lek. Łukasz Adrian Poniatowski

Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurodegeneracyjne i rozwój reakcji zapalnej w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy

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

Promotor: dr hab. n. med. Ilona Joniec-Maciejak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Adriana Wawer

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

SŁOWA KLUCZOWE Atsttrin · Progranulina · Choroba Parkinsona · Neurodegeneracja · Reakcja zapalna · MPTP

KEYWORDS Atsttrin · Progranulin · Parkinson’s disease · Neurodegeneration · Inflammatory reaction · MPTP

Praca doktorska powstała w oparciu o wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu Młodego Badacza nr MB/M/29(53) zatytułowanego:

„Analiza stopnia nasilenia procesów neurozapalnych i neurodegeneracyjnych po domózgowym podaniu Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy”

finansowanego ze środków subwencji uzyskanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny przeznaczonych na naukę przyznanych na podstawie decyzji z dnia 10.06.2020 r.

Numer źródła finansowania: 1M9/M/MB1/N/20

Praca doktorska została wykonana w Laboratorium Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej wchodzącego w skład Centrum Badań Przedklinicznych (CBP) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) oraz operującego w ramach konsorcjum Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT)

Zakup wyposażenia i aparatury był współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013, Priorytet 2 Infrastruktura strefy B+R, Działanie 2.2 Wsparcie tworzenia wspólnej infrastruktury badawczej jednostek naukowych

Pragnę serdecznie i gorąco podziękować:

Pani dr hab. n. med. Ilonie Joniec-Maciejak,
promotorowi mojej rozprawy doktorskiej, za możliwość przeprowadzenia badań, pełne zaangażowanie, życzliwość, dużo cierpliwości, opiekę naukową oraz wszelką pomoc udzieloną w trakcie powstawania niniejszej pracy.

~

Pani dr n. med. Adrianie Wawer,
promotorowi pomocniczemu mojej rozprawy doktorskiej, za nieocenioną pomoc w trudnych początkach pracy doświadczalnej, cenne wskazówki, opiekę naukową oraz wszelką pomoc udzieloną w trakcie powstawania niniejszej pracy.

~

Pani prof. dr hab. n. med. Dagmarze Mirowskiej-Guzel,
kierownikowi Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, za przyjęcie mnie do swojego zespołu i możliwość realizacji badań, stworzenie warunków rozwoju naukowego,liczne wskazówki oraz ogromne pokłady cierpliwości i życzliwości.

~

Pracownikom i zespołowi Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, za nieocenioną i fachową pomoc w realizacji projektu oraz przyjazną atmosferę w trakcie naszej współpracy.

Niniejszą rozprawę pragnę zadedykować mojej najbliższejRodzinie,
dzięki której miałem możliwość kształcić się i zdobywać wiedzę,
którzy zawsze wierzyli w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sam w siebie
wątpiłem i wytrwale wspierali przez wszystkie lata nauki.

Nie ma słów, które wyraziłyby moją wdzięczność za Waszą obecność w moim życiu.

“The brain is the organ of destiny. It holds within its humming mechanism secrets that will determine the future of the human race”

— *Wilder Penfield* —

“Pour grandir de nouveau, l’homme est obligé de se refaire. Et il ne peut pas se refaire sans douleur. Car il est à la fois le marbre et le sculpteur”

— *Alexis Carrel* —

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI 15
SPIS RYCIN 21
SPIS TABEL 31
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 32
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM 40
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM 47
WSTĘP 54
1.1. Choroba Parkinsona 54
1.1.1. Wprowadzenie i rys historyczny 54
1.1.2. Epidemiologia 62
1.1.3. Etiologia 63
1.1.4. Patogeneza 67
1.1.4.1. Zmiany neuropatologiczne 67
1.1.4.2. Zaburzenia funkcji mitochondriów 69
1.1.4.3. Stres oksydacyjny 71
1.1.4.4. Ekscytotoksyczność kwasu glutaminowego 73
1.1.4.5. Zaburzenia funkcji proteasomów 75
1.1.4.6. Reakcja zapalna 77
1.1.4.6.1. Teoria neurozapalna 77
1.1.4.6.2. Zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego 78
1.1.4.6.3. Lokalna reakcja neurozapalna 80
1.1.4.6.4. Rola i funkcja komórek glejowych 81
1.1.4.6.4.1. Komórki mikrogleju 81
1.1.4.6.4.2. Komórki astrogleju 83
1.1.4.6.5. Rola wybranych mediatorów zapalnych i czynników wzrostu 85
1.1.4.6.5.1. Funkcja regulacyjna odpowiedzi immunologicznej 85
1.1.4.6.5.2. Interleukina 1 alfa (IL-1α) 86
1.1.4.6.5.3. Czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF-α) 88
1.1.4.6.5.4. Interleukina 6 (IL-6) 92
1.1.4.6.5.5. Interleukina 10 (IL-10) 93
1.1.4.6.5.6. Interferon gamma (IFN-γ) 95
1.1.4.6.5.7. Cyklooksygenaza 2 (COX-2) 96

1.1.4.6.5.8. Syntaza tlenku azotu (NOS) 96
1.1.4.6.5.9. Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β) 97
1.1.4.6.5.10. Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) 98
1.1.4.7. Zmiany funkcjonowania neuroprzekaźników układu nigrostriatalnego 99
1.1.4.7.1. Układ dopaminergiczny 99
1.1.4.7.1.1. Dopamina 99
1.1.4.7.1.2. Szlaki dopaminergiczne 100
1.1.4.7.1.3. Metabolizm dopaminy 100
1.1.4.7.1.4. Receptory układu dopaminergicznego 103
1.1.4.7.2. Układ serotoninergiczny 104
1.1.4.7.3. Układ glutaminergiczny 104
1.1.4.7.4. Układ GABA-ergiczny 105
1.1.5. Wybrane zwierzęce modele doświadczalne choroby Parkinsona 106
1.1.5.1. Ogólna charakterystyka 106
1.1.5.2. Model wywołany 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) 106
1.1.5.3. Inne modele doświadczalne 115
1.1.6. Wybrane zagadnienia kliniczne 117
1.1.6.1. Objawy neurologiczne 117
1.1.6.2. Diagnostyka 118
1.1.6.3. Terapia 119
1.2. Progranulina (PGRN) oraz związane z nią receptory i szlaki sygnałowe 122
1.2.1. Progranulina (PGRN) 122
1.2.2. Atsttrin 126
1.2.3. Receptory dla PGRN i związane z nimi szlaki sygnałowe 129
1.2.3.1. Sortilina (SORT1) 129
1.2.3.2. Nadrodzina receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNFRSF) 131
1.2.3.2.1. Receptor czynnika martwicy nowotworu 1/2 (TNFR1/2) 131
1.2.3.2.2. Członek TNFRSF 25 (TNFRSF25) 135
1.2.3.3. Efrynowy receptor typu 2A (EPHA2) 135
1.2.3.4. Toll-podobny receptor 9 (TLR9) 136
1.2.4. Ekspresja i regionalna dystrybucja tkankowa 137
1.2.5. Neurobiologiczne aspekty funkcjonowania PGRN 138
1.2.5.1. Ekspresja i tkankowa dystrybucja PGRN w strukturach neuroanatomicznych 138

1.2.5.2. Rola i znaczenie PGRN w fizjologii układu nerwowego 140
1.2.5.3. Zaburzenia funkcji PGRN w chorobach neurodegeneracyjnych 142
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY 144
2.1. Założenia 144
2.2. Cel 144
MATERIAŁ I METODY 146
3.1. Materiał 146
3.1.1. Zwierzęta doświadczalne 146
3.1.2. Grupy włączone do eksperymentu 147
3.1.2.1. Projekt i plan badań 147
3.1.2.2. Etap 1 – analiza kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin 148
3.1.2.3. Etap 2 – ocena wpływu Atsttrin w modelu choroby Parkinsona 151
3.1.2.4. Grupy kontrolne 155
3.1.3. Operacje stereotaktyczne 158
3.1.4. Eksperymentalny model choroby Parkinsona 160
3.1.5. Pobranie i przygotowanie tkanek 161
3.2. Metody 162
3.2.1. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) 162
3.2.1.1. Przygotowanie próbek 162
3.2.1.2. Oznaczenie stężenia monoamin 163
3.2.1.3. Oznaczenie stężenia aminokwasów 164
3.2.2. Metoda Real-Time PCR 165
3.2.2.1. Izolacja RNA z pobranych tkanek 165
3.2.2.2. Synteza cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji 166
3.2.2.3. Reakcja Real-Time PCR 166
3.2.2.4. Ilościowe opracowanie wyników 169
3.2.3. Analiza statystyczna 170
WYNIKI 171
4.1. Analiza ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego za pomocą metod stereotaktycznych na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 171

4.1.1. Wpływ wzrastających dawek Atsttrin podanych do prążkowia (ST) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL 171
4.1.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-1α 171
4.1.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TNF-α 173
4.1.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-6 175
4.1.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-10 177
4.1.1.5. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IFN-γ 179
4.1.1.6. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla COX-2 181
4.1.1.7. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla iNOS 183
4.1.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla nNOS 185
4.1.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TGF-β 187
4.1.1.10. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla BDNF 189
4.1.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TH 191
4.1.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TG2 193
4.1.2. Wpływ wzrastających dawek Atsttrin podanych do prążkowia (ST) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom stężeń wybranych neurotransmiterów u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL 195
4.1.2.1. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin 195
4.1.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DA 195
4.1.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DOPAC 197
4.1.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 3-MT 199
4.1.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HVA 201
4.1.2.1.5. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia DOPAC/DA 203
4.1.2.1.6. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 3-MT/DA 205
4.1.2.1.7. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia HVA/DA 207
4.1.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia NA 209
4.1.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia MHPG 211
4.1.2.1.10. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia MHPG/NA 213
4.1.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HT 215
4.1.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HIAA 217
4.1.2.1.13. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 5-HIAA/5-HT 219

4.1.2.2. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń aminokwasów 221
4.1.2.2.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GLU 221
4.1.2.2.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GABA 223
4.1.2.2.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ALA 225
4.1.2.2.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ASP 227
4.1.2.2.5. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia TAU 229
4.1.2.2.6. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HIS 231
4.1.2.2.7. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia SER 233
4.2. Analiza eksperymentalnego wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych na potencjalny efekt neuroprotekcyjny w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 235
4.2.1. Wpływ empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej do prążkowia (ST) lub istoty czarnej (SN) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL 235
4.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-1α 235
4.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TNF-α 238
4.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-6 241
4.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-10 244
4.2.1.5. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IFN-γ 246
4.2.1.6. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla COX-2 248
4.2.1.7. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla iNOS 250
4.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla nNOS 252
4.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TGF-β 254
4.2.1.10. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla BDNF 256
4.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TH 258
4.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TG2 261
4.2.2. Wpływ empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej do prążkowia (ST) lub istoty czarnej (SN) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom stężeń wybranych neurotransmiterów u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL 264

4.2.2.1. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin 264
4.2.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DA 264
4.2.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DOPAC 267
4.2.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 3-MT 270
4.2.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HVA 273
4.2.2.1.5. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia DOPAC/DA 276
4.2.2.1.6. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 3-MT/DA 279
4.2.2.1.7. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia HVA/DA 282
4.2.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia NA 285
4.2.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia MHPG 288
4.2.2.1.10. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia MHPG/NA 291
4.2.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HT 294
4.2.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HIAA 297
4.2.2.1.13. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 5-HIAA/5-HT 300
4.2.2.2. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń aminokwasów.....303
4.2.2.2.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GLU 303
4.2.2.2.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GABA 306
4.2.2.2.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ALA 309
4.2.2.2.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ASP 312
4.2.2.2.5. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia TAU 315
4.2.2.2.6. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HIS 318
4.2.2.2.7. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia SER 321
DYSKUSJA 324
WNIOSKI 360
PIŚMIENNICTWO 361
OPINIA KOMISJI ETYCZNEJ 423
ZAŁĄCZNIKI 425

SPIS RYCIN

Rycina 1. Biosynteza i metabolizm dopaminy (DA) w obrębie ośrodkowego układu nerwowego 102

Rycina 2. Schemat przebiegu reakcji syntezy MPTP 107

Rycina 3. Schemat przebiegu przemian metabolicznych MPTP 110

Rycina 4. Schemat budowy genu oraz łańcucha polipeptydowego progranuliny (PGRN) z wyszczególnieniem struktury aminokwasowej poszczególnych domen 124

Rycina 5. Schemat budowy łańcucha polipeptydowego Atsttrin z wyszczególnieniem struktury aminokwasowej 127

Rycina 6. Mechanizm aktywacji oraz wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału za pośrednictwem receptora TNFR1 z uwzględnieniem interakcji z PGRN/Atsttrin 133

Rycina 7. Mechanizm aktywacji oraz wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału za pośrednictwem receptora TNFR2 z uwzględnieniem interakcji z PGRN/Atsttrin 134

Rycina 8. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu pierwszej części badania (Etap 1) biorąc pod uwagę rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji 150

Rycina 9. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu pierwszej części badania (Etap 2) biorąc pod uwagę rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji 153

Rycina 10. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu przeprowadzonych procedur oraz interwencji na korespondujących grupach kontrolnych 156

Rycina 11. Procedura wyznaczania współrzędnych stereotaktycznych oraz miejsc trepanacji na podstawie punktów kraniometrycznych na powierzchni czaszki myszy 159

Rycina 12. Ekspresja genu dla IL-1α oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 172

Rycina 13. Ekspresja genu dla TNF-α oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 174

Rycina 14. Ekspresja genu dla IL-6 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 176

Rycina 15. Ekspresja genu dla IL-10 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 178

Rycina 16. Ekspresja genu dla IFN-γ oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 180

Rycina 17. Ekspresja genu dla COX-2 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 182

Rycina 18. Ekspresja genu dla iNOS oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 184

Rycina 19. Ekspresja genu dla nNOS oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 186

Rycina 20. Ekspresja genu dla TGF-β oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 188

Rycina 21. Ekspresja genu dla BDNF oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 190

Rycina 22. Ekspresja genu dla TH oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 192

Rycina 23. Ekspresja genu dla TG2 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 194

Rycina 24. Zmiany stężenia DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 196

Rycina 25. Zmiany stężenia DOPAC oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 198

Rycina 26. Zmiany stężenia 3-MT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 200

Rycina 27. Zmiany stężenia HVA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 202

Rycina 28. Zmiany obrotów DOPAC/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 204

Rycina 29. Zmiany obrotów 3-MT/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 206

Rycina 30. Zmiany obrotów HVA/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 208

Rycina 31. Zmiany stężenia NA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 210

Rycina 32. Zmiany stężenia MHPG oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 212

Rycina 33. Zmiany obrotów MHPG/NA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 214

Rycina 34. Zmiany stężenia 5-HT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 216

Rycina 35. Zmiany stężenia 5-HIAA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 218

Rycina 36. Zmiany obrotów 5-HIAA/5-HT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 220

Rycina 37. Zmiany stężenia GLU oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 222

Rycina 38. Zmiany stężenia GABA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 224

Rycina 39. Zmiany stężenia ALA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 226

Rycina 40. Zmiany stężenia ASP oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 228

Rycina 41. Zmiany stężenia TAU oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 230

Rycina 42. Zmiany stężenia HIS oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 232

Rycina 43. Zmiany stężenia SER oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 234

Rycina 44. Ekspresja genu dla IL-1α oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 237

Rycina 45. Ekspresja genu dla TNF-α oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 240

Rycina 46. Ekspresja genu dla IL-6 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 243

Rycina 47. Ekspresja genu dla IL-10 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 245

Rycina 48. Ekspresja genu dla IFN-γ oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 247

Rycina 49. Ekspresja genu dla COX-2 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 249

Rycina 50. Ekspresja genu dla iNOS oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 251

Rycina 51. Ekspresja genu dla nNOS oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 253

Rycina 52. Ekspresja genu dla TGF-β oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 255

Rycina 53. Ekspresja genu dla BDNF oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 257

Rycina 54. Ekspresja genu dla TH oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 260

Rycina 55. Ekspresja genu dla TG2 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 263

Rycina 56. Zmiany stężenia DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 266

Rycina 57. Zmiany stężenia DOPAC oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 269

Rycina 58. Zmiany stężenia 3-MT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 272

Rycina 59. Zmiany stężenia HVA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 275

Rycina 60. Zmiany obrotów DOPAC/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 278

Rycina 61. Zmiany obrotów 3-MT/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 281

Rycina 62. Zmiany obrotów HVA/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 284

Rycina 63. Zmiany stężenia NA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 287

Rycina 64. Zmiany stężenia MHPG oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 290

Rycina 65. Zmiany obrotów MHPG/NA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 293

Rycina 66. Zmiany stężenia 5-HT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 296

Rycina 67. Zmiany stężenia 5-HIAA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 299

Rycina 68. Zmiany obrotów 5-HIAA/5-HT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 302

Rycina 69. Zmiany stężenia GLU oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 305

Rycina 70. Zmiany stężenia GABA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 308

Rycina 71. Zmiany stężenia ALA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 311

Rycina 72. Zmiany stężenia ASP oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 314

Rycina 73. Zmiany stężenia TAU oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 317

Rycina 74. Zmiany stężenia HIS oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 320

Rycina 75. Zmiany stężenia SER oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL 323

SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka i podział grup ze względu na rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) 149

Tabela 2. Charakterystyka i podział grup ze względu na rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji w trakcie drugiej części badania (Etap 2) 152

Tabela 3. Charakterystyka i podział grup kontrolnych 155

Tabela 4. Sekwencje starterów stosowanych w reakcjach Real-time PCR oraz oczekiwane długości otrzymywanych produktów 168

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3-MT	3-metoksytyramina ($C_9H_{13}NO_2$)
5-HIAA	kwas 5-hydroksyindolooctowy ($C_{10}H_9NO_3$)
5-HT	serotonina ($C_{10}H_{12}N_2O$)
5-HTP	5-hydroksytryptofan ($C_{11}H_{12}N_2O_3$)
6-OHDA	6-hydroksydopamina ($C_8H_{11}NO_3$)
6-OHDOPA	6-hydroksy-3,4-dihydroksyfenyloalanina ($C_9H_{11}NO_5$)
8-OHdG	8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna ($C_{10}H_{13}N_5O_5$)
8-OHG	8-hydroksyguanozyna ($C_{10}H_{13}N_5O_6$)
AA	kwas arachidonowy ($C_{20}H_{32}O_2$)
aa	reszty aminokwasowe (ang. *amino acids*)
AADC	dekarboksylaza aromatycznych L-aminokwasów
AAV	wektor adenowirusowy (ang. *adeno-associated virus*)
AD	choroba Alzheimera (łac. *morbus Alzheimer*)
ADAM17	enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworów alfa
ADAMTS-7	dezintegryna i metaloproteinaza z motywem trombospondyny 7
ADCC	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
ADORA2A	receptor adenozyny A_{2A}
AKT	kinaza białkowa B
ALA	alanina ($C_3H_7NO_2$)
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (łac. *sclerosis lateralis amyotrophica*)
AMPA	kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
AP	oś przednio-tylna (łac. *axis anteroposterior*)
ApoA1	apolipoproteina A1
ARC	jądro łukowate (łac. *nucleus arcuatus*)
ASN	alfa (α)-synukleina
ASP	kwas asparaginowy ($C_4H_7NO_4$)
ATP	adenozyno-5′-trifosforan ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$)
B2M	β2-mikroglobulina
BA	benzyloamina (C_7H_9N)
BBB	bariera krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*)
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
bFGF	podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów 2
BH4	tetrahydrobiopteryna ($C_9H_{15}N_5O_3$)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)
CA	hipokamp (łac. *hippocampus*)
CAIA	zapalenie stawów indukowane przeciwciałami kolagenowymi
CaM	kalmodulina
cAMP	cykliczny adenozyno-3′,5′-monofosforan ($C_{10}H_{12}N_5O_6P$)
CAPN	kaplaina
CASP	kaspaza
CASP5	kaspaza 5

CASP8	prokaspaza 8
CBGTC	pętla korowo-podstawno-wzgórzowo-korowa
CCB	leki z grupy antagonistów wapnia
CCL2	białko chemotaktyczne dla monocytów 1
CCL3	makrofagowe białko zapalne 1 alfa
CCL5	ligand chemokiny 5 z motywem CCL
CD11b	antygen różnicowania komórkowego 11b
CD14	antygen różnicowania komórkowego 14
CD45	antygen różnicowania komórkowego 45
CD54	antygen różnicowania komórkowego 54
cDC	konwencjonalne komórki dendrytyczne
cDNA	komplementarne DNA (ang. *complementary DNA*)
CIA	zapalenie stawów indukowane kolagenem
c-IAP1	białko hamujące apoptozę 1
c-IAP2	białko hamujące apoptozę 2
CMA1	chymaza
Co-IP	koimmunoprecypitacja
COMP	oligomeryczne białko macierzy chrząstki
COMT	katecholo-O-metylotransferaza
COX-2	cykooksygenaza 2
CpG-ODN	oligodeoksynukleotydy cytozyno-guaninowe
CRD	domena bogata w cysteinę (ang. *cysteine-rich domain*)
CRD1	domena bogata w cysteinę 1
CRD2	domena bogata w cysteinę 2
CRD3	domena bogata w cysteinę 3
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*)
CX	kora mózgu (łac. *cortex cerebri*)
CX3CL1	fraktalkina
CXCL1	ligand chemokiny 1 z motywem CXC
CXCL10	ligand chemokiny 10 z motywem CXC
CXCL12	czynnik pochodzenia stromalnego 1
CYCS	cytrochrom C
CYS	cysteina ($C_3H_7NO2_S$)
DA	dopamina ($C_8H_{11}NO_2$)
DAMP	wzorce molekularne związane z uszkodzeniami
DAT	transporter dopaminy
DBS	głęboka stymulacja mózgu (ang. *deep brain stimulation*)
DD	domena śmierci (ang. *death domain*)
DHPG	3,4-dihydroksyfenyloglikol ($C_8H_9NO_4$)
DISC	kompleks sygnałowy indukujący apoptozę
DJ-1	gen kodujący parkinę 7
DLB	otępienie z ciałami Lewy'ego (ang. *dementia with Lewy bodies*)
DOPAC	kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy ($C_8H_8O_4$)
DR3	receptor śmierci 3

DV	oś grzbietowo-brzuszna (łac. *axis ventrodorsalis*)
EAAT-1	transporter aminokwasów pobudzających 1
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
EFNS	European Federation of Neurological Societies
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu
ELA	elastaza
ELANE	elastaza neutrofilowa
EPHA2	efrynowy receptor typu 2A
EPI	epitelina
EPI-1	epitelina 1
EPI-2	epitelina 2
ERK1/2	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy ($C_{27}H_{33}P_2N_9O_{15}$)
FADD	białko adaptorowe FAS związane z domeną śmierci
FAK	kinaza ogniskowo-adhezyjna
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
FIIa	trombina
FMN	mononukleotyd flawinowy ($C_{17}H_{21}N_4O_9P$)
FTLD	otępienie czołowo-skroniowe (ang. *frontotemporal lobar degeneration*)
GABA	kwas gamma-aminomasłowy ($C_4H_9NO_2$)
GABA-T	transaminaza kwasu gamma-aminomasłowego
GAD	dekarboksylaza kwasu glutaminowego
GAP-43	białko związane ze wzrostem 43
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GBA	gen beta(β)-glukocerebrozydazy
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GD	choroba Gauchera (łac. *morbus Gaucher*)
GDNF	glejopochodny czynnik neurotroficzny
GEP	prekursor granuliny-epiteliny
GFAP	kwaśne białko włókienkowe gleju
GLN	glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$)
GLS1	glutaminaza
GLT-1	transporter glutaminianu 1
GLU	kwas glutaminowy ($C_5H_9NO_4$)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie koloni granulocytów i makrofagów
gp130	glikoproteina 130
GP88	glikoproteina 88
GPi	część wewnętrzna gałki bladej (łac. *globus pallidus interna*)
GrB	granzym B
GRN-A	granulina A
GRN-B	granulina B
GRN-C	granulina C
GRN-D	granulina D
GRN-E	granulina E

GRN-F	granulina F
GRN-G	granulina G
GSH	glutation ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)
H&E	metoda barwienia hematoksyliną i eozyną
HIS	histydyna ($C_6H_9N_3O_2$)
HLA-B27	antygen leukocytarny powiązany z antygenem B27
HLA-D	antygen leukocytarny powiązany z antygenem D
HLA-DR	antygen leukocytarny powiązany z antygenem DR
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzym A
HNE	4-hydroksy-2-nonenal ($C_9H_{16}O_2$)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HVA	kwas homowanilinowy ($C_9H_{10}O_4$)
i.p.	podanie dootrzewnowe (ang. *intraperitoneal*)
Iba-1	cząsteczka wiążąca wapń 1
IFN-α	interferon alfa
IFN-γ	interferon gamma
IFN-γR	receptor dla interferonu gamma
IFN-γR1	podjednostka 1 receptora dla interferonu gamma
IFN-γR2	podjednostka 2 receptora dla interferonu gamma
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1
IL-10	interleukina 10
IL-10R	receptor dla interleukiny 10
IL-10R1	podjednostka 1 receptora dla interleukiny 10
IL-10R2	podjednostka 2 receptora dla interleukiny 10
IL-12	interleukina 12
IL-13	interleukina 13
IL-15	interleukina 15
IL-16	interleukina 16
IL-1F	rodzina interleukiny 1
IL-1R	receptory dla interleukiny 1
IL-1R1	receptor dla interleukiny 1 typu 1(CD121a)
IL-1R2	receptor dla interleukiny 1 typu 2 (CD121b)
IL-1RA	antagonista receptora interleukiny 1
IL-1RAcP	białko dodatkowe receptora interleukiny 1
IL-1α	interleukina 1 alfa
IL-1β	interleukina 1 beta
IL-4	interleukina 4
IL-5	interleukina 5
IL-6	interleukina 6
IL-6F	rodzina interleukiny 6
IL-6R	receptor dla interleukiny 6
IL-8	interleukina 8
iNOS	indukowana syntaza tlenku azotu
iPSC	indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

IRAK	kinazy związane z receptorem interleukiny 1
IVDD	choroba zwyrodnieniowa krążka międzykręgowego
JAK	kinazy janusowe
JAK1	kinaza janusowa 1
JNK	N-końcowa kinaza c-Jun
KLK6	neurozyna
L-ARG	L-arginina ($C_6H_{14}N_4O_2$)
L-CYT	L-cytrulina ($C_6H_{13}N_3O_3$)
LDCV	duże gęste pęcherzyki rdzeniowe
L-DOPA	3,4-dihydroksyfenyloalanina ($C_9H_{11}NO_4$)
LEU	leucyna ($C_6H_{13}NO_2$)
LPS	lipopolisacharyd
LRRK2	gen kodujący kinazę bogatą w powtórzenia leucyny typu 2
LT	leukotrieny
L-TRP	L-tryptofan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)
L-TYR	L-tyrozyna ($C_9H_{11}NO_3$)
LTα	limfotoksyna alfa
LUBAC	liniowy kompleks składania łańcucha ubikwityny
MAO	monoaminooksydaza
MAO-A	monoaminooksydaza A
MAO-B	monoaminooksydaza B
MAPT	białko tau związane z mikrotubulami
MCF-7	linia komórkowa Michigan Cancer Foundation-7
M-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MDA	malonylodialdehyd ($C_3H_4O_2$)
mDC	komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego
MDS	International Parkinson and Movement Disorders Society
mGluR1	metabotropowy receptor glutaminergiczny typu 1
mGluR5	metabotropowy receptor glutaminergiczny typu 5
mgp130	błonow a forma glikoproteiny 130
MHC I	cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I
MHC II	cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II
MHC	główny układ zgodności tkankowej
MHPG	3-metoksy-4-hydroksyfenyloetylenoglikol ($C_9H_{12}O_4$)
mIL-6	forma błonowa interleukiny 6
ML	oś środkowo-boczna (łac. *axis mediolateral*)
MMP	enzymy z grupy matałoproteinaz
MMP-12	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 12
MMP-14	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 14
MMP-9	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9
MMSE	Mini Mental State Examination
$MPDP^+$	jon 1-metylo-4-fenylo-2,3-dihydropirydyny
MPP^+	jon 1-metylo-4-fenylopirydynowy
MPPP	1-metylo-4-fenylo-4-propionoamidoksypiryda

MPTP	1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna ($C_{12}H_{15}N$)
MRI	rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*)
MSA	zanik wieloukładowy (ang. *multiple system atrophy*)
MSC	komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*)
mtDNA	mitochondrialne DNA
mTNF-α	błonowa forma czynnika martwicy nowotworów alfa
MyD88	białko adaptacyjne mieloidalnego czynnika różnicowania 88
NA	noradrenalina ($C_8H_{11}NO_3$)
NADPH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$)
NBIA-1	choroba Hallervordena-Spatza (łac. *morbus Hallervorden-Spatz*)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	kappa wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy ($C_5H_9NO_4$)
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
nNOS	neuronalna syntaza tlenku azotu
NO	tlenek azotu
NSC	nerwowe komórki macierzyste
NSPC	nerwowe progenitorowe komórki macierzyste
NT	neurotrofiny
NTS	neurotensyna
NxS	stres nitracyjny
OA	choroba zwyrodnieniowa stawów (ang. *osteoarthritis*)
ODN	oligodeoksynukleotydy
OUN	ośrodkowy układ nerwowy (łac. *systema nervosum centrale*)
OXPHOS	proces fosforylacji oksydacyjnej
OxS	stres oksydacyjny
p38MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenem p38
p44/42 MAPK	kinaza aktywowana mitogenem p44/42
p75NTR	receptor neurotrofin p75
PAF	czynnik aktywujący płytki
PAMP	wzorce molekularne związane z patogenami
para-GRN	paragranulina
PARK2	gen kodujący parkinę 2
PCDGF	czynnik wzrostu pochodzący z komórek PC
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
PDC	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej
pDC	plazmacytoidalne komórki dendrytyczne
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu
PEA	fenyloetyloamina ($C_8H_{11}N$)
PEPI	proepitelina
PET	pozytronowa tomografia emisyjna
PFA	zespół Bradbury'ego-Egglestona (ang. *pure autonomic failure*)
PGD	prostaglandyny

PGI	prostacykliny
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PiD	choroba Picka (łac. *morbus Pick*)
PINK1	gen kodujący kinazę 1 indukowaną PTEN
PLAD	domena asocjacji preligandowej
PLP	fosforan pirydoksalu ($C_8H_{10}NO_6P$)
PRL	prolaktyna
PRO	prolina ($C_5H_9NO_2$)
proNT	proneurotrofina
PRR	receptory rozpoznające wzorzec
PRTN3	proteinaza 3
PSAP	prosapozyna
PTFE	politetrafluoroetylen
PUFA	nienasycone kwasy tłuszczowe
Q10	koenzym Q ($C_{59}H_{90}O_4$)
RA	reumatoidalne zapalenie stawów (ang. *rheumatoid arthritis*)
Red-Ox	potencjał oksydacyjno-redukcyjny
RIP1	białko oddziałujące z receptorem 1
RNS	reaktywne formy azotu
ROS	reaktywne formy tlenu
rRNA	rybosomalne RNA
SCI	uszkodzenie rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury*)
SDS-PAGE	elektroforeza żelowa
SEM	błąd standardowy średniej (ang. *standard error of the mean*)
SER	seryna ($C_3H_7NO_3$)
sgp130	postać wolna glikoproteiny 130
sIL-6	postać wolna interleukiny 6
SLE	toczeń rumieniowaty układowy (łac. *lupus erythematosus systemicus*)
SLPI	inhibitor proteazy leukocytarnej
SMAD3	matka przeciwko dekapentaplegicznemu homologowi 3
SN	istota czarna (łac. *substantia nigra*)
SNpc	część zbita istoty czarnej (łac. *substantia nigra pars compacta*)
SODD	białko wyciszające domenę śmierci
SP1	białko specyficzności 1
SPECT	tomografia emisyjna pojedynczych fotonów
SPR	powierzchniowego rezonansu plazmonowego
SSA	semialdehyd bursztynowy ($C_4H_6O_3$)
ST	prążkowie (łac. *striatum*)
STAT	białka przetwarzające i aktywujące transkrypcję
STN	jądro niskowzgórzowe (łac. *nucleus subthalamicus seu Luysi*)
sTNF-α	postać wolna czynnika martwicy nowotworów alfa
SV	pęcherzyk synaptyczny
SVZ	strefia podkomorowa komór bocznych (ang. *subventricular zone*)
TAB1	białko wiążące kinazę TAK1

TAB2	białko wiążące kinazę TAK2
TAK1	kinaza 1 aktywowana przez transformujący czynnik wzrostu
TAU	tauryna ($C_2H_7NO_3S$)
TCA	cykl kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa)
TDP-43	wtręty białkowe TAR-wiążące DNA 43 kDa
TG2	transglutaminaza typu 2
TGF-e	transformujący czynnik wzrostu e
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta
TH	hydroksylaza tyrozynowa
Thr	treonina ($C_4H_9NO_3$)
TK	tomografia komputerowa
TL1A	białko 1A typu czynnika martwicy nowotworów
TLR	receptory Toll-podobne
TLR9	Toll-podobny receptor 9
TNFR1	receptor dla czynnika martwicy nowotworów alfa typu 1
TNFR2	receptor dla czynnika martwicy nowotworów alfa typu 2
TNFRSC	kompleksy sygnałowe receptorów TNF
TNFRSF	nadrodzina receptorów czynnika martwicy nowotworu
TNFRSF25	członek 25 nadrodziny receptora czynnika martwicy nowotworu
TNFSF	nadrodzina czynika martwicy nowotworów
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów alfa
TPH	hydroksylaza tryptofanowa
TPSO	białko translokacyjne
TRADD	białko domeny śmierci związane z receptorem typu 1 dla TNF
TRAF2	czynnik związany z receptorem TNF 2
TRAF3	czynnik związany z receptorem TNF 3
TrkB	receptor kinazy tropomiozyny B
tRNA	transportujące RNA
TxA	tromboksany
TYK2	kinaza tyrozynowa 2
TβRI	podjednostka typu I receptora dla TGF
TβRII	podjednostka typu II receptora dla TGF
Ub	ubikwityna
UBL-E3	ligaza ubikwitynowa E3
UKPDSBB	United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank
USG	badanie ultrasonograficzne
Vim	jądro brzuszne pośrednie (łac. *nucleus ventralis intermedius*)
VLDL	lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości
VMAT2	pęcherzykowy transporter monoamin 2
VMH	jądro brzuszno-przyśrodkowe (łac. *nucleus ventromedialis*)
VPS10	białko wakuolowe 10
VTA	części brzuszna nakrywki (łac. *area tegmentalis ventralis*)
WB	Western blot
Y2H	drożdżowy system dwuhybrydowy

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Choroba Parkinsona stanowi jedną z najczęściej występujących w populacji przewlekłą chorobę neurodegeneracyjną dotykającą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Szacuje się, że na świecie żyje około 10 milionów ludzi z rozpoznaną chorobą Parkinsona. Wystąpienie choroby związane jest w znacznym stopniu z pogorszeniem jakości życia, oraz pomimo zastosowanego leczenia zachowawczego i operacyjnego, prowadzi do stopniowej utraty samodzielności oraz inwalidztwa, głównie w populacji osób starszych. Klasyczna definicja choroby Parkinsona zakłada występowanie kardynalnych objawów motorycznych, takich jak: spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe, sztywność mięśniowa oraz kompleksowe zaburzenia odruchów posturalnych wyrażających się kompleksowo pod postacią zespołu hipertoniczno-hipokinetycznego. Zaburzenia pozaruchowe choroby obejmują m.in. zaburzenia autonomiczne, zaburzenia neuropsychiatryczne związane z pogorszeniem funkcji poznawczych, dysfunkcje czuciowe oraz zaburzenia snu, których nasilenie nie koreluje zazwyczaj z aktualnym stanem sprawności motorycznej chorego. Wystąpienie objawów neurologicznych stanowi efekt kompleksowego zachwiania równowagi między systemami neuroprzekaźnikowymi nie tylko w obrębie zwojów podstawy, lecz także w całym systemie neuronalnym zawiadującym funkcjami ruchowymi. Następcze zaburzenia projekcji w innych układach neuroprzekaźnikowych stanowią przyczynę pojawienia się objawów pozaruchowych, wykraczających poza typowe objawy osiowe. Aktualnie opisano i scharakteryzowano kilka grup czynników etiopatologicznych ryzyka wystąpienia choroby Parkinsona o różnym znaczeniu. Do szeregu zidentyfikowanych czynników modyfikowalnych i niemodyfikowalnych, w wysokim stopniu predysponujących do wystąpienia schorzenia, opierając się na teorii wieloczynnikowej, należy zaliczyć m.in. zaawansowany wiek, płeć, czynniki środowiskowe, czynniki genetyczne, jak również styl życia oraz dietę. Istotą patogenezy choroby Parkinsona jest kaskada zdarzeń prowadzących w efekcie do degeneracji kontrolujących funkcje ruchowe neuronów dopaminergicznych z późniejszą depigmentacją istoty czarnej (SN), czemu towarzyszy konsolidacja dysfunkcyjnych neurofibrylarnych związków białkowych zawierających alfa (α)-synukleinę (ASN) oraz spadek poziomu stężenia dopaminy (DA) w obrębie struktur układu nigrostriatalnego. Do pozostałych czynników patogenetycznych można zaliczyć zaburzenia funkcji mitochondriów, stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność kwasu glutaminowego (GLU),

zaburzenia funkcji proteasomów, jak również występującą reakcję zapalną. Aktualnie uważa się, że miejscowa i uogólniona odpowiedź układu immunologicznego pełni znaczącą rolę w patogenezie choroby Parkinsona, jak również innych schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym. Ponadto, wiadomo również, że reakcja neurozapalna w obrębie OUN stanowi proces, który z jednej strony może nasilać zjawisko neurodegeneracji, jak również stanowić protekcyjny mechanizm kompensacyjny uruchamiany w obszarze uszkodzonych neuronów. Analiza wciąż rosnącej liczby doniesień ukierunkowuje w tym przypadku uwagę na szczególną rolę reakcji neurozapalnej w patogenezie choroby Parkinsona. Aktualnie wielu niezależnych autorów skupia się w swoich pracach nad identyfikacją oraz precyzyjnym opisem mechanizmów zapalnych odpowiedzialnych za rozwój procesów neurodegeneracyjnych wskazując pośrednio na szczególne znaczenie tego zagadnienia. Złożony przebieg choroby Parkinsona, jak również dążenie do optymalizacji i uzyskania najlepszych efektów leczenia wymaga wielospecjalistycznej opieki oraz interdyscyplinarnego podejścia. Model kompleksowej, koordynowanej terapii oraz opieki obejmuje postępowanie farmakologiczne, rehabilitację, psychoterapię, leczenie operacyjne, jak również pozostałe terapie pozafarmakologiczne. Główne cele leczenia w chorobie Parkinsona obejmują spowolnienie postępu choroby, zmniejszenie nasilenia objawów ruchowych, zapobieganie lub opóźnienie pojawienia się powikłań oraz kontrolę objawów pozaruchowych. Najważniejszym celem leczenia choroby Parkinsona jest trwałe uzupełnienie niedoboru DA, jak również odbudowa prawidłowych szlaków korowo-podkorowych w mózgu, co jest obecnie przedmiotem prowadzonych badań w fazie eksperymentalnej. Aktualnie równolegle rozwijanym kierunkiem badań terapii choroby Parkinsona jest wzbogacenie tkanki nerwowej w określone związki i białka poprzez bezpośrednie podanie domózgowe za pomocą metod stereotaktycznych aktywnych form czynników wzrostu, neuromorfogenów, cytokin, związków neuroprotekcyjnych oraz rekombinowanych form pochodnych tych związków do struktur głębokich mózgu lub układu komorowego. Istotą obecnie wytyczonych nowoczesnych kierunków i wyzwań w terapii choroby Parkinsona jest udoskonalenie i optymalizacja leczenia farmakologicznego, jak również zastosowanie osiągnięć medycyny regeneracyjnej w zakresie możliwie trwałego uzupełnienia niedoboru DA poprzez odbudowę prawidłowych szlaków i połączeń korowo-podkorowych w mózgu powodując kliniczną poprawę u leczonych pacjentów. Niestety, mimo ogromnego postępu w zrozumieniu patomechanizmów leżących u podstaw choroby Parkinsona,

nadal nie jest dostępna terapia stanowiąca leczenie przyczynowe, która efektywnie zatrzymałaby lub spowolniła jej naturalny przebieg. W związku z tym aktualnie trwają badania i poszukiwania nowych skutecznych związków farmakologicznych, sposobów potencjalizacji działania poznanych wcześniej leków oraz innowacyjnych metod operacyjnych terapii choroby Parkinsona. Aktualna wiedza i dane eksperymentalne na temat poszczególnych koncepcji mechanizmów śmierci neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie SN stanowią efekt znacznego rozwoju warsztatu badawczego, wykorzystującego zwierzęce modele doświadczalne choroby Parkinsona. Punktem wyjścia do ich opracowania stanowiło w dużym zakresie wykrycie szeregu związków posiadających silne właściwości neurotoksyczne w odniesieniu do neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie układu nigrostriatalnego. Podstawowe modele eksperymentalne choroby Parkinsona, które są obecnie najczęściej wykorzystywane w badaniach doświadczalnych bazują na związkach, które wykazują wysoki stopień neurotoksyczności i jednocześnie trwale uszkadzają neurony dopaminergiczne. Jedną z takich substancji jest 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP), stanowiąca produkt uboczny syntezy pochodnych heroiny, której efekt farmakologiczny związany jest z powtarzalnym i specyficznym zwyrodnieniem neuronów dopaminergicznych oraz ich zakończeń w obrębie prążkowa (ST), jak również wystąpieniem typowych objawów parkinsonowskich u naczelnych oraz u wybranych gatunków gryzoni. Modele zakładające użycie chlorowodorku MPTP (MPTP-HCL) stanowią swoisty złoty standard dla eksperymentów i badań nad patofizjologią śmierci neuronów dopaminergicznych w przebiegu choroby Parkinsona, najpełniej odwzorowując zarówno symptomy choroby, jak również powstający ubytek funkcji szlaku nigrostriatalnego.

W ostatnim czasie endogenne białko pełniące funkcję czynnika wzrostu, jakim jest progranulina (PGRN) zwróciło szczególną uwagę badaczy ze względu na silne i specyficzne działanie neurotroficzne, przeciwzapalne oraz immunomodulujące. Analizując cechy klasyfikacji ewolucyjnej i strukturalnej, PGRN wydaje się jak dotąd unikatową cząsteczką, której nie można jednoznacznie zaklasyfikować do żadnej znanej rodziny czynników wzrostu. Może ona wykazywać jednocześnie działanie czynnika wzrostu, cząsteczki przeciwzapalnej, adipokiny oraz stanowić źródło poszczególnych domen granulin (GRN) o potencjalnie zapalnym działaniu. Przeprowadzone badania przedkliniczne z wykorzystaniem myszy transgenicznych oraz analizy pośmiertne na ludziach przy użyciu metod proteomicznych, transkryptomicznych oraz

immunofluorescencyjnych pozwoliły zapewnić wgląd we wzorzec ekspresji genu PGRN oraz stopień indukcji jego produktów białkowych w obrębie tkanki nerwowej. Ocena poszczególnych populacji komórkowych OUN wykazuje, że ekspresja PGRN jest konstytutywnie obecna na powierzchni neuronów oraz nieaktywnego mikrogleju, podczas gdy nie obserwuje się jej na astrocytach oraz ependymocytach. Przeprowadzone do tej pory badania na modelach eksperymentalnych oraz w warunkach klinicznych, w ramach innych układów narządowych mocno ugruntowały rolę PGRN jako czynnika biorącego udział w reakcji zapalnej. PGRN stanowi istotny czynnik biorący udział w reakcji neurozapalnej pełniąc rolę immunomodulującą i wykazując szerokospektralne działanie przeciwzapalne oraz hamując aktywność mikrogleju. W tym przypadku utrata funkcji PGRN w obrębie tkanki nerwowej prowadzi do ogólnych zaburzeń funkcji lizosomów, nadmiernej produkcji składników dopełniacza, jak również deregulacji oraz nadmiernej odpowiedzi neurozapalnej skutkując ostatecznie wystąpieniem złożonych zmian neuropatologicznych. Implikowaną rolę PGRN należy traktować jako jedną ze składowych elementów skoordynowanego i wieloczynnikowego mechanizmu neurofizjologicznego. Analiza dostępnych opracowań i badań wskazuje, iż identyfikacja mutacji w genie PGRN jest potencjalnie związana z predyspozycją do wystąpienia chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, w tym choroby Parkinsona. Atsttrin stanowi zmodyfikowaną cząsteczkę białka, którego budowa jest oparta na strukturze łańcucha polipeptydowego PGRN. Przeprowadzone do tej pory analizy i badania pozwoliły zaobserwować szereg strukturalnych i funkcjonalnych właściwości Atsttrin, które są związane z mechanizmami molekularnymi interakcji tego związku z receptorami dedykowanymi czynnikowi martwicy nowotworów alfa (TNF-α), takim jak receptor typu 1 (TNFR1) oraz typu 2 (TNFR2). Zaobserwowano, że w skład łańcucha polipeptydowego PGRN wchodzą trzy domeny, które mogą wiązać się do receptorów TNFR1 oraz TNFR2 w sposób niezależny, co wydaje się potencjalnie możliwe poprzez wewnętrzne zwijanie się ich sekwencji łącznikowych, co wynika z drugorzędowej oraz trzeciorzędowej struktury białka. W przeciwieństwie do PGRN, nie stwierdzono aby Atsttrin ulegało rozpadowi i uwalniało domeny GRN o działaniu zapalnym w przypadku ekspozycji na enzymy proteolityczne rozszczepiające PGRN. Ta sama strukturalna właściwość pozwala zachować Atsttrin powinowactwo do receptorów TNFR1 oraz TNFR2 oraz potencjalnie uniknąć efektów biologicznych charakterystycznych dla działania cytokin i czynników wzrostu. Przeprowadzone badania doświadczalne wskazują, że Atsttrin

może stanowić obecnie jeden z bardziej obiecujących i innowacyjnych środków terapeutycznych w leczeniu stanów związanych z zapaleniem stawów, takich jak choroba zwyrodnieniowa stawów (OA) i reumatoidalne zapalenie stawów (RA) poprzez bezpośrednie wiązanie się z TNFR1 oraz TNFR2, jak również równoległe antagonistyczne działanie względem TNF-α, wykazując w tym mechanizmie swoje właściwości przeciwzapalne.

Założeniem i celem pracy doktorskiej była ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6. Przeprowadzone procedury eksperymentalne i badawcze miały na celu wyjaśnienie czy zastosowanie Atsttrin może być potencjalnie skuteczne w terapii choroby Parkinsona wykazując zakładane działanie neuroprotekcyjne, jak również potencjalnie implikować opracowanie a następnie zastosowanie w przyszłości nowych celowanych terapii opartych na tym związku w praktyce klinicznej. Dodatkowym założeniem pracy było pogłębienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin, jak również optymalizacja i walidacja alternatywnej metody podania związku obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję tego związku. W pierwszym, wstępnym etapie przeprowadzono analizę ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego do ST za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Etap ten obejmował wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź i dawka-efekt, poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej, koniecznej do identyfikacji potencjalnej, skutecznej terapeutycznie i bezpiecznej dawki Atsttrin w obrębie wybranych struktur mózgu takich jak hipokamp (CA), kora (CX), móżdżek (CM) oraz ST. W drugim, właściwym etapie oceniano kolejno wpływ bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Etap ten obejmował ocenę potencjalnie neuroprotekcyjnego wpływu Atsttrin na przebieg procesów neurodegeneracyjnych i rozwój reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu takich jak CA, CX, CM oraz ST. Predefiniowana wartość zakresu obejmującego pięć wzrastających dawek Atsttrin wynoszących odpowiednio 0.1 µg (0.025 µg/µl), 0.5 µg

(0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl), 2 μg (0.5 μg/μl) oraz 5 μg (1.25 μg/μl) została ekstrapolowana i wyznaczona na podstawie danych literaturowych z wcześniej przeprowadzonych badań dotyczących układu mięśniowo-szkieletowego w analogicznych mysich modelach chorób. Panel analizowanych parametrów obejmował kolejno ekspresję cytokin i mediatorów zapalnych (IL-1α, TNF-α, IL-6, IFN-γ oraz COX-2), ekspresję cytokin i mediatorów przeciwzapalnych (IL-10), ekspresję parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego (iNOS oraz nNOS), ekspresję czynników wzrostu i neurotroficznych (TGF-β oraz BDNF), jak również ekspresję enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów (TH oraz TG2) mierzoną za pomocą metody Real-time PCR. Ponadto dokonano analizy ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin (DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA), jak również stężeń aminokwasów (GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER) mierzonych za pomocą metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zgodnie z danymi uzyskanymi z analizy ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt oraz wynikami odczytanymi z wykreślonej krzywej wzorcowej celem przeprowadzenia i uzupełnienia dalszej, właściwej części badania wybrano dawkę 0.5 μg (0.125 μg/μl), która zapewniała optymalny efekt farmakologiczny i charakteryzowała się jednocześnie dostatecznie wysokim poziomem bezpieczeństwa w mikrośrodowisku tkanki mózgu. Obserwowane zmiany wartości analizowanych parametrów po zastosowaniu tej dawki Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 znajdują w tym przypadku swoje subiektywnie zbliżone odbicie w obserwowanych efektach przeciwzapalnych wykazanych w czasie wcześniejszych badań tego związku w innych modelach jednostek chorobowych oraz układach narządowych. W drugiej, właściwej części, kolejno zwiększono panel grup badanych i kontrolnych uwzględniając rozszerzony zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji o zwierzęta poddane iniekcji do SN. Na tym etapie wykonano również stereotaktyczne podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN u myszy niepoddanych innym interwencjom. Panel parametrów analizowany w drugiej części badania obejmował ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym oraz analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego w podobnym zakresie jak w trakcie pierwszej części badania. Stwierdzono, iż bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg

(0.125 µg/µl) za pomocą metod stereotaktycznych do ST oraz SN jest związane z zahamowaniem procesów neurodegeneracyjnych oraz reakcji zapalnej w obrębie ST, CA, CX oraz CM w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Dodatkowo zaobserwowano, iż bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) za pomocą metod stereotaktycznych do ST oraz SN jest związane z wystąpieniem zmian poziomów ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym, jak również ze zmianą ośrodkowego profilu neurochemicznego aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

Jak wykazano, uzyskane wyniki pozwoliły na zweryfikowanie czy zastosowanie Atsttrin może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona. Wykonanie bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin wywiera efekt neuroprotekcyjny na uszkodzone neurony wchodzące w skład szlaku nigrostriatalnego. Jednym z podstawowych mechanizmów neuroprotekcyjnego działania Atsttrin jest hamujący i modulujący wpływ na kinetykę ekspresji wybranych mediatorów reakcji zapalnej. Przedstawione wyniki skłaniają do prowadzenia dalszych badań służących pogłębieniu wiedzy na temat Atsttrin dotyczących farmakologicznych mechanizmów działania tego związku, optymalizacji metod jego podawania, jak również co za tym idzie jego potencjalnego zastosowania w warunkach klinicznych.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Parkinson's disease is one of the most common chronic neurodegenerative disease affecting the central nervous system (CNS). It is estimated that approximately 10 million people worldwide are diagnosed with Parkinson's disease. The occurrence of the disease is largely associated with deterioration in the quality of life and, despite conservative and surgical treatment, leads to a gradual loss of independence and disability, mainly in the elderly population. The classic definition of Parkinson's disease assumes the occurrence of cardinal motor symptoms, such as slowness of movement, resting tremor, muscle stiffness and comprehensive disorders of postural reflexes, expressed comprehensively in the form of hypertonic-hypokinetic syndrome. Non-motor disorders of the disease include, among others, autonomic disorders, neuropsychiatric disorders associated with deterioration of cognitive functions, sensory dysfunctions and sleep disorders, the severity of which usually does not correlate with the current state of the patient's motor skills. The occurrence of neurological symptoms is the result of comprehensive imbalance between neurotransmitter systems, not only in the basal ganglia, but in the entire neuronal system controlling motor functions. Subsequent projection disturbances in other neurotransmitter systems cause the appearance of non-motor symptoms that go beyond typical axial symptoms. Currently, several groups of etiopathological risk factors for Parkinson's disease with different significance have been described and characterized. A number of identified modifiable and non-modifiable factors that predispose to a high degree to the occurrence of the disease, based on the multifactor theory, include advanced age, gender, environmental factors, genetic factors, as well as lifestyle and diet. The essence of the pathogenesis of Parkinson's disease constitutes a cascade of events leading to the loss of dopaminergic neurons controlling motor functions with subsequent depigmentation of the substantia nigra (SN), accompanied by the consolidation of dysfunctional neurofibrillary protein compounds containing alpha (α)-synuclein (ASN) and decrease in the level of dopamine (DA) within the structures of the nigrostriatal system. Other pathogenic factors include mitochondrial dysfunction, oxidative stress, glutamate (GLU) excitotoxicity, proteasome dysfunction, as well as the inflammatory reaction. It is currently believed that the local and generalized response of the immune system plays a significant role in the pathogenesis of Parkinson's disease, as well as other neurodegenerative diseases. Moreover, it is also known that the neuroinflammatory

reaction within the CNS is a process that, on the one hand, may intensify the phenomenon of neurodegeneration, as well as constitute a protective, compensatory mechanism activated in the area of damaged neurons. The analysis of the ever-increasing number of reports draws attention to the special role of the neuroinflammatory reaction in the pathogenesis of Parkinson's disease. Currently, many independent authors focus their work on the identification and precise description of inflammatory mechanisms responsible for the development of neurodegenerative processes, indirectly pointing to the particular importance of this issue and the development of this field of research. The complex course of Parkinson's disease, as well as the pursuit of optimization and obtaining the best treatment effects, requires multidisciplinary care and an interdisciplinary approach. The model of comprehensive, coordinated therapy and care includes pharmacological treatment, rehabilitation, psychotherapy, surgical treatment, as well as other non-pharmacological therapies. The main goals of treatment in Parkinson's disease include slowing the progression of the disease, reducing the severity of motor symptoms, preventing or delaying the onset of complications, and controlling non-motor symptoms. The most important goal of Parkinson's disease treatment is to permanently replenish DA deficiency and, as yet unachieved, to rebuild normal cortical-subcortical pathways in the brain, which is currently the subject of ongoing research in the experimental phase. Currently, a parallel research direction in the treatment of Parkinson's disease is the enrichment of the nervous tissue with specific compounds and proteins through direct intracerebral administration using stereotaxic methods of active forms of growth factors, neuromorphogens, cytokines, neuroprotective compounds and recombinant forms of derivatives of these compounds to the deep structures of the brain or the ventricular system. The essence of the currently set modern directions and challenges in the treatment of Parkinson's disease is to improve and optimize the pharmacological treatment, as well as the application of the achievements of regenerative medicine in the field of possibly permanent replenishment of DA deficiency by rebuilding normal cortical-subcortical pathways and connections in the brain, resulting in clinical improvement in treated patients. Unfortunately, despite enormous progress in understanding the pathomechanisms underlying Parkinson's disease, there is still no causal therapy available that would effectively stop or slow down its natural course. Therefore, research and search for new effective pharmacological compounds, methods of potentiating the action of previously known drugs and innovative surgical methods of

Parkinson's disease therapy are currently underway. Current knowledge and experimental data on individual concepts of the mechanisms of death of dopaminergic neurons located within the SN are the result of significant development of research techniques using animal experimental models of Parkinson's disease. The starting point for their development was, to a large extent, the detection of a number of compounds with strong neurotoxic properties in relation to dopaminergic neurons located within the nigrostriatal system. The basic experimental models of Parkinson's disease that are currently most often used in experimental research are based on compounds that exhibit a high degree of neurotoxicity and at the same time permanently damage dopaminergic neurons. One of the representatives of such substances is 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) which is a by-product of the synthesis of heroin derivatives, the pharmacological effect of which is related to the repetitive and specific degeneration of dopaminergic neurons and their endings in the striatum (ST), as well as the occurrence of typical parkinsonian symptoms in primates and in selected rodent species. Models assuming the use of MPTP hydrochloride (MPTP-HCL) constitute a gold standard for experiments and research on the pathophysiology of dopaminergic neuron death in the course of Parkinson's disease, most fully reflecting both the symptoms of the disease and the resulting loss of function of the nigrostriatal pathway.

Recently, the endogenous protein acting as growth factor, progranulin (PGRN) has attracted special attention of researchers due to its strong and specific neurotrophic, anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Analyzing the features of the evolutionary and structural classification, PGRN seems to be a unique molecule that cannot be clearly classified into any known family of growth factors, where it may simultaneously act as a growth factor, an anti-inflammatory molecule, an adipokine and be the source of individual granulin (GRN) domains with potentially inflammatory effect. Preclinical studies conducted using transgenic mice and post-mortem analyzes in humans using proteomic, transcriptomic and immunofluorescence methods allowed to provide insight into the expression pattern of the PGRN gene and the degree of induction of its protein products within the nervous tissue. Assessment of individual CNS cell populations shows that PGRN expression is constitutively present on the surface of neurons and inactive microglia, while it is not observed on astrocytes and ependymocytes. Studies conducted so far in experimental models and in clinical conditions in other organ systems have firmly established the role of PGRN as a factor involved in the inflammatory response. PGRN constitutes an important factor involved

in the neuroinflammatory reaction, playing an immunomodulatory role, demonstrating a broad-spectrum anti-inflammatory effect by inhibiting the activity of microglia. In this case, the loss of PGRN function within the nervous tissue leads to the general disturbances of lysosomal function, excessive production of complement components, as well as deregulation and excessive neuroinflammatory response, ultimately resulting in complex neuropathological changes. The implicated role of PGRN should be collectively considered as one of the components of a coordinated and multifactorial neurophysiological mechanism. The analysis of available studies and research indicates that the identification of mutations in the PGRN gene is potentially associated with the predisposition to neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease. Atsttrin is a modified protein molecule which structure is based on the structure of the PGRN polypeptide chain. The analyzes and studies carried out so far have allowed us to observe a number of structural and functional properties of Atsttrin, which are related to the molecular mechanisms of its interaction with receptors dedicated to tumor necrosis factor alpha (TNF-α), such as the type 1 receptor (TNFR1) and type 2 (TNFR2). It was observed that the PGRN polypeptide chain includes three domains that can bind to TNFR1 and TNFR2 receptors independently, which seems potentially possible through the internal folding of their linker sequences, which results from the secondary and tertiary structure of the protein. Unlike PGRN, Atsttrin was not found to be degraded and release inflammatory GRN domains when exposed to proteolytic enzymes that cleave PGRN. This same structural property allows Atsttrin to retain its affinity for binding to TNFR1 and TNFR2 receptors and potentially avoid biological effects characteristic of action on cytokines and growth factors. Experimental studies conducted indicate that Atsttrin may currently be one of the more promising and innovative therapeutic agents in the treatment of arthritis-related conditions, such as osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) by directly binding to TNFR1 and TNFR2, as well as a parallel antagonistic effect against TNF-α, demonstrating its anti-inflammatory properties in this mechanism.

The assumption and aim of the doctoral thesis was to evaluate the effect of direct bilateral intracerebral administration of Atsttrin using stereotaxic methods in an experimental model of Parkinson's disease induced by intraperitoneal intoxication of MPTP-HCL in C57BL/6 mice. The experimental and research procedures carried out were aimed at clarifying whether the use of Atsttrin could be potentially effective in the treatment of Parkinson's disease, demonstrating the assumed neuroprotective effect, as

well as potentially implying the development and subsequent use in the future of new targeted therapies based on this compound in clinical practice. An additional aim of the study was to deepen the knowledge regarding the pharmacological mechanisms of action of Atsttrin, as well as to optimize and validate an alternative method of administering the compound, including direct stereotaxic intracerebral injection in an experimental model in C57BL/6 mice. In the first, preliminary stage, an analysis of the overall kinetics of the effect of increasing doses of Atsttrin applied during direct bilateral intracerebral administration to the ST was performed using stereotaxic methods in an experimental model of Parkinson's disease in C57BL/6 strain mice subjected to intraperitoneal intoxication with MPTP-HCL. This stage included determining the dose-response and dose-effect relationships by plotting a standard curve necessary to identify a potentially therapeutically effective and safe dose of Atsttrin within selected brain structures such as the hippocampus (CA), cortex (CX), cerebellum (CM) and ST. In the second, appropriate stage, the effect of direct bilateral intracerebral administration of an empirically determined dose of Atsttrin to the ST or SN was assessed using stereotaxic methods in an experimental model of Parkinson's disease in C57BL/6 strain mice subjected to intraperitoneal intoxication with MPTP-HCL. This stage included the assessment of the potentially neuroprotective effect of Atsttrin on the course of neurodegenerative processes and the development of the inflammatory reaction within selected brain structures such as the CA, CX, CM and ST. Predefined range value of five increasing Atsttrin doses of 0.1 μg (0.025 μg/μl), 0.5 μg (0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl), 2 μg (0.5 μg/μl), and 5 μg (1.25 μg/μl) was extrapolated and determined on the basis of literature data from previously conducted studies on the musculoskeletal system in analogous animal models in mice. The panel of analyzed parameters included the expression of cytokines and inflammatory mediators (IL-1α, TNF-α, IL-6, IFN-γ and COX-2), the expression of anti-inflammatory cytokines and mediators (IL-10), and the expression of stress parameters oxidative and nitrative (iNOS and nNOS), the expression of growth and neurotrophic factors (TGF-β and BDNF), as well as the expression of enzymes related to the metabolism of neurotransmitters (TH and TG2) measured using the Real-time PCR method. In addition, the central neurochemical profile was analyzed by assessing the concentrations of monoamines (DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT and 5-HIAA), as well as amino acids (GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS and SER) measured using the high performance liquid chromatography (HPLC) method.

According to the data obtained from the analysis of the general kinetics of the impact of increasing doses of Atsttrin on the dose-response and dose-effect relationships and the results read from the plotted standard curve, in order to conduct and complete the further, appropriate part of the study, a dose of 0.5 μg (0.125 μg/μl) was selected, which showed in this case, an optimal pharmacological effect and was characterized by a sufficiently high level of safety in the brain tissue microenvironment. The observed changes in the values of the analyzed parameters after the use of this dose of Atsttrin in an experimental model of Parkinson's disease caused by intraperitoneal intoxication of MPTP-HCL in mice of the C57BL/6 strain are in this case subjectively similar reflected in the observed anti-inflammatory effects demonstrated during previous studies of this compound on other models of units. diseases and organ systems. In the second, relevant part, the panel of test and control groups was successively increased, taking into account the extended scope of procedures and interventions performed to include animals injected into the SN. At this stage, stereotaxic administration of Atsttrin at a dose of 0.5 μg (0.125 μg/μl) was also performed into the ST or SN structures in mice not subjected to other interventions. The panel of parameters analyzed in the second part of the study included the expression of selected mediators, factors and enzymes at the transcriptional level and the analysis of changes in the central neurochemical profile to a similar extent as during the first part of the study. It was found that direct bilateral intracerebral administration of Atsttrin at a dose of 0.5 μg (0.125 μg/μl) using stereotaxic methods to the ST and SN is associated with the inhibition of neurodegenerative processes and the inflammatory reaction in the ST, CA, CX and CM in an experimental model of Parkinson's disease in C57BL/6 strain mice subjected to intraperitoneal intoxication with MPTP-HCL. Additionally, it was observed that direct bilateral intracerebral administration of Atsttrin at a dose of 0.5 μg (0.125 μg/μl) using stereotaxic methods to the ST and SN is associated with changes in the expression levels of selected mediators, factors and enzymes at the transcriptional level as well as changes in the central neurochemical profile of amino acids. and monoamines in C57BL/6 strain mice not subjected to any additional experimental procedure.

As demonstrated, the obtained results allowed us to collectively verify whether the use of Atsttrin may constitute a new, potentially promising pharmacological element of the therapeutic strategy for the treatment of Parkinson's disease in the future. In this case, direct intracerebral administration of Atsttrin has a neuroprotective effect on damaged neurons that are part of the nigrostriatal pathway. One of the basic

mechanisms of the neuroprotective effect of Atsttrin is the inhibitory and modulatory effect on the kinetics of the expression of selected mediators of the inflammatory reaction. The presented results encourage further research to deepen knowledge about Atsttrin regarding the pharmacological mechanisms of action of this compound, optimization of its administration methods as well as its further potential use in clinical conditions.

WSTĘP

1.1. Choroba Parkinsona

1.1.1. Wprowadzenie i rys historyczny

Choroba Parkinsona (łac. *morbus Parkinsoni*) stanowi jedną z najczęściej występujących w populacji chorobę neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [1]. Wystąpienie choroby jest związane w znacznym stopniu z pogorszeniem jakości życia oraz pomimo zastosowanego leczenia zachowawczego i operacyjnego, prowadzi do stopniowej utraty samodzielności oraz inwalidztwa głównie u osób starszych [2]. Istotą neuropatologicznych zmian zachodzących w chorobie jest stopniowa utrata neuronów dopaminergicznych wraz z następczym wystąpieniem zaburzeń równowagi między neuroprzekaźnikami [3, 4]. Efektem powstałych zmian jest następcze wystąpienie objawów związanych z uszkodzeniem układu pozapiramidowego (łac. *systema extrapyramidale*) oraz zaburzeń neuropsychiatrycznych [5]. Analiza dostępnego piśmiennictwa z zakresu historii medycyny pozwala stwierdzić, iż schorzenie to oraz jego objawy charakterystyczne było znane oraz opisane na przestrzeni wieków przez różne cywilizacje mimo że często mylono je innymi chorobami, na długo przed opisem sporządzonym w XIX w. przez brytyjskiego lekarza Jamesa Parkinsona (1755-1824 r.) [6]. Już w czasach starożytnych ponad 2500 lat temu (425-221 r. p.n.e.) na terenie obecnych Chin powstały teksty opisujące objawy charakterystyczne dla choroby Parkinsona, takie jak drżenia zawarte w Kanonie Medycyny Żółtego Cesarza (chiń. Huángdì Nèijīng; 黄帝内经) stanowiącym całościowy traktat medyczny zbierający doświadczenia chińskich praktyków tamtego okresu [7]. W ujęciu tradycyjnej medycyny chińskiej schorzenia dotykające starsze osoby w postaci spontanicznego drżenia lub choroby mięśni, takich jak paraliż lub skurcze toniczne wynikają z niedoboru yin (chiń. 陰) w obrębie wątroby oraz nerek prowadząc do wytworzenia się wewnętrznego "wiatru" wywołującego te objawy [8]. Do tej pory w tradycyjnej medycynie chińskiej istnieje około 150 preparatów przeznaczonych do leczenia choroby Parkinsona na które, składa się prawie 200 różnych substancji [8, 9]. Jeszcze wcześniejsze opisy liczące 3000 lat można odnaleźć w indyjskim systemie medycznym Ayurveda (hin. आयुर्वेद) gdzie najistotniejszym tekstem w tym zakresie jest Charaka Saṃhitā (hin. चरकसंहिता) [10]. Schorzenie to w

tamtych czasach było określane jako Kampavata (hin. कंपवात) natomiast jej leczenie opierało się na stosowaniu fitoterapii za pomocą sproszkowanych nasion rośliny gatunku świerzbowca właściwego (łac. *Mucuna pruriens*) z rodziny bobowatych (łac. *Fabaceae*) [11, 12]. Badania dotyczące zastosowania tego gatunku roślin wykazały jej skuteczność w leczeniu choroby Parkinsona co nie powinno zaskakiwać biorąc pod uwagę fakt, iż w 1937 r. wyizolowano z jej nasion 3,4-dihydroksyfenyloalaninę, znaną szerzej pod nazwą lewodopa (L-DOPA) [13]. W starożytnym Egipcie również niektóre opisy medyczne zawarte w papirusie z XIX dynastii (1350-1200 r. p.n.e.) zdają się przedstawiać opis objawów posturalnych choroby Parkinsona [14]. Rozwój znanej nam wiedzy na temat choroby Parkinsona dokonał się w czterech głównych etapach. Za wspomniany wcześniej początek współczesnej historii i pierwszy etap postępu wiedzy klinicznej dotyczącej choroby Parkinsona należy przyjąć datę publikacji pracy Jamesa Parkinsona pt. „An essay on the shaking palsy" wydanej nakładem wydawnictwa Sherwood, Neely, and Jones w 1817 r. składającej się z 66 stron oraz 5 rozdziałów [15]. Autor dokonał obserwacji i analizy sześciu przypadków gdzie trzy z nich stanowiły leczonych wcześniej przez niego pacjentów, natomiast kolejne trzy stanowiły wynik obserwacji ludzi przechodzących na ulicy w Hoxton Square w Londynie, gdzie mieszkał [16]. Zaobserwował on długi czas trwania i powoli postępujący charakter choroby z zaznaczeniem jej głównych objawów. Pierwsze rozdziały monografii dotyczą szczegółowego opisu drżenia oraz zaburzeń postawy i ich następczej kwalifikacji a sam autor odwołuje się w nim do opisów przedstawionych wcześniej przez takie postacie jak Galen (129-200 r. p.n.e.), Franciscus Sylvius de la Boë (1614-1672 r.), François Boissier de Sauvages de la Croix (1706-1767 r.) oraz William Cullen (1710-1790 r.) [17, 18]. Autor również porównywał i komentował swoje opisy różnicując drżenia od tych występujących potencjalnie w przebiegu padaczki, chorób pasożytniczych, związanych z nadużywaniem alkoholu oraz kofeiny jak również związanych z naturalnym procesem starzenia się ludzkiego organizmu. Za pierwotną neuroanatomiczną lokalizację stanowiącą źródło choroby uznano rdzeń przedłużony (łac. *medulla oblongata*) oraz rdzeń kręgowy (łac. *medulla spinalis*) co wynikało z obowiązującego stanu wiedzy anatomicznej na przełomie XVIII i XIX w., który to okres obejmował czas życia autora. Wśród kolejnych praktyków i badaczy zajmujących się chorobą należy wymienić przede wszystkim postać Jean-Martin Charcota (1825-1893 r.), który wraz ze swoim zespołem pacującym w Hôpital Universitaire Pitié-

Salpêtrière w Paryżu zrewidował i udoskonalili pierwotny opis kliniczny przedstawiony przez Jamesa Parkinsona [19]. Zapoczątkowali oni również badania nad opisem neuropatologicznym tego schorzenia rozpoczynając drugi kolejny etap poszerzania wiedzy na temat choroby Parkinsona. Obecnie stosowana terminologia neurologiczna związana z nazewnictwem choroby Parkinsona stanowi efekt skłonności Charcota do stosowania eponimów oraz odejścia od nazwy drżączki poraźnej (łac. *paralysis agitans*) [20]. Jednym z największych zasług Charcota było rozróżnienie drżenia występującego w przebiegu choroby Parkinsona oraz drżenia samoistnego (łac. *tremor essentials*) jak również drżeń występujących jako objaw stwardnienia rozsianego (łac. *sclerosis multiplex*) [21]. Dodatkowo zwrócił on uwagę na występowanie neurologicznych objawów takich jak maskowata twarz, sztywność mięśniowa, bradykinezja, występowanie zaburzeń chodu oraz objawów posturalnych [22]. Poza dokładniejszym opisem objawów neurologicznych Charcot badał i opisał występowanie objawów pozaruchowych takich jak dysfunkcje układu autonomicznego oraz zaburzenia neuropsychiatryczne. Kolejnym ważnym krokiem dotyczącym wyjaśnienia patogenezy choroby był neuropatologiczny opis przedstawiony w 1871 r. jaki wykonał Theodor Meynert (1833-1892 r.) [23]. Po raz pierwszy powiązał on potencjalną patologie występującą w obrębie jąder podstawy takich jak uszkodzenie ciała prążkowanego (łac. *corpus striatum*) oraz gałki bladej (łac. *globus pallidus*) z występowaniem objawów ruchowych. Trzy neuropatologiczne opisy i badania opublikowane w latach 1912-1923 r., których autorem jest Frederic Lewy (1885-1950 r.) poszerzały wiedzę dotyczącą patogenezy choroby Parkinsona poprzez wykazanie obecności cytoplazmatycznych inkluzji zwanych ciałami Lewy'ego (ang. *Lewy bodies*) pierwotnie zaobserwowanych w obrębie istoty bezimiennej (łac. *substantia innominata*) oraz w jądrze grzbietowym nerwu błędnego (łac. *nucleus dorsalis nervi vagi*) [24, 25, 26]. Następnym dużym krokiem dotyczącym postępu wiedzy na temat choroby Parkinsona było powiązanie jej objawów z uszkodzeniem istoty czarnej (SN) usytuowanej w obrębie śródmózgowia (łac. *mesencephalon*) [27]. Pierwsze spostrzeżenie tej korelacji zostało dokonane w artykule autorstwa Paul Blocq (1860-1896) oraz Gheorghe Marinescu (1863-1938 r.) gdzie przedstawiono opis przypadku 38-letniego chorego cierpiącego na gruźlicę (łac. *tuberculosis*), u którego obserwowano jednostronny parkinsonizm (sztywność mięśni oraz drżenie lewych kończyn) [28]. Wykonane pośmiernie u tego pacjenta badanie autopsyjne wykazało obecność guza w obrębie prawego konara mózgu (łac. *pedunculi cerebri*) powodującego destrukcję SN, co jednoznacznie potwierdzało symptomatologię

obserwowaną u tego chorego. Warto tutaj podkreślić istotę znaczenia tego pojedynczego opisu przypadku w rozwoju wiedzy w omawianym zakresie. Teoria ta została następnie rozwinięta przez Édouarda Brissaud (1852-1909 r.) który dokonał ponownej analizy opracowania Blocqua i Marinescu i stwierdził iż SN stanowi główny substrat patologiczny i anatomiczny choroby [29]. Ostatecznego potwierdzenia tej korelacji dokonał Konstantin Tretiakoff (1892-1958 r.) opisując w swojej pracy doktorskiej opublikowanej w 1919 r., utratę pigmentacji komórek oraz obecność ciał Lewy'ego w obrębie SN u pacjentów z chorobą Parkinsona [30]. Rozprawa ta obejmowała analizę 54 przypadków gdzie obserwował on znaczną utratę neuronów wraz z towarzyszącym obrzękiem ciał komórkowych oraz obecnością zwyrodnienia neurofibrylarnego w obrębie SN. Teza zaprezentowana w tym opracowaniu została przyjęta sceptycznie, dopiero po kliku latach została również potwierdzona w pracy autorstwa Charlesa Foix (1882-1927 r.) oraz Jeana Nicolesco (1895-1957 r.) dotyczącej zmian neuropatolgicznych w obrębie jąder podstawy [31]. W czasie kierownictwa Charcota klinika Salpêtrière stała się jednym z najbardziej zaawansowanych ośrodków badań neurologicznych na świecie poprzez realizację działań związanych z rozwojem zaplecza naukowego i dydaktycznego, doborem kadry oraz dokładną analizą dużej populacji pacjentów. Udogodnienia oraz doborowa kadra składająca się z naukowców i klinicystów z Salpêtrière przyciągała pod koniec XIX w. wielu młodych oraz aspirujących lekarzy i jednocześnie badaczy z całego świata, prowadząc do dużej liczby przełomów naukowych na polu neurologii, w tym doskonalszego opisu choroby Parkinsona [32, 33]. Kolejny ważny krok stanowiło na przełomie lat 40. i 50. ubiegłego stulecia wyizolowanie przez Wilhelma Raaba (1895-1970 r.) z mózgów zwierzęcych i ludzkich substancji nazwanej encefaliną, która wykazywała działanie sympatykomimetyczne i okazała się być 3,4-dihydroksyfenyloetyloaminą, znaną szerzej pod nazwą dopamina (DA) [34, 35]. Wkrótce po opublikowaniu powyższej pracy oraz wielu kolejnych dotyczących dokładniejszego opisu DA w sensie biochemicznym, kolejny krok został postawiony przez publikację wyników doświadczeń zespołu szwedzkich badaczy pod kierunkiem neurofarmakologa Arvida Carlssona (1923-2018 r.) z Uniwersytetu w Lund [36, 37]. Ich badanie wykazało, że dootrzewnowe (i.p.) podanie rezerpiny powodowało u myszy i królików bezruch i zanik DA w ich mózgach, który był znoszony podaniem L-DOPY przywracając normalne zachowanie tych zwierząt, co wiązało się również ze wzrostem poziomu DA w ciągu godziny od podania, stanowiąc obserwacje przełomowe zarówno dla poznania

mechanizmów neurochemicznych leżących u podstaw objawów ruchowych choroby Parkinsona, jak i jej późniejszej terapii. Następny ważny krok stanowiło wykazanie przez Oleha Hornykiewicza (1926-2020 r.) w neurochemicznych analizach *post mortem* znacznego zmniejszenia poziomu stężenia DA w jądrze ogoniastym (łac. *nucleus caudatus*) i skorupie (łac. *putamen*) u pacjentów z chorobą Parkinsona i skorelowanie tego faktu z wystąpieniem objawów motorycznych schorzenia [38, 39]. Rok po opublikowaniu tych wyników ten sam zespół naukowców z powodzeniem zaobserwował znaczną poprawę kliniczną u pacjentów z chorobą Parkinsona po podaniu L-DOPA [40]. W tym okresie, stanowiącym przełom lat 50. i 60. XX w. związek pomiędzy spadkiem poziomu DA w obrębie ST oraz z zanikiem neuronów w istocie czarnej w chorobie Parkinsona nie był do końca poznany. Dalsze prace zespołu Hornykiewicza potwierdziły obniżenie poziomu stężenia DA w SN u pacjentów z chorobą Parkinsona [41]. Opis dopaminergicznych projekcji szlaku nigrostriatalnego łączących SN z ST u szczurów przy użyciu histochemicznej metody fluorescencyjnej został przedstawiony w 1964 r. przez zespół w składzie Nils-Erik Andén (1937-1990 r.), Annica Dahlström (1941- r.) oraz Kjell Fuxe (1938- r.) [42]. Jednocześnie stwierdzono spadek poziomu stężenia DA w homogenatach, jak i na preparatach ST po operacyjnym uszkodzeniu części zbitej (łac. *pars compacta*) w obrębie SN (SNpc). Pomimo pierwotnych obserwacji pozytywnych efektów zastosowania L-DOPA u chorych opisanych przez Walthera Birkmayera (1910-1996 r.) i Hornykiewicza, późniejsze próby zastosowania związku w różnych ośrodkach były nieudane oraz związane z wieloma działaniami niepożądanymi. Punktem zwrotnym stanowiącym fundament współczesnego leczenia choroby Parkinsona jest 1967 r., w którym opublikowana została praca Georgea Cotziasa (1918-1977 r.) i wsp., którzy podawali racemiczną formę DOPA w kapsułkach, w stopniowo zwiększanych dawkach (maksymalnie do 12-16 g/dobę) przez okres kilku dni do kilku miesięcy [43]. Zaobserwowali oni osłabienie lub całkowity zanik objawów parkinsonowskich, takich jak: sztywność mięśniowa, drżenia, brak współruchów w trakcie chodzenia, brak ekspresji twarzy, ślinienie się i inne, a działania niepożądane po zastosowaniu tego leku były słabsze i ustępowały przy obniżaniu dawki. Z biegiem czasu udoskonalenie metody podawania L-DOPA oraz jej kombinacja z lekami o innym działaniu farmakokinetycznym pozwoliło na obniżenie terapeutycznej dawki tego związku, co znacząco zmniejszało działania niepożądane terapii. Ostatecznie w 1970 r. L-DOPA została dopuszczona do obrotu przez amerykańską agencję Food and Drug Administration (FDA) i weszła na stałe do

leczenia choroby Parkinsona, stając się do chwili obecnej złotym standardem terapeutycznym. Począwszy od późnych lat 50. stopniowy postęp w dziedzinie neurochemii oraz farmakologii pozwolił na wprowadzenie kolejnych grup leków do terapii choroby Parkinsona takich jak agoniści DA, inhibitory katecholo-O-metylotransferazy (COMT), inhibitory monoaminooksydazy B (MAO-B), leki antycholinergiczne, antagoniści receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) oraz antagoniści receptora adenozyny A_{2A} (ADORA2A) [44, 45]. Postęp wiedzy neuroanatomicznej, jak również poznanie funkcjonowania połączeń neuronalnych w obrębie elementów pętli korowo-podstawno-wzgórzowo-korowej (CBGTC) stanowił podstawę i silne naukowe uzasadnienie do przeprowadzenia skutecznych zabiegów neurochirurgicznych w latach 30. obecnego wieku, w celowanym leczeniu operacyjnym zaburzeń układu pozapiramidowego po pierwszych próbach trwających już od XIX w. [46]. W 1953 r. amerykański neurochirurg Russell Meyers (1905-1999 r.) przeprowadził skuteczną klinicznie resekcję większej części głowy prawego jądra ogoniastego z otwartego dostępu przezkomorowego u 26-letniej kobiety z nasilonym lewostronnym drżeniem spoczynkowym [47]. W latach 50. i 60. stereoencefalotomia, pallidotomia oraz talomotomia były szeroko stosowanymi procedurami w leczeniu choroby Parkinsona dystonii, i różnych formy drżenia [48]. Procedury tego typu były możliwe również dzięki równoległemu opracowaniu przez Ernesta Spiegela (1895-1985 r.) i Henryego Wycisa (1911-1971 r.) w 1952 r. pierwszego atlasu stereotaktycznego ludzkiego mózgu [48]. Następnym kierunkiem w terapii pacjentów z chorobą Parkinsona było opracowanie pierwszej ramy stereotaktycznej znajdującej zastosowanie u ludzi, stanowiącej modyfikację oryginalnej koncepcji aparatu zbudowanego przez Victora Horsleya (1857-1916 r.) i Roberta Clarke'a (1850-1926 r.) rozpoczynając erę nowoczesnej neurochirurgii funkcjonalnej [49]. Kolejnym krokiem w operacyjnym leczeniu choroby Parkinsona po okresie stosowania procedur ablacyjnych było wprowadzenie metody drażnienia głębokich struktur mózgu prądem o wysokiej częstotliwości [50, 51]. Jedna z pierwszych tego typu procedur została wykonana przez zespół pracujący w Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, gdzie Pierre Pollak (1950- r.), Alim Benabid (1942- r.) oraz inni wykonali próbę drażnienia jądra niskowzgórzowego (STN) w znieczuleniu miejscowym u 51-letniego pacjenta z zaawansowaną chorobą Parkinsona u którego występowały znaczne zaburzenia typu „on-off" [52]. Po zastosowaniu bodźca prądowego o częstotliwości 130 Hz stwierdzono osłabienie bezruchu i brak dyskinez. Kolejny kroki wykonany przez ten zespół

stanowiła implantacja dwóm innym pacjentom elektrod do STN, które zostały połączone ze stymulatorem umieszczonym podskórnie w okolicy podobojczykowej [53]. Operacyjne leczenie choroby Parkinsona obejmujące drażnienie struktur głębokich mózgu prądem o wysokiej częstotliwości zostało zatwierdzone w 2002 r. przez FDA [54]. Do chwili obecnej na całym świecie wykonano tysiące operacji implantacji układów głębokiej stymulacji mózgu (DBS), które potwierdziły skuteczność terapeutyczną tej procedury w chorobie Parkinsona, pozwalając na redukcję leczenia farmakologicznego, a w związku z tym na zmniejszenie towarzyszących dyskinez [55, 56]. Kolejnym kierunkiem w rozwoju terapii pacjentów z chorobą Parkinsona były próby wykonania domózgowych przeszczepów komórkowych. Znaczna część przeprowadzonych później prób klinicznych bazowała w tym przypadku na modelu zwierzęcym uszkodzenia szlaku nigrostriatalnego opracowanym na przełomie lat 60. i 70. przez Urbana Ungerstedta (1942- r.) [57, 58]. Model ten pozwalał na ilościową ocenę behawioralną stopnia uszkodzenia układu nigrostriatalnego oraz oszacowanie możliwości jego ewentualnej naprawy. Pierwsze próby transplantacji tkanki płodowej brzusznego śródmózgowia, zawierającej rozwijające się neurony dopaminergiczne do ST szczurów wykonane zostały w 1976 r. przez Andersa Björklunda (1945- r.). Następnym etapem rozwoju domózgowych przeszczepów komórkowych w 1981 r. było opracowanie metody przeszczepiania zawiesiny komórek nerwowych [59]. Pierwsze operacje stereotaktyczne obejmujące domózgową implantację fragmentów tkanki płodowej do skorupy zostały wykonane w listopadzie i grudniu 1987 r. [60]. Dalsze próby kliniczne obejmowały m. in. próby przeszczepów do mózgu obwodowej tkanki nerwowej jak również komórki chromafinowe rdzenia nadnerczy [61]. Należy jednak podkreślić duże różnice dotyczące indywidualnej odpowiedzi pacjentów na domózgowy przeszczep tkanki płodowej, u niektórych chorych uzyskiwano poprawę kliniczną umożliwiającą odstawienie leczenia farmakologicznego i powrót do aktywności zawodowej, u innych natomiast obserwowano wystąpienie działań niepożądanych takich jak halucynacje i dyskinezy. Długofalowe efekty oraz niepożądane efekty bezpośrednich domózgowych transplantacji stereotaktycznych nie były zadowalające, jak również budziły zastrzeżenia etyczno-prawne, co sprawiło że nie weszły one do szerokiej praktyki klinicznej [62]. Intensywny rozwój metod biotechnologicznych oraz technik biologii molekularnej, który ma miejsce w ostatnich latach pozwolił na rozpoczęcie badań dotyczących zastosowania komórek macierzystych jako przeszczepów autologicznych

w terapii pacjentów z chorobą Parkinsona [63]. Pierwszy przeszczep komórek dopaminergicznych, uzyskanych z mysich fibroblastów do ST u szczurów, którym uszkodzono jednostronnie szlak nigrostriatalny został przeprowadzony w 2008 r. [64]. Po upływie 4 tygodni w uszkodzonym ST stwierdzono obecność komórek o fenotypie neuronów dopaminergicznych, których wypustki tworzyły gęste unerwienie okolic przeszczepu. W chwili obecnej możliwości zastosowania somatycznych komórkek macierzystych (MSC) oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) stanowią przedmiot wielu trwających i planowanych badań klinicznych [65]. Obecnie duże nadzieje w leczeniu choroby Parkinsona jak również innych schorzeń neurologicznych, wiąże się z wykorzystaniem terapii genowej, której istotą jest wprowadzanie do określonych komórek OUN specyficznych czynników instruktywnych, jakimi są geny o znaczeniu terapeutycznym [66]. Do chwili obecnej opracowano wiele metod wprowadzania pożądanego genu do komórek docelowych, z których wektory wirusowe charakteryzują się wydajnym systemem przenoszenia swoich genów do jądra komórki gospodarza [67]. W omawianym przypadku terapii genowej najpowszechniejsze zastosowanie znalazły rekombinowane wektory adenowirusowe (AAV), uznawane za jedne z najbezpieczniejszych oraz najefektywniejszych form transferu genów do struktur OUN [68]. Dotychczas jednym z głównych celów terapii genowej testowanych na wielu modelach był transfer genów kodujących enzymy związane z syntezą DA oraz aparatu enzymatycznego niezbędnego do jej syntezy, sekrecji, transportu zwrotnego oraz magazynowania [69]. Równolegle przedmiotem zainteresowania są wektory niosące geny dla czynników neurotroficznych oraz cytokin [70]. Aktualnie prace związane z wprowadzeniem terapii opartej na wektorach AAV w leczeniu choroby Parkinsona stanowią przedmiot toczących się badań klinicznych I, II i III fazy [71]. Innym, rozwijanym równolegle kierunkiem badań jest wzbogacenie tkanki nerwowej w określone związki i białka poprzez bezpośrednie podanie domózgowe za pomocą metod stereotaktycznych aktywnych form czynników wzrostu, neuromorfogenów, cytokin, związków neuroprotekcyjnych oraz rekombinowanych form pochodnych tych związków do struktur głębokich mózgu lub do układu komorowego [72, 73].

Opisane powyżej fakty dotyczące poszukiwania przyczyn choroby Parkinsona, mechanizmów leżących u jej podstaw oraz potencjalnych terapii stanowią jedynie niewielką część wszystkich prac i badań przeprowadzonych do chwili obecnej. Począwszy od późnych lat 50. nasze rozumienie istoty choroby Parkinson posunęło się

skokowo, głównie dzięki pojawieniu się lepszej technologii biomedycznej, jak również niezwykłemu postępowi w pokrewnych dyscyplinach medycznych, takich jak neurofarmakologia, neurochemia, neuropatologia, biologia molekularna i genetyka [74]. Istotą obecnie wytyczonych nowoczesnych kierunków i wyzwań w terapii choroby Parkinsona jest udoskonalenie i optymalizacjia leczenia farmakologicznego, jak również zastosowanie osiągnięć medycyny regeneracyjnej w zakresie możliwie trwałego uzupełnienia niedoboru DA poprzez odbudowę prawidłowych szlaków i połączeń korowo-podkorowych w mózgu powodując kliniczną poprawę u leczonych pacjentów [75, 76].

1.1.2. Epidemiologia

Należy jednoznacznie stwierdzić, że choroba Parkinsona stanowi aktualnie rosnące zagrożenie dla zdrowia w demograficznie starzejących się społeczeństwach i jedno z globalnych wyzwań XXI w. Analiza danych statystycznych dotyczących zachorowalności na chorobę Parkinsona wskazuje na obserwowane zróżnicowanie w poszczególnych badaniach i opracowaniach, co jest najczęściej związane z odmienną metodologią ich przeprowadzenia oraz odmiennym kryteriami przyporządkowania pacjentów do poszczególnych grup [77, 78]. Czynnikiem wpływającym na wartości danych statystycznych oraz stopień ich replikacji jest m.in. zmienne uwzględnienie przypadków atypowych oraz o niepewnym rozpoznaniu [79]. Równocześnie należy zwrócić uwagę, że dostępność systemu opieki zdrowotnej jest zróżnicowana w poszczególnych krajach, obszarach oraz grupach etnicznych co może powodować błędy w ocenie statystycznej [80]. Liczbę wszystkich osób dotkniętych chorobą Parkinsona na świecie szacuje się obecnie na około 10 milionów, gdzie liczba ta podwoiła się w okresie ostatnich 25 lat (1990-2015 r.) w wyniku rosnącej liczby osób starszych [81, 82]. Dane i projekcje statystyczne wskazują, że do 2040 r. przewidywana liczba przypadków wyniesie 12-17 milionów osób [83]. Szacuje się, że choroba Parkinsona dotyka około 1-2/1000 osób, gdzie częstość jej występowania wzrasta istotnie wraz z wiekiem [84]. Należy przyjąć, że ryzyko występowania choroby wzrasta już po 50 r.ż. i dotyczy około 2-3% osób w wieku >65 r.ż., a nawet 4-5% osób w wieku 85 lat [85, 86]. Ryzyko zachorowania wzrasta średnio o 9% w każdej kolejnej dekadzie życia [87]. W populacji ogólnej rozpowszechnienie choroby Parkinsona wynosi około 0.3% ogólnej populacji, gdzie mężczyźni zapadają na nią około 1.5 razy częściej niż kobiety [88].

Ryzyko rozwoju choroby podczas życia wynosi 2%, natomiast jeśli schorzenie występuje u kogoś z krewnych, wzrasta do 4% [89]. Średni wiek zachorowania ocenia się na 58 lat, natomiast średni czas trwania choroby, liczony od diagnozy do śmierci chorego, szacowany jest średnio na 15-16 lat, gdzie szczyt zachorowań przypada na wiek 85-89 lat [90, 91]. W przypadku tzw. parkinsonizmu o wczesnym początku pierwsze objawy pojawiają się jeszcze przed 40-50 r.ż. (ok. 5-10% chorych) [92]. Zachorowalność na chorobę Parkinsona zależy również od przynależności do rasy i grupy etnicznej i jest ona najwyższa w przypadku osób pochodzenia latynoskiego, na drugim miejscu jest rasa kaukaska, trzecie miejsce zajmuje rasa żółta natomiast najmniejsza zachorowalność występuje u afroamerykanów [93]. Do głównych przyczyn zgonu pacjentów z chorobą Parkinsona należą zapalenie płuc (44.1%), nowotwory (11.6%), choroby serca (4.1%), udar mózgu (3.7%) oraz sepsa (3.3%) [94].

1.1.3. Etiologia

Aktualnie opisano i scharakteryzowano kilka grup czynników etiopatologicznych ryzyka wystąpienia choroby Parkinsona o różnym znaczeniu. Do szeregu zidentyfikowanych czynników modyfikowalnych i niemodyfikowalnych, w wysokim stopniu predysponujących do wystąpienia schorzenia, operając się na teorii wieloczynnikowej należy zaliczyć między innymi:

1) Zaawansowany wiek – wykazano, że starzenie się z punktu widzenia gerontologicznego stanowi jeden z głównych niemodyfikowanych czynników ryzyka, gdzie odsetek zachorowań na idiopatyczną chorbę Parkinsona wzrasta wraz w czasem trwania życia [95]. Starzenie się zaburza szereg fizjologicznych procesów komórkowych, co skutkuje zmianami neurodegeneracyjnymi [96]. Kumulacja uszkodzeń somatycznych związanych z wiekiem w połączeniu z niewydolnością mechanizmów kompensacyjnych prowadzi do szybszego wystąpienia schorzenia [97].

2) Płeć męska – obserwuje się 1.5-2 razy częstsze występowanie choroby Parkinsona u pacjentów płci męskiej niż w populacji żeńskiej [98]. Warto w tym miejscu wspomnieć, że populacja żeńska cechuje się wyższą śmiertelnością i szybszym podstępem choroby Parkinsona. Uważa się, że różnice między

płciami wynikają głównie z istniejących różnic w gospodarce hormonalnej oraz z determinanty genetycznej [99].

3) Czynniki środowiskowe – rozpowszechnienie choroby Parkinsona jest większe w krajach uprzemysłowionych i rozwijających się, o wyraźnym stopniu zanieczyszczenia środowiska [100]. Analiza badań epidemiologicznych wskazuje, że ekspozycja na pestycydy, rozpuszczalniki, związki metali ciężkich, związki organohalogenowe i inne substancje toksyczne, również te potencjalnie zawarte w żywności zwiększa ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona [101].

4) Urazy czaszkowo-mózgowe – przebyte w przeszłości urazy głowy są uważane za istotny czynnik predysponujący do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona [102]. Zaobserwowano, że weterani amerykańscy walczący podczas operacji Enduring Freedom (OEF) oraz Iraqi Freedom (OIF), którzy doświadczyli urazu głowy wykazywali 56% wzrost ryzyka rozwoju choroby Parkinsona [103].

5) Mikrobiota jelitowa i choroby przyzębia – przeprowadzone w ostatnim czasie badania sugerują istnienie związku pomiędzy populacją bakterii jelitowych jak również występowaniem stanów zapalnych w obrębie układu szczękowo-twarzowego oraz przyzębia (łac. *peridontitis*), z rozwojem choroby Parkinsona [104, 105]. Dysbioza, czyli stan zaburzenia ilościowego i jakościowego składu bakteryjnego jelit może inicjować stan zapalny na skutek czego, w obrębie ciała neuronu (łac. *perikaryon*) powstają złogi alfa (α)-synukleiny (ASN), które według najnowszych doniesień przemieszczają się wstępująco w sposób prionowy ze śródściennych splotów żołądkowo-jelitowych Auerbacha (łac. *plexus myentericus*) i Meissnera (łac. *plexus submucosus*) wzdłuż nerwu błędnego (łac. *nervus vagus*) do rdzenia przedłużonego potencjalnie inicjując procesy neurodegeneracyjne, leżące u podstaw patofzjologicznych choroby Parkinsona. W podobnym mechanizmie, negatywne sygnały ze zmian wierzchołkowych, infekcji przyzębia i zainfekowanej zębiny (łac. *dentinum*) mogą być transmitowane z jamy ustnej do śródmózgowia drogą nerwu trójdzielnego (łac. *nervus trigeminus*) [106].

6) Czynniki genetyczne - lista mutacji genetycznych, które mogą znacząco wpływać na ryzyko wystąpienia chorobę Parkinsona ciągle się wydłuża, co wskazuje na znaczenie jej genetycznego podłoża [107]. Ryzyko zachorowania jest 2-3 razy większe w przypadku osób, które mają wśród krewnych pierwszego stopnia osobę z chorobą Parkinsona lub drżeniem samoistnym [108, 109]. Obecnie uważa się, że rodzinne i genetyczne formy choroby Parkinsona stanowią około 5-15% przypadków. Znanych jest obecnie już ponad 90 loci i 20 mutacji genów zaangażowanych w rodzinne oraz sporadyczne przypadki schorzenia [110].

7) Styl życia i dieta – istotne znaczenie wydaje się mieć sposób życia, przykładowo wykazano istnienie odwrotnego związku między ryzykiem wystąpienia choroby Parkinsona a piciem, kawy, piciem zielonej herbaty, paleniem papierosów, aktywnością fizyczną lub przyjmowaniem leków z grupy inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) oraz antagonistów wapnia (CCB) [111]. Jednocześnie dane dotyczące związku między stosowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), hiperurykemią, hipercholesterolemią lub podwyższonym wskaźnikiem masy ciała (BMI) dostarczają sprzecznych informacji.

Dane dotyczące czynników etiologicznych pozwalają wyznaczyć względny poziom zachorowalności na chorobę Parkinsona w oparciu o formułę matematyczną zaproponowaną przez Schlossmachera i wsp. [112] bazującą na teorii determinującej jej wieloczynnikowy charakter, według której wszystkie zmienne nakładają się prowadząc do wystąpienia procesu neuropatologicznego według wzoru:

$$P_R(\%) = (E + D + I) \times G \times T$$

gdzie:

P_R (%) – skumulowany współczynnik zachorowalności, wartość 0% w tym modelu odpowiada fizjologicznemu poziomowi produkcji DA w obrębie SN w momencie urodzenia

E – eksposom, narażenie oraz całość ekspozycji na wybrane czynniki środowiskowe oraz ksenobiotyki od okresu prenatalnego

D – obecność wariantów genetycznych predysponujących do rozwoju choroby

I – interakcja gen-środowisko, wajemne stosunki ekspresji genetycznej oraz elementami eksposomu, potencjalnie inicjujące patologiczną odpowiedź tkankową

G – płeć (wartość 0.8 w przypadku kobiet lub wartość 1.2 w przypadku mężczyzn)

T – wiek

1.1.4. Patogeneza

1.1.4.1. Zmiany neuropatologiczne

Istotą patogenezy choroby Parkinsona jest kaskada zdarzeń prowadzących w efekcie do utraty kontrolujących funkcje ruchowe oraz zawierających neuromelaninę ($C_8H_7NO_2$) neuronów dopaminergicznych, z późniejszą depigmentacją SN oraz konsolidacją dysfunkcyjnych neurofibrylarnych związków białkowych w mózgu [113]. W tym przypadku stwierdza się obecność klasycznych ciał Lewy'ego, stanowiących wewnątrzneuronalne i/lub wewnątrzglejowe kwasochłonne wtręty (inkluzje), obserwowane w standardowych barwieniach hematoksyliną i eozyną (H&E) i impregnacji srebrowej [114]. Ultrastrukturalnie składają się one z jasnej otoczki oraz gęstego, hialinowego rdzenia o średnicy ok. 5-25 μm [115]. Ich składnikami jest ponad 90 różnych białek, wśród których należy wymienić m. in. ASN, ubikwitynę (Ub), synfilinę-1 oraz neurofilamenty [116]. ASN, natywnie występująca w formie monomerów/tetramerów o strukturze α-helisy wykazuje skłonność do zmiany konformacji w strukturę beta (β)-kartki, tworząc nierozpuszczalne agregaty. Proces agregacji prowadzi do pojawienia się toksycznych form oligomerycznych i protofibrylarnych [117]. Szacuje się, że w chwili klinicznego rozpoznania choroby Parkinsona ciała Lewy'ego występują w SN u 85-100% pacjentów, przy czym obserwuje się nawet 60% spadek ilości neuronów dopaminergicznych, a w konsekwencji >70% spadki stężeń DA w zakończeniach nerwowych w obrębie jądra ogoniastego i skorupy [118, 119]. Jednocześnie obecność ciał Lewy'ego można również obserwować w obrębie innych struktur OUN [120]. Według teorii opracowanej przez Heiko Braaka (1937- r.) procesy neuropatologiczne, związane z rozwojem choroby Parkinsona są ściśle skorelowane ze stopniem jej zaawansowania i nie odbywają się w sposób przypadkowy [121]. Teoria ta, łączy w sobie wieloczynnikową koncepcję etiopatologiczną choroby Parkinsona i dobrze wpisuje się w obserwacje epidemiologiczne dotyczące objawów neurologicznych w zaawansowanych stadiach schorzenia. Proces ten, przebiega według pewnego stałego schematu, gdzie wczesne zmiany patologiczne (etap 1-2) pojawiają się najpierw w rdzeniu przedłużonym, jądrze grzbietowym nerwu błędnego, opuszkach węchowych (łac. *bulbus olfactorius*) miejscu sinawym (łac. *locus coeruleus*), czy jądrach szwu (łac. *nuclei raphes*) [122]. Obydwa etapy odpowiadają fazie, w której nie stwierdza się objawów ruchowych (faza prodromalna). Następnie zmiany te postępują, rozprzestrzeniając się wzdłuż aksonów

tworzących drogi wstępujące na struktury pnia mózgu (łac. *pons*) i układu nigrostriatalnego (etap 3), co jest związane z pojawieniem się klinicznych objawów motorycznych, kiedy zniszczeniu ulegnie minimum 60% komórek nerwowych w obrębie SN [123]. Kolejno (etap 4) dochodzi do zajęcia kory pośredniej (łac. *mesocortex*), obejmującej zakręt obręczy (łac. *gyrus cinguli*) i przyhipokampowy (łac. *gyrus parahippocampalis*), co jest związane z pojawieniem się pierwszych zmian funkcji intelektualnych [124]. W dalszej kolejności (etap 5-6) zmiany patologiczne rozszerzają się na korę asocjacyjną, jak również pierwotną i wtórną korę nową (łac. *neocortex*), co jest związane z pełnym obrazem klinicznym schorzenia i występowaniem zarówno objawów ruchowych, jak również zaburzeń poznawczych czy demencji [125]. Pewnym zaprzeczeniem teorii Braaka jest ilościowa ocena stopnia zaawansowania procesu neurodegeneracji, gdzie największy stopień utraty neuronów SN następuje w ciągu 5-10 lat w trakcie przedklinicznej fazy choroby Parkinsona, natomiast gęstość ciał Lewy'ego nie koreluje z intensywnością stopnia neurodegeneracji [126]. Wydaje się również, że potencjalna zależność pomiędzy pojawieniem się ciał Lewy'ego oraz procesem neurodegeneracji nie jest liniowa. Ciała Lewy'ego stwierdza się u wszystkich pacjentów z chorobą Parkinsona, z wyjątkiem chorych z homozygotyczną mutacją w genie parkiny (PARK2) [127]. Jednocześnie należy nadmienić że, schorzenia neurodegeneracyjne, które cechują się konsolidacją agregatów ASN należą do grupy tzw. synukleinopatii, do których, poza chorobą Parkinsona zaliczamy m. in. otępienie z ciałami Lewy'ego (DLB), chorobę Alzheimera (AD), zanik wieloukładowy (MSA), stwardnienie zanikowe boczne (ALS), chorobę Gauchera (GD), chorobę Picka (PiD), zespół Bradbury'ego-Egglestona (PFA) oraz choroba Hallervordena-Spatza (NBIA-1) [128, 129]. Obecność ciał Lewy'ego wykazano także w badaniach autopsyjnych mózgów pobranych od osób bez objawów klinicznych choroby Parkinsona, gdzie częstość ich występowania wzrasta wraz z wiekiem [130]. Analizując wyniki badań neuropatologicznych warto zwrócić uwagę, że częstość błędnego rozpoznania choroby Parkinsona szacuje się na poziomie ~24%, przy czym stwierdzano jednocześnie częste współistnienie innych schorzeń, takich jak choroba Alzheimera (~17%) czy zmiany naczyniopochodne (~9%) [131, 132]. Aktualnie trwają próby opracowania ujednoliconych kryteriów neuropatologicznych rozpoznania choroby Parkinsona [133].

1.1.4.2. Zaburzenia funkcji mitochondriów

Mitochondria stanowią wysoce wyspecjalizowane, półautonomiczne organelle obecne prawie we wszystkich komórkach eukariotycznych które odpowiadają głównie za przeprowadzanie procesu fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) jak również za szereg innych istotnych funkcji, m. in. homeostazę wapniową (Ca^{2+}), regulację metabolizmu komórkowego, syntezę hemu, β-oksydację kwasów tłuszczowych, syntezę steroidów oraz udział w zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozie) [134]. Biorąc pod uwagę budowę ultrastrukturalną, mitochondria mimo, iż cechują średnie wymiary wynoszące 1-7 μm długości przy średnicy 0.5-1 μm, mogą zajmować łącznie 12-25% objętości komórki [135]. Organelle te są w stanie zmieniać swoje kształty i rozmiary, podlegać procesom fuzji i fragmentacji oraz, w wyniku ruchów cytoplazmy, elementów cytoszkieletu oraz białek motorycznych, przemieszczać się wewnątrz cytozolu w zależności od potrzeb komórki [136]. Każda organella jest otoczona dwiema błonami białkowo-lipidowymi oddzielonym przestrzenią międzybłonową (pH 7.2-7.4), różniącymi się zarówno pod względem morfologicznym, molekularnym, jak i funkcjonalnym [137]. Gładka błona zewnętrzna (6-7 nm) zawiera kanały oraz kompleksy protein (~50%) obejmujące m. in. enzymy związane z syntezą lipidów, białka kompleksów translokacyjnych oraz receptory dla białek importowanych, wykazując przy tym przepuszczalność dla cząsteczek o wielkości <5 kD [138]. Pofałdowana błona wewnętrzna (5-6 nm) tworzy tzw. grzebienie mitochondrialne (łac. *cristae*) oraz wyróżnia się spośród innych błon biologicznych wysoką zawartością białka (~75-80%) w stosunku do fosfolipidów obejmując m. in. białka łańcucha transportu elektronów, syntazę adenozyno-5′-trifosforau (ATP) oraz białka przekaźnikowe i wykazując przy tym wysoką selektywność przepuszczalności [139]. Wnętrze mitochondrium wypełnia bezpostaciowa substancja płynna (pH 7.9-8.0) stanowiąca macierz (łac. *matrix*) o wysokiej zawartości białka (500 mg/ml), zawierająca m. in. kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDC), enzymy cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA), enzymy utleniania kwasów tłuszczowych oraz enzymy i czynniki potrzebne do procesów replikacji, transkrypcji i translacji [140]. W komórkach eukariotycznych mitochondria jako jedyne, poza jądrem, posiadają swój własny materiał genetyczny, u człowieka każde mitochondrium zawiera 2-10 cząsteczek kolistego mitochondrialnego DNA (mtDNA) o długości około 16.6 kb [141]. Koduje on łącznie 37 genów, wśród których należy wymienić 13 (z 67 wszystkich)

podjednostek polipeptydów łańcucha oddechowego i syntazy ATP, 2 rodzaje rybosomalnego RNA (rRNA) oraz 22 rodzaje transportującego RNA (tRNA), gdzie 28 genów mtDNA kodowane jest na nici ciężkiej (H), natomiast 9 pozostałych genów mtDNA kodowane jest na nici lekkiej (L). Cechą szczególną jest to, że mtDNA u ludzi nie zawiera intronów [142]. Pozostałe białka (ok. 1000-1500) niezbędne do prawidłowego funkcjonowania mitochondrium kodowane są jądrowo i importowane do wnętrza organellum z cytozolu za pomocą translokaz [143]. Pierwotnie mitochondria powstały prawdopodobnie przez endosymbiotyczną resorpcję bakterii tlenowych (α-proteobakterii) około 1.6 biliona lat temu przez eukarionty [144]. Szacuje się, że pojedynczy neuron ludzkiej SN tworzy od 1 do 2 milionów synaps w obrębie ST [145]. Przy założeniu, że mitochondria są obecne w prawie połowie synaps i na kilku metrach aksonu należy stwierdzić że jeden neuron tego typu posiada około 2 milionów mitochondriów [146, 147]. Regulacja i utrzymanie homeostazy metabolicznej i energetycznej stanowi krytyczne wyzwanie dla układu nerwowego [148]. Koszty metaboliczne funkcjonowania podstawowych elektrofizjologicznych funkcji neuronalnych są nieproporcjonalnie wysokie, głównie ze względu na bardzo złożoną morfologię neuronów, konieczność stałego utrzymywania i regulacji przezbłonowych gradientów jonów oraz stałą aktywność miliardów synaps [149]. Znaczna część puli ATP jest w ten sposób wykorzystywana do utrzymania i odnawiania gradientów jonowych, zmieniających się podczas przekazywania sygnałów wewnątrz komórki oraz do przekształcania i pobierania neurotransmiterów [150]. Szacuje się, że ludzki mózg zużywa 20% całkowitego wydatku energetycznego organizmu stanowiąc zaledwie 2% masy ciała [151]. Bioenergetyka połączeń neuronalnych jest w największym stopniu zależna od przemian zachodzących w mitochondriach, w mniejszym stopniu bazując na innych źródłach takich jak glikoliza neuronalna, gdzie nawet krótkie zaburzenia w syntezie mitochondrialnej lub glikolitycznej ATP skutkują niewystarczającym uwalnianiem i recyklingiem pęcherzyków synaptycznych (SV) i następującymi defektami transmisji synaptycznej [152, 153]. Mitochondria kontrolują również homeostazę synaptycznego poziomu jonów Ca^{2+}, co ma kluczowe znaczenie dla uwalniania pęcherzyków synaptycznych. Zmniejszenie mitochondrialnego wychwytu Ca^{2+} skutkuje asynchronicznym uwalnianiem pęcherzyków synaptycznych jak również upośledzeniem krótkoterminowej plastyczności neuronalnej [154, 155]. Nie jest w tym przypadku zaskakujące, że dysfunkcja mitochondrialna stanowi atrakcyjną teorię tłumaczącą potencjalne przyczyny neurodegeneracji oraz jeden z patomechanizmów

choroby Parkinsona [156]. Rola jaką odgrywają mitochondria w patogenezie choroby Parkinsona jest przedmiotem badań od lat 80. XX w., gdzie Schapira i wsp. jako pierwsi zaobserwowali redukcję aktywności kompleksu I (oksydoreduktaza NADH-koenzym Q) w SN u człowieka [157]. Podobne zaburzenia enzymatyczne stwierdzono również w komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych, płytkach krwi, limfocytach, fibroblastach oraz neuronach pochodzących z innych rejonów mózgu [158]. Dysfunkcja poszczególnych kompleksów procesu fosforylacji oksydacyjnej może stanowić zarówno efekt działania silnego stresu, takiego jak kontakt z wysokim stężeniem specyficznego inhibitora, jak również stresu chronicznego najczęściej związanego ze stałą obecnością niewielkich stężeń toksyn w środowisku oraz następczą akumulacją mutacji w obrębie mtDNA [159, 160]. Ostatecznie, zarówno działanie silnego stresu, jak i stresu chronicznego doprowadza do nadmiernej fragmentacji sieci mitochondrialnej oraz zaburzeń integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej, co prowadzi do pogłębienia nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów, podwyższenia produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), powodując jeszcze większe, często nieodwracalne, zniszczenia oksydacyjne białek, lipidów i mtDNA oraz w ostatecznym etapie śmierć komórki [161]. Dodatkowych, przekonujących dowodów dotyczących roli mitochondriów w patogenezie choroby Parkinsona dostarczają opracowania opisujące mutacje genów takich jak m. in. PARK2, PINK1, DJ-1, ASN oraz LRRK2, które pełnią istotną rolę w fizjologicznym funkcjonowaniu tych organelli [162, 163].

1.1.4.3. Stres oksydacyjny

Inną możliwą przyczyną śmierci neuronów dopaminergicznych w obrębie SN jest wystąpienie stresu oksydacyjnego, definiowanego jako zaburzenie homeostazy pomiędzy działaniem ROS a biologiczną zdolnością komórki do szybkiej detoksykacji reaktywnych produktów pośrednich lub kompensacji następstw ich działania [164]. Zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (Red-Ox) w neuronach mają kluczowy wpływ na ich fizjologiczne funkcjonowanie, stąd stres oksydacyjny wydaje się być jednym z istotnych procesów odpowiedzialnych za zjawisko neurodegeneracji w obrębie SN [165]. Wyróżnić można następujące ROS takie jak: rodniki tlenowe (O^{-}), hydroksylowe (OH^{-}) i peroksynitrowe ($ONOO^{-}$), gdzie związki te cechuje bardzo duża reaktywność wynikająca z obecności niesparowanego elektronu (e^{-}), co nadaje im silne

właściwości utleniające [166]. Wewnątrzpochodne źródła powstawania ROS zlokalizowane są wewnątrzkomórkowo, gdzie powstają podczas utleniania zredukowanych form szeregu związków przez tlen (O_2) molekularny w wyniku reakcji Fentona oraz w procesie zachodzących reakcji enzymatycznych [167]. Do głównych wewnątrzpochodnych źródeł ROS należy zaliczyć proces mitochondrialnego transportu elektronów (mitochondrialny łańcuch oddechowy), proces mikrosomalnego transportu elektronów, enzymy utleniające peroksysomów oraz aktywność komórek fagocytujących [168]. Przeprowadzone neuropatologiczne analizy mózgów pacjentów z chorobą Parkinsona wykazały oksydacyjne uszkodzenia neuronów dopaminergicznych, polegające na utlenianiu makromolekuł, takich jak lipidy, białka oraz kwasy nukleinowe [169, 170]. Na występowanie stresu oksydacyjnego wskazują w tym przypadku zwiększone poziomy stężenia 4-hydroksy-2-nonenalu (HNE) oraz malonylodialdehydu (MDA), powstających w procesie peroksydacji lipidów, wzrost poziomu stężenia pochodnych karbonylowych niektórych aminokwasów jak również zwiększenie poziomów stężeń produktów utleniania DNA i RNA, takich jak 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) oraz 8-hydroksyguanozyny (8-OHG) w obrębie SN [171, 172, 173]. Jednocześnie obserwuje się spadek poziomu stężenia zredukowanego glutationu (GSH), stanowiącego najistotniejszy, nieenzymatyczny antyoksydant w obrębie układu nerwowego [174]. Dodatkowo w obrębie SN obserwuje się zmniejszenie puli nienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), stanowiących substrat procesu peroksydacji lipidów [175].

Istotną rolę w procesach wolnorodnikowych związanych ze zjawiskiem neurodegeneracji w przebiegu choroby Parkinsona odgrywa również tlenek azotu (NO) oraz reaktywne formy azotu (RNS), przyczyniając się do wystąpienia stresu nitracyjnego (NxS) [176]. W obecności anionorodnika ponadtlenkowego ($\bullet O_2^-$) oraz NO powstaje $ONOO^-$, który mimo krótkiego okresu półtrwania ($t_{1/2}$) prowadzi do szybkiego nitrowania białek i lipidów [177]. Wykazano, iż poziom indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS) oraz neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS) jak i samego NO jest podwyższony w obrębie komórek glejowych SN u pacjentów z chorobą Parkinsona [178]. Dodatkowo, stwierdzono, iż stężenie NO oraz $ONOO^-$, jest wyższe w surowicy u pacjentów z chorobą Parkinsona w porównaniu do grupy kontrolnej [179]. Analizując model zwierzęcy wykazano, iż myszy z wyłączonym genem kodującym iNOS lub nNOS są bardziej odporne na działanie neurotoksyn uszkadzających układ nigrostriatalny [180]. Inne serie badań wykazały obecność

nitrowanych cząsteczek ASN w badaniach neuropatologicznych u pacjentów z chorobą Parkinsona, zanikiem wieloukładowym oraz otępieniem z ciałami Lewy'ego, gdzie zmodyfikowana cząsteczka ASN stanowi składnik filamentów ciał wtrętowych oraz nierozpuszczalnych frakcji białkowych w zajętych chorobą obszarach mózgu [181]. Analizy te wskazują na istnienie selektywnego i specyficznego procesu nitracji ASN, który jest związany ze zwiększeniem jej podatności na agregację, co pośrednio sugeruje, że oksydacja i nitrowanie przyczynia się bezpośrednio do postępu zmian neurodegeneracyjnych w synukleinopatiach [182]. Jednocześnie zaobserwowano, iż ASN w obecności $ONOO^-$ łatwiej podlega modyfikacji, prowadząc do powstania stabilnych oligomerów odpornych na działanie czynników denaturujących [183]. Potencjalnych źródeł stresu oksydacyjnego upatruje się również w procesie katabolicznego samoutlenienia DA do chinonów i semichinonów oraz produkcji 6-hydroksy-DOPA (6-OHDOPA) przy udziale melanocytów [184, 185].

1.1.4.4. Ekscytotoksyczność kwasu glutaminowego

Wśród hipotez dotyczących patogenezy choroby Parkinsona swoje miejsce znalazła również teoria dotycząca nadmiernej produkcji neurotransmiterów pobudzających, takich jak GLU [186]. Neurony układu glutaminergicznego stanowią najliczniejszą grupę w obrębie OUN, gdzie GLU stanowi główny neuroprzekaźnik pobudzający w mózgu ssaków [187]. Projekcje glutaminergiczne łączą wiele struktur mózgowych, wśród których można wyróżnić m. in. szlaki eferentne z kory (CX) do wzgórza (łac. *thalamus*) oraz jądra półleżącego przegrody (łac. *nucleus accumbens septi*) i ciała migdałowatego (łac. *corpus amygdaloideum*) [188]. GLU jest uwalniany z zakończeń presynaptycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na depolaryzację neuronu, a następnie przy udziale transportera aminokwasów pobudzających 1 (EAAT-1) dochodzi do jego wychwytu zwrotnego do komórek [189]. W komórkach neurogleju odbywa się konwersja GLU do glutaminy (GLN), uwalnianej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, skąd jest ona wchłaniana zwrotnie do zakończeń presynaptycznych a następnie pod wpływem enzymu glutaminazy (GLS1) przekształcana ponownie w GLU, odnawiając pulę tego neuroprzekaźnika [190]. Zwiększone stężenie GLU w przestrzeni pozakomórkowej jest związane z silnym działaniem neurotoksycznym [191]. Wykazano iż GLU jest odpowiedzialny za wystąpienie objawów motorycznych choroby, objawów niepożądanych terapii L-

DOPA, oraz procesu degeneracji neuronów dopaminergicznych [192]. Zaburzenie homeostazy glutaminergicznej odnotowano w badaniach w różnych modelach, gdzie degeneracji zakończeń neuronów dopaminergicznych w obrębie ST towarzyszyło pobudzenie oraz zwiększenie liczby astrocytów przy obniżonej gęstości transporterów astrocytarnych wskazując na zmniejszenie wychwytu zwrotnego GLU poprzez zaburzenie funkcji astrogleju [193, 194]. W momencie zwiększonego uwalniania neuroprzekaźnika oraz zmniejszonego wychwytu zwrotnego dochodzi do nadmiernej stymulacji receptorów NMDA, receptorów kwasu α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) jak również receptorów grupy I, takich jak metabotropowy receptor glutaminergiczny typu 1 (mGluR1) oraz metabotropowy receptor glutaminergiczny typu 5 (mGluR5), co prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} oraz aktywacji szeregu zależnych od niego enzymów m. in. kinaz białkowych, nukleaz oraz lipaz doprowadząc do zaburzeń czynnościowych błony komórkowej neuronów, dysfunkcji mitochondriów oraz stresu oksydacyjnego a w konsekwencji do śmierci komórki [195, 196]. W przebiegu choroby Parkinsona zwiększona aktywność układu glutaminergicznego dotyczy szlaku łączącego STN, SN oraz wewnętrzną część gałki bladej (GPi), jak również szlaków korowo-prążkowiowych, gdzie jest ona czynnikiem destrukcyjnym dla zakończeń neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w tych obszarach neuroanatomicznych [197, 198]. Wydaje się również, że szlak korowo-wzgórzowy zostaje zahamowany [199]. W tym przypadku szlak glutaminergiczny oraz związane z nim receptory zlokalizowane w obrębie szlaków wychodzących z STN oraz CX stanowią potencjalnie efektywny punkt uchwytu dla potencjalnych leków o znaczeniu neuroprotekcyjnym lub objawowym [200]. Dotychczas prowadzone badania nad rolą antagonistów receptorów glutaminergicznych nie dostarczyły jednak przekonujących wyników z uwagi na obserwowane działania niepożądane, co wynika z neuroanatomicznego rozmieszczenia receptorów glutaminergicznych w całej objętości mózgu [201]. Kompleksowe zaburzenia neurochemiczne w przebiegu choroby Parkinsona nie ograniczają się tylko do zmian profilu neuroprzekaźników pobudzających, lecz wtórnie mogą być również wyrażone poprzez zmiany poziomów stężeń innych aminokwasów, takich jak alanina (ALA), kwas asparaginowy (ASP), tauryna (TAU), histydyna (HIS) oraz seryna (SER) [202].

1.1.4.5. Zaburzenia funkcji proteasomów

Proteasomy stanowią istotny wewnątrzkomórkowy system kontroli jakości białek, który zapobiega nagromadzaniu się ich nieprawidłowych, uszkodzonych oraz toksycznych form w komórce, utrzymując stan homeostazy białek (proteostazy) [203, 204]. Wewnątrz jednej komórki ludzkiego organizmu znajduje się około 15-30 tysięcy proteasomów, które zlokalizowane są w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym gdzie skupiają się wokół centrioli (łac. *centriolum*), tworząc tzw. centra proteolityczne komórki [205]. Biorąc pod uwagę budowę ultrastrukturalną, proteasomy 26S występujące u eukariontów stanowią multikatalityczny kompleks proteinaz będący wielopodjednostkowym ATP-zależnym agregatem enzymatycznym o masie cząsteczkowej około 2500 kDa, który składa się z proteasomu 20S tworzącego katalityczny rdzeń oraz zasocjowanego z jednej lub obu stron asymetrycznego kompleksu regulatorowego 19S (PA700) [206, 207]. Katalityczny kompleks rdzeniowy 20S składa się łącznie z 28 homologicznych podjednostek polipeptydowych, 14 podjednostek α i 14 podjednostek β, które tworzą dwa zewnętrzne i wewnętrzne pierścienie, ułożone jeden na drugim formując strukturę cylindryczną [208]. Zewnętrzne pierścienie składają się z siedmiu podjednostek α (α1-α7), natomiast każdy pierścień wewnętrzny zbudowany jest również z siedmiu podjednostek β (β1-β7), definiujących bezpośrednio proteolityczną aktywność centralnego kanału stanowiącego miejsce rozkładu białek [209]. Rdzeń katalityczny proteasomu 20S zawiera poszczególne centra aktywne o różnych specyficznościach określanych jako chymotrypsyno- (CHT-L), trypsyno- (T-L) i kaspazopodobną (C-L) [210]. W przypadku uformowania się immunoproteasomu obserwuje się dodatkową podjednostkę oligopeptydową 11S, która po przyłączeniu do podjednostki 20S służy jako jego potencjalny aktywator [211]. Proteasomy odpowiadają za rozszczepianie i biodegradację polipeptydów w szlaku nielizosomalnym, zależnym od Ub, który to szlak reguluje również ekspresję genów poprzez mechanizmy proteolityczne jak i nie proteolityczne, takie jak ubikwitynacja histonów oraz regulatorów transkrypcji w regulacji dynamiki chromatyny i naprawie uszkodzeń DNA [212, 213]. Ultrastrukturalnie, cząsteczki Ub składają się z 76 reszt aminokwasowych (aa) przy masie około 8.5 kDa oraz występują w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych wykazując przy tym wysoce konserwatywną strukturę pod względem ewolucyjnym [214]. Proces przyłączenia szeregu cząsteczek Ub do łańcucha danego

białka (poliubikwitynacja) powoduje jego oznakowanie, stanowiąc silny sygnał do jego degradacji [215]. Enzymy uczestniczące w ubikwitynacji białek są zdolne do bardzo selektywnego rozpoznawania substratu oraz następczego tworzenia wiązań izopeptydowych [216]. Aktualnie przyjmuje się że proces degradacji cząsteczek ASN w cytozolu podlega ścisłej regulacji poprzez system proteasomalny [217]. Zaobserwowano, iż zastosowanie selektywnych inhibitorów proteasomów z grupy β-laktonów czy epoksomycyn ($C_{28}H_{50}N_4O_7$) hamuje proces degradacji ASN w hodowlach tkankowych [218, 219]. Jednocześnie, zablokowanie aktywności proteasomalnej w wyniku zastosowania selektywnego inhibitora lub wystąpienia mutacji punktowej prowadzi do akumulacji ASN wewnątrz komórki i tworzenia wtrętów podobnych do ciał Lewy'ego [220, 221]. Wykazano również, że ASN może ulegać procesowi ubikwitynacji w warunkach *in vitro*, gdzie w mózgach pacjentów z ciałami Lewy'ego można znaleźć ponadto poli-ubikwitynowane formy tego białka co wskazuje, że modyfikacja ta jest tylko jednym z procesów biorących udział w degradacji ASN przez proteasomy [222, 223]. Istotną rolę w procesie degradacji ASN przez system proteasomalny odgrywa PARK2, która wykazuje aktywność ligazy ubikwityny E3 (UBL-E3), której głównym zadaniem jest przyłączanie reszt Ub do białek degradowanych przez proteasomy [224, 225]. W momencie wystąpienia choroby Parkinsona o dziedzicznym wariancie związanym z mutacją w genie kodującym PARK2 dochodzi do zaburzenia degradacji ASN i jej nagromadzenia się w znacznych ilościach w neuronach [226]. Stwierdzono, że ASN podlega również translokacji i degradacji lizosomalnej w procesie autofagocytozy zależnej od białek opiekuńczych [227, 228]. Po aktywacji procesu autofagii następuje translokacja. Patologiczne i zmutowane formy ASN mają zdolność do wiązania się z receptorami błonowymi lizosomów prowadząc do ich zablokowania, co skutkuje zahamowaniem degradacji nie tylko nieprawidłowej, ale też natywnej formy ASN oraz innych białek podlegających procesowi degradacji w lizosomach [229]. Ponadto, wykazano iż ASN w formie monomerów, jak również agregatów może podlegać trawieniu przez poszczególne proteazy, takie jak neurozyna (KLK6), kalpaina (CAPN) oraz enzymy z grupy mataloproteinaz (MMP) [230, 231, 232].

1.1.4.6. Reakcja zapalna

1.1.4.6.1. Teoria neurozapalna

Aktualnie uważa się, że miejscowa i uogólniona odpowiedź układu immunologicznego pełni znaczącą rolę w patogenezie choroby Parkinsona jak również innych schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym [233]. Jeden z pierwszych dowodów na rozwój reakcji zapalnej w przebiegu schorzenia przedstawili McGeer i wsp. w 1988 r. wykazując obecność form reaktywnego mikrogleju, cechującego się ekspresją ludzkich antygenów leukocytarnych, powiązanych z antygenem DR (HLA-DR), jak również nacieku limfocytów T w okołonaczyniowej tkance w sekcyjnych preparatach neuropatologicznych SNpc pobranych od pacjentów z chorobą Parkinsona [234, 235]. W dalszych badaniach analizujących to zagadnienie stwierdzono zwiększone poziomy ekspresji β2-mikroglobuliny (B2M) stanowiącej elementy łańcuchów lekkich cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) w obrębie ST w sekcyjnych preparatach neuropatologicznych pobranych od tych pacjentów [236]. Jednocześnie, wykazano aktywację układu dopełniacza poprzez obecność opsonin C3d i C4d na powierzchni oligodendrocytów w sekcyjnych preparatach neuropatologicznych SNpc [237]. Inne badania przeprowadzone w tamtym okresie opisały również zmiany odpowiedzi immunologicznej poza granicami OUN związane z podwyższonym stężeniem poziomu poszczególnych cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu jak również aktywację i rekrutację określonych populacji komórkowych tego układu [238, 239]. Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego w przebiegu choroby Parkinsona powiązano również z wystąpieniem procesów autoimmunizacyjnych, gdzie w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) pacjentów zidentyfikowano przeciwciała skierowane przeciwko neuronom dopaminergicznym [240, 241, 242]. Istotne obserwacje dotyczące mechanizmów reakcji zapalnej poczyniono analizując potencjalny neuroprotekcyjny wpływ leków przeciwzapalnych i immunosupresyjnych w zwierzęcych eksperymentalnych modelach choroby oraz obserwacjach klinicznych [243, 244, 245]. Dowodów sugerujących udział reakcji zapalnej w przebiegu choroby Parkinsona dostarczyły również badania wykonane przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET), gdzie przy użyciu znacznika [^{11}C](R)-PK11195, wiążącego się z białkiem translokacyjnym (TPSO) jak również [^{18}F]FEPPA oraz [^{11}C]PBR28 wykazano zwiększoną aktywację mikrogleju w mózgach pacjentów już na wczesnych etapach choroby [246, 247]. Aktualnie wiadomo również, że reakcja neurozapalna w

obrębie OUN stanowi proces który z jednej strony może nasilać zjawisko neurodegeneracji, z drugiej strony może natomiast stanowić protekcyjny mechanizm kompensacyjny uruchamiany w obszarze uszkodzonych neuronów [248, 249]. Analiza wciąż rosnącej liczby doniesień ukierunkowuje uwagę na szczególną rolę reakcji zapalnej w patogenezie choroby Parkinsona [250]. Aktualnie wielu niezależnych autorów skupia się w swoich pracach nad identyfikacją i precyzyjnym opisem mechanizmów neurozapalnych odpowiedzialnych za rozwój procesów neurodegeneracyjnych, wskazując pośrednio na szczególne znaczenie tego zagadnienia i rozwoju tego kierunku badań [251].

1.1.4.6.2. Zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego

W przebiegu choroby Parkinsona dochodzi do zmian w regulacji oraz funkcjonowaniu zarówno miejscowej jak i systemowej odpowiedzi immunologicznej [252]. Obserwowany charakter tych zmian może wskazywać na udział procesów i komponenty autoimmunologicznej w patogenezie schorzenia [253]. Wykazano, że proces oksydacji DA jest związany ze zmianami w strukturze białek i innych makromolekuł w obrębie neuronów dopaminergicznych, co może indukować syntezę przeciwciał skierowanych przeciwko tym cząsteczkom, w konsekwencji prowadząc do rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko tym neuronom [254, 255]. Badania surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona wykazały obecność przeciwciał klasy IgG reagujących z chinoproteinami, będącymi białkami powstałymi w procesie oksydacji DA [256]. Pogłębiona analiza pozwoliła również na zidentyfikowanie tego typu przeciwciała IgG zarówno w surowicy pacjentów pierwotnie nie leczonych, jak również tych leczonych preparatami L-DOPA, co wskazuje, że ich obecność jest zjawiskiem związanym z pierwotnymi zmianami neurozapalnymi, nie będącymi wynikiem procesu wtórnego, związanego z terapią farmakologiczną L-DOPA. Ponadto, u pacjentów z chorobą Parkinsona, szczególnie tych dotkniętych ostrym przebiegiem klinicznym, wykazano podwyższoną aktywność procesów cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) oraz obwodowego wzrostu aktywacji komórek NK [257]. Określenie dokładnego znaczenia tego procesu w mechanizmie neurozapalnym leżącym u podłoża choroby Parkinsona jest trudne przy obecnym stanie wiedzy [258]. Jednocześnie analiza profilu cytomorfologicznego surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona wskazuje, że wraz z

czasem dochodzi do zmniejszenia odsetka wysoce cytotoksycznych form komórek NK i wzrostu mniej cytotoksycznych form w porównaniu ze zdrowymi kontrolami [259]. Sugeruje to istnienie początkowej funkcji ochronnej wykazywanej przez komórki NK, polegającej na zapobieganiu toksycznemu wpływowi ASN, która stopniowo ulega osłabieniu wraz z postępem choroby i zmniejszeniem aktywności komórek NK [260, 261]. Analizy przeprowadzone na modelu zwierzęcym *in vivo* wykazały że immunizacja kawii domowych (łac. *Cavia porcellus*) z odmiany Hartley bydlęcym ekstraktem struktur śródmózgowia była związana z 25% spadkiem liczby neuronów dopaminergicznych w obrębie SNpc, jak również analogicznym 27% spadkiem poziomu DA w obrębie struktur ST sugerując wyraźnie rolę przeciwciał skierowanych przeciwko neuronom dopaminergicznym w inicjowaniu procesów autoimmunologicznych prowadzących do śmierci tych komórek [262]. Podobne obserwacje poczyniono obserwując autoimmunologiczne uszkodzenie neuronów dopaminergicznych u szczurów szczepu Sprague-Dawley, którym stereotaktycznie podano przeciwciała IgG uzyskane z surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona odnotowując 50% spadek liczby neuronów w obrębie SNpc oraz wywołanie objawów hemiparkinsonizmu [263]. Inne badania wykazały, iż poszczególne populacje komórek układu immunologicznego, takie jak monocyty oraz limfocyty T izolowane z krwi osób z chorobą Parkinsona poddane *in vitro* stymulacji lipopolisacharydem (LPS) wykazują zwiększony poziom syntezy cytokin, chemokin oraz czynników transkrypcyjnych biorących udział w reakcji zapalnej w porównaniu do komórek osób zdrowych [264]. W tym przypadku również nie wykazano różnicy w odpowiedzi komórek monocytarnych w odniesieniu do stymulacji przez LPS przez pacjentów przyjmujących różne dawki L-DOPA, wykluczając immunomodulacyjne działanie L-DOPA, nadaktywność wydzielniczą komórek immunokompetentnych. Istotny wpływ procesów immunologicznych na przebieg choroby Parkinsona dostarczają wyniki badań z zakresu epidemiologii genetycznej [265]. Stwierdza się w tym przypadku istnienie polimorfizmu określonych genów dla markerów reakcji zapalnej, gdzie zmienność polimorficzna związana jest z m. in ryzykiem, wiekiem oraz przebiegiem klinicznym choroby Parkinsona [266, 267]. Istotną obserwację stanowi również fakt, iż limfocyty posiadają na swojej powierzchni receptory wiążące DA, co wyraźnie sugeruje wpływ tego neurotransmitera na funkcjonowanie układu immunologicznego [268]. Fakt ten można częściowo wiązać z odmienną zapadalnością pacjentów z chorobą Parkinsona otrzymujących leki dopamionergiczne na niektóre typy nowotorów oraz infekcje [270,

271]. Przytoczone powyżej informacje w jasny sposób wskazują na udział systemowych procesów immunologicznych w patogenezie choroby Parkinsona, gdzie wciąż otwartą kwestią pozostaje doprecyzowanie fakt, czy zmiany w funkcjonowaniu obwodowego układu immunologiczngo stanowią proces pierwotny, który inicjuje następczy proces w obrębie OUN, czy też odwrotnie sygnał zmiany reaktywności obwodowych komórek immunokompetentnych pochodzi pierwotnie z OUN, czyniąc zmiany te procesem wtórnym.

1.1.4.6.3. Lokalna reakcja neurozapalna

Przebieg procesu neurodegeneracyjnego jest związany z wystąpieniem miejscowej reakcji w obrębie określonych struktur OUN, na którą składa się pobudzenie komórek glejowych oraz rozwój reakcji zapalnej [272]. Zachodzące procesy są związane z pobudzeniem populacji komórek mikrogleju oraz astrogleju, wzrostem poziomu ekspresji i syntezy szeregu mediatorów reakcji zapalnej takich jak cytokiny, chemokiny, białka ostrej fazy, cząsteczki adhezyjne, białka składowe układu dopełniacza oraz czynniki wzrostu [273, 274]. Dodatkowo obserwuje się rekrutację i migrację komórek układu immunologicznego z obwodu, co dodatkowo wzmacnia i indukuje wytworzenie specyficznego mikrośrodowiska neurozapalnego, na które składają się zaburzenia w wielopoziomowych interakcjach w obrębie tzw. „sieci cytokin" oraz wystąpieniu zjawiska astroglejozy [275]. Rozwój reakcji zapalnej stanowi nie tylko odpowiedź OUN na postępującą neurodegenerację, ale w istotny sposób przyczynia się do zaistnienia szeregu procesów i mechanizmów prowadzących do nasilenia i degeneracji neuronów dopaminergicznych, prowadząc w konsekwencji do całościowych zaburzeń neurochemicznych w obrębie całego OUN [276, 277]. Jednocześnie uważa się, że miejscowa reakcja neurozapalna w miejscu zwyrodnienia układu nigrostriatalnego może w pewnym stopniu wykazywać działanie neuroprotekcyjne i stanowić mechanizm wzmacniający procesy kompensacyjne uruchamiane w obrębie uszkodzonej części OUN [278, 279].

1.1.4.6.4. Rola i funkcja komórek glejowych

1.1.4.6.4.1. Komórki mikrogleju

Mikroglej jest populacją nieneuronalnych komórek OUN stanowiących rezydualne makrofagi (MΦ) kontrolujące homeostazę i biorące udział w odpowiedzi immunologicznej na skutek oddziaływania czynników bezpośrednio uszkadzających tkankę nerwową [280]. W mózgu osoby dorosłej, w którym nie zachodzą zmiany patologiczne, mikroglej tworzy stałą populację pozostającą w stanie homeostazy określaną mianem mikrogleju spoczynkowego, która stanowi około ~20% wszystkich komórek glejowych OUN [281]. Przybiera on formę niewielkich komórek, charakteryzujących się obecnością 3-5 długich, cienkich wypustek dendrytycznych oraz małym owalnym lub nieregularnym ciałem komórkowym [282]. Do populacji komórek mikrogleju zaliczamy zarówno komórki rezydualne znajdujące się w obrębie OUN, jak również komórki monocytarne przedostające się do niego z obwodu w trakcie toczącego się procesu neurozapalnego [283]. Komórki mikrogleju wykazują na swojej powierzchni ekspresję licznych cząsteczek świadczących o ich szpikowym pochodzeniu takich jak m. in. zjonizowana adaptorowa cząsteczka wiążąca wapń 1 (Iba-1), antygen różnicowania komórkowego 45 (CD45), antygen różnicowania komórkowego 11b (CD11b), antygen różnicowania komórkowego 54 (CD54), antygen różnicowania komórkowego 14 (CD14) oraz moduł zawierający receptor hormonu podobnego do mucyny 1 (F4/80) [284, 285]. Mikroglej wykazuje zdolność reakcji zarówno na zmiany w mózgu, potencjalnie mogące zagrażać jego strukturalnej integralności, jak również te jedynie świadczące o subtelnej zmianie w mikrośrodowisku danej struktury lub obszaru poprzez obecność różnorodnych systemów detekcji sygnałów oraz możliwości uruchomienia różnego typu mechanizmów ich transdukcji [286]. W tym przypadku do aktywacji pod postacią proliferacji, migracji i fagocytozy dochodzi na skutek obecności czynników zakaźnych (bakterii, wirusów, prionów), patologicznie zmodyfikowanych białek i agregatów (np. ASN), komórek apoptotycznych, cząsteczek immunomodulujących jak również zmian aktywności neuronalnej związanej z zaburzeniami neurochemicznymi [287]. Ponadto komórki mikrogleju wykazują ekspresję receptorów rozpoznających wzorzec (PRR), dzięki czemu mogą rozpoznawać i wiązać konserwatywne struktury molekularne, znane jako wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) oraz uszkodzeniami (DAMP), przyczyniając się do ich reaktywnej aktywacji i fagocytozy [288]. Aktywowany mikroglej wykazuje dużą

plastyczność morfologiczną na skutek czego dokonuje rearanżacji cytoszkieletu, przybierając postać komórek o ameboidalnym kształcie, z nielicznymi krótkimi wypustkami i dużym ciele komórkowym nabierając typowych cech komórek układu immunologicznego, co jest również związane z syntezą licznych mediatorów zapalnych, substancji sygnałowych, białek adhezyjnych oraz receptorów powierzchniowych [289]. Komórki mikrogleju wykazują zdolność ekspresji spektrum cytokin zapalnych, mogących oddziaływać na drodze parakrynnej i autokrynnej takich jak m. in. interleukina 1 alfa (IL-1α), interleukina 1 beta (IL-1β), czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF-α), interleukina 5 (IL-5), interleukina 6 (IL-6), interleukina 12 (IL-12), interleukina 13 (IL-13), interleukina 15 (IL-15) oraz interleukina 16 (IL-16) [290, 291]. Wśród cząsteczek przeciwzapalnych i czynników wzrostu należy wymienić m. in. interleukinę 4 (IL-4), interleukinę 10 (IL-10), interferon alfa (IFN-α), interferon gamma (IFN-γ), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), glejopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF), czynnik wzrostu nerwów (NGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów 2 (bFGF) oraz płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) [292, 293]. Mikroglej odpowiada również za ekspresję i wydzielanie szeregu czynników chemotaktycznych takich jak m. in. interleukina 8 (IL-8), ligand chemokiny 1 z motywem CXC (CXCL1), ligand chemokiny 10 z motywem CXC (CXCL10), fraktalkina (CX3CL1) jak również składników układu dopełniacza (C1, C2, C3, C4, C5), metabolitów kwasu arachidonowego (AA) m. in. prostaglandyn (PGD), leukotrienów (LT), czynnika aktywującego płytki (PAF) dodatkowo również ROS oraz RNS [294, 295]. Ponadto komórki mikrogleju wykazują również na swojej powierzchni ekspresję receptorów dla fragmentu Fc łańcuchów immunoglobulin IgG (FcγRI) oraz biorą udział w prezentowaniu antygenów, dzięki cząsteczkom MHC klasy I i II [296, 297]. Aktywowany mikroglej może dokonać polaryzacji przybierając różne postacie fenotypowe w przypadku toczącego się procesu patologicznego oraz reakcji zapalnej [298]. Aktywność komórki mikrogleju, która przybiera fenotypową postać M1 (klasyczną) jest skorelowana z profilem zapalnym oraz promującym odpowiedź cytotoksyczną, gdzie fenotyp M2 (postać alternatywna) wydziela mediatory przeciwzapalne i czynniki troficzne, które stymulują naprawę oraz regenerację promując utrzymanie homeostazy [299, 300]. Obecnie wiadomo, że poza dwoma

klasycznymi fenotypami, można wyróżnić również hybrydy obu tych fenotypów (M2a, M2b, M2c) [301]. Analiza dotychczasowych doniesień naukowych pokazuje, że hipotetyczna utrata przez mikroglej funkcji neuroprotekcyjnej, obejmującej mechanizmy związane z regeneracją tkanek oraz rekonstrukcją macierzy zewnątrzkomórkowej może być kluczowym czynnikiem nasilającym proces neurodegeneracji [302, 303]. Obecnie wydaje się, że zmiana funkcji i reaktywności mikrogleju jest związana z obniżającymi się z wiekiem możliwościami przeprowadzania przez niego procesów naprawczych jak również z utratą kontroli nad jego nadmierną aktywacją przez neurony i astrocyty [304, 305]. Układ nigrostriatalny stanowi jeden z obszarów wykazujących dużą gęstość komórek glejowych oraz samego mikrogleju, co potencjalnie czyni go bardziej niż inne struktury, narażonym na działanie czynników cytotoksycznych [306]. Dodatkowo, zauważono że umiejscowienie komórek mikrogleju może być również związane z jego skłonnością do transformacji w określony morfomolekularny fenotyp, co wykazały kompleksowe analizy transkryptomiczne [307]. Kolejnymi czynnikami wpływającymi potencjalnie na funkcję komórek mikrogleju w przebiegu choroby Parkinsona mogą być mutacje genetyczne jak również wpływ agregatów ASN [308, 309]. Wydaje się, że jedną z opcji terapeutycznych w leczeniu choroby Parkinsona może być przywrócenie długofalowej homeostazy w mózgu, co miałoby polegać nie tyle na zahamowaniu zapalnej aktywności mikrogleju, ile na próbie zmiany (ang. *switch*) jego fenotypu na taki, który pozwoli na regenerację i remielinizację uszkodzonych neuronów szlaku nigrostriatalnego [310].

1.1.4.6.4.2. Komórki astrogleju

Astrocyty stanowią najliczniejszą i największą populację spośród wszystkich komórek glejowych i nieneuronalnych OUN, które spełniają wiele kluczowych funkcji w trakcie całego rozwoju ontogenetycznego człowieka [311, 312]. Do ich funkcji w trakcie embriogenezy i rozwoju mózgu należy zaliczyć kierowanie prekursorów neuronalnych (neuroblastów) do odpowiedniej struktury i obszaru mózgu, wysyłanie i transdukcję sygnałów migrującym neuroblastom do rozpoczęcia procesu różnicowania jak również zapewnienie powstałym już neuronom możliwości wytworzenia prawidłowych połączeń synaptycznych [313, 314]. W dojrzałym OUN głównym zadaniem astrocytów jest utrzymanie wewnętrznej homeostazy, zapewniającej

zachowanie prawidłowej funkcji i aktywności neuronów, stanowiąc wsparcie metaboliczne, pełniąc funkcję przestrzennego rusztowania oraz formując barierę krew-mózg (BBB) [315, 316]. Zarówno w stanie fizjologii jak również w momencie oddziaływania czynnika bezpośrednio uszkadzającego tkankę nerwową astrocyty komunikują się oraz koordynują swoją funkcję zarówno z komórkami nerwowymi jak i komórkami mikrogleju [317]. Komórki astrogleju wykazują szeroką funkcję wydzielniczą odpowiadając za ekspresję i syntezę szeregu cytokin o charakterze zapalnym takich jak m. in. IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-5, IL-6 [318, 319]. Astroglej odpowiada również za ekspresję i wydzielanie szeregu czynników chemotaktycznych takich jak m. in. białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (CCL2), makrofagowe białko zapalne 1 alfa (CCL3), ligand chemokiny 5 z motywem CC 5 (CCL5), CXCL10, czynnik pochodzenia stromalnego 1 (CXCL12) oraz IL-8 [320, 321]. Do mediatorów przeciwzapalnych i czynników wzrostu syntetyzowanych przez komórki astrocytów należy zaliczyć m. in. IL-4,IL-10, TGF-β, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, GDNF, BDNF oraz bFGF [322, 323]. Podobnie jak w przypadku komórek mikrogleju, astroglej może dokonać polaryzacji przybierając różne postacie fenotypowe, gdzie postać A1 jest związana z nabyciem funkcji neurotoksycznej, syntetyzującej czynniki sprzyjające śmierci neuronów i oligodendrocytów, natomiast postać A2 wydaje się pełnić funkcję neuroprotekcyjną, wydzielającą czynniki promujące przeżycie neuronów i ich regenerację [324]. Również podobnie jak w przypadku komórek mikrogleju, analizy transkryptomiczne wykazały, że umiejscowienie komórek astogleju może być również związane z jego skłonnością do transformacji w określony morfomolekularny fenotyp, wskazując potencjalnie na jego odmienną podatność w obrębie układu nigrostriatalnego w przebiegu choroby Parkinsona [325, 326]. Akumulacja złogów ASN w obrębie ciałek inkluzyjnych astrocytów w przebiegu choroby Parkinsona wydaje się również stanowić czynnik wyzwalający i sprzyjający ekspresji cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych oraz innych neurotoksycznych mediatorów [327]. Obecność złogów ASN wydaje się również być związana z rozwojem nadmiernej astroglejozy., zaburzającą równowagę neurochemiczną poprzez zmiany w poziomach GLU [328, 329]. Badania przeprowadzone na transgenicznych myszach z mutacją A53T wykazały spadek ekspresji EAAT-1 oraz transportera glutaminianu 1 (GLT-1) pod wpływem obecności ASN w obrębie komórek astrocytów prowadząc do akumulacji GLU w szczelinie synaptycznej przyczyniając się do nasilenia zjawiska ekscytotoksyczności [330].

1.1.4.6.5. Rola wybranych mediatorów zapalnych i czynników wzrostu

1.1.4.6.5.1. Funkcja regulacyjna odpowiedzi immunologicznej

Regulacja oraz koordynacja funkcji poszczególnych populacji komórkowych w stanie fizjologii jak również w przebiegu odpowiedzi immunologicznej odbywa się za pośrednictwem określonych nośników informacji, które stanowią cytokiny [331, 332]. Cytokiny to grupa związków glikoproteinowych o charakterze hormonów komórkowych, które w sposób autokrynny, parakrynny, endokrynny poprzez zjawiska plejotropi, redundancji, synergii i antagonizmu wpływają miejscowo i/lub ogólnoustrojowo na różne populacje komórek i tkanek organizmu człowieka [333]. Wśród coraz liczniejszej grupy cytokin, ze względu na specyficzne właściwości strukturalne oraz funkcjonalne, wyróżnia się ponadto podrodziny chemokin, interferonów oraz czynników wzrostu [334, 335]. Wielopoziomowe interakcje w obrębie tzw. „sieci cytokin" opierają się na powinowactwie jednej cytokiny do różnych rodzajów dedykowanych receptorów, jak również aktywacji poszczególnego receptora przez kilka różnych typów ligandów [336]. Mechanizm ten, jest związany ze swoistym zabezpieczeniem procesów, w które zaangażowane są cytokiny w momencie dysfunkcji lub braku danego liganda lub receptora [337]. Fenomen ten ma źródło w wielokrotnej duplikacji genów kodujących białka i receptory dla cytokin oraz kolejnych mutacji zachodzących etapowo podczas ewolucji [338, 339]. Zmienność sekwencji genetycznych wskazuje na istnienie znacznego polimorfizmu wśród cytokin i ich receptorów, co tłumaczy wewnątrz- i międzyosobnicze różnice w ujawnianiu się efektów ich działania [340]. Jednocześnie, taka zmienność implikuje to, iż ryzyko zachorowania na poszczególne schorzenia, w tym choroby o podłożu neurodegeneracyjnym będzie niejednakowa w populacji, a odpowiedź neuroimmunologiczna w przebiegu tych chorób może znacząco różnić się u poszczególnych osobników modyfikując naturalny przebieg tej choroby [341, 342]. Wśród komórek układu immunologicznego najważniejsze źródło cytokin stanowią aktywowane limfocyty T oraz makrofagi, natomiast w obrębie OUN są to komórki mikro- i astrogleju jak również neurony oraz komórki śródbłonka naczyniowego [343, 344]. W przypadku zaburzenia wewnętrznej homeostazy OUN poprzez wpływ czynnika uszkadzającego neurony obserwuje się zazwyczaj szybki wzrost stężenia cytokin oraz następczą rekrutację immunokompetentnych komórek wywołując reakcję neurozapalną i reaktywną glejozę [345]. W trakcie toczącej się reakcji neurozapalnej

cytokiny mogą pełnić przeciwstawne funkcje, z jednej strony wykazując działanie neurotoksyczne, z drugiej stanowić czynnik troficzny promujący regenerację neuronów [346]. Wśród ogólnych mechanizmów i funkcji cytokin zapalnych należy wymienić m. in. indukcję aktywności czynników transkrypcyjnych związanych ze wzrostem ekspresji genów dla wielu mediatorów reakcji zapalnej (np. innych cytokin, czynników wzrostu, interferonów, cyklooksygenaz), wzrost stężenia czynników stresu oksydacyjnego oraz nitracyjnego, ekscytotoksyczność GLU poprzez aktywację receptorów NMDA jak również uruchomienie mechanizmów apoptotycznych [347, 348]. Cytokiny zapalne, jako czynniki plejotropowe wykazują również w określonych warunkach właściwości troficzne i neuroprotekcyjne, co najprawdopodobniej zależy od ich stężenia, czasu działania, mikrośrodowiska otaczających komórek OUN oraz rodzaju i typu bodźca aktywującego [349, 350]. Zauważalne w przypadku chorób neurodegeneracyjnych przesunięcie równowagi między cytokinami pro- i przeciwzapalnymi w kierunku tych pierwszych sugeruje i wskazuje jednoznacznie ich potencjalną rolę w patogenezie tych chorób [351].

1.1.4.6.5.2. Interleukina 1 alfa (IL-1α)

IL-1α jest jedną z głównych cytokin zapalnych, odgrywa zasadniczą rolę w indukcji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej o cechach zapalenia samodzielnie oraz w połączeniu z innymi mediatorami [352]. Należy ona do rodziny IL-1 (IL-1F), która składa się łącznie z 11 przedstawicieli [353]. Prekursor IL-1α (pro-IL-1α) jest początkowo syntetyzowany jako białko cytozolowe, które po proteolizie przez szereg proteaz takich jak elastaza (ELA), granzym B (GrB), kaspaza 5 (CASP5), trombina (FIIa), chymaza (CMA1) lub CAPN jest przekształcana w formę aktywną i wydzielana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [354]. IL-1α podobnie jak IL-1β, oraz tzw. antagonista receptora dla IL-1 (IL-1RA) posiada zdolność do wiązania się z dwoma typami receptorów (IL-1R) [355]. Pierwszym z nich jest receptor typu 1 (IL-1R1), należący również do nadrodziny receptorów toll-podobnych (TLR), natomiast drugim jest receptor typu 2 (IL-1R2), który po połączeniu z danym ligandem tworzy nieaktywny kompleks, niezdolny do propagacji dalszych sygnałów komunikacji wewnątrzkomórkowej [356, 357]. IL-1R1 wykazuje większe powinowactwo do IL-1α, natomiast IL-1R2 większe w stosunku do IL-1β [358]. Istotnie wysokie poziomy ekspresji IL-1R1 obserwuje się w obszarach szczególnie bogatych w neurony, takich

jak warstwa komórek ziarnistych zakrętu zębatego (łac. *gyrus dentatus*), warstwa piramidowa komórek hipokampa (CA) oraz podwzgórza (łac. *hypothalamus*) [359, 360]. Dodatkowo ekspresja IL-1R jest znamiennie wyrażona w obrębie komórek śródbłonka naczyń mózgowych [361]. Indukcja i wewnątrzkomórkowa fosforylacja za pośrednictwem receptora IL-1R1 w połączeniu z dodatkowym białkiem receptora IL-1 (IL-1RAcP) prowadzi do sformowania kompleksu, który poprzez wewnątrzkomórkową homologiczną domenę Toll-IL-1R (TIR) rekrutuje białko adaptacyjne mieloidalnego czynnika różnicowania 88 (MyD88) [362]. Opisany kompleks wiąże serynowo-treoninowe kinazy związane z IL-1R (IRAK), które aktywują czynnik 6 związany z receptorem TNF (TRAF6), co indukuje dalsze wiązanie kinazy 1 aktywowanej przez TGF (TAK1), białko wiążące kinazę TAK1 (TAB1) oraz białko wiążące kinazę TAK2 (TAB2) [363]. TAK1 wpływa kolejno na fosforylację kompleksu kinazy IκB (IKK), aktywując w ten sposób czynnik jądrowy kappa wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B (NF-κB), gdzie ponadto aktywowane są również kinaza białkowa aktywowana mitogenem p38 (p38MAPK) oraz kinaza białka c-Jun (JNK). W wyniku tego dochodzi do transkryptomicznej aktywacji i zwiększonej ekspresji szerokiego spektrum genów odpowiedzialnych za syntezę cytokin, chemokin, czynników wzrostu, interferonów, proteaz, enzymów oraz innych cząsteczek, mediatorów oraz białek [364]. IL-1α podlega szerokiej dystrybucji i ekspresji w obrębie tkanek OUN, gdzie jest ona syntetyzowana przez neurony, komórki mikro- i astrogleju, oligodendrocyty, ependymocyty, komórki śródbłonka oraz pozostałe podtypy komórek jednojądrzastych układu immunologicznego infiltrujące OUN w trakcie reakcji neurozapalnej [365, 366].

Dane uzyskane z badań klinicznych wskazują że pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona prezentują wyższe stężenie IL-1α w surowicy oraz CSF pobranym zarówno drogą punkcji lędźwiowej jak również bezpośrednio z układu komorowego w trakcie zabiegu neurochirurgicznego lub wentrykulografii w porównaniu z osobami zdrowymi [367, 368]. Ponadto, wyniki te wskazują, że poziomy te nie odzwierciedlają wzajemnej korelacji kinetyki stężenia i najprawdopodobniej podlegają niezależnej regulacji. Jednocześnie, dane dotyczące stężenia IL-1α w surowicy oraz CSF nie korelują z fenotypową postacią choroby Parkinsona oraz jej klinicznym przebiegiem. Analizy *post mortem* przeprowadzone w trakcie badań neuropatologicznych wykazały zwiększony poziom ekspresji poszczególnych ligandów z rodziny IL-1 w obrębie tkanek pobranych z obszaru SN [369]. W badaniach na różnorodnych modelach przedklinicznych

wykazano, że zahamowanie ekspresji i/lub aktywności zarówno IL-1α jak również IL-1β jest związane ze zmniejszeniem stopnia uszkodzenia neuronów, aktywacji komórek gleju oraz redukcją rekrutacji komórek układu immunologicznego z obwodu w trakcie procesów niedokrwiennych, urazu mechanicznego oraz uszkodzenia ekscytotoksycznego [370, 371, 372]. Wyniki innych badań wskazują, iż w określonych okolicznościach IL-1α może wykazywać działanie neuroprotekcyjne, gdzie poprzez wzrost ekspresji białka związanego ze wzrostem 43 (GAP-43) wpływa na wytwarzanie połączeń neuronalnych [373]. Analizując wyniki dotyczące wpływu polimorfizmu genów dla IL-1α oraz IL-1β w populacji rasy białej, stwierdzono iż ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona w przypadku genotypu (-889C/T) nie jest związane ze zwiększoną predyspozycją i ryzykiem zachorowania [374, 375, 376]. Analogiczne badania przeprowadzone w populacji rasy żółtej wykazały zmniejszone ryzyko zachorowania na chorobę Parkinsona u nosicieli tego allelu [377, 378].

1.1.4.6.5.3. Czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF-α)

TNF-α stanowi jedną z prototypowych i głównych cytokin regulujących przebieg reakcji zapalnej oraz procesów immunologicznych wykazując plejotropowy i wielokierunkowy mechanizm działania [379, 380]. Biologiczna funkcja TNF-α w obrębie OUN jest związana z szerokim spektrum procesów wśród których należy wymienić m. in. regulację ekspresji czynników wzrostu i innych cytokin, udział w mechanizmach neurotransmisji, regulację zjawiska neuroplastyczności, udział w reakcji neurozapalnej, regulację przepuszczalności BBB, udział w procesach neurogenezy i mielinizacji oraz regulację mechanizmów termoregulacji [381, 382, 383]. TNF-α należy do nadrodziny TNF (TNFSF), która składa się łącznie z 19 przedstawicieli [384]. Gen kodujący TNF-α (X02910/X02159) jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 6 w obrębie segmentu 6p23-6q12, pomiędzy genami dla ludzkiego antygenu leukocytarnego B27 (HLA-B27) oraz ludzkiego antygenu leukocytarnego D (HLA-D) [385]. W pierwotnej postaci powstaje on jako homotrimeryczne białko transbłonowe typu II (mTNF-α) o masie cząsteczkowej 26 kDa, które w kolejnym etapie przy udziale metaloproteinazy zawierającej domenę dezintegryny i metaloproteinazy 17 (ADAM17/TACE) tworzy wolną postać TNF-α (sTNF-α) o masie cząsteczkowej 17 kDa, wydzielaną następnie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [386, 387]. TNF-α posiada zdolność do wiązania się z dwoma izotypami receptorów

występujących w postaci homotrimerów, zarówno w formie związanej z błoną komórkową oraz postaci rozpuszczalnej, takich jak receptor typu 1 (TNFR1, p55, CD120a, TNFRSF1a) oraz receptor typu 2 (TNFR2, p75, CD120b, TNFRSF1b) [388, 389]. TNFR1 podlega skutecznej aktywacji przez formy mTNF-α oraz sTNF-α, podczas gdy TNFR2 wiąże się głównie z mTNF-α [390]. Receptory te różnią się składem aminokwasowym, stopniem glikozylacji oraz budową ultrastrukturalną, zauważalną przede wszystkim w części wewnątrzkomórkowej, która w obrębie TNFR1 (55 kDa) obejmuje tak zwaną domenę śmierci (DD), która jednocześnie nie występuje w strukturze TNFR2 (75 kDa) [391]. DD stanowi sekwencję adaptorową dla białek asocjujących, jak również przekaźnik zmian konformacyjnych, gdzie wiele DD białek adaptorowych może ze sobą asocjować sprzyjając w ten sposób inicjacji i amplifikacji sygnału, co opiera się na wzajemnych oddziaływaniach elektrostatycznych amfipatycznych przeciwrównoległych reszt aminokwasowych [392]. Kolektywnie, ze względu na znaczny brak homologii budowy części wewnątrzkomórkowej obu receptorów, posiadają one zdolność propagacji różnych typów sygnałów [393]. Prototypowo TNFR1 pośredniczy przede wszystkim w procesie apoptozy i przebiegu reakcji zapalnej, gdzie wewnątrzkomórkowa propagacja sygnału za pośrednictwem TNFR2 promuje przeżycie komórek, ustąpienie stanu zapalnego oraz stymuluje procesy naprawcze [394]. Zarówno TNF-α, jak również TNFR1 oraz TNFR2 podlegają konstytutywnej syntezie w obrębie tkanki mózgu pełniąc funkcję neuroendokrynnego przekaźnika [395, 396, 397]. TNF-α podlega szerokiej dystrybucji i ekspresji w obrębie tkanek OUN, gdzie jest syntetyzowany przez neurony, komórki mikro- i astrogleju, oligodendrocyty, ependymocyty, komórki śródbłonka oraz pozostałe podtypy komórek jednojądrzastych układu immunologicznego infiltrujące OUN w trakcie reakcji neurozapalnej [398, 399, 400, 401]. Wśród populacji rekrutowanych jednojądrzastych komórek układu immunologicznego związanych z ekspresją TNF-α w trakcie reakcji neurozapalnej należy wymienić m. in. limfocyty $CD4^+$ (Th1, Th17), limfocyty $CD8^+$ (Tc1), granulocyty, monocyty oraz makrofagi [402]. Immunoreaktywność wobec TNF-α oraz obecność jego mRNA jest obserwowana w większości obszarów istoty białej i szarej, takich jak CX, CA, wzgórze, pień mózgu, most (łac. *pons*) oraz móżdżek (CM), w tym szczególnie w strukturach zaangażowanych w regulację autonomiczną, hormonalną oraz behawioralną, wśród których należy wymienić m. in. podwzgórze, ciało migdałowate, prążek krańcowy (łac. *stria terminalis*), jądro przyramienne (łac. *parabrachial nucleus*) oraz jądro grzbietowe nerwu błędnego [403, 404, 405]. TNFR1

oraz TNFR2 podlegają dystrybucji i ekspresji w obrębie rejonów mózgu, w których obserwuje się ekspresję TNF-α pośród wszystkich typów neuronów, natomiast komórki mikro- i astrogleju wykazują predominującą ekspresję TNFR1 a oligodendrocyty i komórki śródbłonka wykazują predominującą ekspresję w stosunku do TNFR2 [406, 407]. TNFR1 po aktywacji jest w stanie rekrutować dwa różne kompleksy sygnałowe (TNFRSC), pozwalające na dalszą wewnątrzkomórkową propagację sygnału [408, 409]. Kompleks typu I bierze udział głównie w aktywacji szlaków, których produkty końcowe stymulują i amplifikują odpowiedź zapalną, zwłaszcza produkcję oraz wydzielanie cytokin, podczas gdy główną funkcją kompleksu II jest transmisja sygnału prowadzącego do rozpadu komórki [410, 411]. Asocjacja TNF-α z TNFR1 powoduje dysocjację białka wyciszającego DD (SODD) oraz interakcję DD z dedykowanym białkiem związanym z tą domeną (TRADD) tworząc w ten sposób swoistą platformę adaptorową stymulującą stopniowe wiązanie innych białek takich jak czynnik związany z receptorem TNF 2 (TRAF2), białko hamujące apoptozę 1 (c-IAP1), białko hamujące apoptozę 2 (c-IAP2) oraz białko oddziałujące z receptorem 1(RIP1) [412, 413, 414]. Po utworzeniu kompleksu adaptorowego białko RIP1 za pośrednictwem liniowego kompleksu (LUBAC) ulega ubikwitynacji oraz wiąże kolejno kinazy TAK1, TAB1 i TAB2, co prowadzi do fosforylacji kompleksu IKK [415, 416]. Ponadto, podczas formowania kompleksu I, aktywacji ulegają również kinaza JNK, p38MAPK oraz zewnątrzkomórkowa kinaza regulowana sygnałem 1/2 (ERK1/2) [417]. Formacji kompleksu II towarzyszy endocytoza aktywowanego receptora, zmiana jego konformacji oraz następcza rekrutacja białka adaptorowego z powinowactwem do DD receptora FAS (FADD) oraz prokaspazy 8 (CASP8), co kończy się powstaniem kompleksu sygnałowego indukującego apoptozę (DISC) oraz śmiercią komórki [418]. Związanie mTNF-α z TNFR2 analogicznie powoduje asocjację oraz aktywację szeregu przekaźników drugo- i trzeciorzędowych, w tym kluczowego w transdukcji i propagacji sygnału TRAF2, jak również czynnika związanego z receptorem TNF 3 (TRAF3), c-IAP1 i c-IAP2, co jest związane z aktywacją kinazy JNK oraz czynnika NF-κB [419, 420]. Aktywacja i propagacja sygnału za pośrednictwem TNFR1 oraz TNFR2 jest ostatecznie związana z wielkoskalową translacyjną oraz transkrypcyjną ekspresją szerokiego spektrum mediatorów, czynników oraz enzymów w przeważającej części zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej [421].

Dane uzyskane z badań klinicznych oraz analiz przeprowadzonych *post mortem* w trakcie badań neuropatologicznych wskazują, że pacjenci z rozpoznaną chorobą

Parkinsona prezentują 432% wzrost stężenia poziomu TNF-α w CSF oraz 366% wzrost poziomu ekspresji TNF-α w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu z osobami z grup kontrolnych [422]. Równocześnie w przeprowadzonych badaniach immunohistochemicznych tkanek pobranych z obszaru SN u pacjentów z chorobą Parkinsona stwierdzono odpowiednio zwiększoną immunoreaktywność wobec TNFR1 oraz TNFR2, głównie w obrębie ciał i wypustek neuronów dopaminergiczych [423, 424]. Pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona oraz parkinsonizmem atypowym prezentują podwyższone stężenie TNF-α w surowicy, co jest dodatnio skorelowane ze stopniem upośledzenia funkcji poznawczych, występowaniem objawów depresji, stopniem niepełnosprawności oraz występowaniem zaburzeń snu [425, 426, 427, 428, 429]. Dodatkowo, podwyższony poziom wolnej postaci TNFR1 w osoczu jest dodatnio skorelowany z obecnością i stopniem występujących zaburzeń wykonawczych u pacjentów z chorobą Parkinsona [430]. Stwierdzono, że u naczelnych które otrzymały dożylnie MPTP w dawce 0.5-5.3 mg/kg, poziom TNF-α w surowicy pozostawał podwyższony do roku od czasu otrzymania iniekcji [431]. Inne obserwacje przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronów dopaminergicznych *in vitro* poddanych inkubacji w obecności TNF-α, potwierdziły wysoką toksyczność tej cytokiny w stosunku do badanej populacji komórek [432, 433]. Analizując wyniki dotyczące wpływu polimorfizmu genu TNF-α stwierdzono, iż predyspozycja i ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona o wczesnym początku jest większa w przypadku obecności genotypu (-1031C), co oceniano w populacji rasy żółtej [434, 435]. Inne badania wskazują, iż analogiczne obserwacje są związane z obecnością genotypu (-308G/A), również związanym z promotorem genu dla TNF-α, co oceniano w populacji rasy białej [436]. Dodatkowo, obecność tych polimorfizmów jest związana z wyższym odnotowywanym poziomem stężenia TNF-α w surowicy w badanej populacji. Analizując wyniki dotyczące wpływu polimorfizmu genu TNFR1 stwierdzono, iż predyspozycja i ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona jest mniejsze w przypadku obecności genotypów (+36A/G) oraz (-609G/T) [437].

1.1.4.6.5.4. Interleukina 6 (IL-6)

IL-6 stanowi jedną z najważniejszych cytokin, która charakteryzuje się wielokierunkowym profilem oddziaływania na procesy zachodzące w organizmie [438]. Uważana jest za cytokinę silnie aktywującą układ immunologiczny i wzmagającą odpowiedź zapalną, choć biorąc pod uwagę niektóre jej wybrane właściwości można przypisać jej również częściowe działanie przeciwzapalne [439]. Należy ona do rodziny IL-6 (IL-6F), która składa się łącznie z 10 przedstawicieli [440]. IL-6 powstaje jako łańcuch glikoproteinowy o długości 184 aa oraz masie cząsteczkowej 21-28 kDa, który w procesie obróbki potranslacyjnej ostatecznie przybiera postać struktury czterech połączonych wzajemnie α-helis [441]. W klasycznym układzie IL-6 wywiera swoje oddziaływanie poprzez specyficzny multimeryczny kompleks receptora IL-6 (IL-6R, gp80, CD126) oraz koreceptora glikoproteiny 130 (gp130, CD130), odpowiedzialnego za uruchomienie wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału [442]. IL-6R, poza formą błonową (mIL-6R) występuje również w formie rozpuszczalnej (sIL-6R) powstającej na drodze enzymatycznego rozkładu przy udziale metaloproteinazy ADAM17 lub na drodze translacji alternatywnego mRNA [443]. W przeciwieństwie do innych cytokin, sIL-6R nie neutralizuje IL-6, natomiast kompleks IL-6/sIL-6R również aktywuje komórki w taki sam sposób, jak sama IL-6 [442]. W warunkach fizjologicznych transaktywacja jest ograniczana przez rozpuszczalną formę gp130 (sgp130), która przyłącza kompleksy IL-6/sIL-6R ograniczając ich przyłączanie do gp130 zakotwiczonych w błonie komórkowej (mgp130) [444]. Analizy krystalograficzne wskazują, iż kompleks receptorowy może przybierać postać tetrameru, składającego się z cząsteczki IL-6, jednego łańcucha IL-6R oraz dwóch cząsteczek gp130 jak również heksametru który składa się z dwóch łańcuchów IL-6R przyłączających dwie cząsteczki IL-6 oraz 2 cząsteczek gp130 [445]. Powstanie kompleksu receptorowego powoduje aktywację szlaku przekazywania sygnału za pośrednictwem cząsteczki gp130 oraz kolejno kinaz janusowych (JAK) oraz białek przetwarzających i aktywujących transkrypcję (STAT), które na drodze nukleoplazmatycznej współdziałając z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulują transkrypcję genów [446, 447]. IL-6 cechuje się szeroką dystrybucją i ekspresją w obrębie tkanek OUN, gdzie jest ona produkowana i wydzielana przez neurony, komórki mikro- i astrogleju, oligodendrocyty, ependymocyty, komórki śródbłonka jak również większość podtypów komórek jednojądrzastych układu immunologicznego

infiltrujących OUN w trakcie reakcji neurozapalnej [448, 449].

Dane uzyskane z badań klinicznych oraz analiz przeprowadzonych *post mortem* w trakcie badań neuropatologicznych wskazują, że pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona prezentują wzrost stężenia poziomu IL-6 zarówno w surowicy, CSF oraz w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu z osobami z grup kontrolnych [429, 450, 451, 452]. Poziom stężenia IL-6 w surowicy u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona jest związany ze stopniem upośledzenia sprawności motorycznej, gorszym uzyskiwanym wynikiem badania Mini Mental State Examination (MMSE), nasileniem objawów depresyjnych, nasileniem zaburzeń snu oraz ogólną zwiększoną śmiertelnością z powodu choroby [453, 454, 455, 456]. Dodatkowo, w przebiegu choroby Parkinsona obserwuje się stopniowy wzrost poziomu stężenia IL-6 w surowicy u około 30-50% pacjentów w okresie 2 lat [457]. Wykazano również, iż poziom stężenia IL-6 w CSF u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona może być związany z upośledzeniem sprawności motorycznej oraz stopniem nasilenia zaburzeń poznawczych [458, 459]. Dodatkowo zaobserwowano, iż pacjenci z biallelicznymi i heterozygotycznymi mutacjami w obrębie genów PRKN oraz PINK1 wykazują zwiększone poziomy IL-6 w surowicy w porównaniu do osób z grup kontrolnych [460].

1.1.4.6.5.5. Interleukina 10 (IL-10)

IL-10 stanowi cytokinę o silnych właściwościach przeciwzapalnych i immunosupresyjnych, której funkcja opiera się na hamowaniu funkcji komórek prezentujących antygen oraz supresję sekrecji cytokin zapalnych [461]. Jest ona strukturalnie związana z interferonami, gdzie występuje ona w postaci homodimeru, w którym każdy monomer jest łańcuchem polipeptydowym składającym się ze 160 aa o masie molekularnej 18.5 kDa, przyjmującym po obróbce potranslacyjnej strukturę 6 połączonych ze sobą α-helis [462]. IL-10 posiada zdolność do wiązania się z receptorem IL-10 (IL-10R), stanowiącym heterodimer składający się odpowiednio z podjednostek IL-10R1 oraz IL-10R2 [463]. Asocjacja IL-10 z IL-10R ropoczyna wewnątrzkomórkową transmisję sygnału prowadząc do aktywacji kinazy janusowej 1 (JAK1), związanej z IL-10R1 oraz kinaza tyrozynowej 2 (TYK2), związanej z IL-10R2, które na drodze nukleoplazmatycznej, współdziałając z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulują transkrypcję genów [464, 465]. IL-10 jest wydzielana w OUN przede wszystkim przez aktywowany antygenami lub cytokinami mikro- i

astroglej, neurony, oligodendrocyty, ependymocyty oraz komórki śródbłonka [466, 467]. Pośród podtypów komórek jednojądrzastych układu immunologicznego infiltrujących OUN w trakcie reakcji neurozapalnej mających zdolność ekspresji IL-10 należy wymienić m. in. limfocyty $CD4^+$ (Th1, Th2, Th17, Treg), limfocyty $CD8^+$, limfocyty B, monocyty, makrofagi, eozynofile, komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego (mDC) oraz komórki tuczne [468]. Rola i funkcja IL-10 w obrębie OUN wykracza poza powszechnie znane przeciwzapalne działanie tej cytokiny, uczestniczy ona m. in w regulacji neurogenezy, neuroprotekcji czy modulowaniu procesów plastyczności synaptycznej [469]. Przeprowadzone modelowe badania różnego typu uszkodzeń mózgu w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, iż IL-10 powoduje hamowanie zmian towarzyszących aktywacji gleju, wytwarzanie cytokin zapalnych oraz innych mediatorów stanu zapalnego i wolnych rodników [470, 471]. Analogicznie IL-10R wykazują ekspresję na powierzchni większości typów komórek OUN [472]. Analizy przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że IL-10 chroni komórki dopaminergiczne przed śmiercią indukowaną działaniem LPS [473]. Inne badania przeprowadzone na pochodzących ze śródmózgowia szczurzych komórkach glejowo-nerwowych wskazują iż zastosowanie IL-10 po wcześniejszej intoksykacji LPS zwiększa ich przeżywalność [474]. Badania przeprowadzone w mysim modelu choroby Parkinsona związane z podaniem wektorów AAV z genem dla IL-10 również potwierdzają protekcyjny wpływ IL-10 w stosunku do komórek szlaku nigrostriatalnego, zwiększając ich przeżywalność oraz prowadząc do zmniejszenia spadku stężenia DA [475].

Dane uzyskane z badań klinicznych są niejednoznaczne, u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona stwierdzano zarówno podwyższone, niższe jak również równe poziomy stężenia IL-10 zarówno w surowicy jak i CSF w porównaniu z zdrowymi osobami z grup kontrolnych [476, 477]. W przypadku badań wykazujących podwyższone stężenie IL-10 w surowicy obserwowano również analogiczną korelację ze stopniem upośledzenia sprawności motorycznej oraz stopniem nasilenia zaburzeń poznawczych [478]. Jednocześnie w przypadku badań wykazujących podwyższone stężenie IL-10 w CSF obserwowano również analogiczną korelację z stężeniem ASN mierzonym w CSF [479].

1.1.4.6.5.6. Interferon gamma (IFN-γ)

IFN-γ stanowi cytokinę o właściwościach immunomodulujących, należącą strukturalnie do rodziny interferonów, mającą istotne znaczenie w regulacji reakcji zapalnej, w której główną rolę odgrywają limfocyty T [480]. Funkcja IFN-γ jest również ściśle powiązana z odpowiedzią immunologiczną w stosunku do czynników infekcyjnych, szczególne wewnątrzkomórkowych patogenów, jak również odporności przeciwnowotworowej [481]. W klasycznym układzie IFN-γ wywiera swoje oddziaływanie poprzez specyficzny multimeryczny kompleks receptorowy (IFN-γR), składającego się kolejno z łańcucha α (IFN-γR1) oraz β (IFN-γR2) [482]. Dimeryzacja obydwu łańcuchów jest związana z uruchomieniem wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału za pośrednictwem kinaz JAK i STAT, które na drodze nukleoplazmatycznej regulują transkrypcję odpowiednich genów [483]. Pośród komórek układu immunologicznego do klasycznych źródeł IFN-γ należy zaliczyć limfocyty T oraz komórki NK, gdzie specyficzne bodźce mogą również indukować wytwarzanie IFN-γ przez inne podtypy komórek [484]. Do głównych komórkowych źródeł IFN-γ w obrębie OUN należy zaliczyć neurony, komórki mikro- i astrogleju, oligodendrocyty oraz komórki śródbłonka [485, 486].

Dane uzyskane z badań klinicznych wskazują, że u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona stężenia IFN-γ w surowicy są podwyższone w porównaniu ze zdrowymi osobami z grup kontrolnych, nie odnotowywano analogicznych obserwacji w przypadku CSF [487, 488]. Analiza badań neuropatologicznych wskazuje na zwiększoną ekspresję IFN-γ w obrębie tkanek pobranych z obszaru śródmózgowia wraz ze zwiększoną koekspresją ASN w porównaniu do osób z grup kontrolnych [489]. W przypadku badań wykazujących podwyższone stężenie IFN-γ w surowicy obserwowano również analogiczną korelację ze stopniem upośledzenia sprawności motorycznej oraz stopniem nasilenia zaburzeń poznawczych [478, 490]. Dodatkowo zaobserwowano, iż pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona oraz towarzyszącymi heterozygotycznymi mutacjami w obrębie genu β-glukocerebrozydazy (GBA) wykazują zwiększone poziomy IFN-γ w surowicy w porównaniu do osób z grup kontrolnych [491].

1.1.4.6.5.7. Cyklooksygenaza 2 (COX-2)

COX-2 stanowi indukowaną izoformę enzymu cyklooksygenazy odpowiadającego za biosyntezę prostanoidów takich jak PGD, prostacykliny (PGI) i tromboksany (TxA) [492]. Substratem dla COX-2 są nienasycone kwasy tłuszczowe, spośród których kwas arachidonowy odgrywa wiodącą rolę [493]. COX-2 jest syntetyzowana w OUN przede wszystkim przez aktywowany antygenami lub cytokinami mikro- i astroglej, neurony, oligodendrocyty oraz komórki śródbłonka [494]. Podlega ona szerokiej dystrybucji w obrębie CA, CX, śródmózgowia, mostu, rdzenia przedłużonego oraz w obrębie zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych, rogach przednich jak również tylnych istoty szarej rdzenia kręgowego [495, 496]. Zdolność ekspresji COX-2 posiada również większość podtypów komórek jednojądrzastych układu immunologicznego infiltrujących OUN w trakcie reakcji neurozapalnej [497]. Aktualnie wydaje się, iż fizjologiczna stała ekspresja COX-2 w obrębie OUN jest związana z aktywnością synaptyczną oraz zjawiskiem neurotransmisji [498].

Dane uzyskane z badań klinicznych oraz analiz przeprowadzonych *post mortem* w trakcie badań neuropatologicznych wskazują, że pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona prezentują wzrost ekspresji COX-2 w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu z osobami z grup kontrolnych [499, 500].Badania przedkliniczne przeprowadzone na modelach choroby Parkinsona wskazują, iż COX-2 pośredniczy w aktywacji mikrogleju przyczyniając się do progresji zjawisk neurodegeneracyjnych poprzez indukcję produkcji wolnych rodników, nasilenie zjawiska ekscytotoksyczności glutaminergicznej oraz agregację złogów ASN [501, 502]. W modelu mysim wykazano, iż zwierzęta pozbawione genu dla COX-2 są bardziej odporne na działanie neurotoksyn uszkadzających układ nigrostriatalny [503].

1.1.4.6.5.8. Syntaza tlenku azotu (NOS)

NOS stanowi enzym występujący w aktywnej formie w postaci homodimeru, który dodatkowo przyłącza dwie cząsteczki kalmoduliny (CaM) a poziom jego aktywności jest zależny do stężenia jonów Ca^{2+} [504]. Enzym ten wymaga obecności pięciu kofaktorów, do których zalicza się dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADPH), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), mononukleotyd flawinowy (FMN), tetrahydrobiopterynę (BH4) oraz hem [505]. NOS odpowiada za pięcioelektronowy

proces utleniania azotu aminowego w cząsteczce L-argininy (L-ARG), gdzie produktami tej reakcji jest NO oraz L-cytrulina (L-CYT) [506]. W stanie fizjologicznym NO w obrębie układu nerwowego pełni rolę nietypowego modulatora, który dyfunduje swobodnie z części postsynaptycznej do części presynaptycznej zakończeń nerwowych biorąc udział w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, uwalniania neuroprzekaźników, regulacji pobudliwości neuronów oraz uczenia się i zapamiętywania [507]. Dokładne omówienie roli NxS zostało wcześniej przedstawione i opisane w części „1.1.4.3. Stres oksydacyjny" celem utrzymania przejrzystości układu prezentowanej pracy.

1.1.4.6.5.9. Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β)

TGF-β stanowi białko cechujące się wielokierunkowym profilem oddziaływania, posiadającym istotne właściwości neurotroficzne oraz immunomodulujące [508, 509]. W warunkach fizjologicznych TGF-β uczestniczy m. in. w procesie neurogenezy oraz rozwoju mózgu [510]. TGF-β składa się z dwóch łańcuchów polipeptydowych o masie molekularnej 25 kDa, które przyjmują strukturę homodimeru [511]. Aktywność biologiczna TGF-β podlega regulacji za pośrednictwem receptorowego kompleksu przyjmującego formę heterotetrameru zawierającego dwie podjednostki typu I (TβRI, TGFBR1) oraz typu II (TβRII, TGFBR2) [512]. Fizjologicznie poziom ekspresji TGF-β w dojrzałym mózgu jest na stosunkowo niskim poziomie, natomiast w przypadku zaistnienia procesu neuropatologicznego odnotowuje się jego wzrost [513]. W badaniach na różnorodnych modelach przedklinicznych wykazano, że TGF-β stanowi istotny modulator aktywacji komórek glejowych, indukując zmiany morfologiczne w obrębie astrocytów [514]. TGF-β jest związkiem cechującym się znaczącą rolą w rozwoju i funkcjonowaniu układu nigrostriatalnego [515, 516]. TGF-β jest niezbędny do wzrostu i przeżycia embrionalnych neuronów dopaminergicznych [517]. Zarodki myszy pozbawione genu dla TGF-β cechują się znacznie zmniejszoną liczbą neuronów w obrębie układu nigrostriatalnego [518]. Postępującą utratę neuronów dopaminergicznych oraz następczą agregację ASN obserwuje się u myszy w wieku 2-3 miesięcy pozbawionych genu matka przeciwko dekapentaplegicznemu homologowi 3 (SMAD3), stanowiącego kluczowy element szlaku sygnałowego TGF-β oraz u myszy z częściową delecją tego genu w wieku 19-20 miesięcy [519]. Wyniki te sugerują, że brak dostatecznej sygnalizacji TGF-β może

zwiększać ryzyko rozwoju choroby Parkinsona, natomiast modulacja w obrębie tej osi sygnałowej może być potencjalnie związana z działaniem terapeutycznym [520]. Jednakże, do tej pory dostępne dane eksperymentalne nie pozwoliły jednoznacznie wykazać ochronnego działania TGF-β na przedklinicznych modelach choroby Parkinsona [521].

Dane uzyskane z badań klinicznych oraz analiz przeprowadzonych *post mortem* w trakcie badań neuropatologicznych wskazują, że pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona prezentują wzrost ekspresji TGF-β w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu z osobami z grup kontrolnych [522]. Analogicznie u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona stwierdza się podwyższone stężenia TGF-β w CSF w porównaniu ze zdrowymi osobami z grup kontrolnych [522, 523]. Wydaje się, iż polimorfizm genu TGF-β może potencjalnie zwiększać podatność na idiopatyczną chorobę Parkinsona [524].

1.1.4.6.5.10. Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF)

BDNF należy do rodziny neurotrofin (NT), polipeptydowych czynników wzrostu odpowiadających za regulację mechanizmów neurogenezy, neuroplastyczności, neuromodulacji jak również ochronę i wspomaganie prawidłowego funkcjonowania komórek nerwowych [525]. Występowanie BDNF w poszczególnych strukturach mózgu jest związane z modyfikacją ich fizjologicznych funkcji. BDNF jest również obecny w obwodowym układzie nerwowym, trombocytach, śródbłonku naczyń krwionośnych, komórkach mięśni gładkich i szkieletowych oraz różnych komórkach układu immunologicznego [526]. Zsyntetyzowane, biologicznie aktywne białko składa się z łańcucha polipeptydowego o długości 118 aa oraz masie cząsteczkowej 13 kDa, które stanowi produkt alternatywnego splicingu 24 pierwotnych transkryptów mRNA [527]. Aktywność biologiczna BDNF podlega regulacji za pośrednictwem specyficznych receptorów takich jak receptor kinazy tropomiozyny B (TrkB) oraz receptor neurotrofin p75 (p75NTR) [528]. BDNF może wywoływać przeciwstawne działania w zależności czy wiąże się z receptorem TrkB czy p75NTR [529]. BDNF może swobodnie przekraczać BBB w obydwu kierunkach w zależności od gradientu stężeń, a poziom krążącego BDNF we krwi może odzwierciedlać jego poziom w obrębie OUN [530].

Dane uzyskane z badań klinicznych oraz analiz przeprowadzonych *post mortem* w trakcie badań neuropatologicznych wskazują, że pacjenci z rozpoznaną chorobą Parkinsona prezentują spadek stężenia poziomu BDNF zarówno w surowicy jak i w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu z osobami z grup kontrolnych [531, 532]. W tym przypadku obniżony poziom stężenia BDNF w surowicy był skorelowany ze stopniem upośledzenia funkcji poznawczych, występowaniem objawów depresji oraz występowaniem zespołu niespokojnych nóg [533, 534, 535]. Jednocześnie, obniżony poziom stężenia BDNF w surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona jest również wiązany ze spadkiem ekspresji transportera DA (DAT) w obrębie struktur ST [536]. Wydaje się również, iż obniżony poziom BDNF w jelitach u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona może być związany z występowaniem zaparć [537]. Istnieją dane wskazujące, że występowanie polimorfizmu Val66Met jest związane z występowaniem niższego poziomu BDNF w surowicy a przez to ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby Parkinsona jak również zwiększoną predyspozycją do rozwoju zaburzeń neuropsychiatrycznych w jej przebiegu [538, 539, 540]. Podobne obserwacje dotyczą występowania polimorfizmu rs6265, związanego ze zwiększonym ryzykiem występowania dyskinez w przebiegu choroby Parkinsona [541]. Potencjalne zastosowanie neurotrofin w terapii choroby Parkinsona jest obarczone trudnościami do których należy zaliczyć ich krótki czas półtrwania, słabą biodostępność oraz słabą przepuszczalność przez BBB [542].

1.1.4.7. Zmiany funkcjonowania neuroprzekaźników układu nigrostriatalnego

1.1.4.7.1. Układ dopaminergiczny

1.1.4.7.1.1. Dopamina

DA jest organicznym związkiem chemicznym należącym do neuroprzekaźników z grupy katecholamin [543]. Grupa ta charakteryzuje się zawartością w strukturze cząsteczki reszty aminowej (-NH_2) oraz pierścienia benzenowego (C_6H_6) z dwiema grupami hydroksylowymi (-OH) w pozycji orto [544]. DA stanowi około ~80% całkowitej ilości amin katecholowych zawartych w mózgu ssaków [545]. Pełni ona kluczowe funkcje w obrębie mózgu takie jak kontrola funkcji ruchowych, procesów uczenia się i zapamiętywania oraz szeregu funkcji autonomicznych [546]. Jej synteza odbywa się w dopaminegicznych neuronach w obrębie OUN oraz w innych organach organizmu takich jak trzustka, nerki, nadnercza, płuca oraz komórki układu immunologicznego, gdzie może działać na drodze auto lub/i parakrynnej [547].

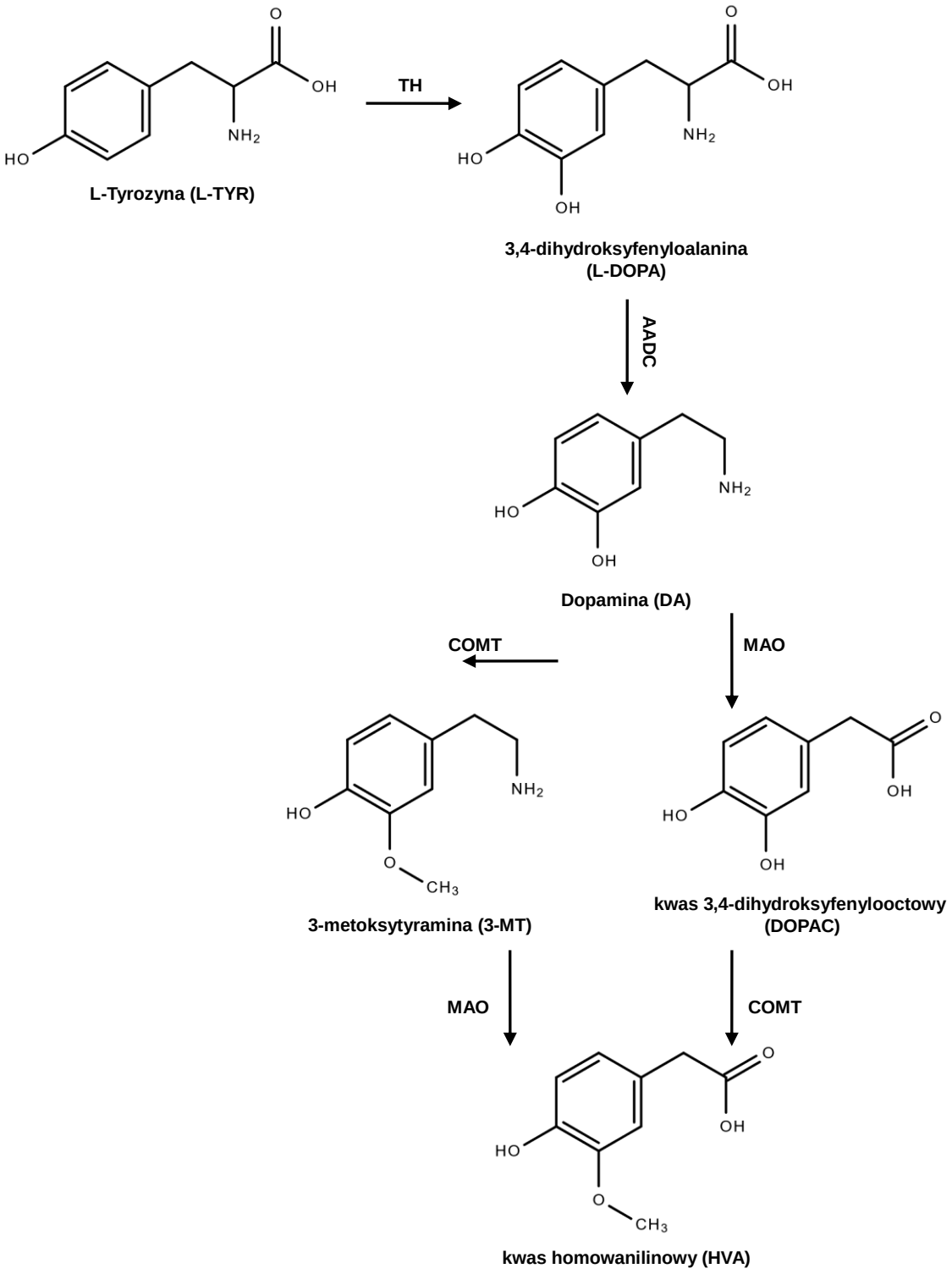
1.1.4.7.1.2. Szlaki dopaminergiczne

Produkcja i wydzielanie DA w obrębie mózgu zachodzi w neuronach dopaminergicznych, które formują sieci neuronalne stanowiące szlaki dopaminergiczne [548]. Wśród nich należy wymienić cztery najważniejsze szlaki: nigrostriatalny, mezolimbiczny, mezokortykalny oraz guzkowo-lejkowy (tuberoinfundibularny) [549]. Perikariony neuronów układu nigrostriatalnego są zlokalizowane w obrębie SN, natomiast ich aksony oddają projekcje i unerwiają głównie skorupę oraz jądro ogoniaste [550]. Odpowiednio neurony szlaku mezolimbicznego i mezokortykalnego oddają projekcje z części brzusznej nakrywki (VTA) i kolejno unerwiają jądro półleżące i guzek węchowy (szlak mezolimbiczny) oraz korę przedczołową mózgu (szlak mezokortykalny) [551]. Szlak guzkowo-lejkowy oddaje projekcje prowadzące z podwzgórza do przysadki (łac. *hypophysis*) [552]. Główną funkcją szlaku nigrostriatalnego jest regulacja funkcji motorycznych, uczestniczy on kolejno w inicjowaniu ruchu, integracji bodźców, warunkowaniu oraz koordynacji motoryczno-sensorycznej [553]. Szlak mezolimbiczny jest związany z regulacją zachowań motywacyjnych oraz układem nagrody jak również emocjonalną analizą bodźców [554]. Część mezokortykalna jest z kolei związana z regulacją procesów uczenia się, zapamiętywania oraz uwagi [555]. Istotą funkcjonowania szlaku guzkowo-lejkowego jest regulacja wydzielania hormonów przysadki, w szczególności prolaktyny (PRL) [556].

1.1.4.7.1.3. Metabolizm dopaminy

Synteza, uwalnianie oraz metabolizm DA zachodzi na drodze wieloetapowego procesu przemian neurochemicznych [557] (Rycina 1). Proces ten rozpoczyna się od L-tyrozyny (L-TYR), która pokonując BBB ulega hydroksylacji w pozycji 3’ pierścienia aromatycznego, co skutkuje powstaniem L-DOPY [558]. Przemiana ta jest katalizowana przez hydroksylazę tyrozynową (TH) przy udziale BH4 jako koenzymu [559]. Reakcja ta stanowi główny etap limitujący syntezę DA, gdzie TH cechuje się najmniejszą aktywnością spośród enzymów zaangażowanych w jej biosyntezę i podlega również hamowaniu zwrotnemu przez rosnące stężenie DA [560]. Powstała L-DOPA jest kolejno przekształcana w cytoplazmie komórek przez enzym dekarboksylazę aromatycznych L-aminokwasów (AADC) do DA [561]. W dalszej kolejności, przy udziale jednej z izoform pęcherzykowego transportera monoamin 2 (VMAT2), przenoszona jest ona do pęcherzyków synaptycznych za zasadzie symportu z jonami

sodu (Na^+) oraz chloru (Cl^-), zapewniając ochronę przed rozkładem enzymatycznym [562]. Stężenie DA w pęcherzykach osiąga wartość 0.1 M natomiast, w obrębie cytoplazmy neuronów osiąga wartość około 100 μM [563]. Różnica stężeń DA w cytoplazmie oraz pęcherzykach synaptycznych umożliwia prawidłowe funkcjonowanie neuronów, ponieważ cząsteczki DA które znajdą się w cytoplazmie ulegają procesom utlenienia, formowania wolnych rodników i reaktywnych chinonów jak również mogą hamować działanie łańcucha transportu elektronów w mitochondriach [564]. Kiedy impuls nerwowy dociera do zakończeń aksonalnych następuje otwarcie błonowych kanałów jonowych oraz następczy napływ jonów Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co stymuluje fuzję pęcherzyków synaptycznych z częścią presynaptyczną błony komórkowej neuronu oraz kolejno wydostanie się DA do szczeliny synaptycznej [565]. W jej obrębie wiąże się ona z receptorami zlokalizowanymi w błonie postsynaptycznej, gdzie po przekazaniu sygnału podlega wychwytowi zwrotnemu z przestrzeni synaptycznej do cytoplazmy części presynaptycznej za pośrednictwem DAT [566]. DAT stanowi istotne białko regulacyjne uczestniczące w neurotransmisji DA, odpowiada za stężenia tego neuroprzekaźnika w przestrzeni synaptycznej [567]. Enzymatyczny rozkład DA ma miejsce zarówno w szczelinie synaptycznej jak i we wnętrzu neuronów [568]. Na dalszych etapach w metabolizmie DA biorą udział monoaminooksydaza (MAO) oraz COMT [569]. MAO stanowi enzym który odpowiada za katalizowanie reakcji oksydacyjnej deaminacji katecholamin do właściwych aldehydów i występuje w dwóch formach takich jak monoaminooksydaza A (MAO-A) oraz MAO-B, które wykazują różną wrażliwość na działanie inhibitorów oraz swoistość substratową [570]. MAO-A odpowiada głównie za rozkład noradrenaliny (NA) oraz serotoniny (5-HT) natomiast, MAO-B wykazuje powinowactwo do DA oraz fenyloetyloaminy (PEA) i benzyloaminy (BA) [571]. Po przekształceniu przez MAO-B, DA ulega przemianie do kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) i nadtlenku wodoru (H_2O_2). W dalszej kolejności DOPAC jest uwalniany z neuronów i w neuronach postsynaptycznych lub komórkach gleju ulega przekształceniu do kwasu homowanilinowego (HVA) [572]. Część uwolnionej DA w pierwszej kolejności ulega degradacji poprzez reakcję O-metylacji za pomocą COMT do 3-metoksytyraminy (3-MT) a następnie utlenianiu przez MAO-B do HVA [573]. NA może ulegać rozkładowi w reakcjach utleniania i deaminacji do postaci 3,4-dihydroksyfenyloglikolu (DHPG), a następnie metylacji przez COMT do postaci 3-metoksy-4-hydroksyfenyloetylenoglikolu (MHPG) [574].



Rycina 1. Biosynteza i metabolizm dopaminy (DA) w obrębie ośrodkowego układu nerwowego

1.1.4.7.1.4. Receptory układu dopaminergicznego

Nerotransmisja za pośrednictwem neuronów dopaminergicznych jest możliwa dzięki pośrednictwu swoistych receptorów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie błon pre- i postsynaptycznych [575]. Aktualnie wyróżnia się pięć rodzajów receptorów dopaminergicznych, wchodzących w skład dwóch rodzin takich jak D1-podobne, obejmujące receptory D1 i D5, oraz D2-podobne, obejmujące receptory D2, D3 oraz D4 [576]. W zależności od rodziny receptory te różnią się występowaniem oraz funkcjonowaniem w obrębie organizmu [577]. Zlokalizowane wyłącznie postsynaptycznie receptory z rodziny D1 przekazują sygnał za pośrednictwem białek Gs, aktywując cyklozę adenylanową oraz zwiększając kolejno stężenie cyklicznego adenozyno-3′,5′-monofosforanu (cAMP) w cytoplazmie neuronu. Receptory z rodziny D2 zlokalizowane zarówno pre-, jak i postsynaptycznie wykazują przeciwstawne działanie hamując aktywność cyklazy adenylanowej za pośrednictwem białek Gi.

Określone typy receptorów dopaminergicznych wykazują różną dystrybucję w poszczególnych obszarach mózgu [578]:

– D1 są zlokalizowane w ST oraz CX,

– D2 są zlokalizowane w ST, CA, korze węchowej, przysadce mózgowej oraz wzgórzu,

– D3 są zlokalizowane w ST,

– D4 są zlokalizowane w korze przedczołowej, ST oraz CA,

– D5 są zlokalizowane w CA oraz korze węchowej.

Jednocześnie receptory układu dopaminergicznego mogą występować poza OUN, w obrębie śródbłonka naczyń krwionośnych [579].

1.1.4.7.2. Układ serotoninergiczny

5-HT jest organicznym związkiem chemicznym należącym do neuroprzekaźników z grupy monoamin [580]. W organizmie 5-HT powstaje na drodze enzymatycznych przemian L-tryptofanu (L-TRP), gdzie w pierwszym etapie dochodzi do addycji grupy -OH przy udziale hydroksylazy tryptofanowej (TPH) oraz BH4 w wyniku czego powstaje 5-hydroksytryptofan (5-HTP) [581]. W dalszej kolejności dochodzi do dekarboksylacji 5-HTP przez AADC oraz wytworzenia 5-HT [582]. Produktem rozkładu 5-HT jest kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA), który powstaje pod wpływem działania MAO [583]. Obserwowalne obniżenie poziomu 5-HT w przebiegu choroby Parkinsona stanowi wynik ubytku neuronów w obrębie VTA i innych strukturach mezolimbicznych [584]. Zmiany te wydają się odpowiadać za objawy depresji towarzyszące chorobie Parkinsona [585].

1.1.4.7.3. Układ glutaminergiczny

GLU stanowi organiczny związek chemiczny należący do neuroprzekaźników z grupy aminokwasów [586]. Stanowi on główny neurotransmiter pobudzający, gdzie około 50% neuronów o obrębie OUN wykorzystuje go jako neuroprzekaźnik [587]. Synteza GLU ma miejsce w komórkach glejowych i zachodzi przy udziale GLS1 z GLN [588]. GLU odpowiada za pobudzenie receptorów jonotropowych, wśród których należy wymienić receptory kainowe, receptory selektywnie aktywowane AMPA oraz receptory selektywnie aktywowane NMDA, jak również siedem rodzajów receptorów metabotropowych (mGluR1-mGluR8) podzielonych na trzy grupy [589]. Układ glutaminergiczny jest odpowiedzialny za szeroko rozumiane dojrzewanie neuronów oraz bierze udział w synaptycznych procesach adaptacyjnych oraz emocjonalnych [590]. Dokładne omówienie roli GLU zostało wcześniej przedstawione i opisane w części „Ekscytotoksyczność kwasu glutaminowego” celem utrzymania przejrzystości układu prezentowanej pracy.

1.1.4.7.4. Układ GABA-ergiczny

Kwas gamma (γ)-aminomasłowy (GABA) jest organicznym związkiem chemicznym należacym do neuroprzekaźników z grupy aminokwasów, który stanowi główny neurotransmiter o działaniu hamującym [591]. Około 25% synaps zlokalizowanych w obrębie OUN stanowią synapsy GABA-ergiczne [592]. Synteza GABA po przekształceniu GLU ma miejsce w komórkach glejowych oraz w neuronach i zachodzi w wyniku reakcji katalizowanej przez dekarboksylazę kwasu glutaminowego (GAD) przy udziale fosforanu pirydoksalu (PLP) jako kofaktora [593]. Dalsze przekształcenie i metabolizm GABA zachodzi przy udziale transaminazy GABA (GABA-T), który odpowiada za przekształcenie GABA do semialdehydu bursztynowego (SSA) a następnie do kwasu bursztynowego ($C_4H_6O_4$), który uczestniczy w przemianach biochemicznych cyklu Krebsa [594]. GABA oddziałuje za pośrednictwem receptorów jonotropowych $GABA_A$ i $GABA_C$ jak również metabotropowych receptorów $GABA_B$ [595]. W przypadku pobudzenia receptora $GABA_A$ dochodzi do stopniowego napływu jonów Cl^- do wnętrza komórki w wyniku czego następuje hiperpolaryzacja błony komórkowej, redukcja potencjałów czynnościowych oraz ograniczenie napływu jonów Ca^{2+} do komórki. Kolejno pobudzenie receptora $GABA_B$ powoduje depolaryzację hamując przepływ jonów potasu (K^+) [596]. Jednocześnie GABA może wykazywać właściwości buforujące, przez co może powodować stabilizację pH w obrębie neuronów [597]. Wiadomo iż układ glutaminergiczny funkcjonuje w dynamicznej równowadze z hamującym układem GABA-ergicznym, a zaburzenia w procesie syntezy i metabolizmu tych aminokwasów mogą sprzyjać ekscytotoksyczności, stanowiącej istotny czynnik w patofizjologii choroby Parkinsona [598]. Zaobserwowano, że zaburzona równowaga pomiędzy układem GABA-ergicznym oraz glutaminianergicznym może wpływać na wystąpienie zaburzeń funkcji układu dopaminergicznego [599]. GABA może również wpływać na przekaźnictwo dopaminergiczne poprzez aktywację receptora D1 [600]. Dodatkowo, wydaje się iż zaburzenia funkcji mitochondriów mogą wpływać na transport oraz stężenie aminokwasów w wyniku zaistnienia deficytu energetycznego nasilając procesy neurodegeneracyjne [601].

1.1.5. Wybrane zwierzęce modele doświadczalne choroby Parkinsona

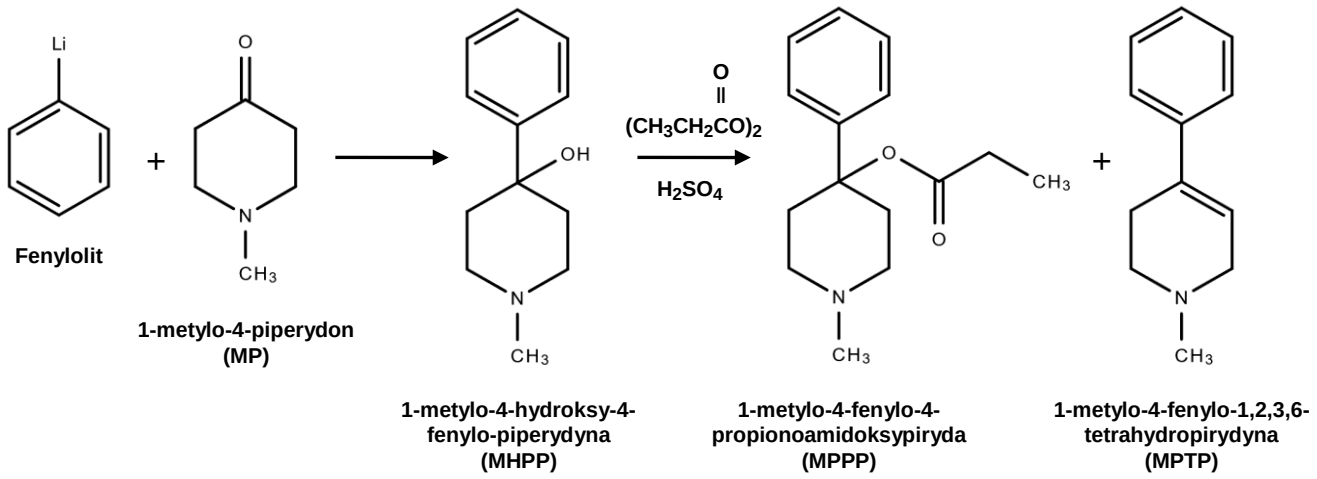
1.1.5.1. Ogólna charakterystyka

Aktualna wiedza i dane eksperymentalne na temat poszczególnych koncepcji mechanizmów śmierci neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie SN stanowią efekt znacznego rozwoju warsztatu badawczego, wykorzystującego zwierzęce modele doświadczalne choroby Parkinsona [602]. Punktem wyjścia do ich opracowania było wykrycie szeregu związków posiadających silne właściwości neurotoksyczne w odniesieniu do neuronów dopaminergicznych układu nigrostriatalnego [603, 604]. Obecnie coraz większe uznanie znajdują również modele transgeniczne z nadekspresją genu ASN lub indukowane podaniem wybranego wektora wirusowego zawierającego odpowiedni gen [605, 606, 607].

1.1.5.2. Model wywołany 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP)

Podstawowe modele eksperymentalne choroby Parkinsona, które są obecnie najczęściej wykorzystywane w badaniach doświadczalnych bazują na związkach, które wykazują wysoki stopień neurotoksyczności i jednocześnie trwale uszkadzają neurony dopaminergiczne. Jedną z takich substancji jest chlorowodorek MPTP (MPTP-HCL), stanowiący produkt uboczny syntezy pochodnych heroiny ($C_{21}H_{23}NO_5$), której efekt farmakologiczny jest związany z powtarzalnym i specyficznym zwyrodnieniem neuronów dopaminergicznych SN oraz ich zakończeń w obrębie ST, jak również z wystąpieniem typowych objawów parkinsonowskich u naczelnych, ludzi oraz u wybranych gatunków gryzoni [608, 609]. Jest to model pierwszego wyboru oraz swoisty złoty standard dla eksperymentów i badań nad patofizjologią śmierci neuronów w przebiegu choroby Parkinsona, najpełniej odwzorowując zarówno symptomy choroby jak również powstający ubytek funkcji szlaku niegrostrialnego [610]. Pierwsze dostępne w piśmiennictwie wzmianki dotyczące analizy biologicznego działania MPTP datuje się na lata 50. ubiegłego wieku, kiedy to w badaniach określających właściwości przeciwbólowe wybranych sulfonów (R-SO_2-R') na modelu mysim stwierdzono, że MPTP nie wykazuje właściwości analgetycznych, identyfikując go jednocześnie jako związek toksyczny [611, 612]. W dalszej kolejności działanie MPTP było analizowane u małp w kontekście jego ewentualnego użycia w leczeniu objawów choroby Parkinsona, gdzie obserwowane efekty były odwrotne niż spodziewane a ostateczne wyniki tego badania nie zostały opublikowane [613]. Również podjęta u ludzi próba

testowania MPTP jako leku przeciwparkinsonowskiego zakończyła się niepowodzeniem (zgonem dwóch z sześciu pacjentów włączonych do tej próbnej terapii), skutkując zakończeniem tego badania [614]. Ponowne zainteresowanie się naukowców związkiem MPTP miało miejsce pod koniec lat 70. kiedy to u 23-letniego studenta collegeu w miejscowości Bethesda w stanie Meryland zażywającego narkotyki zdiagnozowano objawy typowe dla idiopatycznej choroby Parkinsona, takie jak drżenie, sztywność mięśniowa, bradykinezja oraz niestabilność postawy [615]. Kolejno po rozpoznaniu objawów parkinsonizmu zastosowano u niego L-DOPA oraz bromokryptynę ($C_{32}H_{40}BrN_5O_5$), co odniosło pożądany skutek. W niedługim okresie czasu pacjent ten powrócił do przyjmowania narkotyków i ostatecznie zmarł na skutek przedawkowania kokainy ($C_{17}H_{21}NO_4$) oraz kodeiny ($C_{18}H_{21}NO_3$). Przeprowadzone badanie sekcyjne oraz ocena neuropatologiczna mózgu wykazała obecność zmian neurodegeneracyjnych w obrębie układu nigrostriatalnego, pigmentację neuromelaniny w obrębie komórek mikrogleju oraz obecność wewnątrzneuronalnych ciał Lewy'ego potwierdzając wstępną diagnozę. MPTP stanowiło produkt uboczny syntezy dla własnych potrzeb analogu meperydyny ($C_{15}H_{21}NO_2$), 1-metylo-4-fenylo-4-propionoamidoksypirydyny (MPPP). Przy produkcji tego związku zastosowano uproszczenia polegające na braku etapu oczyszczania produktu [616] (Rycina 2). Analizy spektrometryczne używanego do tego celu szkła laboratoryjnego wykazały, że w przypadku tak prowadzonej produkcji powstawał produkt uboczny w postaci MPTP.

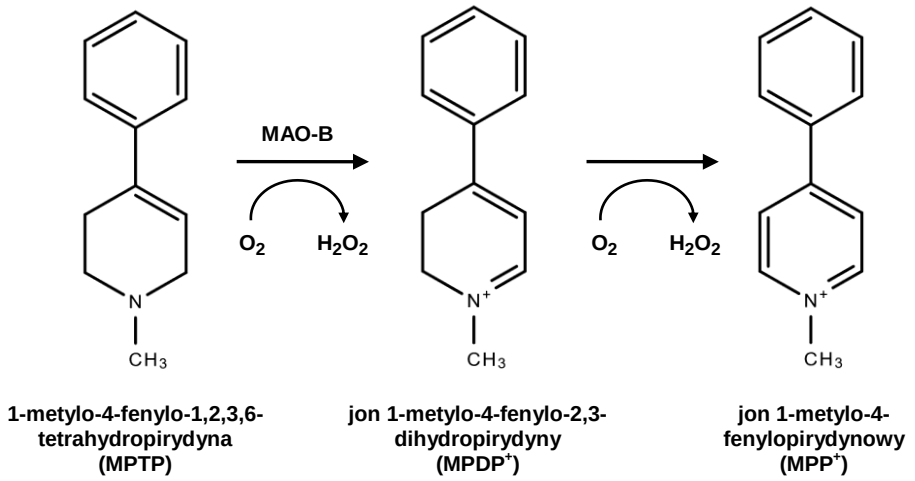


Rycina 2. Schemat przebiegu reakcji syntezy MPTP

W celu dokładnego określenia toksyczności tego związku przeprowadzono szereg testów na szczurach, które jednak w żadnym zastosowanym schemacie doświadczalnym nie spowodowały wystąpienia u zwierząt objawów choroby Parkinsona. Dopiero początek lat 80. spowodował ponowne, poważne zainteresowanie się MPTP, które nastąpiło w analogicznych okolicznościach jak wcześniej. Główny związek między MPTP a parkinsonizmem pojawił się w lipcu 1982 r., kiedy odnotowano cztery przypadki narkomanów (w wieku 26-42 lat), u których pojawiły się objawy choroby Parkinsona związane z użyciem tzw. „syntetycznej heroiny", które wystąpiły w ciągu 4 do 14 dni od zażycia [617]. Wszyscy pacjenci zareagowali na terapię L-DOPA i żaden nie wykazywał przy tym oznak remisji w ciągu pięciu miesięcy od czasu wystąpienia objawów, co objawiało się m.in. występowaniem utrwalonych dyskinez. Bazując na doświadczeniach poprzedniego przypadku wykonano analizę próbek dostarczonych narkotyków identyfikując zarówno obecność widma masowego MPPP jak i MPTP w różnych proporcjach. Na podstawie analizy zebranych próbek, historii choroby pacjentów z obydwu ośrodków oraz wyników badań neuropatologicznych zaproponowano MPTP jako czynnik neurotoksyczny odpowiedzialny za wystąpienie zespołu parkinsonowskiego [616]. Analiza profilu toksyczności obu związków na makakach królewskich (łac. *Macaca mulatta*) wykazała, że zwierzęta te są analogicznie wrażliwe na działanie MPTP użytego w dawce 1-3 mg/kg masy ciała jak ludzie, przy czym szczury wykazują mniejszą wrażliwość [618]. Wykonane iniekcje MPTP były związane z wystąpieniem u tych zwierząt charakterystycznych objawów dla idiopatycznej choroby Parkinsona. Zastosowanie preparatów L-DOPA powodowało złagodzenie objawów oraz zwiększało stężenie DA w CSF tych zwierząt. Przeprowadzone badania eksperymentalne pozwoliły na ostateczną identyfikację MPTP jako substancji neurotoksycznej związanej z wywołaniem zespołu parkinsonowskiego, powstającego na skutek wysokoselektywnego niszczenia neuronów dopaminergicznych w obrębie SN [616]. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym profilu i charakterystyki farmakologicznej MPTP wiadomo, że małpy naczelne (łac. *primates*) wykazują największy stopień wrażliwości na jego neurotoksyczne działanie [619]. Innymi gatunkami podatnymi na neurotoksyczne działanie MPTP są również psy, koty, owce oraz wybrane szczepy myszy oraz szczurów [620]. Intoksykacja MPTP jest związana z trwałym wystąpieniem zmian behawioralnych, neuropatologicznych oraz biochemicznych, porównywalnych ze zmianami obserwowanymi u pacjentów z

chorobą Parkinsona [621].

Biorąc pod uwagę aspekty logistyczne, ekonomiczne oraz etyczno-prawne ograniczenia dotyczące prowadzenia badań eksperymentalnych na ssakach naczelnych, to mysi model choroby Parkinsona indukowany podaniem MPTP stał się tym najczęściej stosowanym w badaniach [622]. Gryzonie są mniej wrażliwe na neurotoksyczne działanie MPTP niż ssaki naczelne, jednakże odpowiednio dobrana dawka i schemat podania może wywołać u nich pożądane efekty [623]. Najbardziej wrażliwe spośród gryzoni na systemowe podania MPTP są myszy czarne, przede wszystkim szczepu C57BL/6, w przeciwieństwie do szczepów albinotycznych takich jak CD-1 lub BALB/c [624]. Zastosowanie obwodowych podskórnych lub dootrzewnowych podań MPTP u szczurów w porównywalnych do myszy dawkach nie wywołuje oczekiwanego nasilonego działania neurotoksycznego jak w przypadku mysiego modelu [625]. Czynnikiem wpływającym na stopień uszkodzenia neuronów dopaminergicznych na skutek intoksykacji MPTP u myszy jest również wiek zwierzęcia, gdzie starsze osobniki są zdecydowanie bardziej podatne na neurotoksyczne działanie MPTP w porównaniu do osobników młodych [626]. Jednocześnie stopień uszkodzenia neuronów dopaminergicznych szlaku nigrostriatalnego jest bardziej nasilony u samców, co objawia się większym spadkiem stężenia DA w obrębie ST tej grupy zwierząt [627]. Po podaniu MPTP, jako związek o lipofilnym charakterze przenika BBB w ciągu kilku minut i odkłada się w obrębie tkanek OUN [628] (Rycina 3). Autoradiograficzna analiza przeprowadzona za pomocą MPTP znakowanego trytem (^{3}H) wykazała, że ^{3}H-MPTP lokalizuje się w ludzkim mózgu przeważnie w obrębie SN, skorupy, oraz miejsca sinawego (łac. *locus coeruleus*) [629]. MPTP przy udziale MAO-B jest następnie utleniana w komórkach glejowych (astrocytach) oraz neuronach serotoninergicznych do nietrwałego jonu 1-metylo-4-fenylo-2,3-dihydropirydyny ($MPDP^+$) [630]. Wydaje się, że zredukowana wrażliwość gryzoni, szczególnie szczurów na intoksykację MPTP wynika ze zmniejszonej aktywności MAO-B u tych zwierząt [631]. Dodatkowo wraz z wiekiem u osobników starszych obserwuje się wzrost aktywności tego enzymu, co częściowo tłumaczy ich zwiększoną wrażliwość na neurotoksyczne działanie MPTP [632]. W dalszej kolejności $MPDP^+$ w mechanizmie spontanicznej oksydacji jest metabolizowany do aktywnego jonu 1-metylo-4-fenylopirydynowego (MPP^+), który jest następnie uwalniany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [633].



Rycina 3. Schemat przebiegu przemian metabolicznych MPTP

Przenika on następnie do neuronu za pośrednictwem DAT na drodze transportu aktywnego, co wyjaśnia po części jego selektywność względem neuronów dopaminergicznych [634]. Jednocześnie zauważono, że farmakologiczne działanie MPP^+ jest powiązane z depolaryzacją neuronów jak również z aktywacją receptorów NMDA, przyczyniając się pośrednio do zwiększonego napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki [635]. Stwierdzono że kompetytywni jak i niekompetytywni antagoniści receptora NMDA mogą wpływać na obniżenie neurotoksycznego efektu jonu MPP^+ po podaniu domózgowym u gryzoni [636]. Analizy przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że obecność DAT na błonie komórkowej jest niezbędna do działania MPTP [637]. Delecja w zakresie jego genu ($DAT^{-/-}$) lub farmakologiczna inhibicja DAT poprzez podanie inhibitorów wychwytu DA wykazuje działanie protekcyjne w stosunku do komórek dopaminergicznych [638]. Podobny efekt protekcyjny wykazuje selegilina ($C_{13}H_{17}N$) stanowiąca inhibitor MAO-B, hamując powstawanie metabolitów MPTP [639]. Potencjalne zastosowanie inhibitorów MAO-A nie jest w tym przypadku skuteczne, samo MPTP wywiera działanie hamujące na działanie tego enzymu [640]. Po wniknięciu do komórki jon MPP^+ może przyjąć różne lokalizacje i oddziaływać neurotoksycznie w wielu niezależnych mechanizmach [641]. Najistotniejszą lokalizacją związaną z neurotoksycznym działaniem jonu MPP^+ jest macierz mitochondrium, a dokładnie kompleks I łańcucha oddechowego [642]. Poprzez zahamowanie aktywności tego enzymu dochodzi do zaburzenia procesu fosforylacji oksydacyjnej poprzez zablokowanie transportu elektronów z dehydrogenazy NADH do koenzymu Q (Q10),

co wywołuje nagłe obniżenie poziomu ATP oraz wytworzenie ROS prowadząc finalnie do oksydacyjnego uszkodzenia białek i DNA [643]. Tak powstałe uszkodzenie metabolizmu mitochondrialnego przez MPP^+ inicjuje aktywację przez komórkę drogi wewnętrznego szlaku apoptozy związanej z dysfunkcją mitochondriów oraz zaburzeniem homeostazy jonów Ca^{2+} [644]. Stwierdzono, że 0.1-0.5 mM stężenie MPP^+ wewnątrz mitochondrium jest wystarczające do wywołania tego procesu [645]. Jednocześnie wysokie stężenie jonu MPP^+ może być związane z nekrotyczną śmiercią komórki na skutek gwałtownego obniżenia poziomu ATP [646]. Proces programowanej śmierci komórki w przypadku apoptozy jest związany z wystąpieniem kilku charakterystycznych etapów w których szczególną rolę pełnią białka z rodziny chłoniaków z komórek B (BCL-2), cytochromu c (CYCS) oraz poszczególnych typów egzekutorowych kaspaz (CASP) [647]. Analizy neuropatologiczne pacjentów z chorobą Parkinsona i badania w warunkach *in* vitro oraz in *vivo* świadczą o przeważnej śmierci neuronów dopaminergicznych na drodze klasycznej apoptozy, gdzie aktualnie żaden z etapów tego patomechanizmu nie znajduje zastosowania jako punkt uchwytu w terapii choroby Parkinsona [648]. Innym istotnym mechanizmem związanym z działaniem jonu MPP^+ jest nasilone uwalnianie DA z pęcherzyków i zakończeń synaptycznych, przez co dochodzi do dodatkowej indukcji stresu oksydacyjnego gdyż cząsteczka DA stanowi reaktywną cząsteczkę wykazująca właściwości utleniające [649]. Z uwagi na opisany mechanizm związany z wywoływaniem stresu oksydacyjnego, komórki o fenotypie neuronalnym eksponowane na działanie jonu MPP^+ stanowią powszechny model zmian molekularnych zachodzących w przebiegu choroby Parkinsona w warunkach *in vitro* [650]. Jednocześnie część jonów MPP^+, która przechodzi do cytozolu komórek dopaminergicznych translokuje do pęcherzyków synaptycznych przy udziale VMAT2 [651]. W ten sposób następuje ograniczenie puli wolnych jonów MPP^+, które mogą potencjalnie wnikać do mitochondriów. Wydaje się, że zjawisko kumulowania MPP^+ w pęcherzykach synaptycznych może wywierać efekt neuroprotekcyjny. Zaobserwowano, że nadekspresja VMAT2 wykazuje działanie protekcyjne zapobiegając degradacji zakończeń neuronów dopaminergicznych działając w ST myszy poddanych intoksykacji MPTP [652]. Jednocześnie myszy z podwójną homozygotyczną delecją ($VMAT2^{-/-}$) są bardziej wrażliwe na neurotoksyczne działanie MPTP [653]. Stopień wrażliwości neuronów dopaminergicznych na toksyczne działanie jonów MPP^+ jest w tej sytuacji zależny od stosunku DAT/VMAT2 [654]. Analizowany średni czas półtrwania aktywnego metabolitu MPP^+ w mózgu jest w

dużym stopniu zależny od gatunku zwierzęcia poddanego intoksykacji MPTP [655]. W tym przypadku czas półtrwania samego MPTP u myszy wynosi około 1-2 h, natomiast u naczelnych MPP^+ jest wykrywalne nawet po około 20 dniach od intoksykacji MPTP [656]. Obserwowane różnice są najprawdopodobniej związane z występowaniem w obrębie neuronów dopaminergicznych znacznej ilości neuromelaniny, posiadającej właściwość łączenia się z MPTP oraz MPP^+ [657]. Stopniowe uwalnianie MPP^+ do cytoplazmy z tak powstałego połączenia również przyczynia się do wydłużenia jego czasu półtrwania oraz działania neurotoksycznego [658]. Głównym czynnikiem regulującym stopień uszkodzenia i czas trwania procesu neurodegeneracji jest wybrany schemat podawania MPTP (jednorazowo lub wielokrotnie w określonych odstępach) oraz użyta dawka [659]. Pozwala to w uznaniowy sposób generować intensywność objawów oraz uzyskiwać zróżnicowany profil neurodegeneracyjnego uszkodzenia, od nawet niewielkiego stopnia aż po zaawansowane stadia.

W praktyce najczęściej wykorzystywane schematy intoksykacji MPTP w badaniach eksperymentalnych obejmują model ostrego oraz podostrego uszkodzenia układu dopaminergicznego [660]. Istnieją również inne procedury oraz zwalidowane modele intoksykacji MPTP u myszy, które charakteryzują się odmiennym stopniem degeneracji neuronów dopaminergicznych, występowaniem lub brakiem zmian cytopatologicznych w komórkach oraz występowaniem kolejno zmian funkcji behawioralnych [661]. Każdy z danych modeli doświadczalnych posiada określone wady i zalety, natomiast wybór danego modelu zwierzęcego bezpośrednio wiąże się z założonym celem eksperymentu. W praktyce eksperymentalnej dostępne są również metody pozwalające na potencjalizację efektów neurotoksycznego działania MPTP u myszy. Przykładem takiego działania jest uzupełnienie dawki MPTP przez dodanie dietyloditiokarbaminianu sodu ($C_5H_{10}NNaS_2$) zwiększając przez to biodostępność powstającego jonu MPP^+ [662]. Kolejnym sposobem uzyskania podobnego efektu jest użycie probenecydu ($C_{13}H_{19}NO_4S$), którego działanie jest związane ze spowolnieniem metabolizmu MPTP oraz eliminacją produktów jego rozpadu [663]. Istotną obserwację stanowi wykazanie obecności granularnych inkluzji przypominających ciała Lewy'ego w SN myszy poddanych przez 3 tygodnie intoksykacji MPTP oraz probenecydu [664]. Potencjalizację neurotoksycznego działania MPTP można ponadto uzyskać poprzez dodatkowe podanie etanolu (C_2H_5OH) oraz aldehydu octowego (C_2H_4O), jak również innych pokrewnych związków dodatkowo indukujących wnikanie jonu MPP^+ do wnętrza komórek [665]. Analiza uzyskiwanych wyników radiologicznych badań

neuroobrazowych oraz w dalszej kolejności preparatów neuropatologicznych u ludzi pozwala stwierdzić, że neurony szlaku dopaminergicznego ulegają zmianom degeneracyjnym w ciągu wielu lat po ekspozycji i następczej intoksykacji MPTP, nawet po przeminięciu ostrej fazy uszkodzenia [666]. Obserwacje przeprowadzone na modelach zwierzęcych, przede wszystkim gryzoni wskazują, że uszkodzenie indukowane podaniem MPTP wydaje się być procesem częściowo odwracalnym [667]. Możliwy stopień kompensacji funkcji komórek nerwowych jest zależny od gatunku, szczepu, płci oraz wieku zwierzęcia jak również zadanego schematu intoksykacji MPTP [668]. Aktywna faza śmierci komórkowej w zwierzęcym modelu MPTP obserwowana jest w stosunkowo krótkim okresie od momentu intoksykacji [669]. Śmierć komórek dopaminergicznych w tym modelu objawia się typowymi zmianami cytopatologicznymi, charakterystycznymi dla procesu apoptozy takimi jak obkurczenie powierzchni perikarionu, kondensacja chromatyny oraz następcza obecność jej złogów wewnątrz neuronu [670]. Inne zastosowane modele mogą z kolei w swoim obrazie neuropatologicznym zawierać neurony wykazujące cytopatologiczne zmiany charakterystyczne dla procesu nekrotycznego [671]. W wyniku zastosowania modelu ostrego uszkodzenia obserwuje się największy stopień degeneracji neuronów dopaminergicznych SN w drugiej dobie od czasu intoksykacji MPTP, który ulega następnie redukcji i ograniczeniu w siódmej dobie od momentu zadziałania czynnika neurotoksycznego [672]. Model tego typu jest związany z 90% spadkiem poziomu DA w obrębie struktur ST oraz utraty neuronów dopaminergicznych na poziomie 60-70% w układzie nigrostriatalnym [673]. Zastosowanie modelu podostrego uszkodzenia jest związane z kolei z największym stopniem degeneracji neuronów dopaminergicznych SN w 7 dobie od czasu intoksykacji MPTP, który ulega następnie redukcji i ograniczeniu w 21 dobie od momentu zadziałania czynnika neurotoksycznego [674]. Poza utratą neuronów dopaminergicznych w modelu MPTP u myszy obserwuje się towarzyszącą aktywację komórek glejowych, w przeważającej części mikrogleju oraz niższą dotyczącą astrocytów [675]. W tym przypadku obserwuje się wcześniejszą odpowiedź mikrogleju niż astrogleju, której maksimum aktywności następuje przed pikiem zachodzącego poziomu neurodegeneracji komórek dopaminergicznych [676]. Zjawisko to jest w opisanych ramach czasowych związane z czynnym udziałem komórek glejowych w śmierci neuronów dopaminergicznych w zastosowanym modelu intoksykacji MPTP. Jednocześnie następcza reakcja zapalna astrogleju stanowi odpowiedź wtórną, co można wykazać poprzez obserwowalny wzrost ekspresji

kwaśnego białka włókienkowego gleju (GFAP) zachodzący również po przeminięciu fazy nasilonej śmierci neuronów dopaminergicznych w obrębie struktur ST oraz SN [677]. Model intoksykacji MPTP, w którym wywołuje się ostre uszkodzenie układu dopaminergicznego nie powoduje powstania charakterystycznych dla choroby Parkinsona wtrętów komórkowych w postaci złogów ASN [678]. W modelu podostrego uszkodzenia, w wyniku zachodzących procesów cytopatologicznych obserwuje się na poziomie ultrastrukturalnym translokację CYCS z mitochondriów do cytoplazmy oraz wzrost ekspresji ASN w cytoplazmie neuronów [679]. Omawiany model uszkodzenia układu dopaminergicznego poprzez intoksykację MPTP u gryzoni wykazuje wiele analogii do procesów leżących u podstaw patogenezy oraz uszkodzenia analogicznych szlaków nerwowych jak w przebiegu choroby Parkinsona [680]. Po podaniu MPTP obserwowane są u zwierząt zaburzenia zachowania, których nasilenie jest zależne od zastosowanej dawki neurotoksyny, imitujące zaburzenia funkcji w przebiegu choroby Parkinsona u ludzi [681]. Wśród obserwowanych zaburzeń motorycznych i behawioralnych należy wyróżnić spowolnienie ruchowe, zaburzenia równowagi oraz bezruch [682]. Obserwowane drżenie całego ciała oraz zaburzenia postawy obserwuje się głównie pierwszego dnia u zwierzęcia po intoksykacji MPTP [683]. Zachodzące zmiany funkcjonalne i behawioralne oraz ich stopień są w dużej mierze zdeterminowane przez czas, który upłynął od czasu intoksykacji MPTP, powstały ubytek neuronów dopaminergicznych, gatunek i szczep zwierzęcia oraz czułość przeprowadzonego testu funkcji motorycznych i behawioralnych [684].

Biorąc pod uwagę liczne analogie, model intoksykacji MPTP wydaje się obecnie najbardziej atrakcyjny oraz jest aktualnie powszechnie stosowany jako eksperymentalny ekwiwalent choroby Parkinsona u zwierząt [685]. Pozwala on w szczególnie precyzyjnym stopniu odwzorować mechanizmy molekularne i zjawiska neuropatologiczne zachodzące w trakcie rozwoju choroby Parkinsona, dostarczając w ten sposób istotnych informacji dotyczących jej patogenezy i potencjalnych możliwości terapeutycznych [686].

1.1.5.3. Inne modele doświadczalne

W doświadczalnych badaniach neurofarmakologicznych poza klasycznym modelem MPTP zastosowanie znajdują inne substancje neurotoksyczne powodujące uszkodzenia neuronów dopaminergicznych, odwzorowujące przez to również pożądane zaburzenia motoryczne i behawioralne [687]. Do związków o działaniu neurotoksycznym należy zaliczyć m.in. 6-hydroksydopaminę (6-OHDA), rotenon ($C_{23}H_{22}O_6$), parakwat ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$), rezerpinę ($C_{33}H_{40}N_2O_9$) oraz metamfetaminę ($C_{10}H_{15}N$) [688].

6-OHDA stanowi jeden z podstawowych związków używanych w badaniach doświadczalnych celem wywołania uszkodzenia układu dopaminergicznego [689]. Jest on związkiem nie mającym zdolności przekraczania BBB, dlatego w celu wywołania efektów neuropatologicznych oraz objawów parkinsonowskich wymaga bezpośredniego podawania domózgowego [690]. Obserwowany w tym modelu stopień uszkodzenia neuronów dopaminergicznych oraz ich zakończeń synaptycznych jest zależny od dawki oraz miejsca podania neurotoksyny [691]. Jednocześnie, uszkodzenia wywołane w ramach tego modelu nie obejmują swoim obszarem innych szlaków neuronalnych, jak również w ich przebiegu nie obserwuje się formowania wtrętów wewnątrzkomórkowych [692]. Klasyczne schematy podawania 6-OHDA obejmują jednostronną iniekcję do struktur SN, przyśrodkowej części przodomózgowia lub ST w stężeniu 4-8 mg/μl, co wywołuje spadek poziomu stężenia DA o ponad 80% oraz następcze zmiany neurodegeneracyjne [693]. Dodatkowo schemat podania odpowiednio dużych dawek 6-OHDA do przyśrodkowej części przodomózgowia odwzorowuje przebieg późnych stadiów choroby Parkinsona pozwalając na optymalne testowanie poszczególnych sposobów neuroprotekcyjnej interwencji farmakologicznej [694]. Wykonanie intoksykacji w sposób stopniowy pozwala również na wywołanie zaburzeń równowagi, postawy ciała oraz chodu zachowując jednostronny charakter analogicznie obserwowany w przebiegu choroby Parkinsona [695].

Kolejną neurotoksyną mająca zastosowanie w modelowaniu choroby Parkinsona w modelu zwierzęcym jest rotenon [696]. Jest on powszechnie znany jako pestycyd, który biochemicznie charakteryzuje się wysokim stopniem lipofilności w wyniku czego swobodnie przenika BBB bez pośrednictwa śródbłonkowych nośników [697]. Działanie farmakodynamiczne rotenonu obejmuje hamowanie kompleksu I łańcucha oddechowego [698]. Schematy podawania rotenonu obejmują iniekcje dożylne lub

podskórne w dawce 1.5-3 mg/kg/dobę, co powoduje stopniową neurodegenerację w obrębie struktur szlaku nigrostriatalnego [699]. Model ten pozwala od strony neuropatologicznej na obserwację inkluzji cytoplazmatycznych imitujących ciała Lewy'ego oraz pobudzenia astro- i mikrogleju [700]. Wykonanie intoksykacji rotenonem pozwala również na rozwój charakterystycznych zaburzeń motorycznych takich jak sztywność, bradykinezja oraz zaburzenia postawy [701].

Parakwat stanowi kolejny związek mający zastosowanie w modelowaniu choroby Parkinsona, stanowi on również znany i używany w przemyśle herbicyd [702]. Jest on związkiem lipofilnym, który przenika BBB i powoduje pośrednie uszkodzenie łańcucha mitochondrialnego nasilając produkcję ROS [703]. Schematy podawania parakwatu obejmują iniekcje dożylne lub podskórne w dawce 10 mg/kg masy ciała, co powoduje stopniową neurodegenerację w obrębie struktur szlaku nigrostriatalnego [704]. Podanie parakwatu jest związane z wystąpieniem neurodegeneracji, obecnością inkluzji cytoplazmatycznych imitujących ciała Lewy'ego oraz aktywacją komórek astro- i mikrogleju [705]. Intoksykacja parakwatem wywołuje również charakterystyczne zaburzenia motoryczne [706].

Inną substancją mająca zastosowanie w modelowaniu choroby Parkinsona stanowi rezerpina [707]. Jest ona związkiem o działaniu sympatykolitycznym, która upośledza magazynowanie oraz syntezę katecholamin [708]. Model rezerpinowy stanowi jeden z najstarszych modeli choroby Parkinsona [709]. Podanie rezerpiny powoduje czasowy spadek stężenia DA oraz wystąpienie objawów motorycznych, gdzie jednocześnie nie dochodzi do obumierania neuronów dopaminergicznych [710]. Innym sposobem pozwalającym na wywołanie efektów imutujących przebieg choroby Parkisona jest użycie metamfetaminy [711]. Farmakodynamiczny mechanizm działania związku obejmuje zaburzenie funkcji transportu pęcherzykowego DA oraz wyczerpywanie zasobów energetycznych neuronu z następczą nadprodukcją ROS [712].

1.1.6. Wybrane zagadnienia kliniczne

1.1.6.1. Objawy neurologiczne

Klasyczna definicja choroby Parkinsona zakłada występowanie kardynalnych objawów motorycznych takich jak spowolnienie ruchowe (łac. *bradykinesia*), drżenie spoczynkowe (łac. *tremor*), sztywność mięśniowa (łac. *rigiditas*) oraz kompleksowe zaburzenia odruchów posturalnych wyrażające się pod postacią zespołu hipertoniczno-hipokinetycznego [713, 714]. Typowa jest asymetryczna dominacja objawów po jednej stronie [715]. Spowolnienie ruchowe definiuje się jako zwolnione wykonywanie czynności, zwiększające się stopniowo w miarę ich powtarzania, charakterystyczny jest również spadek amplitudy ruchu (łac. *hypokinesis*) w czasie wykonywania kolejnych powtórzeń, gdzie obydwie cechy obserwuje się w przypadku wykonywania ruchów naprzemiennych, co znajduje zastosowanie w klinicznej ocenie nasilenia tych objawów [716]. Dostatecznie długie wykonywanie i powtarzanie ćwiczenia przez pacjenta z chorobą Parkinsona może prowadzić do zupełnego zatrzymania jego wykonywania, trudności z zapoczątkowaniem ruchu oraz zahamowania wykonywania czynności (ang. *freezing*) [717]. Klinicznymi przejawami bradykinezji są również zaburzenia chodu, maskowata twarz (łac. *hypomimia*), zaburzenia mowy (łac. *hypophonia*) jak również zmiana charakteru pisma (łac. *micrographia*) [718]. Drżenie spoczynkowe stanowi formę ruchu mimowolnego o częstotliwości 4-6 Hz i amplitudzie od kilku milimetrów do >10 cm [719]. Pojawia się ono w spoczynku i ustępuje przy wykonywaniu ruchu dowolnego. Objaw ten może dotyczyć nie tylko kończyn górnych, lecz również kończyn dolnych, żuchwy czy języka [720]. Dodatkowo można obserwować drżenie pozycyjne i zamiarowe, gdzie zwykle jego największe nasilenie występuje w spoczynku [721]. Sztywność mięśniowa jest definiowana jako wzmożony mimowolny skurcz odczuwany ciągle podczas badania całego zakresu ruchu biernego danej części ciała, występujący z jednakowym nasileniem w zakresie zginaczy i prostowników [722]. W przypadku współwystępowania objawu drżenia spoczynkowego, wyczuwalne jest napięcie typu koła zębatego w kończynach [723]. Kompleksowe zaburzenia odruchów posturalnych wyrażają się przodopochyleniem sylwetki i typowym wzorcem poruszania się, charakteryzującym się wykonywaniem drobnych kroków, chodem na wąskiej podstawie, osłabieniem lub zniesieniem współruchów balansowania kończyn górnych oraz trudnością ze zmianą kierunku poruszania się [724]. Typowy chód pacjenta z chorobą Parkinsona wiąże się z jednoczasowym, nieprawidłowym

stawianiem całej powierzchni podeszwy stopy na podłożu lub odwróceniem fizjologicznego wzorca chodu i rozpoczynaniem kroku od poziomu palców [725].

Jednocześnie w przebiegu choroby Parkinsona u pacjentów obserwuje się liczne objawy pozaruchowe, które w znacznym stopniu ograniczają codzienne funkcjonowanie [726]. W przypadku 21% pacjentów objawy pozaruchowe poprzedzają o wiele lat występowanie klasycznych objawów ruchowych, co może być związane z opóźnieniem w ustaleniu prawidłowego rozpoznania oraz narażeniem przez dłuższy okres czasu na błędnie dobraną i niefektywną terapię [727]. Zaburzenia pozaruchowe obejmują m.in. nieprawidłowości autonomiczne, zaburzenia neuropsychiatryczne związane z pogorszeniem funkcji poznawczych, dysfunkcje czuciowe oraz zaburzenia snu, których nasilenie nie koreluje z aktualnym stanem sprawności motorycznej [728]. Zaobserwowano, iż u części pacjentów fluktuacje objawów pozaruchowych mogą być związane z wystąpieniem większego stopnia niepełnosprawności niż w przypadku zaburzeń motorycznych [729]. Wystąpienie objawów neurologicznych stanowi efekt kompleksowego zachwiania równowagi między systemami neuroprzekaźnikowymi nie tylko w obrębie zwojów podstawy, lecz w całym systemie neuronalnym zawiadującym funkcjami ruchowymi [730]. Następcze zaburzenia projekcji w innych układach neuroprzekaźnikowych stanowi przyczynę pojawienia się objawów pozaruchowych, wykraczających poza typowe objawy osiowe [731].

1.1.6.2. Diagnostyka

Niezwykle skomplikowany charakter choroby Parkinsona nie pozwolił jak dotąd na opracowanie jednoznacznej metody diagnostycznej [732]. Rozpoznanie choroby ma charakter kliniczny i opiera się na powszechnie uznawanych kryteriach United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UKPDSBB), nazywanymi także kryteriami Queen Square jak również aktualnie obowiązujących kryteriach International Parkinson and Movement Disorder Society (MDS) [733, 734]. Kryteria te obejmują zarówno objawy osiowe choroby, kryteria wykluczające oraz objawy dodatkowe [735]. Proces diagnostyczny rozpoczyna się od zdefiniowania klasycznego zespołu parkinsonowskiego, natomiast kolejne kroki pozwalają na oszacowanie, czy można go przypisać chorobie Parkinsona [736, 737]. Aktualne wytyczne MDS umożliwiają ustalenie rozpoznania na dwóch poziomach pewności, wyróżniając pewną (maksymalna możliwa specyficzność) i prawdopodobną diagnozę choroby Parkinsona [738]. W obecnych czasach w rozpoznawaniu ponadto istotną rolę odgrywa

neuroobrazowanie, które jest zalecane zarówno przez międzynarodowe jak i krajowe grupy ekspertów [739, 740]. Klasyczne badania neuroradiologiczne zalecane do wykonania u pacjentów z podejrzeniem choroby Parkinsona, tj. tomografia komputerowa (TK) lub rezonans magnetyczny (MRI) mózgu, nie potwierdzają wprawdzie rozpoznania, ale pozwalają wykluczyć inne choroby typu organicznego (np. guz mózgu, krwiak przymózgowy lub wodogłowie normotensyjne) oraz schorzenia neurodegeneracyjne (DLB, ALS lub AD) wymagające różnicowania [741]. Wraz z rozwojem metod radiologicznych oraz medycyny nuklearnej, pojawiła się możliwość oceny układu pozapiramidowego przy użyciu izotopowych znaczników, mających powinowactwo do części presynaptycznej szlaków nigrostriatalnych [742]. Radioznacznikiem zarejestrowanym do tego typu badań jest ioflupan (^{123}I), który pozwala na potwierdzenie choroby Parkinsona z czułością na poziomie ~98% przy użyciu tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT) [743]. Inną możliwość stanowi użycie fluorodopy (^{18}F-DOPA) przy użyciu PET [744]. Oba badania nie są obecnie rutynowo dostępne ani wykonywane w praktyce klinicznej. Inną alternatywną metodę stanowi przezczaszkowe badanie ultrasonograficzne (USG), które umożliwia potencjalną obserwację hiperechogenicznego sygnału w rzucie SN śródmózgowia [745]. Badanie to wymaga jednakże znacznego doświadczenia osoby badającej, dostępności odpowiedniego sprzętu oraz nie zawsze jest możliwe do oceny u chorych z obniżoną przeziernością kości czaszki (tzw. okno kostne) [746]. Pacjenci u których zaobserwowano wczesny początek zachorowania (<40 r.ż.) lub rodzinny charakter schorzenia powinni zostać opcjonalnie poddani testom genetycznym, gdzie ich dobór zależy od prezentowanego profilu objawów klinicznych [747].

1.1.6.3. Terapia

Złożony charakter choroby Parkinsona jak również dążenie do optymalizacji i uzyskania najlepszych efektów leczenia wymaga wielospecjalistycznej opieki i interdyscyplinarnego zespołu złożonego m. in. z neurologa (główny koordynator opieki), neurochirurga, psychiatry, psychologa, fizjoterapeuty oraz pielęgniarki [748, 749]. Model kompleksowej oraz koordynowanej terapii i opieki obejmuje postępowanie farmakologiczne, rehabilitację, psychoterapię, leczenie operacyjne oraz pozostałe terapie pozafarmakologiczne [750]. Choroba Parkinsona może być skutecznie leczona objawowo i kontrolowana przez wiele lat [751]. Wybór optymalnej metody leczenia

zależy od szeregu czynników, takich jak m. in. wiek pacjenta, obecność współistniejących chorób, dotychczas stosowana farmakoterapia, rozpoznany etap choroby oraz wcześniejsza rezerwa kognitywna [752, 753]. Istotne jest w tym przypadku dostosowanie leczenia do odpowiedniego etapu choroby z uwzględnieniem jej wielowymiarowego charakteru, stopnia nasilenia objawów ruchowych oraz potencjalnej obecności objawów pozaruchowych takich jak np. otępienie czy inne zaburzenia neuropsychiatryczne, które często ograniczają stosowanie zaawansowanych metod operacyjnych z zakresu neurochirurgii czynnościowej, w tym DBS oraz terapii infuzyjnych [754]. Główne cele leczenia w chorobie Parkinsona obejmują zwolnienie postępu choroby, zmniejszenie nasilenia objawów ruchowych, zapobieganie lub opóźnienie pojawienia się powikłań oraz kontrola objawów pozaruchowych [755]. Najważniejszym celem leczenia choroby Parkinsona jest trwałe uzupełnienie niedoboru DA oraz, na razie ciągle nieosiągniętym celem, odbudowa prawidłowych szlaków korowo-podkorowych w mózgu co jest obecnie przedmiotem prowadzonych badań w fazie eksperymentalnej [756, 757].

Zgodnie z aktualną wiedzą leczenie choroby Parkinsona należy zaczynać tak szybko, jak to możliwe (od czasu wystąpienia pierwszych objawów) w celu podtrzymania fizjologicznych mechanizmów kompensacji, które sprawiają że mimo utraty neuronów dopaminergicznych objawy choroby ujawniają się dopiero przy ubytku około ~60-70% ich populacji [758, 759]. Leczenie rozpoczyna się z intencją prowadzenia równoległego postępowania neuroprotekcyjnego oraz objawowego [760, 761]. Aktualnie dostępna farmakoterapia obejmuje preparaty L-DOPA stanowiące najsilniejsze leki dopaminergiczne o najbardziej fizjologicznym działaniu (w kombinacji z benserazydem, karbidopą lub w postaci systemu duodopa), preparaty agonistów DA będące drugą co do siły działania grupą leków stymulujących bezpośrednio dopaminowe receptory postsynaptyczne (pramipeksol, ropinirol, piribedil, rotygotyna oraz apomorfina), inhibitory MAO-B (selegilina, rasagilina), inhibitory COMT (entakapon, tolkapon), leki antycholinergiczne (biperiden, pridinol), jak również antagoniści receptora NMDA (amantadyna) [762, 763, 764]. Metody leczenia operacyjnego obejmują zabiegi ablacyjne oraz radiochirurgiczne (talamotomia, subtalamotomia, palidotomia) jak również implantacje układu DBS obejmującego dwie elektrody połączone z dwoma stymulatorami jednokanałowymi lub jednym dwukanałowym celem stymulacji STN, jądra brzusznego pośredniego wzgórza (Vim) lub brzuszno-tylno-bocznego segmentu GPi [765, 766]. W zaawansowanej postaci

choroby Parkinsona, gdzie oprócz znacznego nasilenia objawów osiowych obserwuje się występowanie fluktuacji ruchowych oraz dyskinez, niepoddających się skutecznej kontroli klasycznymi lekami dopaminergicznymi zastosowanie znajdują wysokospecjalistyczne terapie polegające na implantacji układu DBS, podskórnych wlewach apomorfiny oraz dojelitowych wlewach L-DOPA za pośrednictwem gastrostomii [767, 768, 769]. Jednocześnie, najistotniejszym warunkiem uzyskania dobrego wyniku terapeutycznego tych metod jest właściwa kwalifikacja chorych według obowiązujących wytycznych i kryteriów [770]. Wydaje się, że skuteczność metody DBS i obu terapii infuzyjnych jest porównywalna, natomiast różnią się one między sobą profilem działań niepożądanych oraz przeciwwskazaniami do ich stosowania, jednocześnie wymagają one zapewnienia pacjentowi ciągłości opieki w ramach referencyjnego ośrodka zapewniającego koordynowaną opiekę pacjentom z chorobą Parkinsona [771]. Aktualne rekomendacje European Federation of Neurological Societies (EFNS) oraz MDS wyraźnie wysoko pozycjonują rolę leczenia operacyjnego za pomocą implantacji układu DBS w zaawansowanej postaci choroby Parkinsona [772]. Wyniki przeprowadzonych badań klinicznych wskazują, że obustronna stymulacja STN, jak i GPi, wpływa na poprawę funkcjonowania ruchowego, ogranicza występowanie dyskinez i fluktuacji, poprawia jakość życia oraz pozwala na redukcję przyjmowania niezbędnych leków przeciwparkinsonowskich [773]. Biorąc pod uwagę mechanizm funkcjonowania układu DBS, jego zastosowanie wydaje się być również korzystniejsze niż zabiegi ablacyjne z uwagi na odwracalność stymulacji i możliwość zmiany jej parametrów zależnie od potrzeb pacjenta [774]. Według aktualnie obowiązujących wytycznych od samego początku wystąpienia choroby zaleca się również prowadzenie postępowania rehabilitacyjnego oraz stosowanie innych metod aktywizujących [775]. Kompleksowo prowadzona rehabilitacja ma na celu nie tylko ruchowe usprawnienie pacjenta, ale również pośrednio wpływa na sprawność intelektualną i być może na postęp choroby [776]. W ramach tego postępowania ważne jest także edukowanie chorych jak również zwiększanie partycypacji społecznej pacjenta [777]. Prowadzona rehabilitacja powinna przebiegać w sposób zindywidualizowany oraz powinna być dostosowana do potrzeb i możliwości chorego biorąc pod uwagę wszystkie determinanty kliniczne [778]. Efektywny model kompleksowej opieki zdrowotnej dla pacjentów z chorobą Parkinsona powinien obejmować i zapewniać dostęp do nowoczesnego leczenia neurologicznego i neurochirurgicznego, opieki rehabilitacyjnej oraz socjalnej [779].

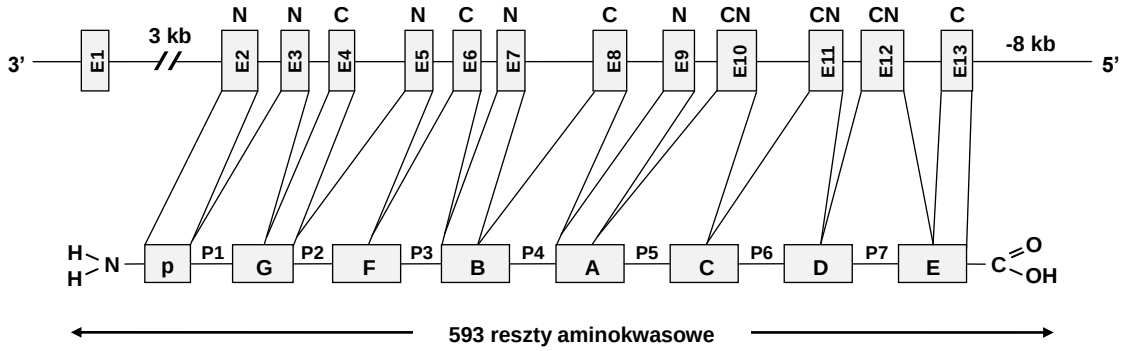
1.2. Progranulina (PGRN) oraz związane z nią receptory i szlaki sygnałowe

1.2.1. Progranulina (PGRN)

Opis budowy i molekularnych podstaw funkcjonowania progranuliny (PGRN) stanowi zbiorczy wynik opracowania badań i analiz wykonanych często równolegle lub w krótkich odstępach czasowych przez niezależne od siebie grupy badaczy z różnych ośrodków naukowych. W badaniach wykonanych w 1990 r. przez Shoyab i wsp. pierwszy raz zidentyfikowano i wyizolowano dwa jednołańcuchowe polipeptydy zawierającyme sekwencje bogate (~20%) w reszty cysteinowe (CYS) o masie cząsteczkowej około ~6 kDa uzyskane ze szczurzych nerek nazwane kolejno epiteliną 1 (EPI-1) oraz epiteliną 2 (EPI-2) [780]. W tym samym roku (w odstępie 2-3 miesięcy) Bateman i wsp. potwierdzili i opisali istnienie nowej rodziny białek, które zostały uzyskane jako efekt frakcjonowania ekstraktu ziarnistości ludzkich leukocytów, nazwanych kolejno granuliną A (GRN-A), granuliną B (GRN-B), granuliną C (GRN-C) oraz granuliną D (GRN-D) [781]. Kolejne piąte białko tej rodziny wyizolowano i częściowo zsekwencjonowano ze szczurzego szpiku kostnego, które charakteryzowało się wysokim stopniem homologii do GRN-A, wyizolowanej wcześniej u człowieka. Zidentyfikowana grupa białek wykazywała również podobne właściwości biologiczne ze względu na wysoce konserwatywną strukturę molekularną i aktywność związaną z obecnością reszt CYS. Opisane pierwotnie EPI-1 i EPI-2 stanowiły analogiczne strukturalnie białka w porównaniu do GRN-A i GRN-B [780, 781]. W 1992 r. obie grupy badaczy (w odstępie 3-4 miesięcy) przeprowadziły analizę komplementarnego DNA (cDNA) i skopiowali gen odpowiedzialny za translację pojedynczego dużego białka prekursorowego (prepropeptydu) zawierającego 7.5 motywu EPI/GRN które zostało nazwane PGRN oraz alternatywnie proepiteliną (PEPI), podkreślając jego pierwotną terminologię i pochodzenie [782, 783]. Dalsze badania i analizy obejmujące szerokoskalowe frakcjonowanie biochemiczne prowadzone przez inne laboratoria w kolejnych latach doprowadziły do izolacji PGRN z szeregu różnego typu źródeł tkankowych takich jak ekstrakt z jąder kawi domowej oraz jej nasienia (akrogranina), kondycjonowane medium wysoce rakotwórczego, niezależnego od insuliny wariantu linii komórkowej adipogennego raka prostaty (PC) pochodzenia potworniaka (PCDGF), wołowa nerka (TGF-e), embriony myszy szczepu BALB/c3T3 (GEP) oraz ludzka linia komórkowa Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) gruczolakoraka sutka (GP88), co stanowiło również przyczynę braku pierwotnego usystematyzowania nomenklatury i

klasyfikacji tego białka [784, 785, 786, 787, 788, 789, 790]. Jednocześnie znaczny stopień skomplikowania używanej terminologii pośrednio sugerował i opisywał różnorodne funkcje biologiczne PGRN [791]. Nomenklatura związana z określeniem granulina (GRN) podkreśla związek białka z granulocytami i innymi komórkami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy nazewnictwo epitelina (EPI) podkreśla jej związek z komórkami tkanki nabłonkowej. Stosowane zamiennie akronimy PGRN, PEPI oraz GEP używane są w stosunku do zidentyfikowanego pierwotnie prepropeptydu stanowiącego większy substrat białkowy ulegający następnie rozpadowi. Inne nazwy takie jak PCDGF oraz TGF-e podkreślają funkcjonalne aspekty białka jako czynnika wzrostu. Jednocześnie inna nazwa akrogranina podkreśla rolę tego białka w procesach reprodukcyjnych, takich jak spermatogeneza oraz embriogeneza, natomiast akronim GP88 odwołuje się do molekularnej struktury łańcucha polipeptydowego.

Analiza ludzkiego genomu pozwala stwierdzić, iż gen PGRN jest zlokalizowany w obrębie długiego ramienia chromosomu 17 (17q21.31) i jest zbudowany z 12 nierównoważnych kodujących eksonów (E2-13) i jednego niekodującego eksonu (E1) oraz 11 intronów [792, 793] (Rycina 4). Gen składa się z 2323 par zasad (bp) o rozmiarze 8 kb w regionie kodującym z najdłuższą otwartą ramką odczytu obejmującą 1782 nukleotydów oraz jest zlokalizowany 1.7 Mb centromerycznie w stosunku do genu białka tau związanego z mikrotubulami (MAPT) [792, 793, 794]. Każdy indywidualny ekson klasyfikuje się w tym przypadku jako typ N lub α (kodujący koniec N-terminalny i pierwsze sześć CYS motywu GRN), typ C lub β (kodujący koniec C-terminalny i drugie sześć CYS motywu GRN) jak również typ CN lub αβ (kodujący koniec C- i N-terminalny sąsiedniego motywu GRN) [795]. Każde dwa eksony są odpowiedzialne za transkrypcję jednego tandemowego powtórzenia GRN, zapobiegając tworzeniu hybrydowych białek GRN-podobnych jako produktu alternatywnego składania. Biorąc pod uwagę cechy sekwencji promotora PGRN, zaobserwowano, że ma on wiele właściwości typowych dla promotorów genów kodujących czynniki wzrostu, takich jak obecność licznych miejsc inicjacji transkrypcji, brak sekwencji TATA-box i CCAAT-box oraz dużą zawartość sekwencji GC które wiążą się z czynnikiem transkrypcyjnym jakim jest białko specyficzności 1 (SP1) [796, 797, 798].



Paragranulina (para-GRN): TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLD (18-47 aa)

Granulina G (GRN-G): GGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCF (58-113 aa)

Granulina F (GRN-F): AIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCI (123-179 aa)

Granulina B (GRN B): VMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCL (206-261 aa)

Granulina A (GRN-A): DVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCE (281-336 aa)

Granulina C (GRN-C): VPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQ (364-417 aa)

Granulina D (GRN-D): IGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCE (442-496 aa)

Granulina E (GRN-E): DVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCL (518-573 aa)

Rycina 4. Schemat budowy genu oraz łańcucha polipeptydowego progranuliny (PGRN) z wyszczególnieniem struktury aminokwasowej poszczególnych domen

Zgodnie z dynamiką ewolucyjną PGRN wydaje się być filogenetycznie starą cząsteczką, która pojawiła się około ~1.5 miliarda lat temu i była powiązana z organizmami jednokomórkowymi biorąc pod uwagę analizę rozkładu i strukturę powtórzeń tandemowych GRN [791, 795]. Jak wykazano tandemowe powtórzenia motywu GRN są obecne w genomie jednokomórkowych eukariontów, roślin, zwierząt wielokomórkowych w tym kręgowców oraz wielu innych typów obecnie żyjących gatunków zwierząt [791, 795]. Jednocześnie są one nieobecne w genomie muszki owocowej (łac. *Drosophila melanogaster*). Odpowiednie geny ortologiczne kodujące PGRN u gryzoni używanych jako zwierzęta laboratoryjne są umiejscowione na chromosomie 11 (11D) u myszy wykazując 79% homologii do ludzkiego białka oraz na chromosomie 10 (10q32.1) u szczura wykazując w tym przypadku 75% homologię [799, 800]. PGRN ulega translacji jako polipeptydowy łańcuch (prepropeptyd) liczący łącznie 593 aa o masie cząsteczkowej wynoszącej około ~68.5 kDa gdzie po glikozylacji (głównie oligosacharydami fukozylowanymi) osiąga masę 88 kDa, co można zaobserwować w standardowych testach Western blot (WB) lub na żelu poliakryloamidowym (-$CH_2CHCONH_2$-) z dodatkiem laurylosiarczanu sodu

($NaC_{12}H_{25}SO_4$) w trakcie elektroforezy żelowej (SDS-PAGE) [786, 801, 802].

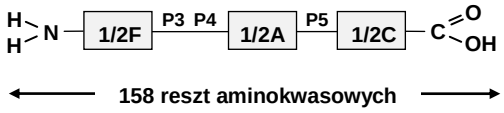
Pod względem ultrastrukturalnym łańcuch polipeptydowy (holoproteina) obejmuje N-terminalny peptyd sygnałowy (SP) zawarty w 17 aa oraz 7.5 sekwencyjnie ułożone motywy GRN, które zawierają wielokrotne tandemowe powtórzenia silnie konserwowanego, 12-CYS motywu ($CX_{5–6}CX_5CCX_8CCX_6CCXDX_2HCCPX_4CX_{5–6}C$) oddzielonego krótkimi sekwencjami łączącymi (P1/2/3/4/5/6/7) w kolejności p-G-F-B-A-C-D-E (p-P1-G-P2-F-P3-B-P4-A-P5-C-P6-D-P7-E), gdzie motywy A-G reprezentują pełne powtórzenia, natomiast „p" stanowi jeden pół-motyw (para-GRN) [803]. Zgodnie z badaniami wykonanymi przy pomocy spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) na białku wyizolowanym z tkanek karpia (łac. *Cyprinus carpio*) należy stwierdzić że w pojęciu przestrzeni topologicznej łańcuch PGRN superstrukturalnie formuje 6 mostków dwusiarczkowych (S-S) za pośrednictwem każdego z 12-CYS motywu przyjmując przy tym całościowo stereochemicznie postać zwartej β-harmonijki stabilizowanej przez 44 mostki dwusiarczkowe w konfiguracji lewoskrętnej superhelisy [804, 805]. Analizując cechy klasyfikacji ewolucyjnej i strukturalnej, PGRN wydaje się jak dotąd unikatową cząsteczką, której nie można jednoznacznie zaklasyfikować do żadnej znanej rodziny czynników wzrostu pomimo potencjalnego odległego powiązania z rodziną naskórkowego czynnik wzrostu (EGF) i TGF-β gdzie PGRN może wykazywać jednocześnie działanie czynnika wzrostu, cząsteczki przeciwzapalnej, adipokiny oraz stanowić źródło poszczególnych domen GRN o potencjalnie zapalnym działaniu [791, 803, 804, 806]. Zaobserwowano również, że PGRN może częściowo pełnić niektóre funkcje insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1), takie jak sygnalizacja mitogenna, ale nie sygnalizacja przeżycia [787]. Proteolityczny rozkład holoproteiny PGRN odbywa się zarówno w przestrzeni wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej, prowadząc do uwolnienia indywidualnych fragmentów GRN zawartych w 56-57 aa o masie cząsteczkowej około ~6 kDa, które po proteolizie występują zarówno w postaci indywidualnej jak i połączonej (~6-25 kDa) [781, 783]. W procesie rozkładu proteolitycznego pośredniczą różne wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe proteinazy serynowo-treoninowe takie jak metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9 (MMP-9), metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 12 (MMP-12), metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 14 (MMP-14), dezintegryna i metaloproteinaza z motywem trombospondyny 7 (ADAMTS-7), elastaza neutrofilowa (ELANE) oraz proteinaza 3 (PRTN3), gdzie występujące wzajemne interakcje są regulowane na podstawie pętli sprzężenia zwrotnego [807, 808, 809, 810,

811, 812, 813]. Inkubacja białka o pełnej długości łańcucha polipeptydowego ze wspomnianymi proteinazami nie zawsze prowadzi do uwolnienia poszczególnych fragmentów GRN o niższej masie cząsteczkowej, jak można by oczekiwać po potencjalnej całkowitej proteolizie. Regulacja zachodzącej proteolizy łańcucha polipeptydowego PGRN jest również ograniczona i regulowana przez wiązanie do niektórych białek takich jak wydzielniczy inhibitor proteazy leukocytarnej (SLPI) oraz apolipoproteina A1 (ApoA1), które wiążą się z PGRN i hamują jego rozszczepienie [814, 815].

1.2.2. Atsttrin

Pierwszy opis wyników badań związanych z syntezą i zastosowaniem zmodyfikowanej cząsteczki białka opartej na strukturze łańcucha polipeptydowego PGRN zwanej Atsttrin (ang. *antagonist of TNF/TNFR signaling via targeting to TNF receptors*) został przedstawiony przez Tang i wsp. w 2011 r. i dotyczył on efektów działania tego związku na modelu zapalenia stawów indukowanego kolagenem (CIA) oraz zapalenia stawów indukowanego przeciwciałami przeciwko kolagenowi (CAIA) u myszy szczepu C57BL/6 [816]. Istotną część opublikowanych badań stanowiła wstępna analiza umożliwiająca identyfikację właściwych części łańcucha polipeptydowego PGRN odpowiedzialnych za interakcję z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 [816, 817, 818]. Wykonana seria analiz obejmująca badania nad wygenerowanymi przez transgeniczne mutanty różnej długości fragmenty łańcucha polipeptydowego PGRN zawierające właściwe domeny GRN oraz fragmenty łączące, polegała na ocenie kinetyki ich wiązania z receptorem TNFR2 przeszukując biblioteki cDNA za pomocą techniki dwuhybrydowej drożdży (Y2H), co pozwoliło na stwierdzenie iż nie istnieje pojedynczy fragment mogący wiązać się z TNFR2 wskazując raczej na istnienie funkcjonalnego fragmentu składającego się z kombinacji właściwych domen GRN i sekwencji łączących (GRN+P). W kolejno przeprowadzonych przez Tang i wsp. w 2011 r. analizach, przy użyciu metod inżynierii molekularnej, zidentyfikowano cząsteczkę stanowiącą polipeptydowy łańcuch o zachowanych właściwościach wiązania do TNFR1 i TNFR2, złożony z połowy domen GRN-A (284-304 aa), GRN-C (366-392 aa) i GRN-F (153-178 aa) wykazujący zdolność do fałdowania się w niezależne domeny GRN zawierające niezależne poddomeny N- i C-terminalne które można zaobserwować za pomocą NMR o wysokiej rozdzielczości [805, 816]. Wytworzony tą metodą fragment stanowi domenę F-A-C (1/2F-1/2A-1/2C) związaną wzajemnie przez

odpowiednie sekwencje łączące takie jak P3 (179-205 aa), P4 (262-283 aa) oraz P5 (336-365 aa) formując polipeptyd w kolejności F-P3-P4-A-P5-C (1/2F-P3-P4-1/2A-P5-1/2C) złożony ogółem z 158 aa oraz zawierający odpowiednio 17 reszt CYS [816] (Rycina 5). Analizy i badania przeprowadzone przez Tian i wsp. pozwoliły ponadto zaobserwować szereg strukturalnych i funkcjonalnych właściwości Atsttrin, które dostarczyły dodatkowych istotnych informacji dotyczących podstaw mechanizmów molekularnych wzajemnych interakcji ligand-receptor pomiędzy PGRN/Atsttrin oraz TNFR1/TNFR2 [819].



Atsttrin: PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGPHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSSKEDATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVS CPDGYTCCRLQSGAWCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP (1-158 aa)

Rycina 5. Schemat budowy łańcucha polipeptydowego Atsttrin z wyszczególnieniem struktury aminokwasowej

Zaobserwowano, że trzy domeny GRN mogą wiązać się do receptorów TNFR1 oraz TNFR2 w sposób niezależny, co wydaje się potencjalnie możliwe poprzez wewnętrzne zwijanie ich sekwencji łącznikowych wynikające z drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury białka. Dodatkowo analizy przeprowadzone za pomocą techniki Y2H wykazały, że zmiana kolejności sekwencji połączonych domen F-A-C nie wpływa na kinetykę oraz zdolność ich wiązania do receptorów TNFR1/2 w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Można wyróżnić kolejno trzy chimeryczne rekombinowane warianty Atsttrin takie jak Atsttrin α (1/2F-1/2A-1/2C), Atsttrin β (1/2A-1/2C-1/2F) oraz Atsttrin γ (1/2A-1/2F-1/2C), gdzie zaobserwowano iż Atsttrin β i Atsttrin γ wykazują silniejsze powinowactwo wiązania się z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 w porównaniu do Atsttrin α [819]. Te różnice w powinowactwie do receptorów mogą zależeć potencjalnie od zmiany konformacji białka wynikającej z powstałych modyfikacji sekwencji polipeptydu.

Biorąc pod uwagę profil farmakokinetyczny i charakterystykę stabilności związku ocenianą na modelu myszy szczepu C57BL/6 stwierdzono że Atsttrin dobrze

wchłania się po podaniu dootrzewnowym i wykazuje wysoką stabilność przy okresie półtrwania wynoszącym około ~120 h (~5 dni) w porównaniu do PGRN z okresem półtrwania wynoszącym około ~40 h (<2 dni) [816, 817]. Maksymalne stężenie (C_{max}) Atsttrin wynosi około 19.3 μg/ml, jest osiągane po 12 godzinach (t_{max}) od czasu podania z 85.5% biodostępnością w odniesieniu do analizy kompartmentu centralnego (krew) [816]. W przeciwieństwie do PGRN, nie stwierdzono aby Atsttrin ulegało rozpadowi i uwalniało domeny GRN o działaniu zapalnym w przypadku ekspozycji na enzymy proteolityczne rozszczepiające PGRN takie jak ELANE, PRTN3 i ADAMTS-7, co można potencjalnie wyjaśnić brakiem w jej strukturze pełnych domen GRN (1/2GRN) [817]. Ta sama strukturalna właściwość pozwala zachować Atsttrin powinowactwo do wiązania się z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 jak również potencjalnie uniknąć efektów biologicznych charakterystycznych dla cytokin i czynników wzrostu. W związku z tym nie obserwowano, jak w przypadku innych inhibitorów TNF-α, takich jak infliksymab (L04AB02) i adalimumab (L04AB04), właściwości onkogennych a raczej przypisuje się temu związkowi działanie przeciwnowotworowe [816, 817, 818, 820, 821]. Dotychczas nie przeprowadzono pełnej i precyzyjnej analizy profilu bezpieczeństwa Atsttrin oraz potencjalnej skuteczności jej zastosowania i wdrożenia do terapii [822]. Jednocześnie opublikowane obserwacje dotyczące danych uzyskanych z modeli przedklinicznych sugerują, że Atsttrin nie wykazuje obserwowalnych działań niepożądanych, w tym wpływu cytotoksycznego, co było oceniane poprzez badanie linii komórkowych A673/6 mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego [816, 817]. Myszy szczepu DBA/1 które otrzymywały wysokie dawki Atsttrin poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie do serca, płuc, żołądka, śledziony, trzustki, jelita cienkiego oraz jelita grubego nie wykazywały widocznych oznak związanych z potencjalną toksycznością związku [817]. Te same badania i użyte modele doświadczalne wskazują, że potencjalnie związki oparte na strukturze PGRN, takie jak Atsttrin, mogą stanowić obecnie jeden z bardziej obiecujących i innowacyjnych środków terapeutycznych w leczeniu stanów związanych z zapaleniem stawów, takich jak choroba zwyrodnieniowa stawów (OA) i reumatoidalne zapalenie stawów (RA) poprzez bezpośrednie wiązanie się z TNFR1 oraz TNFR2 jak również równoległe antagonistyczne działanie względem TNF-α, wykazując w tym mechanizmie swoje właściwości przeciwzapalne [816, 817, 818].

Dane literaturowe sugerują, iż Atsttrin wykazuje silniejsze działanie niż PGRN i inne dobrze znane leki blokujące szlak TNF-α w łagodzeniu zapalenia stawów u myszy

[816, 817, 818]. Jednocześnie, poza działaniem inhibicyjnym w stosunku do TNF-α, zaobserwowano, iż Atsttrin wpływa na hamowanie wiązania limfotoksyny alfa (LTα) z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 [816]. Przeprowadzone badania eksperymentalne sugerują również, iż wdrożenie Atsttrin do terapii może być potencjalnie skuteczne w leczeniu innych chorób o podłożu zapalnym, takich jak zapalenie skóry oraz choroby zapalne jelit [823, 824].

1.2.3. Receptory dla PGRN i związane z nimi szlaki sygnałowe

1.2.3.1. Sortilina (SORT1)

Identyfikacja pierwszego receptora dla PGRN na powierzchni komórki trwała ponad 20 lat od czasu odkrycia EPI-1 i EPI-2, co stanowiło kluczowy krok w zrozumieniu podstaw mechanizmów molekularnych i szlaków sygnałowych związanych z biologiczną aktywnością PGRN [780]. W badaniach opublikowanych w 1993 r. przez Culouscou i wsp. pierwszy raz stwierdzono, iż znakowana radioaktywnym jodem-125 (^{125}I) EPI-1 (^{125}I-EPI-1) tworzy kompleks z receptorem o masie cząsteczkowej 140-145 kDa zlokalizowanym na ludzkich komórkach gruczolakoraka sutka linii MDA-MB-468 [825]. Podobne metodologicznie badanie zostało przeprowadzone przez Xia i wsp. pokazując w tym przypadku krzywoliniową interakcję ^{125}I-PCDGF z receptorem o masie cząsteczkowej ~120 kDa zlokalizowanym na powierzchni komórek linii nabłonka płuc norki (łac. *Neovison vison*) CCL64 [826]. Niemniej jednak obie wspomniane grupy badawcze nie były w stanie precyzyjnie zidentyfikować konkretnego białka receptorowego. Ostatecznie w 2010 r. Hu i wsp. po raz pierwszy zidentyfikowali wzajemną interakcję końca C-terminalnego (GRN-E) cząsteczki PGRN z sortiliną 1 (SORT1) w wyizolowanych i namnożonych neuronach CX oraz CA pochodzących z zarodków szczura w 18 dniu embriogenezy (E18) oraz myszy w 17 dniu embriogenezy (E17) [827]. Dalsze obserwacje prowadzone przez Zheng i wsp. wskazały, że wzajemna interakcja PGRN/SORT1 odbywa się za pośrednictwem regionu β-śmigła SORT1 oraz motywu wiążącego SORT1 w strukturze PGRN, zawierającego trzy sekwencje aminokwasowe GLN-LEU-LEU (QLL) usytuowane na końcu C-terminalnym (590-593 aa) łańcucha polipeptydowego, gdzie analogiczny motyw jest kodowany u myszy jako PRO-LEU-LEU (PLL) oraz jest zlokalizowany w równoważnej pozycji (585-588 aa) w przebiegu łańcucha polipeptydowego [828]. SORT1 stanowi multiligandowe białko transbłonowe typu I,

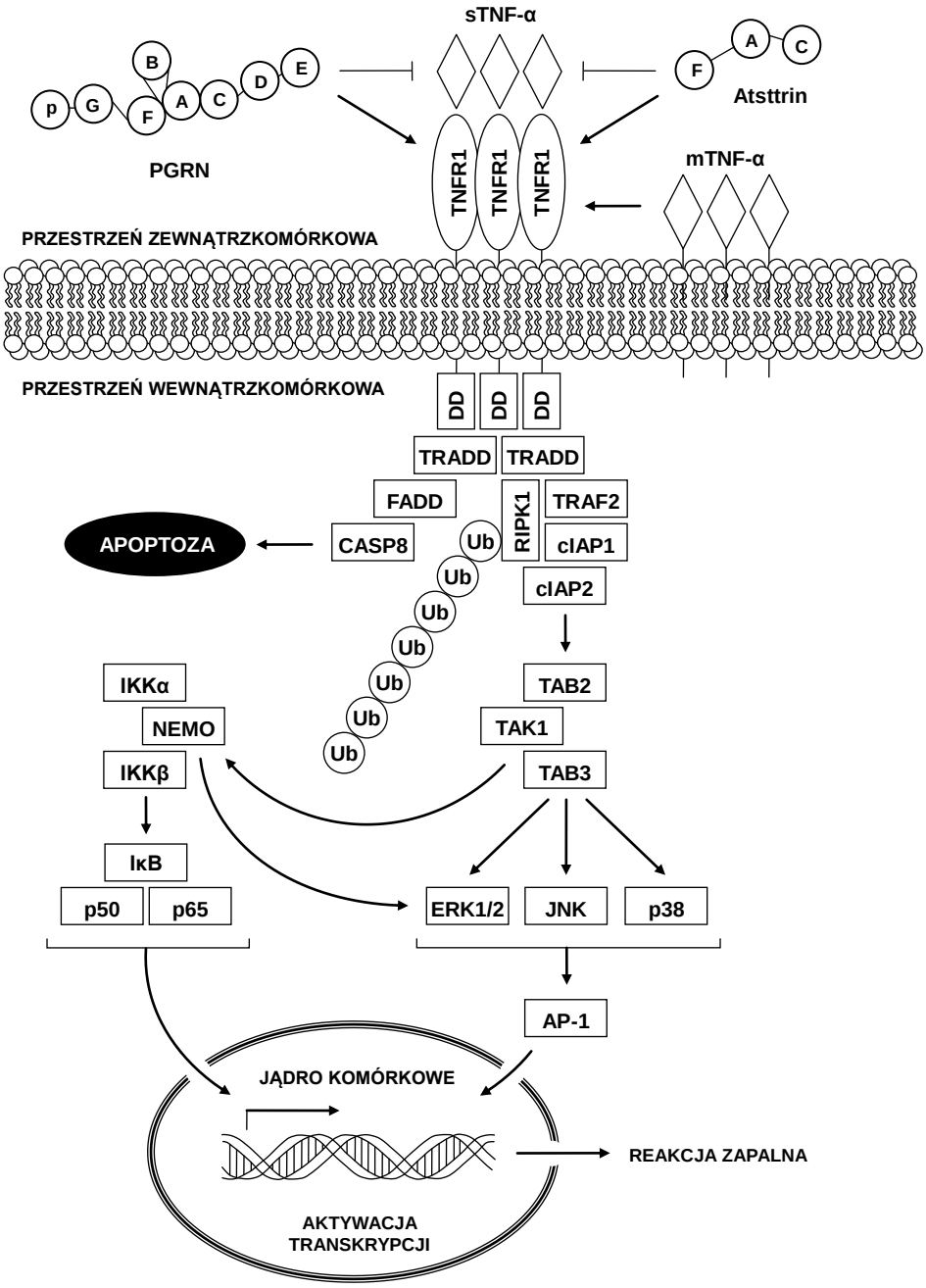
należące do rodziny sortowania białek wakuolowych 10 (VPS10), które jest zlokalizowane zarówno na powierzchni komórki, jak i w kompartmentach endolizosomalnych [829]. Funkcja receptora SORT1 jest związana głównie z transportem białek różnego typu z powierzchni komórki do kompartmentów wewnątrzkomórkowych takich jak lizosomy i endosomy za pośrednictwem aparatu Golgiego w komórkach neuronalnych i nieneuronalnych [829, 830]. Po związaniu PGRN z SORT1 cały powstały kompleks ligand-receptor ulega endocytozie z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co wiąże się z dalszym dostarczaniem PGRN do lizosomów, co może również zachodzić w mechanizmie niezależnym od SORT1 poprzez interakcję z prosapozyną (PSAP) [828, 831]. Można również przypuszczać, że także wolny koniec C-terminalny rozszczepionego PGRN może pośredniczyć w oddziaływaniu z SORT1. Zachodząca regulacja w obrębie tej osi sygnałowej może być w tym przypadku postrzegana jako endogenny mechanizm regulacji zewnątrzkomórkowego poziomu PGRN i obrotu na poziomie zjawisk endocytozy/egzocytozy co wykazano zarówno w trakcie badań w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [828, 832]. Obserwowane zjawisko wydaje się uczestniczyć w patofizjologii otępienia czołowo-skroniowego (FTLD) [833]. W badaniach przeprowadzonych u myszy szczepu C57BL/6 z delecją w genie SORT1 ($SORT1^{-/-}$) wykazano ~2.5 do 5-krotny wzrost poziomu PGRN w mózgu i surowicy [827]. W badaniu przeprowadzonym przez Gass i wsp. na podobnym modelu wyizolowanych i namnożonych neuronów hipokampu myszy szczepu C57BL/6 z delecją $SORT1^{-/-}$ zaobserwowano, że egzogenna PGRN indukuje rozrost neuronów niezależnie od SORT1, co skłoniło autorów do stwierdzenia, że w proces ten zaangażowany jest inny receptor [834]. SORT1 jako receptor multiligandowy uczestniczy również w sekrecji lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL) oraz apoptozie indukowanej proneurotrofiną (proNT) jak również odpowiada za prawidłowy wewnątrzkomórkowy transport NGF, BDNF oraz neurotensyny (NTS) [817, 835, 836, 837, 838, 839]. Obecnie SORT1 przypisuje się funkcję neuronalnego receptora dla PGRN, jednak dokładny udział tego receptora w biologicznej aktywności i funkcji PGRN nadal pozostaje przedmiotem badań i dyskusji [833, 834]. Rozważany jest ponadto potencjalny wpływ TNF-α na regulację w obrębie osi PGRN/SORT1 w warunkach stanu zapalnego [806].

1.2.3.2. Nadrodzina receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNFRSF)

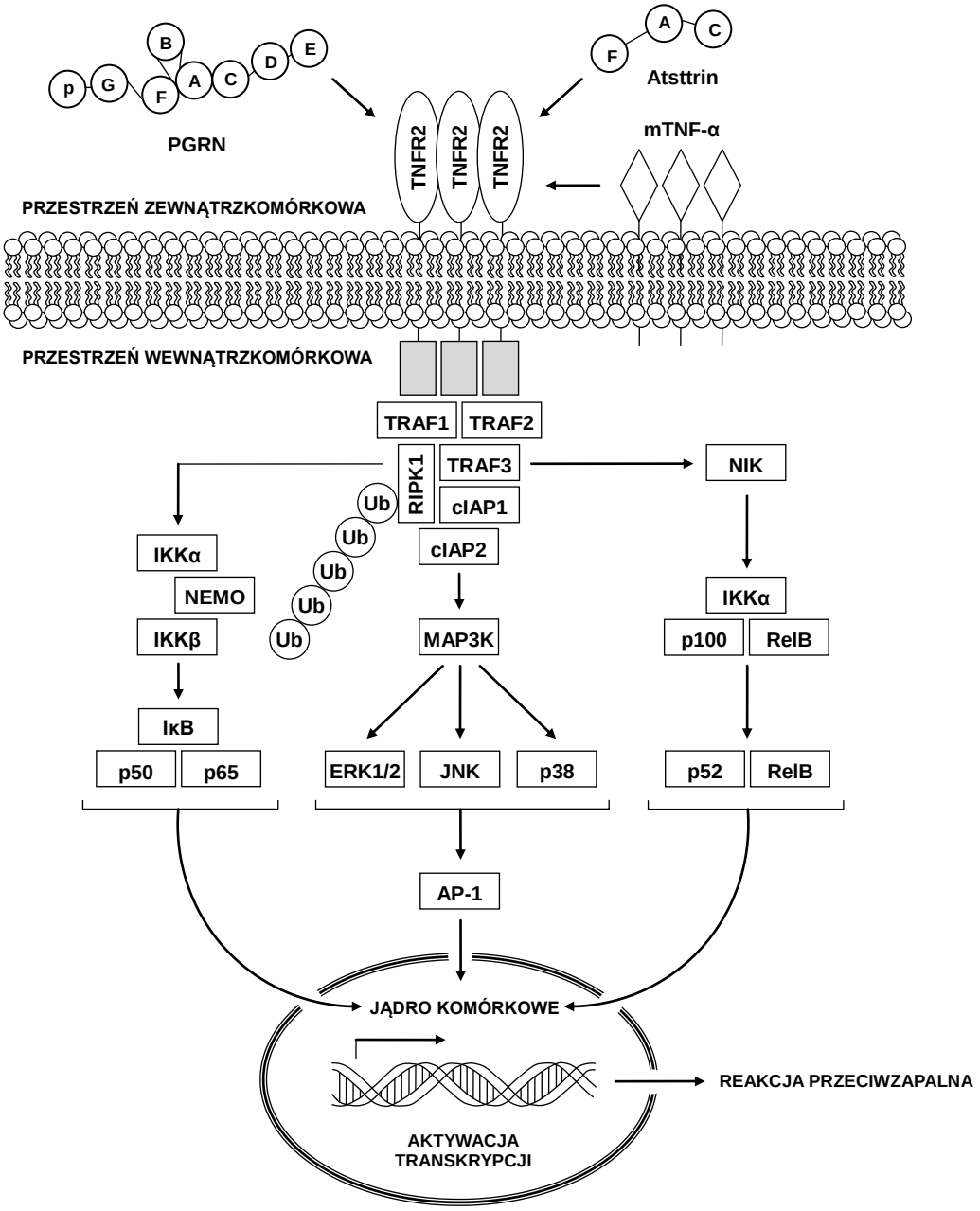
1.2.3.2.1. Receptor czynnika martwicy nowotworu 1/2 (TNFR1/2)

Rok po opisaniu wzajemnej interakcji pomiędzy PGRN oraz SORT1, w wyniku badań przeprowadzonych przez Tang i wsp. w 2011 r. stwierdzono, że PGRN może wchodzić również w interakcje z TNFR1 oraz TNFR2, pełniąc rolę endogennego konkurencyjnego antagonisty TNF-α, co wykazały skriningowe analizy prowadzone za pomocą techniki Y2H oraz dalszych testów koimmunoprecypitacji (Co-IP) [816, 827]. Badania te, prowadzone równoczasowo z opracowaniem struktury cząsteczki Atsttrin stanowiły najbardziej interesujący, pod względem poznawczym oraz uzyskanych wyników, przedmiot rozważań dotyczący zainicjowania nowej koncepcji szlaku sygnałowego związanego z PGRN oraz jej potencjalnego działania przeciwzapalnego. Na podstawie przeprowadzonych badań analizujących kinetykę z wykorzystaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) zaobserwowano, że PGRN łączy się z TNFR1 wykazując powinowactwo porównywalne z TNF-α oraz wiąże się z TNFR2 z ~600-krotnie wyższym powinowactwem niż sam TNF-α i to w sposób dawkozależny [816, 817]. Istotny jest fakt, że Atsttrin łączy się z TNFR1 z ~18-krotnie niższym powinowactwem niż TNF-α oraz wiąże się z TNFR2 z ~10-krotnie wyższym powinowactwem niż sam TNF-α [816, 817]. Jak wcześniej opisano, we wzajemnej interakcji między PGRN/Atsttrin oraz TNFR1/TNFR2 pośredniczy domena F-A-C i związane z nią sekwencje łączące, takie jak P3, P4 i P5 [816, 819]. Zewnątrzkomórkowe wydłużone regiony łączące TNFR1/TNFR2 zawierają strukturalnie konserwowane domeny bogate w CYS (CRD), takie jak domena bogata w CYS 2 (CRD2) i domena bogata w CYS 3 (CRD3), znane również jako domeny wiążące TNF-α [840, 841]. Wzajemna interakcja między TNF-α/PGRN/Atsttrin oraz TNFR1/TNFR2 opiera się na przestrzennym formowaniu się heteroheksamerycznego kompleksu w stosunku stechiometrycznym 3:3, w którym pojedyncza podjednostka receptora styka się z dwiema sąsiednimi podjednostkami ligandu, zwykle za pośrednictwem domen CRD2 i CRD3 [842, 843]. Każda właściwa domena PGRN/Atsttrin poprzez odpowiednie fałdowanie się naśladuje pojedynczą cząsteczkę TNF-α [819, 843]. Inna domena, która pośredniczy w homotypowych interakcjach między łańcuchami receptora poprzez stabilizację i inicjowanie wiązania kompleksu ligand-receptor, znajduje się po przeciwnej stronie końca N-terminalnego domeny 1 bogatej w Cys (CRD1) zawierającego domenę asocjacji preligandowej (PLAD), która

formuje bardziej złożone oligomery kluczowe dla prawidłowej transdukcji sygnału [842, 843]. Transdukcja wewnątrzkomórkowego sygnału typu pobudzającego/hamującego za pośrednictwem TNF-α poprzez TNFR1/TNFR2 jest związana z konkurencyjnym przeciwdziałaniem PGRN/Atsttrin przez wiele różnych drugorzędowych przekaźników i czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κB, p38MAPK, p44/42 MAPK, JNK, ERK1/2, PI3K, kinaza białkowa B (AKT), kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK) oraz czynnik transkrypcyjny jun-B [787, 816, 844, 845, 846, 847]. Szlak transdukcji sygnału za pośrednictwem TNFR1 wyzwala reakcję zapalną i nasila procesy kataboliczne (apoptoza) [847] (Rycina 6). Przeciwnie, szlak sygnałowy TNFR2 jest powiązany z wyzwoleniem reakcji przeciwzapalnej oraz nasileniem procesów anabolicznych (proliferacja) [847] (Rycina 7). Występujące efekty aktywacji TNFR1 oraz TNFR2 są zależne od wzajemnej bilateralnej równowagi pomiędzy tymi zjawiskami. Aktywacja czynników transkrypcyjnych i kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) zależnych od PGRN/Atsttrin oraz TNFR1/TNFR2 jest związana potencjalnie z rozpoczęciem transkrypcji mRNA dla około ~2000 genów indukowanych TNF-α zarówno u myszy jak i u ludzi dla cytokin, chemokin, czynników wzrostu oraz proteinaz związanych odpowiednio z regulacją cyklu komórkowego, rearanżacją cytoszkieletu, migracją, apoptozą oraz wzrostem i przeżyciem komórki [819, 847]. Wydaje się, że TNFR2 stanowi optymalny cel dla obydwu wymienionych ligandów, takich jak PGRN i Atsttrin biorąc pod uwagę analizę biochemiczną i funkcjonalną oraz dotychczasowe dowody potwierdzające korzystny i ochronny mechanizm tej osi sygnalizacyjnej w wielu procesach przebiegających z towarzyszącym stanem zapalnym [842, 847].



Rycina 6. Mechanizm aktywacji oraz wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału za pośrednictwem receptora TNFR1 z uwzględnieniem interakcji z PGRN/Atsttrin. sTNF-α - postać wolna TNF-α, mTNF-α - postać błonowa TNF-α, DD - domena śmierci, TRADD - białko domeny śmierci związane z receptorem typu 1 dla TNF, FADD - białko adaptorowe FAS związane z domeną śmierci, CASP8 - prokaspaza 8, RIPK1 - kinaza białkowa oddziałująca z receptorem kinaz serynowo-treoninowych 1, Ub - ubikwityna, TRAF2 - czynnik związany z receptorem TNF 2 , cIAP1 - komórkowy inhibitor apoptozy 1, cIAP2 - komórkowy inhibitor apoptozy 2, TAB2 - białko wiążące kinazę TAK2, TAK1 - kinaza 1 aktywowana przez transformujący czynnik wzrostu, TAB3 - białko 3 wiążące TGF-β aktywowane kinazą 1 (MAP3K7), ERK1/2 - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2, JNK - N-końcowa kinaza c-Jun, p38 - białko p38, AP-1 - białko aktywujące 1, IKKα - podjednostka alfa inhibitora czynnika jądrowego kappa B, NEMO - niezbędny modulator czynnika jądrowego kappa B, IKKα - podjednostka beta inhibitora czynnika jądrowego kappa B, IκB - inhibitor czynnika jądrowego kappa B, p50 - białko p50, p65 - białko p65



Rycina 7. Mechanizm aktywacji oraz wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału za pośrednictwem receptora TNFR2 z uwzględnieniem interakcji z PGRN/Atsttrin. mTNF-α - postać błonowa TNF-α, TRAF1 - czynnik związany z receptorem TNF 1, TRAF2 - czynnik związany z receptorem TNF 2, TRAF3 - czynnik związany z receptorem TNF 3, RIPK1 - kinaza białkowa oddziałująca z receptorem kinaz serynowo-treoninowych 1, Ub - ubikwityna, cIAP1 - komórkowy inhibitor apoptozy 1, cIAP2 - komórkowy inhibitor apoptozy 2, MAP3K - kinaza kinazy aktywującej kinazę MAP, ERK1/2 - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2, JNK - N-końcowa kinaza c-Jun, p38 - białko p38, AP-1 - białko aktywujące 1, IKKα - podjednostka alfa inhibitora czynnika jądrowego kappa B, NEMO - niezbędny modulator czynnika jądrowego kappa B, IKKα - podjednostka beta inhibitora czynnika jądrowego kappa B, IκB - inhibitor czynnika jądrowego kappa B, p50 - białko p50, p65 - białko p65, NIK – kinaza indukująca czynnik jądrowy kappa B, p100 - podjednostka p100 czynnika jądrowego kappa B, RelB - czynnik transkrypcyjny RelB

1.2.3.2.2. Członek TNFRSF 25 (TNFRSF25)

W trakcie badań wykonanych w 2014 r. przez Liu i wsp. przeprowadzono rozszerzony skrining w poszukiwaniu innych potencjalnych receptorów, do których może przyłączać się Atsttrin wchodzących w skład nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNFRSF) [848]. W oparciu o uzyskane wyniki stwierdzono, że receptor członek TNFRSF 25 (TNFRSF25) nazywany również receptorem śmierci 3 (DR3) może wchodzić w interakcje z Atsttrin. TNFRSF25 stanowi receptor wykazujący najwyższy stopień homologii strukturalnej z TNFR1, zawierając odpowiednio cztery zewnątrzkomórkowe CRD jak i wewnątrzkomórkową DD [849]. Podobnie jak w przypadku TNFR1, PGRN i Atsttrin łączą się z TNFRSF25 poprzez interakcję z domenami CRD1, CRD2 i CRD3 [848]. Co istotne, przed odkryciem PGRN uważano, że białko 1A typu TNF (TL1A) jest jedynym znanym ligandem receptora TNFRSF25 [850]. TL1A jest białkiem transbłonowym typu II, które może występować w postaci związanej z błoną komórkową oraz wolnej w wyniku procesu alternatywnego splicingu lub rozszczepienia proteolitycznego [851]. Oś sygnałowa TL1A/TNFRSF25 bierze udział w patofizjologii wielu chorób o podłożu autoimmunologicznym i zapalnym [852]. Poprzez konkurencyjne wiązanie się PGRN/Atsttrin z receptorem TNFRSF25 wykazują one działanie antagonistyczne względem TL1A, jak wykazano *in vitro* oraz *in vivo* [848, 853]. Transdukcja wewnątrzkomórkowego sygnału typu pobudzającego/hamującego za pośrednictwem TL1A poprzez TNFRSF25 przy jednoczesnym kompetytywnym łączeniu się PGRN/Atsttrin jest potencjalnie związana ze szlakami właściwymi dla TNFR1/R2 [847]. Wydaje się, że potencjalny wpływ na transdukcję sygnału w osiach sygnałowych TL1A/TNFRSF25 oraz TNF-α/TNFR1 przez antagonistyczne działanie PGRN/Atsttrin może stanowić obiecujący kierunek dalszych badań [848, 853].

1.2.3.3. Efrynowy receptor typu 2A (EPHA2)

Badania przeprowadzone przez Neill i wsp. w 2016 r. wskazały na istnienie kolejnego funkcjonalnego receptora dla PGRN jakim jest efrynowy receptor typu 2A (EPHA2) [854, 855, 856]. Zaobserwowano, że powinowactwo wiązania między PGRN oraz EPHA2 jest ściśle związane ze wzajemnym oddziaływaniem PGRN i SORT1 [854]. Szczególnie wysoki poziom ekspresji EPHA2 występuje w strukturach OUN, gdzie uczestniczy w utrzymaniu czynności połączeń synaptycznych oraz wyższych

funkcji mózgu [857, 858]. Dodatkowo obserwuje się udział EPHA2 w patogenezie nowotworu sutka, prostaty, pęcherza moczowego, skóry, płuc, jajnika oraz mózgu [859]. Dane z piśmiennictwa sugerują, że przedłużona stymulacja w obrębie osi sygnałowej PGRN/EPHA2 może być związana z transdukcją sygnału za pośrednictwem MAPK oraz AKT, mogąc powodować nadmierną morfogenezę naczyń włosowatych [854, 855]. Zjawisko to może być potencjalnie związane z nadekspresją PGRN w szerokim spektrum typów nowotworów [786, 788, 789, 791]. Kolejny nowy mechanizm przedstawia z kolei autoregulacyjną zależność ekspresji PGRN na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego w sposób zależny od EPHA2, ale niezależny od aktywności SORT1 [854]. Pomimo dość dokładnego opisu funkcji EPHA2, mało jest danych na temat interakcji PGRN/EPHA2. Wymaga to dalszych badań, które pozwolą na dokładniejsze wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania tej osi sygnałowej [806].

1.2.3.4. Toll-podobny receptor 9 (TLR9)

Na podstawie badań przeprowadzonych przez Park i wsp. stwierdzono, że PGRN oraz osobne GRN stanowią istotne kofaktory, które aktywują i wzmagają odpowiedź kierowaną przez Toll-podobny receptor 9 (TLR9) w stosunku fragmentów DNA zawierających w swoim składzie niemetylowane (un-CH_3) oligodeoksynukleotydy (ODN) cytozyno-guaninowe (CpG-ODN) co było oceniane poprzez badanie linii komórkowych mysich makrofagów RAW264.7 [860, 861]. Autorzy tego badania zauważyli, że PGRN oraz osobne GRN mogą odpowiadać za dostarczanie CpG-ODN do kompartmentów wewnątrzkomórkowych takich jak endolizosomy, w których dochodzi do ekspresji TLR9. TLR9 jest receptorem biorącym udział w odpowiedzi nieswoistej, którego funkcje obejmują rozpoznawanie patogenów oraz udział w aktywacji komórek immunologicznych [862]. Zebrane dane wskazują, że TLR9 odgrywa kluczową rolę w rozwijaniu się swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez stymulację i aktywację różnych typów komórek T i B, wśród których można wyróżnić plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDC), konwencjonalne komórki dendrytyczne (cDC) oraz komórki B [863]. PGRN oraz osobne GRN wydają się być również zaangażowane w patogenezę tocznia rumieniowatego układowego (SLE) poprzez transdukcję sygnału za pośrednictwem TLR9 [864]. Bardziej szczegółowe poznanie mechanizmów oraz znaczenia klinicznego wzajemnej interakcji PGRN/TLR9 wymaga dalszych badań i obserwacji.

1.2.4. Ekspresja i regionalna dystrybucja tkankowa

Konstytutywna ekspresja transkryptu mRNA dla PGRN jak również immunoreaktywność samego białka w warunkach fizjologicznych bezpośrednio implikuje i wskazuje wielofunkcyjny i plejotropowy charakter tej cząsteczki [800, 803]. Dane uzyskane z badań na modelach przedklinicznych oraz u ludzi sugerują, że gen PGRN ulega ekspresji w całym organizmie w trakcie wszystkich etapów rozwoju ontogenetycznego, występując praktycznie w większości typów komórek pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, endodermy i mezodermy) [782,783, 785, 800, 801, 802, 806, 807]. Analizując ogólny profil ekspresji PGRN można zauważyć, że transkrypty mRNA są konstytutywnie obecne w komórkach o mniejszym stopniu zróżnicowania, ulegających szybkiej proliferacji w przeciwieństwie do komórek wyspecjalizowanych i nieaktywnych mitotycznie, wykazujących niski wskaźnik proliferacji w tkankach somatycznych [865, 866]. Dane dotyczące profilu ekspresji PGRN sugerują istnienie jej odrębnej roli jako regulatora kinetyki i homeostazy komórkowej, a zwłaszcza fazowości cyklu komórkowego wpływając na osiągnięcie zarówno fazy S jak i M niezależnie od innych czynników wzrostu, co pośrednio wyjaśnia jej zwiększoną ekspresję w różnych typach nowotworów u ludzi oraz eksperymentalnych liniach komórek nowotworowych [791, 801, 817]. W warunkach fizjologicznych ekspresję PGRN obserwuje się głównie w nabłonkach pochodzenia mezodermalnego i endodermalnego zlokalizowanych w obrębie skóry, przewodu pokarmowego, układu rozrodczego oraz dróg moczowych. Inne typy nabłonków, obecne w pęcherzykach płucnych i kanalikach nerkowych, mogą wykazywać mniejszy stopień hybrydyzacji z anty- i sensownymi rybosondami PGRN [800, 865, 866]. Ekspresja PGRN w obrębie układu rozrodczego i endokrynnego jest najbardziej widoczna w jajnikach, łożysku, jądrach, najądrzach i nadnerczach [784, 800, 865, 866]. Fragmenty oraz preparaty uzyskane z większości tkanek mezenchmalnych *in vivo* obejmujące elementy tkanki łącznej, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych, mięśni gładkich, mięśnia sercowego oraz naczynia z komórkami śródbłonka wykazują niewielką lub słabą ekspresję PGRN [865, 866]. Wysoki poziom ekspresji PGRN obserwuje się również w narządach litych, szpiku kostnym oraz populacjach komórek układu immunologicznego [782, 800]. Wyniki reakcji hybrydyzacji oraz barwień immunohistochemicznych prowadzonych na liniach komórkowych pochodzenia hematopoetycznego i limfoidalnego wskazują, że ekspresja

PGRN jest również widoczna w narządach o podwyższonej ilości tych komórek, takich jak śledziona, węzły chłonne oraz błona śluzowa jelit [800, 866]. Znaczący odsetek populacji komórek immunologicznych i krwiotwórczych związanych z ekspresją PGRN obejmuje m.in. limfocyty, granulocyty, monocyty oraz makrofagi [800, 865, 866, 867, 868, 869, 870]. Przyjmuje się, że prawidłowe stężenie PGRN w surowicy u ludzi zdrowych oscyluje w granicach 101-387 ng/ml (≥125 ng/ml) i jest zależne od parametrów i modyfikatorów, takich jak płeć, wiek oraz czynniki genetyczne. Do tej pory wartości progowe stężenia PGRN w krążeniu nie zostały precyzyjnie określone oraz znormalizowane [871, 872]. Szacuje się, że obecność przeciwciał anty-PGRN występuje u ≤1% zdrowej populacji, potrzeba jednak badań na większej populacji w celu określenia dokładnej wartości [873].

1.2.5. Neurobiologiczne aspekty funkcjonowania PGRN

1.2.5.1. Ekspresja i tkankowa dystrybucja PGRN w strukturach neuroanatomicznych

Międzygatunkowa analiza porównawcza profilu ekspresji genów potwierdza kluczową rolę neurofizjologiczną przypisywaną PGRN, ponieważ obecność cząsteczek podobnych do GRN została zaobserwowana już w komórkach nerwowych i nabłonkach nereidy różnokolorowej (łac. *Hediste diversicolor*), stanowiącej pierścienicę z gromady wieloszczetów, której ostatni wspólny z kręgowcami przodek pojawił się prawdopodobnie bardzo wcześnie w toku ewolucji zwierząt [874]. Przeprowadzone badania przedkliniczne z wykorzystaniem myszy transgenicznych oraz analizy pośmiertne na ludziach przy użyciu metod proteomicznych, transkryptomicznych oraz immunofluorescencyjnych zapewniają wgląd we wzorzec ekspresji genu PGRN oraz stopień indukcji jego produktów białkowych na poziomie ultrastrukturalnym oraz komórkowym w obrębie tkanki nerwowej [800, 865, 866, 867]. Podczas zachodzącego procesu ontomorfogenezy ekspresja PGRN jest wyraźnie widoczna w ujęciu czasowo-przestrzennym, będąc równomiernie rozłożoną w części rostralnej i ogonowej zarówno w stadium embrionalnym, postnatalnym oraz dorosłości na wielu różnych poziomach organizacyjnych tkanki nerwowej oraz jej form progenitorowych [800, 865, 866]. Ekspresję PGRN obserwuje się w mózgu myszy szczepu C57BL/6 już w 13.5 dniu rozwoju embronalnego (E13.5), która stopniowo wzrasta do czasu późnej embriogenezy (E15.5-E18.5) oraz wczesnego wieku pourodzeniowego, osiągając

ostatecznie ogólny szczyt u osobnika dorosłego [875]. Ekspresja PGRN w trakcie proliferacji i różnicowania neuroblastów w korze nowej jest mniej wyrażona, stając się bardziej widoczna na powierzchni neuronów postmitotycznych zlokalizowanych w obrębie VI warstwy kory gruszkowatej (E15.5) [875, 876] Mniej heterogenny wzór ekspresji PGRN dotyczy komórek wykazujących równoczesną ekspresję Iba-1, które wykazują ekspresję PGRN we wszystkich punktach czasowych rozwoju embrionalnego i okresu dorosłości (>E15.5) [875, 877]. Ten specyficzny wzorzec ekspresji neurokomórkowej jest związany ze stopniową infiltracją struktur układu OUN, zwłaszcza obszarów istoty białej w tym ciała modzelowatego (łac. *corpus callosum*) przez komórki mikrogleju podczas E15.5-E18.5, które pochodzą bezpośrednio z komórek szpikowych śledziony i cechują się konstytutywną ekspresją PGRN [875, 878]. Ekspresja PGRN w mózgu dorosłego osobnika jest silnie wyrażona we wszystkich sześciu warstwach kory nowej, gdzie najwyższy poziom ekspresji jest obserwowany w warstwie V/VI zawierającej neurony piramidalne i wielokształtne [800, 866, 875]. Analiza poziomu immunoreaktywności PGRN w kresomózgowiu jest obserwowana w obrębie ST, opuszek węchowych (łac. *rhinencephalon*), ciele migdałowatym oraz CA, wykazując najwyższą ekspresję w CA1, CA2 oraz zakręcie zębatym [800, 865, 866, 875]. Analogiczny poziom immunoreaktywności PGRN wykrywany jest w międzymózgowiu (łac. *diencephalon*), w tym we wzgórzu, podwzgórzu, przysadce jak również śródmózgowiu, w tym w tworze siatkowatym (łac. *formatio reticularis*), wzgórkach górnych (łac. *colliculus superior*) oraz SN jak również tyłomózgowiu wtórnym (łac. *rhombencephalon*) z ekspresją ograniczoną do warstwy komórek Purkinjego [800, 866, 875]. Ocena poszczególnych populacji komórkowych OUN wykazuje, że ekspresja PGRN jest konstytutywnie obecna na powierzchni neuronów i nieaktywnego mikrogleju podczas gdy nie obserwuje się jej na astrocytach oraz ependymocytach [866, 875, 879]. Ponadto stopniowy wzrost (>E13.5) ekspresji PGRN występuje również w komórkach mikronaczyń w obrębie opony miękkiej (łac. *pia mater*) [875]. Poziom ekspresji PGRN w obrębie rdzenia kręgowego jest wysoki w obrębie istoty szarej, szczególnie biorąc pod uwagę rogi przednie (łac. *cornu anterius*) oraz zwoje korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (łac. ganglion sensorium nervi spinalis) w odniesieniu do odcinka szyjnego i lędźwiowego [866, 880]. Ponadto ekspresja PGRN jest również widoczna w rdzeniowych neuronach ruchowych zarówno *in situ* jak i hodowli pierwotnej, jak również w zwojach współczulnych (łac. *ganglia trunci sympathici*). Różnice w poziomie ekspresji mRNA dla PGRN i jego produktu

białkowego w obrębie tkanki mózgowej są skorelowane z wiekiem, gdzie obserwowalna immunoreaktywność jest znacznie wyższa u 7- i 20-tygodniowych, młodszych osobników myszy szczepu C57BL/6J niż u 50-tygodniowych, starszych osobników wykazujących znacznie mniejszy poziom ekspresji [881]. Dodatkowo, przeprowadzone jakościowe analizy ultrastrukturalne wewnętrznych i zewnętrznych elementów komórek nerwowych wykazały, że PGRN wykazuje ekspresję w przebiegu szlaku transportu wewnątrzkomórkowego uwzględniając retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i duże gęste pęcherzyki rdzeniowe (LDCV), gdzie PGRN jest wspólnie transportowana z BDNF zarówno w kierunku antero- i retrogradalnym wzdłuż aksonów i dendrytów [882]. W tym przypadku transport i wydzielanie PGRN w ujęciu czasowo-przestrzennym do kompartmentów wewnątrz- i zewnątrzsynaptycznych są regulowane w sposób zależny od aktywności neuronalnej oraz odpowiedzi na inne bodźce otrzymywane przez komórkę [882, 883]. Przyjmuje się, że prawidłowe stężenie PGRN w CSF oscyluje w zakresie 4.07-6.60 ng/ml (≤5 ng/ml) i jest stosunkowo słabo skorelowane z poszczególnymi parametrami i modyfikatorami demograficznymi i antropometrycznymi jak również czynnikami genetycznymi w przeciwieństwie do ekwiwalentnych wartości mierzonych w surowicy [884, 885]. Nie zaobserwowano wzajemnej korelacji pomiędzy stężeniem PGRN w surowicy i CSF, co wskazuje na zróżnicowaną regulację poziomu jej stężenia w OUN i pozostałych narządach obwodowych [886].

1.2.5.2. Rola i znaczenie PGRN w fizjologii układu nerwowego

PGRN odgrywa istotną fizjologiczną rolę w funkcjonowaniu i rozwoju układu nerwowego, co jest związane z jej ciągłą ekspresją obserwowaną w trakcie całego rozwoju ontogenetycznego, szczególnie w trakcie procesu embriogenezy oraz okresu prenatalnego większości kręgowców. W badaniu przeprowadzonym na samicach szczurów szczepu Wistar-Imamichi w okresie okołourodzeniowym obserwowano wysoki poziom ekspresji PGRN w obrębie jądra brzuszno-przyśrodkowego (VMH) i jądra łukowatego (ARC) podwzgórza po podskórnym wstrzyknięciu propionianu testosteronu ($C_{22}H_{32}O_3$) [887]. Podobne wyniki zaobserwowano po podskórnym podaniu benzoesanu estradiolu ($C_{25}H_{28}O_3$) w obrębie zakrętu zębatego, co pozwoliło na stwierdzenie, że estrogeny mogą indukować ekspresję PGRN w obrębie struktur układu nerwowego [888]. Obserwacje te wskazują na bezpośredni udział PGRN w

epigenetycznych mechanizmach kontroli fenotypowego zróżnicowania dimorfizmu płciowego za pośrednictwem gonadosteroidów zachodzącego w podwzgórzu oraz następnie utrzymaniu tego stanu w wieku dorosłym [889]. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy wiadomo, że neurogeneza u dorosłych ssaków występuje w strefie podkomorowej (SVZ) komór bocznych oraz w w strefie podziarnistej zakrętu zębatego CA [890]. Regiony te, stanowią neuroanatomiczne źródło samoodnawialnych i multipotencjalnych nerwowych komórek macierzystych (NSC) oraz nerwowych progenitorowych komórek macierzystych (NSPC) w których mogą zachodzić aktywnie procesy neurogenezy [891]. Obecnie wiadomo, że NSPC i ich zróżnicowane linie komórkowe wykazują ekspresję PGRN zarówno w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [876, 892]. Badania dotyczące neurogenezy zachodzącej w obrębie siatkówki w modelu danio pręgowanego (łac. *Danio rerio*) wykazały, że delecja w obrębie genu GRN-A (GRN-A$^{-/-}$) jest związana z zaburzeniami rozwoju w komórkach progenitorowych siatkówki takimi jak zaburzenia przebiegu oraz wydłużenie fazy G2 i M cyklu komórkowego, brak nabycia markerów końcowego różnicowania przez komórki postmitotyczne jak również brak kolonizacji siatkówki przez komórki progenitorowe mikrogleju [893]. Wyniki te wskazują na udział PGRN w procesie neurogenezy poprzez regulację kinetyki cyklu komórkowego nerwowych komórek macierzystych i progenitorowych. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy wydaje się zatem, że proces neurogenezy jest kontrolowany przez PGRN, który jest w niego zaangażowany zarówno w mechanizmie bezpośrednim, jak i pośrednim. Przeprowadzone do tej pory badania na tkankach obwodowych mocno ugruntowały rolę PGRN jako czynnika biorącego udział w reakcji zapalnej. PGRN stanowi istotny czynnik biorący udział w reakcji neurozapalnej pełniąc rolę immunomodulującą, wykazując szerokospektralne działanie przeciwzapalne hamując aktywność mikrogleju [894]. Utrata funkcji PGRN w obrębie tkanki nerwowej prowadzi do ogólnych zaburzeń funkcji lizosomów, nadmiernej produkcji składników dopełniacza jak również deregulacji i nadmiernej odpowiedzi neurozapalnej skutkując ostatecznie wystąpieniem złożonych zmian neuropatologicznych [895, 896]. Implikowaną rolę PGRN należy kolektywnie traktować jako jedną z składowych elementów skoordynowanego i wieloczynnikowego mechanizmu neurofizjologicznego, który wciąż wymaga dalszych szczegółowych badań i obserwacji.

1.2.5.3. Zaburzenia funkcji PGRN w chorobach neurodegeneracyjnch

PGRN stanowi plejotropowe białko wykazujące cechy neurotroficzne oraz neuroprotekcyjne, mające szeroki wpływ na morfologię, przeżycie, proliferację i różnicowanie się neuronów [897]. Choroby neurodegeneracyjne stanowią grupę wrodzonych lub nabytych schorzeń układu nerwowego, które są związane z wystąpieniem szeregu zmian cytologicznych, molekularnych, anatomicznych i funkcjonalnych stanowiących ostateczny ekwiwalent neuropatologiczny [898]. Analiza dostępnych opracowań i badań wskazuje, iż identyfikacja mutacji w genie PGRN jest potencjalnie związana z predyspozycją do wystąpienia chorób o podłożu neurodegeneracyjnym [899]. Wśród mutacji występujących w genie kodującym PGRN większość stanowią mutacje nonsensowne (ang. *nonsense mutation*) oraz przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshift mutation*) co prowadzi do następczego wzrostu degradacji jądrowego transkryptu oraz kolejno zmniejszenia poziomu mRNA kodującego PGRN [900]. Określone typy mutacji mogą również powodować wytwarzanie niefunkcjonalnego lub niestabilnego produktu białkowego, jak również jego nieprawidłową sekrecję i degradację [901]. Patogenne mutacje prowadzą w tym przypadku bezpośrednio do obniżenia poziomu PGRN w tkance nerwowej, CSF oraz surowicy, gdzie mutacje powodujące całkowitą utratę jednego allelu funkcjonalnego genu są związane z haploinsuficjencją i zmniejszeniem poziomu białka nawet o 50% [902]. Obserwowane nasilenie procesów neurodegeneracyjnych i zmian neuropatologicznych koreluje ze spadkiem stężenia PGRN [903]. Obserwowane niskie stężenia PGRN są przeważnie skorelowane z początkiem choroby lub mogą występować u ludzi wykazujących mutację w genie kodującym PGRN w przedobjawowym okresie choroby. Kliniczne objawy obserwowane w wyniku mutacji w genie PGRN są niejednorodne, gdzie także czynniki genetyczne, jak i środowiskowe mogą modyfikować fenotypowy obraz choroby oraz postępującej neurodegeneracji [904]. Najczęściej obserwowalne zmiany neuropatologiczne u pacjentów z mutacją w obrębie genu kodującego PGRN obejmują utratę komórek nerwowych prowadzącą do następczej atrofii CX obserwowanej najczęściej w obrębie płatów czołowych, postępującą glejozę oraz stwardnienie w obrębie formacji CA oraz obecność wtrętów cytoplazmatycznych [905]. Po raz pierwszy w 2006 r. stwierdzono iż mutacja w genie kodującym PGRN jest związana z rozwojem FTLD [906]. Jedną z neuropatologicznych cech FTLD związanych z mutacjami PGRN jest obecność ubikwitynowych

wewnątrzjądrowych wtrętów w korze mózgowej i ST [907]. Wydaje się iż brak lub zmniejszona ekspresja PGRN zaburza plastyczność oraz łączność synaptyczną, zwiększa wrażliwość neuronów na neurotoksyczne działanie oraz odkładanie się wtrętów białkowych TAR-wiążących DNA 43 kDa (TDP-43) i ostatecznie sprzyja śmierci komórek [908]. W ostatnim czasie potwierdzono również, iż polimorfizm genu PGRN może mieć wpływ na wystąpienie choroby Alzheimera [909]. Polimorfizm genu PGRN rs5848 w układzie homozygotycznym i recesywnym wydaje się być związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby Alzheimera, potencjalnie prowadząc również do zmian stwardnieniowych CA u tych pacjentów [910]. Przeprowadzone w ostatnim czasie badania wskazują również, iż warianty genetyczne rs5848 i rs646776 mutacji w genie kodującym PGRN mogą mieć związek z rozwojem choroby Parkinsona [911, 912]. Powyższe polimorfizmy pełnią w tym przypadku rolę regulatorów poziomu PGRN w surowicy, gdzie średnie stężenie w surowicy u pacjentów z chorobą Parkinsona jest w tym przypadku niższe w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Patofizjologiczne podstawy mechanizmów prowadzących do neurodegeneracji w przypadku wypadnięcia funkcji genu PGRN wymagają obecnie dalszych badań. Wydaje się, iż PGRN może stanowić potencjalny przesiewowy biomarker użyteczny pod kątem diagnostyki chorób neurodegeneracyjnych u pacjentów z zaburzeniami funkcji poznawczych oraz ruchowych. Analogicznie, gen kodujący PGRN potencjalnie mógłby znaleźć zastosowanie w testach genetycznych oceniających obecność mutacji predysponujących do rozwoju schorzeń neurodegeneracyjnych [913].

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

2.1. Założenia

Założeniem prezentowanej pracy doktorskiej była ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6. Niestety, mimo ogromnego postępu w zrozumieniu patomechanizmów leżących u podstaw choroby Parkinsona, nadal nie jest dostępna terapia stanowiąca leczenie przyczynowe, która efektywnie zatrzymałaby lub spowolniła jej naturalny przebieg. W związku z tym aktualnie trwają badania i poszukiwania nowych skutecznych związków farmakologicznych, sposobów potencjalizacji działania poznanych wcześniej leków oraz innowacyjnych metod operacyjnych w terapii choroby Parkinsona. Przeprowadzone procedury eksperymentalne i badawcze miały na celu wyjaśnienie czy zastosowanie Atsttrin może być potencjalnie skuteczne w terapii choroby Parkinsona wykazując zakładane działanie neuroprotekcyjne, jak również potencjalnie implikować opracowanie a następnie zastosowanie w przyszłości nowych celowanych terapii opartych na tym związku w praktyce klinicznej. Dodatkowym założeniem pracy było pogłębienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin, jak również optymalizacja i walidacja alternatywnej metody podania związku obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6.

2.2. Cel

Celami szczegółowymi prezentowanej pracy doktorskiej były:

1) Analiza ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL, poprzez wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź i dawka-efekt, wykreślenie krzywej wzorcowej, koniecznej do identyfikacji potencjalnej skutecznej terapeutycznie i bezpiecznej dawki związku.

2) Ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych na przebieg procesów neurodegeneracyjnych i rozwój reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL.

3) Ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym oraz ośrodkowy profil neurochemiczny aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

4) Ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych na przebieg procesów neurodegeneracyjnych i rozwój reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL.

5) Ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym oraz ośrodkowy profil neurochemiczny aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

6) Zweryfikowanie czy zastosowanie Atsttrin może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona.

7) Pogłębienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin poprzez optymalizację i walidację alternatywnej metody podania związku obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową w doświadczalnym modelu u myszy szczepu C57BL/6.

MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania zostały przeprowadzone na 10-12 miesięcznych (waga ciała 30 ± 5 g) samcach (40, XY) myszy szczepu C57BL/6 (łac. *Mus musculus*), pochodzących z hodowli prowadzonej przez Centralne Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych (CLZD) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) zlokalizowane i operujące w ramach Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT) – nr 037 w wykazie rejestru hodowców prowadzonym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). Zwierzęta były utrzymywane w standardowych plastikowych klatkach z metalową pokrywą (1290; Tecniplast, Varese, Włochy) w liczbie 3-5 ze wzbogaceniem w formie tekturowych rurek i/lub materiału gniazdowego w warunkach kontrolowanej temperatury (22 ± 5°C) oraz 60 ± 5% wilgotności powietrza (15 wymian powietrza/h) z zachowaniem 12 h cyklu dobowego światło/ciemność (7:00 am/7:00 pm) oraz stałej intensywności oświetlenia. Myszy trzymano w tym samym obiekcie, zapewniając dostęp do paszy granulowanej przemysłowej (Labofeed B; Morawski, Kcynia, Polska) o recepturze zgodnej z wytycznymi Nutrient Requirement of Laboratory Animals (4th Revised Edition, 1995; National Academies Press, Washington, DC, USA) oraz czystej wody *ad libitum* [914]. Przed wykonaniem inwazyjnych procedur eksperymentalnych zwierzęta rozdzielano do odpowiednich klatek i grup określonych na podstawie protokołu badania oraz poddawano dwudniowej habituacji w celu ustabilizowania równowagi hormonalnej i neurochemicznej. Projekt zatytułowany „Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurozapalne, neurotransmisji oraz neurodegeneracyjne w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy” uzyskał zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach przy Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie – uchwała nr WAW2/120/2018 z dnia 25 lipca 2018 roku. Wszystkie procedury eksperymentalne z wykorzystaniem zwierząt były ponadto przeprowadzane zgodnie z postanowieniami przepisów Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. (Dz. Urz. UE L 276 z 20.10.2010; str. 33-79) w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (EUR-Lex – 32010L0063), wytycznymi Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th Edition, 2011; National Academies Press, Washington, DC,

USA) jak również wytycznymi ARRIVE 2.0 [915]. W trakcie wykonywania doświadczeń zostały podjęte wszelkie wysiłki w celu zmniejszenia liczby wykorzystywanych zwierząt oraz zminimalizowania ich dyskomfortu i cierpienia poprzez praktyczne wdrożenie zasady 3R (ang. *replacement, reduction and refinement*) [916]. Jeżeli nie określono inaczej, wszystkie procedury eksperymentalne przeprowadzono w szczególnie powtarzalny sposób, aby wykluczyć jakikolwiek znaczący wpływ na uzyskane dane i wyniki.

3.1.2. Grupy włączone do eksperymentu

3.1.2.1. Projekt i plan badań

Procedury eksperymentalne oraz następcze analizy przy użyciu metod molekularnych i biochemicznych zostały wykonane w dwóch, następujących po sobie etapach. W pierwszej, wstępnej części badania (Etap 1) dokonano analizy ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej, koniecznej do identyfikacji potencjalnej skutecznej dawki związku, która charakteryzowała się optymalnym efektem farmakologicznym oraz jednocześnie wykazywała dostatecznie wysoki poziom bezpieczeństwa w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu. Analizując dokonany przegląd literatury przedmiotu należy stwierdzić, iż do chwili powstania prezentowanej rozprawy doktorskiej nie podejmowano prób bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin. Implikowało to również istniejący brak wiedzy umożliwiającej precyzyjne określenie dawki oraz stężenia tego związku podanego potencjalnie tą drogą. Przedstawiona w przedmiotowej pracy, wprowadzona alternatywna metoda podania Atsttrin obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową oraz wyznaczenie dawki i stężenia związku stanowi wkład własny autora w poruszane obszary badawcze, niemniej jednak zastosowana metodyka uwzględnia znaną i uniwersalną koncepcję. W drugiej, głównej części stanowiącej uzupełnienie badania (Etap 2) zastosowano wyznaczoną wcześniej empirycznie na podstawie krzywej odpowiedzi dawkę związku w celu oceny wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin do ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy na przebieg procesów neurodegeneracyjnych i rozwój reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM. Zgodnie z protokołem badania procedury

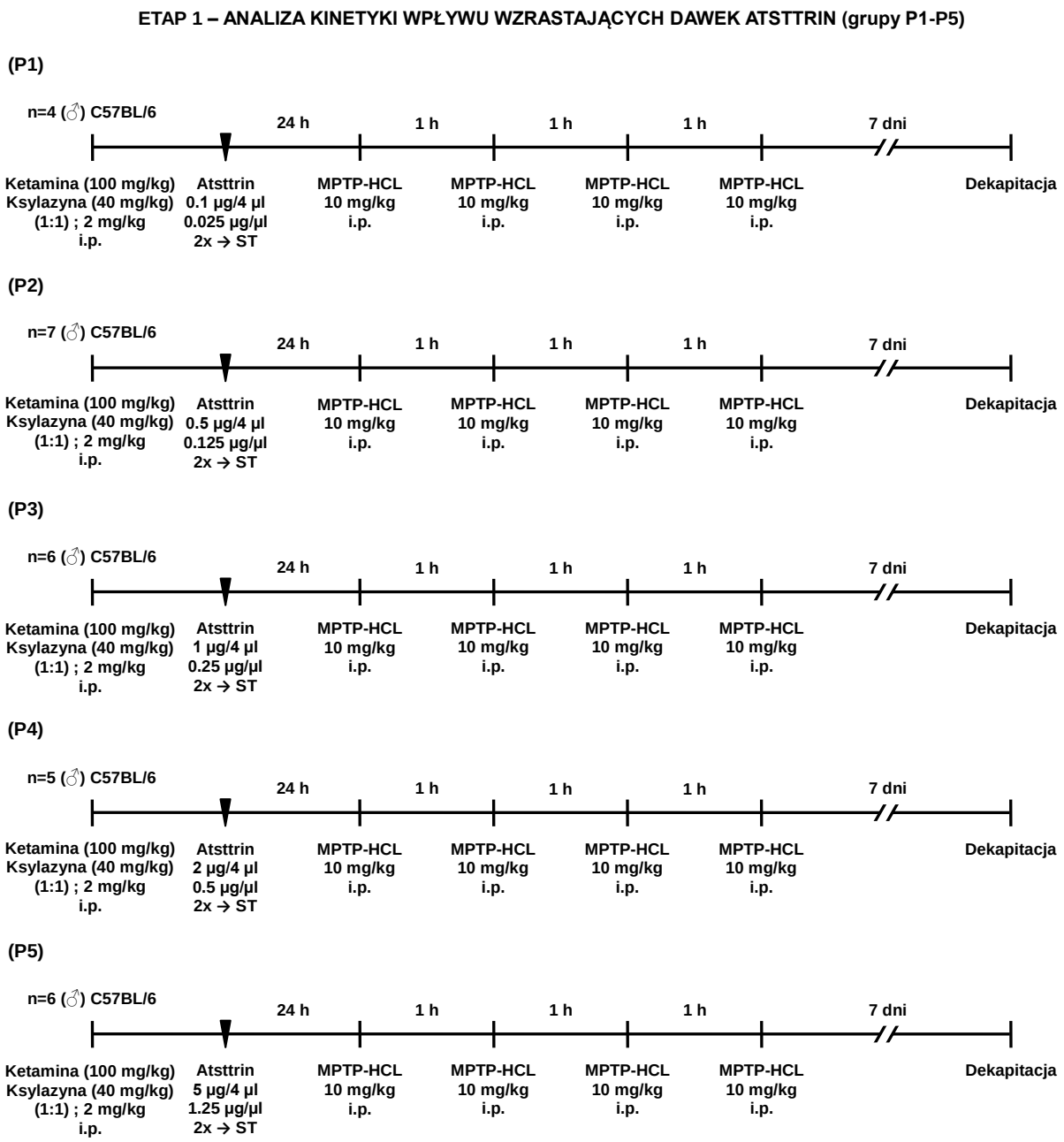
eksperymentalne oraz następcze analizy zostały przeprowadzone na łącznej liczbie 95 myszy (n=95), która została oszacowana przy pomocy ogólnodostępnego internetowego kalkulatora (www.biomath.info/power).

3.1.2.2. Etap 1 – analiza kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin

Predefiniowana wartość zakresu obejmującego pięć wzrastających dawek Atsttrin wynoszących odpowiednio 0.1 µg (0.025 µg/µl), 0.5 µg (0.125 µg/µl), 1 µg (0.25 µg/µl), 2 µg (0.5 µg/µl) oraz 5 µg (1.25 µg/µl) została ekstrapolowana i wyznaczona na podstawie danych literaturowych z wcześniej przeprowadzonych badań dotyczących układu mięśniowo-szkieletowego na analogicznych modelach zwierzęcych u myszy [816]. Ustalone metodą skalowania wartości dawek i stężenie związku przyjmowano w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia oraz z uwzględnieniem istniejących ograniczeń anatomicznych związanych z domózgową drogą podania związku za pomocą metod stereotaktycznych [917]. W pierwszej, wstępnej części badania określanej również roboczo badaniem pilotażowym (ang. *pilot study*) polegającej na analizie ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej użyto zgodnie z protokołem badania łącznie 28 myszy (n=28), które zostały odpowiednio podzielone na pięć grup (P1-P5) uwzględniając rodzaj i zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji (Tabela 1). Kolejno grupy oznaczone jako P1-P5 obejmowały myszy otrzymujące predefiniowane wcześniej wzrastające dawki Atsttrin do ST, które zostały poddane dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL (Rycina 8).

Grupa	Liczba zwierząt (n)	Kod grupy
Atsttrin 0.1 μg/4 μl (0.025 μg/μl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	4	P1
Atsttrin 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	7	P2
Atsttrin 1 μg/4 μl (0.25 μg/μl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	6	P3
Atsttrin 2 μg/4 μl (0.5 μg/μl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	5	P4
Atsttrin 5 μg/4 μl (1.25 μg/μl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	6	P5

Tabela 1. Charakterystyka i podział grup ze względu na rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji w trakcie pierwszej części badania (Etap 1). 7d - założony siedmiodniowy punkt czasowy, w którym zwierzęta były uśmiercane zgodnie z protokołem badania, 4x MPTP-HCL - cztery seryjne dootrzewnowe iniekcje chlorowodorku 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, Atsttrin 0.1 μg/4 μl (0.025 μg/μl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.1 μg/4 μl (0.025 μg/μl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Atsttrin 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg/4 μl (0.125 μg/μl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Atsttrin 1 μg/4 μl (0.25 μg/μl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 1 μg/4 μl (0.25 μg/μl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Atsttrin 2 μg/4 μl (0.5 μg/μl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 2 μg/4 μl (0.5 μg/μl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Atsttrin 5 μg/4 μl (1.25 μg/μl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 5 μg/4 μl (1.25 μg/μl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych



Rycina 8. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu pierwszej części badania (Etap 1) biorąc pod uwagę rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji (grupy P1-P5). 2x → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych, MPTP-HCL - chlorowodorek 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, i.p. - iniekcja dootrzewnowa

Panel parametrów analizowany w pierwszej części badania celem oceny ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej oraz następczej identyfikacji terapeutycznej dawki Atsttrin obejmował kolejno:

1) Ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym poprzez ocenę ilości mRNA w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

    a) Cytokin i mediatorów zapalnych: IL-1α, TNF-α, IL-6, IFN-γ oraz COX-2
    b) Cytokin i mediatorów przeciwzapalnych: IL-10
    c) Parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego: iNOS oraz nNOS
    d) Czynników wzrostu i neurotroficznych: TGF-β oraz BDNF
    e) Enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów: TH oraz TG2

2) Analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

    a) Monoamin: DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, 5-HT oraz 5-HIAA
    b) Aminokwasów: GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER

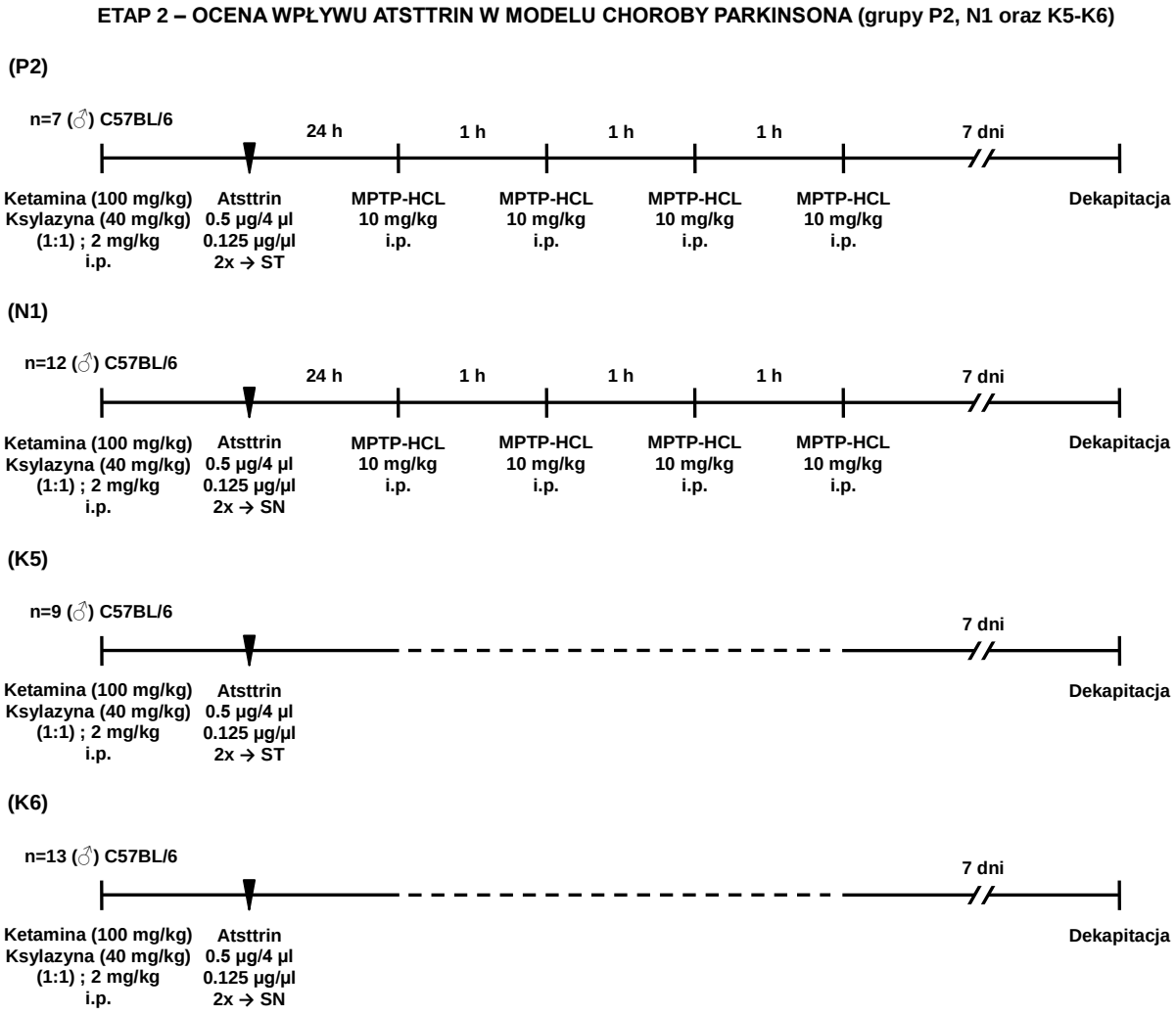
3.1.2.3. Etap 2 – ocena wpływu Atsttrin w modelu choroby Parkinsona

Zgodnie z danymi uzyskanymi z analizy ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt oraz wynikami odczytanymi z wykreślonej krzywej wzorcowej celem przeprowadzenia i uzupełnienia dalszej części badania wybrano dawkę 0.5 μg (0.125 μg/μl), która wykazywała w tym przypadku optymalny efekt farmakologiczny i charakteryzowała się jednocześnie dostatecznie wysokim poziomem bezpieczeństwa w mikrośrodowisku tkanki mózgu (Tabela 2). Analiza ta została w całości przedstawiona i opisana w części „Wyniki" celem utrzymania przejrzystości układu prezentowanej pracy. W drugiej, głównej części stanowiącej uzupełnienie badania, określanej również roboczo badaniem właściwym

(ang. *proper study*) polegającej na analizie wpływu empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej do ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych użyto w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona zgodnie z protokołem badania łącznie 34 myszy (n=34), które zostały odpowiednio podzielone na określone grupy, uwzględniając rodzaj i zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji (Rycina 9). W tej części badania do analiz wykorzystano ponownie grupę P2 obejmującą w tym przypadku 7 myszy (n=7), które otrzymały Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) do ST oraz zostały poddane dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w trakcie pierwszej części badania. Kolejno, grupa oznaczona jako N1 obejmowała 12 myszy (n=12), które otrzymały Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) do SN oraz zostały poddane dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Na tym etapie wykonano również stereotaktyczne podania Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) do struktur ST lub SN u 22 myszy (n=22), niepoddanych innym interwencjom celem otrzymania dodatkowych grup kontrolnych (K5-K6), które arbitralnie włączono i ujęto w tej części doświadczenia celem uszczegółowienia oraz interpretacji otrzymanych wyników.

Grupa	Liczba zwierząt (n)	Kod grupy
Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	7	P2
Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → SN + 4x MPTP-HCL (7d)	12	N1
Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → ST (7d)	9	K5
Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → SN (7d)	13	K6

Tabela 2. Charakterystyka i podział grup ze względu na rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji w trakcie drugiej części badania (Etap 2). 7d - założony siedmiodniowy punkt czasowy, w którym zwierzęta były uśmiercane zgodnie z protokołem badania, 4x MPTP-HCL - cztery seryjne dootrzewnowe iniekcje chlorowodorku 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Atsttrin 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) → SN - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych



Rycina 9. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu drugiej części badania (Etap 2) biorąc pod uwagę rodzaj przeprowadzonych procedur oraz interwencji (grupy P2, N1 oraz K5-K6). 2x → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych, 2x → SN - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych, MPTP-HCL - chlorowodorek 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, i.p. - iniekcja dootrzewnowa

Panel parametrów analizowanych w drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona obejmował kolejno:

1) Ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym poprzez ocenę ilości mRNA w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

    a) Cytokin i mediatorów zapalnych: IL-1α, TNF-α, IL-6, IFN-γ oraz COX-2
    b) Cytokin i mediatorów przeciwzapalnych: IL-10
    c) Parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego: iNOS oraz nNOS
    d) Czynników wzrostu i neurotroficznych: TGF-β oraz BDNF
    e) Enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów: TH oraz TG2

2) Analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

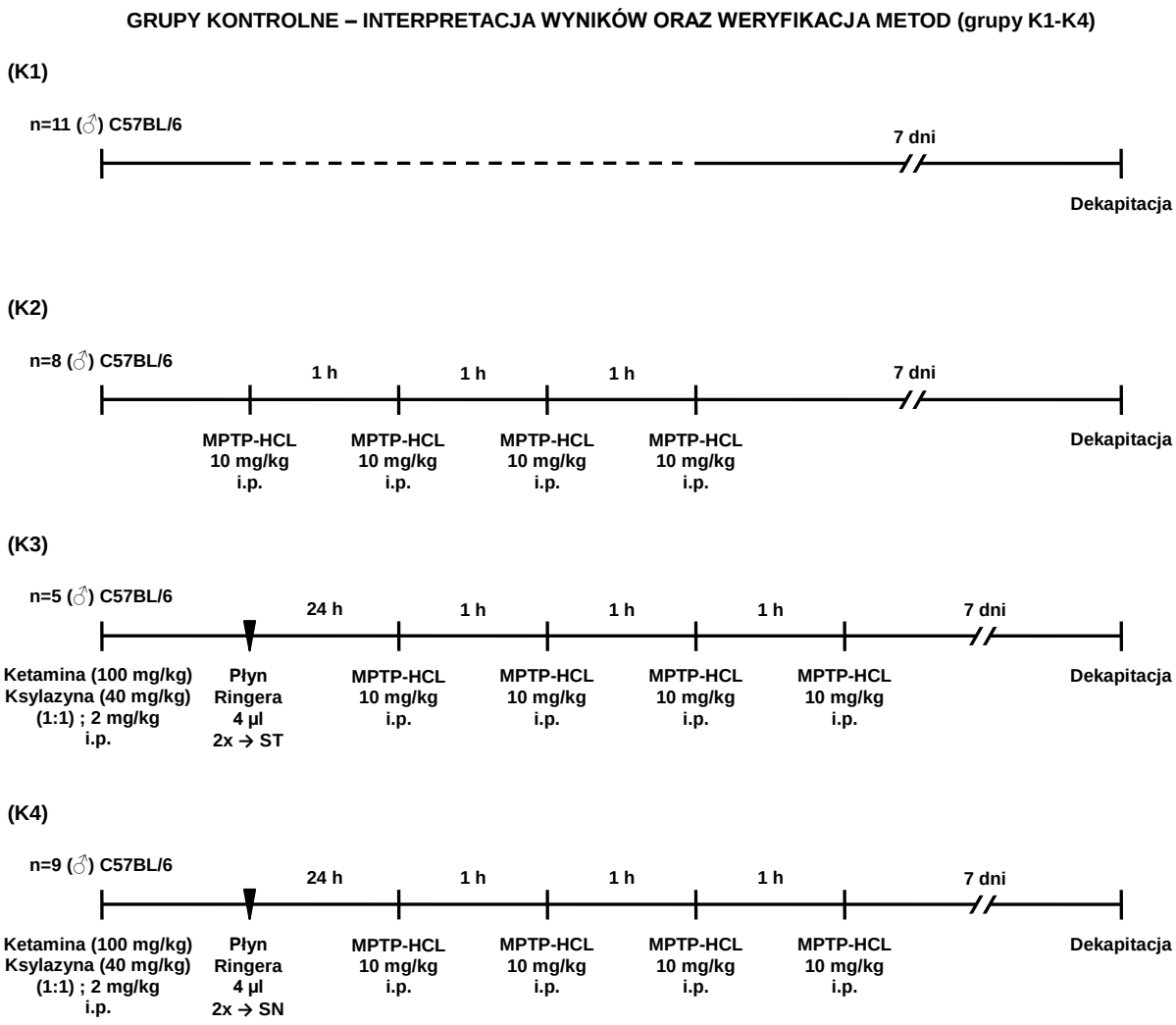
    a) Monoamin: DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA
    b) Aminokwasów: GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER

3.1.2.4. Grupy kontrolne

Celem właściwej interpretacji uzyskanych wyników, jak również zapewnieniu podstawowego odniesienia oraz weryfikacji użytych metod w trakcie przebiegu całego badania zdefiniowano korespondujące grupy kontrolne (Tabela 3). Zgodnie z protokołem badania użyto łącznie 33 myszy (n=33), które zostały odpowiednio podzielone na określone grupy, uwzględniając rodzaj i zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji (Rycina 10).

Grupa	Liczba zwierząt (n)	Kod grupy
Kontrola niepoddana żadnej procedurze i interwencji (7d)	11	K1
4x MPTP-HCL (7d)	8	K2
Płyn Ringera (4 µl) → ST + 4x MPTP-HCL (7d)	5	K3
Płyn Ringera (4 µl) → SN + 4x MPTP-HCL (7d)	9	K4

Tabela 3. Charakterystyka i podział grup kontrolnych. 7d - założony siedmiodniowy punkt czasowy, w którym zwierzęta były uśmiercane zgodnie z protokołem badania, 4x MPTP-HCL - cztery seryjne dootrzewnowe iniekcje chlorowodorku 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, Płyn Ringera (4 µl) → ST - bilateralne domózgowe podanie płynu Ringera do ST za pomocą metod stereotaktycznych, Płyn Ringera (4 µl) → SN - bilateralne domózgowe podanie płynu Ringera do SN za pomocą metod stereotaktycznych



Rycina 10. Schematyczne przedstawienie czasowego przebiegu przeprowadzonych procedur oraz interwencji na korespondujących grupach kontrolnych (K1-K4). 2x → ST - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych, 2x → SN - bilateralne domózgowe podanie Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych, MPTP-HCL - chlorowodorek 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, i.p. - iniekcja dootrzewnowa

Panel parametrów analizowany w grupach kontrolnych, zdefiniowanych celem właściwej interpretacji uzyskanych wyników, jak również zapewnieniu podstawowego odniesienia oraz weryfikacji użytych metod w trakcie przebiegu całego badania obejmował kolejno:

1) Ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym poprzez ocenę ilości mRNA w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

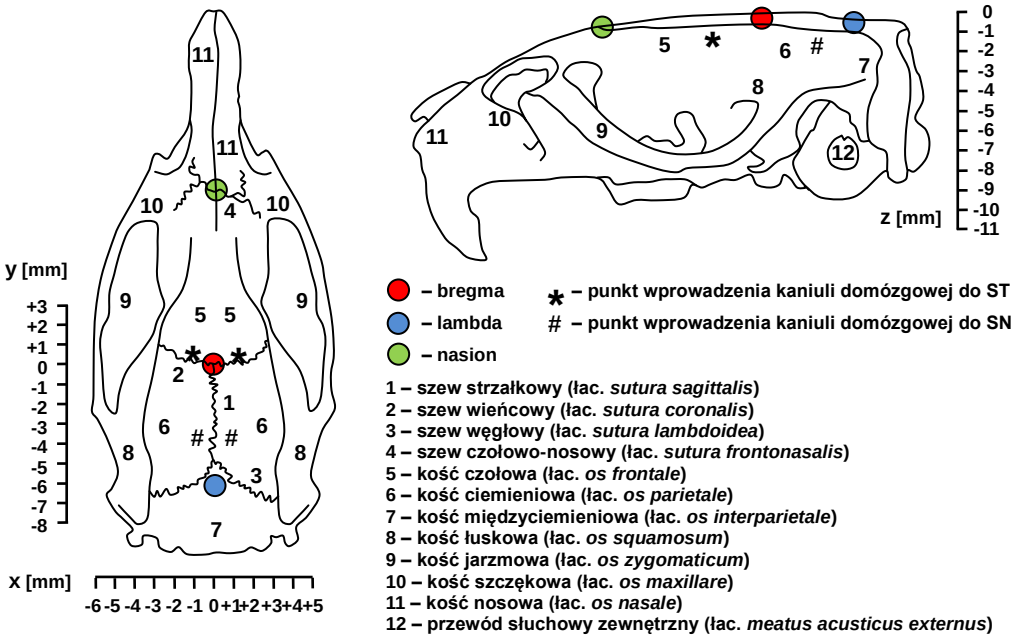
    a) Cytokin i mediatorów zapalnych: IL-1α, TNF-α, IL-6, IFN-γ oraz COX-2
    b) Cytokin i mediatorów przeciwzapalnych: IL-10
    c) Parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego: iNOS oraz nNOS
    d) Czynników wzrostu i neurotroficznych: TGF-β oraz BDNF
    e) Enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów: TH oraz TG2

2) Analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń w wyizolowanych strukturach mózgu takich jak ST, CA, CX oraz CM:

    a) Monoamin: DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA
    b) Aminokwasów: GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER

3.1.3. Operacje stereotaktyczne

Podczas wykonywania operacji stereotaktycznych zwierzęta były znieczulane i usypiane poprzez podanie kombinacji (1:1; v/v) ketaminy (Ketanest 50 mg/ml; Pfizer, New York, NY, USA) oraz ksylazyny (Xylapan 20 mg/ml; Vetoquinol AG, Bern, Szwajcaria) w dawce 2 ml/kg drogą pojedynczej iniekcji dootrzewnowej (i.p.) przy użyciu sterylnej strzykawki zaopatrzonej w igłę 25G x 5/8" (Ø 0.5 x 16 mm) o objętości 1 ml (300014; BD Plastipak, Madryt, Hiszpania) zachowując stosowne procedury aseptyki. Stopień głębokości narkozy uznawano za dostateczny, gdy po uciśnięciu jednej z tylnych kończyn zwierzęcia nie obserwowano odruchu jej zginania. Po indukcji znieczulenia myszy były umieszczane na stoliku stereotaktycznym (51900; Stoelting, Wood Dale, IL, USA) zaopatrzonym w dodatkowy adapter (51625; Stoelting, Wood Dale, IL, USA), w którym głowa myszy była unieruchamiana trzypunktowo, przy pomocy dwóch poprzeczek usznych oraz uchwytu na siekacze i nos. Po przystrzyżeniu włosów za pomocą golarki elektrycznej (9667L; 3M Health Care, Saint Paul, MN, USA) z wymiennymi ostrzami (9660; 3M Health Care, Saint Paul, MN, USA) oraz następczym przygotowaniu aseptycznego pola operacyjnego wykonywano podłużne linijne cięcie skóry pokrywającej czaszkę od linii oczu, odsłaniając szew strzałkowy (łac. *sutura saggitalis*) i wieńcowy (łac. *sutura coronalis*). Powierzchnia czaszki była następnie zakropiona 3% roztworem nadtlenku wodoru (H_2O_2; Hasco-Lek, Wrocław, Polska) celem dokładniejszej identyfikacji i wizualizacji punktów bregma i lambda, uzyskania hemostazy oraz dezynfekcji. Oczy myszy dodatkowo zakrapiano 0.15% roztworem hialuronianu sodu ($C_{28}H_{44}N_2O_{23}\cdot Na$) i 2% dekspantenolu ($C_9H_{19}NO_4$) w postaci gotowego roztworu (Bepanthen Eye; Bayer, Leverkusen, Niemcy) chroniąc je przed nadmiernym wysychaniem oraz uszkodzeniem rogówki w trakcie trwania procedury. Używając kompletu śrub mikrometrycznych wyznaczano miejsca wejścia kaniuli domózgowej na sklepistości czaszki, gdzie pozycja igły była wyzerowana poprzez odczytanie koordynat w punkcie bregmy (Rycina 11). Otwory trepanacyjne były wykonywane manualnie za pomocą sterylnej igły (4665112; B. Braun, Melsungen, Niemcy) w rozmiarze 19G x 1½″ (Ø 1.1 x 40 mm) unikając przez to potencjalnego urazu termicznego związanego z użyciem mikrowiertarki, tuż nad zakładanymi miejscami wprowadzenia kaniuli domózgowej w oparciu o zaplanowane wcześniej koordynaty.



Rycina 11. Procedura wyznaczania współrzędnych stereotaktycznych oraz miejsc trepanacji na podstawie punktów kraniometrycznych na powierzchni czaszki myszy

Iniekcje były wykonane przy użyciu automatycznej pompy (UMP2; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) zaopatrzonej w mikrostrzykawkę (NanoFil-100; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) połączoną z dedykowaną igłą (NF35BV-2; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) zamontowaną na ruchomym ramieniu stolika stereotaktycznego poruszającym się w trzech osiach – przednio-tylnej (AP), środkowo-bocznej (ML) oraz grzbietowo-brzusznej (DV), połączonej z programowalnym kontrolerem (Micro 4; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Po wizualnej identyfikacji opony twardej wprowadzano powoli igłę do mózgu a następnie odczekiwano 2 min przed rozpoczęciem infuzji w celu powrotu mózgu do prawidłowej topografii po przejściowej mechanicznej deformacji przez igłę. Programowana pompa mikrostrzykawkowa została użyta do bilateralnego podania 4 µl (8 µl na cały mózg) roztworu Atsttrin (Atreaon, Newton, CA, USA) przygotowanego w sterylnym roztworze płynu Ringera w składzie 8.6 g/dm^3 NaCl, 0.3 g/dm^3 KCl oraz 0.33 g/dm^3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Fresenius Kabi, Warszawa, Polska) do struktur ST przy następujących koordynatach – AP (y_a): +0.62, ML (x_a): ± 1.75 w stosunku do punktu bregma i DV (z_a): -3.5 mm w stosunku do opony twardej lub SN przy następujących

koordynatach – AP (y_b): -3.08, ML (x_b): ± 0.8 w stosunku do bregma i DV (z_b): -4.6 mm w stosunku do opony twardej na podstawie The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos G, Franklin KBJ. 2nd Edition; Academic Press, 2001, San Diego, CA, USA) z automatyczną szybkością przepływu 0.5 µl/min. Po wykonaniu iniekcji kaniulę utrzymywano w mózgu przez 3 minuty, aby zminimalizować ryzyko wystąpienia cofnięcia się (refluksu) wstrzykniętej substancji po torze wyprowadzanej igły. Po upływie tego czasu igła była usuwana, powstałe otwory trepanacyjne wypełniano woskiem kostnym (060.196.0057; Atramat, Ciudad de México, Meksyk) używając dwustronnego dysektora natomiast ranę skóry głowy zaopatrzano pojedynczymi monofilamentowymi niewchłanianymi szwami 5-0 z nylonu (poliamidu), używając igły w rozmiarze 16 mm o krzywiźnie 3/8 koła (DK05PA; Yavo, Bełchatów, Polska). Tak zaopatrzoną chirurgicznie ranę dezynfekowano ostatecznie 7.5% wodnym roztworem powidonu jodu (Braunol; B. Braun, Melsungen, Niemcy). Myszy z grup kontrolnych zostały poddane identycznemu znieczuleniu oraz operacji stereotaktycznej związanej z wykonaniem bilateralnej iniekcji domózgowej równej objętości sterylnego płynu Ringera. Tak zaopatrzone po wykonaniu procedury zwierzęta umieszczano w klatkach z wolnym dostępem do wody i pożywienia. W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia znacznej hipotermii u zwierząt w trakcie okresu okołooperacyjnego w pomieszczeniu utrzymywana była odpowiednio kontrolowana wysoka temperatura ($28 \pm 2°C$) otoczenia.

3.1.4. Eksperymentalny model choroby Parkinsona

W celu indukcji zespołu objawów związanych z uszkodzeniem układu pozapiramidowego oraz następczych zmian biochemicznych i neuropatologicznych stanowiących model imitujący zmiany zachodzące w chorobie Parkinsona u myszy zastosowano dootrzewnowe iniekcje toksyny MPTP-HCL (68750; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zgodnie z założonym protokołem badania intoksykacja MPTP-HCL była wykonywana po przeprowadzeniu operacji stereotaktycznych w wyznaczonych punktach czasowych i grupach zwierząt. Związek z uwagi na wysoki stopień toksyczności po uprzednim przygotowaniu w odpowiednich warunkach był każdorazowo rozpuszczany w szczelnie zamkniętej oznakowanej ampułce w czasie 5 min przed rozpoczęciem iniekcji w sterylnym roztworze 0.9% NaCl (Polfa SA, Lublin, Polska) oraz nabierany do jałowej strzykawki zaopatrzonej w igłę 25G x 5/8" (Ø 0.5 x

16 mm) o objętości 1 ml (300014; BD Plastipak, Madryt, Hiszpania). Przyjęty schemat podań obejmował cztery seryjne wstrzyknięcia dootrzewnowe zachowując stosowne procedury aseptyki w 1 h odstępach w dawce 10 mg/kg masy ciała (objętość 0.1 ml/20 g) do całkowitej łącznej dawki 40 mg/kg (4 x 0.12 ml) czystej toksyny MPTP, co odpowiadało 47 mg/kg związku MPTP-HCL [918]. Wybrana w eksperymencie dawka MPTP-HCL, dostosowana odpowiednio do grupy wiekowej i płci myszy stanowiła najbardziej efektywny schemat biorąc pod uwagę opisany w piśmiennictwie profil spadku (≥80%) poziomu DA w obrębie struktur ST [919]. Intoksykacje MPTP-HCL były prowadzone w specjalnej pracowni, w godzinach 10:00-15:00 (UTC+01:00) każdorazowo przez odpowiednio przeszkoloną osobę zaopatrzoną w odpowiednie środki ochrony osobistej (gogle ochronne, półmaska filtrująca klasy FFP3, kombinezon ochronny, rękawice nitrylowe oraz ochraniacze na obuwie) przy zachowaniu wszelkich procedur bezpieczeństwa i higieny pracy (BHP). Po zakończeniu podań MPTP-HCL powierzchnie robocze pracowni były dezynfekowane, natomiast jednorazowe elementy stroju ochronnego, powstałe odpady medyczne oraz ściółka poddawane utylizacji. W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia znacznej hipotermii u zwierząt po wykonaniu intoksykacji MPTP-HCL w pomieszczeniu utrzymywana była odpowiednio kontrolowana wysoka temperatura ($28 \pm 2°C$) otoczenia. Podczas trwania procedur doświadczalnych oraz 14 dni po ich zakończeniu nie przechowywano innych zwierząt w pomieszczeniu.

3.1.5. Pobranie i przygotowanie tkanek

W określonych punktach czasowych zgodnie z protokołem badania zwierzęta były uśmiercane przez nagłą dyslokację kręgów szyjnych powodującą przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego. W tym celu kciuk i palec wskazujący dominującej ręki umieszczano po obu stronach szyi, podtrzymując mysz u podstawy czaszki gdzie druga ręką chwytając nasadę ogona wykonywała mechaniczną trakcję wzdłuż osi długiej zwierzęcia powodując oddzielenie połączenia kręgów szyjnych i czaszki. Dekapitację przeprowadzano na poziomie stawów głowowo-szyjnych (C_0-C_1/C_2) za pomocą nożyczek typu Mayo. W następnym etapie wykonywano długie podłużne linijne cięcie skóry oraz oddzielano kości pokrywy czaszki wzdłuż szwu strzałkowego i kolejno resekowano sklepienie przez jego fragmentację przy użyciu mikronożyczek. W następnym etapie cały mózg sprawnie wydobywano oddzielając go od kości podstawy i

odchodzących nerwów czaszkowych oraz umieszczono na schłodzonej szklanej płytce (10 x 15 x 0.5 cm). Przy użyciu techniki mikrochirurgicznej i odpowiednich narzędzi pod kontrolą mikroskopu (SK-292H; Opta-Tech, Warszawa, Polska) wypreparowywano i pobierano obustronnie próbki ST, CA, CX oraz CM. W pierwszym etapie izolacji uzyskiwano dwa preparaty CX okolicy czołowej a następnie od półkul oddzielano struktury leżące w obrębie tylnego dołu czaszki uzyskując preparaty CM. W dalszej kolejności wykonywano cięcie w lini pośrodkowej półkul oraz następnie otwierano komorę boczną mózgu wzdłuż szczeliny naczyniówkowej preparując CA a następnie uzyskując istotę szarą ST. Pobrane preparaty tkanki mózgu były następnie ważone (XS105 Dual Range; Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria) oraz umieszczane w suchym lodzie (CO_2) a następnie przechowywane w zamrażarce w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia oznaczeń przy użyciu metod molekularnych i biochemicznych.

3.2. Metody

3.2.1. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

3.2.1.1. Przygotowanie próbek

W pierwszym etapie poprzedzającym wykonanie oznaczeń tkanki homogenizowano używając sonifikatora ultradźwiękowego (VirSonic 60; VirTis, Gardiner, NY, USA) w 1000 µl mieszaniny homogenizacyjnej zawierającej 0.1 M kwas nadchlorowy ($HClO_4$) oraz 0.05 mM kwas askorbinowy ($C_6H_8O_6$). Kolejno próbki wirowano przez 15 min z szybkością 13.000 obrotów/min (Labofuge 400R; Heraeus Instruments, Hanau, Niemcy) w temperaturze 4°C a tak uzyskany supernatant był przesączany przez filtr strzykawkowy wykonany z politetrafluoroetylenu (PTFE) o średnicy 13 mm i rozmiarze porów 0.2 µm (6792-1302 Puradisc; Whatman, Wielka Brytania). Tak przygotowany roztwór próbki (20 µl) był zamykany w odpowiedniej kapslowanej fiolce (29379-U; Supelco, Bellefonte, PA, USA) i umieszczany w systemie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3.2.1.2. Oznaczenie stężenia monoamin

Analiza stężenia monoamin i ich metabolitów: DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA w pobranych próbkach tkanek była wykonywana przy zastosowaniu metody HPLC z detekcją elektrochemiczną (HPLC-ED). Układ użytego chromatografu składał się kolejno z autosamplera (LaChrom L-7250; Merck-Hitachi, Darmstadt/Tokio, Niemcy/Japonia), pompy (Mini-Star K-500; Knauer, Berlin, Niemcy) oraz detektora elektrochemicznego (L-3500A; Merck-Recipe, Darmstadt/Monachium, Niemcy) z elektrodą szklano-węglową. Jako fazę ruchomą (eluent) zastosowano bufor cytrynianiowo-fosforanowy stanowiący roztwór 32 mM fosforanu sodu (NaH_2PO_4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 34 mM kwasu cytrynowego ($C_6H_8O_7$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM octanu kwasu sulfoninowego ($C_8H_{18}O_3S$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz 54 μM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dejonizowanej (18.3 MΩ · cm) wodzie zawierającej 16% metanolu (CH_3OH; Merck, Darmstadt, Niemcy). Rozdziału i następczej identyfikacji poszczególnych związków monoamin dokonywano w odwróconym układzie faz używając kolumny EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18AB (720936.40; Macherey-Nagel, Düren, Niemcy) o wymiarach 250 mm x 4 mm przy średnim rozmiarze cząstek 5 μm oraz wielkość porów 100 Å przy przepływie 0.8 ml/min oraz odpowiednim potencjale elektrochemicznym (μ) równym +0.8 V względem elektordy chlorosrebrowej (Ag/AgCl). Badane próbki były podawane na kolumnę w automatyczny i precyzyjny sposób za pomocą autosamplera gdzie następował ich izokratyczny rozdział. Wypłukiwane z kolumny frakcje były rejestrowane i integrowane przez komputer w postaci pików gdzie dane dotyczące wielkości sygnału były analizowane w programie Clarity (wersja 5.0; DataApex, Praga, Czechy). Stężenie neuroprzekaźników w badanych próbkach określano obliczając pole powierzchni pod krzywą pików i porównując go z polem roztworów wzorcowych o znanym stężeniu (kalibracja zewnętrzna). Końcowa ilość monoamin w próbce była wyrażona jako pg/mg mokrej tkanki. Wartości obrotów określono jako wzajemny stosunek ilości metabolitów do natywnego neuroprzekaźnika, odpowiednio DOPAC/DA, 3-MT/DA, HVA/DA, MHPG/NA oraz 5-HIAA/5-HT.

3.2.1.3. Oznaczenie stężenia aminokwasów

Analiza stężenia poszczególnych aminokwasów: GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER w pobranych tkankach była wykonywana przy zastosowaniu metody HPLC-ED. Do wykonania oznaczeń wykorzystano próbki, w których wcześniej oznaczano stężenia monoamin poddając je reakcji derywatyzacji przedkolumnowej polegającej na przeprowadzeniu analitów (aminokwasów) w wyniku reakcji chemicznej do odpowiednich pochodnych o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie. W tym przypadku roztwór do przeprowadzenia reakcji derywatyzacji został przygotowany przez rozpuszczenie 22 mg o-ftaldialdehydu (OPA; Fluka, Buchs, Szwajcaria) w mieszaninie zawierającej 1 M siarczan (IV) sodu (Na_2SO_3) w objętości 0.5 ml, metanol w objętości 0.5 ml oraz 0.1 M tetraboran sodu ($Na_2B_4O_7$) w 0.9 ml objętości. Procedura ta była przeprowadzana poprzez dodanie 20 µl roztworu do derywatyzacji do 1 ml roztworu próbki oraz do 1 ml roztworu standardu inkubując je następnie przez 15 min w warunkach temperatury pokojowej bez dostępu światła. Układ użytego chromatografu składał się kolejno z autosamplera (Primaide 1210; Hitachi, Tokio, Japonia), pompy (Primaide 1110, Hitachi, Tokio, Japonia) oraz detektora elektrochemicznego (EC3000; Recipe, Monachium, Niemcy) z elektrodą szklano-węglową. Jako fazę ruchomą (eluent) zastosowano 0.2 M kwas cytrynowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 45 mM fosforan dwusodowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz 0.15 mM kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dejonizowanej (18.3 MΩ·cm) wodzie zawierającej 24% metanolu (CH_3OH; Merck, Darmstadt, Niemcy). Przygotowanie fazy ruchomej oraz roztworu do derywatyzacji wykonano według. zmodyfikowanej metody Rowley'a i wsp. z późniejszymi modyfikacjami [920]. Rozdziału i następczej identyfikacji poszczególnych związków aminokwasów dokonywano w odwróconym układzie faz używając kolumny Luna 5 µm C18(2) 100 Å (00G-4252-E0; Phenomenex, Torrance, CA, USA) o wymiarach 250 mm x 4.6 mm przy przepływie 0.8 ml/min oraz odpowiednim potencjale elektrochemicznym (µ) równym +0.85 V względem elektrody. Badane próbki były nastrzykiwane na kolumnę w automatyczny i precyzyjny sposób za pomocą autosamplera, gdzie następował ich izokratyczny rozdział. Wypłukiwane z kolumny frakcje były rejestrowane i integrowane przez komputer w postaci pików gdzie dane dotyczące wielkości sygnału były zapisywane oraz analizowane w programie Primaide (wersja 1.0; Merck, Darmstadt, Niemcy). Stężenie

neuroprzekaźników w badanych próbkach określano obliczając pole powierzchni pod krzywą pików i porównując je z polem roztworów wzorcowych o znanym stężeniu (kalibracja zewnętrzna). Końcowa ilość aminokwasów w tkance była wyrażona jako ng/mg mokrej tkanki.

3.2.2. Metoda Real-Time PCR

3.2.2.1. Izolacja RNA z pobranych tkanek

Ekstrakcja całkowitego RNA z pobranych tkanek była prowadzona przy użyciu zmodyfikowanej metody AGPC (ang. *acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*) opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi [921]. Tkanki homogenizowano w 1 ml odczynnika TRI Reagent (T9424; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), po wcześniejszym mechanicznym rozdrobnieniu za pomocą sterylnego mikrotłuczka (0030120973; Eppendorf, Hamburg, Niemcy) oraz inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu do każdej probówki dodawano 200 µl chloroformu (C2432; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a następnie po dokładnym wymieszaniu wirowano z prędkością 12000 xg przez 20 min w temperaturze 4°C (Labofuge 400R; Heraeus Instruments, Hanau, Niemcy). Po odwirowaniu powstałą górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do sterylnej probówki zawierającej 650 µl izopropanolu (278475; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz po dokładnym wymieszaniu inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu całość ponownie wirowano z prędkością 12000 xg przez 10 min w temperaturze 4°C (Labofuge 400R; Heraeus Instruments, Hanau, Niemcy). Po uprzednim oddzieleniu supernatantu pozostały pelet RNA przemywano w 1 ml 75% etanolu (C_2H_5OH) i wirowano z szybkością 7500 xg przez 5 min w temperaturze 4°C (Labofuge 400R; Heraeus Instruments, Hanau, Niemcy). Po usunięciu etanolu, pozostałe po osuszeniu pelety rozpuszczano w 20 µl wody wolnej od nukleaz (95284; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pomiar stężenia całkowitego RNA wykonywano używając spektrofotometru BioPhotometerD30 (6133000001; Eppendorf, Hamburg, Niemcy) wyposażonego w przystawkę TrayCell (Z802573; Hellma GmbH, Müllheim, Niemcy) obejmującą zakres spektralny 200-2500 nm przy zastosowanej długości fali (λ) wynoszącej odpowiednio 260 nm, 280 nm oraz 320 nm. Dodatkowej ocenie podlegała wartość współczynnika absorpcji A_{260}/A_{280} świadczącego o zanieczyszczeniu próbki białkami, którego wartość w tym przypadku oscylowała w

granicach 1.6-1.8 zawierając się w akceptowanych granicach normy dla tego typu oznaczeń. Pomiar wykonywano w dwóch powtórzeniach. Po wyizolowaniu RNA przechowywano w temperaturze -80ºC do czasu wykonania reakcji odwrotnej transkrypcji.

3.2.2.2. Synteza cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji

W celu otrzymania jednoniciowego cDNA wyizolowane wcześniej RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji (RT), mającej na celu przepisanie informacji genetycznej z pierwotnej nici matrycowej. Reakcję prowadzono używając zestawu PrimeScript RT Reagent (Perfect Real Time) zawierającego wszystkie składniki potrzebne do wykonania mieszaniny reakcyjnej (RR037A; TakaraBio, Otsu, Japonia). Do sterylnych probówek dodawano 4 µl RNA oraz kolejno 6 µl mieszaniny reakcyjnej (mixu), w skład której wchodziło 2 µl odczynnika 5X PrimeScript Buffer (SD2197), 0.5 µl odczynnika PrimeScript RT Enzyme Mix I (SD2200), 0.5 µl odczynnika Oligo dT Primer (dGTP, dATP, dTTP oraz dCTP) o stężeniu 10 mmol/l dla każdego nukleotydu (SD2199), 0.5 µl odczynnika Random 6 mers (SD2201) oraz 2.5 µl wody RNase Free dH2O (SD2202). Inkubację prowadzono w termocyklerze gradientowym SensoQuest Labcycler (011-101; SensoQuest GmbH, Göttingen, Niemcy) przez 15 min w temperaturze 37ºC, a następnie w temperaturze 85ºC przez 5 s w celu denaturacji potencjalnie powstających hybryd RNA/cDNA. Tak otrzymany materiał cDNA przechowywano w temperaturze -20ºC do czasu wykonania reakcji amplifikacji.

3.2.2.3. Reakcja Real-Time PCR

Amplifikację odpowiednich fragmentów cDNA wykonano za pomocą reakcji Real-Time PCR z monitorowaniem i analizą kinetyki przyrostu produktu w czasie rzeczywistym. W tym celu wykorzystano aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM System (73070BC; Qiagen Benelux BV, Velno, Holandia) oraz kompatybilne oprogramowanie Rotor-Gene Q Series Software (wersja 2.1.0; Qiagen Benelux BV, Velno, Holandia) obsługujące termocykler. Reakcję prowadzono używając mieszaniny, w skład której wchodziło 1 µl uzyskanego wcześniej cDNA, 10 µl odczynnika FastStart Essential DNA Green Master (06402712001; Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA), 1.25 µl startera ”forward” (F), 1.25 µl startera ”reverse” (R) oraz 6.5 µl wody wolnej od nukleaz (06924204001; Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA). W reakcjach amplifikacji cDNA używano mieszaniny starterów dla wybranych genów

zaprojektowanych przy użyciu publicznie dostępnego narzędzia informatycznego Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) dostępnego na stronach National Center for Biotechnology Information (NCBI), instytucji gromadzącej i udostępniającej publicznie sekwencje DNA (Tabela 4). Oprócz oceny ekspresji badanych genów, dodatkowo w każdej próbce oznaczano ekspresję referencyjnego genu dla dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH), który wykazuje stałą i stosunkowo wysoką ekspresję w większości komórek organizmu. Zastosowanie tego typu kontroli wewnętrznej pozwoliło na wyeliminowanie potencjalnych różnic wynikających z niejednakowej jakości wykorzystywanego RNA oraz zmiennej wydajności reakcji odwrotnej transkrypcji.

Protokół reakcji Real-Time PCR obejmował następujące etapy:

1) Denaturacja wstępna – 95ºC / 10 min
2) Liczba cykli – 45
    c) Denaturacja: 95ºC / 15 s
    d) Przyłączenie starterów: 58ºC / 15 s
    e) Synteza: 72ºC / 15 s
3) Wykonanie krzywej topnienia – od 70ºC do 95ºC / kolejno co 0.5ºC

Amplifikowany gen	Sekwencje starterów (5'→3')		Długość produktu (pz)	Numer dostępu do sekwencji referencyjnej GenBank (NCBI)
GAPDH	F	5'–TGCACCACCAACTGCTTAGC–3'	87	NM_001289726.1
	R	5'–GGCATGGACTGTGGTCATGAG–3'		
IL-1α	F	5'–ACGTCAAGCAACGGGAAGAT–3'	124	NM_010554.4
	R	5'–AAGGTGCTGATCTGGGTTGG–3'		
IL-6	F	5'–GAGGATACCACTCCCAACAGACC–3'	141	NM_031168.2
	R	5'–AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA–3'		
IL-10	F	5'–TGGCATGAGGATCAGCAGGG–3'	85	NM_010548.2
	R	5'–TAGGAGCATGTGGCTCTGGC–3'		
TNF-α	F	5'–AGCCGATGGGTTGTACCTTG–3'	99	NM_013693.3
	R	5'–ATAGCAAATCGGCTGACGGT–3'		
TH	F	5'–AACCTACCAGCCGGTGTACT–3'	94	NM_009377.2
	R	5'–AGAGAATGGGCGCTGGATAC–3'		
TG2	F	5'–TCAGCAAGTGAAGTACGGGC–3'	106	NM_009373.3
	R	5'–GGCGGAGTTGTAGTTGGTCA–3'		
TGF-β	F	5'–CATTGGCAAAGGTCGGTTT–3'	109	NM_011577.2
	R	5'–TGCCTCTCGGAACCATGAAC–3'		
BDNF	F	5'–GGACCAGAAGCGTGACAACAA–3'	142	NM_001048142.1
	R	5'–CGCCTTCATGCAACCGAAGT–3'		
INF-γ	F	5'–ACACTGCATCTTGGCTTTGC–3'	76	NM_008337.4
	R	5'–GCTTTCAATGACTGTGCCGT–3'		
iNOS	F	5'–CCTGGGAGCGCTCTAGTGAA–3'	97	NM_001313921.1
	R	5'–TCTGTGCTGTCCCAGTGAGG–3'		
nNOS	F	5'–GGAGGATGCTGGTGTGTTCA–3'	103	NM_008712.3
	R	5'–AAGGCGGTTGGTCACTTCAT–3'		
COX-2	F	5'–CCTCTGCGATGCTCTTCCGA–3'	70	NM_011198.4
	R	5'–CAAGGATTTGCTGCCTGGCT–3'		

Tabela 4. Sekwencje starterów stosowanych w reakcjach Real-time PCR oraz oczekiwane długości otrzymywanych produktów

3.2.2.4. Ilościowe opracowanie wyników

Każdą kolejno analizowaną próbkę, poddaną amplifikacji w trakcie reakcji Real-Time PCR charakteryzowały i opisywały następujące parametry:

1) E – efektywność (wydajność powielania transgenu), liczona dla cyklu w fazie logarytmicznej amplifikacji cDNA, pod uwagę brano tylko próbki posiadające efektywność większą od 1.7 (E >1.7) według zależności:

$$E = 10^{\frac{-1}{k}} \qquad k = \frac{-1}{logE}$$

gdzie:

k – współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej (kalibracyjnej), opisujący ilość cykli PCR w zależności od zawartości cDNA w próbce

2) C_T – próg wykrywalności (ang. *treshold cycle*) określający taką ilość cykli PCR (C_T ≥10), w których poziom amplifikacji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu oraz wartość fluorescencji przekracza poziom tła (ang. *background*)

Względny wynik poziomu ekspresji analizowanych genów wyznaczano w oparciu o formułę matematyczną zaproponowaną przez Pfaffl'a [922] według wzoru:

$$R = \frac{(E_{gen\ badany})^{\Delta C_T gen\ badany\ (kontrola-próbka)}}{(E_{gen\ kontrolny})^{\Delta C_T gen\ kontrolny\ (kontrola-próbka)}}$$

gdzie:

R – poziom ekspresji analizowanego transkryptu w próbie nieznanej wyrażony jako wielokrotność genu kontrolnego (stosunek fluorescencji próbki badanej do próbki referencyjnej)

$E_{gen\ badany}$ – efektywność reakcji PCR dla analizowanego genu

$E_{gen\ kontrolny}$ – efektywność reakcji PCR dla genu kontrolnego (GAPDH)

ΔC_T – różnica C_T dla kontroli i próbki

3.2.3. Analiza statystyczna

Otrzymane dane i wyniki oznaczeń poddano analizie statystycznej przy użyciu pakietu programu Python (wersja 3.9.15; Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA) oraz środowiska Jupyter Notebook (wersja 6.5.2; Project Jupyter, San Francisco, CA, USA). Do tego celu posługiwano się poszczególnymi modułami i zestawami algorytmów numerycznych zawartych w bibliotekach SciPy (wersja 1.9.3), Matplotlib (wersja 3.6.2), NumPy (wersja 1.23.5) oraz Pandas (wersja 1.5.2). Ponadto posłużono się arkuszem kalkulacyjnym Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) do wykonania analiz pomocniczych oraz obliczeń porównawczych. Do oceny różnic między poszczególnymi grupami wykorzystana została funkcja scipy.stats.ttest_ind przy zastosowaniu dwustronnego t-testu Welcha nie zakładającego równości wariancji w populacji badanej i kontrolnej oraz przyjmujący hipotezę alternatywną, że średnie dystrybucji w populacjach badanej i kontrolnej nie są równe. Podczas analizy wartości prawdopodobieństwa istotności mniejsze niż 0.05 ($p<0.05$) były uznawane za statystycznie znamienne. W celu przedstawienia ogólnej charakterystyki rozkładu empirycznego uzyskanych wyników posłużono się histogramami. Wyniki zaprezentowano na diagramach słupkowych jako wartości średnie ± błąd standardowy (SEM).

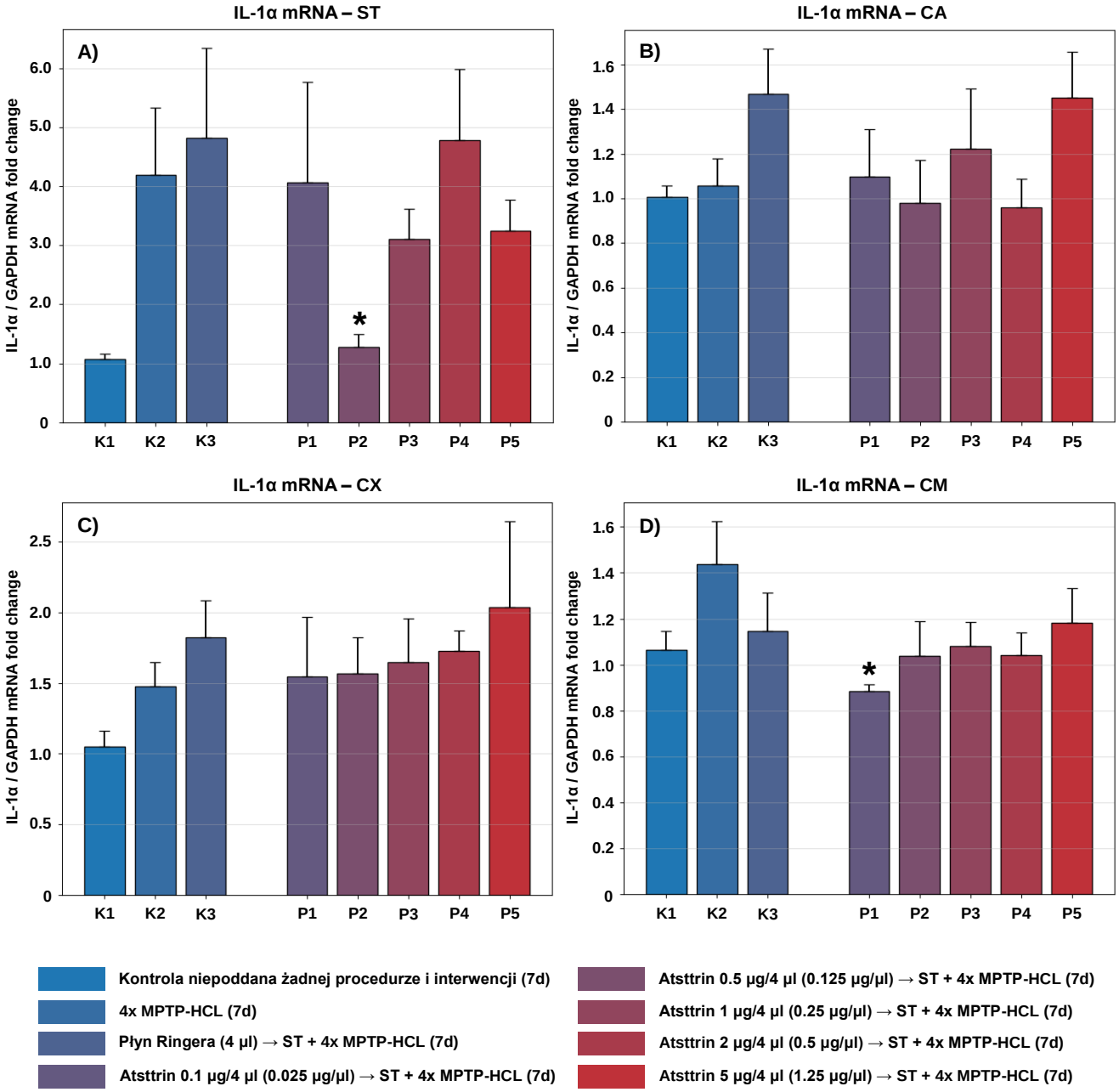
WYNIKI

4.1. Analiza ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego za pomocą metod stereotaktycznych na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL

4.1.1 Wpływ wzrastających dawek Atsttrin podanych do prążkowia (ST) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL

4.1.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-1α

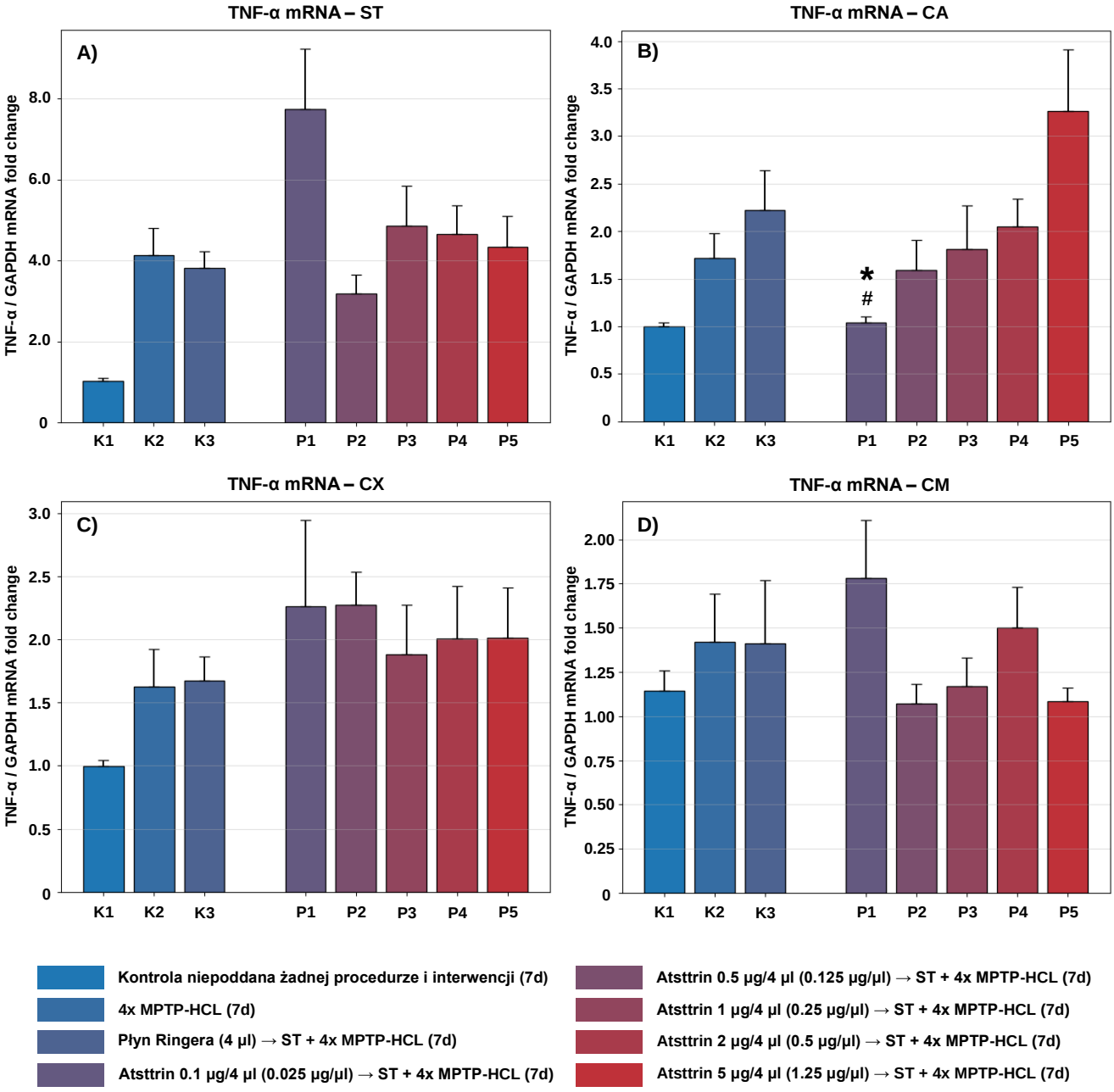
Ekspresję poziomu mRNA dla IL-1α w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 12). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0383$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższej (P1) oraz kolejno wyższych (P3-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0213$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania kolejno wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CM.



Rycina 12. Ekspresja genu dla IL-1α oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TNF-α

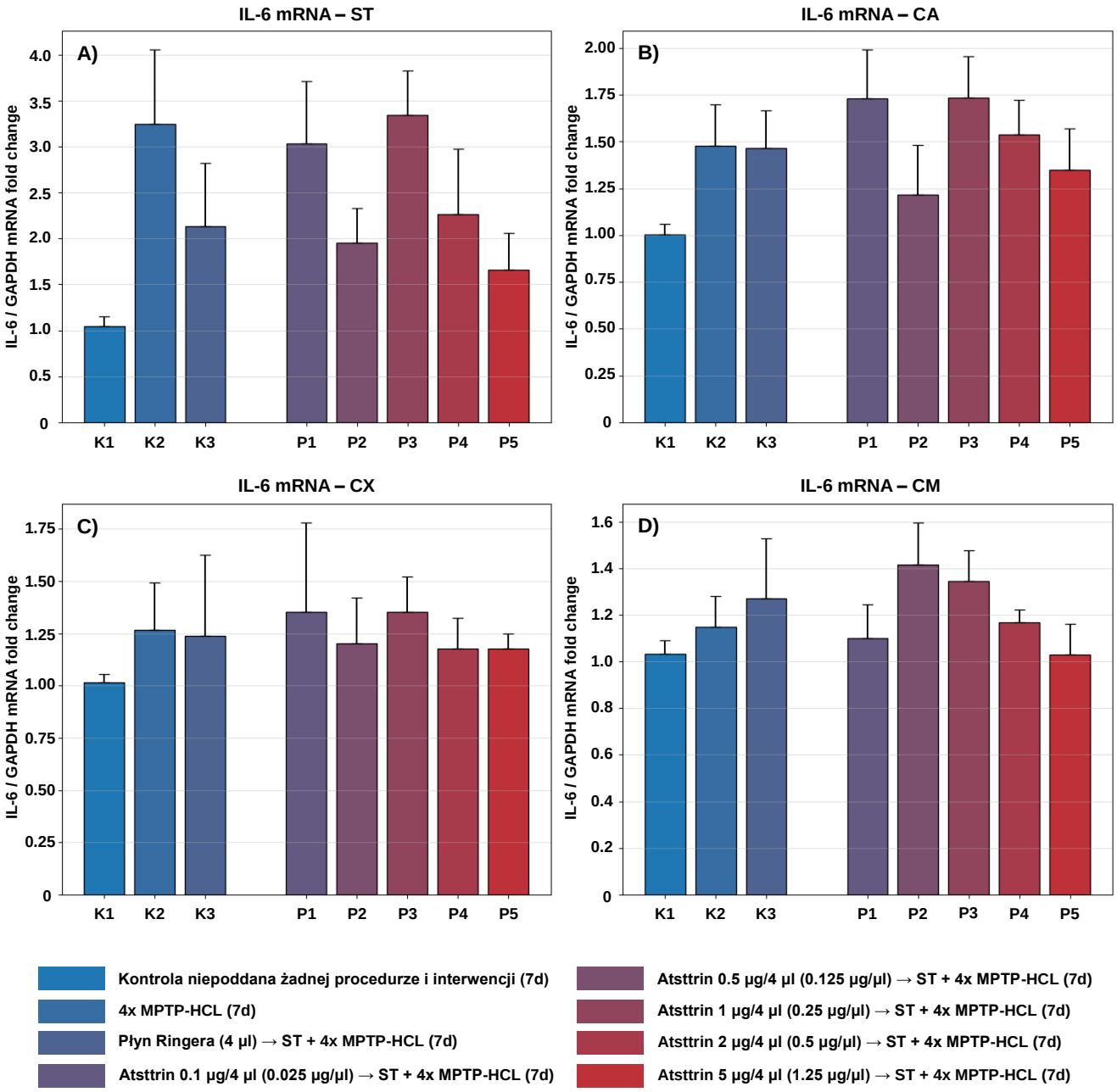
Ekspresję poziomu mRNA dla TNF-α w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 13). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0327/p=0.0465$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CA w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania kolejno wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CA. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



Rycina 13. Ekspresja genu dla TNF-α oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-6

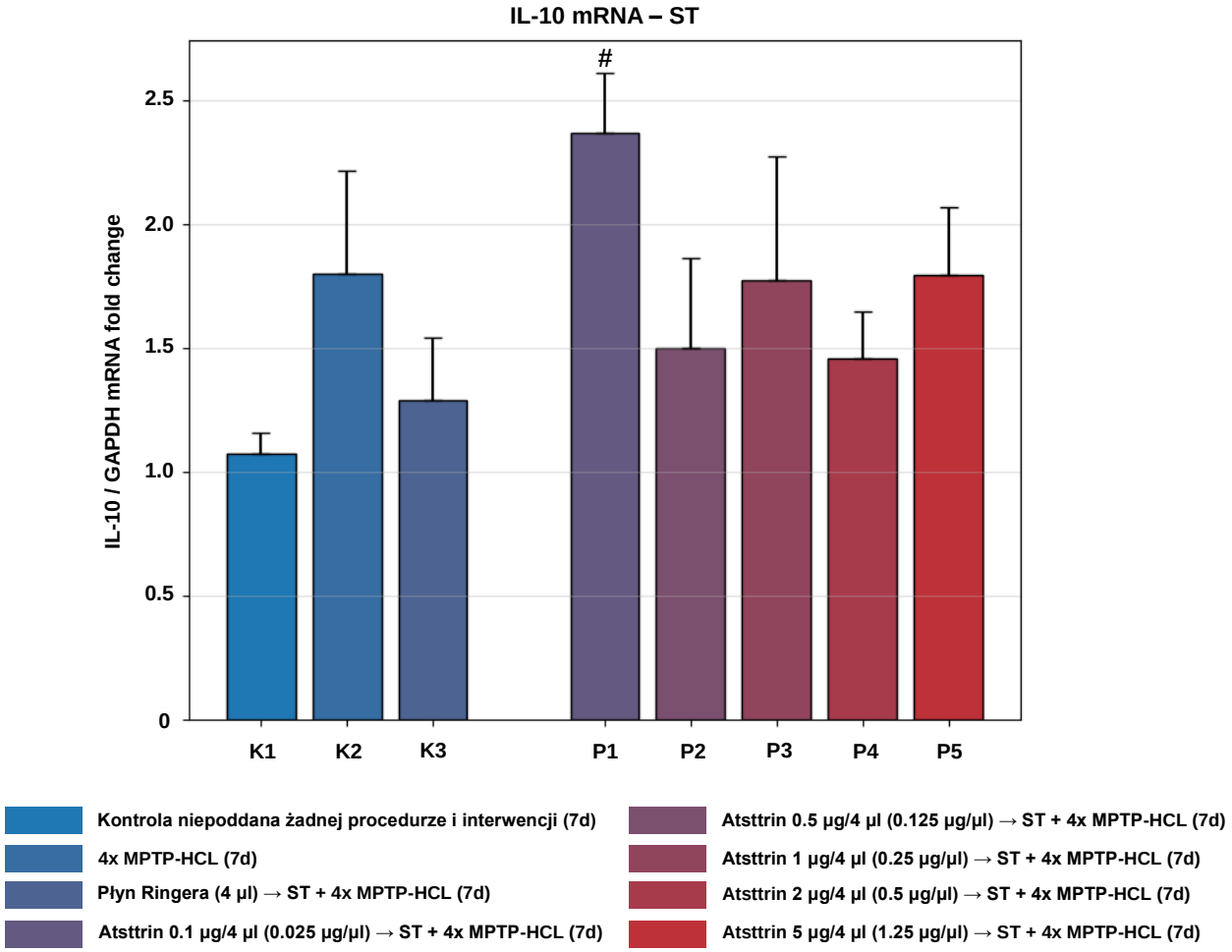
Ekspresję poziomu mRNA dla IL-6 w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 14). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie żadnej z ocenianych struktur neuroanatomicznych u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



Rycina 14. Ekspresja genu dla IL-6 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-10

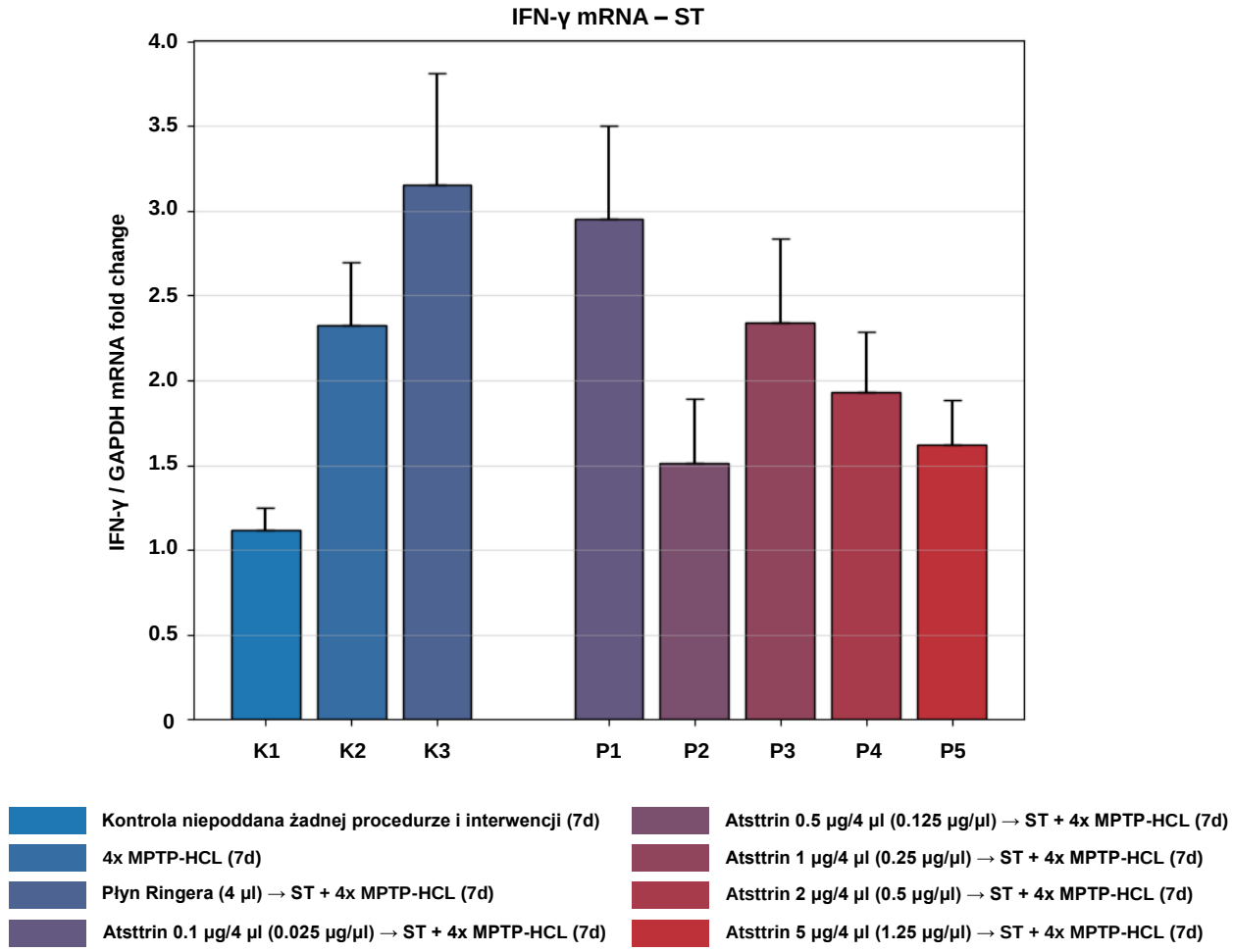
Ekspresję poziomu mRNA dla IL-10 w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 15). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0182$) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST.



Rycina 15. Ekspresja genu dla IL-10 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}p<0.05$; $^{\#\#}p<0.01$; $^{\#\#\#}p<0.001$

4.1.1.5. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IFN-γ

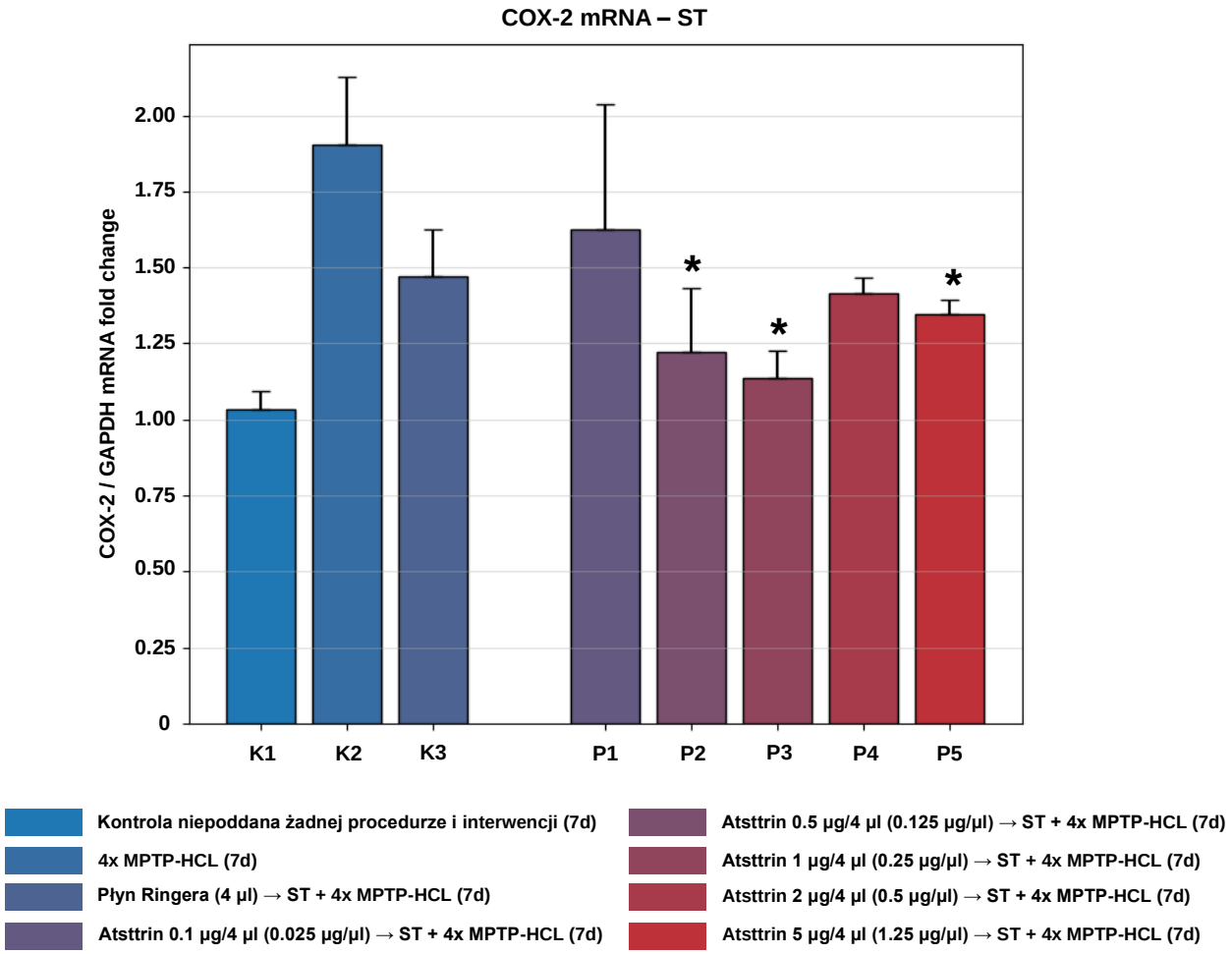
Ekspresję poziomu mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 16). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



Rycina 16. Ekspresja genu dla IFN-γ oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}p<0.05$; $^{\#\#}p<0.01$; $^{\#\#\#}p<0.001$

4.1.1.6. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla COX-2

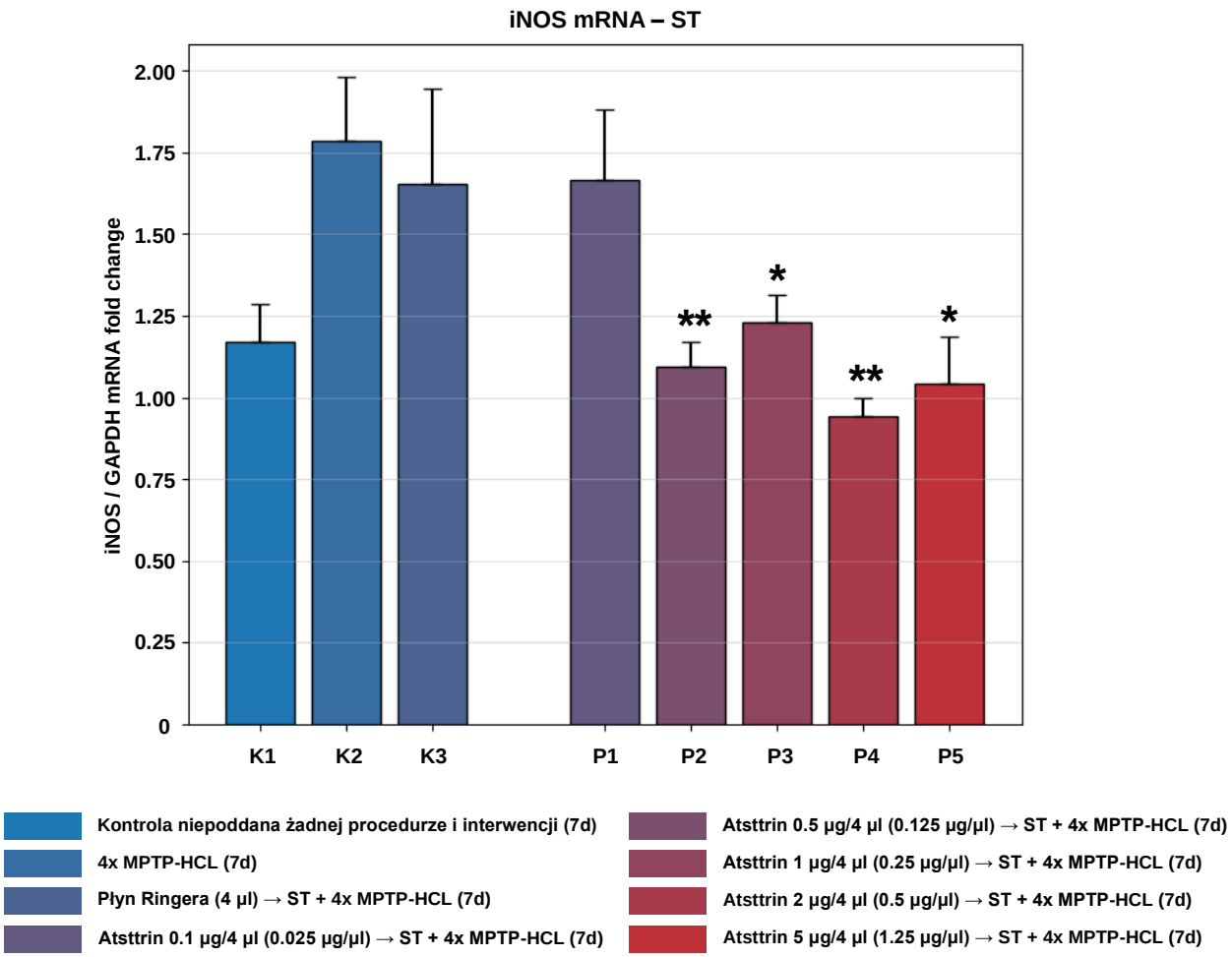
Ekspresję poziomu mRNA dla COX-2 w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 17). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2), 0.25 μg/μl (P3) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0438/p=0.0104/p=0.0400$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST w porównaniu do grup kontrolnej (K2).



Rycina 17. Ekspresja genu dla COX-2 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001

4.1.1.7. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla iNOS

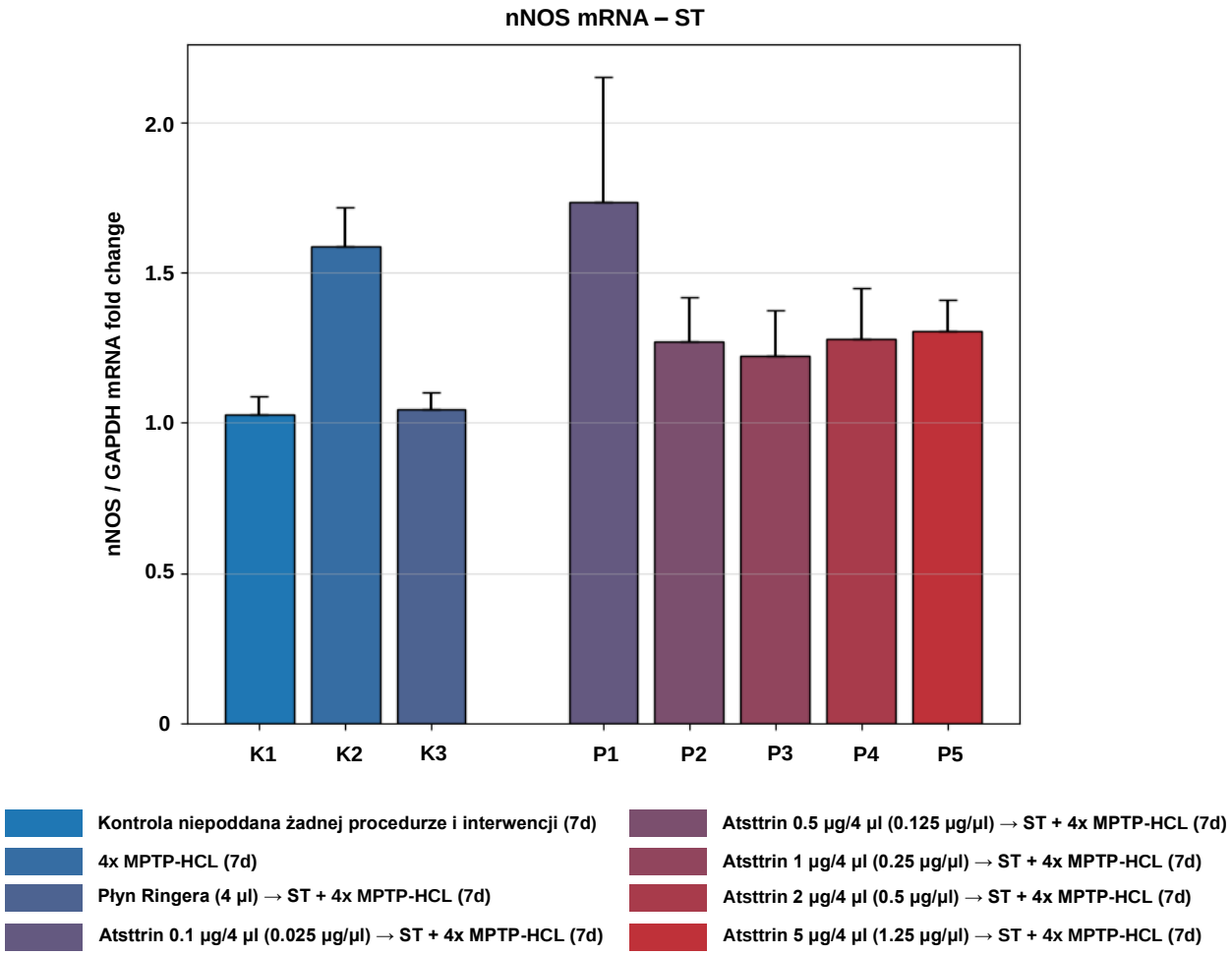
Ekspresję poziomu mRNA dla iNOS w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 18). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2), 0.25 µg/µl (P3), 0.5 µg/µl (P4) oraz 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0093/p=0.0275/p=0.0031/p=0.0102) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST w porównaniu do grup kontrolnej (K2).



Rycina 18. Ekspresja genu dla iNOS oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001

4.1.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla nNOS

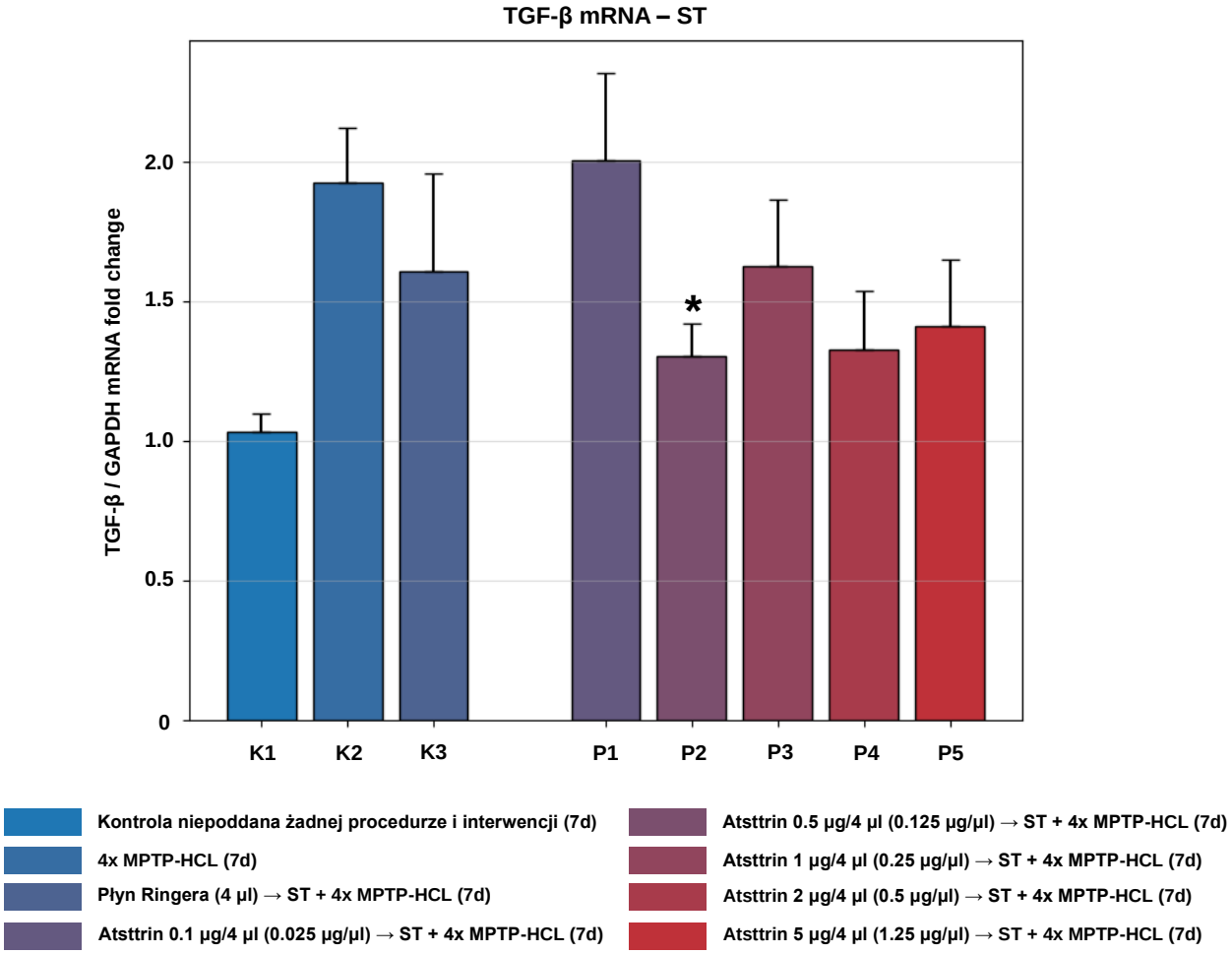
Ekspresję poziomu mRNA dla nNOS w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 19). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w żadnej z pięciu zastosowanych dawkek.



Rycina 19. Ekspresja genu dla nNOS oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001

4.1.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TGF-β

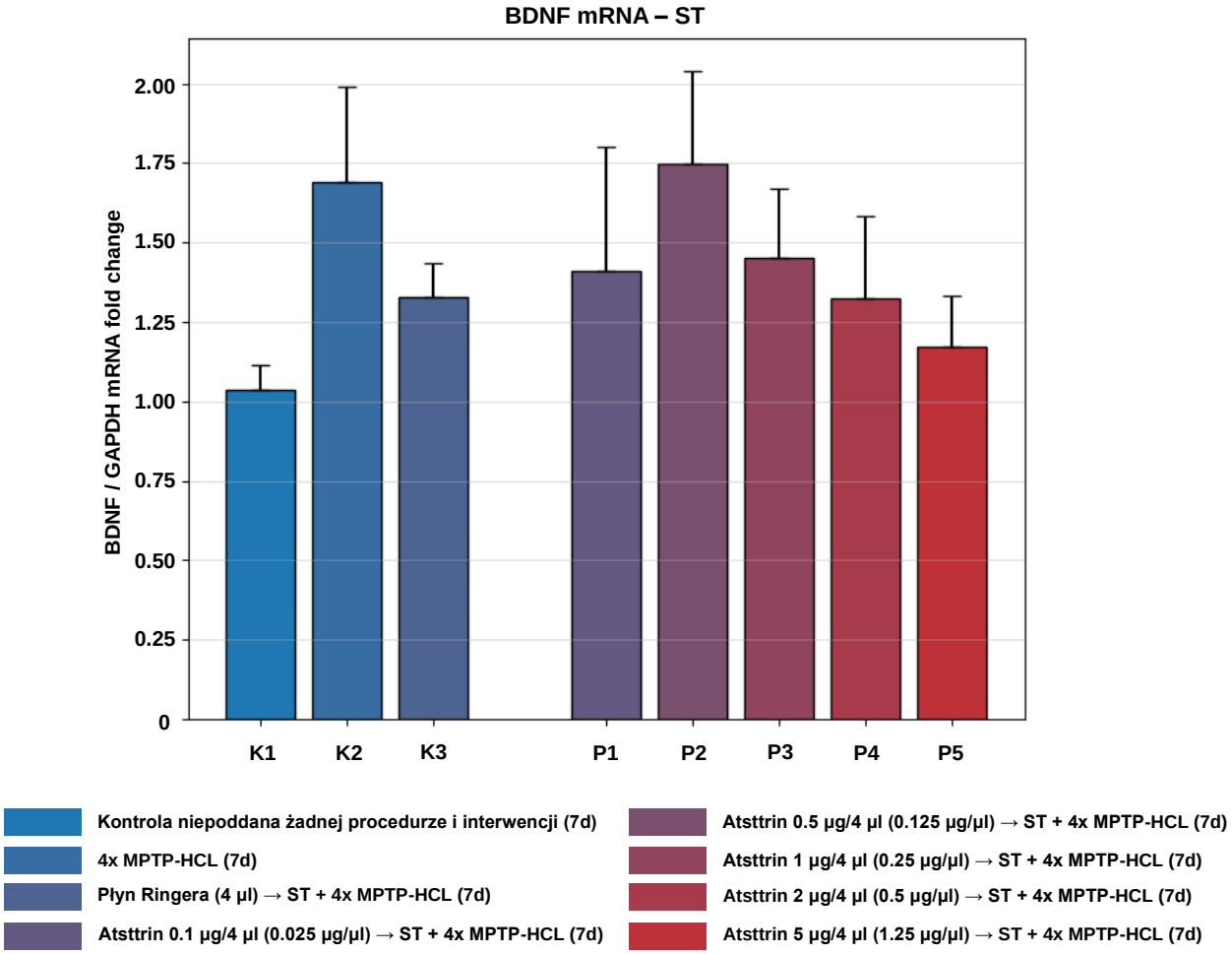
Ekspresję poziomu mRNA dla TGF-β w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 20). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0189$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższej (P1) oraz kolejno wyższych (P3-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST.



Rycina 20. Ekspresja genu dla TGF-β oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001

4.1.1.10. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla BDNF

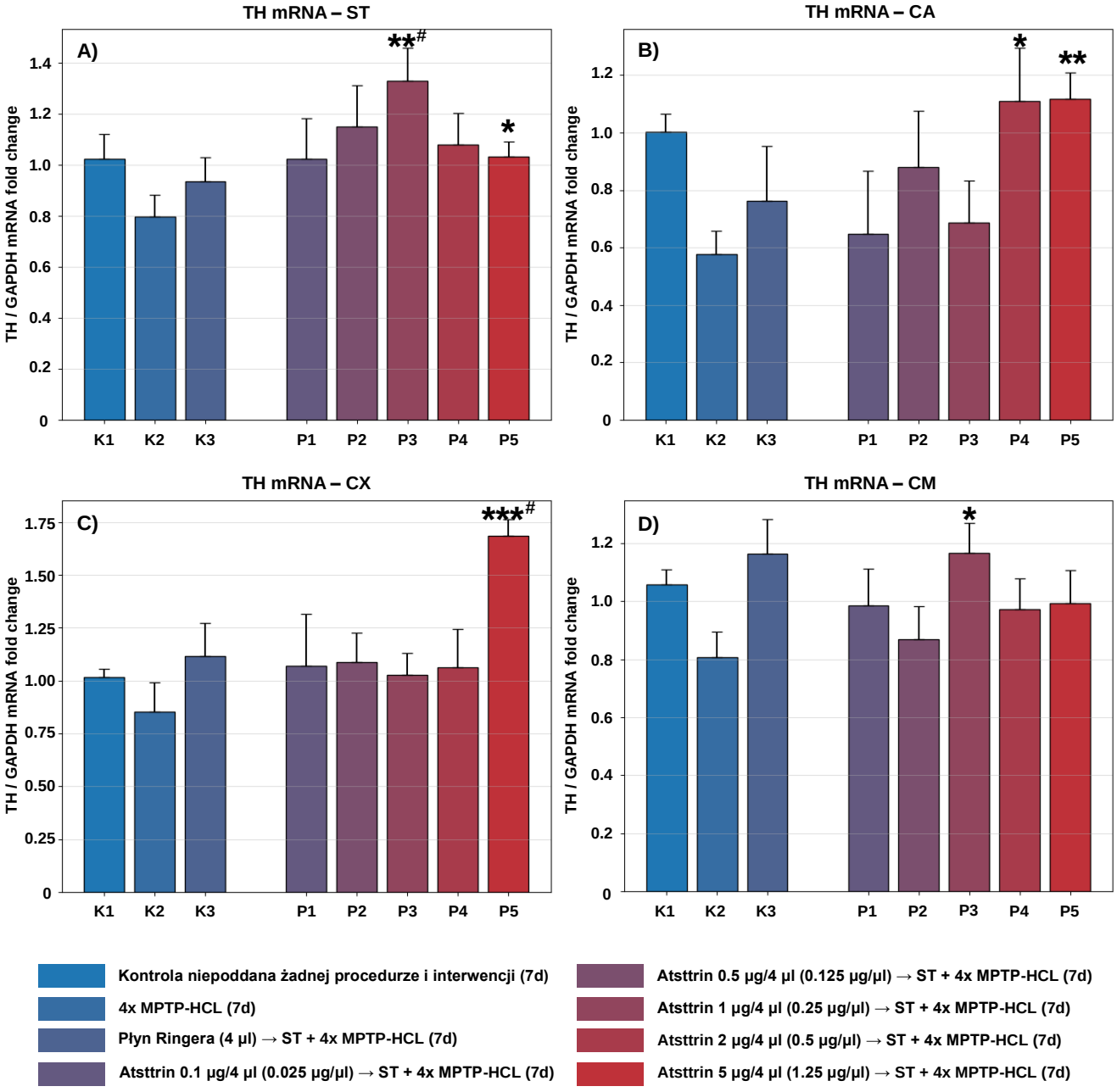
Ekspresję poziomu mRNA dla BDNF w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 21). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w żadnej z pięciu zastosowanych dawek.



Rycina 21. Ekspresja genu dla BDNF oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001

4.1.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TH

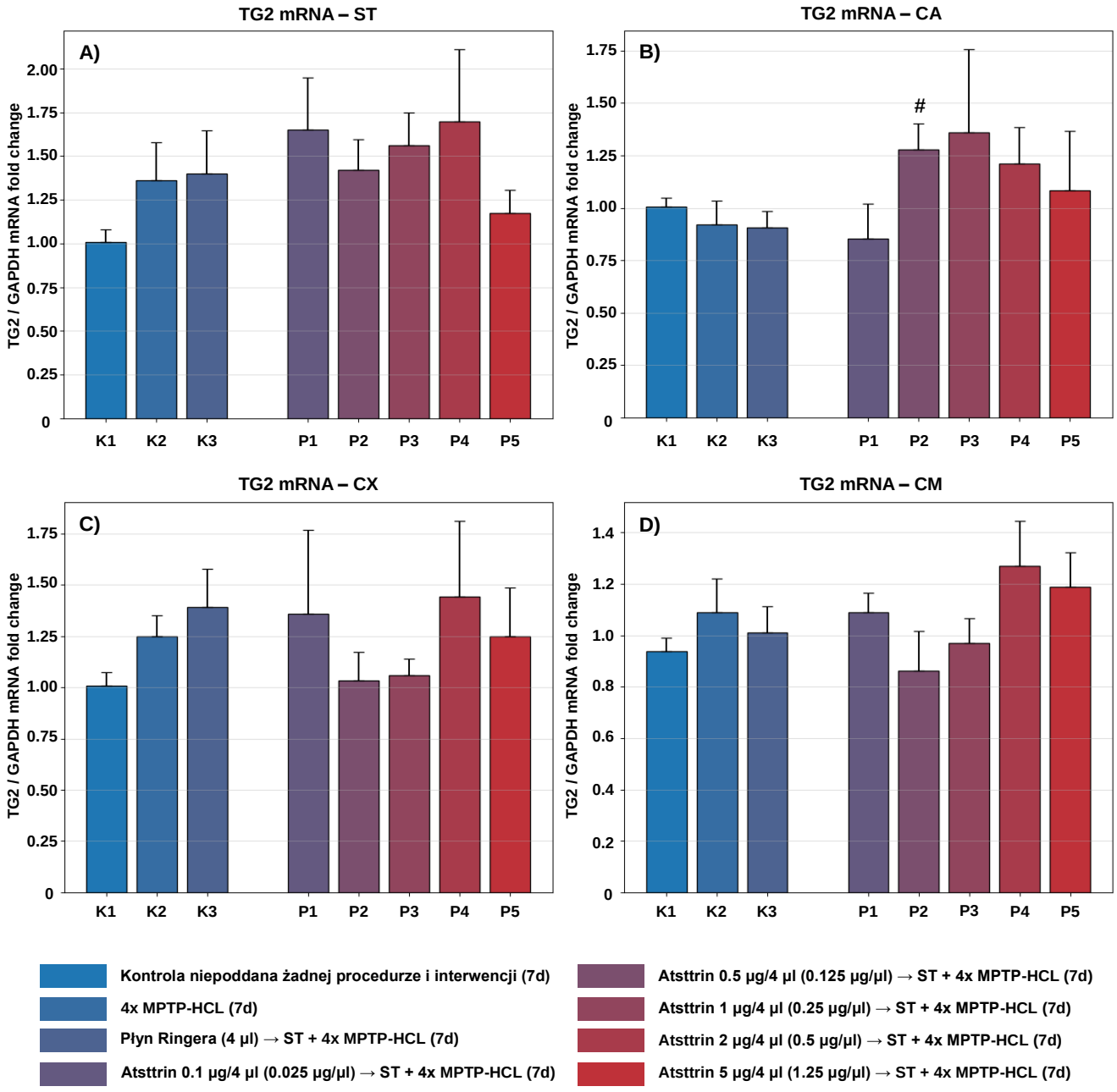
Ekspresję poziomu mRNA dla TH w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 22). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0072/p=0.0367) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie ST w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0420) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 µg/µl (P4) oraz 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0421/p=0.0010) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003/p=0.0169) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CX w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CX. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0235) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 22. Ekspresja genu dla TH oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TG2

Ekspresję poziomu mRNA dla TG2 w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 23). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w żadnej z pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0307$) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższej (P1) oraz kolejno wyższych (P3-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CA. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



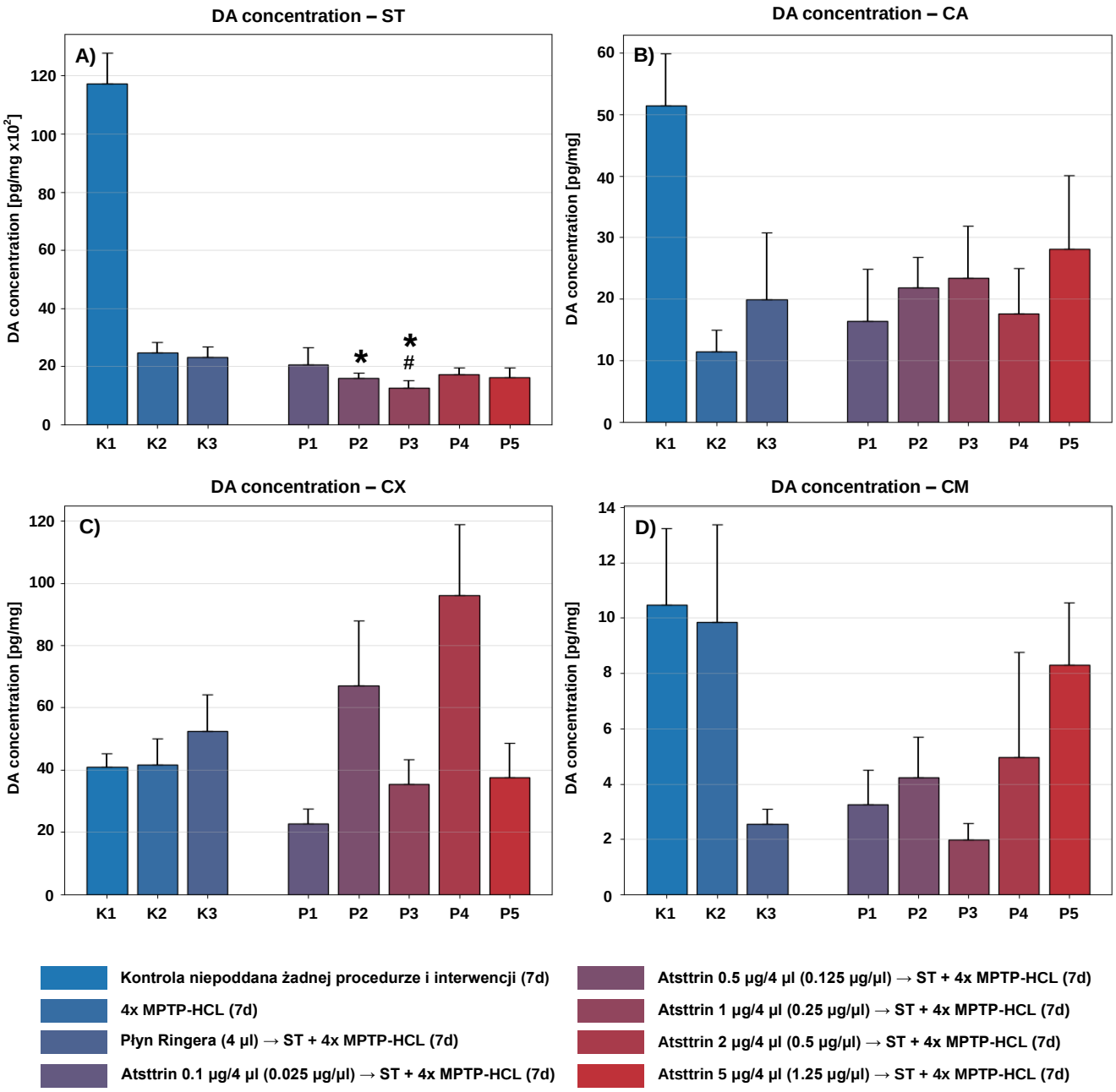
Rycina 23. Ekspresja genu dla TG2 oceniana w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2. Wpływ wzrastających dawek Atsttrin podanych do prążkowia (ST) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom stężeń wybranych neurotransmiterów u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL

4.1.2.1. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin

4.1.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DA

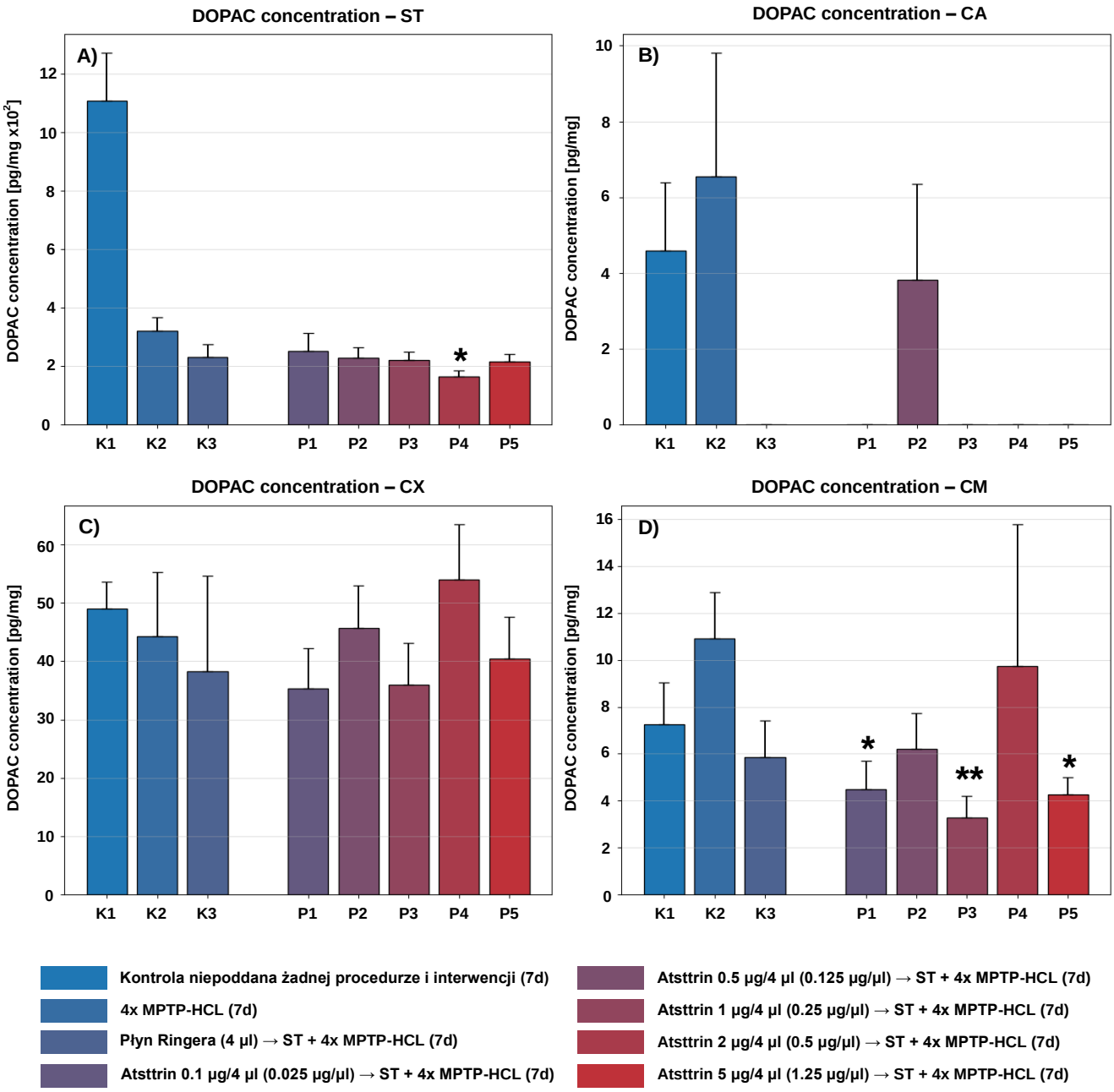
Poziom stężenia DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 24). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0481$) wzrostem poziomu stężenia DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 μg/μl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0155/p=0.0499$) wzrostem poziomu stężenia DA w obrębie ST w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężeń DA w obrębie CA, CX oraz CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w żadnej z pięciu zastosowanych dawek.



Rycina 24. Zmiany stężenia DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DOPAC

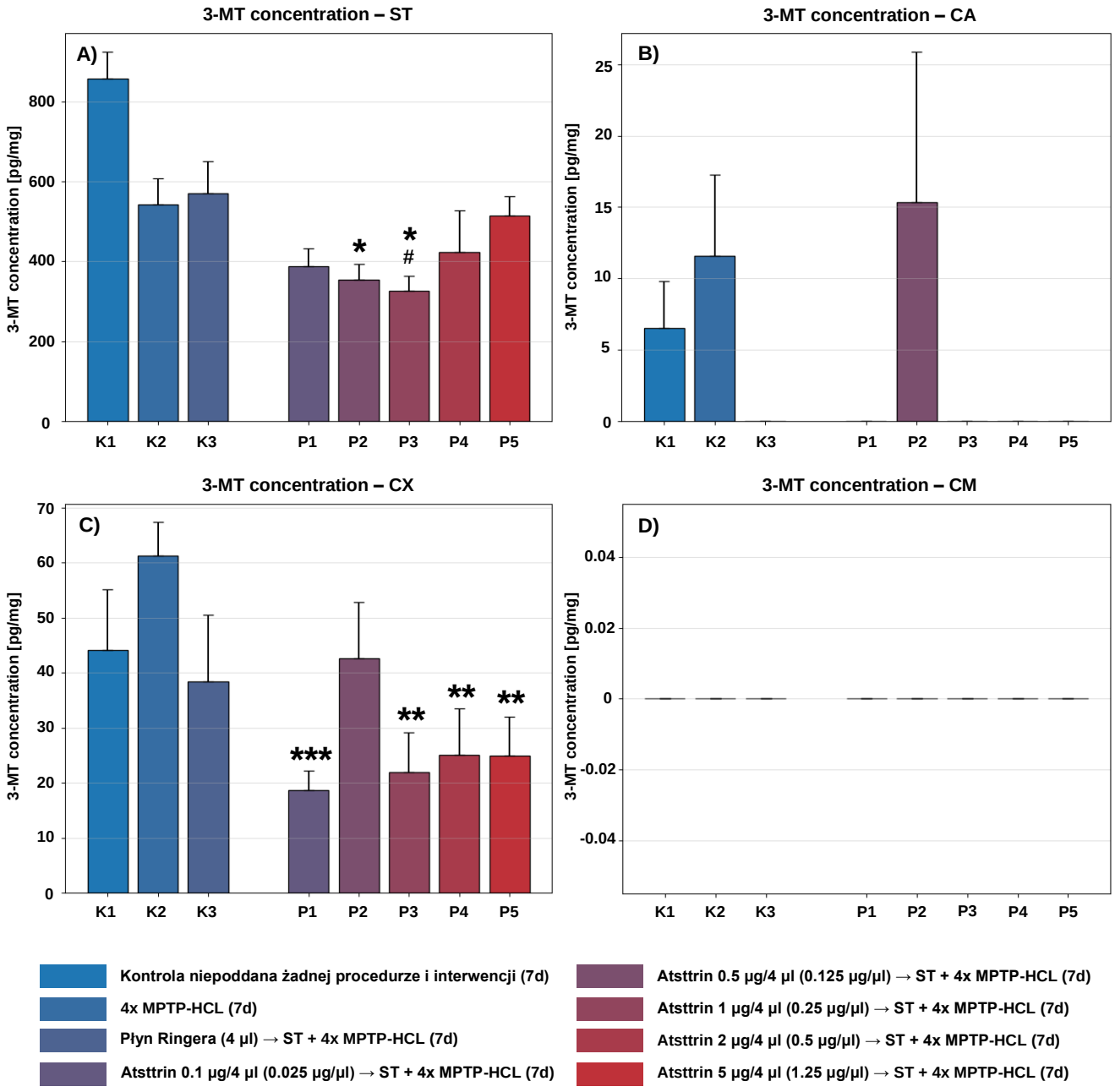
Poziom stężenia DOPAC w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 25). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia DOPAC w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0148$) spadkiem poziomu stężenia DOPAC w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższej (P5) oraz kolejno niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia DOPAC w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1), 0.25 μg/μl (P3) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0193$/$p=0.0057$/$p=0.0116$) spadkiem poziomu stężenia DOPAC w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 25. Zmiany stężenia DOPAC oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 3-MT

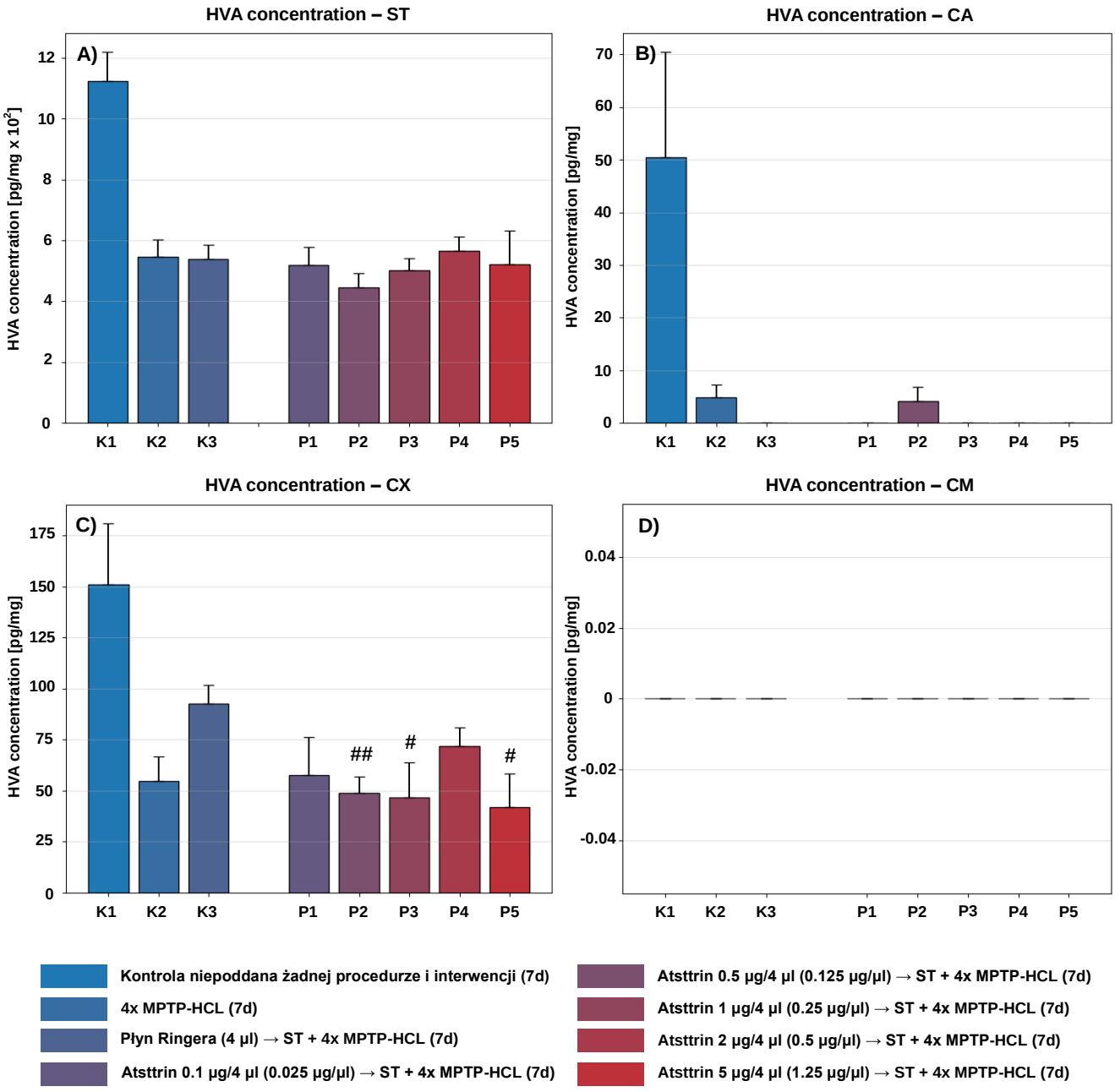
Poziom stężenia 3-MT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 26). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanymi średnimi wzrostami lub spadkami poziomu stężenia 3-MT w zależności od ocenianej struktury neuroanatomicznej wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) oraz 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0311/p=0.0157) spadkiem poziomu stężenia 3-MT w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0348) spadkiem poziomu stężenia 3-MT w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 µg/µl (P1), 0.25 µg/µl (P3), 0.5 µg/µl (P4) oraz 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0001/p=0.0017/p=0.0085/p=0.0024) spadkiem poziomu stężenia 3-MT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CM, u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia 3-MT w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.



Rycina 26. Zmiany stężenia 3-MT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HVA

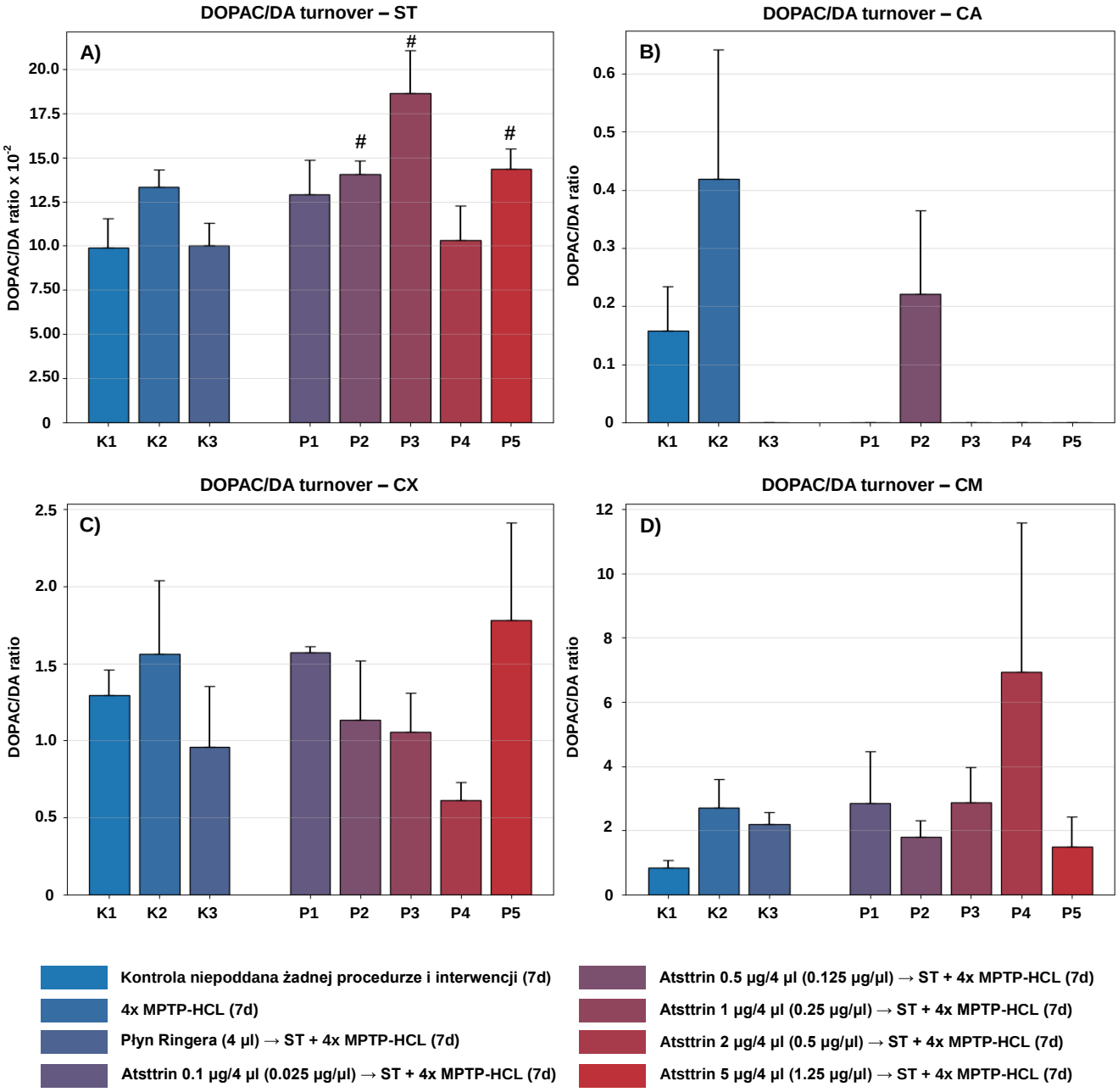
Poziom stężenia HVA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 27). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia HVA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych staty stycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2), 0.25 μg/μl (P3) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0060/p=0.0472/p=0.0284$) spadkiem poziomu stężenia HVA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CM, u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia HVA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.



Rycina 27. Zmiany stężenia HVA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.5. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia DOPAC/DA

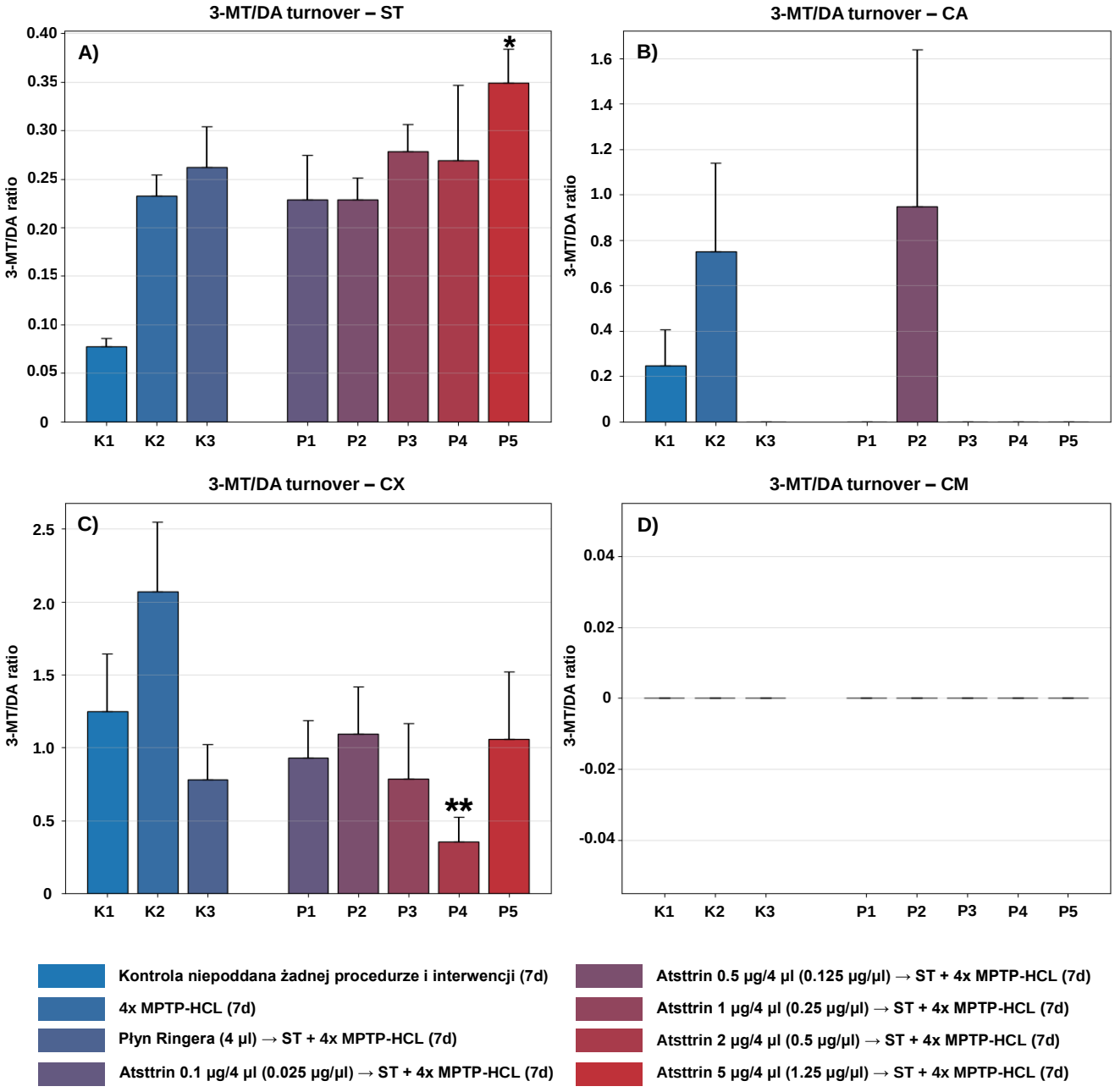
Poziom obrotów DOPAC/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 28). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2), 0.25 µg/µl (P3) oraz 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0323/p=0.0148/p=0.0346$) wzrostem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



Rycina 28. Zmiany obrotów DOPAC/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.6. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 3-MT/DA

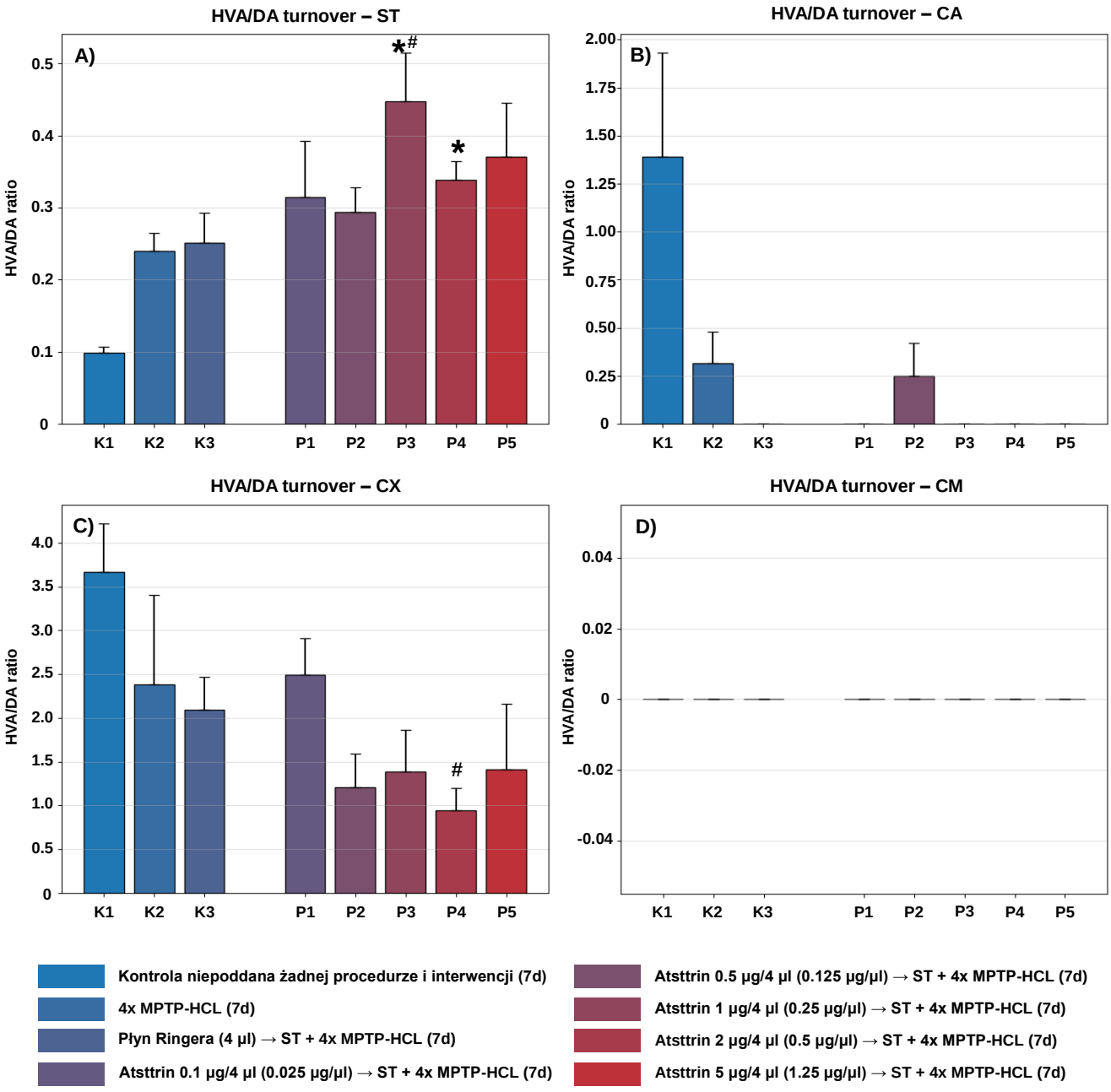
Poziom obrotów 3-MT/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 29). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0206$) wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0087$) wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższej (P5) oraz niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie CX. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów 3-MT/DA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.



Rycina 29. Zmiany obrotów 3-MT/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.7. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia HVA/DA

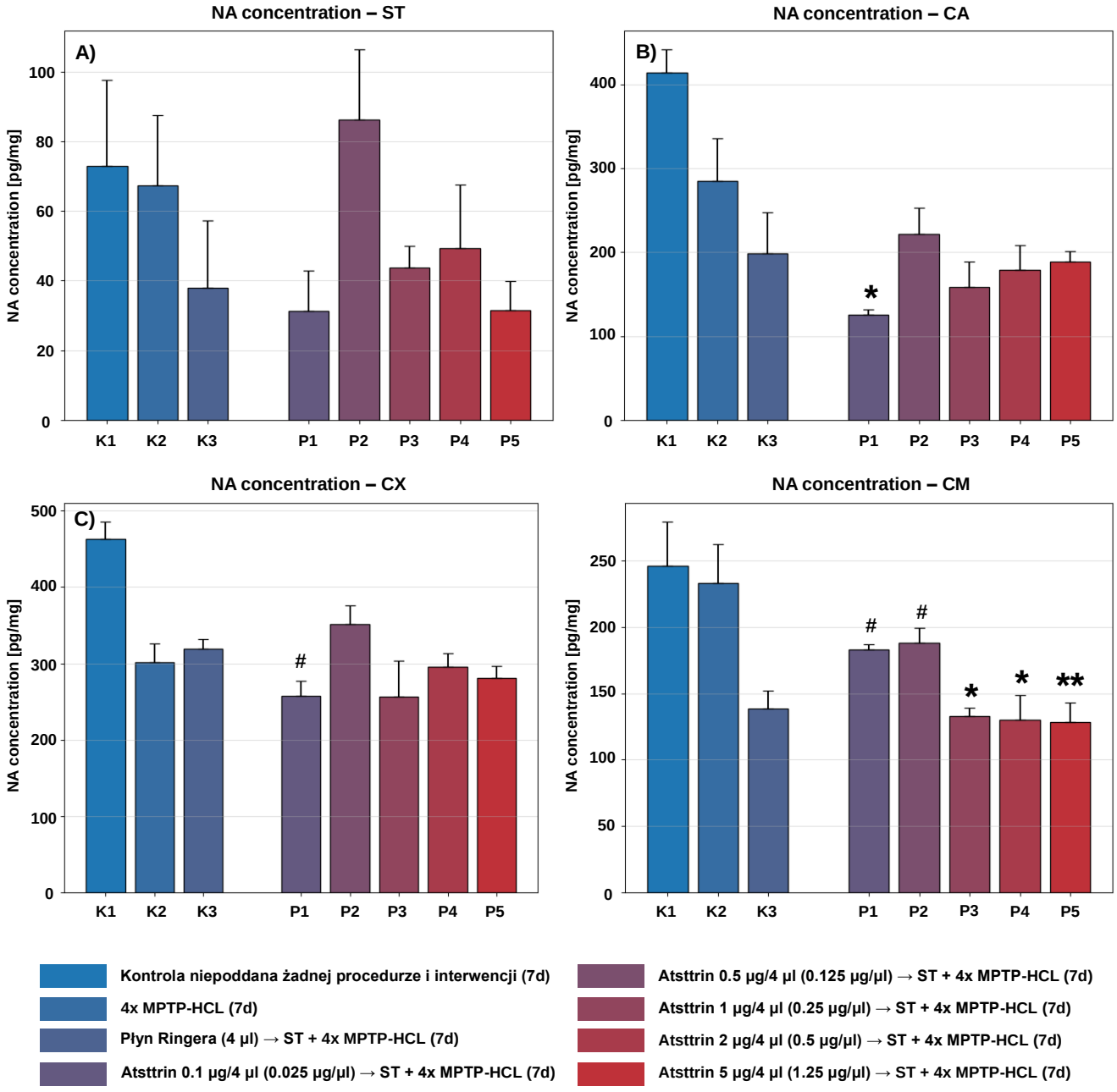
Poziom obrotów HVA/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 30). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanymi średnimi wzrostami lub spadkami poziomu obrotów HVA/DA w zależności od ocenianej struktury neuroanatomicznej wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) oraz 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0259/p=0.0222) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0381) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0411) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższej (P5) oraz niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu obrotów HVA/DA w obrębie CX. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów HVA/DA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego



Rycina 30. Zmiany obrotów HVA/DA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia NA

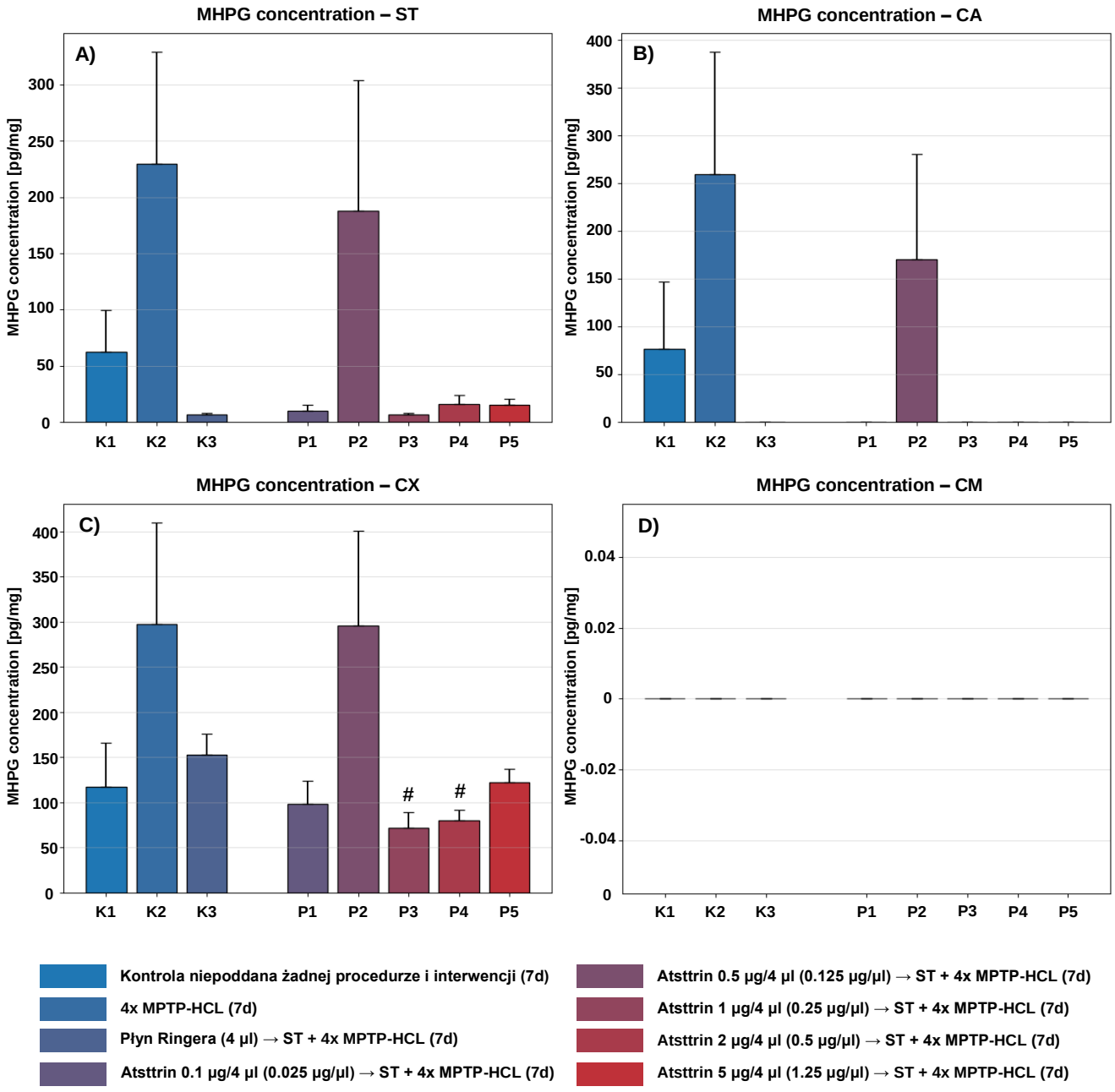
Poziom stężenia NA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 31). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0156$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia NA w obrębie CA. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0427$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia NA w obrębie CX. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 μg/μl (P3), 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0103$/$p=0.0127$/$p=0.0091$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) oraz 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0274$/$p=0.0211$) wzrostem poziomu stężenia NA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3).



Rycina 31. Zmiany stężenia NA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia MHPG

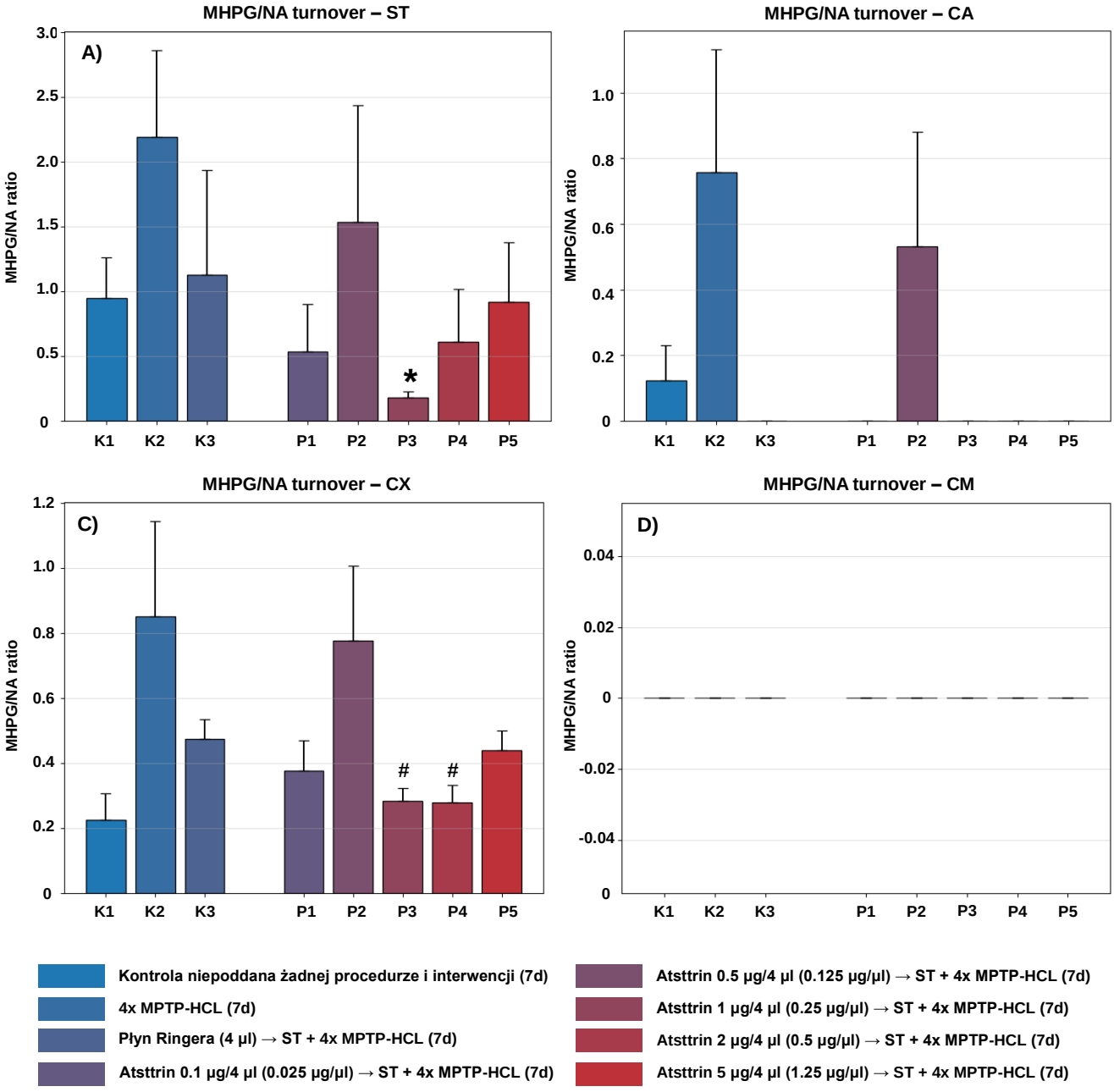
Poziom stężenia MHPG w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 32). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia NA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie ST, u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) oraz 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0237/p=0.0307$) spadkiem poziomu stężenia MHPG w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CM, u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia MHPG w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.



Rycina 32. Zmiany stężenia MHPG oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.10. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia MHPG/NA

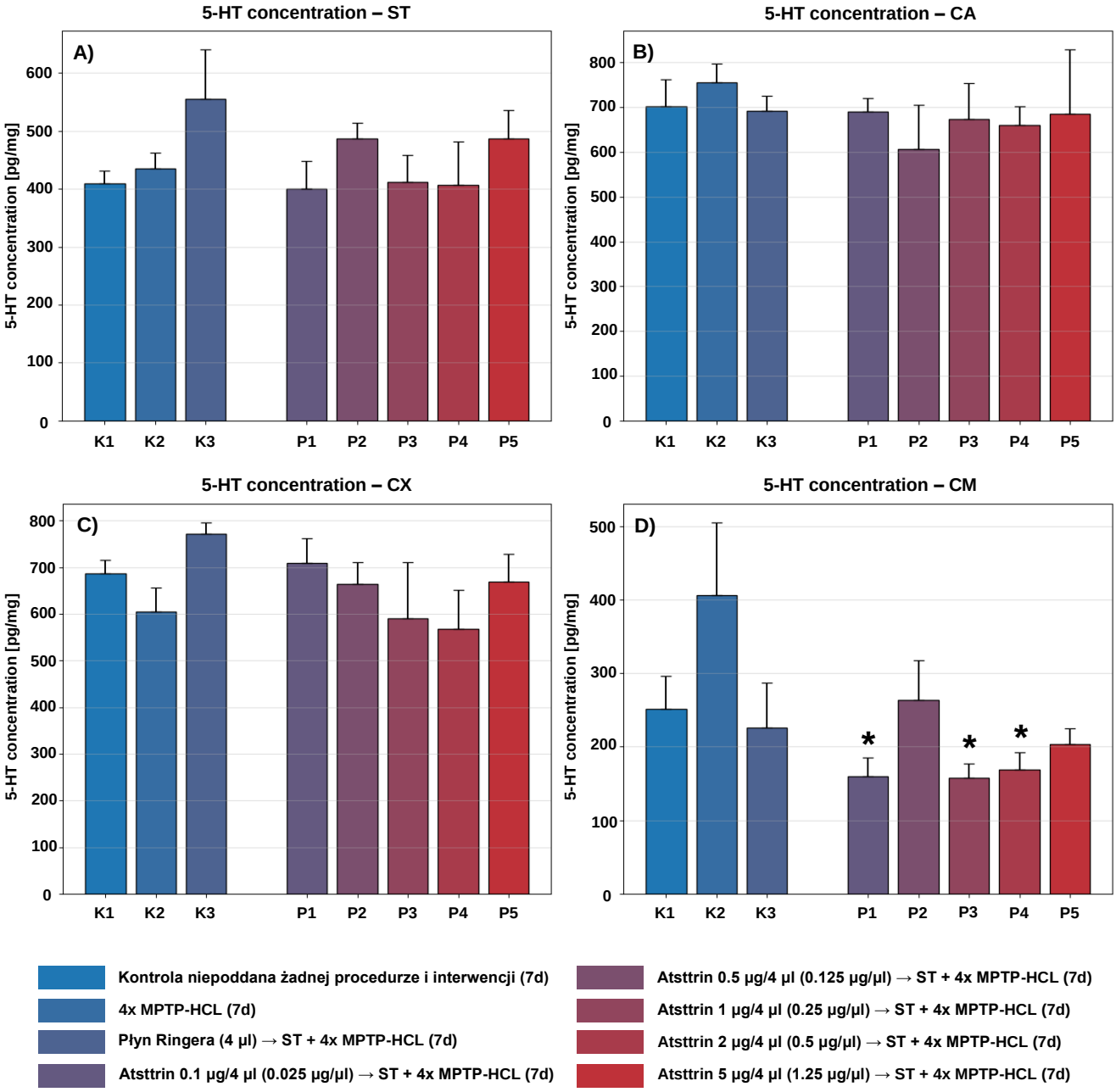
Poziom obrotów MHPG/NA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 33). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0191$) spadkiem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P2) oraz wyższych (P4-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 µg/µl (P3) oraz 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0353/p=0.0434$) spadkiem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów MHPG/NA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.



Rycina 33. Zmiany obrotów MHPG/NA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HT

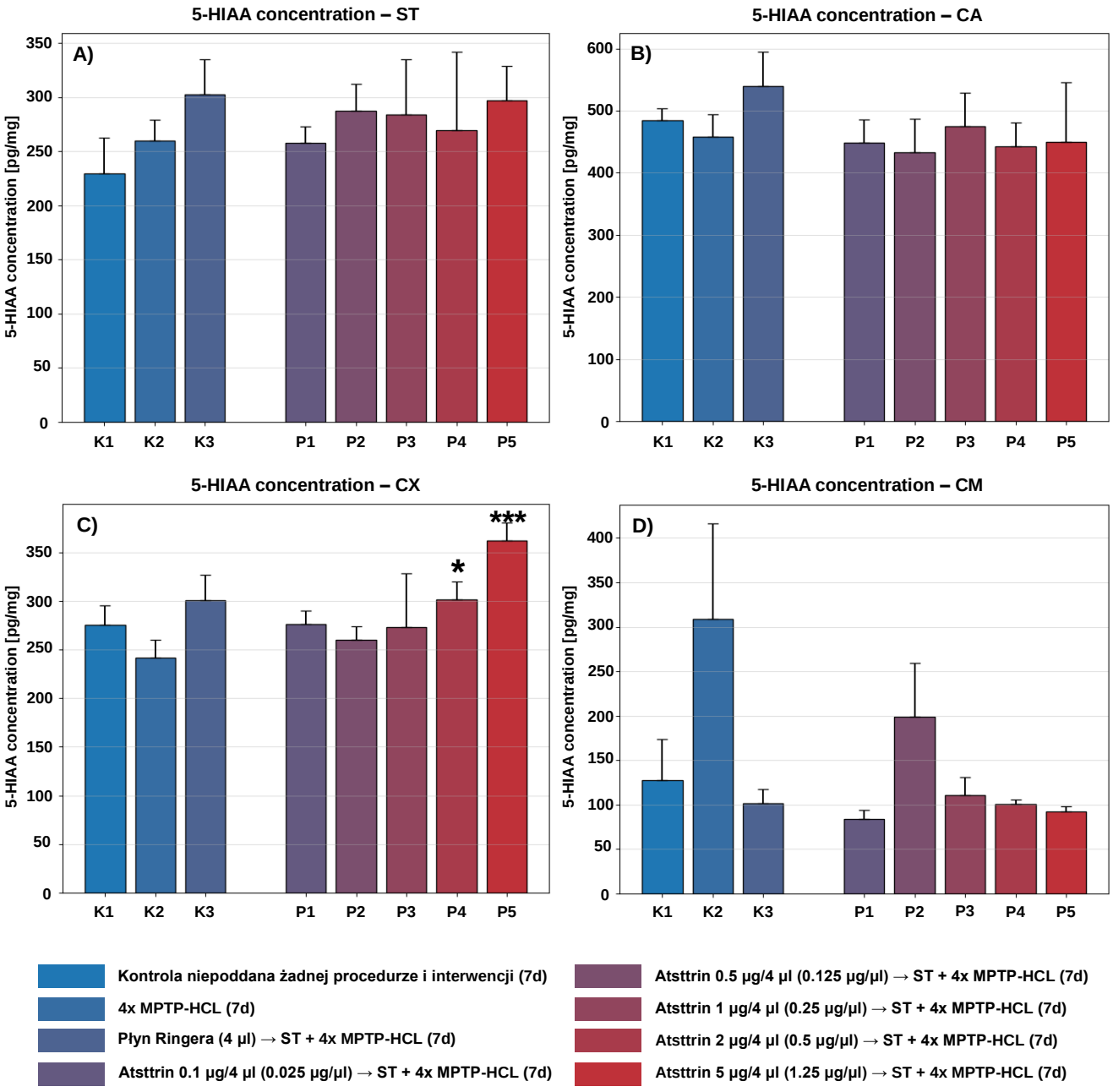
Poziom stężenia 5-HT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 34). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia 5-HT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie ST, CA oraz CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 µg/µl (P1), 0.25 µg/µl (P3) oraz 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0420/p=0.0400/p=0.0480$) spadkiem poziomu stężenia 5-HT w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 34. Zmiany stężenia 5-HT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HIAA

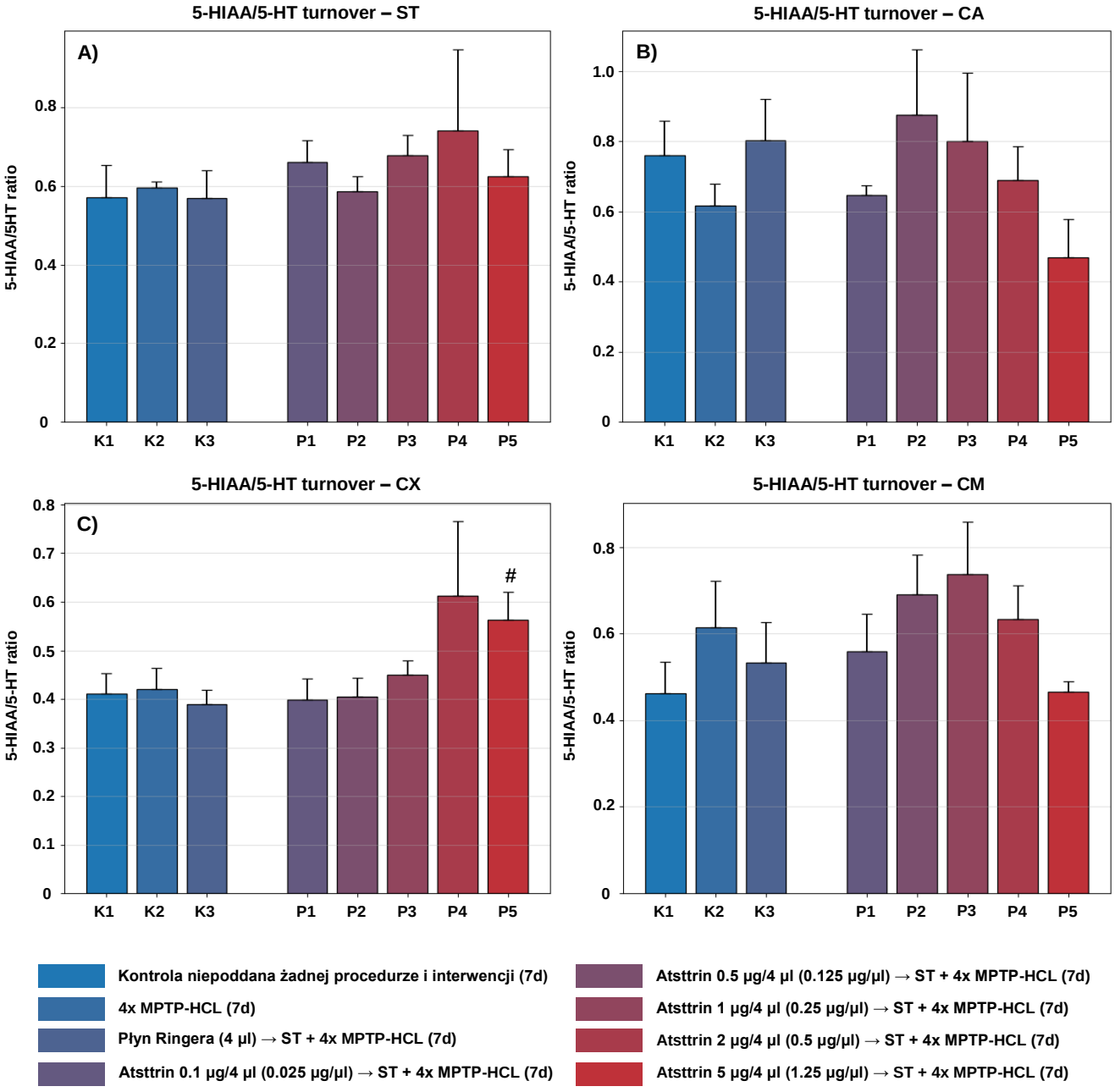
Poziom stężenia 5-HIAA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 35). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0406/p=0.0007$) wzrostem poziomu stężenia 5-HT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.



Rycina 35. Zmiany stężenia 5-HIAA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.1.13. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 5-HIAA/5-HT

Poziom obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 36). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0289$) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach.

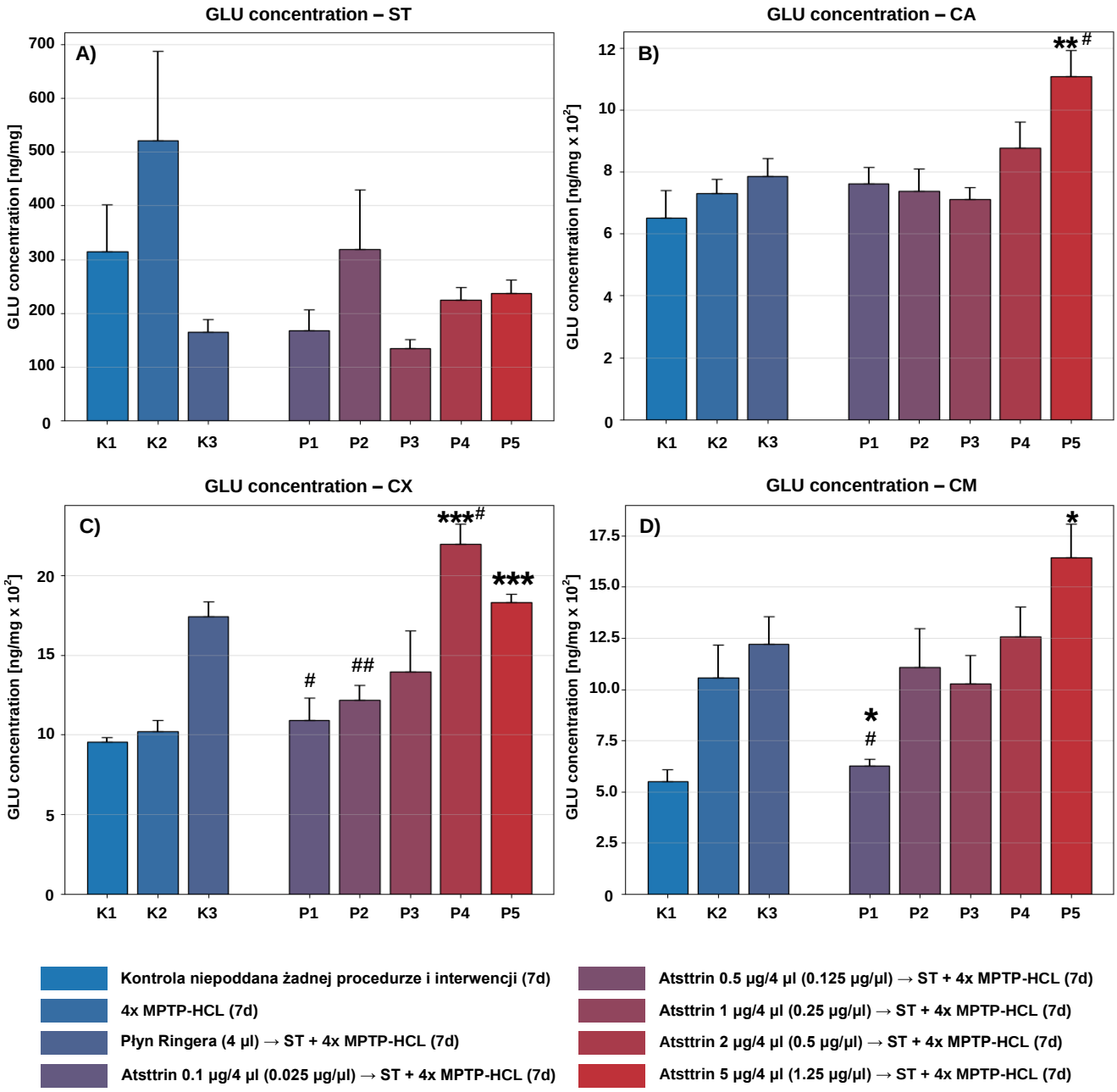


Rycina 36. Zmiany obrotów 5-HIAA/5-HT oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń aminokwasów

4.1.2.2.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GLU

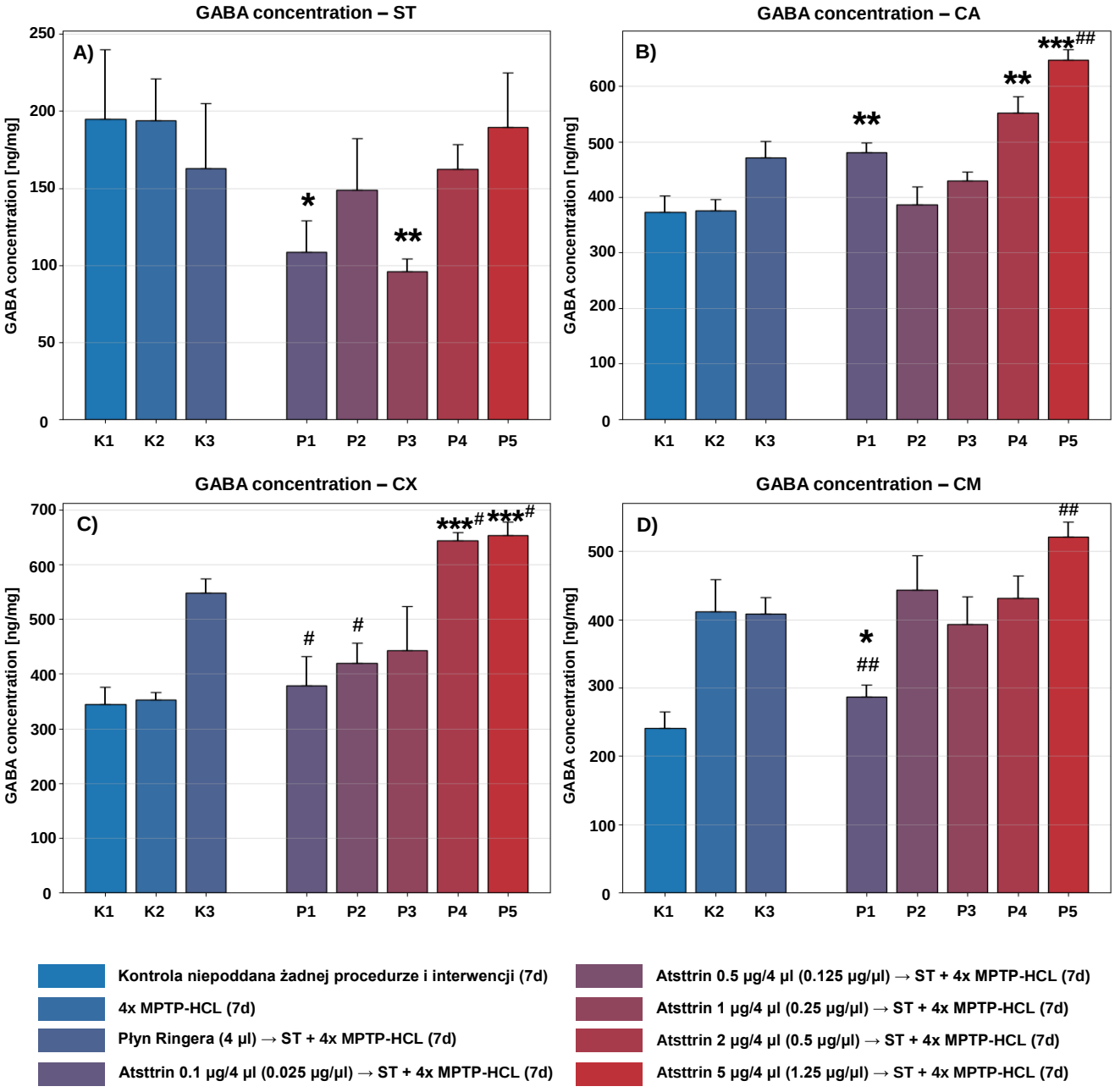
Poziom stężenia GLU w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 37). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0046/p=0.0130$) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CA w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia GLU w obrębie CA. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.000126/p=0.0000006$) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0311081/p=0.0102954$) spadkiem poziomu stężenia GLU w obrębie CM w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Przeciwstawnie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie $p=0.0258802$) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 37. Zmiany stężenia GLU oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GABA

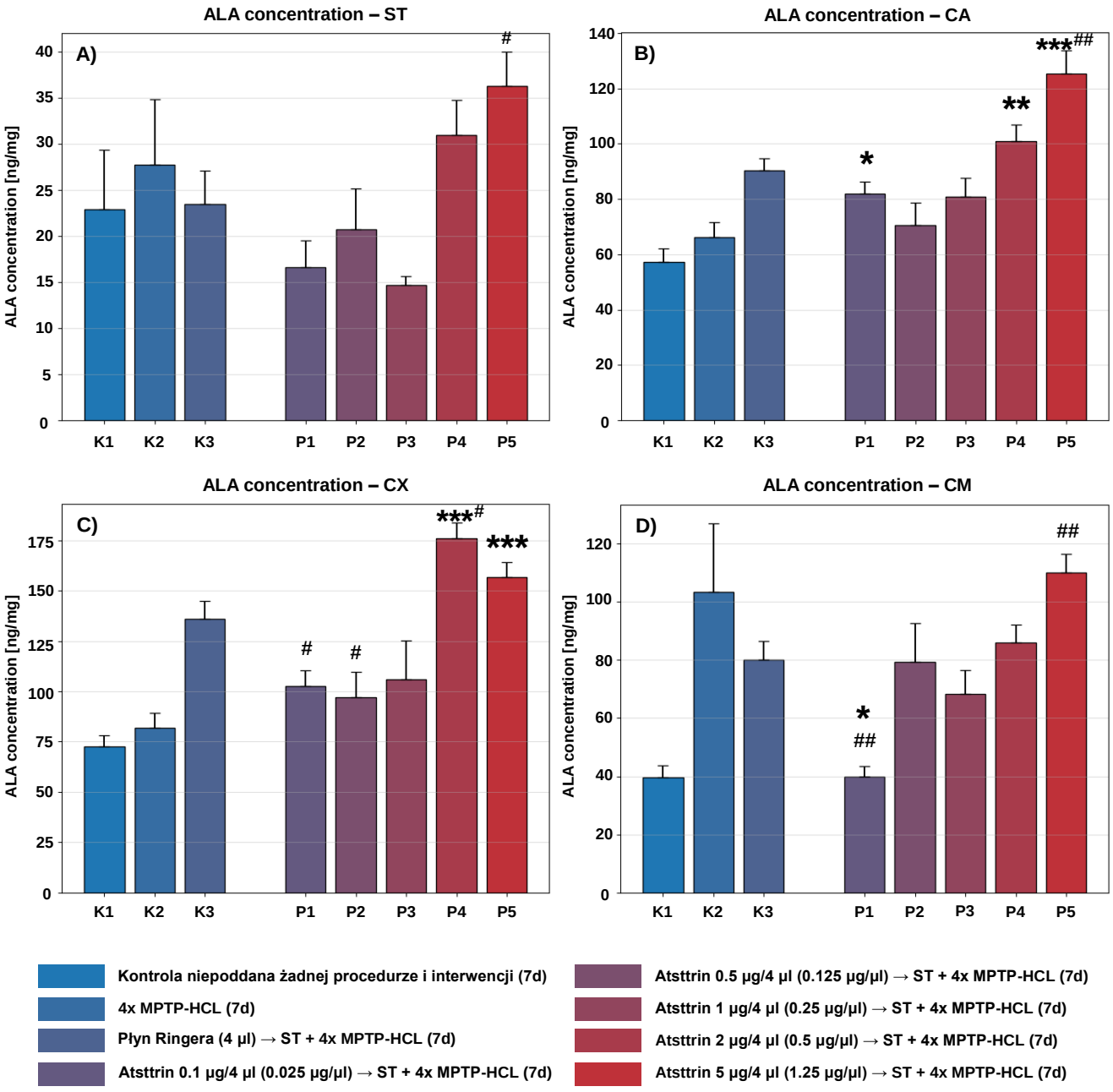
Poziom stężenia GABA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 38). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie większosci ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) oraz 0.25 μg/μl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0316689/p=0.0087248) spadkiem poziomu stężenia GABA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1), 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0033740/p=0.0015291/p=0.0000004) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0014362) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000001/0.000007) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0167033/p=0.0171644) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Przeciwstawnie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) oraz 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0388106/p=0.0171399) spadkiem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0311081/p=0.0102954) spadkiem poziomu stężenia GABA w obrębie CM w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0258802) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3).



Rycina 38. Zmiany stężenia GABA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ALA

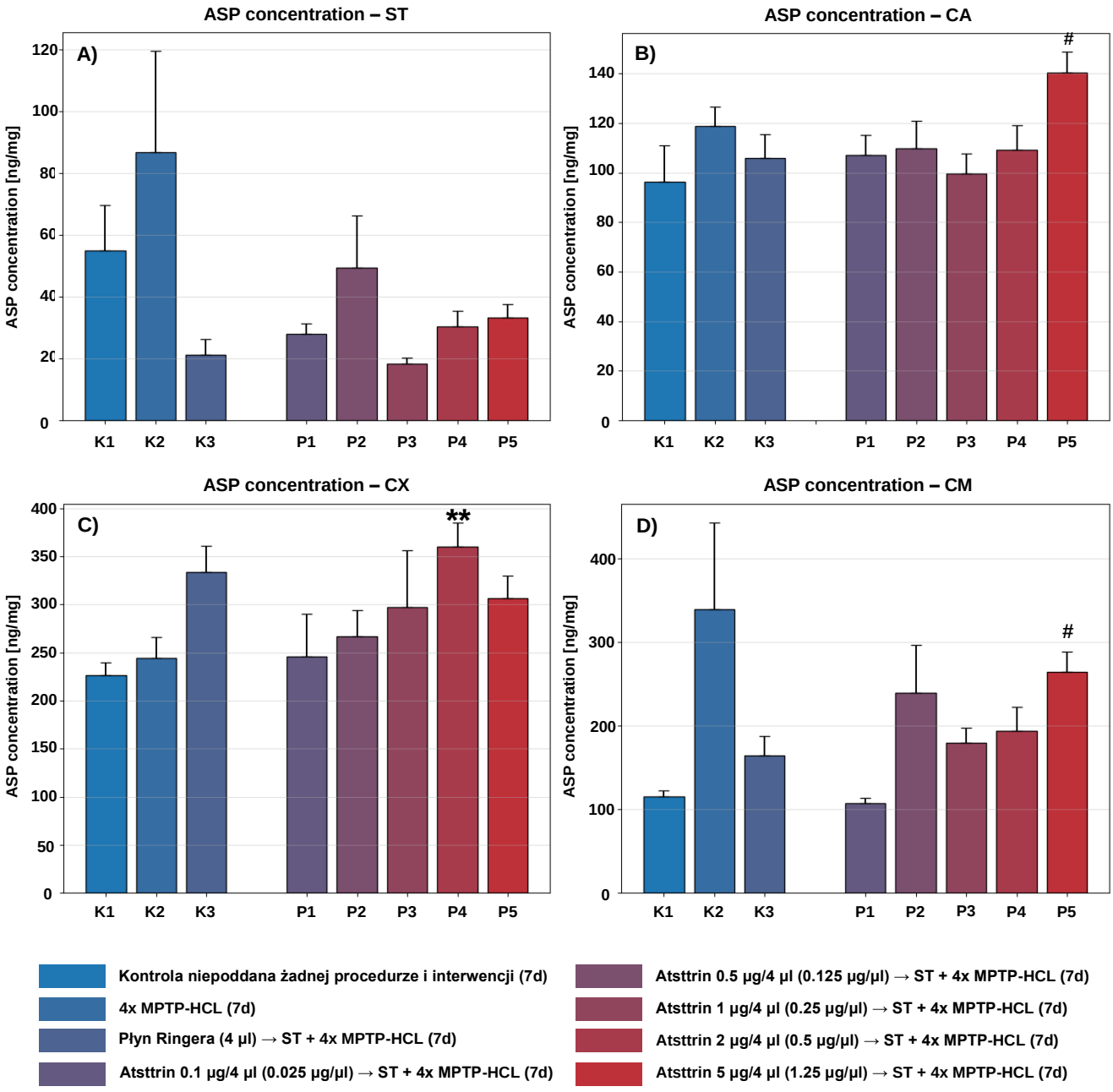
Poziom stężenia ALA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 39). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0361044) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia ALA w obrębie ST. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1), 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0479320/p=0.0018012/p=0.0002280) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0070253) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000006/p=0.0000001) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) oraz 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0260195/p=0.0296518) spadkiem poziomu stężenia ALA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Przeciwstawnie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0100749) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0321279/p=0.0014595) spadkiem poziomu stężenia ALA w obrębie CM w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K3). Przeciwstawnie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0087789) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3).



Rycina 39. Zmiany stężenia ALA oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ASP

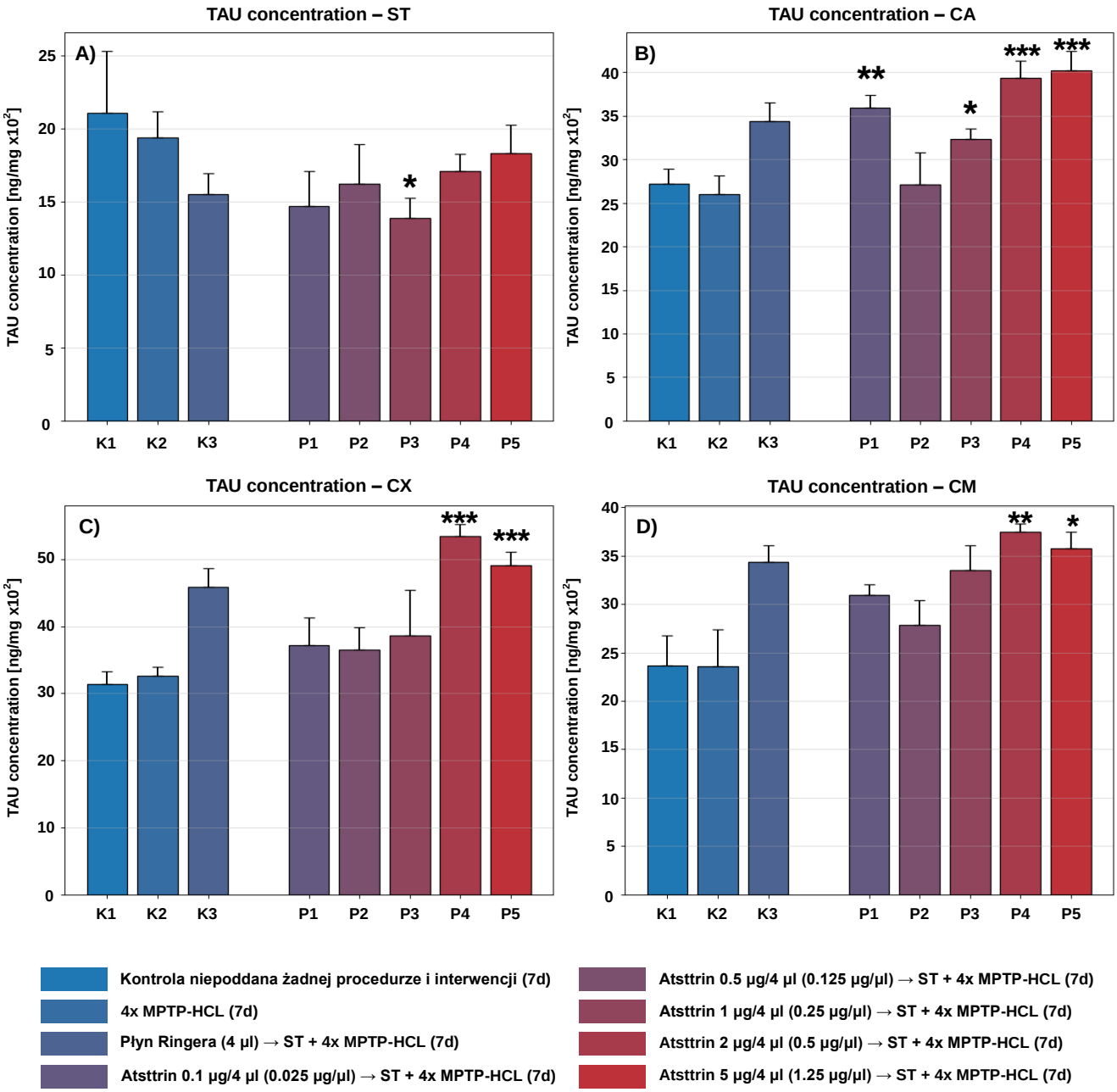
Poziom stężenia ASP w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 40). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0257864$) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia ASP w obrębie CA. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 µg/µl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0064001$) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższej (P5) oraz niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia ASP w obrębie CX. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 µg/µl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0163601$) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P4) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia ASP w obrębie CM.



Rycina 40. Zmiany stężenia ASP oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.5. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia TAU

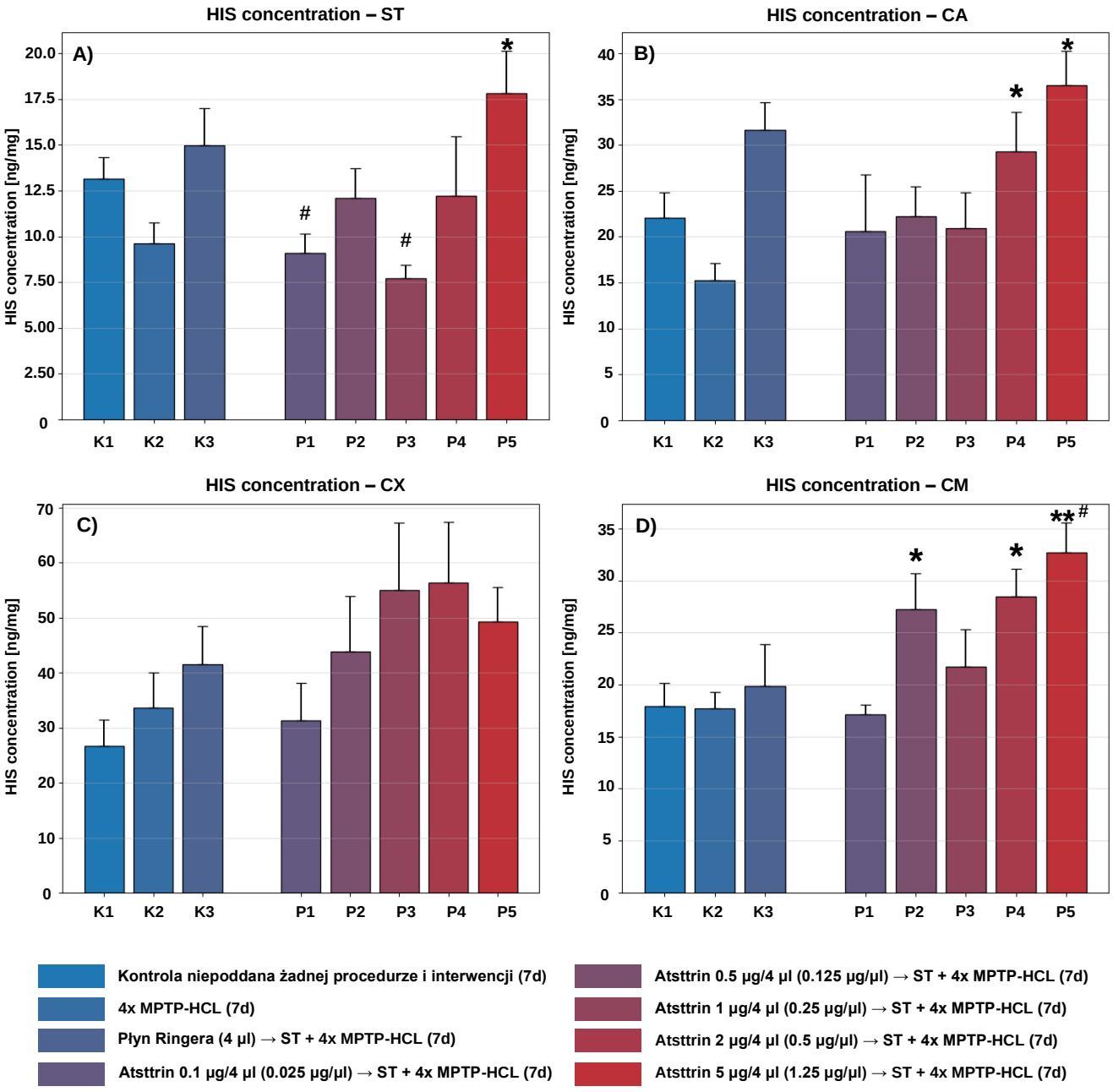
Poziom stężenia TAU w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 41). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.25 μg/μl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0305806) spadkiem poziomu stężenia TAU w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P2) oraz wyższych (P4-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia TAU w obrębie ST. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1), 0.25 μg/μl (P3), 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0028696/p=0.0257991/p=0.0008178/p=0.0006006) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.00001/p=0.00005) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia TAU w obrębie CX. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0079357/p=0.0157874) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia TAU w obrębie CM.



Rycina 41. Zmiany stężenia TAU oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.6. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HIS

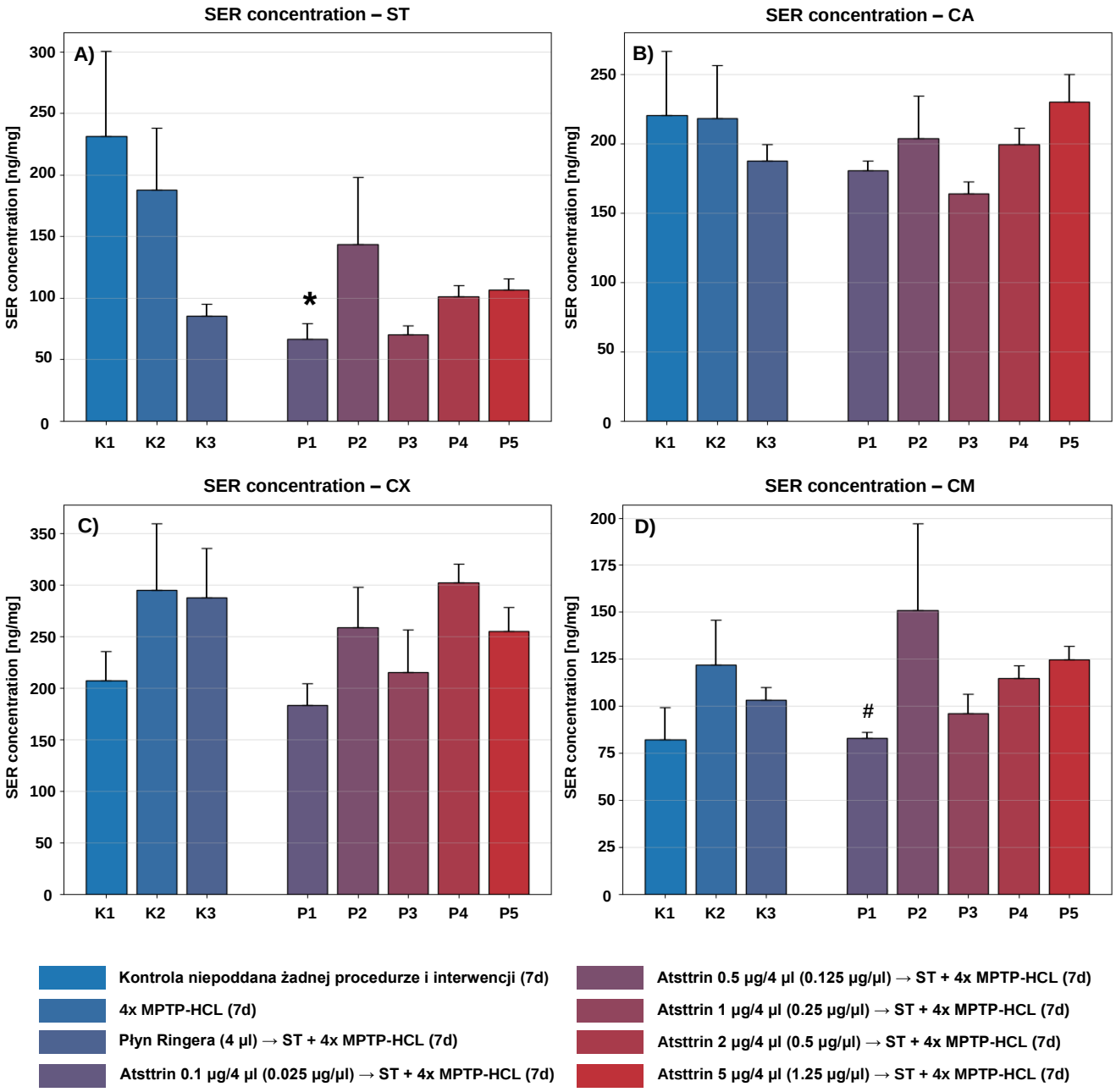
Poziom stężenia HIS w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 42). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0148277) wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Odmiennie, wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) oraz 0.25 μg/μl (P3) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0424342/p=0.0197932) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0011069) wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Odmiennie, wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.5 μg/μl (P4) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0258125) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania niższych (P1-P3) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia HIS w obrębie CA. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2), 0.5 μg/μl (P4) oraz 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0328847p=0.0105209/p=0.0018273) wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 1.25 μg/μl (P5) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0343039) wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3).



Rycina 42. Zmiany stężenia HIS oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

4.1.2.2.7. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia SER

Poziom stężenia SER w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie pierwszej części badania (Etap 1) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 43). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0471462$) spadkiem poziomu stężenia SER w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia SER w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST we wszystkich pięciu zastosowanych dawkach. Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.025 μg/μl (P1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0411774$) spadkiem poziomu stężenia SER w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Zastosowanie domózgowego stereotaktycznego podania wyższych (P2-P5) dawek Atsttrin do ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu stężenia SER w obrębie CM.



Rycina 43. Zmiany stężenia SER oceniane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001

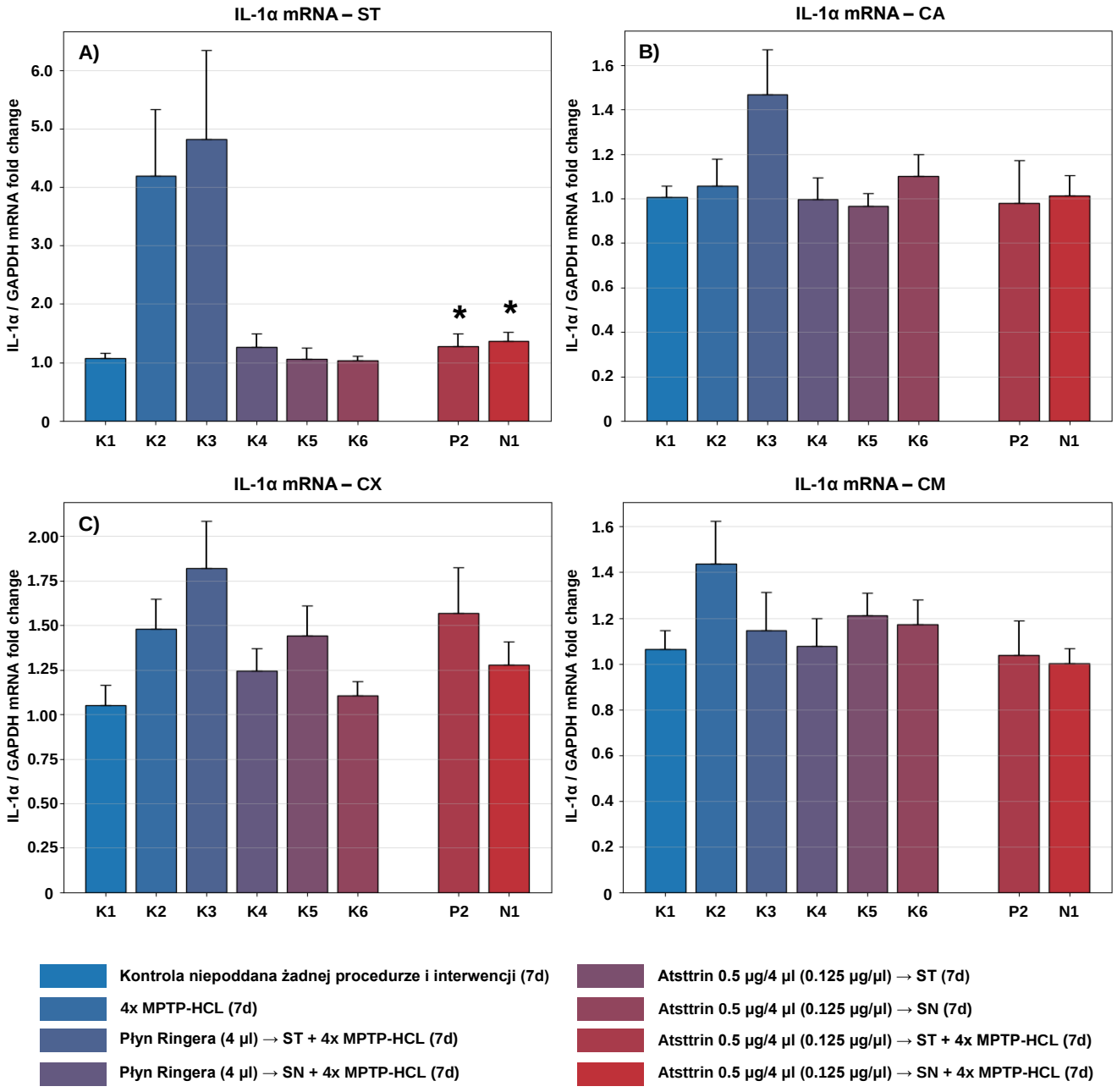
4.2. Analiza eksperymentalnego wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych na potencjalny efekt neuroprotekcyjny w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL

4.2.1. Wpływ empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej do prążkowia (ST) lub istoty czarnej (SN) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL

4.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-1α

Ekspresję poziomu mRNA dla IL-1α w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 44). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie wszytkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0383239$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0422765$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono

istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

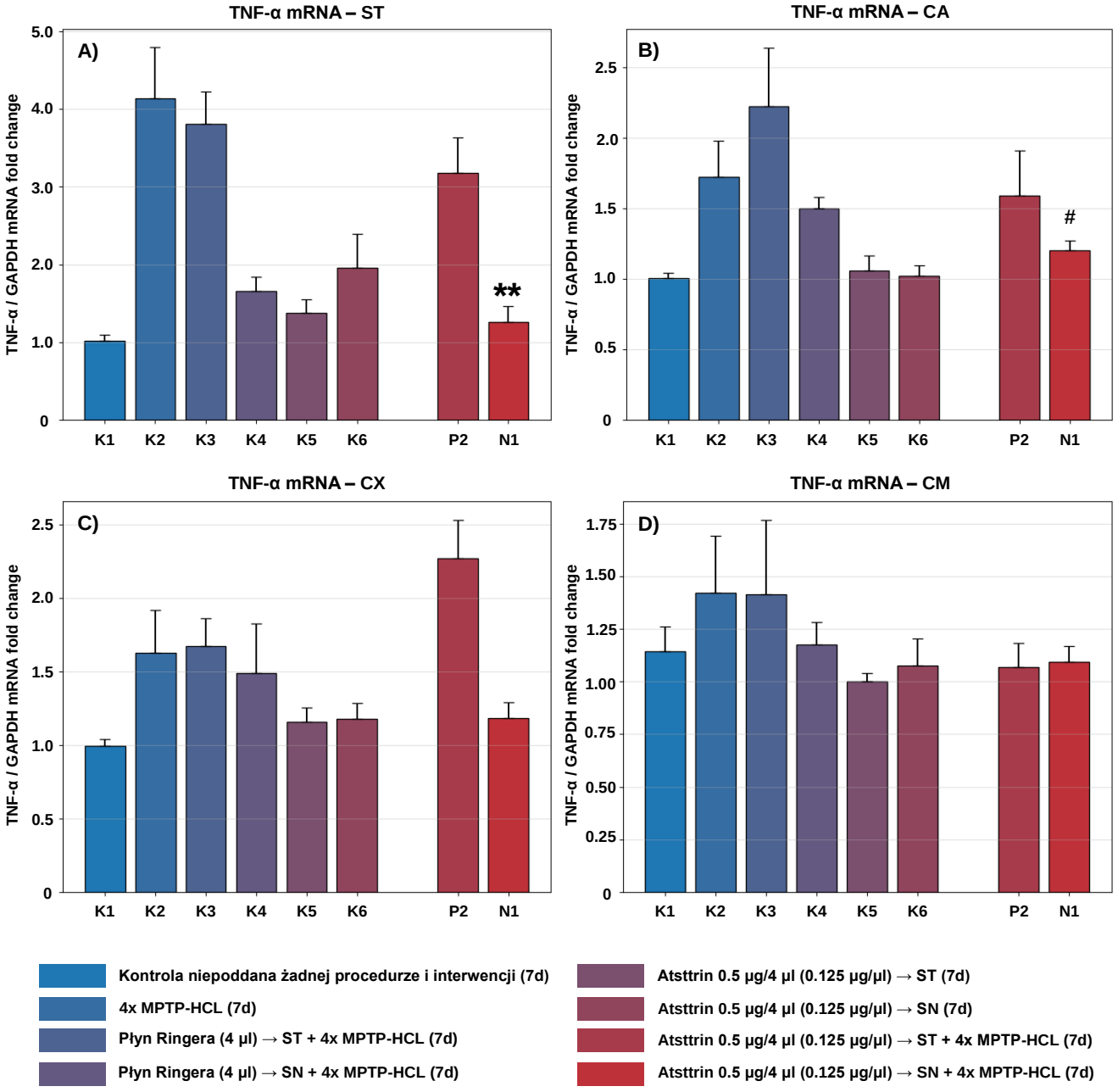


Rycina 44. Ekspresja genu dla IL-1α oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TNF-α

Ekspresję poziomu mRNA dla TNF-α w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 45). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0027266) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0135752) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono

istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

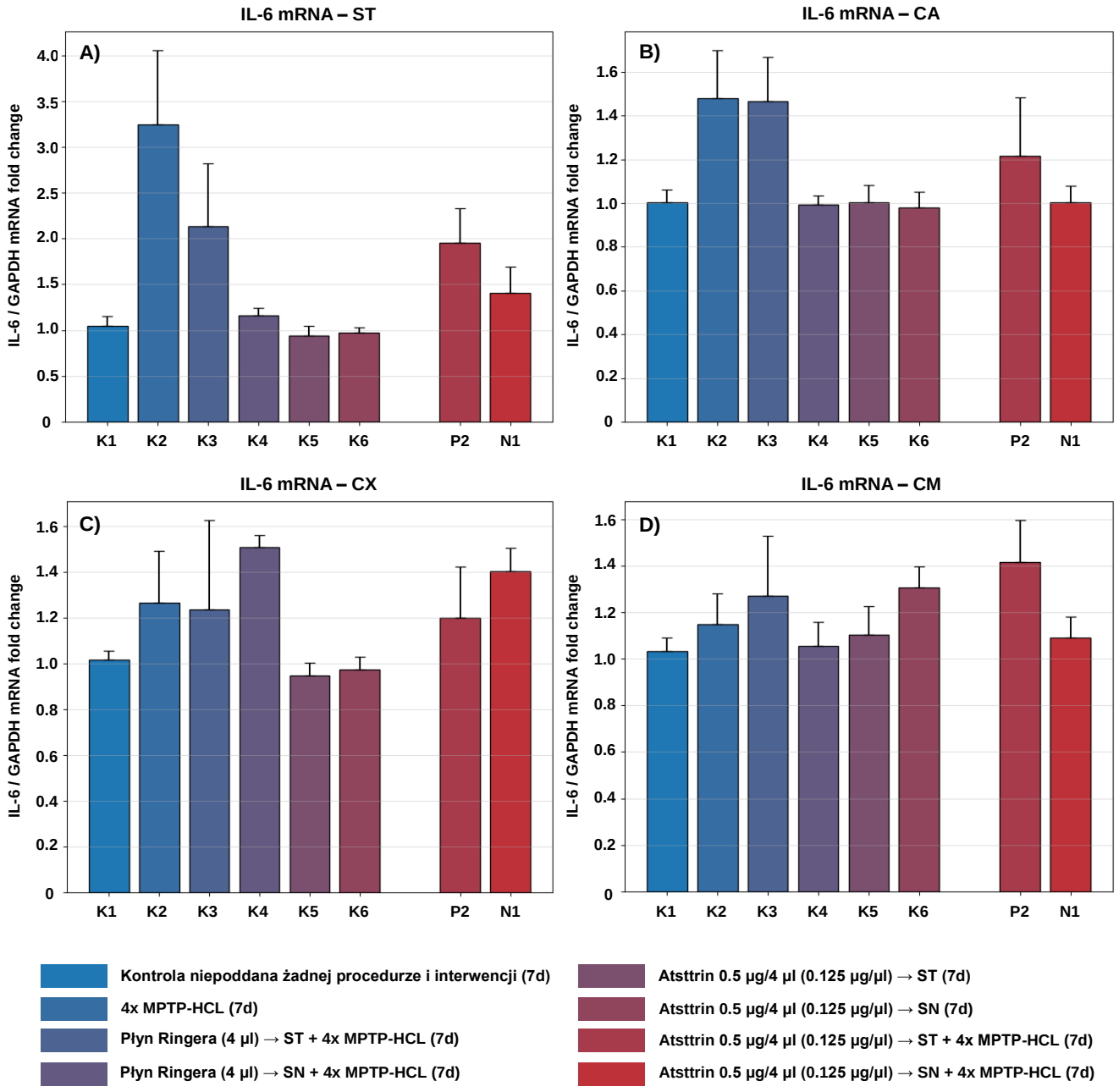


Rycina 45. Ekspresja genu dla TNF-α oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-6

Ekspresję poziomu mRNA dla IL-6 w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 46). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL

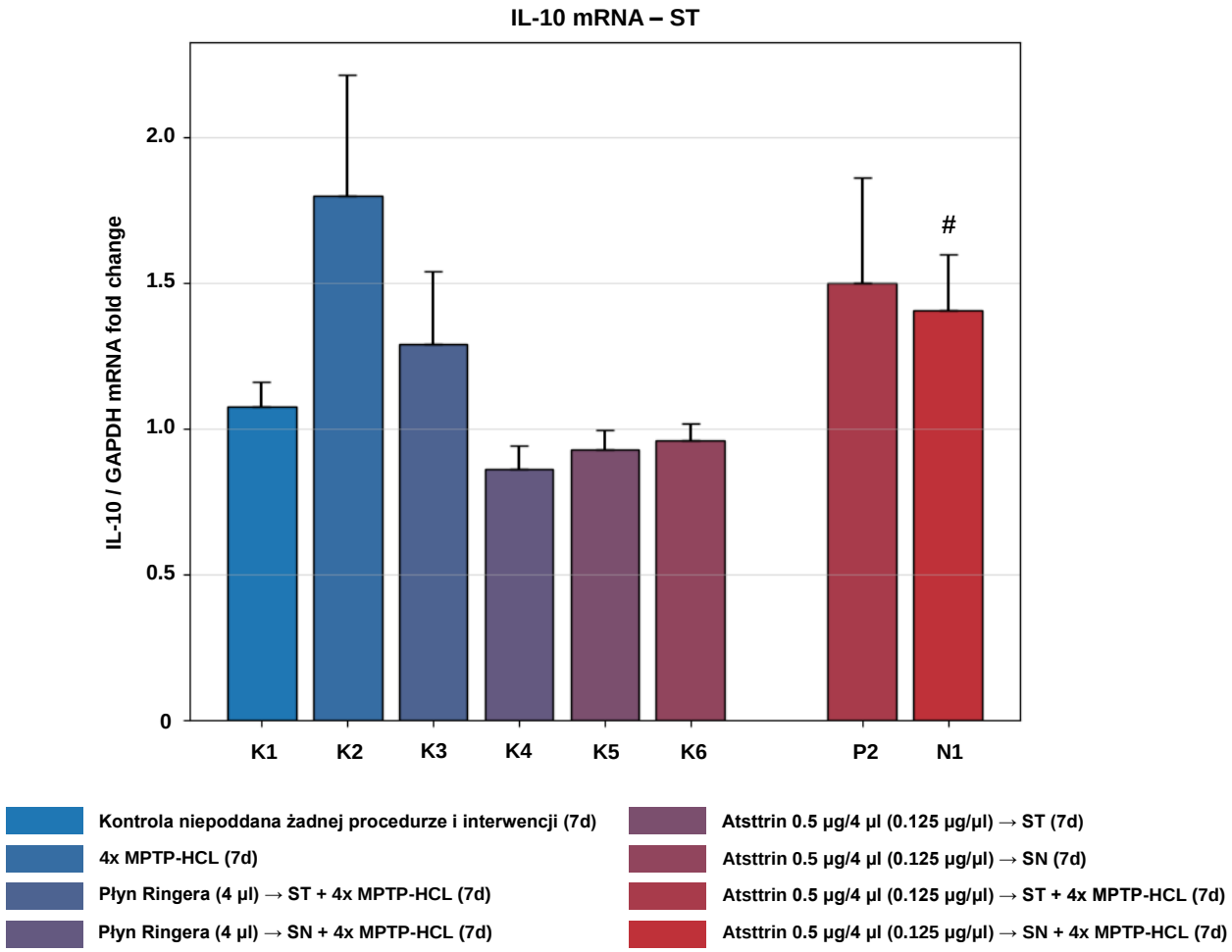
po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).



Rycina 46. Ekspresja genu dla IL-6 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IL-10

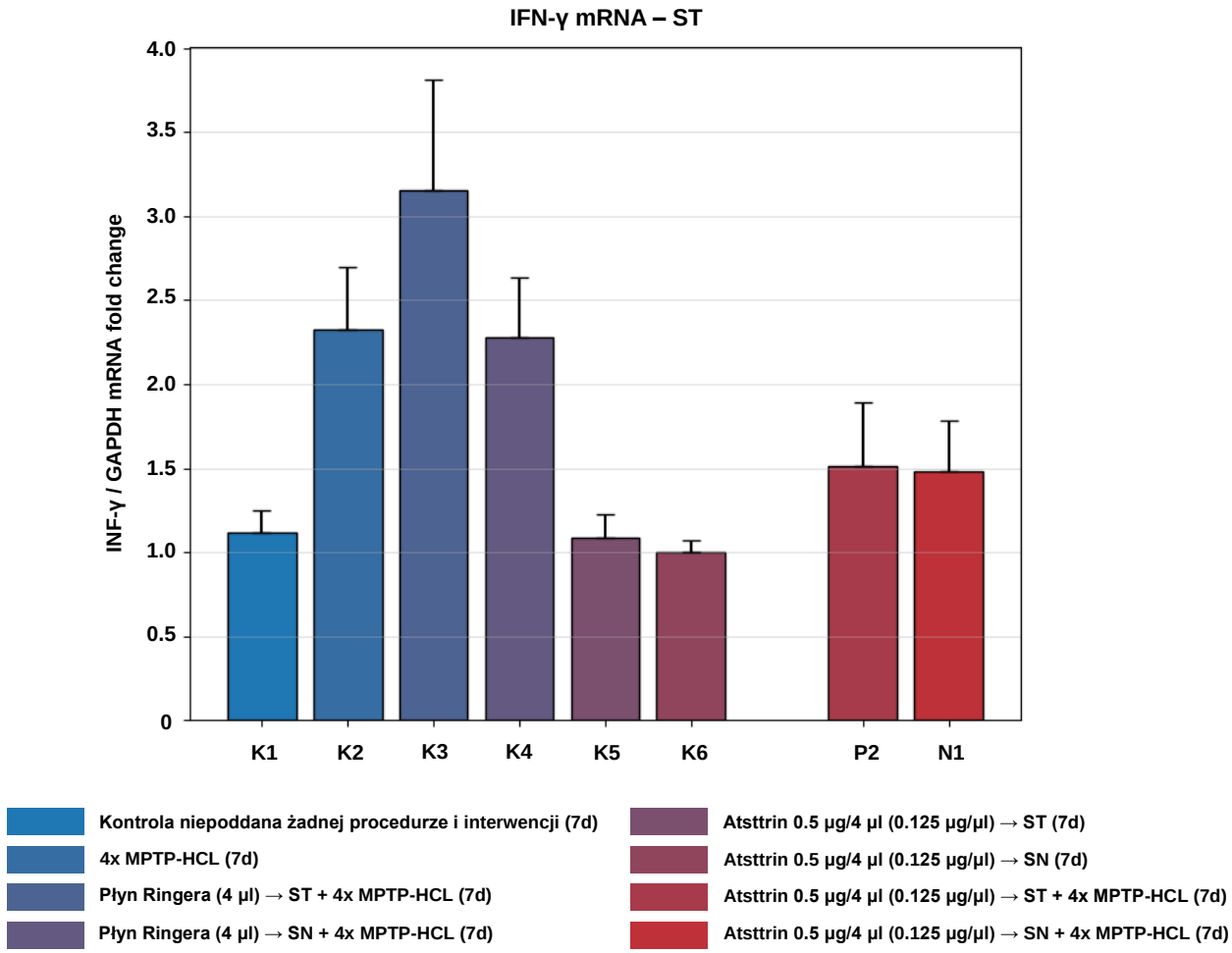
Ekspresję poziomu mRNA dla IL-10 w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 47). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0190115$) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K4).



Rycina 47. Ekspresja genu dla IL-10 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.5. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla IFN-γ

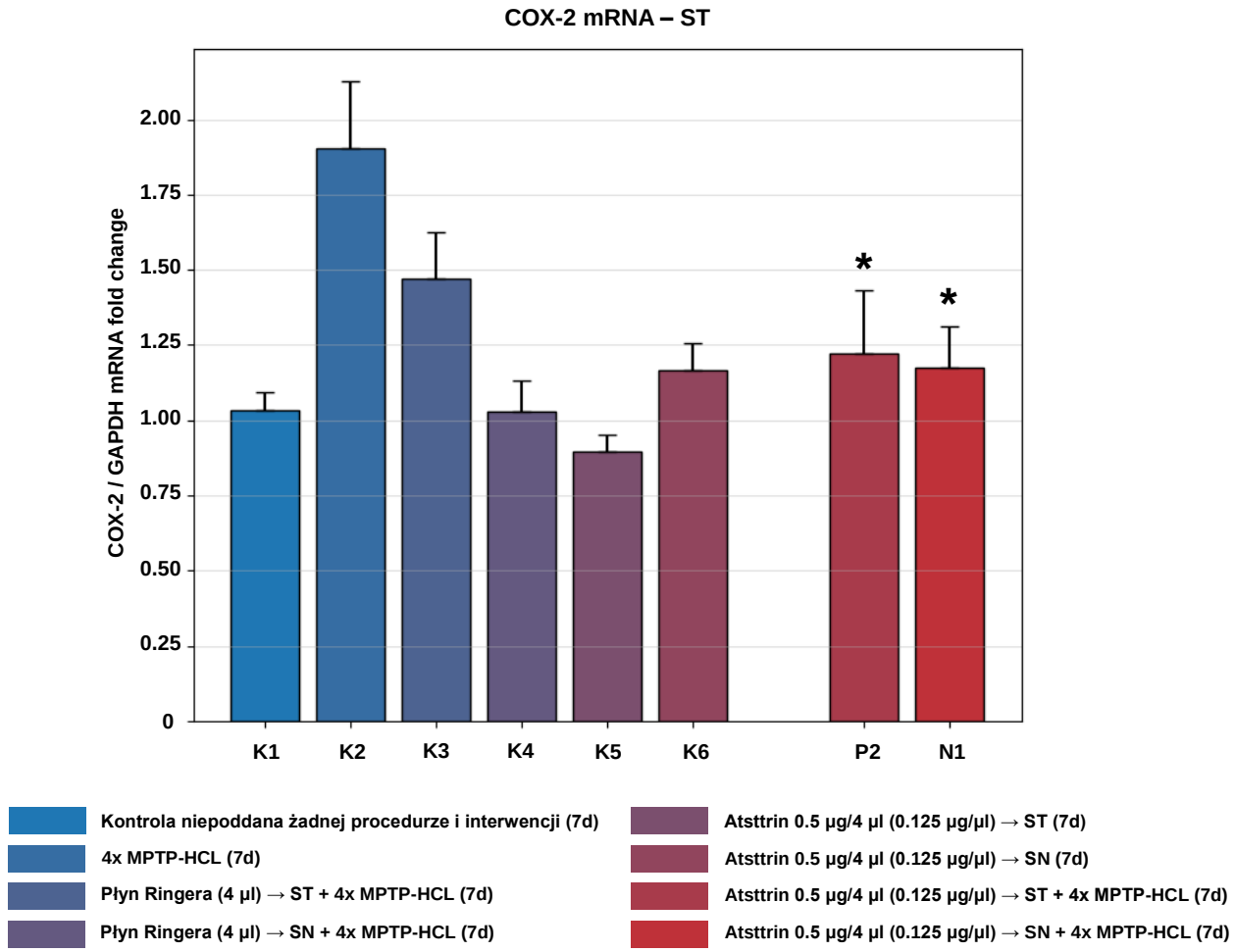
Ekspresję poziomu mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 48). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IFN-γ w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).



Rycina 48. Ekspresja genu dla IFN-γ oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.6. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla COX-2

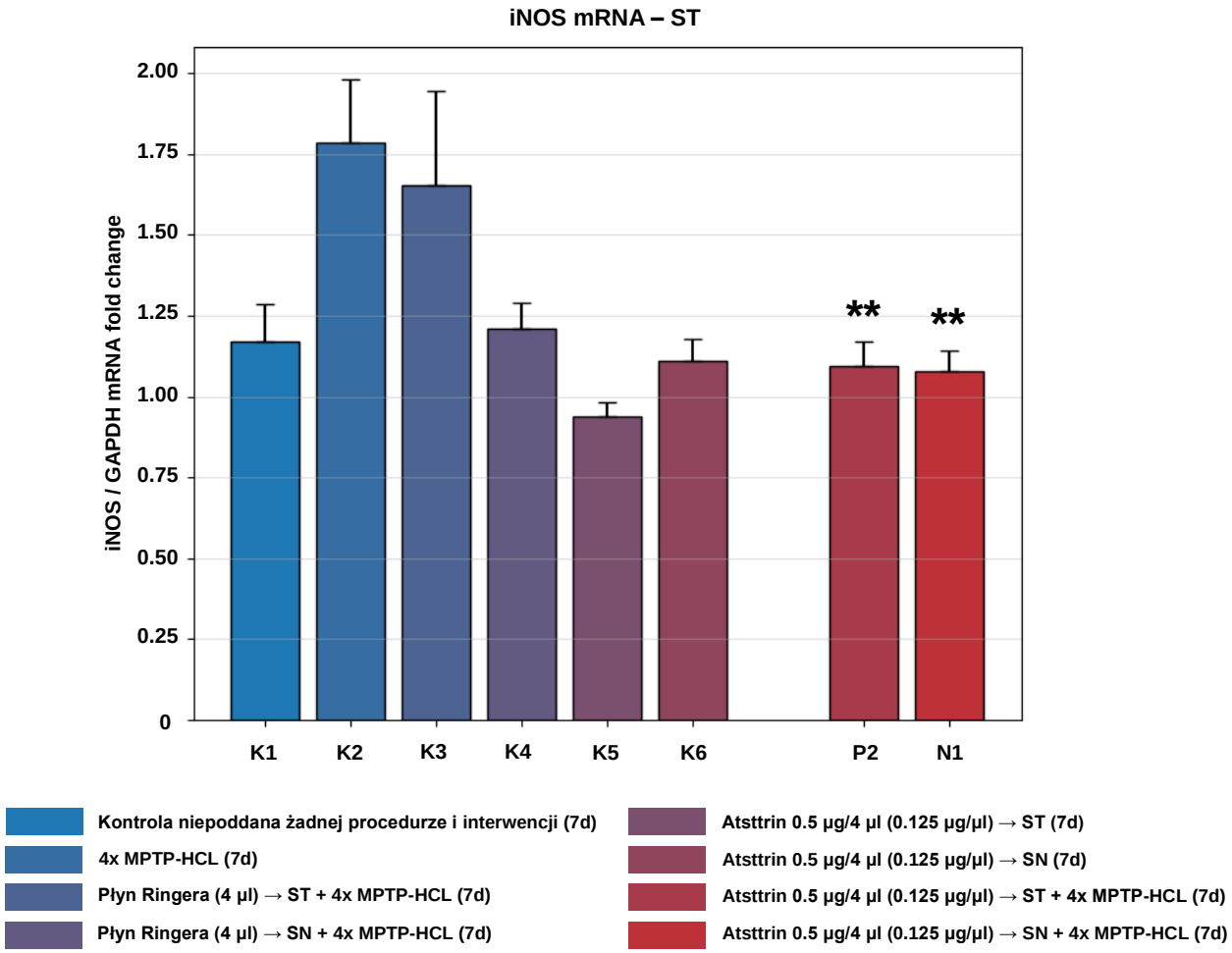
Ekspresję poziomu mRNA dla COX-2 w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 49). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0438675$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0159224$) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla COX-2 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 49. Ekspresja genu dla COX-2 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.7. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla iNOS

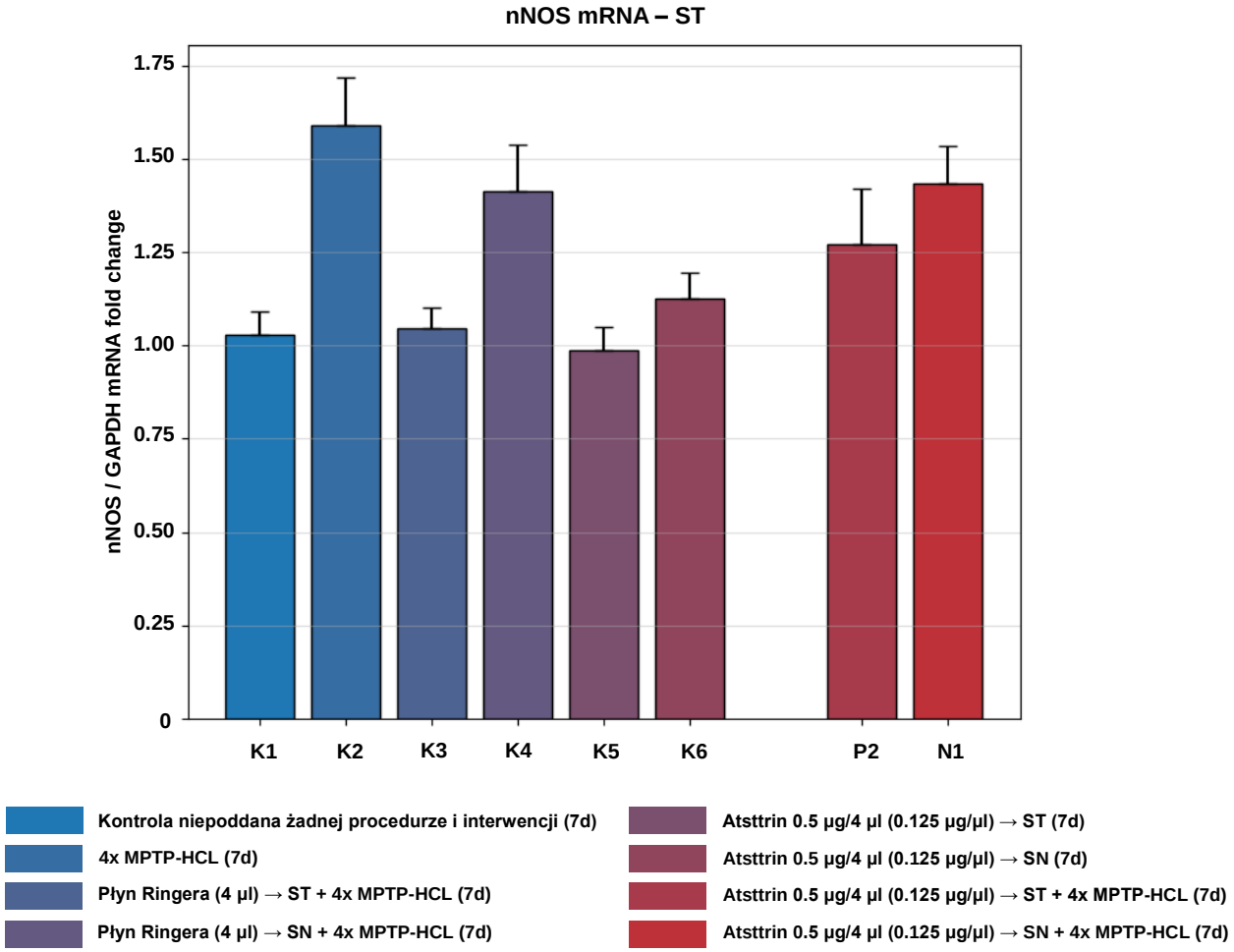
Ekspresję poziomu mRNA dla iNOS w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 50). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obsewrowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0093981) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0080852) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 50. Ekspresja genu dla iNOS oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla nNOS

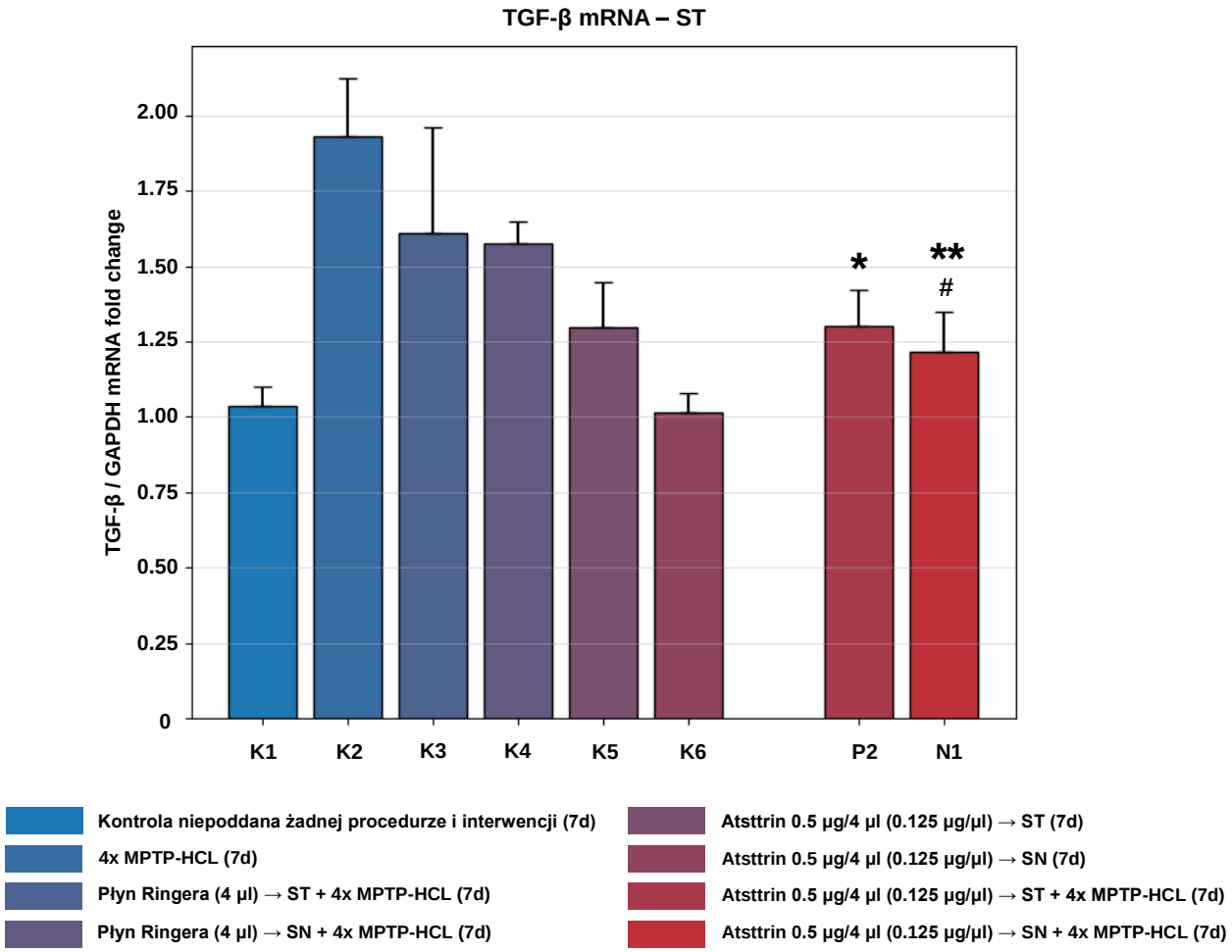
Ekspresję poziomu mRNA dla nNOS w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 51). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla nNOS w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).



Rycina 51. Ekspresja genu dla nNOS oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TGF-β

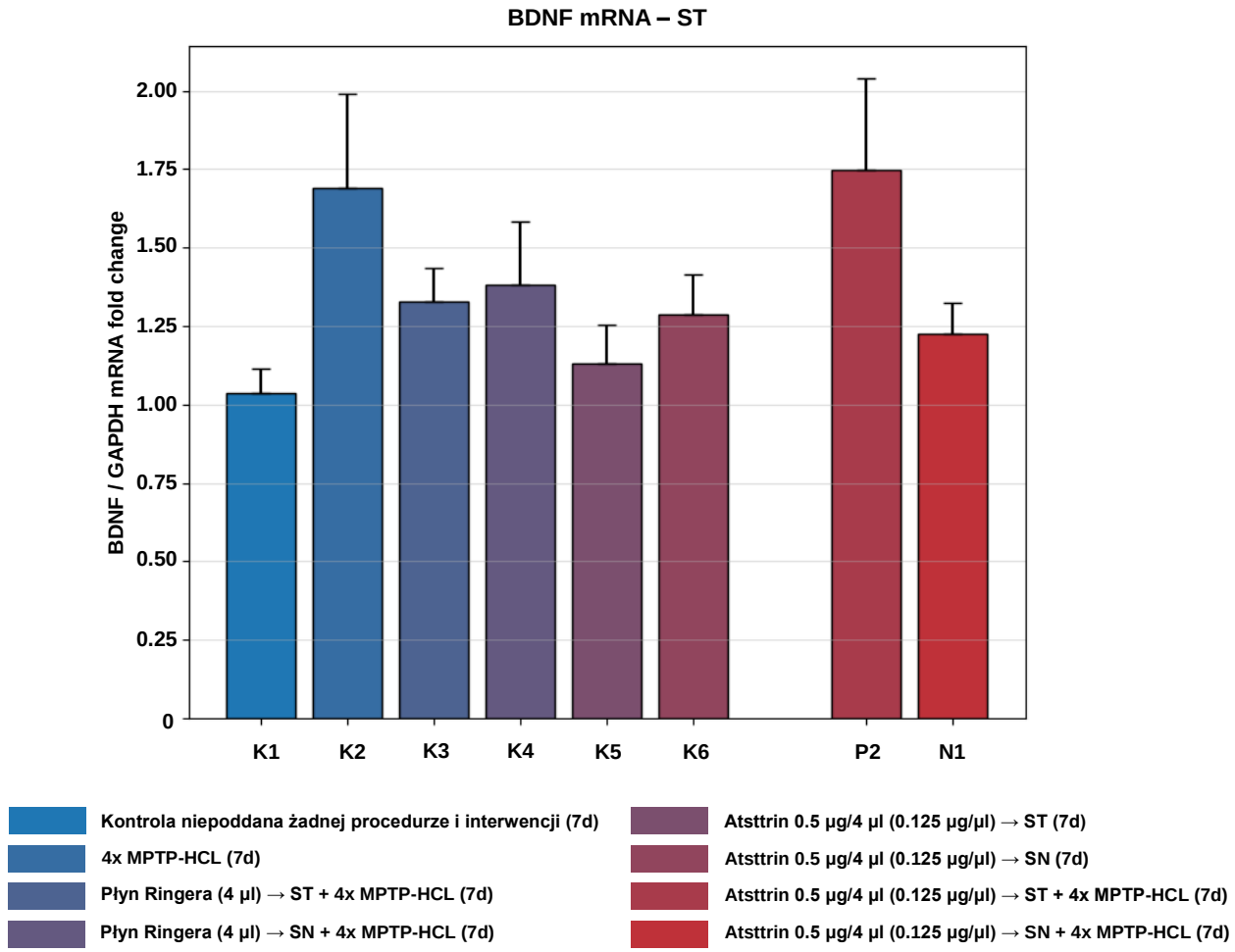
Ekspresję poziomu mRNA dla TGF-β w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 52). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0189949) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0096524/p=0.0272968) spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K4).



Rycina 52. Ekspresja genu dla TGF-β oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.10. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla BDNF

Ekspresję poziomu mRNA dla BDNF w obrębie ST u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 53). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

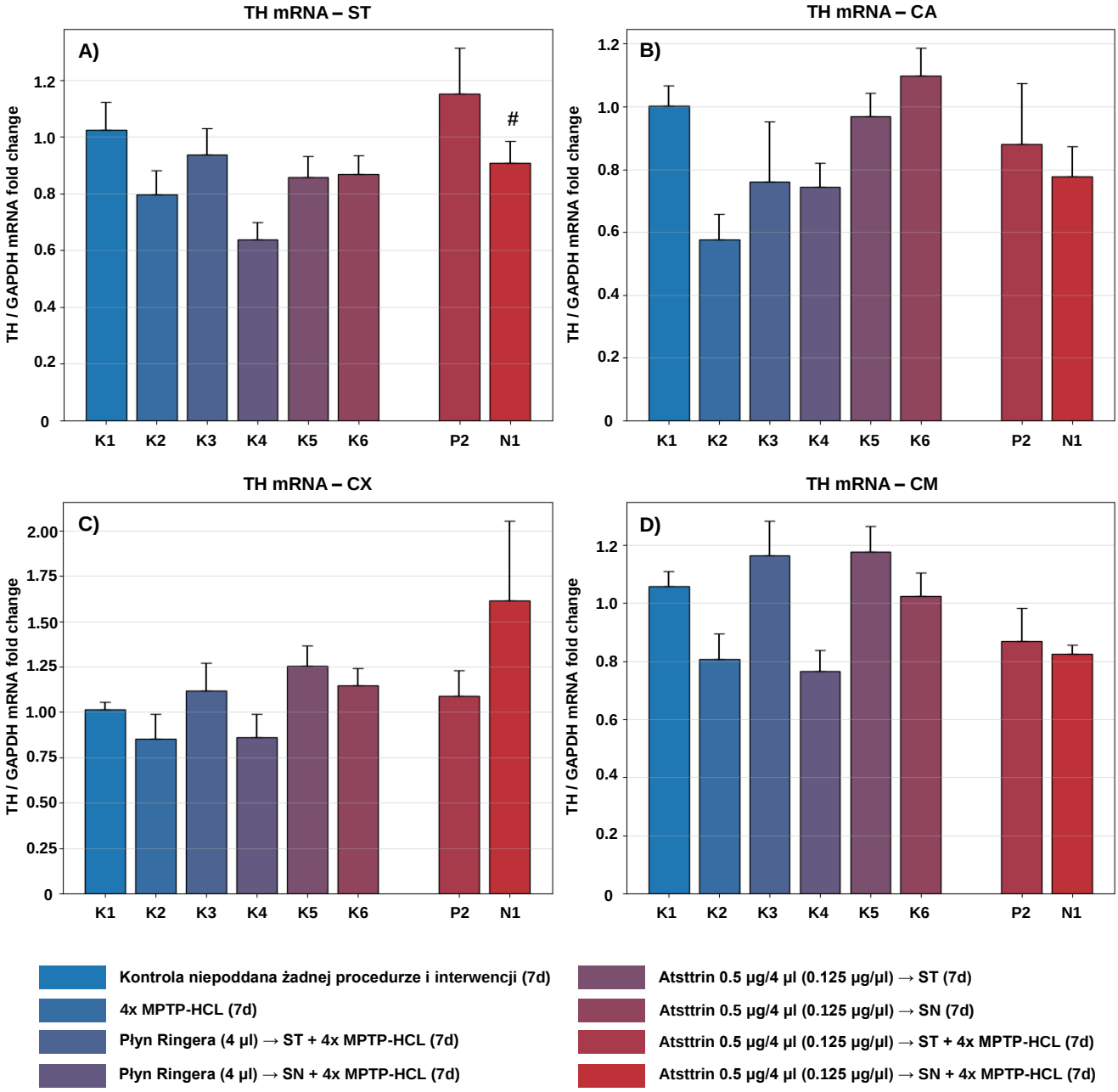


Rycina 53. Ekspresja genu dla BDNF oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TH

Ekspresję poziomu mRNA dla TH w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 54). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0132717$) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji

mRNA dla TH w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TH w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

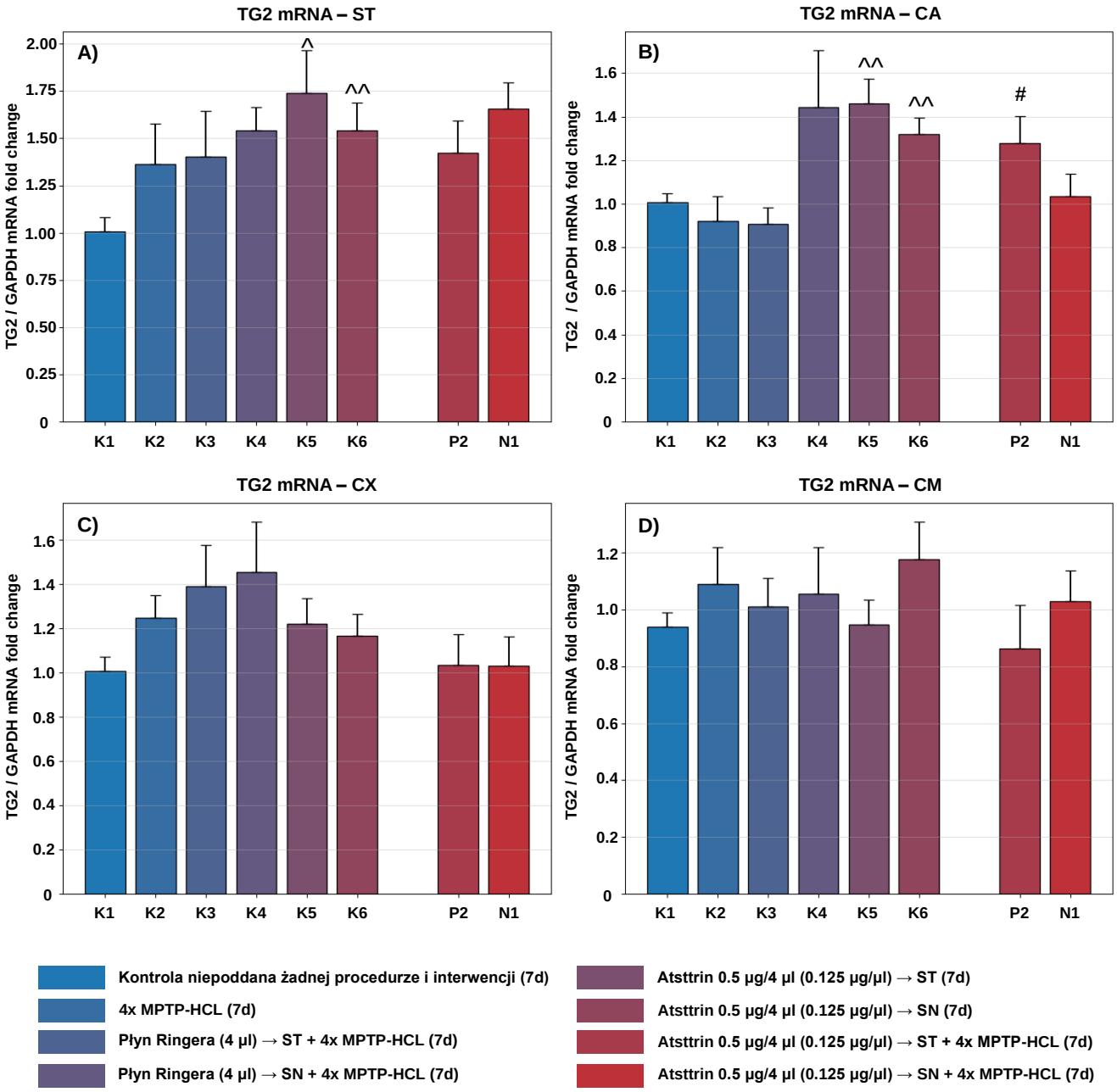


Rycina 54. Ekspresja genu dla TH oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu ekspresji genu dla TG2

Ekspresję poziomu mRNA dla TG2 w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą Real-Time PCR (Rycina 55). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0120320) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0042795) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0031859) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0023615) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnie statystycznym (p=0.0307471) wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji

MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla Tg2 w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).



Rycina 55. Ekspresja genu dla TG2 oceniana w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST oznaczona metodą Real-Time PCR. Wyniki zostały wyrażone w postaci analizy półilościowej jako wartość fluorescencji próbki badanej w stosunku do fluorescencji genu referencyjnego GAPDH (ang. *fold change*). Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

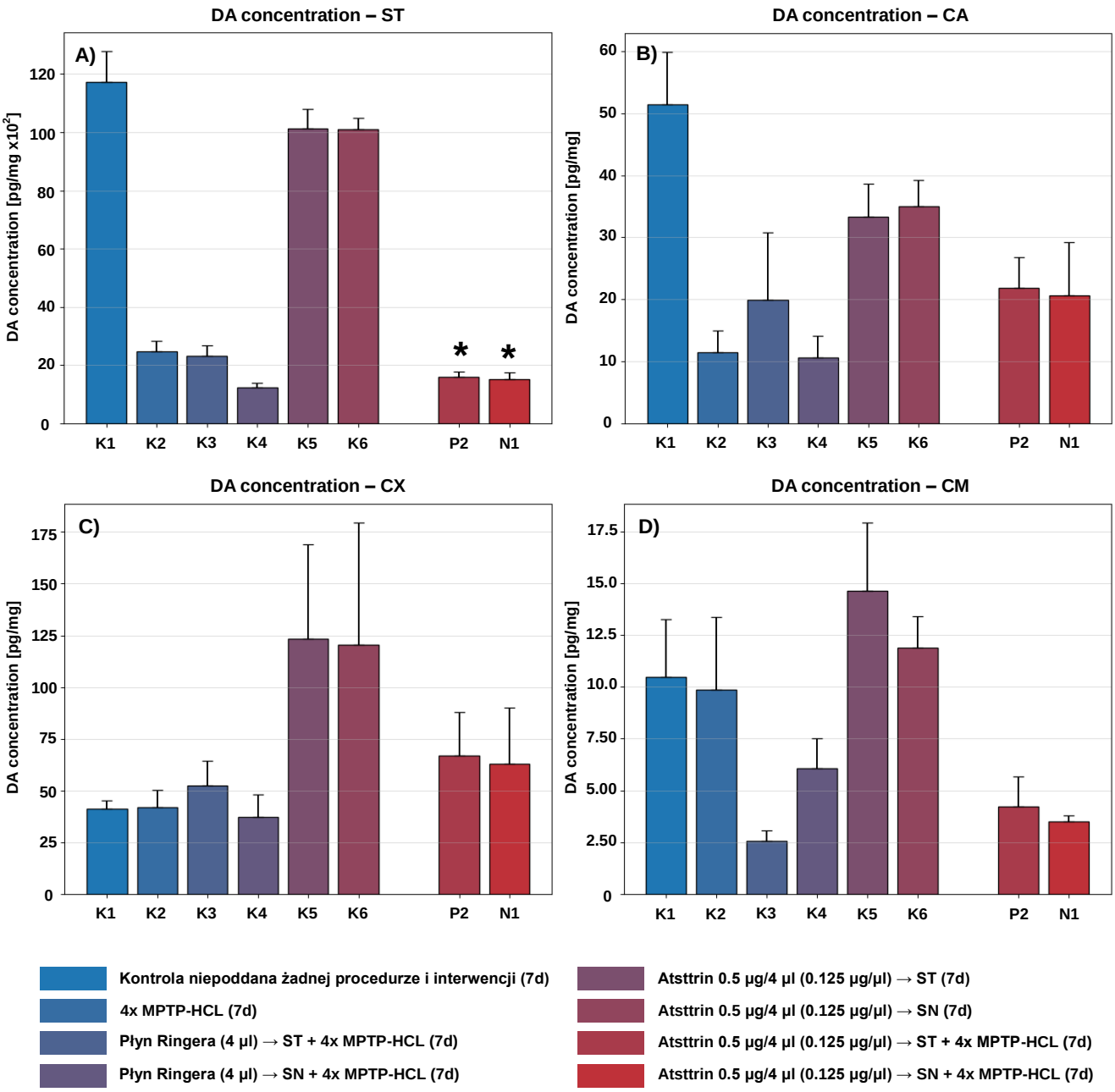
4.2.2. Wpływ empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej do prążkowia (ST) lub istoty czarnej (SN) za pomocą metod stereotaktycznych na poziom stężeń wybranych neurotransmiterów u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL

4.2.2.1. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin

4.2.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DA

Poziom stężenia DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 56). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0481299$) spadkiem poziomu stężenia DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0407553$) spadkiem poziomu stężenia DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CX u

zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

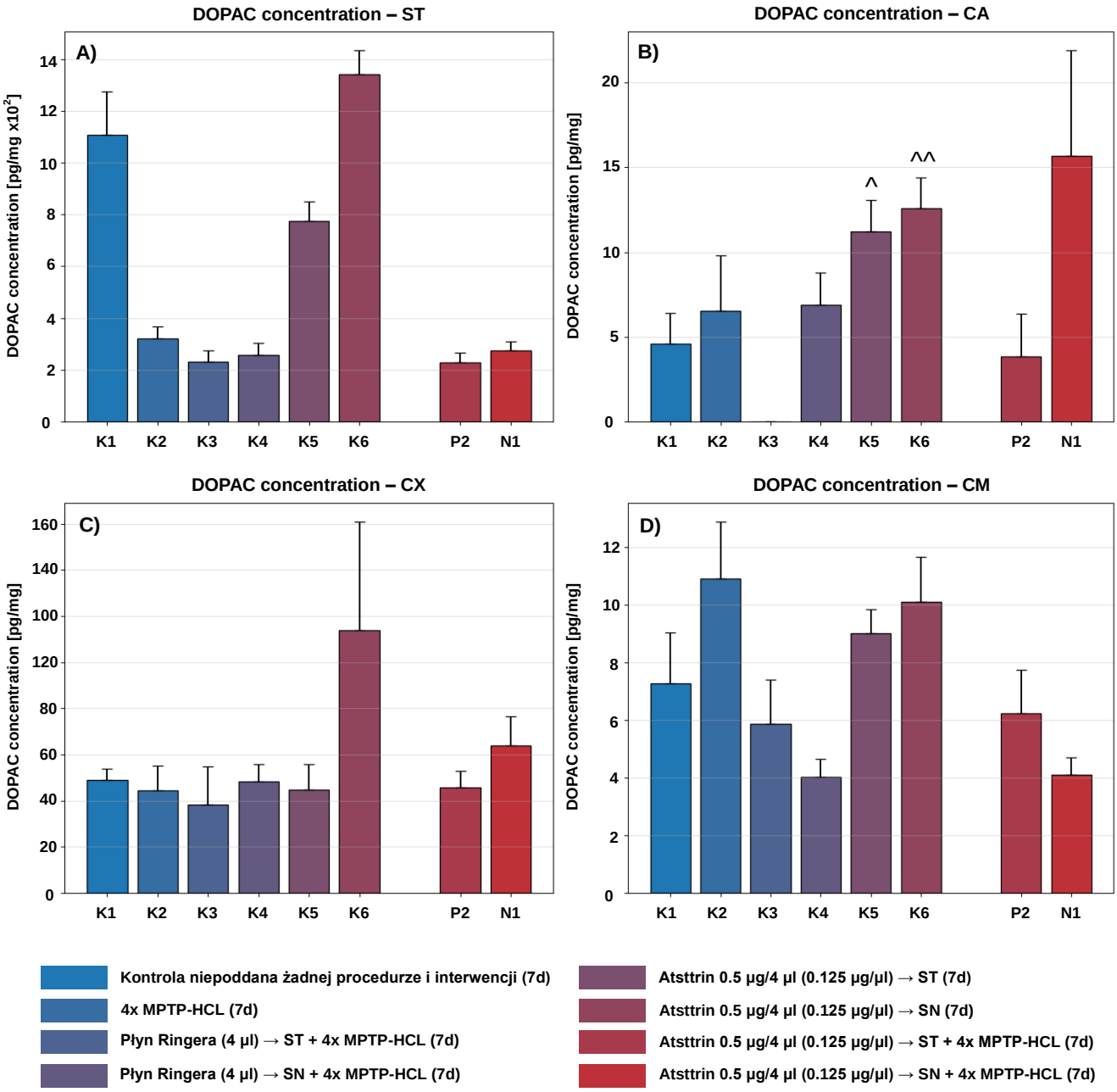


Rycina 56. Zmiany stężenia DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DOPAC

Poziom stężenia DOPAC w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 57). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia DOPAC w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0192628$) wzrostem poziomu stężenia DOPAC w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0050917$) wzrostem poziomu stężenia DOPAC w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie

stężenia DOPAC w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia DOPAC w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

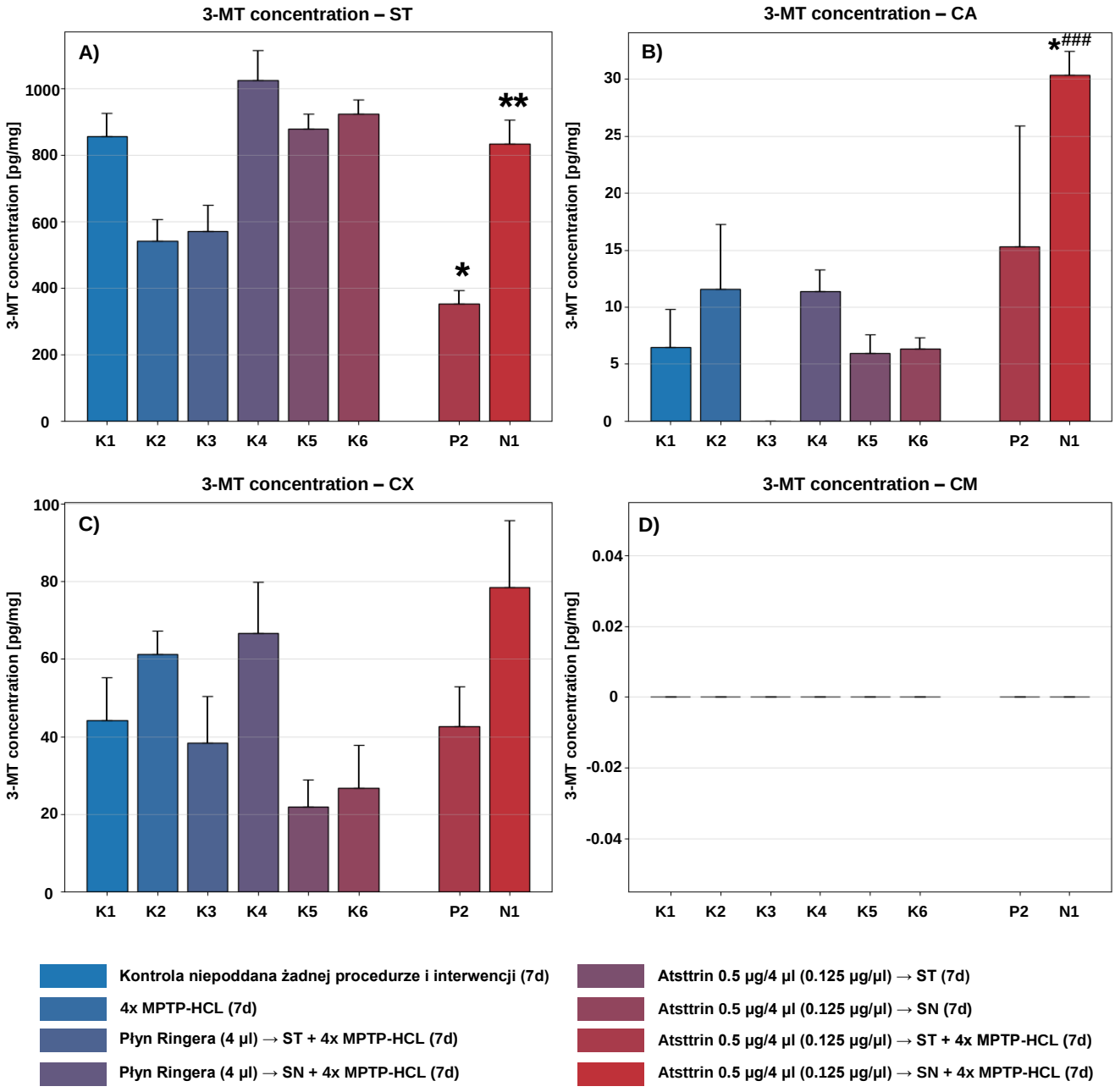


Rycina 57. Zmiany stężenia DOPAC oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 3-MT

Poziom stężenia 3-MT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 58). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia 3-MT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnie statystycznym ($p=0.0311267$) spadkiem poziomu stężenia 3-MT w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Odmiennie, wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0074346$) wzrostem poziomu stężenia 3-MT w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0126704/p=0.000002$) wzrostem poziomu stężenia 3-MT w obrębie CA w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych

statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 3-MT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia 3-MT w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

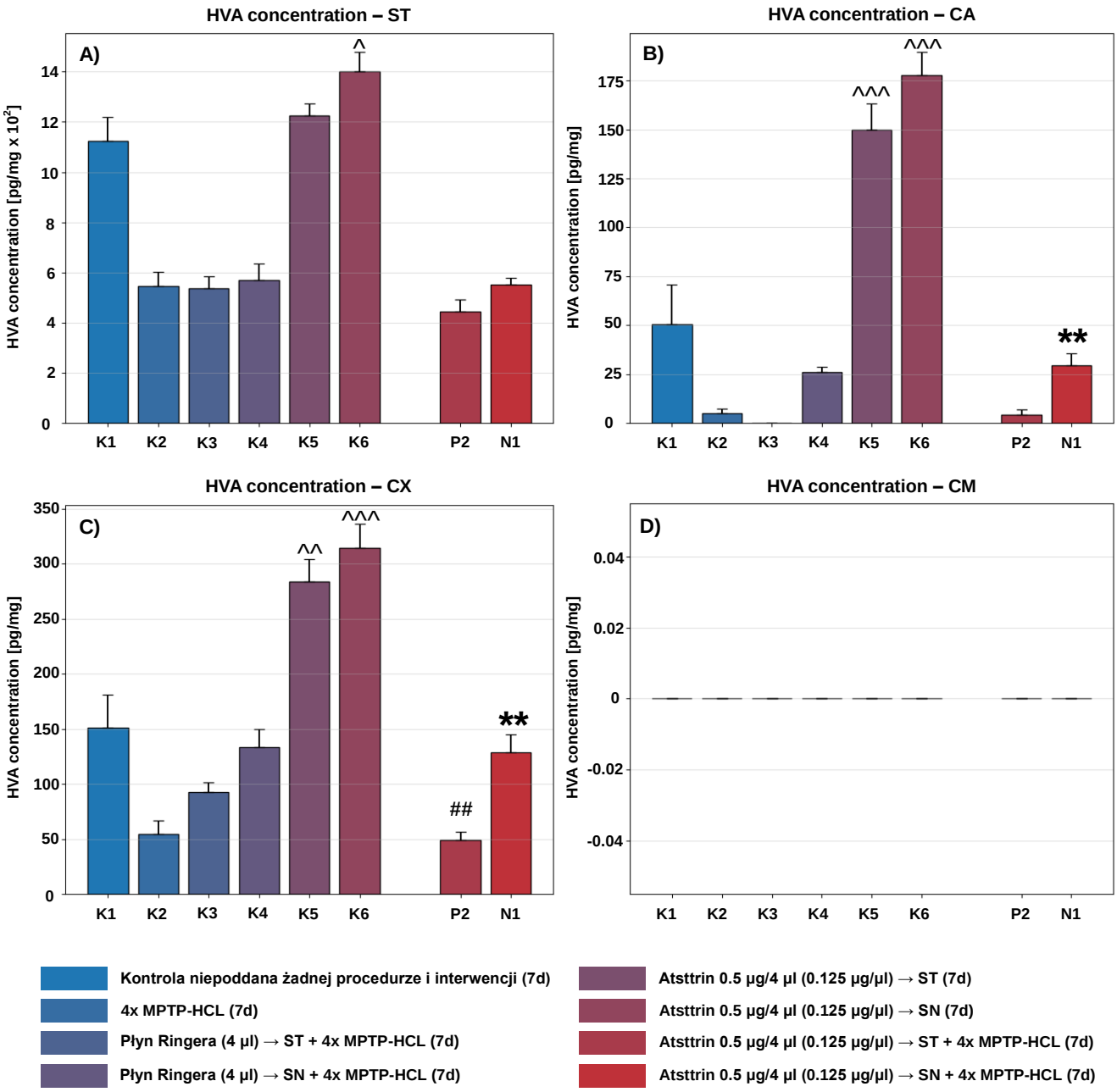


Rycina 58. Zmiany stężenia 3-MT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HVA

Poziom stężenia HVA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 59). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia HVA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0350820) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0007318) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000488) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0029351) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego

stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0020301) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003118) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.047202) spadkiem poziomu stężenia HVA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Odmiennie, wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.001642) wzrostem poziomu stężenia HVA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HVA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia HVA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

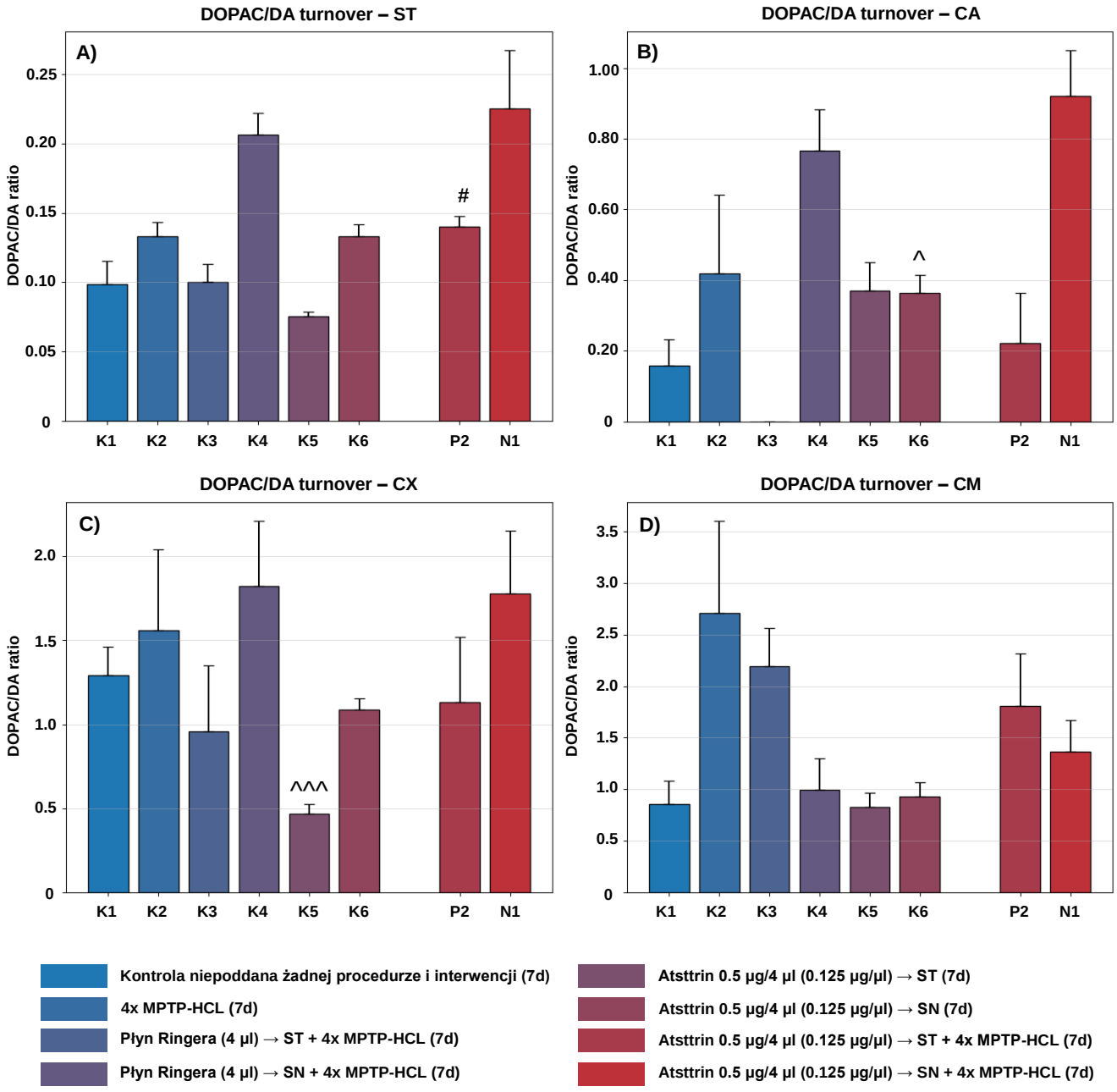


Rycina 59. Zmiany stężenia HVA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.5. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia DOPAC/DA

Poziom obrotów DOPAC/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 60). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0323267) wzrostem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0341772) wzrostem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0005372) spadkiem poziomu obrotów DOPAC/DA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono

istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów DOPAC/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

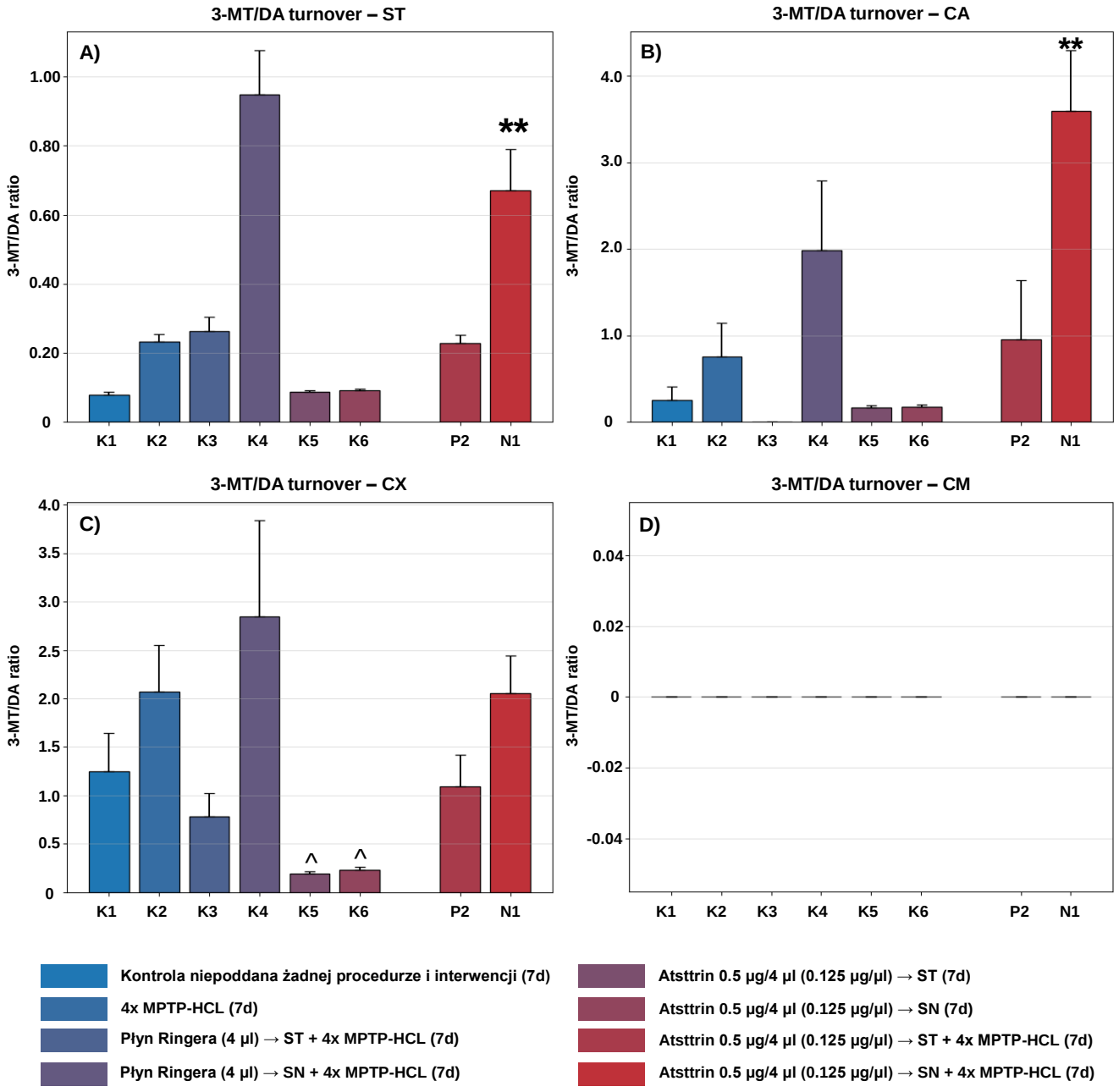


Rycina 60. Zmiany obrotów DOPAC/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.6. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 3-MT/DA

Poziom obrotów 3-MT/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 61). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0037621) wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0027443) wzrostem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0235245) spadkiem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0277827) spadkiem poziomu obrotów 3-MT/DA w obrębie CX w porównaniu do grupy

kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 3-MT/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów 3-MT/DA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

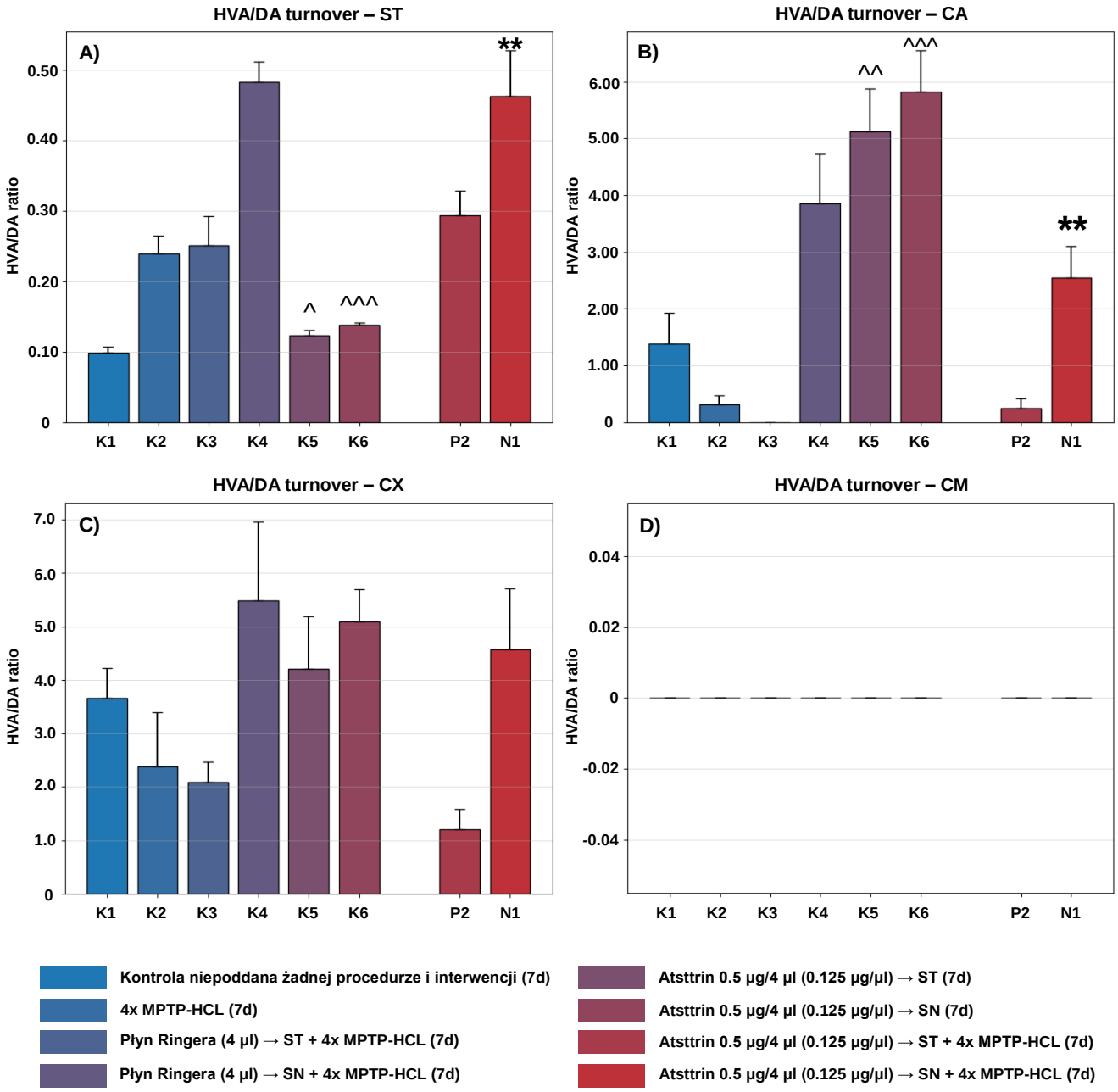


Rycina 61. Zmiany obrotów 3-MT/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.7. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia HVA/DA

Poziom obrotów HVA/DA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 62). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym spadkiem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0385746) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0006292) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnie statystycznym (p=0.0067709) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0011054) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000731) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym

statystycznie (p=0.0019145) wzrostem poziomu obrotów HVA/DA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów HVA/DA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów HVA/DA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

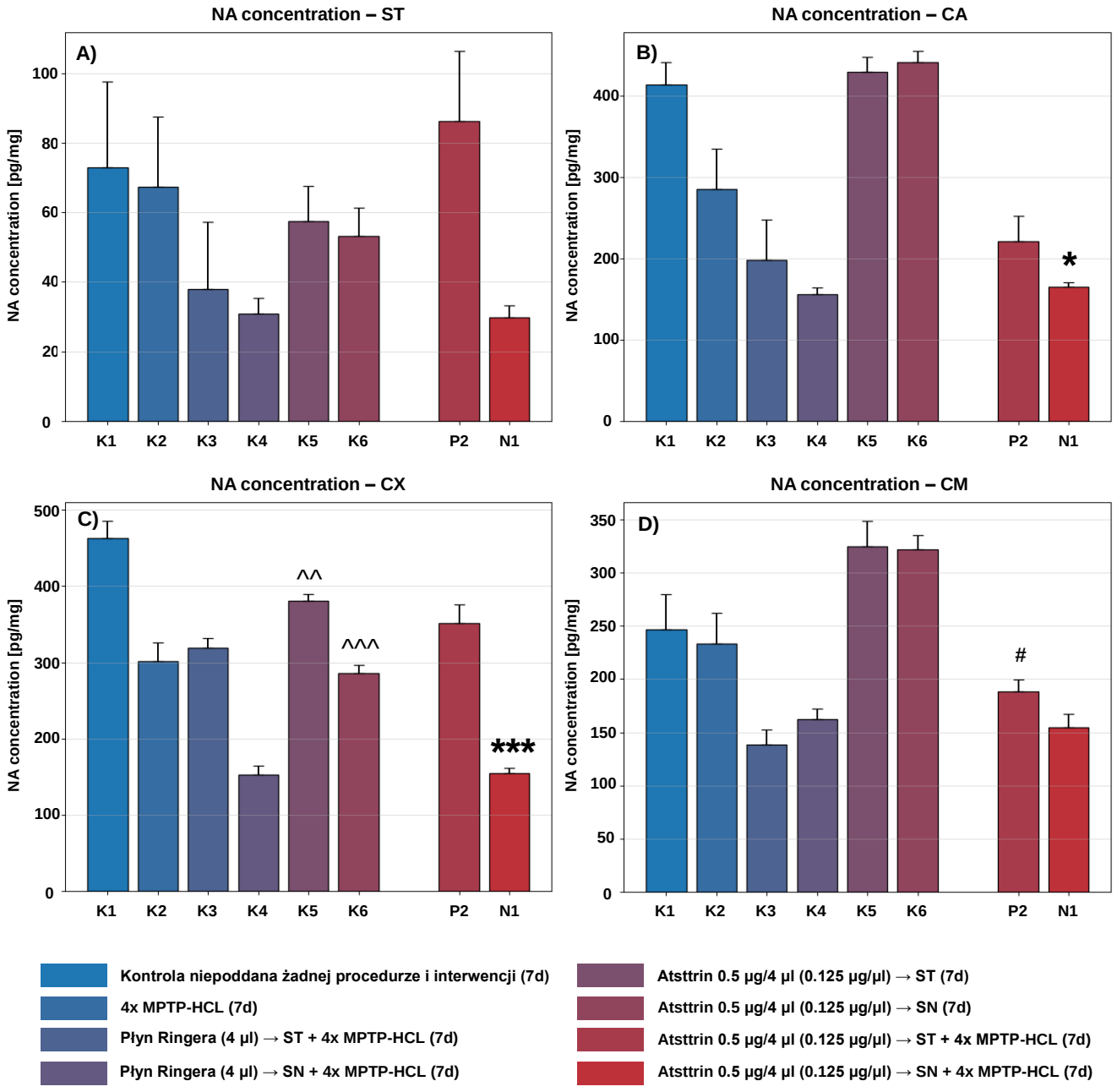


Rycina 62. Zmiany obrotów HVA/DA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.8. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia NA

Poziom stężenia NA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 63). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0486076$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0047484$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.000005$) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w

poziomie stężenia NA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003772) spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0211908) wzrostem poziomu stężenia NA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia NA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

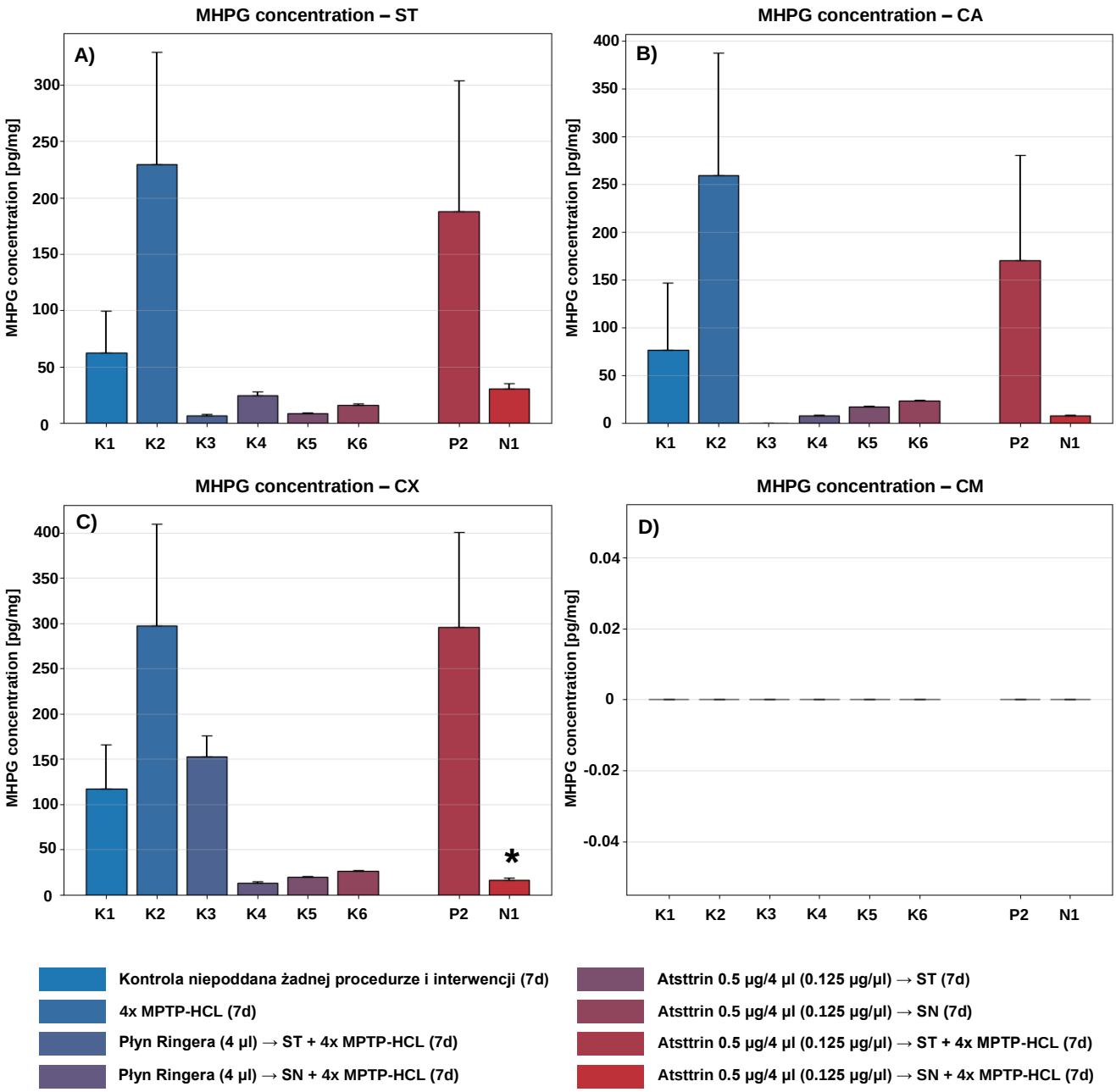


Rycina 63. Zmiany stężenia NA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.9. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia MHPG

Poziom stężenia MHPG w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 64). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia MHPG w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie

(p=0.0419616) spadkiem poziomu stężenia MHPG w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia MHPG w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu stężenia MHPG w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

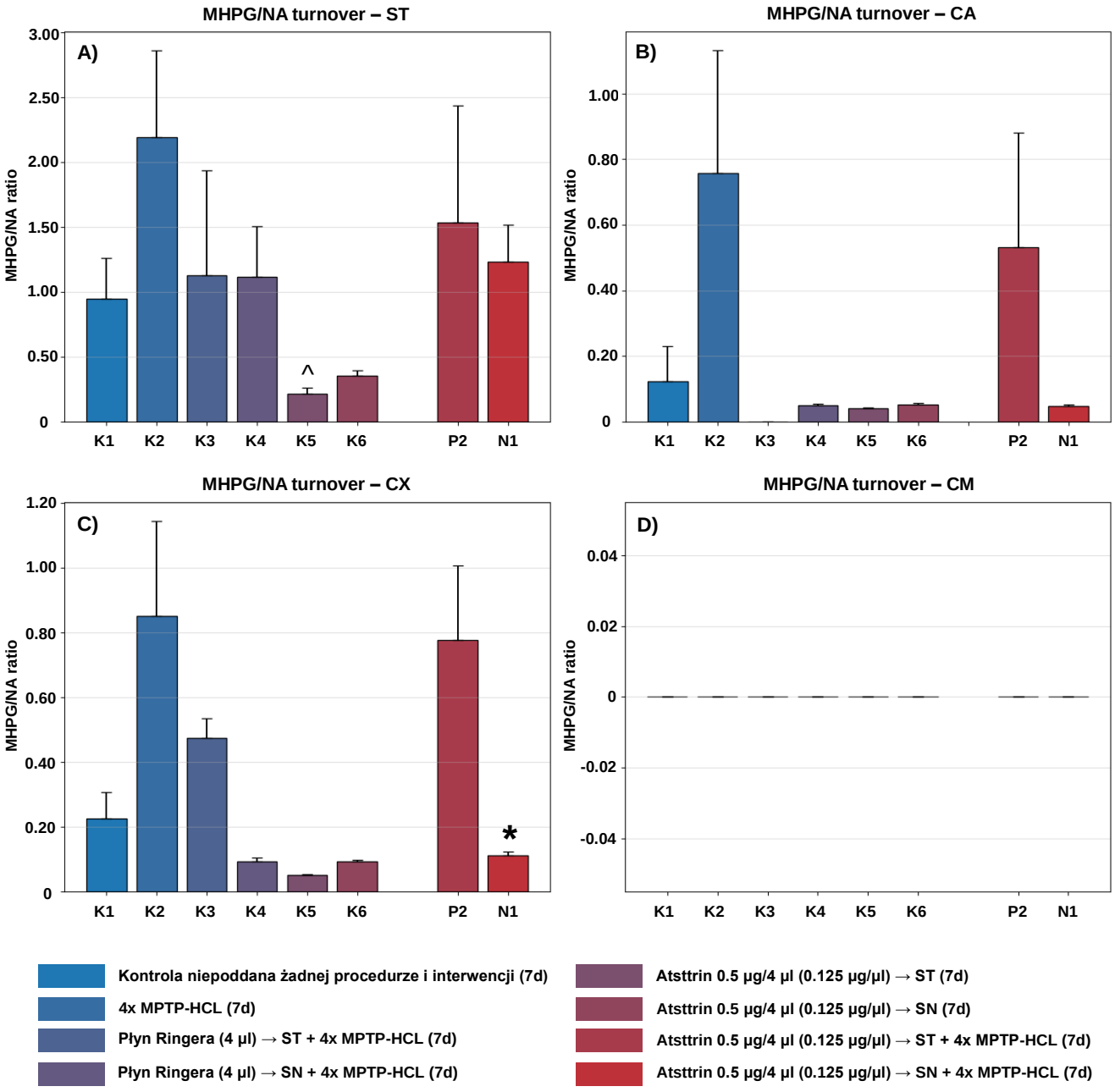


Rycina 64. Zmiany stężenia MHPG oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.10. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia MHPG/NA

Poziom obrotów MHPG/NA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 65). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0435441$) spadkiem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po

wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0400629) spadkiem poziomu obrotów MHPG/NA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów MHPG/NA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Uzyskane w tym przypadku dane i wartości dotyczące poziomu obrotów MHPG/NA w CM nie pozwoliły jednakże na przeprowadzenie pełnej analizy i opracowania statystycznego.

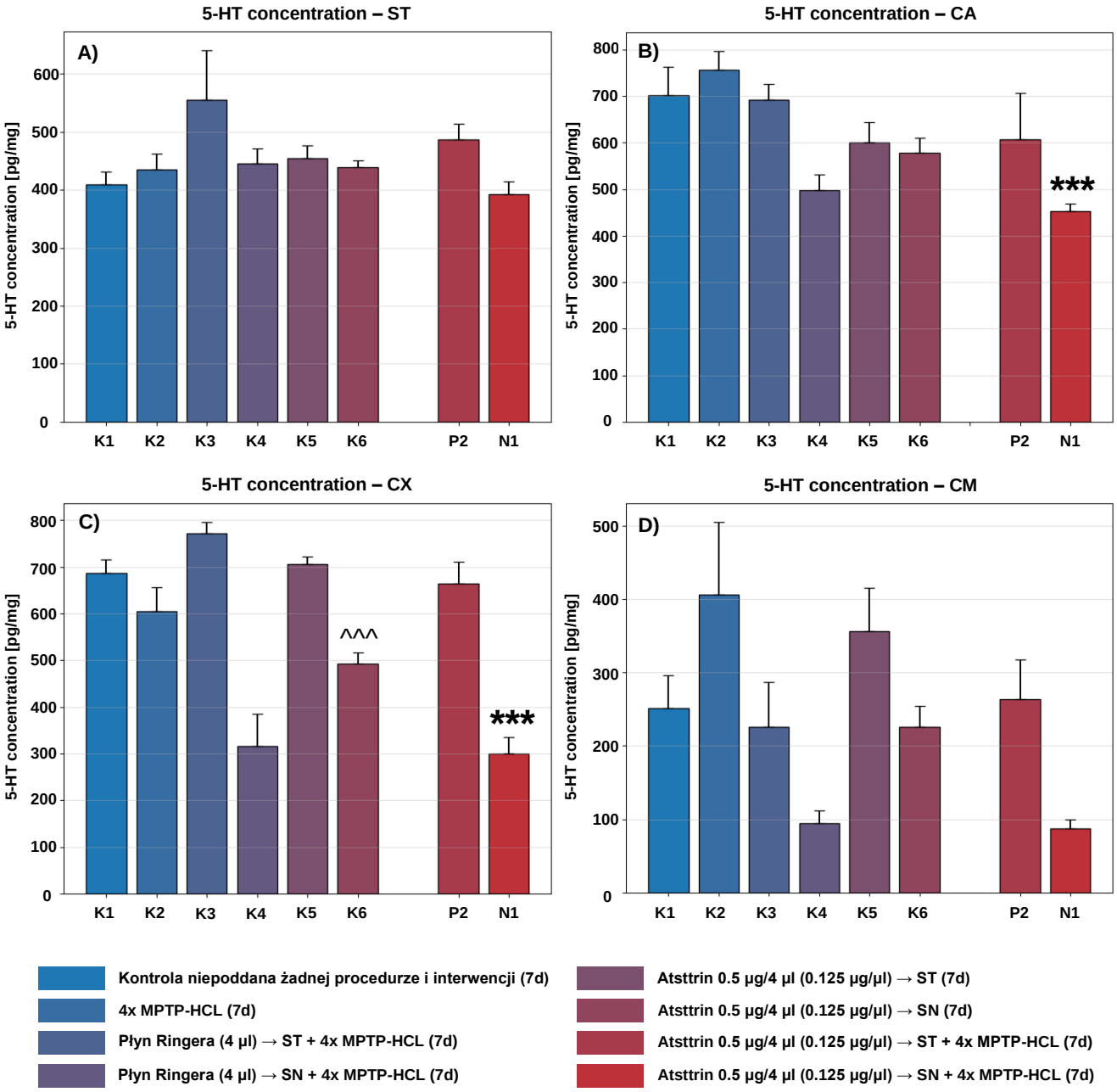


Rycina 65. Zmiany obrotów MHPG/NA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.11. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HT

Poziom stężenia 5-HT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 66). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia 5-HT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 µg/µl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0000629$) spadkiem poziomu stężenia 5-HT w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0000394$) spadkiem poziomu stężenia 5-HT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL

po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003055) spadkiem poziomu stężenia 5-HT w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

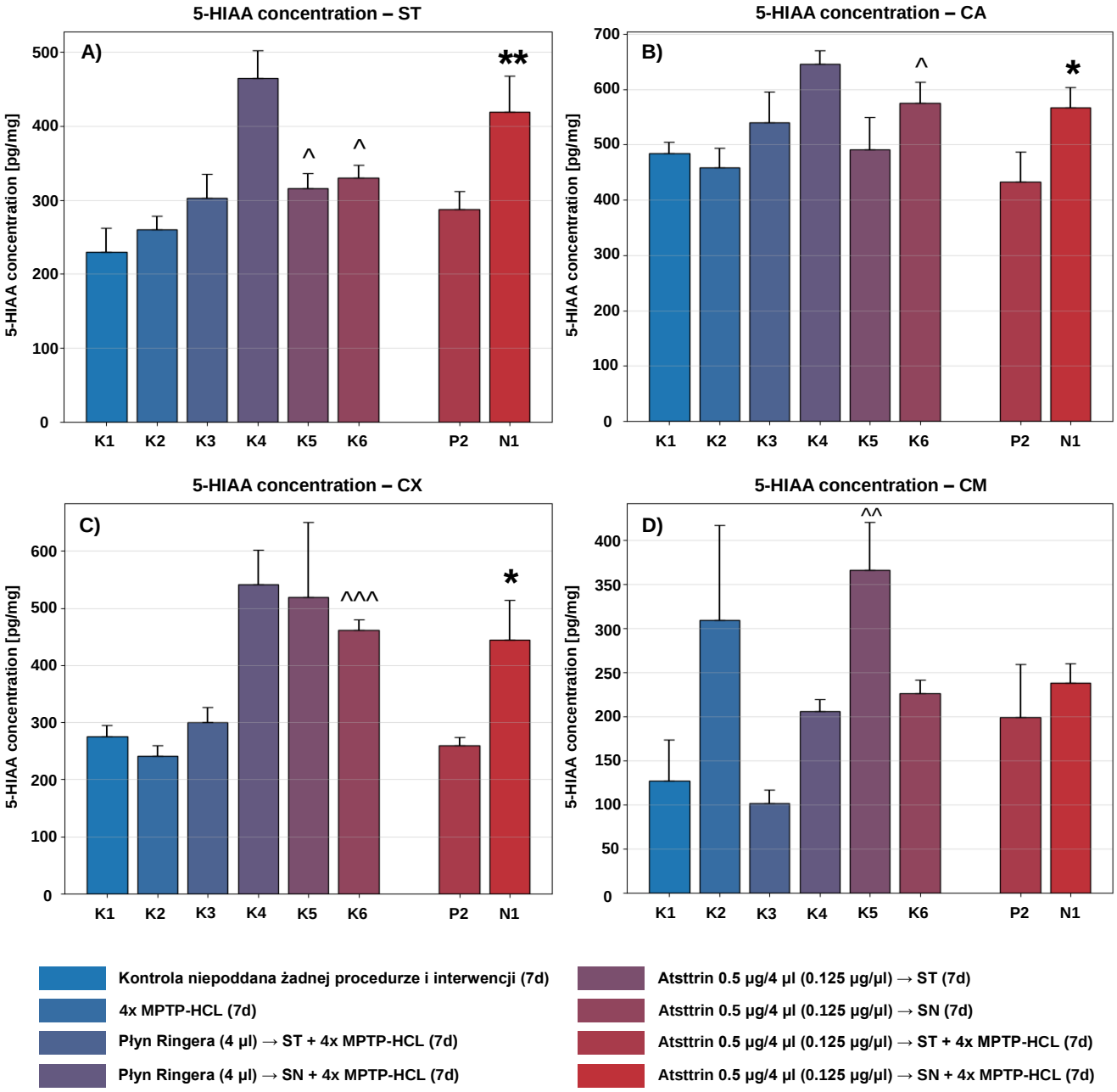


Rycina 66. Zmiany stężenia 5-HT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia pg/mg (ang. *concentration*) mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.12. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia 5-HIAA

Poziom stężenia 5-HIAA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 67). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0418715) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0158486) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0082217) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0439727) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0491303) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie CA w

porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000001) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0141848) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0046574) wzrostem poziomu stężenia 5-HIAA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia 5-HIAA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

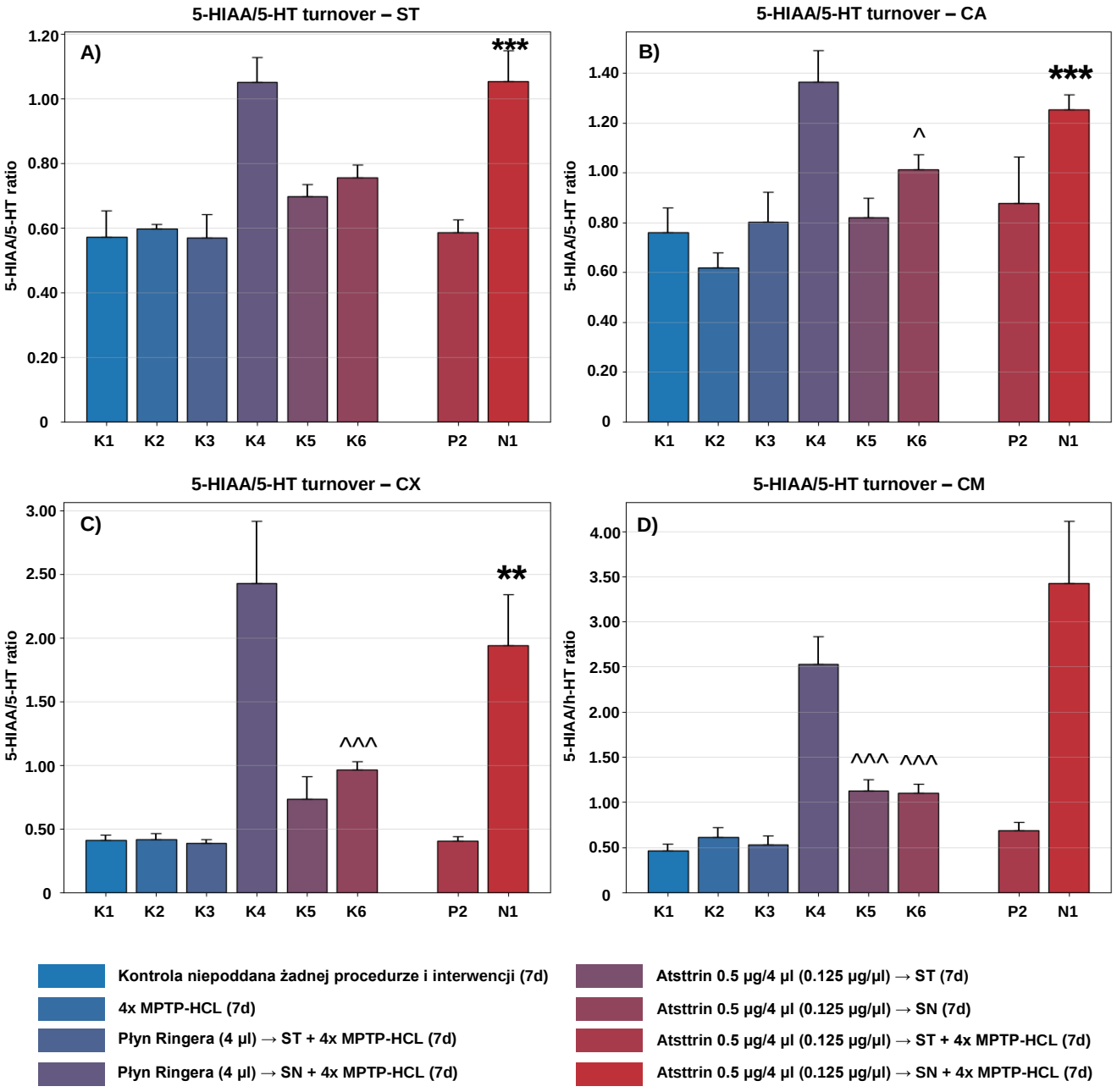


Rycina 67. Zmiany stężenia 5-HIAA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) pg/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.1.13. Ewaluacja i ocena stosunku poziomów stężenia 5-HIAA/5-HT

Poziom obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie stosunku wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 68). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0005119) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0458169) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000001) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie

domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000006) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0029463) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0004041) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000560) wzrostem poziomu obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).



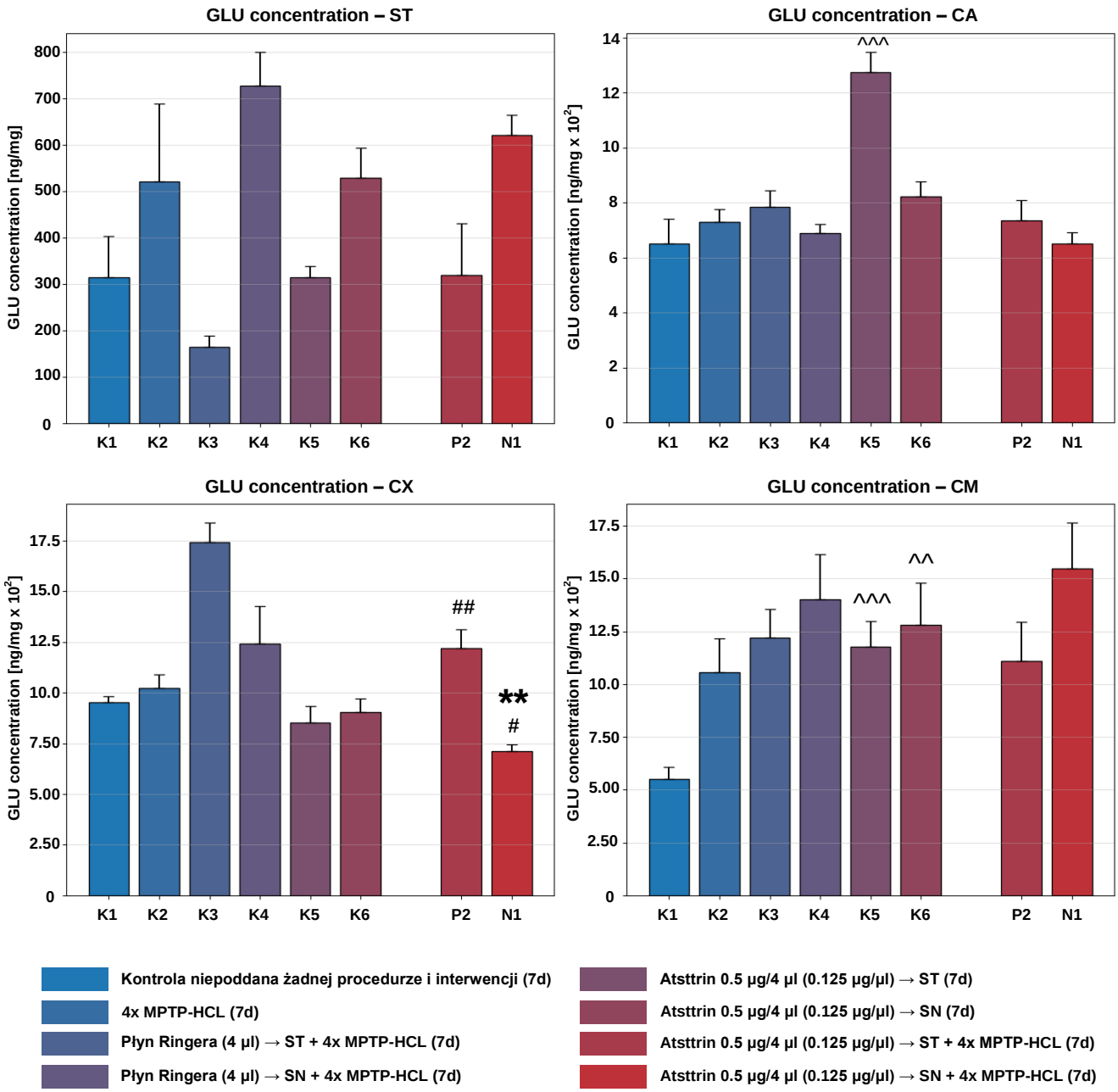
Rycina 68. Zmiany obrotów 5-HIAA/5-HT oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) wyznaczone w oparciu o stężenia oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stosunku stężenia (ang. *turnover ratio*) analizowanych monoamin. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2. Analiza zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń aminokwasów

4.2.2.2.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GLU

Poziom stężenia GLU w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 69). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0000400$) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6).

Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0031399) spadkiem poziomu stężenia GLU w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0017924/p=0.0210138) spadkiem poziomu stężenia GLU w obrębie CX w porównaniu do grup kontrolnych (K2/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0007185) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0034603) wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GLU w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1).

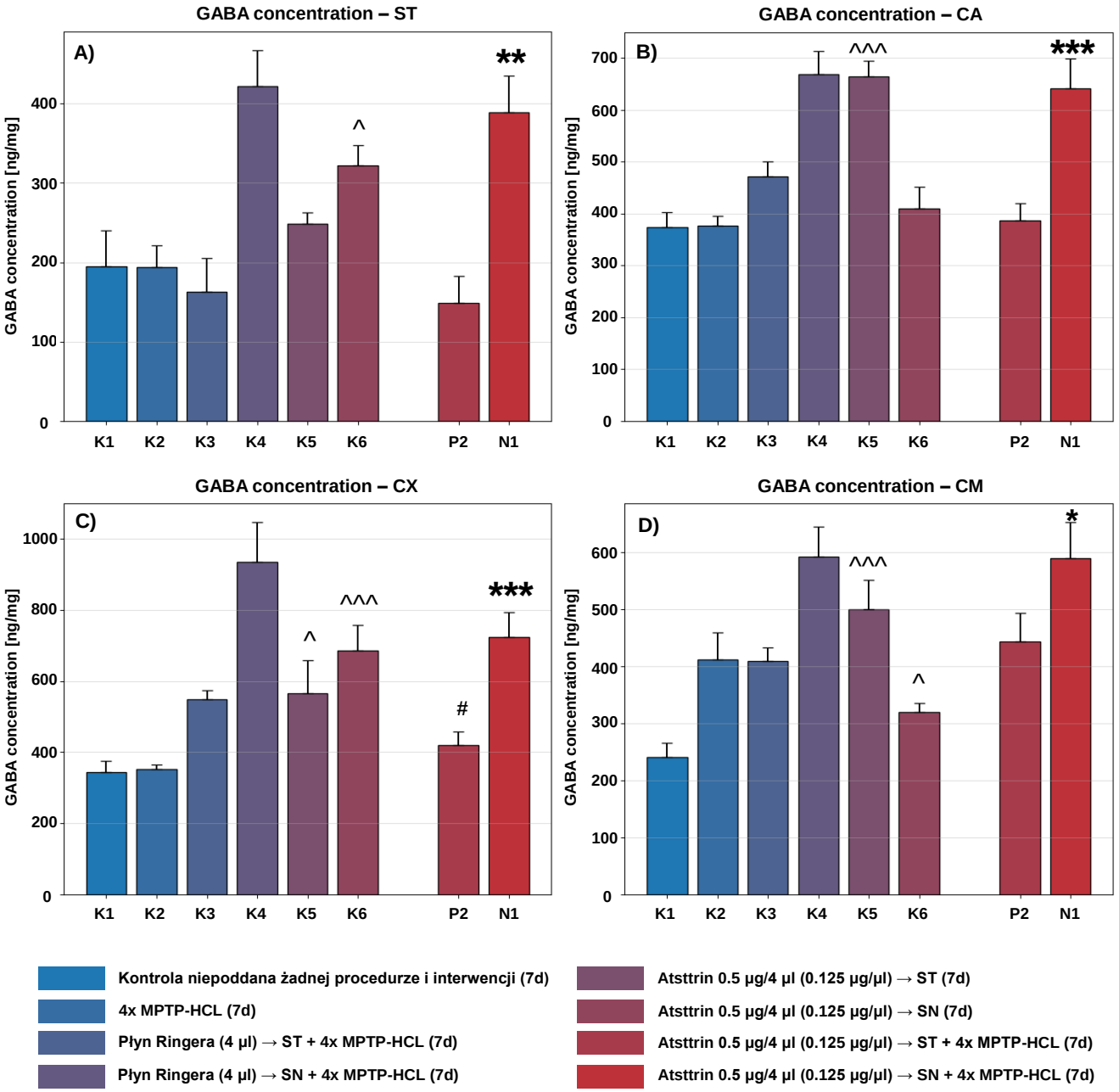


Rycina 69. Zmiany stężenia GLU oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.2. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia GABA

Poziom stężenia GABA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 70). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GABA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0256796) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GABA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0022771) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000002) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GABA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GABA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0006422) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego

podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0474540) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003612) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0171399) spadkiem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Odmiennie, wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0002015) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0007935) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0193541) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia GABA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0371299) wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).

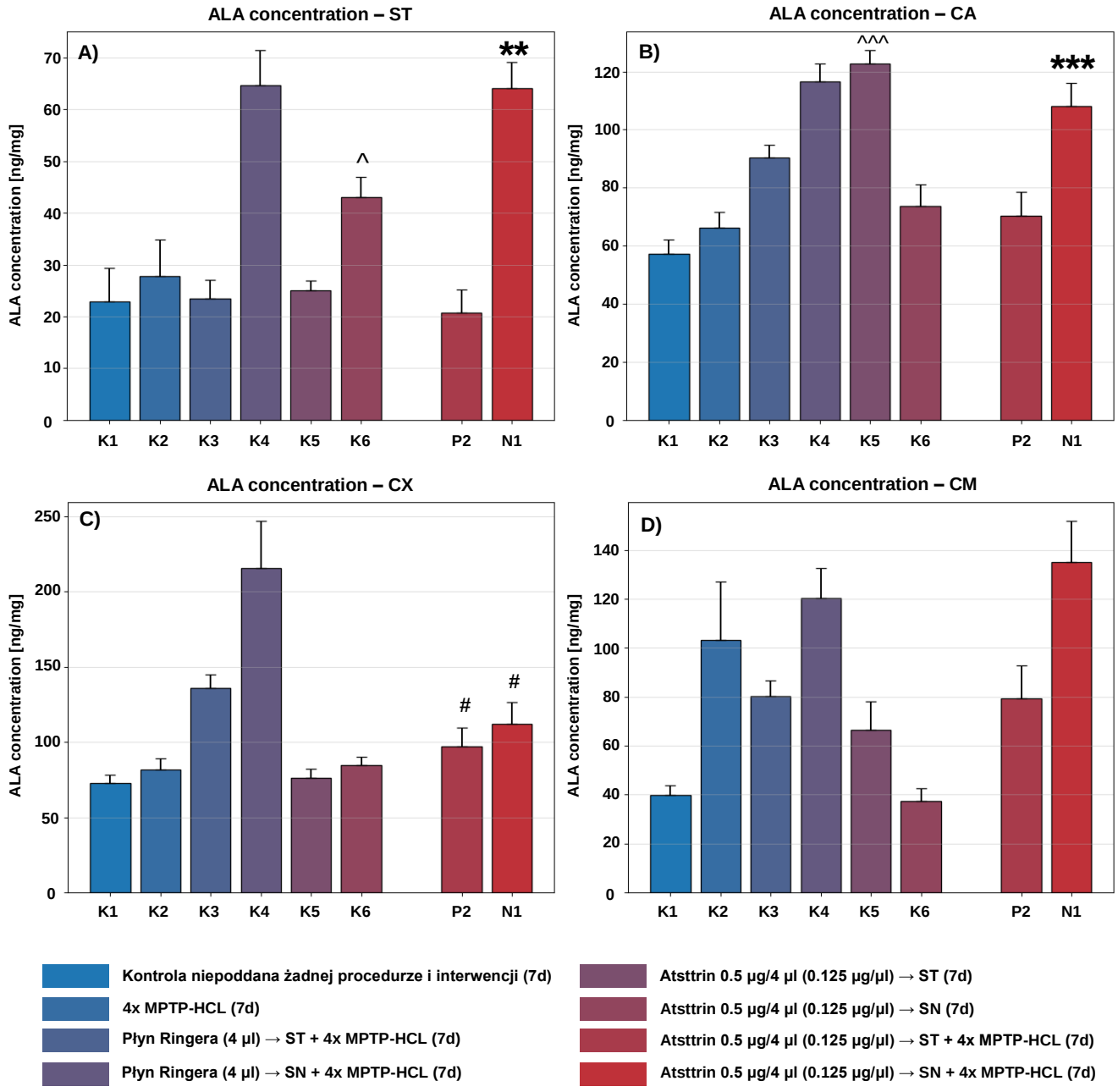


Rycina 70. Zmiany stężenia GABA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.3. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ALA

Poziom stężenia ALA w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 71). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0156242) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0010260) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.00000001) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0004328) wzrostem poziomu stężenia ALA w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia

ALA w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0296518) spadkiem poziomu stężenia ALA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K3). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0113780) spadkiem poziomu stężenia ALA w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ALA w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

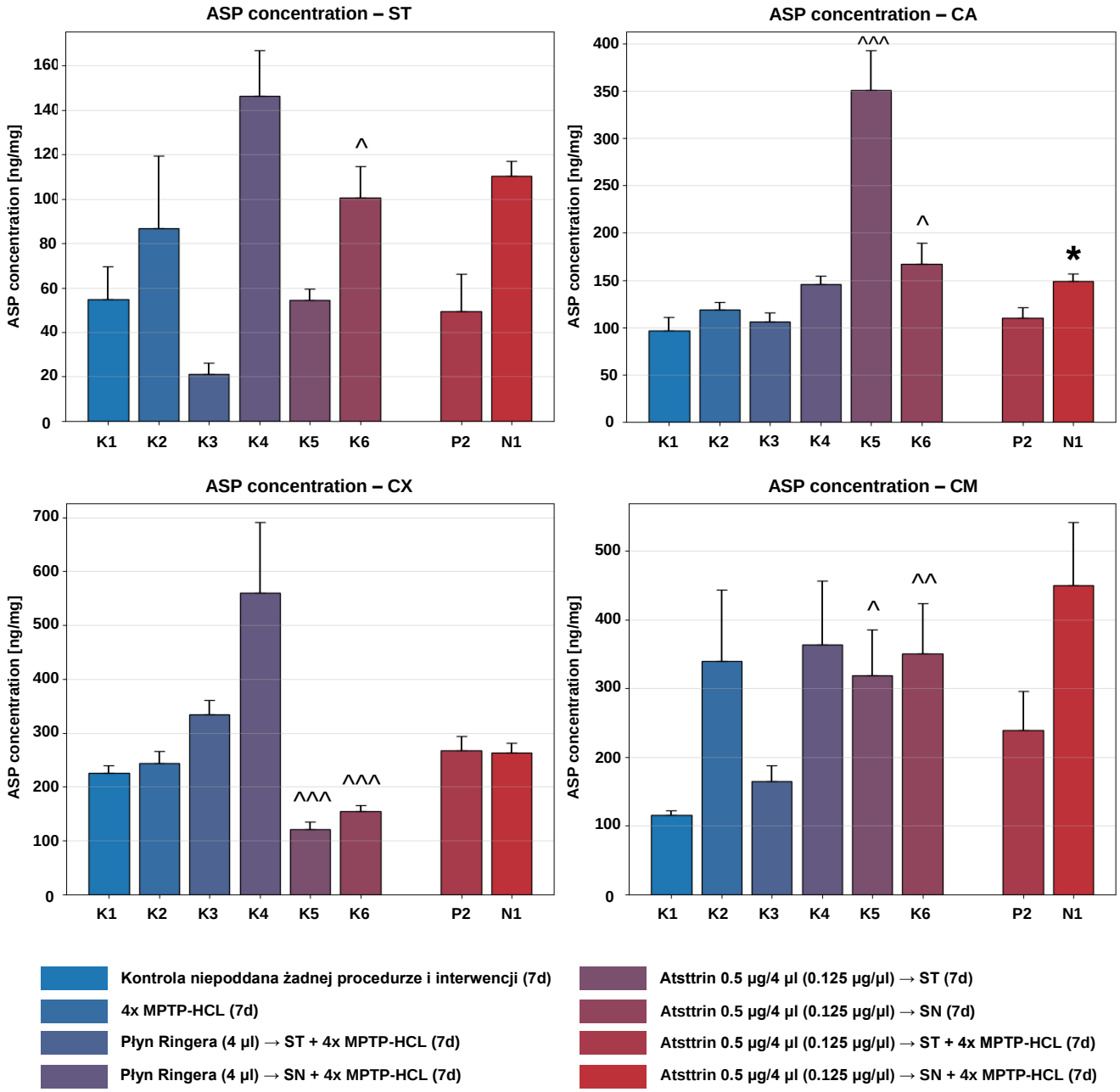


Rycina 71. Zmiany stężenia ALA oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.4. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia ASP

Poziom stężenia ASP w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 72). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0357392) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0001919) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0157020) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0129908) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego

podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000456) spadkiem poziomu stężenia ASP w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0005582) spadkiem poziomu stężenia ASP w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0154331) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0079807) wzrostem poziomu stężenia ASP w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia ASP w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 µg/µl (N1).

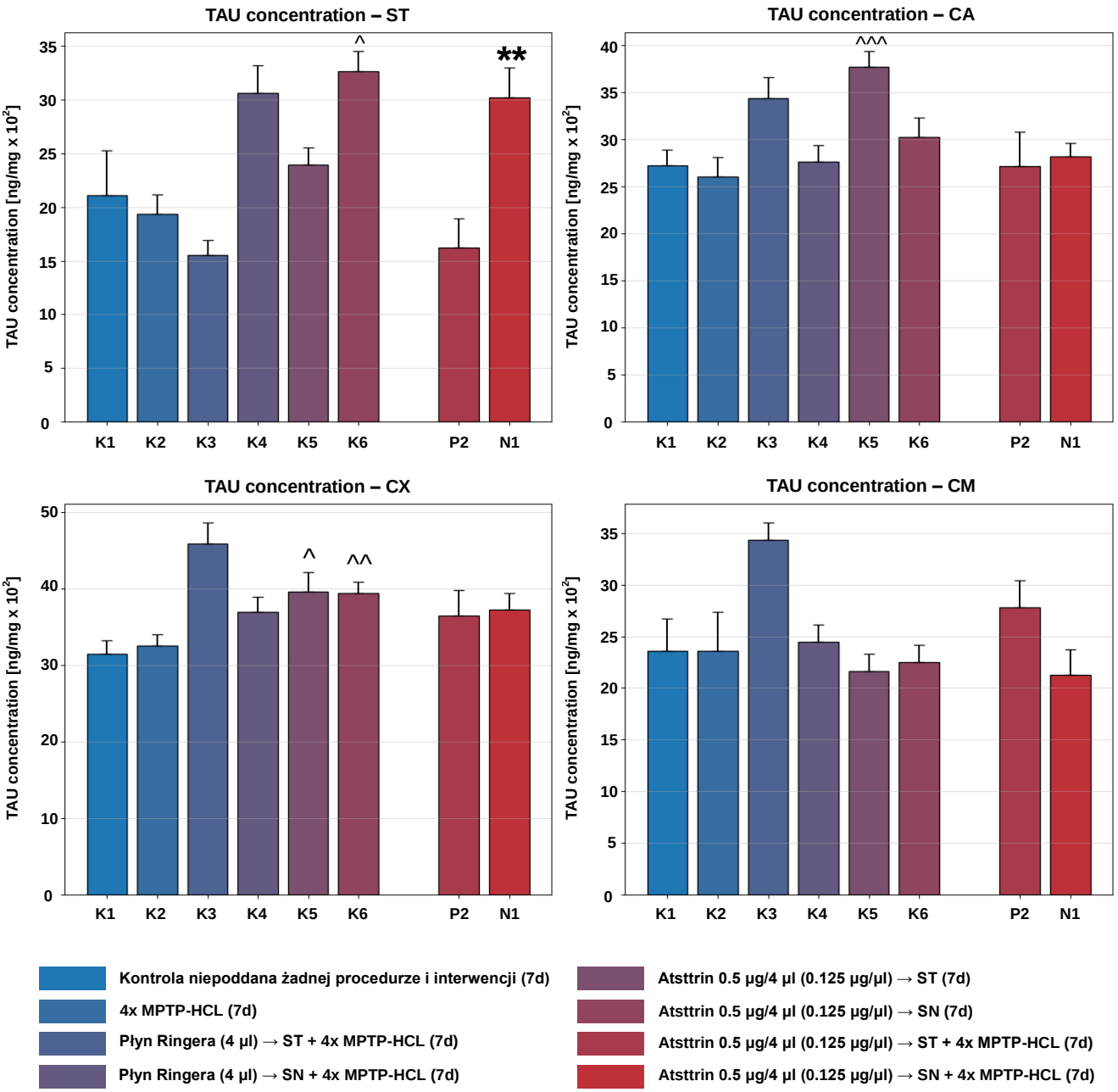


Rycina 72. Zmiany stężenia ASP oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.5. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia TAU

Poziom stężenia TAU w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 73). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0253909) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0040427) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003268) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt

niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0189689) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0030262) wzrostem poziomu stężenia TAU w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia TAU w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

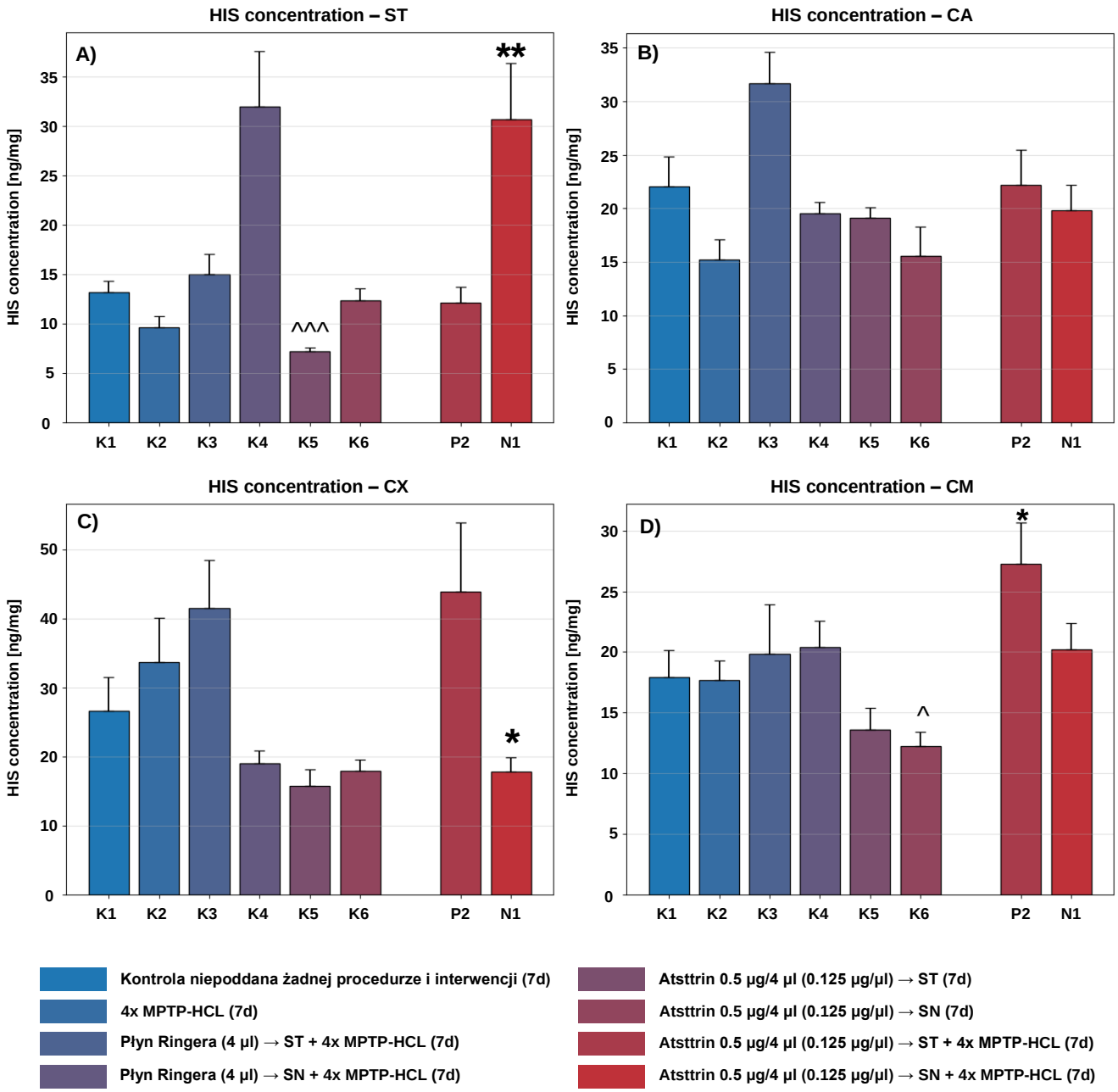


Rycina 73. Zmiany stężenia TAU oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.6. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia HIS

Poziom stężenia HIS w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 74). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003712) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0036094) wzrostem poziomu stężenia HIS w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CX u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST lub SN w dawce 0.125 μg/μl (K5/K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu

domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0445375) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CM u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0494226) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0328847) spadkiem poziomu stężenia HIS w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia HIS w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1).

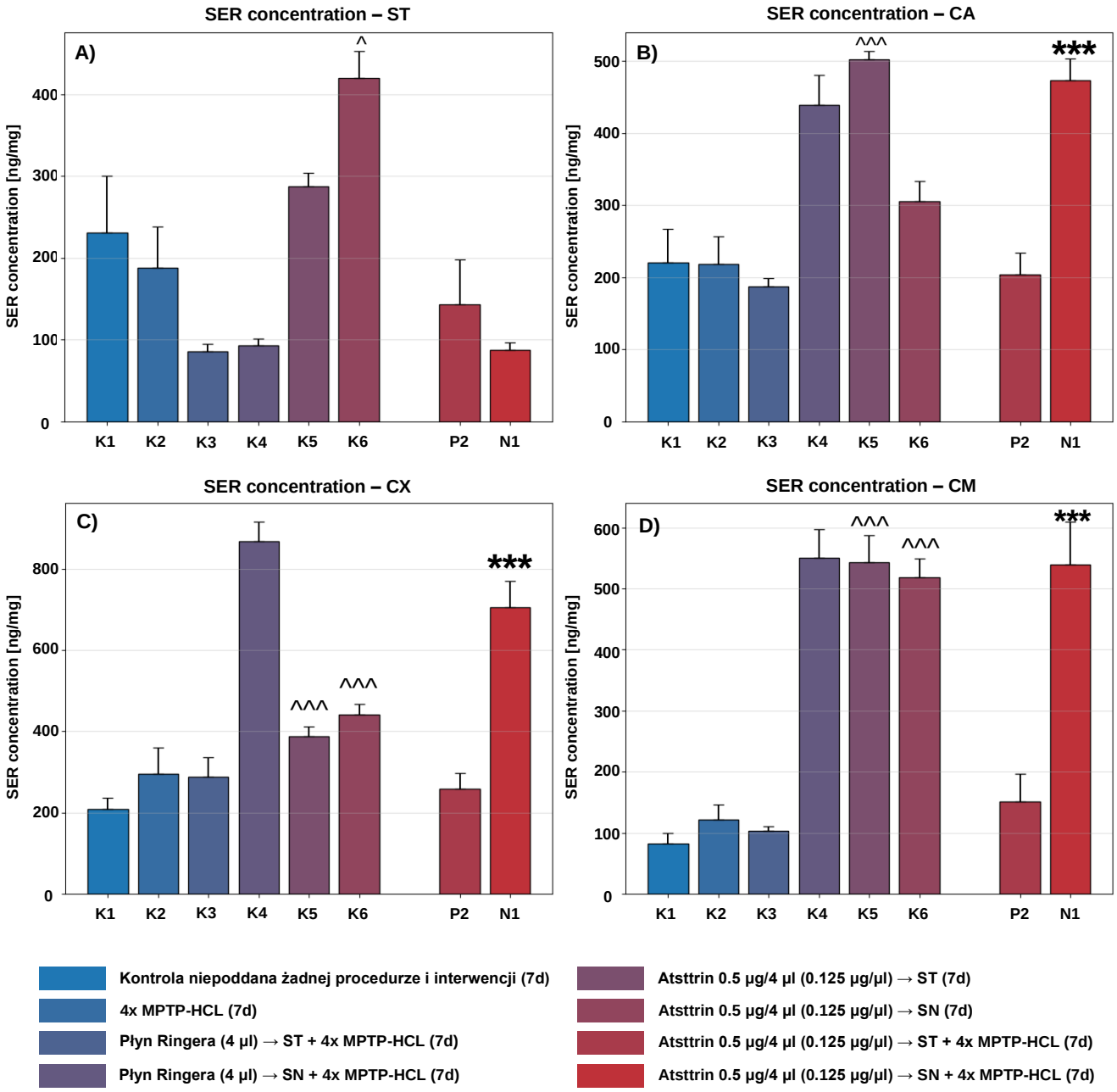


Rycina 74. Zmiany stężenia HIS oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

4.2.2.2.7. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia SER

Poziom stężenia SER w obrębie wybranych struktur neuroanatomicznych u myszy szczepu C57BL/6 w trakcie drugiej części badania (Etap 2) analizowano na podstawie wyników otrzymanych metodą HPLC (Rycina 75). Intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych (K2/K3/K4). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie ST u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0270631) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Analogicznie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie ST u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000928) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CA u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CA u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0001067) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CA w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt

niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000878) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000006) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CX u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0003247) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CX w porównaniu do grupy kontrolnej (K2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (K5) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.000002) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Analogicznie wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (K6) u zwierząt niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000000007) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia SER w obrębie CM u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL po wykonaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 μg/μl (P2). Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do SN w dawce 0.125 μg/μl (N1) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie (p=0.0000701) wzrostem poziomu stężenia SER w obrębie CM w porównaniu do grupy kontrolnej (K2).



Rycina 75. Zmiany stężenia SER oceniane w trakcie analizy eksperymentalnego wpływu Atsttrin w dawce 0.5 µg/4 µl (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST lub SN na potencjalny efekt neuroprotekcyjny u myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w prążkowiu - ST (A), hipokampie - CA (B), korze - CX (C) oraz móżdżku - CM (D) oznaczone metodą HPLC. Wyniki zostały wyrażone jako wartość stężenia (ang. *concentration*) ng/mg mokrej tkanki. Dane przedstawiono w postaci średnich ± SEM. * - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K2), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K3/K4), $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#}$p<0.001; ^ - różnica względem odpowiedniej grupy kontrolnej (K1), $^{\wedge}$p<0.05; $^{\wedge\wedge}$p<0.01; $^{\wedge\wedge\wedge}$p<0.001

DYSKUSJA

Choroba Parkinsona należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych i jest bezpośrednio związana z postępującą utratą kontrolujących funkcje motoryczne neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie SNpc [923]. W przebiegu choroby obserwuje się zmiany neuropatologiczne pod postacią konsolidacji dysfunkcyjnych neurofibrylarnych wtrętów ASN oraz stopniowo postępującą depigmentację obszaru SN [924]. Efektem występujących zmian neuropatologicznych jest kompleksowe zaburzenie równowagi między neuroprzekaźnikami układu pozapiramidowego, związane z obecnością klinicznych objawów ruchowych, jak również, w dalszych etapach zaawansowania choroby pojawieniem się zaburzeń pozaruchowych [925]. Istota patogenezy choroby Parkinsona jest związana z szeregiem procesów i mechanizmów, takich jak m. in. zaburzenia funkcji proteasomów, akumulacja ASN, zaburzenia funkcji mitochondriów i homeostazy energetycznej komórki, stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność GLU oraz reakcja neurozapalna [926]. Biorąc pod uwagę wieloczynnikowy charakter schorzenia nie można aktualnie jednoznacznie stwierdzić, który z opisywanych patomechanizmów jest najistotniejszy w perspektywie rozwoju i wystąpienia objawów choroby Parkinsona. Postępujące zmiany neurodegeneracyjne związane ze zmianami w funkcjonowaniu oraz regulacji miejscowej oraz systemowej odpowiedzi immunologicznej, wydają się stanowić jeden z ważniejszych mechanizmów patofizjologicznych uczestniczących w chorobie Parkinsona [927]. Wzajemnie powiązane patogenne mechanizmy neurodegeneracyjne są związane z pobudzeniem populacji komórek mikrogleju oraz astrogleju, jak również ze wzrostem poziomu ekspresji i syntezą szeregu mediatorów reakcji zapalnej takich jak cytokiny, chemokiny, białka ostrej fazy, cząsteczki adhezyjne, składowe układu dopełniacza oraz czynniki wzrostu [928]. Jednocześnie obserwuje się rekrutację i migrację komórek układu immunologicznego z obwodu, co dodatkowo wzmacnia i indukuje wytworzenie specyficznego mikrośrodowiska neurozapalnego, na które składają się zaburzenia w wielopoziomowych interakcjach w obrębie tzw. „sieci cytokin” oraz wystąpieniu kompensacyjnego zjawiska astroglejozy [929]. Rozwój reakcji neurozapalnej przyczynia się w istotny sposób do nasilenia i degeneracji neuronów dopaminergicznych, prowadząc w konsekwencji do zaistnienia całościowych zaburzeń neurochemicznych w obrębie szlak nigrostriatalnego [930]. Przypuszcza się, iż reakcja neurozapalna może również w pewnym stopniu wykazywać działanie

neuroprotekcyjne i stanowić mechanizm wzmacniający procesy kompensacyjne uruchamiane w obrębie uszkodzonych neuronów układu nigrostriatalnego [931]. Otwartą kwestią pozostaje fakt, czy reakcja neurozapalna stanowi proces pierwotny, który inicjuje zmiany neurodegeneracyjne, czy też odwrotnie, stanowi proces wtórny do zaistniałych zmian neurodegeneracyjnych. Rosnąca aktualnie liczba publikacji oraz doniesień naukowych ukierunkowuje uwagę na szczególną rolę reakcji neurozapalnej w patogenezie choroby Parkinsona [932]. Prowadzone prace badawcze wydają się być nakierowane na identyfikację nowych czynników molekularnych oraz opis mechanizmów zapalnych zaangażowanych w rozwój procesów neurodegeneracyjnych, co podkreśla szczególne znaczenie tego kierunku badań [933]. Analogicznie rozwijany równolegle kierunek badań stanowią eksperymenty polegające na bezpośrednich podaniach domózgowych za pomocą metod stereotaktycznych aktywnych form czynników wzrostu, neuromorfogenów, cytokin, związków neuroprotekcyjnych oraz rekombinowanych form pochodnych tych związków do struktur głębokich mózgu lub układu komorowego [934]. Istotę tych kierunków badań a jednocześnie wyzwanie w terapii choroby Parkinsona stanowi w tym przypadku optymalizacja i udoskonalenie leczenia farmakologicznego jak również dalszy rozwój medycyny regeneracyjnej w zakresie możliwie trwałego uzupełnienia niedoboru DA poprzez odbudowę neuronów w obrębie układu nigrostriatalnego, wpywając ostatecznie na kliniczną poprawę u leczonych pacjentów [935]. Pomimo znacznego postępu w rozumieniu patomechanizmów leżących u podstaw choroby Parkinsona, nadal nie jest dostępna terapia stanowiąca adekwatne leczenie przyczynowe, która efektywnie zatrzymałaby lub spowolniła naturalny przebieg choroby.

Jednym z zidentyfikowanych w niedawnym czasie czynników molekularnych, który zwrócił szczególną uwagę badaczy różnych dyscyplin neuronauk oraz klinicystów stanowi PGRN [936]. Związek ten poprzez wykazywane właściwości neurotroficzne, przeciwzapalne i immunomodulujące może potencjalnie znaleźć zastosowanie w diagnostyce i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [937]. PGRN jest białkiem biorącym udział w wielu procesach fizjologicznych oraz patofizjologicznych zachodzących w obrębie OUN jak i poza nim, które obejmują, ale nie ograniczają się do embriogenezy, angiogenezy, nowotworzenia, regeneracji tkanek, zjawiska insulinooporności, metabolizmu tkanki chrzęstnej i kostnej oraz modulowania przebiegu procesów autoimmunologicznych [938]. Zmiany w ekspresji lub strukturze PGRN mogą uczestniczyć w patomechanizmach komórkowych odpowiedzi na czynniki

genetyczne, hormonalne, środowiskowe oraz osobnicze. PGRN reguluje wielopoziomowo i wielokierunkowo homeostazę oraz funkcje neuronalne pełniąc funkcję unifikacyjną jako czynnik neurotroficzny wpływający na powstawanie, różnicowanie oraz rozwój neuronów [939]. Niezwykle istotną właściwością PGRN jest jej potencjał do bezpośredniego wpływu na przekaźnictwo związane z TNF-α oraz do wiązania się z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 i tym samym hamowanie przekaźnictwa w obrębie tej osi sygnałowej wykazując działanie przeciwzapalne [940]. Aktualnie w praktyce klinicznej nie są dostępne leki bezpośrednio bazujące na strukturze molekularnej PGRN, wpływające na poziom ekspresji mRNA genu kodującego PGRN lub stężenia samego białka.

Atsttrin stanowi nowe rekombinowane białko, którego budowa molekularna została oparta na strukturze łańcuchów polipeptydowych trzech domen PGRN odpowiadających bezpośrednio za łączenie się i interakcję z receptorami TNFR1 oraz TNFR2 [941]. Istotna część opublikowanych do tej pory badań na modelach przedklinicznych sugeruje, iż przeciwzapalne działanie Atsttrin w sensie farmakodynamicznym potencjalnie przewyższa PGRN i inne dobrze znane leki będące antagonistami TNF-α [942]. Te same badania eksperymentalne i użyte modele doświadczalne wskazują, że potencjalnie związki oparte na strukturze PGRN, takie jak Atsttrin, mogą stanowić obecnie jedne z bardziej obiecujących i innowacyjnych środków terapeutycznych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, u podłoża który stoją zjawiska neurozapalne.

Zagadnieniem naukowym analizowanym w prezentowanej pracy doktorskiej były badania nad wpływem bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6. Wykonane badania eksperymentalne i analizy badawcze miały na celu wyjaśnienie czy zastosowanie Atsttrin może być potencjalnie skuteczne w terapii choroby Parkinsona wykazując zakładane działanie neuroprotekcyjne, jak również potencjalnie implikować opracowanie a następnie zastosowanie w przyszłości nowych celowanych terapii opartych na tym związku w praktyce klinicznej. Dodatkowym i równie ważnym założeniem pracy było uzupełnienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin, jak również optymalizacja i walidacja alternatywnej metody podania związku obejmującą bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową w popularnym i uznanym modelu choroby

Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6. Do przeprowadzenia eksperymentów i badań wybrano zwierzęta starzejące się, w wieku 10-12 miesięcy, gdzie przyjmuje się że jest to wiek najbardziej zbliżony do czasu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych choroby Parkinsona u ludzi [943]. W tym przypadku modele choroby Parkinsona, które są opracowywane i używane z zastosowaniem starzejących się zwierząt najpełniej oddają stan funkcjonalny OUN, w obrębie którego dochodzi do pojawienia się pierwszych, specyficznych zmian i objawów związanych z chorobą Parkinsona. Pierwszym celem prezentowanej pracy doktorskiej była analiza ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej, koniecznej do identyfikacji potencjalnie skutecznej terapeutycznie i bezpiecznej dawki związku. Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe należy stwierdzić, iż do czasu powstania prezentowanej pracy doktorskiej nie podejmowano prób bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin w warunkach eksperymentalnych i klinicznych. W związku z tym nie było także wcześniej ustalonej dawki oraz stężenia Atsttrin do podań tą drogą. Kierując się danymi literaturowymi z dotychczas przeprowadzonych badań, w większości dotyczących układu mięśniowo-szkieletowego na analogicznych modelach zwierzęcych u myszy, dokonano predefiniowanej ekstrapolacji pięciu wzrastających dawek Atsttrin wynoszących odpowiednio 0.1 μg (0.025 μg/μl), 0.5 μg (0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl), 2 μg (0.5 μg/μl) oraz 5 μg (1.25 μg/μl) [816]. W badaniach przedstawionych przez Tang i wsp. stwierdzono, iż zastosowanie dootrzewnowej iniekcji Atsttrin w dawce 0.5 mg/kg masy ciała u myszy szczepu C57BL/6 zapobiega znacząco rozwojowi zmian zwyrodnieniowych na modelu CIA [816]. Dodatkowo stwierdzono, że zastosowanie wyższej dawki związku (10 mg/kg masy ciała) zapewnia długotrwała regresję zmian zapalnych przez okres około 3 tygodni. W kolejno przeprowadzonych przez Lai i wsp. analizach na analogicznym modelu u myszy szczepu DBA1/J zastosowano dootrzewnową iniekcję Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg masy ciała, co było związane ze spadkiem stężenia oligomerycznego białka macierzy chrząstki (COMP) w surowicy oraz regresją zmian zapalnych w stawach zwierząt [944]. W innej pracy przedstawionej przez Tian i wsp. podobnie posłużono się modelem CIA indukowanym u myszy DBA1/J, gdzie również stosowano Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg masy ciała [819]. W badaniach przedstawionych przez Wei i wsp. stwierdzono iż zastosowanie bezpośredniej iniekcji dostawowej Atsttrin w dawce

1 µg/µl (6 µg) u myszy szczepu C57BL/6 również zapobiega rozwojowi zmian zwyrodnieniowych w modelu choroby zwyrodnieniowej stawów (łac. *osteoarthritis*) indukowanej destabilizacją łąkotki przyśrodkowej (DMM) [945]. W badaniach Zhao i wsp. na modelu zapalenia skóry indukowanego oksazolonem ($C_3H_3NO_2$) u myszy szczepu C57BL/6 wykazano, iż dootrzewnowa iniekcja Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg wykazuje terapeutyczny efekt [823]. W innym badaniu przedstawionym przez Liu i wsp. w modelu zapalenia mózgu (łac. *encephalitis*) u myszy szczepu C57BL/6 indukowanym bezpośrednią dokomorową iniekcją LPS w dawce 10 µg/µl (1 µl) stwierdzono, iż zastosowanie dootrzewnowej iniekcji Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg masy ciała wpływa korzystnie na zahamowanie procesów neurozapalnych [946]. W opracowaniu Wang i wsp. w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego (SCI) u myszy szczepu C57BL/6 wykazano, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.64 µg/µl (1.6 µg) zawartej w układzie opartym na kopolimerze triblokowym poli(L-laktyd-ko-glikolid)-blok-poli(tlenek etylenu) (PLGA-PEG-PLGA) wiązało się z poprawą stanu neurologicznego zwierząt oraz ograniczeniem zmian neurozapalnych [947]. W analizach przeprowadzonych przed Hettinghouse i wsp. dotyczących hamowania aktywacji układu TNF-α/ NF-κB obserwowanego poprzez zjawisko bioluminescencji *in vivo* używano Atsttrin w dawce 2.5-5 mg/kg masy ciała podanej drogą dootrzewnową u myszy szczepu C57BL/6 [948]. Podobne dawki Atsttrin stosowano również na modelu choroby zwyrodnieniowej krążka międzykręgowego (IVDD) w badaniach Wang i wsp., gdzie używano dawki 2.5 mg/kg masy ciała zwierzęcia [949]. W pracy przedstawionej przez Katyal i wsp. posłużono się modelem choroby zwyrodnieniowej stawów indukowanej transekcją więzadła krzyżowego przedniego u królików nowozelandzkich (łac. *Oryctolagus cuniculus*), gdzie stwierdzono, iż zastosowanie bezpośredniej iniekcji dostawowej Atsttrin w dawce 0.5 mg wpływa na spowolnienie patologicznych zmian chrząstki stawowej [950]. Biorąc pod uwagę zakres dawek Atsttrin opisanych w dostępnych opracowaniach oraz średnią masę myszy szczepu C57BL/6 w wieku 10-12 miesięcy wynoszącą 30 ± 5 g, można przyjąć że terapeutyczna dawka związku w przeliczeniu na dane dostępne w literaturze wynosi ~0.075-0.15 mg. Wyznaczone przez nas empirycznie wzrastające dawki Atsttrin w odpowiednim stężeniu i objętości zostały predefiniowane i ekstrapolowane przez przyjęcie korekty dotyczącej istniejących ograniczeń anatomicznych związanych z domózgową drogą podania związku za pomocą metod stereotaktycznych uwzględniającą wielkość i lokalizację struktur neuroanatomicznych stanowiących cel, sąsiedztwo obszarów krytycznych oraz możliwe

uniknięcie efektu ablacyjnego. W tym momencie warto ponownie odnieść się do wyboru bezpośredniej domózgowej drogi podania Atsttrin, gdzie z powodu uwarunkowań biochemicznych i fizykochemicznych cząsteczka ta wydaje się nie przekraczać BBB, co uniemożliwia jej obwodowe podanie. Procedury eksperymentalne oraz następcze analizy przy użyciu metod molekularnych i biochemicznych w pierwszej części badania zgodnie z założonym protokołem obejmowały myszy szczepu C57BL/6 otrzymujące bilateralnie predefiniowane wzrastające dawki Atsttrin do ST, które zostały poddane dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Z uwagi na wstępny charakter oznaczeń w pierwszej części badania, ograniczono się do wykonania iniekcji do jednego celu stereotaktycznego obejmującego ST, będącego największą strukturą spośród jąder podstawnych i struktur podkorowych, stanowiąc przez to stosunkowo dostępną strukturę cechującą się znaczną objętością w stosunku do innych części mózgu myszy oraz względnie dogodną lokalizacją neuroanatomiczną [951]. Pod względem neurofizjologicznym wybór tej struktury neuroanatomiczej był podyktowany jej rolą jako głównego ośrodka integrującego i regulującego sygnały w obrębie układu nigrostriatalnego, przez co analizy po przeprowadzonej interwencji eksperymentalnej pozwoliły na szerokospektralną ocenę neurofunkcjonalną tego układu. Analogicznie liczba zwierząt, zakres wyizolowanych struktur neuroanatomicznych oraz panel badanych oznaczeń został odpowiednio ograniczony celem ogólnej, ale jednocześnie dostatecznie precyzyjnej, ewaluacji stopnia nasilenia reakcji neurozapalnej i stanu neurofunkcjonalnego umożliwiającej identyfikację dawki Atsttrin cechującej się optymalnym efektem farmakologicznym oraz jednocześnie prezentującej dostatecznie wysoki poziom bezpieczeństwa w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu. W pierwszej części badania oceniającej wpływ wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt celem identyfikacji terapeutycznej dawki związku dokonano oceny poziomu ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym poprzez ocenę ilości mRNA w wybranych wyizolowanych strukturach mózgu używając metody Real-Time PCR. Analizie poddano kolejno panel cytokin i mediatorów zapalnych takich jak IL-1α (ST, CA, CX oraz CM), TNF-α (ST, CA, CX oraz CM), IL-6 (ST, CA, CX oraz CM), COX-2 (ST) oraz IFN-γ (ST). Ewaluacja poziomu ekspresji IL-1α, TNF-α oraz IL-6 w trakcie dawkozależnej części badania została przeprowadzona we wszystkich czterech wyizolowanych strukturach z uwagi na ich nadrzędną rolę w kształtowaniu procesów odpowiedzi neuroimmunologicznej w obrębie OUN. Cytokiny te cechują się najbardziej

prominentnym oddziaływaniem neurotoksycznym, mogąc wpływać na zakres neurouszkodzeń również w sposób pośredni poprzez uruchamianie szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do syntezy różnego typu mediatorów zapalnych [952]. Faktem oczywistym jest, że z punktu widzenia badania Atsttrin stanowi związek bezpośrednio antagonizujący TNF-α, co jednoznacznie nakierowuje tok analiz w stronę dokładnej ewaluacji tej osi sygnałowej już w pierwszej, wstępnej części badań. Z uwagi na ograniczony charakter analiz w tym etapie dokonano ewaluacji poziomu ekspresji COX-2 jedynie w obrębie ST. Do tej grupy włączono również na tym etapie badań arbitralnie IFN-γ, który odgrywa rolę regulatora i modulatora odpowiedzi zapalnej wpływając na aktywację komórek układu immunologicznego, dokonując ewaluacji poziomu jego ekspresji w obrębie ST. Kolejno dokonano analizy poziomu ekspresji IL-10, stanowiącej najbardziej prominentnego przedstawiciela cytokin i mediatorów przeciwzapalnych, gdzie jednocześnie z uwagi na założony przez nas charakter analiz na w tym etapie badań, skupiający się na nasileniu reakcji zapalnej, dokonano jedynie ewaluacji jej poziomu ekspresji w obrębie ST. Następnie poddano analizie wybrane parametry stresu oksydacyjnego i nitracyjnego takie jak iNOS oraz nNOS, których synteza jest aktywowana nawet w obecności niewielkich ilości aktywatorów zapalnych, skutkując produkcją wolnych rodników, co analizowano wstępnie poprzez ocenę poziomu ich ekspresji w obrębie ST. Kolejno dokonano analizy poziomu ekspresji czynników wzrostu i neurotroficznych takich jak TGF-β oraz BDNF celem wstępnej oceny, czy Atsttrin może stymulować ich syntezę wykazując potencjał neuroprotekcyjny, co oceniano w obrębie ST. Ostatnimi analizowanymi w pierwszej dawko-zależnej części badania parametrami były enzymy związane z metabolizmem neuroprzekaźników takie jak TH (ST, CA, CX oraz CM) oraz TG2 (ST, CA, CX oraz CM). TH stanowi kluczowy enzym metabolizmu DA, odpowiadający za przemianę L-TYR do L-DOPA, którego obecność stanowi istotny wskaźnik poziomu nasilenia zmian neurodegeneracyjnych [953]. Z kolei, TG2 jest enzymem zaangażowanym w procesy neurodegeneracyjne promując powstawanie wielkocząsteczkowych agregatów białkowych ASN, gdzie nasilenie tego procesu stanowi ekwiwalent progresji zachodzenia zmian neuropatologicznych [954].

Analizując profil ekspresji cytokin i mediatorów zapalnych w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy w pierwszej kolejności zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α, TNF-α oraz IL-6 w

obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących aktywację mechanizmów neurozapalnych, jak również pozostaje punktem odniesienia dla celu analizy, jakim była identyfikacja spadków poziomów ekspresji tych cytokin po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin [955]. Podobną tendencję dotyczącą wzrostu ekspresji mRNA po podaniu MPTP-HCL obserwowano w stosunku do COX-2 oraz IFN-γ w obrębie ST. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji IL-1α najbardziej efektywną okazała się dawka 0.5 μg (0.125 μg/μl), która spowodowała istotny statystyczne spadek poziomu ekspresji tej cytokiny w obrębie ST. Pozostałe dawki nie powodowały istotnych statystyczne i ważnych dla tego etapu badań zmian w poziomie ekspresji tej cytokiny w ST oraz w innych strukturach neuroanatomicznych. Oddziaływanie wszystkich pięciu zastosowanych dawek Atsttrin nie było związane z istotnym statystyczne dla tego etapu badań spadkiem poziomu ekspresji TNF-α w obrębie wszystkich ocenianych strukturach neuroanatomicznych. Istotna w tym przypadku była obserwowana tendencja spadku poziomu ekspresji TNF-α po podaniu Atsttrin, która była najbardziej prominentna w obrębie ST, jak również pozostałych strukturach neuroanatomicznych po zastosowaniu dwóch najmniejszych dawek takich jak 0.1 μg (0.025 μg/μl) oraz 0.5 μg (0.125 μg/μl). Analogiczne, obserwacje dotyczące braku jednoznacznej istotności statystycznej oraz tendencję zmiany poziomu ekspresji pod wpływem pięciu zastosowanych dawek Atsttrin zaboserwowano w odniesieniu do IL-6 oraz IFN-γ. W przypadku COX-2 skuteczne okazały się dawki 0.5 μg (0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl) oraz 5 μg (1.25 μg/μl), których zastosowanie było związane z istotnym statystycznie spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla tego enzymu w obrębie ST. Biorąc pod uwagę profil ekspresji cytokin i mediatorów zapalnych w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy zauważyć, iż zastosowanie wyższych dawek Atsttrin w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania nie wiązało się z oczekiwanym efektem neuroprotekcyjnym, lecz w niektórych przypadkach z obserwowaną tendencją odwrotną, która jednakże nie była istotna statystycznie. Zasadnym, biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi spadku ekspresji cytokin i mediatorów zapalnych, na tym etapie badań wydaje się potencjalnie wybór jednej z dwóch pierwszych ocenianych dawek Atsttrin. Jedyną ewaluowaną cytokiną i czynnikiem przeciwzapalnym, z uwagi

na wspomniany wcześniej ograniczony charakter analiz w tym etapie badań była IL-10. W tym przypadku zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji tej cytokiny w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin w dawce 0.1 μg (0.025 μg/μl), gdzie zastosowanie kolejno wyższych dawek związku nie przyniosło oczekiwanego efektu neuroprotekcyjnego w postaci wzrostu poziomu ekspresji tej cytokiny. Analizując profil ekspresji wybranych parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego, w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS oraz nNOS w obrębie ST wśród grup kontrolnych. Obserwacja ta również pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących aktywację mechanizmów neurozapalnych wykazujących komponentę stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz stanowi punkt odniesienia dla celu analizy jakim była ocena spadków poziomów ekspresji tych enzymów po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin [956]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji iNOS najbardziej efektywne okazały się dawki 0.5 μg (0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl), 2 μg (0.5 μg/μl) oraz 5 μg (1.25 μg/μl), które spowodowały istotny statystyczne spadek poziomu ekspresji tego enzymu w obrębie ST. Istotna w tym przypadku była obserwowana tendencja spadku poziomu ekspresji iNOS po zastosowaniu wzrastającej dawki związku. Analogicznych obserwacji dokonano w odniesieniu do ekspresji nNOS, gdzie nie wykazano jednoznacznej istotności statystycznej, jednak ważna w tym przypadku była tendencja do spadku poziomu ekspresji tego enzymu po zastosowaniu coraz większej dawki związku. Zasadnym, biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi spadku wybranych parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego, na tym etapie badań, wydawał się potencjalnie wybór jednej z wyższych ocenianych dawek Atsttrin. Analizując profil ekspresji wybranych czynników wzrostu i neurotroficznych, w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β oraz BDNF w obrębie ST wśród grup kontrolnych. Co ciekawe, obserwacje te również pozostają w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących profil ekspresji tych

czynników oraz stanowią punkt odniesienia dla celu analizy jakim była identyfikacja adekwatnych potencjalnych wzrostów poziomów ekspresji tych czynników po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin [957]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji TGF-β zastosowanie dawki 0.5 μg (0.125 μg/μl) było związane z istotnym statystycznie spadkiem poziomu ekspresji tego czynnika w obrębie ST. Dane dotyczące poziomu ekspresji BDNF nie wykazały jednoznacznej istotności statystycznej, jednak kluczowa w tym przypadku była tendencja do spadku poziomu ekspresji tego czynnika po podaniu coraz większej dawki Atsttrin. Zasadnym, biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi spadku wybranych czynników wzrostu i neurotroficznych, na tym etapie badań wydaje się potencjalnie wybór jednej z niższych ocenianych dawek Atsttrin. Analizując profil ekspresji wybranych parametrów związanych z metabolizmem neurotransmiterów oraz nasileniem zmian neurodegeneracyjnych, w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu ekspresji mRNA dla TH w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych oraz średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TG2 w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. Obserwacja ta również pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących profil ekspresji tych czynników oraz stanowi punkt odniesienia dla celu analizy jakim była identyfikacja adekwatnych wzrostów oraz spadków poziomów ekspresji tych enzymów w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin [958]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji TH zastosowanie dawki 1 μg/4 μl (0.25 μg/μl) było związane z najbardziej istotnym statystycznie wzrostem poziomu ekspresji tego enzymu w obrębie ST. W odniesieniu do innych struktur neuroanatomicznych obserwowano istotnie statystyczne wzrosty poziomu ekspresji TH zazwyczaj przy zastosowaniu tej i kolejno wyższych dawek Atsttrin. Analogiczne obserwacje dotyczące poziomu ekspresji TG2 nie wykazały istotności statystycznej w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych poza obserwowanym istotnym statystycznie wzrostem ekspresji w

obrębie CA po użyciu dawki 0.5 µg (0.125 µg/µl) zastosowanej w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST. Zasadnym, biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi zmian ekspresji wybranych parametrów związanych z metabolizmem neurotransmiterów oraz nasileniem zmian neurodegeneracyjnych, na tym etapie badań wydawał się potencjalnie wybór jednej z pośrednich ocenianych dawek Atsttrin. W pierwszej części badania oceniającej wpływ wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt celem identyfikacji terapeutycznej dawki związku dokonano także ewaluacji zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń określonych neurotransmiterów w wybranych wyizolowanych strukturach mózgu używając metody HPCL. Analizie poddano kolejno panel monoamin (ST, CA, CX oraz CM) takich jak DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA, jak również aminokwasów (ST, CA, CX oraz CM) takich jak GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER. Kompleksowa ewaluacja zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego w trakcie dawkozależnej części badania została przeprowadzona we wszystkich czterech wyizolowanych strukturach neuroanatomicznych celem wstępnej oceny funkcji i wzajemnej interakcji układów dopaminergicznego, noradrenergicznego, serotoninergicznego, glutaminergicznego oraz GABA-ergicznego. Główną intencją tych oznaczeń na tym etapie badań była ewaluacja poziomu stężeń DA oraz jej metabolitów z uwagi na ich nadrzędną rolę w patogenezie choroby Parkinsona [959]. Poziom stężenia DA jako głownego neuroprzekaźnika biorącego udział w patofizjologii choroby Parkinsona stanowi w tym przypadku najbardziej prominentny i użyteczny wskaźnik zakresu powstałych neurouszkodzeń. Faktem oczywistym jest, że z punktu widzenia hipotezy przeprowadzonego badania Atsttrin uznano za związek bezpośrednio wpływający na potencjał ochronny oraz regeneracyjny neuronów dopaminergicznych, co jednoznacznie nakierowało tok analiz w stronę dokładnej ewaluacji poziomu stężeń DA i jej metabolitów. Analizując profil stężeń monoamin w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem poziomu stężenia DA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących neurotoksyczne oddziaływanie MPTP-HCL, jak również pozostaje punktem odniesienia dla celu analizy jakim była identyfikacja wzrostów poziomów stężenia DA po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania

Atsttrin [960]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia DA zastosowanie dawek 0.5 μg (0.125 μg/μl) oraz 1 μg (0.25 μg/μl) było (przeciwnie do oczekiwanego efektu) związane z istotnie statystycznym spadkiem tego neuroprzekaźnika w obrębie ST. Analogiczne obserwacje dotyczące poziomu stężenia DA w innych strukturach neuroanatomicznych nie wykazały istotności statystycznej, jednak kluczowa w tym przypadku była tendencja do ogólnego średniego wzrostu poziomu stężenia DA po zastosowaniu wzrastającej dawki związku. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku metabolizmu DA wyrażonego poziomem obrotów DOPAC/DA, 3-MT/DA oraz HVA/DA najbardziej efektywne okazały się dawki 0.5 μg (0.125 μg/μl), 1 μg (0.25 μg/μl) oraz 2 μg (0.5 μg/μl), które spowodowały istotny statystyczne wzrost poziomu obrotów tych neuroprzekaźników w obrębie ST. Analogiczne obserwacje dotyczące poziomu obrotów tych neurotransmiterów w innych strukturach neuroanatomicznych nie wykazały jednoznacznej istotności statystycznej oraz tendencji zmian. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia NA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA oraz ich obrotów istotne statystycznie zmiany poziomu stężeń i obrotów były widoczne w obrębie CM oraz CX. Zasadnym, biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi zmian ekspresji wybranych neurotransmiterów z grupy monoamin, na tym etapie badań wydawał się potencjalnie wybór jednej z pośrednich ocenianych dawek Atsttrin. Analizując profil stężeń aminokwasów w trakcie pierwszej, wstępnej części badania należy w pierwszej kolejności zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 nie przedstawiała jednolitego wzorca wzrostu lub spadku poziomu stężeń GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych. Obserwacje te posłużyły w każdym, osobnym przypadku za punkt odniesienia dla celu analizy jakim była identyfikacja zmian poziomów stężeń wśród tej grupy neuroprzekaźników po zastosowaniu domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin. Analizując profil stężenia GLU należy w pierwszej kolejności zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym

średnim wzrostem poziomu stężenia tego neuroprzekaźnika w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących dynamiczną reorganizację neurochemiczną, w wyniku czego powstały deficyt DA jest związany z podwyższeniem profilu stężenia GLU w obrębie OUN [961]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia GLU najbardziej efektywne okazały się dawki 0.5 μg (0.125 μg/μl) oraz 1 μg (0.25 μg/μl), które spowodowały istotny statystyczne spadek tego neuroprzekaźnika w obrębie CX. Poziom stężenia GLU nie uległ istotnym statystycznie zmianom w obrębie ST, CA oraz CM. Istotna w tym przypadku była obserwowana przez nas tendencja wzrostu poziomu stężenia GLU w obrębie tych struktur neuroanatomicznych po podaniu coraz większych dawek Atsttrin do ST. Zasadnym biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi zmian poziomu stężenia GLU na tym etapie badań wydawał się potencjalnie wybór jednej z mniejszych ocenianych dawek Atsttrin. Analogicznie analizując profil stężenia GABA należy w pierwszej kolejności zauważyć, iż dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu stężenia tego neuroprzekaźnika w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych wśród grup kontrolnych. Podobnie jak wcześniej, obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wcześniej prezentowanymi w literaturze wynikami badań opisujących dynamiczną reorganizację neurochemiczną w wyniku czego powstały deficyt DA jest związany z podwyższeniem profilu stężenia GABA w obrębie OUN [962]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin, zastosowanych w trakcie stereotaktycznego podania domózgowego do ST stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia GABA najbardziej efektywne okazały się dawki 0.1 μg (0.025 μg/μl), 0.5 μg (0.125 μg/μl) oraz 1 μg (0.25 μg/μl), które w uśrednieniu powodowały istotny statystyczne spadek tego neuroprzekaźnika w obrębie ST, CX oraz CM. Istotna w tym przypadku była również obserwowana tendencja wzrostu poziomu stężenia GABA w obrębie większosci struktur neuroanatomicznych po zastosowaniu coraz większych dawek Atsttrin podanych do ST. Zasadnym biorąc pod uwagę uzyskany profil odpowiedzi zmian poziomu stężenia GABA, na tym etapie badań wydawał się potencjalnie wybór jednej z mniejszych ocenianych dawek Atsttrin. Pozostałe aminokwasy analizowane na tym

etapie badań takie jak ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER wykazały zbliżony profil zmian poziomu stężeń w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych, gdzie efektywne okazywały się mniejsze dawki Atsttrin przy odwrotnym efekcie wzrostu po zastosowaniu coraz większych dawek związku. Biorąc pod uwagę orientacyjny uzyskany profil odpowiedzi reorganizacji neurochemicznej oraz zmian poziomu stężenia zbiorczej grupy aminokwasów takich jak ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER zasadnym na tym etapie badań wydawał się potencjalnie wybór jednej z mniejszych ocenianych dawek Atsttrin. W opisanej powyżej pierwszej części badania wykonano szereg eksperymentów i analiz oceniających wpływ wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt celem identyfikacji potencjalnej skutecznej dawki związku, która charakteryzowała się optymalnym efektem farmakologicznym oraz jednocześnie wykazywała dostatecznie wysoki poziom bezpieczeństwa w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu.

Opisana w przedmiotowej pracy wprowadzona alternatywna metoda podania Atsttrin obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową oraz próbę wyznaczenia dawki i stężenia związku stanowi wkład własny autora przy zachowaniu metodyki uwzględniającej znaną i uniwersalną koncepcję. Biorąc pod uwagę opisany wcześniej profil farmakokinetyczny uwzględniający ekstrapolowaną biodostępność jak również charakterystykę stabilności Atsttrin uwzględniając parametry $t_{1/2}$ oraz C_{max}, podjęto próbę możliwie dokładnego ilościowego i jakościowego opisu efektów działania wzrastających dawek związku w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 [812]. Istotną trudnością wyznaczenia adekwatnej dawki, jak już wielokrotnie wspomniano, było ustalenie optymalnego efektu farmakologicznego przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego profilu bezpieczeństwa. W tym przypadku analizowanymi zmiennymi, które należało wzajemnie pogodzić było zahamowanie odpowiedzi neurozapalnej przy jednoczesnym odpowiednim wpływie na profil neurochemiczny w poszczególnych strukturach neuroanatomicznych. Racjonalny wybór oraz walidacja odpowiedniej dawki Atsttrin, biorąc pod uwagę szeroki panel oznaczonych parametrów jako potencjalnych punktów uchwytu terapii, stanowił decyzję podyktowaną kompromisem pomiędzy potencjalnym obserwowanym efektem neuroprotekcyjnym oraz neurotoksycznym kolejnych testowanych dawek związku. Zgodnie z danymi uzyskanymi z analizy ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt

oraz cząstkowymi wynikami poszczególnych oznaczeń celem przeprowadzenia i uzupełnienia dalszej części badania wybrano ostatecznie dawkę związku o wartości 0.5 μg (0.125 μg/μl). Opisane zjawiska przy zastosowaniu tej dawki Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 znajdują w tym przypadku swoje subiektywnie zbliżone odbicie w obserwowanych efektach przeciwzapalnych wykazanych w czasie wcześniejszych badań tego związku na innych modelach jednostek chorobowych oraz układach narządowych [963].

W drugiej, głównej części badania polegającej na analizie wpływu empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin podanej domózgowo za pomocą metod stereotaktycznych zwiększono panel grup badanych i kontrolnych uwzględniając rozszerzony zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji o zwierzęta poddane iniekcji do SN. Na tym etapie wykonano również stereotaktyczne podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN u myszy które nie zostały poddane innym interwencjom. Panel parametrów analizowanych w drugiej części badania obejmował ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym oraz analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego w podobnym zakresie jak w trakcie pierwszej części badania. Główną intencją oznaczeń na tym etapie badań była kompleksowa ewaluacja wszystkich badanych parametrów pod kątem przebiegu procesów neurodegeneracyjnych i rozwoju reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu. Dodatkowym, równie ważnym zamierzeniem tej części badania było pogłębienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin oraz ostatecznie zweryfikowanie, czy zastosowanie tego związku może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona. W drugiej części badania rozszerzono zakres procedur eksperymentalnych poprzez wykonanie iniekcji do kolejnego celu stereotaktycznego obejmującego SN. W tym przypadku SN stanowi najistotniejszą z punktu widzenia patogenezy choroby Parkinsona strukturę neuroanatomiczną, która jednocześnie z powodu lokalizacji i rozmiaru stanowi trudniejszy technicznie obszar pod względem wykonania procedury iniekcji stereotaktycznej [964]. Pod względem neurofizjologicznym wybór tej struktury neuroanatomiczej był podyktowany jej nadrzędną rolą jako regulatora układu nigrostriatalnego oraz głównej lokalizacji zawierającej perikariony neuronów dopaminergicznych [965]. Analogicznie w drugiej części badania rozszerzono liczbę zwierząt oraz panel badanych oznaczeń celem

szczegółowej ewaluacji stopnia nasilenia reakcji neurozapalnej oraz stanu neurofunkcjonalnego w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. W tej części badania ostatecznie odniesiono się do tezy zakładającej, że zastosowanie Atsttrin może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona. Ponadto odniesiono się do kwestii farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin dokonując optymalizacji i walidacji alternatywnej metody podania związku obejmującą bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję domózgową. Analogicznie w drugiej części badania oceniającej wpływ bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST lub SN u myszy szczepu C57BL/6 za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL, dokonano oceny poziomu ekspresji wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym poprzez ocenę ilości mRNA w wybranych wyizolowanych strukturach mózgu używając metody Real-Time PCR. Analizie poddano kolejno panel cytokin i mediatorów zapalnych takich jak IL-1α (ST, CA, CX oraz CM), TNF-α (ST, CA, CX oraz CM), IL-6 (ST, CA, CX oraz CM), COX-2 (ST) oraz IFN-γ (ST). Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu ekspresji cytokin i mediatorów zapalnych w trakcie drugiej, właściwej części badania posłużono się analogicznie wcześniej opisanymi grupami kontrolnymi. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż przypadku poziomu ekspresji IL-1α zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystyczne spadkiem poziomu ekspresji tej cytokiny w obrębie ST. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA dla IL-1α w obrębie pozostałych struktur neuroanatomicznych po domózgowym podaniu Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST oraz SN. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-1α w żadnej z ocenianych struktur neuroanatomicznych. Biorąc pod uwagę profil ekspresji mRNA dla IL-1 α w trakcie drugiej, właściwej części

badania należy zauważyć, iż zastosowanie Atsttrin w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania wiązało się z efektem neuroprotekcyjnym oraz ograniczeniem reakcji neurozapalnej. W odniesieniu do analiz *post mortem* u ludzi wiadomo, iż poziom ekspresji IL-1α w obrębie tkanek pobranych z obszaru SN u osób z chorobą Parkinsona jest podwyższony [965]. Po intoksykacji MPTP-HCL uzyskano analogiczne wyniki dotyczące wzrostu poziomu ekspresji IL-1α w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych. W tym przypadku pierwszym źródłem syntezy IL-1α wydają się być zaktywowane komórki mikrogleju, a w dalszym etapie komórki dopaminergiczne poddane uszkadzającemu działaniu MPTP-HCL [966]. Wyniki przeprowadzone na różnych modelach neurodegeneracji wskazują na wzajemną korelację pomiędzy stopniem obumierania neuronów a poziomem IL-1α [967]. Zaobserwowano, iż podanie egzogennej IL-1α do struktur układu nigrostriatalnego jest związane z indukcją zmian neurodegeneracyjnych [968]. Jednocześnie zauważono, iż zmiany te podlegają zahamowaniu lub regresji w przypadku zastosowania IL-1RA [969]. Ponadto zaobserwowano, iż IL-1α może za pośrednictwem polisynaptycznych szlaków limbicznych wpływać na procesy neurodegeneracyjne w obrębie CX poprzez nasilenie transmisji glutaminergicznej [970]. Terapeutyczne oddziaływanie Atsttrin pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez Liu i wsp. gdzie analizowano model, w trakcie którego wykonywano bezpośrednie dokomorowe podania LPS w dawce 1 µl (10 µg/µl) u myszy szczepu C57BJ/6 [946]. W tym przypadku Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg masy ciała podawano dootrzewnowo co 3 dni przez okres 7 dni przed dokomorowym podaniem LPS. W ramach tego eksperymentu dodatkowo badano hodowle astrocytów, które zostały poddane działaniu LPS w dawce 0, 100 lub 300 ng/ml oraz Atsttrin w dawce 200 ng/ml. Zastosowanie Atsttrin w ramach tego badania było związane z redukcją poziomu ekspresji IL-1β oraz innych mediatorów zapalnych u myszy, co również obserwowano w obrębie hodowli komórkowej. Wydaje się, że zahamowanie ekspresji cytokin z rodziny IL-1 za pośrednictwem Atsttrin jest związane ze zmniejszeniem stopnia uszkodzenia neuronów oraz aktywacji komórek astro- oraz mikrogleju. Celem pogłębienia wiedzy dotyczącej mechanizmów farmakodynamicznych oddziaływania Atsttrin, jak również jej profilu bezpieczeństwa w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu, wykonano bilateralne domózgowe podania Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) do struktur ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej. Z przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz, można

wysnuć wniosek, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wykazuje działania neurotoksycznego oraz indukującego zjawiska neurodegeneracyjne związane z nadekspresją IL-1α, cechując się pod tym względem stosunkowo dużym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. W oparciu o wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania stwierdzono, iż przypadku poziomu ekspresji TNF-α zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie spadkiem poziomu ekspresji tej cytokiny w obrębie ST oraz CA, bez istotnego efektu w obrębie CX oraz CM. Analogicznie stereotaktyczne podanie do ST nie wywołało istotnego statystycznie efektu w odniesieniu do poziomu ekspresji TNF-α w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TNF-α w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych. Biorąc pod uwagę profil ekspresji mRNA dla TNF-α w trakcie drugiej, właściwej części badania należy zauważyć, iż zastosowanie Atsttrin w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania wiązało się z efektem neuroprotekcyjnym oraz redukcją reakcji neurozapalnej. Faktem wiadomym jest, że z punktu widzenia celu niniejszej pracy oznaczenie to stanowi centralny i najważniejszy punkt prezentowanych analiz. Wiadomo, iż istotna część opublikowanych do tej pory badań na modelach przedklinicznych wskazuje, iż przeciwzapalne działanie Atsttrin w sensie farmakodynamicznym może być potencjalnie korzystne w celu leczena chorób neurodegeneracyjnych, u podłoża których stoją zjawiska neurozapalne [971]. TNF-α stanowi prototypową cytokinę regulującą przebieg reakcji neurozapalnej, wykazującą przy tym plejotropowy i wielokierunkowy mechanizm działania [972]. Opisane wcześniej dane i wyniki badań analizujących rolę TNF-α jednoznacznie pozycjonują rolę tej cytokiny w patogenezie choroby Parkinsona, biorąc pod uwagę jej zwiększony poziom ekspresji w obrębie układu nigrostriatalnego, CSF oraz krwi obwodowej obserwowany zarówno u ludzi jak i u zwierząt [973]. Udowodniono, iż poziom ekspresji TNF-α sam w sobie stanowi zmienną pozwalającą na korelację obecności tej cytokiny z nasileniem zaburzeń neurologicznych u pacjentów z chorobą Parkinsona [974]. Biorąc pod uwagę przedkliniczne modele zwierzęce związane z intoksykacją MPTP-HCL wykazano, iż myszy pozbawione genu TNF-α wykazywały mniejszy stopień uszkodzenia układu nigrostriatalnego, co również sugeruje istotną role tej

cytokiny w patogenezie choroby Parkinsona [975]. Analogiczne wyniki uzyskiwano podczas stosowania inhibitorów TNF-α, gdzie obserwowano adekwatne ograniczenie stopnia neurodegeneracji [976]. W cytowanym wcześniej badaniu przeprowadzonym przez Liu i wsp. analizowano również odpowiednio poziom ekspresji TNF-α [946]. Analogicznie jak w przypadku poziomu ekspresji IL-1α, poziom ekspresji TNF-α uległ redukcji po zastosowaniu Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg u myszy szczepu C57BL/6 wcześniej poddanych iniekcji dokomorowej LPS w dawce 1 µl (10 µg/µL). Wydaje się, że zahamowanie ekspresji cytokin z rodziny TNF-α przez Atsttrin jest związane ze zmniejszeniem stopnia uszkodzenia neuronów oraz aktywacji komórek astro- oraz mikrogleju. Ponadto, z przeprowadzonych analiz wynika, iż Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) nie wykazuje działania neurotoksycznego oraz indukującego zjawiska neurodegeneracyjne związane z nadekspresją TNF-α, cechując się pod tym względem stosunkowo dużym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. Uzyskane wyniki skłaniają do rozpatrywania Atsttrin w kategorii związku, który mógłby stanowić element skutecznej terapii leczenia choroby Parkinsona i w sposób celowany wpływałby na czynniki związane z reakcją neurozapalną. Przeprowadzone eksperymenty oraz oznaczenia z pewnością przybliżają nas do potwierdzenia tej tezy, jak również jednocześnie podkreślają niezwykłą złożoność oddziaływań zachodzących w obrębie sieci cytokin, biorąc pod uwagę reakcję neurozapalną zachodzącą w przebiegu choroby Parkinsona. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji IL-6 zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) nie wiązało się z istotnymi statystycznie zmianami poziomu ekspresji w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych. Również wykonanie analogicznych domózgowych podań Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-6 w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych. IL-6 stanowi jedną z głównych cytokin o działaniu zapalnym oraz immunomodulującym, jednakże zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi może ona również wpływać hamująco na rozwój reakcji neurozapalnej, a przez to mieć potencjalnie ochronny wpływ na układ nigrostriatalny [977]. Zgodnie z wcześniejszymi danymi omawiającymi podwyższony poziom IL-6 w CSF oraz

surowicy u osób z chorobą Parkinsona można stwierdzić, że jest to potencjalnie związane z wystąpieniem nieswoistego mechanizmu kompensacyjnego promującego fenotyp neuroregeneracyjny [978]. Dodatkowo, w badaniach na hodowli komórkowych komórek dopaminergicznych *in vitro* stwierdzono, iż stopniowe podawanie IL-6 w zakresie stężeń 5 ng/ml do 50 ng/ml było związane z wydłużonym czasem przeżycia tych komórek [979]. Ciekawym wydaje się fakt, że myszy szczepu C57BL/6 pozbawione genu kodującego IL-6 wykazywały większą podatność na intoksykację MPTP-HCL pod kątem rozwoju reakcji neurozapalnej i syntezy jej mediatorów jak również zwiększony stopień utraty DA [980]. Prawdopodobnie obserwowany w przedstawionej pracy brak wpływu Atsttrin na poziom ekspresji mRNA dla IL-6 mógł być skorelowany z potencjalnym uruchomieniem mechanizmów regeneracyjnych związanych z oddziaływaniem tej cytokiny. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania przeprowadzonej celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem tego enzymu w obrębie ST. Obserwacja ta stanowi odzwierciedlenie toczącego się procesu neurozapalnego na skutek intoksykacji MPTP-HCL oraz jasno wskazuje na przeciwzapalne działanie Atsttrin w tym modelu doświadczalnym. Analogiczne wyniki dotyczące terapeutycznego wpływu Atsttrin zaobserwowano na omawianym już zwierzęcym modelu dokomorowego podania LPS oraz Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg podanej wcześniej dootrzewnowo [946]. Przeprowadzone analizy dodatkowo potwierdzają, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wykazuje działania indukującego odpowiedź neurozapalną, związaną z nadekspresją COX-2, cechując się pod tym względem stosunkowo dużym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. Wiadomo, iż neurony wykazują wysoką ekspresję COX-2, a jednocześnie w obrębie mikrogleju, astrocytów oraz komórkach okołonaczyniowych ekspresja enzymu jest stosunkowo niska [981, 982]. Zgodnie z danymi literaturowymi ekspresja COX-2 wzrasta w neuronach oraz innych komórkach OUN pod wpływem takich bodźców jak pobudzenie synaptyczne, niedokrwienie oraz zapalenie [983]. Funkcja cykooksygenaz w patogenezie choroby Parkinsona pozostaje niejednoznaczna, lecz jest ona w dużej mierze związana z produkcją mediatorów reakcji zapalnej oraz niezależnie z produkcją wolnych rodników [984]. Ekspresja i następcza synteza COX-2 u pacjentów z chorobą

Parkinsona jest zwiększona w obrębie SN, skorupy oraz jądra ogoniastego gdzie dodatkowo obserwuje się zwiększone stężenie prostaglandyn [985]. Biorąc pod uwagę mechanizm działania COX-2 w przebiegu choroby Parkinsona należy stwierdzić, iż aktywność tego enzymu jest związana z kilkoma zjawiskami, gdzie neuroprzekaźniki z grupy monoamin, w tym DA, stanowią redukujące kofaktory reakcji syntezy prostaglandyn i mogą zwiększać aktywność syntazy COX-2 [986]. Dodatkowo w SN znajdują się duże ilości H_2O_2 oraz żelaza (Fe) powstałe w wyniku metabolizmu DA jako efekt działania MAO [987]. W tym przypadku tlen oraz żelazo stanowią niezbędne elementy sprzyjające maksymalnej aktywności COX-2. Wiadomo, iż u pacjentów z chorobą Parkinsona stężenie żelaza w SN jest podwyższone w stosunku do populacji osób zdrowych, dotyczy to również H_2O_2 stanowiącego źródło wolnych rodników tlenowych, co faworyzuje wzmożoną aktywność COX-2 [988]. COX-2 dzięki swoim cechom katalitycznym jest w stanie przeprowadzić reakcję utlenienia DA na skutek czego powstaje 5-S-cysteinylo-DA oraz produkty uboczne w postaci wolnych rodników [989]. 5-S-cysteinylo-DA może przyczyniać się do uszkodzenia DNA poprzez zwiększenie aktywności enzymów detoksykacyjnych, doprowadzając do śmierci komórki [990]. Badania przeprowadzone na modelu choroby zwyrodnieniowej stawów u myszy szczepu C57BL/6 oraz szczurów szczepu Sprague-Dawley, jak również hodowli ludzkich chondrocytów wykazały, analogicznie do uzyskanych wyników, iż zastosowanie Atsttrin wiązało się z następczym spadkiem aktywności indukowanej przez TNF-α fosforylacji oraz translokacji czynnika NF-κB związanej w nadekspresją COX-2 [945]. Podobne wyniki uzyskano w cytowanym wcześniej badaniu na modelu zapalenia mózgu u myszy szczepu C57BL/6 indukowanym bezpośrednią dokomorową iniekcją LPS w dawce 10 μg/μl (1 μl), gdzie stwierdzono, iż zastosowanie dootrzewnowej iniekcji Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg wpływa korzystnie na zahamowanie ekspresji COX-2 poprzez hamowanie aktywności czynnika NF-κB [946]. Farmakologiczna modyfikacja aktywności cyklooksygenaz za pośrednictwem Atsttrin wydaje się wpływać na przebieg uszkodzenia szlaków nigrostriatalnych oraz wyzwalać efekt neuroprotekcyjny obserwowany po wcześniejszej intoksykacji MPTP-HCL. W trakcie oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do struktur ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wiązało się z zmianami poziomu ekspresji IFN-γ w obrębie ocenianych struktur neuroanatomicznych. W tym przypadku

obserwowano jedynie niepotwierdzoną statystycznie tendencję do spadku poziomu ekspresji mRNA dla IFN-γ po zastosowaniu Atsttrin. Przeprowadzone analizy wykazały również, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wykazuje działania wpływającego na poziom ekspresji mRNA dla IFN-γ u zdrowych myszy szczepu C57BL/6, cechując się pod tym względem stosunkowo dużym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. IFN-γ uważany jest za jeden z istotniejszych czynników stymulujących rozwój zmian neurodegeneracyjnych, szczególnie o podłożu autoimmunologicznym [991]. Zaskakującym wydaje się fakt, iż w trakcie badania nie udało się wykazać opisywanego dotychczas w literaturze wzrostu poziomu ekspresji tej cytokiny po intoksykacji MPTP-HCL [992]. W tym przypadku wydaje się, iż czynnikiem mogący mieć wpływ na brak uzyskanej istotnej zmiany poziomu ekspresji IFN-γ może być czas prowadzenia eksperymentu. Obserwacja ta może być wynikiem niedostatecznej odpowiedzi komórek astro- i mikrogleju, stanowiących główne źródło IFN-γ w obrębie mózgu [993]. Innym znanym źródłem tej cytokiny są limfocyty Th1, dlatego również istotny w tym przypadku wydaje się czas rekrutacji komórek układu immunologicznego z obwodu. Niemniej z punktu widzenia potencjalnej neurotoksyczności, Atsttrin wydaje się nie mieć wpływu na zmiany poziomu ekspresji tej cytokiny, a przez to, potencjalnie pozostaje czynnikiem nieindukującym odpowiedzi immunologicznej związanej z IFN-γ. Jak we wcześniejszej części badania, kolejno dokonano analizy poziomu ekspresji IL-10, stanowiącej najbardziej prominentnego przedstawiciela cytokin i mediatorów przeciwzapalnych. Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu ekspresji IL-10 w trakcie drugiej, właściwej części badania użyto tych samych grup kontrolnych, u których jak opisano wcześniej, dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania przeprowadzonej celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji IL-10 zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie wzrostem poziomu ekspresji tej cytokiny w obrębie ST. Analogiczne stereotaktyczne podanie do ST nie wywołało istotnego statystycznie efektu w odniesieniu do poziomu ekspresji IL-10 w obrębie ST. Wykonanie bilateralnego

domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w obrębie ST. Biorąc pod uwagę profil ekspresji mRNA dla IL-10 w trakcie drugiej, właściwej części badania należy zauważyć, iż zastosowanie Atsttrin w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania na modelu choroby Parkinsona wiązało się z efektem niwelującym nasilenie reakcji neurozapalnej poprzez promowanie ekspresji mediatorów odpowiedzi przeciwzapalnej. Ponadto, z przeprowadzonych analiz wynika, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wykazuje działania neurotoksycznego oraz indukującego zjawiska neurozapalne związane z potencjalnym obniżeniem poziomu ekspresji IL-10, cechując się pod tym względem stosunkowym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. Wyniki badań przedklinicznych przeprowadzonych na modelach różnego typu uszkodzeń mózgu wskazują jednoznacznie, że IL-10 powoduje zahamowanie zmian towarzyszących aktywacji gleju, wytwarzaniu cytokin zapalnych, innych mediatorów stanu zapalnego oraz wolnych rodników [994]. Wiele wyników przedklinicznych badań eksperymentalnych wskazuje, iż substytucja IL-10 za pośrednictwem podania samego białka lub wzmożenie ekspresji jego genu za pośrednictwem wektora wirusowego w modelu choroby Parkinsona jest związane ze zmniejszeniem poziomu degeneracji neuronów dopaminergicznych, zahamowaniem aktywności mikrogleju oraz kolektywnym zahamowaniem reakcji neurozapalnej w obrębie układu nigrostriatalnego [995]. Jak we wcześniejszej części badania, kolejno dokonano analizy poziomu ekspresji iNOS oraz nNOS, stanowiących prominentnych przedstawicieli parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego. Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu ekspresji iNOS oraz nNOS w trakcie drugiej, właściwej części badania użyto tych samych grup kontrolnych, u których jak opisano wcześniej, dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla iNOS oraz nNOS w obrębie ST. Analizując wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania przeprowadzonego celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin zarówno do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie spadkiem poziomu ekspresji iNOS w obrębie ST. Wykonanie

bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla iNOS w obrębie ST. W przypadku analizy poziomu ekspresji mRNA dla nNOS nie wykazano żadnych istotnie statystycznych zmian w trakcie analogicznego cyklu procedur eksperymentalnych. Biorąc pod uwagę profil ekspresji mRNA dla parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego takich jak iNOS oraz nNOS należy zauważyć, iż zastosowanie Atsttrin w trakcie domózgowego stereotaktycznego podania w modelu choroby Parkinsona wiązało się z efektem niwelującym nasilenie reakcji neurozapalnej poprzez zahamowanie ekspresji tych enzymów. Jednocześnie z przeprowadzonych analiz wynika, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wykazuje działania neurotoksycznego oraz indukującego zjawiska neurozapalne związane z potencjalnym podwyższeniem poziomu ekspresji iNOS oraz nNOS, cechując się pod tym względem stosunkowo dużym bezpieczeństwem pod kątem jej potencjalnego zastosowania w farmakoterapii. Otrzymane wyniki wskazują, że Atsttrin wywiera wpływ hamujący ekspresję iNOS, jednocześnie nie wpływając na poziom ekspresji nNOS. Ekspresja iNOS jest związana z aktywnością transkrypcyjną czynnika NF-kB, który na skutek sprzężenia zwrotnego jest hamowany przez fizjologiczne poziomy NO [996]. iNOS może również podlegać regulacji za pośrednictwem cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10, poprzez szlak NF-kB, co stanowi dokładne odzwierciedlenie uzyskanych wyników dotyczących zwiększonego poziomu ekspresji IL-10 oraz obniżonego poziomu ekspresji iNOS po stereotaktycznym podaniu Atsttrin [997]. nNOS z kolei podlega regulacji za pośrednictwem CaM, jonów Ca^{2+} oraz innych kofaktorów [998]. Badania przeprowadzone na modelu choroby zwyrodnieniowej stawów u myszy szczepu C57BL/6 oraz szczurów szczepu Sprague-Dawley, jak również hodowli ludzkich chondrocytów wykazały, iż zastosowanie Atsttrin wiązało się z następczym spadkiem aktywności indukowanej przez TNF-α fosforylacji oraz translokacji czynnika NF-κB związanej z nadekspresją iNOS [945]. Podobne wyniki uzyskano w wcześniej przywoływanym badaniu na modelu zapalenia mózgu u myszy szczepu C57BL/6 indukowanym bezpośrednią dokomorową iniekcją LPS w dawce 10 μg/μl (1 μl) gdzie stwierdzono, iż zastosowanie dootrzewnowej iniekcji Atsttrin w dawce 2.5 mg/kg wpływa korzystnie na zahamowanie ekspresji iNOS poprzez obniżenie aktywności czynnika NF-κB [946]. Jak we wcześniejszej części badania, kolejno dokonano analizy

poziomu ekspresji czynników wzrostu i neurotroficznych takich jak TGF-β oraz BDNF. Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu ekspresji czynników wzrostu i neurotroficznych w trakcie drugiej, właściwej części badania użyto tych samych grup kontrolnych u których jak opisano wcześniej dootrzewnowa intoksykacja MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim wzrostem poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β oraz BDNF wśród ocenianych struktur neuroanatomicznych. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania przeprowadzonego celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie spadkiem poziomu ekspresji TGF-β w obrębie ST. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla TGF-β w obrębie ST. Wydaje się, iż ograniczenie ekspresji TGF-β na wczesnym etapie reakcji zapalnej w układzie nigrostriatalnym na skutek oddziaływania Atsttrin stanowi konsekwencję ograniczenia aktywacji astrogleju, stanowiącego główne źródło komórkowe tego czynnika wzrostu [999]. Jednocześnie w pewnych okolicznościach w trakcie reakcji neurozapalnej TGF-β może pełnić również paradoksalną rolę czynnika nasilającego zjawiska neurodegeneracyjne [1000]. Wskazują na to wyniki badań przeprowadzonych z użyciem rekombinowanego wektora wirusowego Ad-huTGF-β, który po bezpośrednim domózgowym podaniu doprowadził do nasilenia zmian neurodegeneracyjnych wywołanych wcześniej podaniem MPTP-HCL [1001]. Sam TGF-β pełni również rolę w procesach neurotransmisji dopaminergicznej, oddziaływując na receptory D2 w obrębie ST [1002]. Istotną rolą TGF-β jest nasilanie aktywności genów kodujących neurotrofiny za pośrednictwem aktywacji receptorów TrkB, swoistych dla tych czynników [1003]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wiązało się z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji BDNF w obrębie ST. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej nie było związane z istotną

statystycznie zmianą poziomu ekspresji mRNA dla BDNF w obrębie ST. Analizując wcześniejsze badania dotyczące poziomu BDNF u pacjentów z chorobą Parkinsona należy stwierdzić, iż prezentują oni spadek stężenia poziomu BDNF zarówno w surowicy jak i w obrębie tkanek pobranych z obszaru ST w porównaniu ze zdrowymi osobami z grup kontrolnych [1004]. Badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych choroby Parkinsona skupiają się na zwiększaniu obecności BDNF w obrębie mózgu poprzez jego bezpośrednie wstrzyknięcie, transdukcję genów wektorami wirusowymi, dostarczanie przez nośniki nie wirusowe jak również poprzez wydzielanie przez komórki zmodyfikowane genetycznie [1005]. Być może brak oczekiwanego potencjalnie obserwowalnego wzrostu poziomu ekspresji BDNF jest związany z głównym miejscem jego produkcji, którym są neurony a nie astroglej stanowiący pierwszą populację komórkową uczestniczącą w reakcji neurozapalnej [1006]. Jak we wcześniejszej części badania, kolejno dokonano analizy poziomu ekspresji wybranych parametrów związanych z metabolizmem neurotransmiterów oraz nasileniem zmian neurodegeneracyjnych takich jak TH oraz TG2. Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu ekspresji enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów takich jak TH oraz TG2 w trakcie drugiej, właściwej części badania użyto tych samych grup zwierząt kontrolnych, u których wykonano dootrzewnową intoksykację MPTP-HCL. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu ekspresji TH zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) nie wiązało się z istotną statystycznie zmianą poziomu ekspresji tego enzymu w obrębie ST. Uzyskane wyniki wskazały na zaistnienie pożądanego efektu, jakim było przywrócenie w obrębie ST funkcji syntezy DA po zastosowaniu Atsttrin. Zjawisko to może być związane z częściową regeneracją komórek dopaminergicznych, jak również aktywacją w pierwotnie nieuszkodzonych neuronach mechanizmów kompensacyjnych uzupełniających niedobory TH. Podobnych obserwacji dokonano na modelu eksperymentalnym u myszy szczepu C57BL/6J, które poddano intoksykacji MPTP-HCL a następnie bezpośredniemu dokomorowemu podaniu 1 ng PGRN [1007]. W tym przypadku stwierdzono wzrost ekspresji TH w przeprowadzonych analizach immunochemicznych mózgów pobranych od zwierząt w 3 dobie po przeprowadzeniu procedur eksperymentalnych. Analizując dalsze wyniki uzyskane w trakcie drugiej

części badania przeprowadzonej celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie i odwrotnym do oczekiwanego wzrostem ekspresji TG2 w obrębie CA. Co interesujące, domózgowe podanie empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST oraz SN u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych intoksykacji MPTP-HCL oraz innej procedurze było związane z odwrotnym do oczekiwanego wzrostem ekspresji TG2 w obrębie ST oraz CA. Jak wspomniano wcześniej, TG2 stanowi enzym zaangażowany w procesy neurodegeneracyjne promując powstawanie wielkocząsteczkowych agregatów białkowych ASN, stanowiących ekwiwalent nasilenia powstawania zmian neuropatologicznych w przebiegu choroby Parkinsona [1008]. W oparciu o dotychczasowe wyniki badań trudno jednoznacznie określić w jaki sposób ekspresja TG2 jest związana ze szlakami sygnałowymi aktywowanymi za pośrednictwem PGRN oraz Atsttrin. Obserwacja ta zwraca uwagę na konieczność poznania roli, jaką pełni potencjalna wzajemna interakcja pomiędzy TG2 oraz PGRN w kontekście biologicznych procesów zachodzących w obrębie komórek układu nigrostriatalnego. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach analizy zostały czasowo ograniczone, przez co nie można wykluczyć, że wydłużenie czasu obserwacji pozwoliłoby wykazać odmienną tendencję ekspresji TG2 oraz zmian profilu proteomowego w przebiegu procesu neurodegeneracji po następczym podaniu Atsttrin.

Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające stan funkcjonalny układu nigrostriatalnego u myszy szczepu C57BL/6 po intoksykacji MPTP-HCL, oraz następczej próbie farmakologicznej terapii za pomocą Atsttrin, przeprowadzono kompleksową ocenę profilu stężeń monoamin oraz aminokwasów we wszystkich czterech wyizolowanych strukturach neuroanatomicznych przeprowadzając ewaluację stanu i wzajemnych interakcji układów dopaminergicznego, noradrenergicznego, serotoninergicznego, glutaminergicznego oraz GABA-ergicznego. Celem ustalenia punktu odniesienia dla oceny profilu zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego w trakcie drugiej, właściwej części badania odniesiono się częściowo do wyników uzyskanych w trakcie pierwszej części badania, analogicznie jak w przypadku innych oznaczeń u wybranych grup kontrolnych. Główną intencją oznaczeń na tym etapie badań była ostateczna ewaluacja poziomu stężeń DA oraz jej metabolitów z uwagi na ich wiodącą rolę w patogenezie choroby Parkinsona. Hipotezą przeprowadzonych

badań było uznanie Atsttrin za związek bezpośrednio wpływający na potencjał ochronny oraz regeneracyjny neuronów dopaminergicznych, co jak wspomniano, nakierowało ostateczny tok analiz w stronę precyzyjnej ewaluacji poziomu stężeń DA, jej metabolitów oraz obrotów. Analizując profil stężeń monoamin w trakcie drugiej, właściwej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia DA zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wiązało się z istotnym statystycznie, odwrotnym do oczekiwanego spadkiem poziomu stężenia tego neuroprzekaźnika w obrębie ST oraz SN. Równoległe obserwacje dotyczące poziomu stężenia DA w innych strukturach neuroanatomicznych nie wykazały jednoznacznej istotności statystycznej, jednak kluczowa w tym przypadku była tendencja do ogólnego średniego wzrostu poziomu stężenia DA po zastosowaniu Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl). Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane z wzrostem poziomu stężenia DA w obrębie CX oraz CM, co jednak nie stanowiło wartości istotnych statystycznie. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w trakcie drugiej części badania przeprowadzonej celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu obrotów DOPAC/DA, 3-MT/DA oraz HVA/DA zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) było związane z istotnym statystycznie średnim wzrostem poziomu tych obrotów w obrębie ST oraz CX. Analogiczne obserwacje dotyczące poziomu obrotów tych neuroprzekaźników w innych strukturach neuroanatomicznych, jak również zastosowanie Atsttrin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej, nie wykazały jednoznacznych istotności statystycznych. Na podstawie przytoczonych powyżej wyników badań można zatem wysnuć wstępnie nieoczekiwany oraz zaskakujący wniosek, iż zastosowanie Atsttrin nie wykazuje neuroprotekcyjnego efektu w analizowanym modelu zwierzęcym choroby Parkinsona. W tym przypadku zaobserwowano również nieoczekiwaną niekoherentność uzyskanych wartości wskaźników mediatorów układu immunologicznego oraz poziomów stężeń monoamin oraz ich obrotów. Biorąc pod uwagę dostępne, choć w bardzo ograniczonym

zakresie dane literaturowe wydawało by się, iż zastosowanie Atsttrin powinno być związane z orgraniczeniem spadku poziomu stężenia DA po intoksykacji MPTP-HCL w obrębie struktur neuroanatomicznych powiązanych ze szlakiem nigrostriatalnym. W badaniu przeprowadzonym przez van Kampen i wsp. analizowano podobny jak w przedstawionej rozprawie zwierzęcy model choroby Parkinsona, gdzie elementem terapeutycznym eksperymentów było wykonanie bezpośredniego stereotaktycznego podania wektora zawierającego gen PGRN [1009]. Zastosowany podczas doświadczenia wektor pLenti6/R4R2/V5-DEST (ND-602) stanowił nośnik dla genu PGRN, natomiast otrzymujące go myszy szczepu C57BL/6 zostały poddane dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL w dawce 30 mg/kg w ciągu 5 kolejnych dni. W tym przypadku zastosowanie bezpośredniej domózgowej iniekcji wektora lentiwirusowego ND-602 zawierającego gen dla PGRN u myszy poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z brakiem istotnego spadku poziomów stężeń DA, DOPAC oraz HVA jak również brakiem wzrostu poziomu obrotów DOPAC/DA oraz HVA/DA w obrębie ST. Jednocześnie, zastosowanie ND-602 było związane z brakiem istotnego spadku populacji komórek TH^+ w obrębie ST oraz SN, wykazując kolektywnie, iż PGRN wywiera neuroprotekcyjny wpływ na komórki układu nigrostriatalnego. Odwołując się do wcześniej uzyskanych wyników dotyczących poziomu ekspresji TNF-α oraz innych mediatorów zapalnych należy stwierdzić, iż uzyskane dane oraz wartości zgodnie ze wcześniejszymi danymi literaturowymi pozwalają na rozpatrywanie ich roli jako czynników związanych z rozwojem reakcji neurozapalnej oraz zjawiska neurodegeneracji. Z drugiej jednak strony nie można jednoznacznie wykluczyć ich potencjalnej aktywności neuroprotekcyjnej, przez co mogą stanowić istotny element mechanizmów naprawczych w obrębie układu nigrostriatalnego, gdzie zjawisko to podlega potencjalnie wielokierunkowej oraz wielopoziomowej regulacji. W literaturze wykazano, iż TNF-α może realizować swoje neuroprotekcyjne działanie poprzez receptory TNFR1, modulując w tym przypadku funkcję DAT, co zaobserwowano w modelu po podaniu metamfetaminy [1010]. Wiadomo, iż receptory dedykowane TNF-α znajdują się na powierzchni wszystkich elementów komórkowych występujących w obrębie układu nigrostriatalnego, co jest związane z faktem iż cytokina ta może oddziaływać na neurony dopaminergiczne w sposób bezpośredni, jak i pośredni poprzez komórki glejowe [1011]. Istotnym jest fakt, iż u osób z chorobą Parkinsona dochodzi do wzrostu ekspresji puli receptorów TNFR1 w obrębie układu nigrostriatalnego [1012]. Oczekiwanym efektem byłoby, że

ograniczenie wpływu TNF-α na wstępnym etapie po intoksykacji MPTP-HCL powinno być związane z istotnym, trwałym ograniczeniem stopnia neurodegeneracji. Nie można jednak wykluczyć, iż w tym przypadku TNF-α wydzielany w ostrej fazie reakcji neurozapalnej może pełnić funkcję w uruchamianiu procesów regeneracyjnych [1013]. Jednocześnie synteza tej cytokiny może być związana z nasileniem zmian w obrębie uszkodzonego szlaku nigrostriatalnego, niekorzystnych dla neuronów dopaminergicznych [1014]. W tym przypadku wczesne zastosowanie Atsttrin oraz związany z tym brak oczekiwanego efektu farmakologicznego można powiązać z wyżej opisanymi mechanizmami patofizjologicznymi. Komplementarne oddziaływanie TNF-α może być również realizowane za pośrednictwem innych receptorów, gdzie zablokowanie TNFR1 może wymuszać podjęcie mechanizmów kompensacyjnych polegających na syntezie innych funkcjonalnych receptorów, przez co przykazywanie sygnału związanego z TNF-α pozostaje zachowane, prowadząc do obniżenia poziomu DA [1015]. Pewne wyjaśnienie uzyskanych wyników mogą przynieść obserwacje dotyczące funkcjonowania TNF-α w obrębie OUN, gdzie stwierdza się jego zróżnicowany wpływ w zależności od lokalizacji neuroanatomicznej oraz zdolności do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κB [1016]. Jednocześnie wiadomo, iż TNF-α może regulować poziom stężenia DA w obrębie synaps i ciał komórek nerwowych, dlatego warto zaznaczyć, iż wykorzystanie metody HPLC do analizy stężenia neuroprzekaźników w zhomogenizowanej tkance stanowi wartośc całkowitej puli DA obecnej w cytoplazmie, przestrzeni pozakomórkowej oraz przechowywanej w pęcherzykach synaptycznych, co może wpływać na rzeczywisty postulowany mechanizm oddziaływania farmakologicznego Atsttrin w warunkach omawianego modelu [1017]. Nie można również wykluczyć, że wydłużenie czasu obserwacji pozwoliłoby potencjalnie wykazać późniejszy wzrost poziomu stężenia DA, gdzie uwzględniając latencję, mogłoby dość do pełnej aktywacji mechanizmów neuroregeneracyjnych. Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające stan funkcjonalny układu noradrenergicznego w trakcie drugiej części badania przeprowadzonej celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia NA zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) było związane z istotnym statystycznie średnim spadkiem poziomu tego neuroprzekaźnika w obrębie CA, CX oraz CM. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w

dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane z istotnym statystycznie spadkiem poziomu stężenia NA w obrębie CX. Równoległe obserwacje dotyczące poziomu stężenia MHPG oraz obrotów MHPG/NA były związane ze spadkiem obydwu parametrów w obrębie CX po podaniu Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona. W naturalnym przebiegu choroby Parkinsona poza zmianami neuropatologicznymi w obrębie szlaków dopaminergicznych obserwuje się również zwyrodnienia komórek barwnikowych w obszarze miejsca sinawego zlokalizowanego w moście, gdzie zlokalizowane są również skupiska komórek noradrenergicznych [1018]. Uważa się, że postępujące uszkodzenie układu noradrenergicznego wiąże się z objawami depresji oraz narastającymi objawami otępiennymi u pacjentów z chorobą Parkinsona [1019]. Zaobserwowano również, iż uszkodzenie struktury miejsca sinawego jest związane z zahamowaniem syntezy DA w obrębie ST, natomiast stymulacja tej struktury nasila aktywność neuronów dopaminergicznych [1020]. Biorąc pod uwagę tezy założone w niniejszej pracy, wydawało by się, iż zastosowanie Atsttrin powinno być związane z ograniczeniem spadku poziomu stężenia NA po intoksykacji MPTP-HCL w obrębie struktur neuroanatomicznych związanych z transmisją noradrenergiczną. W oparciu o dotychczasowe wyniki badań trudno jednoznacznie określić mechanizm w jakim Atsttrin wpływa na transmisję noradrenergiczną w analizowanym modelu choroby Parkinsona. Wydaje się zasadne, iż należy w tym przypadku częściowo wziąć pod uwagę analogiczne zjawiska patofizjologiczne odpowiedzialne za obserwowany wcześniej spadek poziomu DA po zastosowaniu Atsttrin. Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające stan funkcjonalny układu serotoninergicznego w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia 5-HT zastosowanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) było związane z istotnym statystycznie średnim spadkiem poziomu stężenia tego neuroprzekaźnika w obrębie CA oraz CX. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane z istotnym statystycznie spadkiem

poziomu stężenia 5-HT w obrębie CX. Równoległe obserwacje dotyczące poziomu stężenia 5-HIAA oraz obrotów 5-HIAA/5-HT były związane ze wzrostem obydwu wartości w obrębie ST, CA oraz CX po podaniu Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane ze wzrostem wartości poziomu stężenia 5-HT oraz obrotów 5-HIAA/5-HT w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. W przebiegu choroby Parkinsona obserwuje się obniżenie poziomu 5-HT, co jest najbardziej wyrażone w obrębie VTA oraz innych struktur mezolimbicznych [1021]. Osoby z chorobą Parkinsona prezentują objawy nasilonej apatii, depresji oraz lęku, które można postrzegać jako kompleksowe zaburzenia neurokognitywistyczne powstałe w wyniku zaburzonej transmisji serotoninergicznej w obrębie wyspy (łac. *insula*), kory oczodołowo-czołowej (łac. *cortex orbitofrontalis*) oraz przedniego zakrętu obręczy, w szczególności w obszarze położonym brzusznie do kolana ciała modzelowatego (łac. *genu corporis callosi*) [1022]. Obniżenie aktywności DA wpływa w tym przypadku również na spadek aktywności transmisji serotoninergicznej. Istotny w tym przypadku wydaje się antagonizm w stosunku do receptora 5-HT_{2C}, związany z nasilaniem wydzielania DA w obszarze przedczołowym [1023]. Receptor ten pełni istotną rolę w regulacji uwalniania DA, zarówno bezpośrednio, jak i przez projekcje glutaminergiczne dochodzące do jądra półleżącego [1024]. Wpływ 5-HT jest w tym przypadku odpowiedzialny za hamowanie GLU za pośrednictwem receptora 5-HT_{1A} [1025]. W tym przypadku wydaje się, iż Atsttrin wywiera pozytywny wpływ na przywrócenie transmisji serotoninergicznej w analizowanych obszarach neuroanatomicznych ulegających procesowi neurodegeneracji w przebiegu choroby Parkinsona.

Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające stan funkcjonalny układu glutaminergicznego w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do ST oraz SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia GLU zastosowanie związku było związane kolejno z istotnie statystycznym wzrostem (podanie do ST) oraz spadkiem (podanie do SN) poziomu tego neuroprzekaźnika w obrębie CX. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg

(0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane z istotnym statystycznie wzrostem poziomu stężenia GLU w obrębie CA oraz CM. W zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi oraz ugruntowaną wiedzą dotyczącą zjawisk neurotransmisji w przebiegu choroby Parkinsona po dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 zaobserwowano analogicznie ogólny średni wzrost poziomu stężenia GLU w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych [1026]. W przebiegu choroby Parkinsona zwiększona aktywność układu glutaminergicznego stanowi czynnik destrukcyjny dla zakończeń neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie STN, SN oraz GPi jak również szlaków korowo-prążkowiowych [1027]. W tym przypadku wpływ GLU jest odpowiedzialny za wystąpienie objawów motorycznych choroby, objawów niepożądanych terapii L-DOPA oraz procesu degeneracji neuronów dopaminergicznych [1028]. W badaniach przeprowadzonych przez Xu i wsp. zaobserwowano, iż hodowle szczurzych neuronów (E18.5) pobrane z CX poddane wpływowi GLU wykazują większą przeżywalność po inkubacji z PGRN [897]. W tym przypadku mechanizmem pozwalającym na uniknięcie apoptozy wydaje się być aktywacja szlaku PI3K/AKT oraz MAPK/ERK1/2. Biorąc pod uwagę opisane powyżej, choć w bardzo ograniczonym zakresie, dane literaturowe wydawało by się, iż zastosowanie Atsttrin powinno być związane ze spadkiem aktywności szlaku glutaminergicznego u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL w obrębie struktur neuroanatomicznych powiązanych szlakiem nigrostriatalnym. W oparciu o dotychczasowe wyniki badań trudno jednoznacznie określić mechanizm w jakim Atsttrin wpływa na transmisję glutaminergiczną w analizowanym modelu choroby Parkinsona. Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające stan funkcjonalny układu GABA-ergicznego w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż zastosowanie związku było związane z istotnym statystycznie wzrostem poziomu GABA w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane z istotnym statystycznie wzrostem poziomu stężenia GABA w obrębie większości ocenianych

struktur neuroanatomicznych. GABA stanowi głowny neuroprzekaźnik o działaniu hamującym, obejmując około 20-30% synaps zlokalizowanych w obrębie OUN [1029]. Istotnym jest, iż układ glutaminergiczny funkcjonuje w dynamicznej równowadze z hamującym układem GABA-ergicznym, gdzie zaburzenia tej równowagi mogą wpływać na wystąpienie zaburzeń funkcji układu dopaminergicznego oraz stanowić istotny czynnik w patofizjologii choroby Parkinsona [1030]. Funkcja jaką wykazuje układ GABA-ergiczny polega na ochronie neuronów poprzez precyzyjną kontrolę napływu jonów Ca^{2+}, bezpośrednio przez receptory GABA, jak również pośrednio poprzez sieć astroglejową [1031]. Istotne jest, iż usunięcie jonów Ca^{2+} z mitochondriów oraz cytoplazmy neuronu jest związane ze znacznym wysiłkiem energetycznym komórki, dlatego neurony przeciążone Ca^{2+} mają duże zapotrzebowanie na energię, co wskazuje również pośrednio na rolę dysfunkcji mitochondriów w patogenezie choroby Parkinsona [1032]. Zjawisko to podlega kontroli i regulacji przez aktywność GABA, która może precyzyjnie dozować ilość Ca^{2+} wnikającą do wnętrza komórki. Spadek zdolności buforowania Ca^{2+} wydaje się być potencjalnie odpowiedzialny za utratę neuronów w SN w przebiegu choroby Parkinsona [1033]. Wzajemna równowaga między aktywnością hamującą i aktywująca w obrębie sieci neuronalnych jest również w tym przypadku związana z metabolizmem GABA oraz GLU. W tej równowadze sygnał pallidalny utrzymuje ośrodki czuciowo-motoryczne i motywacyjne (wzgórze, VTA oraz SN) i ich docelowe neurony pod wpływem tonicznego (~90 Hz) hamowania GABA [1034]. Spadek tonicznej aktywności hamującej GABA w zwojach podstawy mózgu powoduje w tym przypadku zwiększoną koaktywację różnych konkurencyjnych programów neuromotorycznych, wyzwalając objawy choroby Parkinsona [1035]. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki wydaje się, iż zastosowanie Atsttrin odpowiada za przywrócenie równowagi pomiędzy toniczną aktywnością układu glutaminergicznego oraz GABA-ergicznego. Zasadne wydaje się stwierdzenie, iż wykonanie bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin w tym modelu doświadczalnym jest efektywne i przynosi terapeutyczny efekt w zakresie przywrócenia neurofizjologicznej równowagi pomiędzy tymi neuroprzekaźnikami. W oparciu o dotychczasowe wyniki badań trudno jednak precyzyjnie określić mechanizm, w jakim Atsttrin wpływa na transmisję GABA-ergiczną w analizowanym modelu choroby Parkinsona. W niniejszej pracy oprócz analizy poziomów stężeń GLU oraz GABA poddano również ewaluacji inne aminokwasy takie jak ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER. Rola oraz znaczenie aminokwasów w patogenezie choroby Parkinsona oraz funkcjonowaniu OUN jest od

wielu lat przedmiotem intensywnych badań [1036]. Zaobserwowano, iż stężenia wybranych aminokwasów w CSF oraz w osoczu osób zdrowych różnią od tych mierzonych u pacjentów z chorobą Parkinsona [1037]. W tym przypadku obserwuje się również zmniejszenie współczynnika określającego stosunek ich stężenia w CSF do stężenia w osoczu, co może być związane z istnieniem zaburzeń ich transportu przez BBB [1038]. Analizując kolejno parametry neurochemiczne oceniające poziom stężeń badanych aminokwasów w trakcie drugiej części badania celem oceny eksperymentalnego wpływu bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby stwierdzono, iż w przypadku poziomu stężenia ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER zastosowanie związku było związane z istotnymi statystycznie średnimi wzrostami w obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiejkolwiek innej procedurze eksperymentalnej było w większości przypadków analogicznie związane z istotnym statystycznie wzrostem poziomu stężenia ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER obrębie większości ocenianych struktur neuroanatomicznych. Kompleksowe mechanizmy odpowiedzialne za farmakologiczny efekt wpływu Atsttrin na stężenia poszczególnych aminokwasów wydają się aktualnie trudne do określenia, co wymaga dalszych pogłębionych badań i analiz.

Aktualnie jednoznaczne ustalenie miejsca terapii lekami immunomodulującymi w przebiegu choroby Parkinsona stanowi skomplikowane zagadnienie z pogranicza wielu dziedzin takich jak neurofarmakologia, neurochemia, neuropatologia, biologia molekularna i genetyka [1039]. Istotnym wydaje się, że w chwili obecnej mimo ogromnego postępu wiedzy, dalsze szczegółowe poznanie mechanizmów reakcji neurozapalnej zachodzącej w przebiegu choroby Parkinsona, jak również innych schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym, ma wciąż podstawowe znaczenie w zrozumieniu patofizjologii tych chorób oraz poszukiwaniu nowych metod terapii i leczenia [1040]. Jak wykazano w prezentowanych rozdziałach tej pracy, uzyskane wyniki pozwoliły kolektywnie na zweryfikowanie czy zastosowanie Atsttrin może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki skłaniają do prowadzenia dalszych badań służących pogłębieniu wiedzy na temat Atsttrin dotyczących farmakologicznych mechanizmów działania tego związku,

optymalizacji metod jego podawania jak jego dalszego potencjalnego zastosowania w warunkach klinicznych.

WNIOSKI

1) Na podstawie analizy kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin podanych do prążkowia (ST) na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt wykazano, iż Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) wykazuje optymalny efekt farmakologiczny i charakteryzuje się dostatecznie wysokim poziomem bezpieczeństwa w obrębie mikrośrodowiska tkanki mózgu.

2) Bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) za pomocą metod stereotaktycznych do prążkowia (ST) jest związane z zahamowaniem reakcji zapalnej w obrębie prążkowia, hipokampa, kory oraz móżdżku w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL.

3) Bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) za pomocą metod stereotaktycznych do prążkowia (ST) jest związane z wystąpieniem zmian poziomów ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym jak również zmianą ośrodkowego profilu neurochemicznego aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

4) Bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) za pomocą metod stereotaktycznych do istoty czarnej (SN) jest związane z zahamowaniem reakcji zapalnej w obrębie prążkowia, hipokampa, kory oraz móżdżku w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL.

5) Bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 μg/μl) za pomocą metod stereotaktycznych do istoty czarnej (SN) jest związane z wystąpieniem zmian poziomów ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym jak również zmianą ośrodkowego profilu neurochemicznego aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

6) Konieczne są dalsze badania dotyczące możliwości zastosowania Atsttrin jako potencjalnego nowego leku w terapii choroby Parkinsona.

7) Bezpośrednia stereotaktyczna iniekcja domózgowa Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 stanowi optymalną metodę podania związku pozwalając na uzyskanie oczekiwanego efektu farmakologicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. Lancet. 2015 Aug 29;386(9996):896-912. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
2. Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. Semin Neurol. 2017 Apr;37(2):118-126. doi: 10.1055/s-0037-1601888.
3. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. Clin Neurophysiol. 2008 Jul;119(7):1459-74. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.017.
4. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Mov Disord. 2011 May;26(6):1049-55. doi: 10.1002/mds.23732.
5. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr;79(4):368-76. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.
6. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2002 Spring;14(2):223-36; discussion 222. doi: 10.1176/jnp.14.2.223
7. Zhang ZX, Dong ZH, Román GC. Early descriptions of Parkinson disease in ancient China. Arch Neurol. 2006 May;63(5):782-4. doi: 10.1001/archneur.63.5.782.
8. Li Q, Zhao D, Bezard E. Traditional Chinese medicine for Parkinson's disease: a review of Chinese literature. Behav Pharmacol. 2006 Sep;17(5-6):403-10. doi: 10.1097/00008877-200609000-00006.
9. Zeng BY. Effect and Mechanism of Chinese Herbal Medicine on Parkinson's Disease. Int Rev Neurobiol. 2017;135:57-76. doi: 10.1016/bs.irn.2017.02.004.
10. Manyam BV. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. Mov Disord. 1990;5(1):47-8. doi: 10.1002/mds.870050112.
11. Ovallath S, Deepa P. The history of parkinsonism: descriptions in ancient Indian medical literature. Mov Disord. 2013 May;28(5):566-8. doi: 10.1002/mds.25420. doi: 10.1002/mds.25420.
12. Pathak-Gandhi N, Vaidya AD. Management of Parkinson's disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. J Ethnopharmacol. 2017 Feb 2;197:46-51. doi: 10.1016/j.jep.2016.08.020.
13. Damodaran M, Ramaswamy R. Isolation of l-3:4-dihydroxyphenylalanine from the seeds of Mucuna pruriens. Biochem J. 1937 Dec;31(12):2149-52. doi: 10.1042/bj0312149.
14. Stern G. Did parkinsonism occur before 1817? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1989 Jun;Suppl:11-2. doi: 10.1136/jnnp.52.suppl.11.
15. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones, London, 1817.
16. Hurwitz B. Urban observation and sentiment in James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy (1817). Lit Med. 2014 Spring;32(1):74-104. doi: 10.1353/lm.2014.0002.
17. Sylvius de la Boe F. Opera Medica. Danielem Elsevirium et Abrahamum Wolfgang, Amsterdam. 1680.
18. Sauvages de la Croix FB de. Nosologia methodica Amstelodami: Sumptibus Fratrum de Tournes. 1673.
19. Goetz CG. Charcot: Past and present. Rev Neurol (Paris). 2017 Dec;173(10):628-636. doi: 10.1016/j.neurol.2017.04.004.
20. Goedert M, Compston A. Parkinson's disease - the story of an eponym. Nat Rev Neurol. 2018 Jan;14(1):57-62. doi: 10.1038/nrneurol.2017.165.
21. Zalc B. One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. Brain. 2018 Dec 1;141(12):3482-3488. doi: 10.1093/brain/awy287.
22. Walusinski O. Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. Rev Neurol (Paris). 2018 Sep - Oct;174(7-8):491-505. doi: 10.1016/j.neurol.2017.08.005.
23. Meynert T. Ueber Beitrage zur differential Diagnose der paralytischen Irrsinns. Wiener Med Presse 1871;11:645-647.

24. Lewy FH. Paralysis agitans. 1. Pathologische Anatomie. In: Lewandowsky M, editor. Handbuch der Neurologie, Dritter Band, Spezielle Neurologie I. Berlin: Julius Springer; 1912. pp. 920–933.
25. Lewy FH. Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. Dtsch Ztschr Nervenheilkunde. 1914;50:50–55.
26. Lewy FH. Die Lehre vom Tonus und der Bewegung Zugleich Systematische Untersuchungen zur Klinik, Physiologie, Pathologie und Pathogenese der. Paralysis agitans. Berlin: Julius Springer; 1923.
27. Parent M, Parent A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. Can J Neurol Sci. 2010 May;37(3):313-9. doi: 10.1017/s0317167100010209.
28. Blocq P., Marinesco G. (1893). Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiplégique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cerebral. Comptes Rendus Séances Société Biol. 5, 105–111.
29. Brissaud, Lecons sur les maladies nereuses, Vols. XXII and XXIII, Masson, Paris 1895.
30. Tretiakoff, C. Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger, These de Paris, 1919.
31. Charles Foix et Jean Nicolesco : Anatomie cérébrale. Les noyaux gris centraux et la région mesencephalo-sous-optique ; suivi d'une appendice sur l'anatomie pathologique de la maladie de Parkinson, Paris, Masson, 1925.
32. Micale MS. The salpêtrière in the age of Charcot: an institutional perspective on medical history in the late nineteenth century. J Contemp Hist. 1985;20(4):703-31. doi: 10.1177/002200948502000411.
33. Hostiuc S, Drima E, Buda O. Shake the Disease. Georges Marinesco, Paul Blocq and the Pathogenesis of Parkinsonism, 1893. Front Neuroanat. 2016 Jun 24;10:74. doi: 10.3389/fnana.2016.00074.
34. Raab W. (1948) Specific sympathomimetic substance in the brain. Am. J. Physiol., 152: 324–339.
35. RaabW, Gigee W. Concentration and distribution of "encephalin" in the brain of humans and animals. Proc Soc Exp Biol Med. 1951 Jan;76(1):97-100. doi: 10.3181/00379727-76-18398.
36. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature. 1957 Nov 30;180(4596):1200. doi: 10.1038/1801200a0.
37. Carlsson A, lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. Science. 1958 Feb 28;127(3296):471. doi: 10.1126/science.127.3296.471 .
38. Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Mensachen undihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems.Klin Wochenschr 1960;38:1238–1239.
39. Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brainfunction. Pharmacol Rev 1966;18:925–964.
40. Birkmayer von W., Hornykiewicz O. (1961) Der L-3,4-dioxyphenylalanin (=DOPA) Effect bei der Parkinsonakinese. Wien. Klin. Wochenschrift, 73: 787–788.
41. Hornykiewicz O. (1963) The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. Wien.Klin. Wochenschr., 75: 309–312.
42. Anden NE, Carlssson A, Dahlstrom A, Fuxe K, Hillarp NA,Larsson K. Demonstration and mapping out of nigro-neostriataldopamine neurons. Life Sci 1964;3:523–530.
43. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. N Engl J Med. 1967 Feb 16;276(7):374-9. doi: 10.1056/NEJM196702162760703.
44. Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. Neuropsychopharmacology. 2012 Jan;37(1):213-46. doi: 10.1038/npp.2011.212.

45. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. JAMA. 2014 Apr 23-30;311(16):1670-83. doi: 10.1001/jama.2014.3654.
46. Gross CE, Boraud T, Guehl D, Bioulac B, Bezard E. From experimentation to the surgical treatment of Parkinson's disease: prelude or suite in basal ganglia research? Prog Neurobiol. 1999 Dec;59(5):509-32. doi: 10.1016/s0301-0082(99)00015-5.
47. Meyers R. Surgical procedure for postencephalitic tremor, with notes on the physiology of the premotor fibers. Arch Neurol 1940; 44:455459.
48. Speelman JD, Bosch DA. Resurgence of functional neurosurgery for Parkinson's disease: a historical perspective. Mov Disord. 1998 May;13(3):582-8. doi: 10.1002/mds.870130336.
49. Rahman M, Murad GJ, Mocco J. Early history of the stereotactic apparatus in neurosurgery. Neurosurg Focus. 2009 Sep;27(3):E12. doi: 10.3171/2009.7.FOCUS09118.
50. Hariz MI, Hariz GM. Therapeutic stimulation versus ablation. Handb Clin Neurol. 2013;116:63-71. doi: 10.1016/B978-0-444-53497-2.00006-1.
51. Sironi VA. Origin and evolution of deep brain stimulation. Front Integr Neurosci. 2011 Aug 18;5:42. doi: 10.3389/fnint.2011.00042.
52. Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J. Effets de la stimulation du noyau sous-thalamique dans la maladie de Parkinson [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. Rev Neurol (Paris). 1993;149(3):175-6.
53. Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M, Perret J. Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. Stereotact Funct Neurosurg. 1994;62(1-4):76-84. doi: 10.1159/000098600.
54. Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group, Obeso JA, Olanow CW, Rodriguez-Oroz MC, Krack P, Kumar R, Lang AE. Deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. N Engl J Med. 2001 Sep 27;345(13):956-63. doi: 10.1056/NEJMoa000827.
55. Gross RE, McDougal ME. Technological advances in the surgical treatment of movement disorders. Curr Neurol Neurosci Rep. 2013 Aug;13(8):371. doi: 10.1007/s11910-013-0371-2.
56. Li J, Mei S, Jia X, Zhang Y. Evaluation of the Direct Effect of Bilateral Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus on Levodopa-Induced On-Dyskinesia in Parkinson's Disease. Front Neurol. 2021 Apr 12;12:595741. doi: 10.3389/fneur.2021.595741.
57. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur J Pharmacol. 1968 Dec;5(1):107-10. doi: 10.1016/0014-2999(68)90164-7.
58. Ungerstedt U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. Acta Physiol Scand Suppl. 1971;367:49-68. doi: 10.1111/j.1365-201x.1971.tb10999.x.
59. Björklund A, Lindvall O. Replacing Dopamine Neurons in Parkinson's Disease: How did it happen? J Parkinsons Dis. 2017;7(s1):S21-S31. doi: 10.3233/JPD-179002.
60. Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. Science. 1990 Feb 2;247(4942):574-7. doi: 10.1126/science.2105529.
61. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Mårtensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. J Neurosurg. 1985 Feb;62(2):169-73. doi: 10.3171/jns.1985.62.2.0169.
62. Goetz CG, Stebbins GT 3rd, Klawans HL, Koller WC, Grossman RG, Bakay RA, Penn RD. United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. Neurology. 1991 Nov;41(11):1719-22. doi: 10.1212/wnl.41.11.1719.

63. Venkatesh K, Sen D. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson's Disease. Curr Stem Cell Res Ther. 2017;12(4):326-347. doi: 10.2174/1574888X12666161114122059.
64. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 15;105(15):5856-61. doi: 10.1073/pnas.0801677105.
65. Chen W, Huang Q, Ma S, Li M. Progress in Dopaminergic Cell Replacement and Regenerative Strategies for Parkinson's Disease. ACS Chem Neurosci. 2019 Feb 20;10(2):839-851. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00389.
66. Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life Sci. 2019 Jun 1;226:77-90. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.057.
67. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. Neuron. 2019 Mar 6;101(5):839-862. doi: 10.1016/j.neuron.2019.02.017.
68. Ozawa K, Fan DS, Shen Y, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogawa M, Urabe M, Kume A, Nakano I. Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. J Neural Transm Suppl. 2000;(58):181-91. doi: 10.1007/978-3-7091-6284-2_15.
69. Fan D, Shen Y, Kang D, Nakano I, Ozawa K. Adeno-associated virus vector-mediated triple gene transfer of dopamine synthetic enzymes. Chin Med J (Engl). 2001 Dec;114(12):1276-9.
70. Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. Brain Res. 2000 Dec 15;886(1-2):82-98. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02915-2.
71. Mandel RJ, Burger C. Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: promises and challenges. Curr Opin Mol Ther. 2004 Oct;6(5):482-90.
72. Domanskyi A, Saarma M, Airavaara M. Prospects of Neurotrophic Factors for Parkinson's Disease: Comparison of Protein and Gene Therapy. Hum Gene Ther. 2015 Aug;26(8):550-9. doi: 10.1089/hum.2015.065.
73. Bondarenko O, Saarma M. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: Clinical Trials, Open Challenges and Nanoparticle-Mediated Delivery to the Brain. Front Cell Neurosci. 2021 Jun 2;15:682597. doi: 10.3389/fncel.2021.682597.
74. Przedborski S. The two-century journey of Parkinson disease research. Nat Rev Neurosci. 2017 Mar 17;18(4):251-259. doi: 10.1038/nrn.2017.25.
75. Söderbom G. Status and future directions of clinical trials in Parkinson's disease. Int Rev Neurobiol. 2020;154:153-188. doi: 10.1016/bs.irn.2020.02.009.
76. Oertel W, Schulz JB. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. J Neurochem. 2016 Oct;139 Suppl 1:325-337. doi: 10.1111/jnc.13750.
77. Yan F, Robert M, Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2017 Nov 1;9(5):157-163.
78. Strasak AM, Zaman Q, Pfeiffer KP, Göbel G, Ulmer H. Statistical errors in medical research - a review of common pitfalls. Swiss Med Wkly. 2007 Jan 27;137(3-4):44-9. doi: 10.4414/smw.2007.11587.
79. Trotta L, Kabeya Y, Buyse M, Doffagne E, Venet D, Desmet L, Burzykowski T, Tsuburaya A, Yoshida K, Miyashita Y, Morita S, Sakamoto J, Praveen P, Oba K. Detection of atypical data in multicenter clinical trials using unsupervised statistical monitoring. Clin Trials. 2019 Oct;16(5):512-522. doi: 10.1177/1740774519862564.

80. Peters DH, Garg A, Bloom G, Walker DG, Brieger WR, Rahman MH. Poverty and access to health care in developing countries. Ann N Y Acad Sci. 2008;1136:161-71. doi: 10.1196/annals.1425.011.
81. Ball N, Teo WP, Chandra S, Chapman J. Parkinson's Disease and the Environment. Front Neurol. 2019 Mar 19;10:218. doi: 10.3389/fneur.2019.00218.
82. Kanegusuku H, Ritti-Dias RM, Barbosa PYI, das Neves Guelfi ET, Okamoto E, Miranda CS, de Paula Oliveira T, Piemonte MEP. Influence of motor impairment on exercise capacity and quality of life in patients with Parkinson disease. J Exerc Rehabil. 2021 Aug 23;17(4):241-246. doi: 10.12965/jer.2142290.145.
83. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. J Parkinsons Dis. 2018;8(s1):S3-S8. doi: 10.3233/JPD-181474.
84. Oña ED, Balaguer C, Cano-de la Cuerda R, Collado-Vázquez S, Jardón A. Effectiveness of Serious Games for Leap Motion on the Functionality of the Upper Limb in Parkinson's Disease: A Feasibility Study. Comput Intell Neurosci. 2018 Apr 11;2018:7148427. doi: 10.1155/2018/7148427.
85. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. Nat Rev Dis Primers. 2017 Mar 23;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.
86. Dashtipour K. Do genetic factors protect against Parkinson's disease? What I can learn from my healthy grandma. Med Hypotheses. 2014 Dec;83(6):637-9. doi: 10.1016/j.mehy.2014.09.024.
87. Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. Neurology. 2000 Nov 14;55(9):1358-63. doi: 10.1212/wnl.55.9.1358.
88. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. CMAJ. 2016 Nov 1;188(16):1157-1165. doi: 10.1503/cmaj.151179.
89. Marder K, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Côté L, Louis E, Groves J, Mayeux R. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. Neurology. 1996 Jul;47(1):155-60. doi: 10.1212/wnl.47.1.155.
90. Ishihara LS, Cheesbrough A, Brayne C, Schrag A. Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007 Dec;78(12):1304-9. doi: 10.1136/jnnp.2006.100107.
91. Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. Neurology. 1999 Apr 12;52(6):1214-20. doi: 10.1212/wnl.52.6.1214.
92. Qian E, Huang Y. Subtyping of Parkinson's Disease - Where Are We Up To? Aging Dis. 2019 Oct 1;10(5):1130-1139. doi: 10.14336/AD.2019.0112.
93. Ben-Joseph A, Marshall CR, Lees AJ, Noyce AJ. Ethnic Variation in the Manifestation of Parkinson's Disease: A Narrative Review. J Parkinsons Dis. 2020;10(1):31-45. doi: 10.3233/JPD-191763.
94. Iwasaki S, Narabayashi Y, Hamaguchi K, Iwasaki A, Takakusagi M. Cause of death among patients with Parkinson's disease: a rare mortality due to cerebral haemorrhage. J Neurol. 1990 Apr;237(2):77-9. doi: 10.1007/BF00314665.
95. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? Mov Disord. 2017 Jul;32(7):983-990. doi: 10.1002/mds.27037.
96. Rodriguez M, Rodriguez-Sabate C, Morales I, Sanchez A, Sabate M. Parkinson's disease as a result of aging. Aging Cell. 2015 Jun;14(3):293-308. doi: 10.1111/acel.12312.
97. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. Nat Rev Neurosci. 2011 Jun;12(6):359-66. doi: 10.1038/nrn3039.
98. Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? J Parkinsons Dis. 2019;9(3):501-515. doi: 10.3233/JPD-191683.

99. Jurado-Coronel JC, Cabezas R, Ávila Rodríguez MF, Echeverria V, García-Segura LM, Barreto GE. Sex differences in Parkinson's disease: Features on clinical symptoms, treatment outcome, sexual hormones and genetics. Front Neuroendocrinol. 2018 Jul;50:18-30. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.09.002.
100. Wright Willis A, Evanoff BA, Lian M, Criswell SR, Racette BA. Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US Medicare beneficiaries. Neuroepidemiology. 2010;34(3):143-51. doi: 10.1159/000275491.
101. Caudle WM, Guillot TS, Lazo CR, Miller GW. Industrial toxicants and Parkinson's disease. Neurotoxicology. 2012 Mar;33(2):178-88. doi: 10.1016/j.neuro.2012.01.010.
102. Chauhan NB. Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury. Restor Neurol Neurosci. 2014;32(2):337-65. doi: 10.3233/RNN-130354.
103. Gardner RC, Byers AL, Barnes DE, Li Y, Boscardin J, Yaffe K. Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study. Neurology. 2018 May 15;90(20):e1771-e1779. doi: 10.1212/WNL.0000000000005522.
104. Nielsen SD, Pearson NM, Seidler K. The link between the gut microbiota and Parkinson's Disease: A systematic mechanism review with focus on α-synuclein transport. Brain Res. 2021 Oct 15;1769:147609. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147609.
105. Kaur T, Uppoor A, Naik D. Parkinson's disease and periodontitis - the missing link? A review. Gerodontology. 2016 Dec;33(4):434-438. doi: 10.1111/ger.12188.
106. Sansores-España LD, Melgar-Rodríguez S, Olivares-Sagredo K, Cafferata EA, Martínez-Aguilar VM, Vernal R, Paula-Lima AC, Díaz-Zúñiga J. Oral-Gut-Brain Axis in Experimental Models of Periodontitis: Associating Gut Dysbiosis With Neurodegenerative Diseases. Front Aging. 2021 Dec 10;2:781582. doi: 10.3389/fragi.2021.781582.
107. Billingsley KJ, Bandres-Ciga S, Saez-Atienzar S, Singleton AB. Genetic risk factors in Parkinson's disease. Cell Tissue Res. 2018 Jul;373(1):9-20. doi: 10.1007/s00441-018-2817-y.
108. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. Eur J Neurol. 2020 Jan;27(1):27-42. doi: 10.1111/ene.14108.
109. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2020 Aug;91(8):795-808. doi: 10.1136/jnnp-2019-322338.
110. Rikos D, Siokas V, Burykina TI, Drakoulis N, Dardiotis E, Zintzaras E. Replication of chromosomal loci involved in Parkinson's disease: A quantitative synthesis of GWAS. Toxicol Rep. 2021 Oct 12;8:1762-1768. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.10.008.
111. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. Lancet Neurol. 2016 Nov;15(12):1257-1272. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30230-7.
112. Schlossmacher MG, Tomlinson JJ, Santos G, Shutinoski B, Brown EG, Manuel D, Mestre T. Modelling idiopathic Parkinson disease as a complex illness can inform incidence rate in healthy adults: the P_R EDIGT score. Eur J Neurosci. 2017 Jan;45(1):175-191. doi: 10.1111/ejn.13476.
113. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. Parkinsonism Relat Disord. 2018 Jan;46 Suppl 1(Suppl 1):S30-S33. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.
114. Attems J, Toledo JB, Walker L, Gelpi E, Gentleman S, Halliday G, Hortobagyi T, Jellinger K, Kovacs GG, Lee EB, Love S, McAleese KE, Nelson PT, Neumann M, Parkkinen L, Polvikoski T, Sikorska B, Smith C, Grinberg LT, Thal DR, Trojanowski JQ, McKeith IG. Neuropathological consensus criteria for the evaluation of Lewy pathology in post-mortem brains: a multi-centre study. Acta Neuropathol. 2021 Feb;141(2):159-172. doi: 10.1007/s00401-020-02255-2.
115. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26;95(11):6469-73. doi: 10.1073/pnas.95.11.6469.

116. Gai WP, Yuan HX, Li XQ, Power JT, Blumbergs PC, Jensen PH. In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. Exp Neurol. 2000 Dec;166(2):324-33. doi: 10.1006/exnr.2000.7527.
117. Ingelsson M. Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. Front Neurosci. 2016 Sep 5;10:408. doi: 10.3389/fnins.2016.00408.
118. Geut H, Hepp DH, Foncke E, Berendse HW, Rozemuller JM, Huitinga I, van de Berg WDJ. Neuropathological correlates of parkinsonian disorders in a large Dutch autopsy series. Acta Neuropathol Commun. 2020 Mar 26;8(1):39. doi: 10.1186/s40478-020-00914-9.
119. 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;32(9):1264-1310. doi: 10.1002/mds.27115.
120. Rezaie P, Cairns NJ, Chadwick A, Lantos PL. Lewy bodies are located preferentially in limbic areas in diffuse Lewy body disease. Neurosci Lett. 1996 Jul 12;212(2):111-4. doi: 10.1016/0304-3940(96)12775-0.
121. 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;24(2):197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
122. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). J Neurol. 2002 Oct;249 Suppl 3:III/1-5. doi: 10.1007/s00415-002-1301-4.
123. Braak H, Müller CM, Rüb U, Ackermann H, Bratzke H, de Vos RA, Del Tredici K. Pathology associated with sporadic Parkinson's disease--where does it end? J Neural Transm Suppl. 2006;(70):89-97. doi: 10.1007/978-3-211-45295-0_15.
124. Braak H, Rüb U, Del Tredici K. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. J Neurol Sci. 2006 Oct 25;248(1-2):255-8. doi: 10.1016/j.jns.2006.05.011.
125. Jellinger KA. A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. Acta Neuropathol. 2008 Jul;116(1):1-16. doi: 10.1007/s00401-008-0406-y.
126. Parkkinen L, O'Sullivan SS, Collins C, Petrie A, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. Disentangling the relationship between lewy bodies and nigral neuronal loss in Parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 2011;1(3):277-86. doi: 10.3233/JPD-2011-11046.
127. Johansen KK, Torp SH, Farrer MJ, Gustavsson EK, Aasly JO. A Case of Parkinson's Disease with No Lewy Body Pathology due to a Homozygous Exon Deletion in *Parkin*. Case Rep Neurol Med. 2018 Jun 28;2018:6838965. doi: 10.1155/2018/6838965.
128. Martí MJ, Tolosa E, Campdelacreu J. Clinical overview of the synucleinopathies. Mov Disord. 2003 Sep;18 Suppl 6:S21-7. doi: 10.1002/mds.10559.
129. Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. Mov Disord. 2003 Sep;18 Suppl 6:S2-12. doi: 10.1002/mds.10557.
130. Jellinger KA. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. J Neural Transm (Vienna). 2004 Oct;111(10-11):1219-35. doi: 10.1007/s00702-004-0138-7.
131. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. Brain. 2002 Apr;125(Pt 4):861-70. doi: 10.1093/brain/awf080.

132. Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. Arch Neurol. 1993 Feb;50(2):140-8. doi: 10.1001/archneur.1993.00540020018011.
133. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. Lancet Neurol. 2009 Dec;8(12):1150-7. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70238-8.
134. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. Nature. 2014 Jan 16;505(7483):335-43. doi: 10.1038/nature12985.
135. Gear AR, Bednarek JM. Direct counting and sizing of mitochondria in solution. J Cell Biol. 1972 Aug;54(2):325-45. doi: 10.1083/jcb.54.2.325.
136. Lovas JR, Wang X. The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. Biochim Biophys Acta. 2013 Jan;1833(1):184-94. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.007.
137. Perrone M, Caroccia N, Genovese I, Missiroli S, Modesti L, Pedriali G, Vezzani B, Vitto VAM, Antenori M, Lebiedzinska-Arciszewska M, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P. The role of mitochondria-associated membranes in cellular homeostasis and diseases. Int Rev Cell Mol Biol. 2020;350:119-196. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.11.002.
138. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, Zierz S. Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. Biochem Soc Trans. 2000 Feb;28(2):164-9. doi: 10.1042/bst0280164.
139. Song DH, Park J, Maurer LL, Lu W, Philbert MA, Sastry AM. Biophysical significance of the inner mitochondrial membrane structure on the electrochemical potential of mitochondria. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2013 Dec;88(6):062723. doi: 10.1103/PhysRevE.88.062723.
140. Mazunin IO, Levitskii SA, Patrushev MV, Kamenski PA. Mitochondrial Matrix Processes. Biochemistry (Mosc). 2015 Nov;80(11):1418-28. doi: 10.1134/S0006297915110036.
141. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. Br Med Bull. 2013;106(1):135-59. doi: 10.1093/bmb/ldt017.
142. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 9;1410(2):103-23. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00161-3.
143. Bogorodskiy A, Okhrimenko I, Maslov I, Maliar N, Burkatovskii D, von Ameln F, Schulga A, Jakobs P, Altschmied J, Haendeler J, Katranidis A, Sorokin I, Mishin A, Gordeliy V, Büldt G, Voos W, Gensch T, Borshchevskiy V. Accessing Mitochondrial Protein Import in Living Cells by Protein Microinjection. Front Cell Dev Biol. 2021 Jul 7;9:698658. doi: 10.3389/fcell.2021.698658.
144. Graf JS, Schorn S, Kitzinger K, Ahmerkamp S, Woehle C, Huettel B, Schubert CJ, Kuypers MMM, Milucka J. Anaerobic endosymbiont generates energy for ciliate host by denitrification. Nature. 2021 Mar;591(7850):445-450. doi: 10.1038/s41586-021-03297-6.
145. Bolam JP, Pissadaki EK. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. Mov Disord. 2012 Oct;27(12):1478-83. doi: 10.1002/mds.25135.
146. Shepherd GM, Harris KM. Three-dimensional structure and composition of CA3-->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. J Neurosci. 1998 Oct 15;18(20):8300-10. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-20-08300.1998.
147. Misgeld T, Schwarz TL. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. Neuron. 2017 Nov 1;96(3):651-666. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.055.
148. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2001 Oct;21(10):1133-45. doi: 10.1097/00004647-200110000-00001.

149. Korf J, Gramsbergen JB. Timing of potential and metabolic brain energy. J Neurochem. 2007 Dec;103(5):1697-708. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04909.x.
150. Davis GW. Not Fade Away: Mechanisms of Neuronal ATP Homeostasis. Neuron. 2020 Feb 19;105(4):591-593. doi: 10.1016/j.neuron.2020.01.024.
151. Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. Neuron. 2015 May 20;86(4):883-901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.
152. Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. Cell. 2014 Feb 13;156(4):825-35. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.
153. Jang S, Nelson JC, Bend EG, Rodríguez-Laureano L, Tueros FG, Cartagenova L, Underwood K, Jorgensen EM, Colón-Ramos DA. Glycolytic Enzymes Localize to Synapses under Energy Stress to Support Synaptic Function. Neuron. 2016 Apr 20;90(2):278-91. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.011.
154. Gazit N, Vertkin I, Shapira I, Helm M, Slomowitz E, Sheiba M, Mor Y, Rizzoli S, Slutsky I. IGF-1 Receptor Differentially Regulates Spontaneous and Evoked Transmission via Mitochondria at Hippocampal Synapses. Neuron. 2016 Feb 3;89(3):583-97. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.034.
155. Kwon SK, Sando R 3rd, Lewis TL, Hirabayashi Y, Maximov A, Polleux F. LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. PLoS Biol. 2016 Jul 18;14(7):e1002516. doi: 10.1371/journal.pbio.1002516.
156. Banerjee R, Starkov AA, Beal MF, Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul;1792(7):651-63. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.11.007.
157. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. 1990 Mar;54(3):823-7. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x.
158. Subrahmanian N, LaVoie MJ. Is there a special relationship between complex I activity and nigral neuronal loss in Parkinson's disease? A critical reappraisal. Brain Res. 2021 Sep 15;1767:147434. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147434.
159. González-Rodríguez P, Zampese E, Stout KA, Guzman JN, Ilijic E, Yang B, Tkatch T, Stavarache MA, Wokosin DL, Gao L, Kaplitt MG, López-Barneo J, Schumacker PT, Surmeier DJ. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. Nature. 2021 Nov;599(7886):650-656. doi: 10.1038/s41586-021-04059-0.
160. Subrahmanian N, LaVoie MJ. Is there a special relationship between complex I activity and nigral neuronal loss in Parkinson's disease? A critical reappraisal. Brain Res. 2021 Sep 15;1767:147434. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147434.
161. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nat Rev Neurosci. 2008 Jul;9(7):505-18. doi: 10.1038/nrn2417.
162. Dodson MW, Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Curr Opin Neurobiol. 2007 Jun;17(3):331-7. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.010.
163. Singh A, Zhi L, Zhang H. LRRK2 and mitochondria: Recent advances and current views. Brain Res. 2019 Jan 1;1702:96-104. doi: 10.1016/j.brainres.2018.06.010.
164. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. Front Neuroanat. 2015 Jul 8;9:91. doi: 10.3389/fnana.2015.00091.
165. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging Cell. 2019 Dec;18(6):e13031. doi: 10.1111/acel.13031.
166. Fozia, Shaheen A, Ahmad I, Amin SB, Ahmad N, Ullah R, Bari A, Sohaib M, Hafiz Majid M, Alobaid A. Ballodiolic Acid A and B: Two New ROS, ($^{\bullet}$OH), ($ONOO^{-}$) Scavenging and Potent Antimicrobial Constituents Isolated from *Ballota*

pseudodictamnus (L.) Benth. Pharmaceutics. 2021 Mar 17;13(3):402. doi: 10.3390/pharmaceutics13030402.
167. Wu D, Yotnda P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. J Vis Exp. 2011 Nov 21;(57):3357. doi: 10.3791/3357.
168. Konno T, Melo EP, Chambers JE, Avezov E. Intracellular Sources of ROS/H_2O_2 in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. Cells. 2021 Jan 25;10(2):233. doi: 10.3390/cells10020233.
169. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8. doi: 10.1002/ana.10483.
170. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. J Neurochem. 1998 Jan;70(1):268-75. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010268.x.
171. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 2;93(7):2696-701. doi: 10.1073/pnas.93.7.2696.
172. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. J Neurochem. 1997 Sep;69(3):1196-203. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031196.x.
173. Isobe C, Abe T, Terayama Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. Neurosci Lett. 2010 Jan 18;469(1):159-63. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.065.
174. Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 1997;104(6-7):661-77. doi: 10.1007/BF01291884.
175. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J Neurochem. 1989 Feb;52(2):381-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x.
176. Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. Pharmacol Ther. 2006 Jan;109(1-2):33-41. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.05.007.
177. Kouti L, Noroozian M, Akhondzadeh S, Abdollahi M, Javadi MR, Faramarzi MA, Mousavi S, Ghaeli P. Nitric oxide and peroxynitrite serum levels in Parkinson's disease: correlation of oxidative stress and the severity of the disease. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Apr;17(7):964-70.
178. Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Neuroscience. 1996 May;72(2):355-63. doi: 10.1016/0306-4522(95)00578-1.
179. Barmaki H, Morovati A, Eydivandi Z, Jafari Naleshkenani F, Saedi S, Musavi H, Abbasi M, Hemmati-Dinarvand M. The Association between Serum Oxidative Stress Indexes and Pathogenesis of Parkinson's Disease in the Northwest of Iran. Iran J Public Health. 2021 Mar;50(3):606-615. doi: 10.18502/ijph.v50i3.5621.
180. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov Disord. 1998;13 Suppl 1:24-34.
181. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science. 2000 Nov 3;290(5493):985-9. doi: 10.1126/science.290.5493.985.
182. Stykel MG, Ryan SD. Nitrosative stress in Parkinson's disease. NPJ Parkinsons Dis. 2022 Aug 11;8(1):104. doi: 10.1038/s41531-022-00370-3.
183. Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VM, Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and

oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18344-9. doi: 10.1074/jbc.M000206200.
184. Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. Neurotox Res. 2003;5(3):165-76. doi: 10.1007/BF03033137.
185. Olney JW, Zorumski CF, Stewart GR, Price MT, Wang GJ, Labruyere J. Excitotoxicity of L-dopa and 6-OH-dopa: implications for Parkinson's and Huntington's diseases. Exp Neurol. 1990 Jun;108(3):269-72. doi: 10.1016/0014-4886(90)90134-e.
186. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. Mol Neurobiol. 1996 Feb;12(1):73-94. doi: 10.1007/BF02740748.
187. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. J Neural Transm (Vienna). 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
188. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr. 2000 Apr;130(4S Suppl):1007S-15S. doi: 10.1093/jn/130.4.1007S.
189. Magi S, Piccirillo S, Amoroso S, Lariccia V. Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. Int J Mol Sci. 2019 Nov 13;20(22):5674. doi: 10.3390/ijms20225674.
190. Yelamanchi SD, Jayaram S, Thomas JK, Gundimeda S, Khan AA, Singhal A, Keshava Prasad TS, Pandey A, Somani BL, Gowda H. A pathway map of glutamate metabolism. J Cell Commun Signal. 2016 Mar;10(1):69-75. doi: 10.1007/s12079-015-0315-5.
191. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. Mol Neurobiol. 2001 Aug-Dec;24(1-3):107-29. doi: 10.1385/MN:24:1-3:107.
192. Johnson KA, Conn PJ, Niswender CM. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2009 Dec;8(6):475-91. doi: 10.2174/187152709789824606.
193. Hindeya Gebreyesus H, Gebrehiwot Gebremichael T. The Potential Role of Astrocytes in Parkinson's Disease (PD). Med Sci (Basel). 2020 Jan 27;8(1):7. doi: 10.3390/medsci8010007.
194. Dervan AG, Meshul CK, Beales M, McBean GJ, Moore C, Totterdell S, Snyder AK, Meredith GE. Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease. Exp Neurol. 2004 Nov;190(1):145-56. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.07.004.
195. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Cell Calcium. 2003 Oct-Nov;34(4-5):325-37. doi: 10.1016/s0143-4160(03)00141-6.
196. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J Mol Med (Berl). 2000;78(1):3-13. doi: 10.1007/s001090000077.
197. Buchanan RJ, Gjini K, Darrow D, Varga G, Robinson JL, Nadasdy Z. Glutamate and GABA concentration changes in the globus pallidus internus of Parkinson's patients during performance of implicit and declarative memory tasks: a report of two subjects. Neurosci Lett. 2015 Mar 4;589:73-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.028.
198. Wang YY, Wang Y, Jiang HF, Liu JH, Jia J, Wang K, Zhao F, Luo MH, Luo MM, Wang XM. Impaired glutamatergic projection from the motor cortex to the subthalamic nucleus in 6-hydroxydopamine-lesioned hemi-parkinsonian rats. Exp Neurol. 2018 Feb;300:135-148. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.11.006.
199. Oueslati A, Breysse N, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Salin P. Dysfunction of the cortico-basal ganglia-cortical loop in a rat model of early parkinsonism is reversed by metabotropic glutamate receptor 5 antagonism. Eur J Neurosci. 2005 Dec;22(11):2765-74. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04498.x.
200. Cenci MA. Glutamatergic pathways as a target for the treatment of dyskinesias in Parkinson's disease. Biochem Soc Trans. 2014 Apr;42(2):600-4. doi: 10.1042/BST20140006.
201. Bonsi P, Cuomo D, Picconi B, Sciamanna G, Tscherter A, Tolu M, Bernardi G, Calabresi P, Pisani A. Striatal metabotropic glutamate receptors as a target for

pharmacotherapy in Parkinson's disease. Amino Acids. 2007 Feb;32(2):189-95. doi: 10.1007/s00726-006-0320-3.
202. Figura M, Kuśmierska K, Bucior E, Szlufik S, Koziorowski D, Jamrozik Z, Janik P. Serum amino acid profile in patients with Parkinson's disease. PLoS One. 2018 Jan 29;13(1):e0191670. doi: 10.1371/journal.pone.0191670.
203. Franić D, Zubčić K, Boban M. Nuclear Ubiquitin-Proteasome Pathways in Proteostasis Maintenance. Biomolecules. 2021 Jan 4;11(1):54. doi: 10.3390/biom11010054.
204. Alberti S. Molecular mechanisms of spatial protein quality control. Prion. 2012 Nov-Dec;6(5):437-42. doi: 10.4161/pri.22470.
205. Russell SJ, Steger KA, Johnston SA. Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21943-52. doi: 10.1074/jbc.274.31.21943.
206. Blackburn C, Gigstad KM, Hales P, Garcia K, Jones M, Bruzzese FJ, Barrett C, Liu JX, Soucy TA, Sappal DS, Bump N, Olhava EJ, Fleming P, Dick LR, Tsu C, Sintchak MD, Blank JL. Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S beta5-subunit. Biochem J. 2010 Sep 15;430(3):461-76. doi: 10.1042/BJ20100383.
207. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu Rev Biochem. 1996;65:801-47. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.004101.
208. Wilk S, Chen WE, Magnusson RP. Properties of the proteasome activator subunit PA28 alpha and its des-tyrosyl analog. Arch Biochem Biophys. 1998 Nov 15;359(2):283-90. doi: 10.1006/abbi.1998.0918.
209. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annu Rev Biochem. 1999;68:1015-68. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.1015.
210. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. J Biol Chem. 2006 Mar 31;281(13):8582-90. doi: 10.1074/jbc.M509043200.
211. Johnston-Carey HK, Pomatto LC, Davies KJ. The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2015 Jul-Aug;51(4):268-81. doi: 10.3109/10409238.2016.1172554.
212. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 29;1695(1-3):55-72. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
213. Hammond-Martel I, Yu H, Affar EB. Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. Cell Signal. 2012 Feb;24(2):410-421. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.10.009.
214. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67:425-79. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
215. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. EMBO J. 1998 Dec 15;17(24):7151-60. doi: 10.1093/emboj/17.24.7151.
216. Neutzner M, Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. Essays Biochem. 2012;52:37-50. doi: 10.1042/bse0520037.
217. Engelender S. α-Synuclein fate: proteasome or autophagy? Autophagy. 2012 Mar;8(3):418-20. doi: 10.4161/auto.19085.
218. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. J Biol Chem. 2003 Jul 4;278(27):25009-13. doi: 10.1074/jbc.M300227200.
219. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM. Degradation of alpha-synuclein by proteasome. J Biol Chem. 1999 Nov 26;274(48):33855-8. doi: 10.1074/jbc.274.48.33855.
220. Hyun DH, Lee M, Halliwell B, Jenner P. Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins. J Neurochem. 2003 Jul;86(2):363-73. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01841.x.
221. McNaught KS, Mytilineou C, Jnobaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, Olanow CW. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell

death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. J Neurochem. 2002 Apr;81(2):301-6. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x.
222. Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. FEBS Lett. 2001 Nov 30;509(1):22-6. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03115-5.
223. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. J Biol Chem. 2002 Dec 13;277(50):49071-6. doi: 10.1074/jbc.M208046200.
224. Mizuno Y. More than 20 years of the discovery of Park2. Neurosci Res. 2020 Oct;159:3-8. doi: 10.1016/j.neures.2020.02.002.
225. Shimura H, Hattori N, Kubo Si, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet. 2000 Jul;25(3):302-5. doi: 10.1038/77060.
226. Konovalova EV, Lopacheva OM, Grivennikov IA, Lebedeva OS, Dashinimaev EB, Khaspekov LG, Fedotova EY, Illarioshkin SN. Mutations in the Parkinson's Disease-Associated PARK2 Gene Are Accompanied by Imbalance in Programmed Cell Death Systems. Acta Naturae. 2015 Oct-Dec;7(4):146-9.
227. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science. 2004 Aug 27;305(5688):1292-5. doi: 10.1126/science.1101738.
228. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. J Biol Chem. 2008 Aug 29;283(35):23542-56. doi: 10.1074/jbc.M801992200.
229. Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. Brain. 2008 Aug;131(Pt 8):1969-78. doi: 10.1093/brain/awm318.
230. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, Nukina N. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. Hum Mol Genet. 2003 Oct 15;12(20):2625-35. doi: 10.1093/hmg/ddg283.
231. Mishizen-Eberz AJ, Guttmann RP, Giasson BI, Day GA 3rd, Hodara R, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ, Lynch DR. Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of alpha-synuclein by calpain I in vitro. J Neurochem. 2003 Aug;86(4):836-47. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01878.x.
232. Sung JY, Park SM, Lee CH, Um JW, Lee HJ, Kim J, Oh YJ, Lee ST, Paik SR, Chung KC. Proteolytic cleavage of extracellular secreted {alpha}-synuclein via matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 2005 Jul 1;280(26):25216-24. doi: 10.1074/jbc.M503341200.
233. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2012 Jan;18 Suppl 1:S210-2. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70065-7.
234. 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;38(8):1285-91. doi: 10.1212/wnl.38.8.1285.
235. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. Ann Neurol. 1988 Oct;24(4):574-6. doi: 10.1002/ana.410240415.
236. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Nagatsu T. Brain beta 2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease. J Neural Transm Park Dis Dement Sect. 1995;9(1):87-92. doi: 10.1007/BF02252965.
237. Yamada T, McGeer PL, McGeer EG. Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. Acta Neuropathol. 1992;84(1):100-4. doi: 10.1007/BF00427222.
238. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Link H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in

cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. Acta Neurol Scand. 1994 Sep;90(3):160-6. doi: 10.1111/j.1600-0404.1994.tb02699.x.
239. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. Neurobiol Dis. 2010 Mar;37(3):510-8. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.004.
240. Carvey PM, McRae A, Lint TF, Ptak LR, Lo ES, Goetz CG, Klawans HL. The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease. Neurology. 1991 May;41(5 Suppl 2):53-8; discussion 59-60. doi: 10.1212/wnl.41.5_suppl_2.53.
241. Defazio G., Dal Toso R., Benvegnu D., Minozzi M.C., Cananzi A.R., Leon A., Parkinsonian serum carries complement-dependent toxicity for rat mesencephalic dopaminergic neurons in culture. Brain Res, 1994. 633(1-2): 206-212.
242. Wang XJ, Yan ZQ, Lu GQ, Stuart S, Chen SD. Parkinson disease IgG and C5a-induced synergistic dopaminergic neurotoxicity: role of microglia. Neurochem Int. 2007 Jan;50(1):39-50. doi: 10.1016/j.neuint.2006.07.014.
243. Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. Neurology. 2010 Mar 23;74(12):995-1002. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d5a4a3.
244. Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. Exp Neurol. 2007 Jun;205(2):295-312. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.02.008.
245. Racette BA, Gross A, Vouri SM, Camacho-Soto A, Willis AW, Searles Nielsen S. Immunosuppressants and risk of Parkinson disease. Ann Clin Transl Neurol. 2018 May 31;5(7):870-875. doi: 10.1002/acn3.580.
246. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2006 Feb;21(2):404-12. doi: 10.1016/j.nbd.2005.08.002.
247. Bartels AL, Willemsen AT, Doorduin J, de Vries EF, Dierckx RA, Leenders KL. [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? Parkinsonism Relat Disord. 2010 Jan;16(1):57-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.05.005.
248. Ding ZB, Song LJ, Wang Q, Kumar G, Yan YQ, Ma CG. Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. Neural Regen Res. 2021 Sep;16(9):1702-1710. doi: 10.4103/1673-5374.306064.
249. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. J Immunol Res. 2018 Apr 16;2018:4784268. doi: 10.1155/2018/4784268.
250. Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. Cells. 2020 Jul 14;9(7):1687. doi: 10.3390/cells9071687.
251. Grotemeyer A, McFleder RL, Wu J, Wischhusen J, Ip CW. Neuroinflammation in Parkinson's Disease - Putative Pathomechanisms and Targets for Disease-Modification. Front Immunol. 2022 May 18;13:878771. doi: 10.3389/fimmu.2022.878771.
252. Tan EK, Chao YX, West A, Chan LL, Poewe W, Jankovic J. Parkinson disease and the immune system - associations, mechanisms and therapeutics. Nat Rev Neurol. 2020 Jun;16(6):303-318. doi: 10.1038/s41582-020-0344-4.
253. Bonam SR, Muller S. Parkinson's disease is an autoimmune disease: A reappraisal. Autoimmun Rev. 2020 Dec;19(12):102684. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102684.
254. Sanders LH, Timothy Greenamyre J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. Free Radic Biol Med. 2013 Sep;62:111-120. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003.
255. Tan JSY, Chao YX, Rötzschke O, Tan EK. New Insights into Immune-Mediated Mechanisms in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2020 Dec 6;21(23):9302. doi: 10.3390/ijms21239302.

256. Rowe DB, Le W, Smith RG, Appel SH. Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. J Neurosci Res. 1998 Sep 1;53(5):551-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980901)53:5<551::AID-JNR5>3.0.CO;2-8.
257. Bokor M, Faragó A, Garam T, Malatinszky G, Schnabel R. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in Parkinson's disease. J Neurol Sci. 1993 Mar;115(1):47-50. doi: 10.1016/0022-510x(93)90065-7.
258. Weiss F, Labrador-Garrido A, Dzamko N, Halliday G. Immune responses in the Parkinson's disease brain. Neurobiol Dis. 2022 Jun 15;168:105700. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105700.
259. Tian J, Dai SB, Jiang SS, Yang WY, Yan YQ, Lin ZH, Dong JX, Liu Y, Zheng R, Chen Y, Zhang BR, Pu JL. Specific immune status in Parkinson's disease at different ages of onset. NPJ Parkinsons Dis. 2022 Jan 10;8(1):5. doi: 10.1038/s41531-021-00271-x.
260. Earls RH, Menees KB, Chung J, Gutekunst CA, Lee HJ, Hazim MG, Rada B, Wood LB, Lee JK. NK cells clear α-synuclein and the depletion of NK cells exacerbates synuclein pathology in a mouse model of α-synucleinopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jan 21;117(3):1762-1771. doi: 10.1073/pnas.1909110117.
261. Earls RH, Lee JK. The role of natural killer cells in Parkinson's disease. Exp Mol Med. 2020 Sep;52(9):1517-1525. doi: 10.1038/s12276-020-00505-7.
262. Appel SH, Le WD, Tajti J, Haverkamp LJ, Engelhardt JI. Nigral damage and dopaminergic hypofunction in mesencephalon-immunized guinea pigs. Ann Neurol. 1992 Oct;32(4):494-501. doi: 10.1002/ana.410320403.
263. Chen S, Le WD, Xie WJ, Alexianu ME, Engelhardt JI, Siklós L, Appel SH. Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. Arch Neurol. 1998 Aug;55(8):1075-80. doi: 10.1001/archneur.55.8.1075.
264. Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofrj M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. Brain Behav Immun. 2009 Jan;23(1):55-63. doi: 10.1016/j.bbi.2008.07.003.
265. Chu K, Zhou X, Luo BY. Cytokine gene polymorphisms and Parkinson's disease: a meta-analysis. Can J Neurol Sci. 2012 Jan;39(1):58-64. doi: 10.1017/s0317167100012695.
266. Pierce S, Coetzee GA. Parkinson's disease-associated genetic variation is linked to quantitative expression of inflammatory genes. PLoS One. 2017 Apr 13;12(4):e0175882. doi: 10.1371/journal.pone.0175882.
267. Chen R, Liu J, Li S, Li X, Huo Y, Yao YG, Xiao X, Li M, Luo XJ. Functional genomics elucidates regulatory mechanisms of Parkinson's disease-associated variants. BMC Med. 2022 Feb 16;20(1):68. doi: 10.1186/s12916-022-02264-w.
268. Buttarelli FR, Fanciulli A, Pellicano C, Pontieri FE. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. Curr Neuropharmacol. 2011 Jun;9(2):278-88. doi: 10.2174/157015911795596612.
269. Ejma M, Madetko N, Brzecka A, Guranski K, Alster P, Misiuk-Hojło M, Somasundaram SG, Kirkland CE, Aliev G. The Links between Parkinson's Disease and Cancer. Biomedicines. 2020 Oct 14;8(10):416. doi: 10.3390/biomedicines8100416.
270. Harris MA, Tsui JK, Marion SA, Shen H, Teschke K. Association of Parkinson's disease with infections and occupational exposure to possible vectors. Mov Disord. 2012 Aug;27(9):1111-7. doi: 10.1002/mds.25077.
271. Wang H, Liu X, Tan C, Zhou W, Jiang J, Peng W, Zhou X, Mo L, Chen L. Bacterial, viral, and fungal infection-related risk of Parkinson's disease: Meta-analysis of cohort and case-control studies. Brain Behav. 2020 Mar;10(3):e01549. doi: 10.1002/brb3.1549.

272. Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. Transl Neurodegener. 2015 Oct 12;4:19. doi: 10.1186/s40035-015-0042-0.
273. More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY, Choi DK. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. Mediators Inflamm. 2013;2013:952375. doi: 10.1155/2013/952375.
274. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. Cell. 2010 Mar 19;140(6):918-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.016.
275. MacMahon Copas AN, McComish SF, Fletcher JM, Caldwell MA. The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A Complex Interplay Between Astrocytes, Microglia, and T Lymphocytes? Front Neurol. 2021 May 26;12:666737. doi: 10.3389/fneur.2021.666737.
276. Marogianni C, Sokratous M, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Bogdanos D, Xiromerisiou G. Neurodegeneration and Inflammation-An Interesting Interplay in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2020 Nov 10;21(22):8421. doi: 10.3390/ijms21228421.
277. Badanjak K, Fixemer S, Smajić S, Skupin A, Grünewald A. The Contribution of Microglia to Neuroinflammation in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2021 Apr 28;22(9):4676. doi: 10.3390/ijms22094676.
278. Griffiths M, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. Int Rev Neurobiol. 2007;82:29-55. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82002-2.
279. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. Glia. 2010 Feb;58(3):253-63. doi: 10.1002/glia.20928.
280. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. Glia. 2002 Nov;40(2):140-155. doi: 10.1002/glia.10161.
281. Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. Arzneimittelforschung. 1995 Mar;45(3A):357-60.
282. Savage JC, Picard K, González-Ibáñez F, Tremblay MÈ. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. Front Immunol. 2018 Apr 25;9:803. doi: 10.3389/fimmu.2018.00803.
283. Grassivaro F, Menon R, Acquaviva M, Ottoboni L, Ruffini F, Bergamaschi A, Muzio L, Farina C, Martino G. Convergence between Microglia and Peripheral Macrophages Phenotype during Development and Neuroinflammation. J Neurosci. 2020 Jan 22;40(4):784-795. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1523-19.2019.
284. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. Front Cell Neurosci. 2020 Aug 6;14:198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198.
285. Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. Mol Psychiatry. 2018 Feb;23(2):177-198. doi: 10.1038/mp.2017.246.
286. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 2007 Nov;10(11):1387-94. doi: 10.1038/nn1997.
287. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. Cell. 2018 May 17;173(5):1073-1081. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
288. Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. Exp Neurol. 2014 Aug;258:5-16. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.001.

289. Ayoub AE, Salm AK. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. J Neurosci. 2003 Aug 27;23(21):7759-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-21-07759.2003.
290. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. Int J Dev Neurosci. 1995 Jun-Jul;13(3-4):253-64. doi: 10.1016/0736-5748(94)00076-f.
291. Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. J Neurochem. 1999 Apr;72(4):1466-71. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721466.x.
292. Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M. Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J Neurosci Res. 2007 Jun;85(8):1752-61. doi: 10.1002/jnr.21241.
293. Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. J Neurosci Res. 2002 Jul 1;69(1):94-103. doi: 10.1002/jnr.10253.
294. Kremlev SG, Roberts RL, Palmer C. Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. J Neuroimmunol. 2004 Apr;149(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.11.012.
295. Gorica E, Calderone V. Arachidonic Acid Derivatives and Neuroinflammation. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2022;21(2):118-129. doi: 10.2174/1871527320666210208130412.
296. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain Res Rev. 2007 Feb;53(2):344-54. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.002.
297. Hayes GM, Woodroofe MN, Cuzner ML. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. J Neurol Sci. 1987 Aug;80(1):25-37. doi: 10.1016/0022-510x(87)90218-8.
298. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. Mol Neurobiol. 2016 Mar;53(2):1181-1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.
299. Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW. Microglial phenotype and adaptation. J Neuroimmune Pharmacol. 2013 Sep;8(4):807-23. doi: 10.1007/s11481-013-9490-4.
300. Schwabenland M, Brück W, Priller J, Stadelmann C, Lassmann H, Prinz M. Analyzing microglial phenotypes across neuropathologies: a practical guide. Acta Neuropathol. 2021 Dec;142(6):923-936. doi: 10.1007/s00401-021-02370-8.
301. Böttcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, Kunkel D, Knop A, Paza E, Fidzinski P, Kraus L, Snijders GJL, Kahn RS, Schulz AR, Mei HE; NBB-Psy, Hol EM, Siegmund B, Glauben R, Spruth EJ, de Witte LD, Priller J. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. Nat Neurosci. 2019 Jan;22(1):78-90. doi: 10.1038/s41593-018-0290-2.
302. Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2009 Nov;89(3):277-87. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.08.001.
303. Stefanova N. Microglia in Parkinson's Disease. J Parkinsons Dis. 2022;12(s1):S105-S112. doi: 10.3233/JPD-223237.
304. Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. The relation between α-synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments. Neuroscience. 2015 Aug 27;302:47-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.008.
305. Ho MS. Microglia in Parkinson's Disease. Adv Exp Med Biol. 2019;1175:335-353. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_13.
306. De Biase LM, Schuebel KE, Fusfeld ZH, Jair K, Hawes IA, Cimbro R, Zhang HY, Liu QR, Shen H, Xi ZX, Goldman D, Bonci A. Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. Neuron. 2017 Jul 19;95(2):341-356.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.020.

307. Uriarte Huarte O, Kyriakis D, Heurtaux T, Pires-Afonso Y, Grzyb K, Halder R, Buttini M, Skupin A, Mittelbronn M, Michelucci A. Single-Cell Transcriptomics and *In Situ* Morphological Analyses Reveal Microglia Heterogeneity Across the Nigrostriatal Pathway. Front Immunol. 2021 Mar 29;12:639613. doi: 10.3389/fimmu.2021.639613.
308. Langston RG, Beilina A, Reed X, Kaganovich A, Singleton AB, Blauwendraat C, Gibbs JR, Cookson MR. Association of a common genetic variant with Parkinson's disease is mediated by microglia. Sci Transl Med. 2022 Jul 27;14(655):eabp8869. doi: 10.1126/scitranslmed.abp8869.
309. Bido S, Muggeo S, Massimino L, Marzi MJ, Giannelli SG, Melacini E, Nannoni M, Gambarè D, Bellini E, Ordazzo G, Rossi G, Maffezzini C, Iannelli A, Luoni M, Bacigaluppi M, Gregori S, Nicassio F, Broccoli V. Microglia-specific overexpression of α-synuclein leads to severe dopaminergic neurodegeneration by phagocytic exhaustion and oxidative toxicity. Nat Commun. 2021 Oct 29;12(1):6237. doi: 10.1038/s41467-021-26519-x.
310. Awogbindin IO, Ishola IO, St-Pierre MK, Carrier M, Savage JC, Di Paolo T, Tremblay MÈ. Remodeling microglia to a protective phenotype in Parkinson's disease? Neurosci Lett. 2020 Sep 14;735:135164. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135164.
311. Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. Vet Pathol. 1994 Mar;31(2):145-67. doi: 10.1177/030098589403100201.
312. Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. Neurotherapeutics. 2010 Oct;7(4):338-53. doi: 10.1016/j.nurt.2010.07.006.
313. de Majo M, Koontz M, Rowitch D, Ullian EM. An update on human astrocytes and their role in development and disease. Glia. 2020 Apr;68(4):685-704. doi: 10.1002/glia.23771.
314. Clavreul S, Dumas L, Loulier K. Astrocyte development in the cerebral cortex: Complexity of their origin, genesis, and maturation. Front Neurosci. 2022 Sep 13;16:916055. doi: 10.3389/fnins.2022.916055.
315. Hart CG, Karimi-Abdolrezaee S. Recent insights on astrocyte mechanisms in CNS homeostasis, pathology, and repair. J Neurosci Res. 2021 Oct;99(10):2427-2462. doi: 10.1002/jnr.24922.
316. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. Brain Struct Funct. 2017 Jul;222(5):2017-2029. doi: 10.1007/s00429-017-1383-5.
317. Garland EF, Hartnell IJ, Boche D. Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans? Front Neurosci. 2022 Feb 16;16:824888. doi: 10.3389/fnins.2022.824888.
318. Burkert K, Moodley K, Angel CE, Brooks A, Graham ES. Detailed analysis of inflammatory and neuromodulatory cytokine secretion from human NT2 astrocytes using multiplex bead array. Neurochem Int. 2012 May;60(6):573-80. doi: 10.1016/j.neuint.2011.09.002.
319. Qin H, Benveniste EN. ELISA methodology to quantify astrocyte production of cytokines/chemokines in vitro. Methods Mol Biol. 2012;814:235-49. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_16.
320. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. PLoS One. 2014 Apr 1;9(4):e92325. doi: 10.1371/journal.pone.0092325.
321. Meeuwsen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. Glia. 2003 Sep;43(3):243-53. doi: 10.1002/glia.10259.
322. Mena MA, de Bernardo S, Casarejos MJ, Canals S, Rodríguez-Martín E. The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. Mol Neurobiol. 2002 Jun;25(3):245-63. doi: 10.1385/MN:25:3:245.

323. Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. EMBO J. 2016 Feb 1;35(3):239-57. doi: 10.15252/embj.201592705.
324. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017 Jan 26;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029.
325. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. J Neurosci. 2012 May 2;32(18):6391-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
326. Kam TI, Hinkle JT, Dawson TM, Dawson VL. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2020 Oct;144:105028. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105028.
327. Lee HJ, Kim C, Lee SJ. Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. Oxid Med Cell Longev. 2010 Jul-Aug;3(4):283-7. doi: 10.4161/oxim.3.4.12809.
328. Kreft M, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A. Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homoeostasis and metabolic compartmentation. ASN Neuro. 2012 Apr 27;4(3):e00086. doi: 10.1042/AN20120007.
329. Dos-Santos-Pereira M, Acuña L, Hamadat S, Rocca J, González-Lizárraga F, Chehín R, Sepulveda-Diaz J, Del-Bel E, Raisman-Vozari R, Michel PP. Microglial glutamate release evoked by α-synuclein aggregates is prevented by dopamine. Glia. 2018 Nov;66(11):2353-2365. doi: 10.1002/glia.23472.
330. Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. Mol Brain. 2010 Apr 21;3:12. doi: 10.1186/1756-6606-3-12.
331. Lowry SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation. Arch Surg. 1993 Nov;128(11):1235-41. doi: 10.1001/archsurg.1993.01420230063010.
332. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. Immunity. 2008 Apr;28(4):477-87. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.002.
333. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Aug-Oct;13(4-5):413-21. doi: 10.1016/s1359-6101(02)00026-6.
334. Oppenheim JJ. Cytokines: past, present, and future. Int J Hematol. 2001 Jul;74(1):3-8. doi: 10.1007/BF02982543.
335. Oppenheim JJ. The Future of the Cytokine Discipline. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Sep 4;10(9):a028498. doi: 10.1101/cshperspect.a028498.
336. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. Immunol Today. 1989 Sep;10(9):299-304. doi: 10.1016/0167-5699(89)90085-6.
337. Morel PA, Lee REC, Faeder JR. Demystifying the cytokine network: Mathematical models point the way. Cytokine. 2017 Oct;98:115-123. doi: 10.1016/j.cyto.2016.11.013.
338. Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. The evolution of mammalian chemokine genes. Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Aug;21(4):253-62. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.03.004.
339. Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. Dev Comp Immunol. 2011 Jul;35(7):705-15. doi: 10.1016/j.dci.2011.01.019.
340. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. Genes Immun. 1999 Sep;1(1):3-19. doi: 10.1038/sj.gene.6363645.
341. Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. Neurobiol Aging. 2005 Mar;26(3):349-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.05.010.

342. Magnusen AF, Hatton SL, Rani R, Pandey MK. Genetic Defects and Pro-inflammatory Cytokines in Parkinson's Disease. Front Neurol. 2021 Jun 22;12:636139. doi: 10.3389/fneur.2021.636139.
343. Barrett KE. Cytokines: sources, receptors and signalling. Baillieres Clin Gastroenterol. 1996 Mar;10(1):1-15. doi: 10.1016/s0950-3528(96)90036-6.
344. Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. Pharmacol Ther. 1996;69(2):85-95. doi: 10.1016/0163-7258(95)02033-0.
345. Konsman JP. Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! Pharmaceuticals (Basel). 2022 Jan 25;15(2):140. doi: 10.3390/ph15020140.
346. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. Nat Rev Immunol. 2017 Jan;17(1):49-59. doi: 10.1038/nri.2016.123.
347. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. Int J Mol Sci. 2019 Nov 28;20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008.
348. Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. Neuropharmacology. 2015 Sep;96(Pt A):70-82. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.027.
349. Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2008;68(4):526-34.
350. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. J Neurol. 2004 Nov;251(11):1304-16. doi: 10.1007/s00415-004-0649-z.
351. Aguilera G, Colín-González AL, Rangel-López E, Chavarría A, Santamaría A. Redox Signaling, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. Antioxid Redox Signal. 2018 Jun 20;28(18):1626-1651. doi: 10.1089/ars.2017.7099.
352. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood. 2011 Apr 7;117(14):3720-32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417.
353. Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. Semin Immunol. 2013 Dec 15;25(6):389-93. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.001.
354. Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y, Liu H. IL-1α Processing, Signaling and Its Role in Cancer Progression. Cells. 2021 Jan 7;10(1):92. doi: 10.3390/cells10010092.
355. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, Sota J, Dinarello CA. Interleukin 1α: a comprehensive review on the role of IL-1α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. Autoimmun Rev. 2021 Mar;20(3):102763. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102763.
356. Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. Semin Immunol. 2013 Dec 15;25(6):394-407. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.023.
357. Symons JA, Young PR, Duff GW. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28;92(5):1714-8. doi: 10.1073/pnas.92.5.1714.
358. Loddick SA, Liu C, Takao T, Hashimoto K, De Souza EB. Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. Brain Res Brain Res Rev. 1998 May;26(2-3):306-19. doi: 10.1016/s0165-0173(97)00037-4.
359. Farrar WL, Kilian PL, Ruff MR, Hill JM, Pert CB. Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. J Immunol. 1987 Jul 15;139(2):459-63.
360. Cunningham ET Jr, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB. In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. J Neurosci. 1992 Mar;12(3):1101-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-03-01101.1992.
361. Van Dam AM, De Vries HE, Kuiper J, Zijlstra FJ, De Boer AG, Tilders FJ, Berkenbosch F. Interleukin-1 receptors on rat brain endothelial cells: a role in neuroimmune interaction? FASEB J. 1996 Feb;10(2):351-6. doi: 10.1096/fasebj.10.2.8641570.

362. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. Biochim Biophys Acta. 2002 Nov 11;1592(3):265-80. doi: 10.1016/s0167-4889(02)00320-8.
363. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):24-32. doi: 10.1016/j.smim.2006.12.004.
364. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. Adv Exp Med Biol. 2016;941:21-29. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_2.
365. Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. J Neurosci Res. 2004 Oct 15;78(2):151-6. doi: 10.1002/jnr.20266.
366. Higgins GA, Olschowka JA. Induction of interleukin-1 beta mRNA in adult rat brain. Brain Res Mol Brain Res. 1991 Jan;9(1-2):143-8. doi: 10.1016/0169-328x(91)90139-o.
367. Zimmermann M, Brockmann K. Blood and Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Inflammation in Parkinson's Disease. J Parkinsons Dis. 2022;12(s1):S183-S200. doi: 10.3233/JPD-223277.
368. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1996 Jun 14;211(1):13-6. doi: 10.1016/0304-3940(96)12706-3.
369. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl. 2000;(58):143-51.
370. Rothwell NJ, Strijbos PJ. Cytokines in neurodegeneration and repair. Int J Dev Neurosci. 1995 Jun-Jul;13(3-4):179-85. doi: 10.1016/0736-5748(95)00018-c.
371. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. Nat Rev Neurosci. 2001 Oct;2(10):734-44. doi: 10.1038/35094583.
372. Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, Rothwell N. Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. J Neurosci. 2002 Jan 1;22(1):38-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00038.2002.
373. Hébert G, Mingam R, Arsaut J, Dantzer R, Demotes-Mainard J. Cellular distribution of interleukin-1alpha-immunoreactivity after MPTP intoxication in mice. Brain Res Mol Brain Res. 2005 Aug 18;138(2):156-63. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.04.019.
374. Schulte T, Schöls L, Müller T, Woitalla D, Berger K, Krüger R. Polymorphisms in the interleukin-1 alpha and beta genes and the risk for Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2002 Jun 21;326(1):70-2. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00301-4.
375. Möller JC, Depboylu C, Kölsch H, Lohmüller F, Bandmann O, Gocke P, Du Y, Paus S, Wüllner U, Gasser T, Oertel WH, Klockgether T, Dodel RC. Lack of association between the interleukin-1 alpha (-889) polymorphism and early-onset Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2004 Apr 15;359(3):195-7. doi: 10.1016/j.neulet.2004.01.058.
376. Dodel RC, Lohmüller F, Du Y, Eastwood B, Gocke P, Oertel WH, Gasser T. A polymorphism in the intronic region of the IL-1alpha gene and the risk for Parkinson's disease. Neurology. 2001 Apr 10;56(7):982-3. doi: 10.1212/wnl.56.7.982.
377. Zhou YT, Yang JF, Zhang YL, Wang XY, Chan P. Protective role of interlekin-1 alpha gene polymorphism in Chinese Han population with sporadic Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2008 Nov 7;445(1):23-5. doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.054.
378. Wu YR, Chen CM, Hwang JC, Chen ST, Feng IH, Hsu HC, Liu CN, Liu YT, Lai YY, Huang HJ, Lee-Chen GJ. Interleukin-1 alpha polymorphism has influence on late-onset sporadic Parkinson's disease in Taiwan. J Neural Transm (Vienna). 2007 Sep;114(9):1173-7. doi: 10.1007/s00702-007-0726-4.
379. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. Blood. 2012 Jan 19;119(3):651-65. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225.
380. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2002 Dec;1(4):327-41. doi: 10.2174/1568010023344571.

381. De Simoni MG, Imeri L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. Biol Signals Recept. 1998 Jan-Feb;7(1):33-44. doi: 10.1159/000014526.
382. Jarskog LF, Xiao H, Wilkie MB, Lauder JM, Gilmore JH. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. Int J Dev Neurosci. 1997 Oct;15(6):711-6. doi: 10.1016/s0736-5748(97)00029-4.
383. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. J Neuroimmune Pharmacol. 2012 Mar;7(1):42-59. doi: 10.1007/s11481-011-9287-2.
384. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci. 2002 Jan;27(1):19-26. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01995-8.
385. Jones EY, Stuart DI, Walker NP. Structure of tumour necrosis factor. Nature. 1989 Mar 16;338(6212):225-8. doi: 10.1038/338225a0.
386. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell. 1988 Apr 8;53(1):45-53. doi: 10.1016/0092-8674(88)90486-2.
387. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. Biochemistry. 1996 Jun 25;35(25):8216-25. doi: 10.1021/bi952182t.
388. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. Cell Signal. 2002 Jun;14(6):477-92. doi: 10.1016/s0898-6568(01)00262-5.
389. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell. 1995 Dec 1;83(5):793-802. doi: 10.1016/0092-8674(95)90192-2.
390. Su Z, Dhusia K, Wu Y. Understanding the functional role of membrane confinements in TNF-mediated signaling by multiscale simulations. Commun Biol. 2022 Mar 11;5(1):228. doi: 10.1038/s42003-022-03179-1.
391. Pennica D, Lam VT, Weber RF, Kohr WJ, Basa LJ, Spellman MW, Ashkenazi A, Shire SJ, Goeddel DV. Biochemical characterization of the extracellular domain of the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Biochemistry. 1993 Mar 30;32(12):3131-8. doi: 10.1021/bi00063a027.
392. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. Nature. 1996 Dec 19-26;384(6610):638-41. doi: 10.1038/384638a0.
393. Singh A, Ni J, Aggarwal BB. Death domain receptors and their role in cell demise. J Interferon Cytokine Res. 1998 Jul;18(7):439-50. doi: 10.1089/jir.1998.18.439.
394. Pegoretti V, Baron W, Laman JD, Eisel ULM. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. Front Immunol. 2018 Apr 30;9:925. doi: 10.3389/fimmu.2018.00925.
395. Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Chen TY, Morrison DC. Tumor necrosis factor-alpha gene expression in the tissues of normal mice. Cytokine. 1992 Sep;4(5):340-6. doi: 10.1016/1043-4666(92)90076-4.
396. Gatti S, Bartfai T. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. Brain Res. 1993 Oct 8;624(1-2):291-4. doi: 10.1016/0006-8993(93)90090-a.
397. Wesselingh SL, Power C, Glass JD, Tyor WR, McArthur JC, Farber JM, Griffin JW, Griffin DE. Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. Ann Neurol. 1993 Jun;33(6):576-82. doi: 10.1002/ana.410330604.
398. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. Brain Res. 1989 Jul 10;491(2):394-7. doi: 10.1016/0006-8993(89)90078-4.
399. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Aug;86(16):6348-52. doi: 10.1073/pnas.86.16.6348.

400. Tarlow MJ, Jenkins R, Comis SD, Osborne MP, Stephens S, Stanley P, Crocker J. Ependymal cells of the choroid plexus express tumour necrosis factor-alpha. Neuropathol Appl Neurobiol. 1993 Aug;19(4):324-8. doi: 10.1111/j.1365-2990.1993.tb00447.x.
401. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. Stroke. 1994 Jul;25(7):1481-8. doi: 10.1161/01.str.25.7.1481.
402. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. Neuroscience. 2015 Aug 27;302:2-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038.
403. Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. J Comp Neurol. 1993 Nov 22;337(4):543-67. doi: 10.1002/cne.903370403.
404. Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? J Neurochem. 2000 Feb;74(2):457-71. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740457.x.
405. Wesselingh SL, Power C, Glass JD, Tyor WR, McArthur JC, Farber JM, Griffin JW, Griffin DE. Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. Ann Neurol. 1993 Jun;33(6):576-82. doi: 10.1002/ana.410330604.
406. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. Prog Neurobiol. 1998 Oct;56(3):307-40. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00045-8.
407. Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. J Neuroimmunol. 1997 May;75(1-2):104-12. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00009-x.
408. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell. 2003 Jul 25;114(2):181-90. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00521-x.
409. Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, Rieser E, Feltham R, Vince J, Warnken U, Wenger T, Koschny R, Komander D, Silke J, Walczak H. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. Mol Cell. 2009 Dec 11;36(5):831-44. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.013.
410. Gough P, Myles IA. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. Front Immunol. 2020 Nov 25;11:585880. doi: 10.3389/fimmu.2020.585880.
411. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. Nat Immunol. 2011 Nov 16;12(12):1143-9. doi: 10.1038/ni.2159.
412. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell. 1995 May 19;81(4):495-504. doi: 10.1016/0092-8674(95)90070-5.
413. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K, Fairbrother WJ, Vucic D. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. J Biol Chem. 2008 Sep 5;283(36):24295-9. doi: 10.1074/jbc.C800128200.
414. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. Immunity. 1996 Apr;4(4):387-96. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80252-6.

415. O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Skountzos P, Yeh WC, Ting AT. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. Curr Biol. 2007 Mar 6;17(5):418-24. doi: 10.1016/j.cub.2007.01.027.
416. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. Mol Cell. 2006 Apr 21;22(2):245-57. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.026.
417. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. Cell Signal. 2007 Jun;19(6):1238-48. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.12.013.
418. Schütze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M, Krönke M. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. J Biol Chem. 1999 Apr 9;274(15):10203-12. doi: 10.1074/jbc.274.15.10203.
419. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. Cell. 1995 Dec 29;83(7):1243-52. doi: 10.1016/0092-8674(95)90149-3.
420. Rodríguez M, Cabal-Hierro L, Carcedo MT, Iglesias JM, Artime N, Darnay BG, Lazo PS. NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):22814-24. doi: 10.1074/jbc.M111.225631.
421. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 2003 Jan;10(1):45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189.
422. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. Neurosci Lett. 1994 Jan 3;165(1-2):208-10. doi: 10.1016/0304-3940(94)90746-3.
423. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1994 May 19;172(1-2):151-4. doi: 10.1016/0304-3940(94)90684-x.
424. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999 May 1;19(9):3440-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-09-03440.1999.
425. Williams-Gray CH, Wijeyekoon R, Yarnall AJ, Lawson RA, Breen DP, Evans JR, Cummins GA, Duncan GW, Khoo TK, Burn DJ, Barker RA; ICICLE-PD study group. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). Mov Disord. 2016 Jul;31(7):995-1003. doi: 10.1002/mds.26563.
426. Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. Acta Neurol Scand. 1999 Jul;100(1):34-41. doi: 10.1111/j.1600-0404.1999.tb00721.x.
427. Hu Y, Yu SY, Zuo LJ, Cao CJ, Wang F, Chen ZJ, Du Y, Lian TH, Wang YJ, Chan P, Chen SD, Wang XM, Zhang W. Parkinson disease with REM sleep behavior disorder: features, α-synuclein, and inflammation. Neurology. 2015 Mar 3;84(9):888-94. doi: 10.1212/WNL.0000000000001308.
428. Menza M, Dobkin RD, Marin H, Mark MH, Gara M, Bienfait K, Dicke A, Kusnekov A. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. Psychosomatics. 2010 Nov-Dec;51(6):474-9. doi: 10.1176/appi.psy.51.6.474.
429. Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepien A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. Neurosci Lett. 2008 Aug 22;441(2):158-62. doi: 10.1016/j.neulet.2008.06.040.

430. Rocha NP, Teixeira AL, Scalzo PL, Barbosa IG, de Sousa MS, Morato IB, Vieira EL, Christo PP, Palotás A, Reis HJ. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease. Mov Disord. 2014 Apr;29(4):527-31. doi: 10.1002/mds.25752.
431. Barcia C, de Pablos V, Bautista-Hernández V, Sánchez-Bahillo A, Bernal I, Fernández-Villalba E, Martín J, Bañón R, Fernández-Barreiro A, Herrero MT. Increased plasma levels of TNF-alpha but not of IL1-beta in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration. Parkinsonism Relat Disord. 2005 Nov;11(7):435-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2005.05.006.
432. McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. Exp Neurol. 2001 Jun;169(2):219-30. doi: 10.1006/exnr.2001.7688.
433. Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. Brain Res Dev Brain Res. 2002 Jan 31;133(1):27-35. doi: 10.1016/s0165-3806(01)00315-7.
434. Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kaji R, Kuno S. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2001 Sep 21;311(1):1-4. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02111-5.
435. Wu YR, Feng IH, Lyu RK, Chang KH, Lin YY, Chan H, Hu FJ, Lee-Chen GJ, Chen CM. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with the risk of Parkinson's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Apr 5;144B(3):300-4. doi: 10.1002/ajmg.b.30435.
436. Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. Arch Neurol. 2007 Jun;64(6):836-40. doi: 10.1001/archneur.64.6.836.
437. Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Werner J, Woitalla D, Berg D, Kühnl N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 2000;107(5):553-62. doi: 10.1007/s007020070078.
438. Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. J Exp Med. 2020 May 4;217(5):e20190347. doi: 10.1084/jem.20190347.
439. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta. 2011 May;1813(5):878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
440. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta. 2011 May;1813(5):878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
441. Hammacher A, Ward LD, Weinstock J, Treutlein H, Yasukawa K, Simpson RJ. Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. Protein Sci. 1994 Dec;3(12):2280-93. doi: 10.1002/pro.5560031213.
442. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell. 1989 Aug 11;58(3):573-81. doi: 10.1016/0092-8674(89)90438-8.
443. Rose-John S, Neurath MF. IL-6 trans-signaling: the heat is on. Immunity. 2004 Jan;20(1):2-4. doi: 10.1016/s1074-7613(04)00003-2.
444. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. Blood. 1993 Aug 15;82(4):1120-6.
445. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets. 2007 May;11(5):613-24. doi: 10.1517/14728222.11.5.613.

446. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J. 1998 Sep 1;334 (Pt 2)(Pt 2):297-314. doi: 10.1042/bj3340297.
447. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):2623-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2623.
448. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. Int J Biol Sci. 2012;8(9):1254-66. doi: 10.7150/ijbs.4679.
449. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Eur J Immunol. 1989 Apr;19(4):689-94. doi: 10.1002/eji.1830190418.
450. Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. PLoS One. 2012;7(10):e47387. doi: 10.1371/journal.pone.0047387.
451. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. Neurosci Lett. 1994 Oct 24;180(2):147-50. doi: 10.1016/0304-3940(94)90508-8.
452. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. Neurosci Lett. 1995 Dec 29;202(1-2):17-20. doi: 10.1016/0304-3940(95)12192-7.
453. Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. Neurosci Lett. 2010 Jan 1;468(1):56-8. doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.062.
454. Selikhova MV, Kushlinskii NE, Lyubimova NV, Gusev EI. Impaired production of plasma interleukin-6 in patients with Parkinson's disease. Bull Exp Biol Med. 2002 Jan;133(1):81-3. doi: 10.1023/a:1015120930920.
455. Pereira JR, Santos LVD, Santos RMS, Campos ALF, Pimenta AL, de Oliveira MS, Bacheti GG, Rocha NP, Teixeira AL, Christo PP, Scalzo PL. IL-6 serum levels are elevated in Parkinson's disease patients with fatigue compared to patients without fatigue. J Neurol Sci. 2016 Nov 15;370:153-156. doi: 10.1016/j.jns.2016.09.030.
456. Dufek M, Rektorova I, Thon V, Lokaj J, Rektor I. Interleukin-6 May Contribute to Mortality in Parkinson's Disease Patients: A 4-Year Prospective Study. Parkinsons Dis. 2015;2015:898192. doi: 10.1155/2015/898192.
457. Veselý B, Dufek M, Thon V, Brozman M, Králová S, Halászová T, Koriťáková E, Rektor I. Interleukin 6 and complement serum level study in Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 2018 May;125(5):875-881. doi: 10.1007/s00702-018-1857-5.
458. Lian TH, Guo P, Zuo LJ, Hu Y, Yu SY, Yu QJ, Jin Z, Wang RD, Li LX, Zhang W. Tremor-Dominant in Parkinson Disease: The Relevance to Iron Metabolism and Inflammation. Front Neurosci. 2019 Mar 27;13:255. doi: 10.3389/fnins.2019.00255.
459. Yu SY, Zuo LJ, Wang F, Chen ZJ, Hu Y, Wang YJ, Wang XM, Zhang W. Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. BMC Neurol. 2014 May 22;14:113. doi: 10.1186/1471-2377-14-113.
460. Borsche M, König IR, Delcambre S, Petrucci S, Balck A, Brüggemann N, Zimprich A, Wasner K, Pereira SL, Avenali M, Deuschle C, Badanjak K, Ghelfi J, Gasser T, Kasten M, Rosenstiel P, Lohmann K, Brockmann K, Valente EM, Youle RJ, Grünewald A, Klein C. Mitochondrial damage-associated inflammation highlights biomarkers in PRKN/PINK1 parkinsonism. Brain. 2020 Oct 1;143(10):3041-3051. doi: 10.1093/brain/awaa246.
461. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
462. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological

similarity to interferon gamma. Structure. 1995 Jun 15;3(6):591-601. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00193-9.
463. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. J Immunol. 1994 Feb 15;152(4):1821-9.
464. Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. J Immunol. 1995 Aug 1;155(3):1079-90.
465. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. J Interferon Cytokine Res. 1999 Jun;19(6):563-73. doi: 10.1089/107999099313695.
466. Seo DR, Kim KY, Lee YB. Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. Neuroreport. 2004 May 19;15(7):1157-61. doi: 10.1097/00001756-200405190-00015.
467. Burmeister AR, Marriott I. The Interleukin-10 Family of Cytokines and Their Role in the CNS. Front Cell Neurosci. 2018 Nov 27;12:458. doi: 10.3389/fncel.2018.00458.
468. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol. 2010 Mar;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711.
469. Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-10 in the brain. Crit Rev Immunol. 2001;21(5):427-49.
470. Balasingam V, Yong VW. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. J Neurosci. 1996 May 1;16(9):2945-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-09-02945.1996.
471. Pang Y, Rodts-Palenik S, Cai Z, Bennett WA, Rhodes PG. Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury. Brain Res Dev Brain Res. 2005 Jun 30;157(2):141-9. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.03.015.
472. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The Regulatory Role of IL-10 in Neurodegenerative Diseases. Biomolecules. 2020 Jul 9;10(7):1017. doi: 10.3390/biom10071017.
473. Arimoto T, Choi DY, Lu X, Liu M, Nguyen XV, Zheng N, Stewart CA, Kim HC, Bing G. Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. Neurobiol Aging. 2007 Jun;28(6):894-906. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.04.011.
474. Qian L, Block ML, Wei SJ, Lin CF, Reece J, Pang H, Wilson B, Hong JS, Flood PM. Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. J Pharmacol Exp Ther. 2006;319(1):44-52.
475. Joniec-Maciejak I, Ciesielska A, Wawer A, Sznejder-Pachołek A, Schwenkgrub J, Cudna A, Hadaczek P, Bankiewicz KS, Członkowska A, Członkowski A. The influence of AAV2-mediated gene transfer of human IL-10 on neurodegeneration and immune response in a murine model of Parkinson's disease. Pharmacol Rep. 2014 Aug;66(4):660-9. doi: 10.1016/j.pharep.2014.03.008.
476. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Neurol. 2016 Nov 1;73(11):1316-1324. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742.
477. Koziorowski D, Tomasiuk R, Szlufik S, Friedman A. Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients. Cytokine. 2012 Dec;60(3):762-6. doi: 10.1016/j.cyto.2012.07.030.
478. Martin-Ruiz C, Williams-Gray CH, Yarnall AJ, Boucher JJ, Lawson RA, Wijeyekoon RS, Barker RA, Kolenda C, Parker C, Burn DJ, Von Zglinicki T, Saretzki G. Senescence and Inflammatory Markers for Predicting Clinical Progression in Parkinson's Disease: The ICICLE-PD Study. J Parkinsons Dis. 2020;10(1):193-206. doi: 10.3233/JPD-191724.
479. Usenko TS, Nikolaev MA, Miliukhina IV, Bezrukova AI, Senkevich KA, Gomzyakova NA, Beltceva YA, Zalutskaya NM, Gracheva EV, Timofeeva AA, Petrova OA, Semenov AV, Lubimova NE, Totolyan AA, Pchelina SN. Plasma cytokine profile in

synucleinophaties with dementia. J Clin Neurosci. 2020 Aug;78:323-326. doi: 10.1016/j.jocn.2020.04.058.
480. Monteiro S, Roque S, Marques F, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. Brain interference: Revisiting the role of IFNγ in the central nervous system. Prog Neurobiol. 2017 Sep;156:149-163. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.05.003.
481. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Apr;13(2):95-109. doi: 10.1016/s1359-6101(01)00038-7.
482. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 2004 Feb;75(2):163-89. doi: 10.1189/jlb.0603252.
483. Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, Jaung MS, Blaser BW, Sun J, Benson DM Jr, Mao H, Yokohama A, Bhatt D, Shen L, Davuluri R, Weinstein M, Marcucci G, Caligiuri MA. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. Immunity. 2006 May;24(5):575-90. doi: 10.1016/j.immuni.2006.03.016.
484. Murray PD, McGavern DB, Pease LR, Rodriguez M. Cellular sources and targets of IFN-gamma-mediated protection against viral demyelination and neurological deficits. Eur J Immunol. 2002 Mar;32(3):606-15. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<606::AID-IMMU606>3.0.CO;2-D.
485. Wei YP, Kita M, Shinmura K, Yan XQ, Fukuyama R, Fushiki S, Imanishi J. Expression of IFN-gamma in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. J Interferon Cytokine Res. 2000 Apr;20(4):403-9. doi: 10.1089/107999000312342.
486. De Simone R, Levi G, Aloisi F. Interferon gamma gene expression in rat central nervous system glial cells. Cytokine. 1998 Jun;10(6):418-22. doi: 10.1006/cyto.1997.0314.
487. Rathnayake D, Chang T, Udagama P. Selected serum cytokines and nitric oxide as potential multi-marker biosignature panels for Parkinson disease of varying durations: a case-control study. BMC Neurol. 2019 Apr 6;19(1):56. doi: 10.1186/s12883-019-1286-6.
488. Iwaoka K, Otsuka C, Maeda T, Yamahara K, Kato K, Takahashi K, Takahashi K, Terayama Y. Impaired metabolism of kynurenine and its metabolites in CSF of parkinson's disease. Neurosci Lett. 2020 Jan 1;714:134576. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134576.
489. Liscovitch N, French L. Differential Co-Expression between α-Synuclein and IFN-γ Signaling Genes across Development and in Parkinson's Disease. PLoS One. 2014 Dec 10;9(12):e115029. doi: 10.1371/journal.pone.0115029.
490. Eidson LN, Kannarkat GT, Barnum CJ, Chang J, Chung J, Caspell-Garcia C, Taylor P, Mollenhauer B, Schlossmacher MG, Ereshefsky L, Yen M, Kopil C, Frasier M, Marek K, Hertzberg VS, Tansey MG. Candidate inflammatory biomarkers display unique relationships with alpha-synuclein and correlate with measures of disease severity in subjects with Parkinson's disease. J Neuroinflammation. 2017 Aug 18;14(1):164. doi: 10.1186/s12974-017-0935-1.
491. Miliukhina IV, Usenko TS, Senkevich KA, Nikolaev MA, Timofeeva AA, Agapova EA, Semenov AV, Lubimova NE, Totolyan AA, Pchelina SN. Plasma Cytokines Profile in Patients with Parkinson's Disease Associated with Mutations in GBA Gene. Bull Exp Biol Med. 2020 Feb;168(4):423-426. doi: 10.1007/s10517-020-04723-x.
492. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). J Natl Cancer Inst. 1998 Nov 4;90(21):1609-20. doi: 10.1093/jnci/90.21.1609.
493. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. J Biol Chem. 1999 Aug 13;274(33):22903-6. doi: 10.1074/jbc.274.33.22903.
494. Wu T, Wu H, Wang J, Wang J. Expression and cellular localization of cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in the hemorrhagic brain. J Neuroinflammation. 2011 Mar 8;8:22. doi: 10.1186/1742-2094-8-22.

495. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem. 2000;69:145-82. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
496. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. Brain Res. 1999 Jun 5;830(2):226-36. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01389-x.
497. Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. Trends Pharmacol Sci. 2009 Apr;30(4):174-81. doi: 10.1016/j.tips.2009.01.002.
498. Bartels AL, Leenders KL. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. Curr Neuropharmacol. 2010 Mar;8(1):62-8. doi: 10.2174/157015910790909485.
499. Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. Mol Cell Neurosci. 2000 Dec;16(6):724-39. doi: 10.1006/mcne.2000.0914.
500. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5473-8. doi: 10.1073/pnas.0837397100.
501. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat Neurosci. 2001 Jul;4(7):702-10. doi: 10.1038/89490.
502. Chae SW, Kang BY, Hwang O, Choi HJ. Cyclooxygenase-2 is involved in oxidative damage and alpha-synuclein accumulation in dopaminergic cells. Neurosci Lett. 2008 May 9;436(2):205-9. doi: 10.1016/j.neulet.2008.03.031.
503. Feng ZH, Wang TG, Li DD, Fung P, Wilson BC, Liu B, Ali SF, Langenbach R, Hong JS. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Neurosci Lett. 2002 Sep 6;329(3):354-8. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00704-8.
504. Piazza M, Guillemette JG, Dieckmann T. Dynamics of nitric oxide synthase-calmodulin interactions at physiological calcium concentrations. Biochemistry. 2015 Mar 24;54(11):1989-2000. doi: 10.1021/bi501353s.
505. Lewis DA, Rud KS, Miller VM. Cofactors of constitutive nitric oxide synthase and endothelium-dependent relaxations in canine femoral veins. J Cardiovasc Pharmacol. 1993 Sep;22(3):443-8. doi: 10.1097/00005344-199309000-00015.
506. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. Nitric Oxide. 2010 Aug 1;23(1):1-11. doi: 10.1016/j.niox.2010.03.001.
507. Kiss JP, Vizi ES. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. Trends Neurosci. 2001 Apr;24(4):211-5. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01745-8.
508. Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-β in the liver. Hepatobiliary Surg Nutr. 2014 Dec;3(6):386-406. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.06.
509. Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. J Physiol Paris. 2002 Jan-Mar;96(1-2):25-30. doi: 10.1016/s0928-4257(01)00077-8.
510. Rodríguez-Martínez G, Velasco I. Activin and TGF-β effects on brain development and neural stem cells. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2012 Nov 1;11(7):844-55. doi: 10.2174/1871527311201070844.
511. Huang T, David L, Mendoza V, Yang Y, Villarreal M, De K, Sun L, Fang X, López-Casillas F, Wrana JL, Hinck AP. TGF-β signalling is mediated by two autonomously functioning TβRI:TβRII pairs. EMBO J. 2011 Apr 6;30(7):1263-76. doi: 10.1038/emboj.2011.54.

512. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF-β Family Members. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Aug 1;8(8):a022053. doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
513. Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. Int J Mol Sci. 2012;13(7):8219-8258. doi: 10.3390/ijms13078219.
514. Luo J. TGF-β as a Key Modulator of Astrocyte Reactivity: Disease Relevance and Therapeutic Implications. Biomedicines. 2022 May 23;10(5):1206. doi: 10.3390/biomedicines10051206.
515. Roussa E, von Bohlen und Halbach O, Krieglstein K. TGF-beta in dopamine neuron development, maintenance and neuroprotection. Adv Exp Med Biol. 2009;651:81-90. doi: 10.1007/978-1-4419-0322-8_8.
516. Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keeffe GW. Roles for the TGFβ superfamily in the development and survival of midbrain dopaminergic neurons. Mol Neurobiol. 2014 Oct;50(2):559-73. doi: 10.1007/s12035-014-8639-3.
517. Poulsen KT, Armanini MP, Klein RD, Hynes MA, Phillips HS, Rosenthal A. TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. Neuron. 1994 Nov;13(5):1245-52. doi: 10.1016/0896-6273(94)90062-0.
518. Zhang J, Pho V, Bonasera SJ, Holtzman J, Tang AT, Hellmuth J, Tang S, Janak PH, Tecott LH, Huang EJ. Essential function of HIPK2 in TGFbeta-dependent survival of midbrain dopamine neurons. Nat Neurosci. 2007 Jan;10(1):77-86. doi: 10.1038/nn1816.
519. Tapia-González S, Giráldez-Pérez RM, Cuartero MI, Casarejos MJ, Mena MÁ, Wang XF, Sánchez-Capelo A. Dopamine and α-synuclein dysfunction in Smad3 null mice. Mol Neurodegener. 2011 Oct 13;6:72. doi: 10.1186/1750-1326-6-72.
520. Tesseur I, Nguyen A, Chang B, Li L, Woodling NS, Wyss-Coray T, Luo J. Deficiency in Neuronal TGF-β Signaling Leads to Nigrostriatal Degeneration and Activation of TGF-β Signaling Protects against MPTP Neurotoxicity in Mice. J Neurosci. 2017 Apr 26;37(17):4584-4592. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2952-16.2017.
521. Sauer H, Rosenblad C, Björklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8935-9. doi: 10.1073/pnas.92.19.8935.
522. Mogi M, Harada M, Kondo T, Narabayashi H, Riederer P, Nagatsu T. Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1995 Jun 30;193(2):129-32. doi: 10.1016/0304-3940(95)11686-q.
523. Vawter MP, Dillon-Carter O, Tourtellotte WW, Carvey P, Freed WJ. TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. Exp Neurol. 1996 Dec;142(2):313-22. doi: 10.1006/exnr.1996.0200.
524. Goris A, Williams-Gray CH, Foltynie T, Brown J, Maranian M, Walton A, Compston DA, Barker RA, Sawcer SJ. Investigation of TGFB2 as a candidate gene in multiple sclerosis and Parkinson's disease. J Neurol. 2007 Jul;254(7):846-8. doi: 10.1007/s00415-006-0414-6.
525. Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, Banks WA, Beckman BS, Zadina JE. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. Neurosci Biobehav Rev. 1994 Spring;18(1):143-59. doi: 10.1016/0149-7634(94)90043-4.
526. Serra-Millàs M. Are the changes in the peripheral brain-derived neurotrophic factor levels due to platelet activation? World J Psychiatry. 2016 Mar 22;6(1):84-101. doi: 10.5498/wjp.v6.i1.84.
527. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. Genomics. 2007 Sep;90(3):397-406. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.05.004.

528. Notaras M, van den Buuse M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. Neuroscientist. 2019 Oct;25(5):434-454. doi: 10.1177/1073858418810142.
529. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. Arch Med Sci. 2015 Dec 10;11(6):1164-78. doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
530. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. Neuropharmacology. 1998 Dec;37(12):1553-61. doi: 10.1016/s0028-3908(98)00141-5.
531. Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. J Neurol. 2010 Apr;257(4):540-5. doi: 10.1007/s00415-009-5357-2.
532. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. Exp Neurol. 2000 Nov;166(1):127-35. doi: 10.1006/exnr.2000.7483.
533. Khalil H, Alomari MA, Khabour OF, Al-Hieshan A, Bajwa JA. Relationship of circulatory BDNF with cognitive deficits in people with Parkinson's disease. J Neurol Sci. 2016 Mar 15;362:217-20. doi: 10.1016/j.jns.2016.01.032.
534. Wang Y, Liu H, Du XD, Zhang Y, Yin G, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2017 Aug;41:73-78. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.05.012.
535. Huang YX, Zhang QL, Huang CL, Wu WQ, Sun JW. Association of Decreased Serum BDNF With Restless Legs Syndrome in Parkinson's Disease Patients. Front Neurol. 2021 Oct 26;12:734570. doi: 10.3389/fneur.2021.734570.
536. Ziebell M, Khalid U, Klein AB, Aznar S, Thomsen G, Jensen P, Knudsen GM. Striatal dopamine transporter binding correlates with serum BDNF levels in patients with striatal dopaminergic neurodegeneration. Neurobiol Aging. 2012 Feb;33(2):428.e1-5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.010.
537. Ahn EH, Kang SS, Liu X, Cao X, Choi SY, Musazzi L, Mehlen P, Ye K. BDNF and Netrin-1 repression by C/EBPβ in the gut triggers Parkinson's disease pathologies, associated with constipation and motor dysfunctions. Prog Neurobiol. 2021 Mar;198:101905. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101905.
538. Karamohamed S, Latourelle JC, Racette BA, Perlmutter JS, Wooten GF, Lew M, Klein C, Shill H, Golbe LI, Mark MH, Guttman M, Nicholson G, Wilk JB, Saint-Hilaire M, DeStefano AL, Prakash R, Tobin S, Williamson J, Suchowersky O, Labell N, Growdon BN, Singer C, Watts R, Goldwurm S, Pezzoli G, Baker KB, Giroux ML, Pramstaller PP, Burn DJ, Chinnery P, Sherman S, Vieregge P, Litvan I, Gusella JF, Myers RH, Parsian A. BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. Neurology. 2005 Dec 13;65(11):1823-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000187075.81589.fd.
539. Ramezani M, Ruskey JA, Martens K, Kibreab M, Javer Z, Kathol I, Hammer T, Cheetham J, Leveille E, Martino D, Sarna JR, Gan-Or Z, Pfeffer G, Ismail Z, Monchi O. Association Between BDNF Val66Met Polymorphism and Mild Behavioral Impairment in Patients With Parkinson's Disease. Front Neurol. 2021 Jan 14;11:587992. doi: 10.3389/fneur.2020.587992.
540. Liu J, Zhou Y, Wang C, Wang T, Zheng Z, Chan P. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) genetic polymorphism greatly increases risk of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2012 Feb;18(2):140-3. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.09.002.
541. Kusters CDJ, Paul KC, Guella I, Bronstein JM, Sinsheimer JS, Farrer MJ, Ritz BR. Dopamine receptors and BDNF-haplotypes predict dyskinesia in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2018 Feb;47:39-44. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.11.339.
542. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov. 2011 Mar;10(3):209-19. doi: 10.1038/nrd3366.

543. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. Cell Mol Neurobiol. 2019 Jan;39(1):31-59. doi: 10.1007/s10571-018-0632-3.
544. Uno H, Fellman JH. Neural uptake of catecholamines and their molecular structures: a histopharmacologic study. J Supramol Struct. 1978;9(2):207-17. doi: 10.1002/jss.400090206.
545. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. Neurosci Biobehav Rev. 2000 Jan;24(1):125-32. doi: 10.1016/s0149-7634(99)00063-9.
546. Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. Neuropharmacology. 1996;35(11):1503-19. doi: 10.1016/s0028-3908(96)00100-1.
547. Franco R, Reyes-Resina I, Navarro G. Dopamine in Health and Disease: Much More Than a Neurotransmitter. Biomedicines. 2021 Jan 22;9(2):109. doi: 10.3390/biomedicines9020109.
548. Oldehinkel M, Llera A, Faber M, Huertas I, Buitelaar JK, Bloem BR, Marquand AF, Helmich RC, Haak KV, Beckmann CF. Mapping dopaminergic projections in the human brain with resting-state fMRI. Elife. 2022 Feb 3;11:e71846. doi: 10.7554/eLife.71846.
549. Albanese A, Altavista MC, Rossi P. Organization of central nervous system dopaminergic pathways. J Neural Transm Suppl. 1986;22:3-17.
550. Bédard P, Larochelle L, Parent A, Poirier LJ. The nigrostriatal pathway: a correlative study based on neuroanatomical and neurochemical criteria in the cat and the monkey. Exp Neurol. 1969 Nov;25(3):365-77. doi: 10.1016/0014-4886(69)90131-9.
551. Bannon MJ, Roth RH. Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. Pharmacol Rev. 1983 Mar;35(1):53-68.
552. Annunziato L. Regulation of the tuberoinfundibular and nigrostriatal systems. Evidence for different kinds of dopaminergic neurons in the brain. Neuroendocrinology. 1979;29(1):66-76. doi: 10.1159/000122906.
553. Martin WR, Palmer MR, Patlak CS, Calne DB. Nigrostriatal function in humans studied with positron emission tomography. Ann Neurol. 1989 Oct;26(4):535-42. doi: 10.1002/ana.410260407.
554. Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. Brain Res Rev. 2007 Dec;56(2):283-321. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.014.
555. Hirano S. Clinical implications for dopaminergic and functional neuroimage research in cognitive symptoms of Parkinson's disease. Mol Med. 2021 Apr 15;27(1):40. doi: 10.1186/s10020-021-00301-7.
556. Durham RA, Johnson JD, Moore KE, Lookingland KJ. Evidence that D2 receptor-mediated activation of hypothalamic tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the male rat occurs via inhibition of tonically active afferent dynorphinergic neurons. Brain Res. 1996 Sep 2;732(1-2):113-20. doi: 10.1016/0006-8993(96)00501-x.
557. Hallman H, Jonsson G. Neurochemical studies on central dopamine neurons--regional characterization of dopamine turnover. Med Biol. 1984;62(3):198-209.
558. Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. Mol Neurodegener. 2019 Aug 20;14(1):35. doi: 10.1186/s13024-019-0332-6.
559. Abreu-González P, González-Hernández T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Barroso-Chinea P, González MC. Tetrahydrobiopterin stimulates L-DOPA release from striatal tissue. Eur J Pharmacol. 2006 Jul 10;541(1-2):33-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.04.019.
560. Gordon SL, Quinsey NS, Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. J Neurochem. 2008 Aug;106(4):1614-23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05509.x.
561. Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, Boulton AA. Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase by dopamine receptors in the rat brain. J Neurochem. 1992 Feb;58(2):636-41. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb09765.x.

562. Lohr KM, Miller GW. VMAT2 and Parkinson's disease: harnessing the dopamine vesicle. Expert Rev Neurother. 2014 Oct;14(10):1115-7. doi: 10.1586/14737175.2014.960399.
563. Omiatek DM, Bressler AJ, Cans AS, Andrews AM, Heien ML, Ewing AG. The real catecholamine content of secretory vesicles in the CNS revealed by electrochemical cytometry. Sci Rep. 2013;3:1447. doi: 10.1038/srep01447.
564. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. Acta Med Okayama. 2008 Jun;62(3):141-50. doi: 10.18926/AMO/30942.
565. Schinelli S, Paolillo M, Quartieri M, Santagostino G. Dopamine synthesis, uptake and metabolism in embryonic rat mesencephalic cultures. Pharmacol Res. 1993 Oct-Nov;28(3):265-76. doi: 10.1006/phrs.1993.1130.
566. Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. Trends Pharmacol Sci. 2013 Sep;34(9):489-96. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.005.
567. Torres GE. The dopamine transporter proteome. J Neurochem. 2006 Apr;97 Suppl 1:3-10. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03719.x.
568. Finberg JPM. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 2019 Apr;126(4):433-448. doi: 10.1007/s00702-018-1952-7.
569. Levin JA, Wilson SE. The effect of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase inhibitors on the accumulation and metabolism of [l-3H] norepinephrine by the adventitia and media of rabbit aorta. J Pharmacol Exp Ther. 1977 Dec;203(3):598-609.
570. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior. Pol J Pharmacol. 1999 Jan-Feb;51(1):25-9.
571. Sağlık BN, Osmaniye D, Acar Çevik U, Levent S, Kaya Çavuşoğlu B, Atlı Eklioğlu Ö, Özkay Y, Koparal AS, Kaplancıklı ZA. Synthesis, *in vitro* enzyme activity and molecular docking studies of new benzylamine-sulfonamide derivatives as selective MAO-B inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem. 2020 Dec;35(1):1422-1432. doi: 10.1080/14756366.2020.1784892.
572. Miyamoto JK, Uezu E, Terashima S. Active transport pumps of HVA and DOPAC in dopaminergic nerve terminals. Physiol Behav. 1991 Jan;49(1):141-7. doi: 10.1016/0031-9384(91)90245-j.
573. Sharp T, Zetterström T, Ungerstedt U. An in vivo study of dopamine release and metabolism in rat brain regions using intracerebral dialysis. J Neurochem. 1986 Jul;47(1):113-22. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb02838.x.
574. Sharma RP, Javaid JI, Faull K, Davis JM, Janicak PG. CSF and plasma MHPG, and CSF MHPG index: pretreatment levels in diagnostic groups and response to somatic treatments. Psychiatry Res. 1994 Jan;51(1):51-60. doi: 10.1016/0165-1781(94)90046-9.
575. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. Physiol Rev. 1998 Jan;78(1):189-225. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189.
576. Yamamoto K, Fontaine R, Pasqualini C, Vernier P. Classification of Dopamine Receptor Genes in Vertebrates: Nine Subtypes in Osteichthyes. Brain Behav Evol. 2015;86(3-4):164-75. doi: 10.1159/000441550.
577. Richfield EK, Penney JB, Young AB. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience. 1989;30(3):767-77. doi: 10.1016/0306-4522(89)90168-1.
578. Palacios JM, Camps M, Cortés R, Probst A. Mapping dopamine receptors in the human brain. J Neural Transm Suppl. 1988;27:227-35. doi: 10.1007/978-3-7091-8954-2_20.
579. Amenta F. Density and distribution of dopamine receptors in the cardiovascular system and in the kidney. J Auton Pharmacol. 1990;10 Suppl 1:s11-8. doi: 10.1111/j.1474-8673.1990.tb00222.x.

580. Azizi SA. Monoamines: Dopamine, Norepinephrine, and Serotonin, Beyond Modulation, "Switches" That Alter the State of Target Networks. Neuroscientist. 2022 Apr;28(2):121-143. doi: 10.1177/1073858420974336.
581. Rahman S, Khan IA, Thomas P. Tryptophan hydroxylase: a target for neuroendocrine disruption. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2011;14(5-7):473-94. doi: 10.1080/10937404.2011.578563.
582. Rouzaud-Laborde C, Hanoun N, Baysal I, Rech JS, Mias C, Calise D, Sicard P, Frugier C, Seguelas MH, Parini A, Pizzinat N. Role of endothelial AADC in cardiac synthesis of serotonin and nitrates accumulation. PLoS One. 2012;7(7):e34893. doi: 10.1371/journal.pone.0034893.
583. Forsgren L, Almay BG, Häggendal J, Oreland L. Monoamine oxidase (MAO), 5-hydroxyindole acetic acid (5 HIAA) and homovanillic acid (HVA) in motor neuron disease. Acta Neurol Scand. 1987 Jan;75(1):22-7. doi: 10.1111/j.1600-0404.1987.tb07884.x.
584. Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2015 Jan 15;277:136-45. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.037.
585. Maillet A, Krack P, Lhommée E, Météreau E, Klinger H, Favre E, Le Bars D, Schmitt E, Bichon A, Pelissier P, Fraix V, Castrioto A, Sgambato-Faure V, Broussolle E, Tremblay L, Thobois S. The prominent role of serotonergic degeneration in apathy, anxiety and depression in de novo Parkinson's disease. Brain. 2016 Sep;139(Pt 9):2486-502. doi: 10.1093/brain/aww162.
586. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. J Neural Transm (Vienna). 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
587. Hassel B, Boldingh KA, Narvesen C, Iversen EG, Skrede KK. Glutamate transport, glutamine synthetase and phosphate-activated glutaminase in rat CNS white matter. A quantitative study. J Neurochem. 2003 Oct;87(1):230-7. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01984.x.
588. Kvamme E. Synthesis of glutamate and its regulation. Prog Brain Res. 1998;116:73-85. doi: 10.1016/s0079-6123(08)60431-8.
589. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, Swanson GT, Swanger SA, Greger IH, Nakagawa T, McBain CJ, Jayaraman V, Low CM, Dell'Acqua ML, Diamond JS, Camp CR, Perszyk RE, Yuan H, Traynelis SF. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. Pharmacol Rev. 2021 Oct;73(4):298-487. doi: 10.1124/pharmrev.120.000131.
590. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. J Neural Transm (Vienna). 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
591. Obrietan K, van den Pol AN. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca2+ elevating to depressing. J Neurosci. 1995 Jul;15(7 Pt 1):5065-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-07-05065.1995.
592. Schmidt-Wilcke T, Fuchs E, Funke K, Vlachos A, Müller-Dahlhaus F, Puts NAJ, Harris RE, Edden RAE. GABA-from Inhibition to Cognition: Emerging Concepts. Neuroscientist. 2018 Oct;24(5):501-515. doi: 10.1177/1073858417734530.
593. Roth FC, Draguhn A. GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. Neural Plast. 2012;2012:805830. doi: 10.1155/2012/805830.
594. Cavalcanti-de-Albuquerque JP, de-Souza-Ferreira E, de Carvalho DP, Galina A. Coupling of GABA Metabolism to Mitochondrial Glucose Phosphorylation. Neurochem Res. 2022 Feb;47(2):470-480. doi: 10.1007/s11064-021-03463-2.
595. Jembrek MJ, Vlainic J. GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls. Curr Pharm Des. 2015;21(34):4943-59. doi: 10.2174/1381612821666150914121624.
596. Li G, Shao C, Chen Q, Wang Q, Yang K. Accumulated GABA activates presynaptic GABAB receptors and inhibits both excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat midbrain periaqueductal gray. Neuroreport. 2017 Apr 12;28(6):313-318. doi: 10.1097/WNR.0000000000000756.

597. Kaila K, Saarikoski J, Voipio J. Mechanism of action of GABA on intracellular pH and on surface pH in crayfish muscle fibres. J Physiol. 1990 Aug;427:241-60. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018170.
598. O'Gorman Tuura RL, Baumann CR, Baumann-Vogel H. Beyond Dopamine: GABA, Glutamate, and the Axial Symptoms of Parkinson Disease. Front Neurol. 2018 Sep 26;9:806. doi: 10.3389/fneur.2018.00806.
599. Turossi Amorim ED, de Jager L, Martins AB, Rodrigues AT, Cruz Lucchetti BF, Ariza D, Pinge-Filho P, Crestani CC, Uchoa ET, Martins-Pinge MC. Glutamate and GABA neurotransmission are increased in paraventricular nucleus of hypothalamus in rats induced to 6-OHDA parkinsonism: Involvement of nNOS. Acta Physiol (Oxf). 2019 Jul;226(3):e13264. doi: 10.1111/apha.13264.
600. Viaro R, Longo F, Vincenzi F, Varani K, Morari M. l-DOPA promotes striatal dopamine release through D1 receptors and reversal of dopamine transporter. Brain Res. 2021 Oct 1;1768:147583. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147583.
601. Klivenyi P, Kekesi KA, Hartai Z, Juhasz G, Vecsei L. Effects of mitochondrial toxins on the brain amino acid concentrations. Neurochem Res. 2005 Nov;30(11):1421-7. doi: 10.1007/s11064-005-8512-x.
602. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. FEBS J. 2012 Apr;279(7):1156-66. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x.
603. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. Neuroscience. 2012 Jun 1;211:51-76. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.057.
604. Orth M, Tabrizi SJ. Models of Parkinson's disease. Mov Disord. 2003 Jul;18(7):729-37. doi: 10.1002/mds.10447.
605. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci. 2001 May;2(5):325-34. doi: 10.1038/35072550.
606. Hashimoto M, Rockenstein E, Masliah E. Transgenic models of alpha-synuclein pathology: past, present, and future. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;991:171-88.
607. Fischer DL, Gombash SE, Kemp CJ, Manfredsson FP, Polinski NK, Duffy MF, Sortwell CE. Viral Vector-Based Modeling of Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease. Methods Mol Biol. 2016;1382:367-82. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9_26.
608. Kopin IJ. MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. Environ Health Perspect. 1987 Nov;75:45-51. doi: 10.1289/ehp.877545.
609. Kopin IJ. MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. Environ Health Perspect. 1987 Nov;75:45-51. doi: 10.1289/ehp.877545.
610. Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Waggie K. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. Lab Anim Sci. 1999 Aug;49(4):363-71.
611. Buchi J, Prost M. Sulfones douées d'une action hypnotique et analgésique. Ann Pharm Fr. 1954 Apr;12(4):241-9.
612. Büchi J, Prost M, Eichenberger H. Lieberherr, R. Synthese und Analgetische Wirkung einiger 1-Methyl-4-phenyl-piperidin-(4)-alkylsulfone. Helv Chim Acta. 1952 Aug;35(5): 1527-1536.
613. Langston JW, Langston EB, Irwin I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. Acta Neurol Scand Suppl. 1984;100:49-54.
614. Markey SP, Schmuff NR. The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. Med Res Rev. 1986 Oct-Dec;6(4):389-429. doi: 10.1002/med.2610060402.
615. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psychiatry Res. 1979 Dec;1(3):249-54. doi: 10.1016/0165-1781(79)90006-4.

616. Langston JW. The MPTP Story. J Parkinsons Dis. 2017;7(s1):S11-S19. doi: 10.3233/JPD-179006.
617. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science. 1983 Feb 25;219(4587):979-80. doi: 10.1126/science.6823561.
618. Burns RS, Markey SP, Phillips JM, Chiueh CC. The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. Can J Neurol Sci. 1984 Feb;11(1 Suppl):166-8. doi: 10.1017/s0317167100046345.
619. Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Mar;2(3):a009308. doi: 10.1101/cshperspect.a009308.
620. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011 Sep;1(1):a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316.
621. Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity. Mov Disord. 1998;13 Suppl 1:35-8.
622. Antony PM, Diederich NJ, Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research. Mamm Genome. 2011 Aug;22(7-8):401-19. doi: 10.1007/s00335-011-9330-x.
623. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. J Parkinsons Dis. 2011;1(1):19-33. doi: 10.3233/JPD-2011-11023.
624. Filipov NM, Norwood AB, Sistrunk SC. Strain-specific sensitivity to MPTP of C57BL/6 and BALB/c mice is age dependent. Neuroreport. 2009 May 6;20(7):713-7. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832aa95b.
625. Narmashiri A, Abbaszadeh M, Ghazizadeh A. The effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the cognitive and motor functions in rodents: A systematic review and meta-analysis. Neurosci Biobehav Rev. 2022 Sep;140:104792. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104792.
626. Muñoz-Manchado AB, Villadiego J, Romo-Madero S, Suárez-Luna N, Bermejo-Navas A, Rodríguez-Gómez JA, Garrido-Gil P, Labandeira-García JL, Echevarría M, López-Barneo J, Toledo-Aral JJ. Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice. J Neurochem. 2016 Jan;136(2):373-87. doi: 10.1111/jnc.13409.
627. Antzoulatos E, Jakowec MW, Petzinger GM, Wood RI. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Pharmacol Biochem Behav. 2010 Jun;95(4):466-72. doi: 10.1016/j.pbb.2010.03.009.
628. Marini AM, Lipsky RH, Schwartz JP, Kopin IJ. Accumulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultured cerebellar astrocytes. J Neurochem. 1992 Apr;58(4):1250-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb11336.x.
629. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Apr;82(7):2173-7. doi: 10.1073/pnas.82.7.2173.
630. Fritz RR, Abell CW, Patel NT, Gessner W, Brossi A. Metabolism of the neurotoxin in MPTP by human liver monoamine oxidase B. FEBS Lett. 1985 Jul 8;186(2):224-8. doi: 10.1016/0014-5793(85)80713-4.
631. Melamed E, Youdim MB, Rosenthal J, Spanier I, Uzzan A, Globus M. In vivo effect of MPTP on monoamine oxidase activity in mouse striatum. Brain Res. 1985 Dec 16;359(1-2):360-3. doi: 10.1016/0006-8993(85)91451-9.
632. Saura J, Richards JG, Mahy N. Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. Neurobiol Aging. 1994 Jul-Aug;15(4):399-408. doi: 10.1016/0197-4580(94)90071-x.
633. Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. Life Sci. 1987 Feb 23;40(8):721-9. doi: 10.1016/0024-3205(87)90299-2.
634. Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG. Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. J Neurochem. 1997 Sep;69(3):1322-5. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031322.x.

635. Church WH, Hewett SJ. Relationship between NMDA receptor expression and MPP+ toxicity in cultured dopaminergic cells. J Neurosci Res. 2003 Sep 15;73(6):811-7. doi: 10.1002/jnr.10732.
636. Brouillet E, Beal MF. NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. Neuroreport. 1993 Apr;4(4):387-90. doi: 10.1097/00001756-199304000-00011.
637. Kurosaki R, Muramatsu Y, Watanabe H, Michimata M, Matsubara M, Imai Y, Araki T. Role of dopamine transporter against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. Metab Brain Dis. 2003 Jun;18(2):139-46. doi: 10.1023/a:1023863003093.
638. Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. Exp Neurol. 1999 Feb;155(2):268-73. doi: 10.1006/exnr.1998.6995.
639. Kupsch A, Sautter J, Götz ME, Breithaupt W, Schwarz J, Youdim MB, Riederer P, Gerlach M, Oertel WH. Monoamine oxidase-inhibition and MPTP-induced neurotoxicity in the non-human primate: comparison of rasagiline (TVP 1012) with selegiline. J Neural Transm (Vienna). 2001;108(8-9):985-1009. doi: 10.1007/s007020170018.
640. Trevor AJ, Singer TP, Ramsay RR, Castagnoli N Jr. Processing of MPTP by monoamine oxidases: implications for molecular toxicology. J Neural Transm Suppl. 1987;23:73-89. doi: 10.1007/978-3-7091-8901-6_5.
641. Singer TP, Ramsay RR. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. FEBS Lett. 1990 Nov 12;274(1-2):1-8. doi: 10.1016/0014-5793(90)81315-f.
642. Cassarino DS, Parks JK, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. Biochim Biophys Acta. 1999 Jan 6;1453(1):49-62. doi: 10.1016/s0925-4439(98)00083-0.
643. Dhanasekaran M, Karuppagounder SS, Uthayathas S, Wold LE, Parameshwaran K, Jayachandra Babu R, Suppiramaniam V, Brown-Borg H. Effect of dopaminergic neurotoxin MPTP/MPP+ on coenzyme Q content. Life Sci. 2008 Jul 18;83(3-4):92-5. doi: 10.1016/j.lfs.2008.04.016.
644. Nicotra A, Parvez S. Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. Neurotoxicol Teratol. 2002 Sep-Oct;24(5):599-605. doi: 10.1016/s0892-0362(02)00213-1.
645. Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. J Neurochem. 1986 May;46(5):1501-7. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb01768.x.
646. Fabre E, Monserrat J, Herrero A, Barja G, Leret ML. Effect of MPTP on brain mitochondrial H2O2 and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. J Physiol Biochem. 1999 Dec;55(4):325-31.
647. Choi WS, Canzoniero LM, Sensi SL, O'Malley KL, Gwag BJ, Sohn S, Kim JE, Oh TH, Lee EB, Oh YJ. Characterization of MPP(+)-induced cell death in a dopaminergic neuronal cell line: role of macromolecule synthesis, cytosolic calcium, caspase, and Bcl-2-related proteins. Exp Neurol. 1999 Sep;159(1):274-82. doi: 10.1006/exnr.1999.7133.
648. Teng X, Sakai T, Liu L, Sakai R, Kaji R, Fukui K. Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. J Neurochem. 2006 May;97(4):1126-35. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03833.x.
649. Hsieh YC, Mounsey RB, Teismann P. MPP(+)-induced toxicity in the presence of dopamine is mediated by COX-2 through oxidative stress. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2011 Aug;384(2):157-67. doi: 10.1007/s00210-011-0660-8.
650. Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic

neuronal cells. Neurotoxicology. 2007 Sep;28(5):988-97. doi: 10.1016/j.neuro.2007.08.008.
651. Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 2;94(18):9938-43. doi: 10.1073/pnas.94.18.9938.
652. Chen CX, Huang SY, Zhang L, Liu YJ. Synaptophysin enhances the neuroprotection of VMAT2 in MPP+-induced toxicity in MN9D cells. Neurobiol Dis. 2005 Aug;19(3):419-26. doi: 10.1016/j.nbd.2005.01.014.
653. Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 2;94(18):9938-43. doi: 10.1073/pnas.94.18.9938.
654. Lohr KM, Chen M, Hoffman CA, McDaniel MJ, Stout KA, Dunn AR, Wang M, Bernstein AI, Miller GW. Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) Level Regulates MPTP Vulnerability and Clearance of Excess Dopamine in Mouse Striatal Terminals. Toxicol Sci. 2016 Sep;153(1):79-88. doi: 10.1093/toxsci/kfw106.
655. Jossan SS, Sakurai E, Oreland L. MPTP toxicity in relation to age, dopamine uptake and MAO-B activity in two rodent species. Pharmacol Toxicol. 1989 Mar;64(3):314-8. doi: 10.1111/j.1600-0773.1989.tb00654.x.
656. Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. J Bioenerg Biomembr. 2004 Aug;36(4):375-9. doi: 10.1023/B:JOBB.0000041771.66775.d5.
657. D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. Nature. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):324-6. doi: 10.1038/327324a0.
658. D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. Neuromelanin: a role in MPTP-induced neurotoxicity. Life Sci. 1987 Feb 23;40(8):705-12. doi: 10.1016/0024-3205(87)90297-9.
659. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Nat Protoc. 2007;2(1):141-51. doi: 10.1038/nprot.2006.342.
660. Zhang QS, Heng Y, Mou Z, Huang JY, Yuan YH, Chen NH. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. Acta Pharmacol Sin. 2017 Oct;38(10):1317-1328. doi: 10.1038/aps.2017.49.
661. Mustapha M, Mat Taib CN. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. Bosn J Basic Med Sci. 2021 Aug 1;21(4):422-433. doi: 10.17305/bjbms.2020.5181.
662. Irwin I, Wu EY, DeLanney LE, Trevor A, Langston JW. The effect of diethyldithiocarbamate on the biodisposition of MPTP: an explanation for enhanced neurotoxicity. Eur J Pharmacol. 1987 Sep 11;141(2):209-17. doi: 10.1016/0014-2999(87)90265-2.
663. Alvarez-Fischer D, Noelker C, Grünewald A, Vulinović F, Guerreiro S, Fuchs J, Lu L, Lombès A, Hirsch EC, Oertel WH, Michel PP, Hartmann A. Probenecid potentiates MPTP/MPP+ toxicity by interference with cellular energy metabolism. J Neurochem. 2013 Dec;127(6):782-92. doi: 10.1111/jnc.12343.
664. Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. Parkinsonism Relat Disord. 2008;14 Suppl 2(Suppl 2):S112-5. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.012.
665. Zuddas A, Corsini GU, Schinelli S, Johannessen JN, di Porzio U, Kopin IJ. MPTP treatment combined with ethanol or acetaldehyde selectively destroys dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. Brain Res. 1989 Oct 30;501(1):1-10. doi: 10.1016/0006-8993(89)91020-2.

666. Vingerhoets FJ, Snow BJ, Tetrud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. Ann Neurol. 1994 Nov;36(5):765-70. doi: 10.1002/ana.410360513.
667. AlShimemeri S, Di Luca DG, Fox SH. MPTP Parkinsonism and Implications for Understanding Parkinson's Disease. Mov Disord Clin Pract. 2021 Sep 25;9(1):42-47. doi: 10.1002/mdc3.13344.
668. McCallum SE, Parameswaran N, Perez XA, Bao S, McIntosh JM, Grady SR, Quik M. Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. J Neurochem. 2006 Feb;96(4):960-72. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03610.x.
669. McCallum SE, Parameswaran N, Perez XA, Bao S, McIntosh JM, Grady SR, Quik M. Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. J Neurochem. 2006 Feb;96(4):960-72. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03610.x.
670. He XJ, Yamauchi H, Uetsuka K, Nakayama H. Neurotoxicity of MPTP to migrating neuroblasts: studies in acute and subacute mouse models of Parkinson's disease. Neurotoxicology. 2008 May;29(3):413-20. doi: 10.1016/j.neuro.2008.02.007.
671. Karch J, Kanisicak O, Brody MJ, Sargent MA, Michael DM, Molkentin JD. Necroptosis Interfaces with MOMP and the MPTP in Mediating Cell Death. PLoS One. 2015 Jun 10;10(6):e0130520. doi: 10.1371/journal.pone.0130520.
672. Kuroiwa H, Yokoyama H, Kimoto H, Kato H, Araki T. Biochemical alterations of the striatum in an MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. Metab Brain Dis. 2010 Jun;25(2):177-83. doi: 10.1007/s11011-010-9195-9.
673. Bradbury AJ, Costall B, Jenner PG, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. The effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal and limbic catecholamine neurones in white and black mice. Antagonism by monoamine oxidase inhibitors. Neuropharmacology. 1986 Aug;25(8):897-904. doi: 10.1016/0028-3908(86)90016-x.
674. Santoro M, Fadda P, Klephan KJ, Hull C, Teismann P, Platt B, Riedel G. Neurochemical, histological, and behavioral profiling of the acute, sub-acute, and chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. J Neurochem. 2023 Jan;164(2):121-142. doi: 10.1111/jnc.15699.
675. Yasuda Y, Shimoda T, Uno K, Tateishi N, Furuya S, Yagi K, Suzuki K, Fujita S. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. J Neuroimmunol. 2008 Nov 15;204(1-2):43-51. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.08.003.
676. Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Członkowski A, Członkowska A. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Immunopharmacology. 1998 Jun;39(3):167-80. doi: 10.1016/s0162-3109(98)00022-8.
677. O'Callaghan JP, Miller DB, Reinhard JF Jr. Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Brain Res. 1990 Jun 25;521(1-2):73-80. doi: 10.1016/0006-8993(90)91526-m.
678. Shimoji M, Zhang L, Mandir AS, Dawson VL, Dawson TM. Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Brain Res Mol Brain Res. 2005 Mar 24;134(1):103-8. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.01.012.
679. Pain S, Gochard A, Bodard S, Gulhan Z, Prunier-Aesch C, Chalon S. Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease. Exp Toxicol Pathol. 2013 Jul;65(5):689-94. doi: 10.1016/j.etp.2012.09.001.
680. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. Restor Neurol Neurosci. 2000;16(2):135-142.

681. Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2001 Nov 1;125(1-2):109-25. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00309-6.
682. Jiang PE, Lang QH, Yu QY, Tang XY, Liu QQ, Li XY, Feng XZ. Behavioral Assessments of Spontaneous Locomotion in a Murine MPTP-induced Parkinson's Disease Model. J Vis Exp. 2019 Jan 7;(143). doi: 10.3791/58653.
683. Haobam R, Sindhu KM, Chandra G, Mohanakumar KP. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. Behav Brain Res. 2005 Sep 8;163(2):159-67. doi: 10.1016/j.bbr.2005.04.011.
684. Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. Behav Genet. 2000 May;30(3):171-82. doi: 10.1023/a:1001958023096.
685. Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. Brain Res Mol Brain Res. 2005 Mar 24;134(1):57-66. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.09.017.
686. von Bohlen Und Halbach O. Modeling neurodegenerative diseases in vivo review. Neurodegener Dis. 2005;2(6):313-20. doi: 10.1159/000092318.
687. Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. Prog Brain Res. 2010;184:17-33. doi: 10.1016/S0079-6123(10)84002-6.
688. Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. Rev Neurol (Paris). 2015 Nov;171(11):750-61. doi: 10.1016/j.neurol.2015.07.011.
689. Guimarães RP, Ribeiro DL, Dos Santos KB, Godoy LD, Corrêa MR, Padovan-Neto FE. The 6-hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. J Vis Exp. 2021 Oct 27;(176). doi: 10.3791/62923.
690. Carvey PM, Zhao CH, Hendey B, Lum H, Trachtenberg J, Desai BS, Snyder J, Zhu YG, Ling ZD. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. Eur J Neurosci. 2005 Sep;22(5):1158-68. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04281.x.
691. Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Neuroscience. 1995 Aug;67(3):631-47. doi: 10.1016/0306-4522(95)00066-r.
692. Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. Brain Res. 1976 Feb 6;102(2):201-15. doi: 10.1016/0006-8993(76)90877-5.
693. Thiele SL, Warre R, Nash JE. Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. J Vis Exp. 2012 Feb 14;(60):3234. doi: 10.3791/3234.
694. Smith AD, Amalric M, Koob GF, Zigmond MJ. Effect of bilateral 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle on reaction time. Neuropsychopharmacology. 2002 Jun;26(6):756-64. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00420-1.
695. Baldwin HA, Koivula PP, Necarsulmer JC, Whitaker KW, Harvey BK. Step Sequence Is a Critical Gait Parameter of Unilateral 6-OHDA Parkinson's Rat Models. Cell Transplant. 2017 Apr 13;26(4):659-667. doi: 10.3727/096368916X693059.
696. 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;34(2):279-90. doi: 10.1016/j.nbd.2009.01.016.
697. Guo Z, Ruan Z, Zhang D, Liu X, Hou L, Wang Q. Rotenone impairs learning and memory in mice through microglia-mediated blood brain barrier disruption and neuronal apoptosis. Chemosphere. 2022 Mar;291(Pt 2):132982. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132982.
698. 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 7;278(10):8516-25. doi: 10.1074/jbc.M210432200.
699. 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 15;1655:104-113. doi: 10.1016/j.brainres.2016.11.020.
700. Rocha SM, Bantle CM, Aboellail T, Chatterjee D, Smeyne RJ, Tjalkens RB. Rotenone induces regionally distinct α-synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57Bl/6 mice. Neurobiol Dis. 2022 Jun 1;167:105685. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105685.
701. Troshev D, Berezhnoy D, Kulikova O, Abaimov D, Muzychuk O, Nalobin D, Stvolinsky S, Fedorova T. The dynamics of nigrostriatal system damage and neurobehavioral changes in the rotenone rat model of Parkinson's disease. Brain Res Bull. 2021 Aug;173:1-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2021.04.006.
702. Vaccari C, El Dib R, Gomaa H, Lopes LC, de Camargo JL. Paraquat and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2019;22(5-6):172-202. doi: 10.1080/10937404.2019.1659197.
703. Vaccari C, El Dib R, Gomaa H, Lopes LC, de Camargo JL. Paraquat and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2019;22(5-6):172-202. doi: 10.1080/10937404.2019.1659197.
704. Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, Buckley B, Mirochnitchenko O, Richfield EK. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. Environ Health Perspect. 2007 Oct;115(10):1448-53. doi: 10.1289/ehp.9932.
705. Sandström von Tobel J, Zoia D, Althaus J, Antinori P, Mermoud J, Pak HS, Scherl A, Monnet-Tschudi F. Immediate and delayed effects of subchronic Paraquat exposure during an early differentiation stage in 3D-rat brain cell cultures. Toxicol Lett. 2014 Oct 15;230(2):188-97. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.02.001.
706. Chanyachukul T, Yoovathaworn K, Thongsaard W, Chongthammakun S, Navasumrit P, Satayavivad J. Attenuation of paraquat-induced motor behavior and neurochemical disturbances by L-valine in vivo. Toxicol Lett. 2004 May 2;150(3):259-69. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.02.007.
707. Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2012 May 16;231(1):154-63. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.008.
708. Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2012 May 16;231(1):154-63. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.008.
709. Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. Mov Disord. 2011 May;26(6):993-1002. doi: 10.1002/mds.23696.
710. Lorenc-Koci E, Ossowska K, Wardas J, Wolfarth S. Does reserpine induce parkinsonian rigidity? J Neural Transm Park Dis Dement Sect. 1995;9(2-3):211-23. doi: 10.1007/BF02259662.
711. Shin EJ, Jeong JH, Hwang Y, Sharma N, Dang DK, Nguyen BT, Nah SY, Jang CG, Bing G, Nabeshima T, Kim HC. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity as a model of Parkinson's disease. Arch Pharm Res. 2021 Jul;44(7):668-688. doi: 10.1007/s12272-021-01341-7.
712. Shin EJ, Tran HQ, Nguyen PT, Jeong JH, Nah SY, Jang CG, Nabeshima T, Kim HC. Role of Mitochondria in Methamphetamine-Induced Dopaminergic Neurotoxicity: Involvement in Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Pro-apoptosis-A Review. Neurochem Res. 2018 Jan;43(1):66-78. doi: 10.1007/s11064-017-2318-5.
713. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr;79(4):368-76. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.

714. Vitek JL, Giroux M. Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. Ann Neurol. 2000 Apr;47(4 Suppl 1):S131-40.
715. Heinrichs-Graham E, Santamaria PM, Gendelman HE, Wilson TW. The cortical signature of symptom laterality in Parkinson's disease. Neuroimage Clin. 2017 Feb 12;14:433-440. doi: 10.1016/j.nicl.2017.02.010.
716. Ling H, Massey LA, Lees AJ, Brown P, Day BL. Hypokinesia without decrement distinguishes progressive supranuclear palsy from Parkinson's disease. Brain. 2012 Apr;135(Pt 4):1141-53. doi: 10.1093/brain/aws038.
717. Mancini M, Smulders K, Cohen RG, Horak FB, Giladi N, Nutt JG. The clinical significance of freezing while turning in Parkinson's disease. Neuroscience. 2017 Feb 20;343:222-228. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.045.
718. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. Brain. 2001 Nov;124(Pt 11):2131-46. doi: 10.1093/brain/124.11.2131.
719. Papengut F, Raethjen J, Binder A, Deuschl G. Rest tremor suppression may separate essential from parkinsonian rest tremor. Parkinsonism Relat Disord. 2013 Jul;19(7):693-7. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.03.013.
720. Ou R, Wei Q, Hou Y, Zhang L, Liu K, Lin J, Jiang Z, Zhao B, Cao B, Shang H. Facial tremor in patients with Parkinson's disease: prevalence, determinants and impacts on disease progression. BMC Neurol. 2021 Feb 23;21(1):86. doi: 10.1186/s12883-021-02105-y.
721. Zach H, Dirkx M, Bloem BR, Helmich RC. The Clinical Evaluation of Parkinson's Tremor. J Parkinsons Dis. 2015;5(3):471-4. doi: 10.3233/JPD-150650.
722. Ferreira-Sánchez MDR, Moreno-Verdú M, Cano-de-la-Cuerda R. Quantitative Measurement of Rigidity in Parkinson´s Disease: A Systematic Review. Sensors (Basel). 2020 Feb 6;20(3):880. doi: 10.3390/s20030880.
723. Findley LJ, Gresty MA, Halmagyi GM. Tremor, the cogwheel phenomenon and clonus in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1981 Jun;44(6):534-46. doi: 10.1136/jnnp.44.6.534.
724. di Biase L, Di Santo A, Caminiti ML, De Liso A, Shah SA, Ricci L, Di Lazzaro V. Gait Analysis in Parkinson's Disease: An Overview of the Most Accurate Markers for Diagnosis and Symptoms Monitoring. Sensors (Basel). 2020 Jun 22;20(12):3529. doi: 10.3390/s20123529.
725. Boonstra TA, van der Kooij H, Munneke M, Bloem BR. Gait disorders and balance disturbances in Parkinson's disease: clinical update and pathophysiology. Curr Opin Neurol. 2008 Aug;21(4):461-71. doi: 10.1097/WCO.0b013e328305bdaf.
726. Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. Nat Rev Neurosci. 2017 Jul;18(7):435-450. doi: 10.1038/nrn.2017.62.
727. O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. Mov Disord. 2008 Jan;23(1):101-6. doi: 10.1002/mds.21813.
728. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. Lancet Neurol. 2009 May;8(5):464-74. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70068-7.
729. Hermanowicz N, Jones SA, Hauser RA. Impact of non-motor symptoms in Parkinson's disease: a PMDAlliance survey. Neuropsychiatr Dis Treat. 2019 Aug 5;15:2205-2212. doi: 10.2147/NDT.S213917.
730. Moustafa AA, Chakravarthy S, Phillips JR, Gupta A, Keri S, Polner B, Frank MJ, Jahanshahi M. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. Neurosci Biobehav Rev. 2016 Sep;68:727-740. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.07.010.
731. Titova N, Padmakumar C, Lewis SJG, Chaudhuri KR. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? J Neural Transm (Vienna). 2017 Aug;124(8):907-914. doi: 10.1007/s00702-016-1667-6.
732. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. JAMA. 2020 Feb 11;323(6):548-560. doi: 10.1001/jama.2019.22360.

733. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1988 Jun;51(6):745-52. doi: 10.1136/jnnp.51.6.745.
734. 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;30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424.
735. Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. Semin Neurol. 2017 Apr;37(2):118-126. doi: 10.1055/s-0037-1601888.
736. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. CMAJ. 2016 Nov 1;188(16):1157-1165. doi: 10.1503/cmaj.151179.
737. Mulroy E, Stamelou M, Bhatia KP. How to approach a patient with parkinsonism - red flags for atypical parkinsonism. Int Rev Neurobiol. 2019;149:1-34. doi: 10.1016/bs.irn.2019.10.001.
738. Postuma RB, Poewe W, Litvan I, Lewis S, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Chan P, Slow E, Seppi K, Schaffer E, Rios-Romenets S, Mi T, Maetzler C, Li Y, Heim B, Bledsoe IO, Berg D. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. Mov Disord. 2018 Oct;33(10):1601-1608. doi: 10.1002/mds.27362.
739. Bidesi NSR, Vang Andersen I, Windhorst AD, Shalgunov V, Herth MM. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. J Neurochem. 2021 Nov;159(4):660-689. doi: 10.1111/jnc.15516.
740. Bidesi NSR, Vang Andersen I, Windhorst AD, Shalgunov V, Herth MM. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. J Neurochem. 2021 Nov;159(4):660-689. doi: 10.1111/jnc.15516.
741. Helmich RC, Vaillancourt DE, Brooks DJ. The Future of Brain Imaging in Parkinson's Disease. J Parkinsons Dis. 2018;8(s1):S47-S51. doi: 10.3233/JPD-181482.
742. Golan H, Volkov O, Shalom E. Nuclear imaging in Parkinson's disease: The past, the present, and the future. J Neurol Sci. 2022 May 15;436:120220. doi: 10.1016/j.jns.2022.120220.
743. Tuma Santos CA, Wallace WD, Kim S, Vijayakumar V. Pitfalls and Artifacts of ^{123}I-Ioflupane SPECT in Parkinsonian Syndromes: A Quality Improvement Teaching Tool. J Nucl Med Technol. 2021 Jun;49(2):114-119. doi: 10.2967/jnmt.120.258491.
744. Jokinen P, Helenius H, Rauhala E, Brück A, Eskola O, Rinne JO. Simple ratio analysis of 18F-fluorodopa uptake in striatal subregions separates patients with early Parkinson disease from healthy controls. J Nucl Med. 2009 Jun;50(6):893-9. doi: 10.2967/jnumed.108.061572.
745. Berg D. Transcranial ultrasound as a risk marker for Parkinson's disease. Mov Disord. 2009;24 Suppl 2:S677-83. doi: 10.1002/mds.22540.
746. Ressner P, Skoloudík D, Hlustík P, Kanovský P. Hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. J Neuroimaging. 2007 Apr;17(2):164-7. doi: 10.1111/j.1552-6569.2007.00114.x.
747. Day JO, Mullin S. The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. Genes (Basel). 2021 Jun 30;12(7):1006. doi: 10.3390/genes12071006.
748. Qamar MA, Harington G, Trump S, Johnson J, Roberts F, Frost E. Multidisciplinary Care in Parkinson's Disease. Int Rev Neurobiol. 2017;132:511-523. doi: 10.1016/bs.irn.2017.02.001.
749. van der Marck MA, Kalf JG, Sturkenboom IH, Nijkrake MJ, Munneke M, Bloem BR. Multidisciplinary care for patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2009 Dec;15 Suppl 3:S219-23. doi: 10.1016/S1353-8020(09)70819-3.
750. Rajan R, Brennan L, Bloem BR, Dahodwala N, Gardner J, Goldman JG, Grimes DA, Iansek R, Kovács N, McGinley J, Parashos SA, Piemonte MEP, Eggers C. Integrated Care in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Mov Disord. 2020 Sep;35(9):1509-1531. doi: 10.1002/mds.28097.

751. Stoker TB, Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. F1000Res. 2020 Jul 31;9:F1000 Faculty Rev-862. doi: 10.12688/f1000research.25634.1.
752. Nijhuis FA, van Heek J, Bloem BR, Post B, Faber MJ. Choosing an Advanced Therapy in Parkinson's Disease; is it an Evidence-Based Decision in Current Practice? J Parkinsons Dis. 2016 Jul 25;6(3):533-43. doi: 10.3233/JPD-160816.
753. Dijk JM, Espay AJ, Katzenschlager R, de Bie RMA. The Choice Between Advanced Therapies for Parkinson's Disease Patients: Why, What, and When? J Parkinsons Dis. 2020;10(s1):S65-S73. doi: 10.3233/JPD-202104.
754. De Gaspari D, Siri C, Landi A, Cilia R, Bonetti A, Natuzzi F, Morgante L, Mariani CB, Sganzerla E, Pezzoli G, Antonini A. Clinical and neuropsychological follow up at 12 months in patients with complicated Parkinson's disease treated with subcutaneous apomorphine infusion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006 Apr;77(4):450-3. doi: 10.1136/jnnp.2005.078659.
755. Oertel W, Schulz JB. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. J Neurochem. 2016 Oct;139 Suppl 1:325-337. doi: 10.1111/jnc.13750.
756. Guo X, Tang L, Tang X. Current Developments in Cell Replacement Therapy for Parkinson's Disease. Neuroscience. 2021 May 21;463:370-382. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.03.022.
757. Chen W, Huang Q, Ma S, Li M. Progress in Dopaminergic Cell Replacement and Regenerative Strategies for Parkinson's Disease. ACS Chem Neurosci. 2019 Feb 20;10(2):839-851. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00389.
758. Murman DL. Early treatment of Parkinson's disease: opportunities for managed care. Am J Manag Care. 2012 Sep;18(7 Suppl):S183-8.
759. Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, Del Rey NL, Hernandez LF, Obeso JA. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. Exp Neurol. 2017 Dec;298(Pt B):148-161. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.10.002.
760. Hauser RA. Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. Am J Manag Care. 2010 Mar;16 Suppl Implications:S100-7.
761. Weiner WJ. Early diagnosis of Parkinson's disease and initiation of treatment. Rev Neurol Dis. 2008 Spring;5(2):46-53; quiz 54-5.
762. Tizabi Y, Getachew B, Aschner M. Novel Pharmacotherapies in Parkinson's Disease. Neurotox Res. 2021 Aug;39(4):1381-1390. doi: 10.1007/s12640-021-00375-5.
763. Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. Int J Mol Sci. 2017 Mar 4;18(3):551. doi: 10.3390/ijms18030551.
764. Straka I, Minár M, Gažová A, Valkovič P, Kyselovič J. Clinical aspects of adherence to pharmacotherapy in Parkinson disease: A PRISMA-compliant systematic review. Medicine (Baltimore). 2018 Jun;97(23):e10962. doi: 10.1097/MD.0000000000010962.
765. Liu Y, Li W, Tan C, Liu X, Wang X, Gui Y, Qin L, Deng F, Hu C, Chen L. Meta-analysis comparing deep brain stimulation of the globus pallidus and subthalamic nucleus to treat advanced Parkinson disease. J Neurosurg. 2014 Sep;121(3):709-18. doi: 10.3171/2014.4.JNS131711.
766. Tan ZG, Zhou Q, Huang T, Jiang Y. Efficacies of globus pallidus stimulation and subthalamic nucleus stimulation for advanced Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. Clin Interv Aging. 2016 Jun 21;11:777-86. doi: 10.2147/CIA.S105505.
767. Volkmann J. Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. J Clin Neurophysiol. 2004 Jan-Feb;21(1):6-17. doi: 10.1097/00004691-200401000-00003.
768. Sesar Á, Fernández-Pajarín G, Ares B, Rivas MT, Castro A. Continuous subcutaneous apomorphine infusion in advanced Parkinson's disease: 10-year experience with 230 patients. J Neurol. 2017 May;264(5):946-954. doi: 10.1007/s00415-017-8477-0.
769. Blaise AS, Baille G, Carrière N, Devos D, Dujardin K, Grolez G, Kreisler A, Kyheng M, Moreau C, Mutez E, Seguy D, Defebvre L. Safety and effectiveness of levodopa-

carbidopa intestinal gel for advanced Parkinson's disease: A large single-center study. Rev Neurol (Paris). 2020 May;176(4):268-276. doi: 10.1016/j.neurol.2019.07.024.
770. Martinez-Ramirez D, Okun MS. Rationale and clinical pearls for primary care doctors referring patients for deep brain stimulation. Gerontology. 2014;60(1):38-48. doi: 10.1159/000354880.
771. Clarke CE, Worth P, Grosset D, Stewart D. Systematic review of apomorphine infusion, levodopa infusion and deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2009 Dec;15(10):728-41. doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.09.005.
772. Ferreira JJ, Katzenschlager R, Bloem BR, Bonuccelli U, Burn D, Deuschl G, Dietrichs E, Fabbrini G, Friedman A, Kanovsky P, Kostic V, Nieuwboer A, Odin P, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Schüpbach M, Tolosa E, Trenkwalder C, Schapira A, Berardelli A, Oertel WH. Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease. Eur J Neurol. 2013 Jan;20(1):5-15. doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03866.x.
773. Eggington S, Valldeoriola F, Chaudhuri KR, Ashkan K, Annoni E, Deuschl G. The cost-effectiveness of deep brain stimulation in combination with best medical therapy, versus best medical therapy alone, in advanced Parkinson's disease. J Neurol. 2014 Jan;261(1):106-16. doi: 10.1007/s00415-013-7148-z.
774. Spindola B, Leite MA, Orsini M, Fonoff E, Landeiro JA, Pessoa BL. Ablative surgery for Parkinson's disease: Is there still a role for pallidotomy in the deep brain stimulation era? Clin Neurol Neurosurg. 2017 Jul;158:33-39. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.04.018.
775. Abbruzzese G, Marchese R, Avanzino L, Pelosin E. Rehabilitation for Parkinson's disease: Current outlook and future challenges. Parkinsonism Relat Disord. 2016 Jan;22 Suppl 1:S60-4. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.005.
776. Rafferty MR, Nettnin E, Goldman JG, MacDonald J. Frameworks for Parkinson's Disease Rehabilitation Addressing When, What, and How. Curr Neurol Neurosci Rep. 2021 Feb 22;21(3):12. doi: 10.1007/s11910-021-01096-0.
777. Hunter H, Lovegrove C, Haas B, Freeman J, Gunn H. Experiences of people with Parkinson's disease and their views on physical activity interventions: a qualitative systematic review. JBI Database System Rev Implement Rep. 2019 Apr;17(4):548-613. doi: 10.11124/JBISRIR-2017-003901.
778. Ferrazzoli D, Ortelli P, Zivi I, Cian V, Urso E, Ghilardi MF, Maestri R, Frazzitta G. Efficacy of intensive multidisciplinary rehabilitation in Parkinson's disease: a randomised controlled study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2018 Aug;89(8):828-835. doi: 10.1136/jnnp-2017-316437.
779. Prizer LP, Browner N. The integrative care of Parkinson's disease: a systematic review. J Parkinsons Dis. 2012;2(2):79-86. doi: 10.3233/JPD-2012-12075.
780. Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Oct;87(20):7912-6. doi: 10.1073/pnas.87.20.7912
781. Bateman A, Belcourt D, Bennett H, Lazure C, Solomon S. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Dec 31;173(3):1161-8. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80908-8.
782. Bhandari V, Palfree RG, Bateman A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1715-9. doi: 10.1073/pnas.89.5.171.
783. Plowman GD, Green JM, Neubauer MG, Buckley SD, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. J Biol Chem. 1992 Jun 25;267(18):13073-8.
784. Anakwe OO, Gerton GL. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. Biol Reprod. 1990 Feb;42(2):317-28. doi: 10.1095/biolreprod42.2.317.
785. Baba T, Hoff HB 3rd, Nemoto H, Lee H, Orth J, Arai Y, Gerton GL. Acrogranin, an

acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. Mol Reprod Dev. 1993 Mar;34(3):233-43. doi: 10.1002/mrd.1080340302.
786. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. J Biol Chem. 1993 May 25;268(15):10863-9.
787. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH, Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. Cancer Res. 1999 Oct 15;59(20):5331-40.
788. Serrero G. Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 29;308(3):409-13. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01452-9.
789. Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. Carcinogenesis. 2004 Sep;25(9):1587-92. doi: 10.1093/carcin/bgh171.
790. Parnell PG, Wunderlich J, Carter B, Halper J. Purification of transforming growth factor type e. J Cell Biochem. 1990 Feb;42(2):111-6. doi: 10.1002/jcb.240420207.
791. Bateman A, Bennett HP. The granulin gene family: from cancer to dementia. Bioessays. 2009 Nov;31(11):1245-54. doi: 10.1002/bies.200900086.
792. Bhandari V, Bateman A. Structure and chromosomal location of the human granulin gene. Biochem Biophys Res Commun. 1992 Oct 15;188(1):57-63. doi: 10.1016/0006-291X(92)92349-3.
793. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. Nature. 2006 Aug 24;442(7105):920-4. doi: 10.1038/nature05017.
794. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. Nature. 2006 Aug 24;442(7105):916-9. doi: 10.1038/nature05016.
795. Palfree RG, Bennett HP, Bateman A. The Evolution of the Secreted Regulatory Protein Progranulin. PLoS One. 2015 Aug 6;10(8):e0133749. doi: 10.1371/journal.pone.0133749.
796. Bhandari V, Daniel R, Lim PS, Bateman A. Structural and functional analysis of a promoter of the human granulin/epithelin gene. Biochem J. 1996 Oct 15;319 (Pt 2):441-7.
797. Baba T, Nemoto H, Watanabe K, Arai Y, Gerton GL. Exon/intron organization of the gene encoding the mouse epithelin/granulin precursor (acrogranin). FEBS Lett. 1993 May 10;322(2):89-94. doi: 10.1016/0014-5793(93)81544-A.
798. Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science. 1989 Jul 28;245(4916):371-8. doi: 10.1126/science.2667136
799. Bucan M, Gatalica B, Baba T, Gerton GL. Mapping of Grn, the gene encoding the granulin/epithelin precursor (acrogranin), to mouse chromosome 11. Mamm Genome. 1996 Sep;7(9):704-5. doi: 10.1007/s003359900212.
800. Bhandari V, Giaid A, Bateman A. The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. Endocrinology. 1993 Dec;133(6):2682-9. doi: 10.1210/endo.133.6.8243292.
801. De Muynck L, Van Damme P. Cellular effects of progranulin in health and disease. J Mol Neurosci. 2011 Nov;45(3):549-60. doi: 10.1007/s12031-011-9553-z.

802. Songsrirote K, Li Z, Ashford D, Bateman A, Thomas-Oates J. Development and application of mass spectrometric methods for the analysis of progranulin N-glycosylation. J Proteomics. 2010 Jun 16;73(8):1479-90. doi: 10.1016/j.jprot.2010.02.013.
803. Bateman A, Bennett HP. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. J Endocrinol. 1998 Aug;158(2):145-51. J Endocrinol. 1998 Aug;158(2):145-51. doi: 10.1677/joe.0.1580145
804. Hrabal R, Chen Z, James S, Bennett HP, Ni F. The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. Nat Struct Biol. 1996 Sep;3(9):747-52. doi: 10.1038/nsb0996-747.
805. Tolkatchev D, Malik S, Vinogradova A, Wang P, Chen Z, Xu P, Bennett HP, Bateman A, Ni F. Structure dissection of human progranulin identifies well-folded granulin/epithelin modules with unique functional activities. Protein Sci. 2008 Apr;17(4):711-24. doi: 10.1110/ps.073295308.
806. Abella V, Pino J, Scotece M, Conde J, Lago F, Gonzalez-Gay MA, Mera A, Gómez R, Mobasheri A, Gualillo O. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent. Drug Discov Today. 2017 Oct;22(10):1557-1564. doi: 10.1016/j.drudis.2017.06.006.
807. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HP, Bateman A. Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. J Mol Neurosci. 2011 Nov;45(3):538-48. doi: 10.1007/s12031-011-9569-4.
808. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD, Ding A. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. Cell. 2002 Dec 13;111(6):867-78. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01141-8.
809. Xu D, Suenaga N, Edelmann MJ, Fridman R, Muschel RJ, Kessler BM. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. Mol Cell Proteomics. 2008 Nov;7(11):2215-28. doi: 10.1074/mcp.M800095-MCP200.
810. Suh HS, Choi N, Tarassishin L, Lee SC. Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). PLoS One. 2012;7(4):e35115. doi: 10.1371/journal.pone.0035115.
811. Butler GS, Dean RA, Tam EM, Overall CM. Pharmacoproteomics of a metalloproteinase hydroxamate inhibitor in breast cancer cells: dynamics of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated membrane protein shedding. Mol Cell Biol. 2008 Aug;28(15):4896-914. doi: 10.1128/MCB.01775-07.
812. Bai XH, Wang DW, Kong L, Zhang Y, Luan Y, Kobayashi T, Kronenberg HM, Yu XP, Liu CJ. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. Mol Cell Biol. 2009 Aug;29(15):4201-19. doi: 10.1128/MCB.00056-09.
813. Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, Lämmermann T, Pfister H, Bateman A, Belaaouaj A, Ring J, Ollert M, Fässler R, Jenne DE. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. J Clin Invest. 2008 Jul;118(7):2438-47. doi: 10.1172/JCI34694.
814. Devoogdt N, Rasool N, Hoskins E, Simpkins F, Tchabo N, Kohn EC. Overexpression of protease inhibitor-dead secretory leukocyte protease inhibitor causes more aggressive ovarian cancer in vitro and in vivo. Cancer Sci. 2009 Mar;100(3):434-40. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01076.x.
815. Okura H, Yamashita S, Ohama T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Hamada Y, Sougawa N, Ohyama R, Sawa Y, Matsuyama A. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. J Atheroscler Thromb. 2010 Jun 30;17(6):568-77. doi: 10.5551/jat.3921.
816. Tang W, Lu Y, Tian QY, Zhang Y, Guo FJ, Liu GY, Syed NM, Lai Y, Lin EA, Kong L, Su J, Yin F, Ding AH, Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Tao J, Craft J, Yin Z, Feng JQ, Abramson SB, Yu XP, Liu CJ. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. Science. 2011 Apr 22;332(6028):478-84. doi: 10.1126/science.1199214.

817. Liu CJ. Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. FEBS Lett. 2011 Dec 1;585(23):3675-80. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.065.
818. Bayry J. New horizons in natural TNF-α antagonist research. Trends Mol Med. 2011 Oct;17(10):538-40. doi: 10.1016/j.molmed.2011.06.007.
819. Tian Q, Zhao Y, Mundra JJ, Gonzalez-Gugel E, Jian J, Uddin SM, Liu C. Three TNFR-binding domains of PGRN act independently in inhibition of TNF-alpha binding and activity. Front Biosci (Landmark Ed). 2014 Jun 1;19:1176-85. doi: 10.2741/4274.
820. Ong CH, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. Histol Histopathol. 2003 Oct;18(4):1275-88. doi: 10.14670/HH-18.1275.
821. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. JAMA. 2006 May 17;295(19):2275-85. doi: 10.1001/jama.295.19.2275.
822. Xia Q, Zhu S, Wu Y, Wang J, Cai Y, Chen P, Li J, Heng BC, Ouyang HW, Lu P. Intra-articular transplantation of atsttrin-transduced mesenchymal stem cells ameliorate osteoarthritis development. Stem Cells Transl Med. 2015 May;4(5):523-31. doi: 10.5966/sctm.2014-0200.
823. Zhao YP, Tian QY, Liu CJ. Progranulin deficiency exaggerates, whereas progranulin-derived Atsttrin attenuates, severity of dermatitis in mice. FEBS Lett. 2013 Jun 19;587(12):1805-10. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.037.
824. Wei F, Zhang Y, Jian J, Mundra JJ, Tian Q, Lin J, Lafaille JJ, Tang W, Zhao W, Yu X, Liu CJ. PGRN protects against colitis progression in mice in an IL-10 and TNFR2 dependent manner. Sci Rep. 2014 Nov 12;4:7023. doi: 10.1038/srep07023.
825. Culouscou JM, Carlton GW, Shoyab M. Biochemical analysis of the epithelin receptor. J Biol Chem. 1993 May 15;268(14):10458-62.
826. Xia X, Serrero G. Identification of cell surface binding sites for PC-cell-derived growth factor, PCDGF, (epithelin/granulin precursor) on epithelial cells and fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Apr 17;245(2):539-43. doi: 10.1006/bbrc.1998.8498.
827. Hu F, Padukkavidana T, Vægter CB, Brady OA, Zheng Y, Mackenzie IR, Feldman HH, Nykjaer A, Strittmatter SM. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. Neuron. 2010 Nov 18;68(4):654-67. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.034.
828. Zheng Y, Brady OA, Meng PS, Mao Y, Hu F. C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking. PLoS One. 2011;6(6):e21023. doi: 10.1371/journal.pone.0021023.
829. Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. Nat Rev Neurosci. 2008 Dec;9(12):899-909. doi: 10.1038/nrn2516.
830. Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. Cell Mol Life Sci. 2009 Aug;66(16):2677-89. doi: 10.1007/s00018-009-0043-1.
831. Evers BM, Rodriguez-Navas C, Tesla RJ, Prange-Kiel J, Wasser CR, Yoo KS, McDonald J, Cenik B, Ravenscroft TA, Plattner F, Rademakers R, Yu G, White CL 3rd, Herz J. Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency. Cell Rep. 2017 Sep 12;20(11):2565-2574. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.056.
832. Carrasquillo MM, Nicholson AM, Finch N, Gibbs JR, Baker M, Rutherford NJ, Hunter TA, DeJesus-Hernandez M, Bisceglio GD, Mackenzie IR, Singleton A, Cookson Rademakers R. Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.11.002MR.
833. Lewis J, Golde TE. Sorting out frontotemporal dementia? Neuron. 2010 Nov 18;68(4):601-3. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.014.

834. Gass J, Lee WC, Cook C, Finch N, Stetler C, Jansen-West K, Lewis J, Link CD, Rademakers R, Nykjær A, Petrucelli L. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. Mol Neurodegener. 2012 Jul 10;7:33. doi: 10.1186/1750-1326-7-33.
835. Nicholson AM, Finch NA, Almeida M, Perkerson RB, van Blitterswijk M, Wojtas A, Cenik B, Rotondo S, Inskeep V, Almasy L, Dyer T, Peralta J, Jun G, Wood AR, Frayling TM, Fuchsberger C, Fowler S, Teslovich TM, Manning AK, Kumar S, Curran J, Lehman D, Abecasis G, Duggirala R, Pottier C, Zahir HA, Crook JE, Karydas A, Mitic L, Sun Y, Dickson DW, Bu G1, Herz J, Yu G, Miller BL, Ferguson S, Petersen RC, Graff-Radford N, Blangero J, Rademakers R. Prosaposin is a regulator of progranulin levels and oligomerization. Nat Commun. 2016 Jun 30;7:11992. doi: 10.1038/ncomms11992.
836. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science. 2001 Nov 30;294(5548):1945-8. doi: 10.1126/science.1065057.
837. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. Nature. 2004 Feb 26;427(6977):843-8. doi: 10.1038/nature02319.
838. Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL, Lee FS. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. J Neurosci. 2005 Jun 29;25(26):6156-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005.
839. Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J, Petersen CM. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. J Biol Chem. 1999 Mar 26;274(13):8832-6. doi: 10.1074/jbc.274.13.8832.
840. Jian J, Zhao S, Tian Q, Gonzalez-Gugel E, Mundra JJ, Uddin SM, Liu B, Richbourgh B, Brunetti R, Liu CJ. Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains. FEBS Lett. 2013 Nov 1;587(21):3428-36. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.024.
841. Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. Curr Opin Struct Biol. 2004 Apr;14(2):154-60. doi 10.1016/j.sbi.2004.03.003.
842. Liu CJ, Bosch X. Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. Pharmacol Ther. 2012 Jan;133(1):124-32. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.003.
843. Wu H, Siegel RM. Progranulin resolves inflammation. Science. 2011 Apr 22;332(6028):427-8. doi: 10.1126/science.1205992.
844. Feng JQ, Guo FJ, Jiang BC, Zhang Y, Frenkel S, Wang DW, Tang W, Xie Y, Liu CJ. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. FASEB J. 2010 Jun;24(6):1879-92. doi: 10.1096/fj.09-144659.
845. Hwang HJ, Jung TW, Hong HC, Choi HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, Baik SH, Yoo HJ. Progranulin protects vascular endothelium against atherosclerotic inflammatory reaction via Akt/eNOS and nuclear factor-κB pathways. PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e76679. doi: 10.1371/journal.pone.0076679.
846. Monami G, Gonzalez EM, Hellman M, Gomella LG, Baffa R, Iozzo RV, Morrione A. Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. Cancer Res. 2006 Jul 15;66(14):7103-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0633.
847. Wang BC, Liu H, Talwar A, Jian J. New discovery rarely runs smooth: an update on progranulin/TNFR interactions. Protein Cell. 2015 Nov;6(11):792-803. doi: 10.1007/s13238-015-0213-x.
848. Liu C, Li XX, Gao W, Liu W, Liu DS. Progranulin-derived Atsttrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity. PLoS One. 2014 Mar 20;9(3):e92743. doi: 10.1371/journal.pone.0092743.
849. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R,

Ni J, Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science. 1996 Nov 8;274(5289):990-2. doi: 10.1126/science.274.5289.990.
850. Bittner S, Ehrenschwender M. Multifaceted death receptor 3 signaling-promoting survival and triggering death. FEBS Lett. 2017 Sep;591(17):2543-2555. doi: 10.1002/1873-3468.12747.
851. Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschwender M. Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3. FEBS J. 2016 Jan;283(2):323-36. doi: 10.1111/febs.13576.
852. Aiba Y, Nakamura M. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. Mediators Inflamm. 2013;2013:258164. doi: 10.1155/2013/258164.
853. Jian J, Li G, Hettinghouse A, Liu C. Progranulin: A key player in autoimmune diseases. Cytokine. 2018 Jan;101:48-55. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.007.
854. Neill T, Buraschi S, Goyal A, Sharpe C, Natkanski E, Schaefer L, Morrione A, Iozzo RV. EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin. J Cell Biol. 2016 Dec 5;215(5):687-703. doi: 10.1083/jcb.201603079.
855. Chitramuthu B, Bateman A. Progranulin and the receptor tyrosine kinase EphA2, partners in crime? J Cell Biol. 2016 Dec 5;215(5):603-605. doi: 10.1083/jcb.201610097.
856. Kandouz M. The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. Cancer Metastasis Rev. 2012 Jun;31(1-2):353-73. doi: 10.1007/s10555-012-9352-1.
857. Yamaguchi Y, Pasquale EB. Eph receptors in the adult brain. Curr Opin Neurobiol. 2004 Jun;14(3):288-96. doi: 10.1016/j.conb.2004.04.003.
858. Murai KK, Pasquale EB. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. Neuroscientist. 2004 Aug;10(4):304-14. doi: 10.1177/1073858403262221.
859. Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. Expert Opin Ther Targets. 2011 Jan;15(1):31-51. doi: 10.1517/14728222.2011.538682.
860. Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, Nishihara M, Ploegh HL. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. Immunity. 2011 Apr 22;34(4):505-13. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.018.
861. Moresco EM, Beutler B. Special delivery: granulin brings CpG DNA to Toll-like receptor 9. Immunity. 2011 Apr 22;34(4):453-5. doi: 10.1016/j.immuni.2011.04.001.
862. Vollmer J. TLR9 in health and disease. Int Rev Immunol. 2006 May-Aug;25(3-4):155-81. doi: 10.1080/08830180600743107.
863. Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. Expert Opin Ther Targets. 2010 Aug;14(8):787-96. doi: 10.1517/14728222.2010.501333.
864. Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Horiuchi T, Akashi K. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. Arthritis Res Ther. 2012 Nov 11;14(6):R244. doi: 10.1186/ar4087.
865. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. J Histochem Cytochem. 2000 Jul;48(7):999-1009. doi: 10.1177/002215540004800713.
866. Daniel R, Daniels E, He Z, Bateman A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. Dev Dyn. 2003 Aug;227(4):593-9. doi: 10.1002/dvdy.10341.
867. Belcourt DR, Okawara Y, Fryer JN, Bennett HP. Immunocytochemical localization of granulin-1 to mononuclear phagocytic cells of the teleost fish Cyprinus carpio and Carassius auratus. J Leukoc Biol. 1995 Jan;57(1):94-100. doi: 10.1002/jlb.57.1.94.

868. Ong CH, He Z, Kriazhev L, Shan X, Palfree RG, Bateman A. Regulation of progranulin expression in myeloid cells. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 Dec;291(6):R1602-12. doi: 10.1152/ajpregu.00616.2005.
869. Taggart C, Coakley RJ, Greally P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Jan;278(1):L33-41. Doi: 10.1152/ajplung.2000.278.1.L33.
870. Hu Y, Xiao H, Shi T, Oppenheim JJ, Chen X. Progranulin promotes tumour necrosis factor-induced proliferation of suppressive mouse $CD4^+$ $Foxp3^+$ regulatory T cells. Immunology. 2014 Jun;142(2):193-201. doi: 10.1111/imm.12241.
871. Sleegers K, Brouwers N, Van Damme P, Engelborghs S, Gijselinck I, van der Zee J, Peeters K, Mattheijssens M, Cruts M, Vandenberghe R, De Deyn PP, Robberecht W, Van Broeckhoven C. Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. Ann Neurol. 2009 May;65(5):603-9. doi: 10.1002/ana.21621.
872. Nicholson AM, Finch NA, Thomas CS, Wojtas A, Rutherford NJ, Mielke MM, Roberts RO, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Rademakers R. Progranulin protein levels are differently regulated in plasma and CSF. Neurology. 2014 May 27;82(21):1871-8. doi: 10.1212/WNL.0000000000000445.
873. Thurner L, Preuss KD, Fadle N, Regitz E, Klemm P, Zaks M, Kemele M, Hasenfus A, Csernok E, Gross WL, Pasquali JL, Martin T, Bohle RM, Pfreundschuh M. Progranulin antibodies in autoimmune diseases. J Autoimmun. 2013 May;42:29-38. doi: 10.1016/j.jaut.2012.10.003.
874. Deloffre L, Sautiere PE, Sautiere P, Cocquerelle C, Andries, JC. Mise en évidence d'une molécule apparentée aux granulines chez un invertébré marin, Hediste diversicolor. Bull. Soc. zool. Fr., 1999, 124(4):337-346.
875. Petkau TL, Neal SJ, Orban PC, MacDonald JL, Hill AM, Lu G, Feldman HH, Mackenzie IR, Leavitt BR. Progranulin expression in the developing and adult murine brain. J Comp Neurol. 2010 Oct 1;518(19):3931-47. doi: 10.1002/cne.22430.
876. Nedachi T, Kawai T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Progranulin enhances neural progenitor cell proliferation through glycogen synthase kinase 3β phosphorylation. Neuroscience. 2011 Jun 30;185:106-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.037.
877. Petkau TL, Kosior N, de Asis K, Connolly C, Leavitt BR. Selective depletion of microglial progranulin in mice is not sufficient to cause neuronal ceroid lipofuscinosis or neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2017 Nov 17;14(1):225. doi: 10.1186/s12974-017-1000-9.
878. Suh HS, Gelman BB, Lee SC. Potential roles of microglial cell progranulin in HIV-associated CNS pathologies and neurocognitive impairment. J Neuroimmune Pharmacol. 2014 Mar;9(2):117-32. doi: 10.1007/s11481-013-9495-z.
879. Petkau TL, Blanco J, Leavitt BR. Conditional loss of progranulin in neurons is not sufficient to cause neuronal ceroid lipofuscinosis-like neuropathology in mice. Neurobiol Dis. 2017 Oct;106:14-22. doi: 10.1016/j.nbd.2017.06.012.
880. Ryan CL, Baranowski DC, Chitramuthu BP, Malik S, Li Z, Cao M, Minotti S, Durham HD, Kay DG, Shaw CA, Bennett HP, Bateman A. Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. BMC Neurosci. 2009 Oct 27;10:130. doi: 10.1186/1471-2202-10-130.
881. Matsuwaki T, Asakura R, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Age-dependent changes in progranulin expression in the mouse brain. J Reprod Dev. 2011 Feb;57(1):113-9. doi: 10.1262/jrd.10-116S.
882. Petoukhov E, Fernando S, Mills F, Shivji F, Hunter D, Krieger C, Silverman MA, Bamji SX. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. J Cell Sci. 2013 Dec 1;126(Pt 23):5412-21. doi: 10.1242/jcs.132076.
883. Townley RA, Boeve BF, Benarroch EE. Progranulin: Functions and neurologic correlations. Neurology. 2018 Jan 16;90(3):118-125. doi: 10.1212/WNL.0000000000004840.

884. Morenas-Rodríguez E, Cervera-Carles L, Vilaplana E, Alcolea D, Carmona-Iragui M, Dols-Icardo O, Ribosa-Nogué R, Muñoz-Llahuna L, Sala I, Belén Sánchez-Saudinós M, Blesa R, Clarimón J, Fortea J, Lleó A. Progranulin Protein Levels in Cerebrospinal Fluid in Primary Neurodegenerative Dementias. J Alzheimers Dis. 2016;50(2):539-46. doi: 10.3233/JAD-150746.
885. Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Hobert MA, Jansen IE, Metzger FG, Heutink P, Gasser T, Maetzler W, Blauwendraat C, Synofzik M. Cerebrospinal Fluid Progranulin, but Not Serum Progranulin, Is Reduced in GRN-Negative Frontotemporal Dementia. Neurodegener Dis. 2017;17(2-3):83-88. doi: 10.1159/000448896.
886. Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Dubois E, Hobert MA, Müller vom Hagen J, Krüger S, Biskup S, Blauwendraat C, Hruscha M, Kaeser SA, Heutink P, Maetzler W, Synofzik M. Serum Levels of Progranulin Do Not Reflect Cerebrospinal Fluid Levels in Neurodegenerative Disease. Curr Alzheimer Res. 2016;13(6):654-62. doi: 10.2174/1567205013666160314151247.
887. Suzuki M, Yoshida S, Nishihara M, Takahashi M. Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. Neurosci Lett. 1998 Feb 20;242(3):127-30. doi: 10.1016/S0304-3940(98)00008-1.
888. Chiba S1, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Involvement of granulin in estrogen-induced neurogenesis in the adult rat hippocampus. J Reprod Dev. 2007 Apr;53(2):297-307. doi: 10.1262/jrd.18108.
889. Suzuki M, Lee HC, Kayasuga Y, Chiba S, Nedachi T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis. J Reprod Dev. 2009 Aug;55(4):351-5. doi: 10.1262/jrd.20249.
890. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011 May 26;70(4):687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
891. Ladran I, Tran N, Topol A, Brennand KJ. Neural stem and progenitor cells in health and disease. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2013 Nov-Dec;5(6):701-15. doi: 10.1002/wsbm.1239.
892. Lü L, Luo L, Lu Y, Chen L, Xu J, Guo K. Progranulin expression in neural stem cells and their differentiated cell lineages: an immunocytochemical study. Mol Med Rep. 2013 Nov;8(5):1359-64. doi: 10.3892/mmr.2013.1664.
893. Walsh CE, Hitchcock PF. Progranulin regulates neurogenesis in the developing vertebrate retina. Dev Neurobiol. 2017 Sep;77(9):1114-1129. doi: 10.1002/dneu.22499.
894. Martens LH, Zhang J, Barmada SJ, Zhou P, Kamiya S, Sun B, Min SW, Gan L, Finkbeiner S, Huang EJ, Farese RV Jr. Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. J Clin Invest. 2012 Nov;122(11):3955-9. doi: 10.1172/JCI63113.
895. Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang HY, Shang Y, Oldham MC, Martens LH, Gao F, Coppola G, Sloan SA, Hsieh CL, Kim CC, Bigio EH, Weintraub S, Mesulam MM, Rademakers R, Mackenzie IR, Seeley WW, Karydas A, Miller BL, Borroni B, Ghidoni R, Farese RV Jr, Paz JT, Barres BA, Huang EJ. Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. Cell. 2016 May 5;165(4):921-35. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.001.
896. Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, Yamanouchi K, Hasegawa M, Nishihara M. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. Hum Mol Genet. 2017 Mar 1;26(5):969-988. doi: 10.1093/hmg/ddx011.
897. Xu J, Xilouri M, Bruban J, Shioi J, Shao Z, Papazoglou I, Vekrellis K, Robakis NK. Extracellular progranulin protects cortical neurons from toxic insults by activating survival signaling. Neurobiol Aging. 2011 Dec;32(12):2326.e5-16. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.017.
898. Kovacs GG. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. J Clin Pathol. 2019 Nov;72(11):725-735. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205952.

899. Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A. Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. Brain. 2017 Dec 1;140(12):3081-3104. doi: 10.1093/brain/awx198.
900. Karch CM, Ezerskiy L, Redaelli V, Giovagnoli AR, Tiraboschi P, Pelliccioni G, Pelliccioni P, Kapetis D, D'Amato I, Piccoli E, Ferretti MG, Tagliavini F, Rossi G. Missense mutations in progranulin gene associated with frontotemporal lobar degeneration: study of pathogenetic features. Neurobiol Aging. 2016 Feb;38:215.e1-215.e12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.029.
901. Yu CE, Bird TD, Bekris LM, Montine TJ, Leverenz JB, Steinbart E, Galloway NM, Feldman H, Woltjer R, Miller CA, Wood EM, Grossman M, McCluskey L, Clark CM, Neumann M, Danek A, Galasko DR, Arnold SE, Chen-Plotkin A, Karydas A, Miller BL, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD, Van Deerlin VM. The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. Arch Neurol. 2010 Feb;67(2):161-70. doi: 10.1001/archneurol.2009.328.
902. Nicholson AM, Finch NA, Rademakers R. Human genetics as a tool to identify progranulin regulators. J Mol Neurosci. 2011 Nov;45(3):532-7. doi: 10.1007/s12031-011-9554-y.
903. Antonell A, Gil S, Sánchez-Valle R, Balasa M, Bosch B, Prat MC, Chiollaz AC, Fernández M, Yagüe J, Molinuevo JL, Lladó A. Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease: detection of GRN mutations in a Spanish cohort. J Alzheimers Dis. 2012;31(3):581-91. doi: 10.3233/JAD-2012-112120.
904. Davion S, Johnson N, Weintraub S, Mesulam MM, Engberg A, Mishra M, Baker M, Adamson J, Hutton M, Rademakers R, Bigio EH. Clinicopathologic correlation in PGRN mutations. Neurology. 2007 Sep 11;69(11):1113-21. doi: 10.1212/01.wnl.0000267701.58488.69.
905. Josephs KA, Ahmed Z, Katsuse O, Parisi JF, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Davies P, Duara R, Graff-Radford NR, Uitti RJ, Rademakers R, Adamson J, Baker M, Hutton ML, Dickson DW. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (PGRN) mutations. J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Feb;66(2):142-51. doi: 10.1097/nen.0b013e31803020cf.
906. Snowden JS, Pickering-Brown SM, Mackenzie IR, Richardson AM, Varma A, Neary D, Mann DM. Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. Brain. 2006 Nov;129(Pt 11):3091-102. doi: 10.1093/brain/awl267.
907. Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, Dwosh E, Gass J, Cannon A, Rademakers R, Hutton M, Feldman HH. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. Brain. 2006 Nov;129(Pt 11):3081-90. doi: 10.1093/brain/awl271.
908. Tapia L, Milnerwood A, Guo A, Mills F, Yoshida E, Vasuta C, Mackenzie IR, Raymond L, Cynader M, Jia W, Bamji SX. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. J Neurosci. 2011 Aug 3;31(31):11126-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6244-10.2011.
909. Xu HM, Tan L, Wan Y, Tan MS, Zhang W, Zheng ZJ, Kong LL, Wang ZX, Jiang T, Tan L, Yu JT. PGRN Is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease: a Case-Control Replication Study and Meta-analysis. Mol Neurobiol. 2017 Mar;54(2):1187-1195. doi: 10.1007/s12035-016-9698-4.
910. Fenoglio C, Galimberti D, Cortini F, Kauwe JS, Cruchaga C, Venturelli E, Villa C, Serpente M, Scalabrini D, Mayo K, Piccio LM, Clerici F, Albani D, Mariani C, Forloni G, Bresolin N, Goate AM, Scarpini E. Rs5848 variant influences GRN mRNA levels in brain and peripheral mononuclear cells in patients with Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2009;18(3):603-12. doi: 10.3233/JAD-2009-1170.

911. Mateo I, González-Aramburu I, Pozueta A, Vázquez-Higuera JL, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Juan P, Calero M, Dobato JL, Infante J, Berciano J, Combarros O. Reduced serum progranulin level might be associated with Parkinson's disease risk. Eur J Neurol. 2013 Dec;20(12):1571-3. doi: 10.1111/ene.12090.
912. Chen Y, Cao B, Ou R, Chen X, Zhao B, Wei Q, Wu Y, Shang HF. Association analysis of the GRN rs5848 and MAPT rs242557 polymorphisms in Parkinson's disease and multiple system atrophy: a large-scale population-based study and meta-analysis. Int J Neurosci. 2016 Oct;126(10):947-54. doi: 10.3109/00207454.2015.1086345.
913. Ghidoni R, Paterlini A, Albertini V, Binetti G, Benussi L. Losing protein in the brain: the case of progranulin. Brain Res. 2012 Oct 2;1476:172-82. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.075.
914. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995.
915. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
916. MacArthur Clark J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. Br J Nutr. 2018 Aug;120(s1):S1-S7. doi: 10.1017/S0007114517002227.
917. Fornari RV, Wichmann R, Atsak P, Atucha E, Barsegyan A, Beldjoud H, Messanvi F, Thuring CM, Roozendaal B. Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. J Vis Exp. 2012 Jan 30;(59):e3528. doi: 10.3791/3528.
918. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Neurodegeneration. 1995 Sep;4(3):257-69. doi: 10.1016/1055-8330(95)90015-2.
919. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2012 Jan;18 Suppl 1:S183-5. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70057-8.
920. Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. J Neurosci Methods. 1995 Mar;57(1):93-9. doi: 10.1016/0165-0270(94)00132-z.
921. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
922. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
923. Huddleston DE, Langley J, Sedlacik J, Boelmans K, Factor SA, Hu XP. In vivo detection of lateral-ventral tier nigral degeneration in Parkinson's disease. Hum Brain Mapp. 2017 May;38(5):2627-2634. doi: 10.1002/hbm.23547.
924. Fasano M, Giraudo S, Coha S, Bergamasco B, Lopiano L. Residual substantia nigra neuromelanin in Parkinson's disease is cross-linked to alpha-synuclein. Neurochem Int. 2003 Jun;42(7):603-6. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00161-4.
925. Mizuno Y, Hattori N, Matsumine H. Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease. J Neurochem. 1998 Sep;71(3):893-902. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71030893.x.
926. Alexander GE. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. Dialogues Clin Neurosci. 2004 Sep;6(3):259-80. doi: 10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander.

927. Çınar E, Tel BC, Şahin G. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and its Treatment Opportunities. Balkan Med J. 2022 Sep 9;39(5):318-333. doi: 10.4274/balkanmedj.galenos.2022.2022-7-100.
928. Lee Y, Lee S, Chang SC, Lee J. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. Arch Pharm Res. 2019 May;42(5):416-425. doi: 10.1007/s12272-019-01133-0.
929. Kim R, Kim HJ, Kim A, Jang M, Kim A, Kim Y, Yoo D, Im JH, Choi JH, Jeon B. Peripheral blood inflammatory markers in early Parkinson's disease. J Clin Neurosci. 2018 Dec;58:30-33. doi: 10.1016/j.jocn.2018.10.079.
930. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. Eur J Neurosci. 2002 Mar;15(6):991-8. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01938.x.
931. Le W, Wu J, Tang Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. Front Mol Neurosci. 2016 Sep 21;9:89. doi: 10.3389/fnmol.2016.00089.
932. Castillo-Rangel C, Marin G, Hernández-Contreras KA, Vichi-Ramírez MM, Zarate-Calderon C, Torres-Pineda O, Diaz-Chiguer DL, De la Mora González D, Gómez Apo E, Teco-Cortes JA, Santos-Paez FM, Coello-Torres MLÁ, Baldoncini M, Reyes Soto G, Aranda-Abreu GE, García LI. Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Gene to Clinic: A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2023 Mar 17;24(6):5792. doi: 10.3390/ijms24065792.
933. Yang L, Mao K, Yu H, Chen J. Neuroinflammatory Responses and Parkinson' Disease: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Targets. J Neuroimmune Pharmacol. 2020 Dec;15(4):830-837. doi: 10.1007/s11481-020-09926-7.
934. Faraji AH, Rajendran S, Jaquins-Gerstl AS, Hayes HJ, Richardson RM. Convection-Enhanced Delivery and Principles of Extracellular Transport in the Brain. World Neurosurg. 2021 Jul;151:163-171. doi: 10.1016/j.wneu.2021.05.050.
935. Sidorova YA, Volcho KP, Salakhutdinov NF. Neuroregeneration in Parkinson's Disease: From Proteins to Small Molecules. Curr Neuropharmacol. 2019;17(3):268-287. doi: 10.2174/1570159X16666180905094123.
936. Petkau TL, Life B, Lu G, Yang J, Fornes O, Wasserman W, Simpson EM, Leavitt BR. Human progranulin-expressing mice as a novel tool for the development of progranulin-modulating therapeutics. Neurobiol Dis. 2021 Jun;153:105314. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105314.
937. Huang M, Modeste E, Dammer E, Merino P, Taylor G, Duong DM, Deng Q, Holler CJ, Gearing M, Dickson D, Seyfried NT, Kukar T. Network analysis of the progranulin-deficient mouse brain proteome reveals pathogenic mechanisms shared in human frontotemporal dementia caused by GRN mutations. Acta Neuropathol Commun. 2020 Oct 7;8(1):163. doi: 10.1186/s40478-020-01037-x.
938. Bateman A, Cheung ST, Bennett HPJ. A Brief Overview of Progranulin in Health and Disease. Methods Mol Biol. 2018;1806:3-15. doi: 10.1007/978-1-4939-8559-3_1.
939. Chitramuthu BP, Campos-García VR, Bateman A. Multiple Molecular Pathways Are Influenced by Progranulin in a Neuronal Cell Model-A Parallel Omics Approach. Front Neurosci. 2022 Jan 6;15:775391. doi: 10.3389/fnins.2021.775391.
940. Lan YJ, Sam NB, Cheng MH, Pan HF, Gao J. Progranulin as a Potential Therapeutic Target in Immune-Mediated Diseases. J Inflamm Res. 2021 Dec 4;14:6543-6556. doi: 10.2147/JIR.S339254.
941. Ding H, Wei J, Zhao Y, Liu Y, Liu L, Cheng L. Progranulin derived engineered protein Atsttrin suppresses TNF-α-mediated inflammation in intervertebral disc degenerative disease. Oncotarget. 2017 Nov 29;8(65):109692-109702. doi: 10.18632/oncotarget.22766.
942. Hettinghouse A, Fu W, Liu CJ. Monitoring Atsttrin-Mediated Inhibition of TNFα/NF-κβ Activation Through In Vivo Bioluminescence Imaging. Methods Mol Biol. 2021;2248:201-210. doi: 10.1007/978-1-0716-1130-2_14.

943. Sundström E, Fredriksson A, Archer T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. Brain Res. 1990 Oct 1;528(2):181-8. doi: 10.1016/0006-8993(90)91656-2..
944. Lai Y, Yu XP, Zhang Y, Tian Q, Song H, Mucignat MT, Perris R, Samuels J, Krasnokutsky S, Attur M, Greenberg JD, Abramson SB, Di Cesare PE, Liu CJ. Enhanced COMP catabolism detected in serum of patients with arthritis and animal disease models through a novel capture ELISA. Osteoarthritis Cartilage. 2012 Aug;20(8):854-62. doi: 10.1016/j.joca.2012.05.003.
945. Wei JL, Fu W, Ding YJ, Hettinghouse A, Lendhey M, Schwarzkopf R, Kennedy OD, Liu CJ. Progranulin derivative Atsttrin protects against early osteoarthritis in mouse and rat models. Arthritis Res Ther. 2017 Dec 19;19(1):280. doi: 10.1186/s13075-017-1485-8.
946. Liu L, Qu Y, Liu Y, Zhao H, Ma HC, Noor AF, Ji CJ, Nie L, Si M, Cheng L. Atsttrin reduces lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by inhibiting the nuclear factor kappa B signaling pathway. Neural Regen Res. 2019 Nov;14(11):1994-2002. doi: 10.4103/1673-5374.259623.
947. Wang C, Zhang L, Ndong JC, Hettinghouse A, Sun G, Chen C, Zhang C, Liu R, Liu CJ. Progranulin deficiency exacerbates spinal cord injury by promoting neuroinflammation and cell apoptosis in mice. J Neuroinflammation. 2019 Nov 27;16(1):238. doi: 10.1186/s12974-019-1630-1.
948. Hettinghouse A, Fu W, Liu CJ. Monitoring Atsttrin-Mediated Inhibition of TNFα/NF-κβ Activation Through In Vivo Bioluminescence Imaging. Methods Mol Biol. 2021;2248:201-210. doi: 10.1007/978-1-0716-1130-2_14.
949. Wang S, Sun G, Fan P, Huang L, Chen Y, Chen C. Distinctive roles of tumor necrosis factor receptor type 1 and type 2 in a mouse disc degeneration model. J Orthop Translat. 2021 Dec 3;31:62-72. doi: 10.1016/j.jot.2021.11.003.
950. Katyal P, Hettinghouse A, Meleties M, Hasan S, Chen C, Cui M, Sun G, Menon R, Lin B, Regatte R, Montclare JK, Liu CJ. Injectable recombinant block polymer gel for sustained delivery of therapeutic protein in post traumatic osteoarthritis. Biomaterials. 2022 Feb;281:121370. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121370.
951. Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Dec 1;2(12):a009621. doi: 10.1101/cshperspect.a009621.
952. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdorj A, Genua M, Sanvito F, Ponzoni M, Doglioni C, Cristofori P, Traversari C, Bordignon C, Ciceri F, Ostuni R, Bonini C, Casucci M, Bondanza A. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. Nat Med. 2018 Jun;24(6):739-748. doi: 10.1038/s41591-018-0036-4.
953. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch Biochem Biophys. 2011 Apr 1;508(1):1-12. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
954. Keillor JW, Johnson GVW. Transglutaminase 2 as a therapeutic target for neurological conditions. Expert Opin Ther Targets. 2021 Sep;25(9):721-731. doi: 10.1080/14728222.2021.1989410.
955. Vroon A, Drukarch B, Bol JG, Cras P, Brevé JJ, Allan SM, Relton JK, Hoogland PV, Van Dam AM. Neuroinflammation in Parkinson's patients and MPTP-treated mice is not restricted to the nigrostriatal system: microgliosis and differential expression of interleukin-1 receptors in the olfactory bulb. Exp Gerontol. 2007 Aug;42(8):762-71. doi: 10.1016/j.exger.2007.04.010.
956. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med. 1999 Dec;5(12):1403-9. doi: 10.1038/70978.

957. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl. 2000;(60):277-90. doi: 10.1007/978-3-7091-6301-6_19.
958. Hong GU, Cho JW, Kim SY, Shin JH, Ro JY. Inflammatory mediators resulting from transglutaminase 2 expressed in mast cells contribute to the development of Parkinson's disease in a mouse model. Toxicol Appl Pharmacol. 2018 Nov 1;358:10-22. doi: 10.1016/j.taap.2018.09.003.
959. Zhang PL, Chen Y, Zhang CH, Wang YX, Fernandez-Funez P. Genetics of Parkinson's disease and related disorders. J Med Genet. 2018 Feb;55(2):73-80. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105047.
960. Costa G, Frau L, Wardas J, Pinna A, Plumitallo A, Morelli M. MPTP-induced dopamine neuron degeneration and glia activation is potentiated in MDMA-pretreated mice. Mov Disord. 2013 Dec;28(14):1957-65. doi: 10.1002/mds.25646.
961. Löschmann PA, Lange KW, Wachtel H, Turski L. MPTP-induced degeneration: interference with glutamatergic toxicity. J Neural Transm Suppl. 1994;43:133-43.
962. Trujillo P, Song AK, Hay KR, Aumann M, Yan Y, Kang H, Donahue MJ, Claassen DO. Dopamine-induced changes to thalamic GABA concentration in impulsive Parkinson disease patients. NPJ Parkinsons Dis. 2022 Apr 5;8(1):37. doi: 10.1038/s41531-022-00298-8.
963. González-Rodríguez M, Ait Edjoudi D, Cordero Barreal A, Ruiz-Fernández C, Farrag M, González-Rodríguez B, Lago F, Capuozzo M, Gonzalez-Gay MA, Mera Varela A, Pino J, Farrag Y, Gualillo O. Progranulin in Musculoskeletal Inflammatory and Degenerative Disorders, Focus on Rheumatoid Arthritis, Lupus and Intervertebral Disc Disease: A Systematic Review. Pharmaceuticals (Basel). 2022 Dec 12;15(12):1544. doi: 10.3390/ph15121544.
964. Bartus RT, Baumann TL, Siffert J, Herzog CD, Alterman R, Boulis N, Turner DA, Stacy M, Lang AE, Lozano AM, Olanow CW. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. Neurology. 2013 Apr 30;80(18):1698-701. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182904faa.
965. Hewett SJ, Jackman NA, Claycomb RJ. Interleukin-1β in Central Nervous System Injury and Repair. Eur J Neurodegener Dis. 2012 Aug;1(2):195-211.
966. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2002 Jun 21;326(1):67-9. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00300-2.
967. Lofrumento DD, Saponaro C, Cianciulli A, De Nuccio F, Mitolo V, Nicolardi G, Panaro MA. MPTP-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. Neuroimmunomodulation. 2011;18(2):79-88. doi: 10.1159/000320027.
968. Pott Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. Brain. 2008 Jul;131(Pt 7):1880-94. doi: 10.1093/brain/awn101.
969. Lee E, Hwang I, Park S, Hong S, Hwang B, Cho Y, Son J, Yu JW. MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration. Cell Death Differ. 2019 Jan;26(2):213-228. doi: 10.1038/s41418-018-0124-5.
970. Gopinath A, Mackie PM, Phan LT, Tansey MG, Khoshbouei H. The complex role of inflammation and gliotransmitters in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2023 Jan;176:105940. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105940.
971. Nguyen AD, Nguyen TA, Martens LH, Mitic LL, Farese RV Jr. Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. Trends Endocrinol Metab. 2013 Dec;24(12):597-606. doi: 10.1016/j.tem.2013.08.003.
972. Tweedie D, Sambamurti K, Greig NH. TNF-alpha inhibition as a treatment strategy for neurodegenerative disorders: new drug candidates and targets. Curr Alzheimer Res. 2007 Sep;4(4):378-85. doi: 10.2174/156720507781788873.

973. Çomoğlu SS, Güven H, Acar M, Öztürk G, Koçer B. Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2013 Oct 11;553:63-7. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.019.
974. Wang L, Yi H, Liang X, Xu F, Li T, Yang X, Wei M, Ou Z, Tong Q. Plasma TNF-α and phosphorylated α-syn are associated with fatigue in patients with Parkinson's disease. J Neuroimmunol. 2023 Dec 15;385:578222. doi: 10.1016/j.jneuroim.2023.578222.
975. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. J Neurochem. 2004 May;89(4):822-33. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02399.x.
976. Peter I, Dubinsky M, Bressman S, Park A, Lu C, Chen N, Wang A. Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. JAMA Neurol. 2018 Aug 1;75(8):939-946. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.0605.
977. Spittau B, Zhou X, Ming M, Krieglstein K. IL6 protects MN9D cells and midbrain dopaminergic neurons from MPP+-induced neurodegeneration. Neuromolecular Med. 2012 Dec;14(4):317-27. doi: 10.1007/s12017-012-8189-7.
978. Diaz K, Kohut ML, Russell DW, Stegemöller EL. Peripheral inflammatory cytokines and motor symptoms in persons with Parkinson's disease. Brain Behav Immun Health. 2022 Mar 7;21:100442. doi: 10.1016/j.bbih.2022.100442.
979. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. Neuroscience. 1991;40(2):445-52. doi: 10.1016/0306-4522(91)90132-8.
980. Bolin LM, Strycharska-Orczyk I, Murray R, Langston JW, Di Monte D. Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. J Neurochem. 2002 Oct;83(1):167-75. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01131.x.
981. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 19;93(6):2317-21. doi: 10.1073/pnas.93.6.2317.
982. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. J Neuropathol Exp Neurol. 2004 Sep;63(9):901-10. doi: 10.1093/jnen/63.9.901.
983. López DE, Ballaz SJ. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. Mol Neurobiol. 2020 Dec;57(12):5167-5176. doi: 10.1007/s12035-020-02087-x.
984. Sánchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell AL, Isacson O. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. J Neuroinflammation. 2004 May 17;1(1):6. doi: 10.1186/1742-2094-1-6.
985. Teismann P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. Biofactors. 2012 Nov-Dec;38(6):395-7. doi: 10.1002/biof.1035.
986. Hellstrand M, Eriksson E, Nilsson CL. Dopamine D(2) receptor-induced COX-2-mediated production of prostaglandin E(2) in D(2)-transfected Chinese hamster ovary cells without simultaneous administration of a Ca(2+)-mobilizing agent. Biochem Pharmacol. 2002 Jun 15;63(12):2151-8. doi: 10.1016/s0006-2952(02)01020-1.
987. Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? Acta Neurol Scand Suppl. 1989;126:47-54. doi: 10.1111/j.1600-0404.1989.tb01782.x.
988. Gerlach M, Double KL, Youdim MB, Riederer P. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. J Neural Transm Suppl. 2006;(70):133-42. doi: 10.1007/978-3-211-45295-0_21.

989. Sadasivan S, Pond BB, Pani AK, Qu C, Jiao Y, Smeyne RJ. Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. PLoS One. 2012;7(3):e33693. doi: 10.1371/journal.pone.0033693.
990. Mosca L, Lendaro E, d'Erme M, Marcellini S, Moretti S, Rosei MA. 5-S-Cysteinyl-dopamine effect on the human dopaminergic neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Neurochem Int. 2006 Aug;49(3):262-9. doi: 10.1016/j.neuint.2006.01.023.
991. Viengkhou B, Hofer MJ. Breaking down the cellular responses to type I interferon neurotoxicity in the brain. Front Immunol. 2023 Feb 3;14:1110593. doi: 10.3389/fimmu.2023.1110593.
992. Barcia C, Ros CM, Annese V, Gómez A, Ros-Bernal F, Aguado-Yera D, Martínez-Pagán ME, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT. IFN-γ signaling, with the synergistic contribution of TNF-α, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. Cell Death Dis. 2011 Apr 7;2(4):e142. doi: 10.1038/cddis.2011.17.
993. Hindinger C, Bergmann CC, Hinton DR, Phares TW, Parra GI, Hussain S, Savarin C, Atkinson RD, Stohlman SA. IFN-γ signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. PLoS One. 2012;7(7):e42088. doi: 10.1371/journal.pone.0042088.
994. de Bilbao F, Arsenijevic D, Moll T, Garcia-Gabay I, Vallet P, Langhans W, Giannakopoulos P. In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice. J Neurochem. 2009 Jul;110(1):12-22. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06098.x.
995. Schwenkgrub J, Joniec-Maciejak I, Sznejder-Pachołek A, Wawer A, Ciesielska A, Bankiewicz K, Członkowska A, Członkowski A. Effect of human interleukin-10 on the expression of nitric oxide synthases in the MPTP-based model of Parkinson's disease. Pharmacol Rep. 2013;65(1):44-9. doi: 10.1016/s1734-1140(13)70962-9.
996. Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF-κB pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. Cell Signal. 2011 Feb;23(2):425-35. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.10.017.
997. Huang CJ, Stevens BR, Nielsen RB, Slovin PN, Fang X, Nelson DR, Skimming JW. Interleukin-10 inhibition of nitric oxide biosynthesis involves suppression of CAT-2 transcription. Nitric Oxide. 2002 Feb;6(1):79-84. doi: 10.1006/niox.2001.0402.
998. León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. Mol Pharmacol. 2000 Nov;58(5):967-75. doi: 10.1124/mol.58.5.967.
999. Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. Glia. 2014 Aug;62(8):1227-40. doi: 10.1002/glia.22675.
1000. Tesseur I, Wyss-Coray T. A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. Curr Alzheimer Res. 2006 Dec;3(5):505-13. doi: 10.2174/156720506779025297.
1001. Sánchez-Capelo A, Colin P, Guibert B, Biguet NF, Mallet J. Transforming growth factor beta1 overexpression in the nigrostriatal system increases the dopaminergic deficit of MPTP mice. Mol Cell Neurosci. 2003 Aug;23(4):614-25. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00081-2.
1002. Sarkar DK, Chaturvedi K, Oomizu S, Boyadjieva NI, Chen CP. Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)-beta1, and TGF-beta type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. Endocrinology. 2005 Oct;146(10):4179-88. doi: 10.1210/en.2005-0430.
1003. Yaman I, Ağaç Çobanoğlu D, Xie T, Ye Y, Amit M. Advances in understanding cancer-associated neurogenesis and its implications on the neuroimmune axis in cancer. Pharmacol Ther. 2022 Nov;239:108199. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108199.

1004. Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. Neuroreport. 1999 Feb 25;10(3):557-61. doi: 10.1097/00001756-199902250-00021.
1005. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2020 Feb 10;21(3):1170. doi: 10.3390/ijms21031170.
1006. Fulmer CG, VonDran MW, Stillman AA, Huang Y, Hempstead BL, Dreyfus CF. Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. J Neurosci. 2014 Jun 11;34(24):8186-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014.
1007. Fujimori H, Ohba T, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. The Involvement of Progranulin for α-Synuclein Reduction through Autolysosome Formation. Biol Pharm Bull. 2023;46(8):1032-1040. doi: 10.1248/bpb.b22-00711.
1008. Grosso H, Woo JM, Lee KW, Im JY, Masliah E, Junn E, Mouradian MM. Transglutaminase 2 exacerbates α-synuclein toxicity in mice and yeast. FASEB J. 2014 Oct;28(10):4280-91. doi: 10.1096/fj.14-251413.
1009. Van Kampen JM, Baranowski D, Kay DG. Progranulin gene delivery protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. PLoS One. 2014 May 7;9(5):e97032. doi: 10.1371/journal.pone.0097032.
1010. Nakajima A, Yamada K, Nagai T, Uchiyama T, Miyamoto Y, Mamiya T, He J, Nitta A, Mizuno M, Tran MH, Seto A, Yoshimura M, Kitaichi K, Hasegawa T, Saito K, Yamada Y, Seishima M, Sekikawa K, Kim HC, Nabeshima T. Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity. J Neurosci. 2004 Mar 3;24(9):2212-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4847-03.2004.
1011. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. J Neurosci. 2006 Sep 13;26(37):9365-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1504-06.2006.
1012. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. J Neural Transm (Vienna). 2000;107(3):335-41. doi: 10.1007/s007020050028.
1013. Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. Prog Neurobiol. 2007 Dec;83(6):363-74. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.07.008. PMC2190541.
1014. Clark IA, Vissel B. Broader Insights into Understanding Tumor Necrosis Factor and Neurodegenerative Disease Pathogenesis Infer New Therapeutic Approaches. J Alzheimers Dis. 2021;79(3):931-948. doi: 10.3233/JAD-201186.
1015. Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. Front Cell Dev Biol. 2020 May 21;8:365. doi: 10.3389/fcell.2020.00365.
1016. Yli-Karjanmaa M, Larsen KS, Fenger CD, Kristensen LK, Martin NA, Jensen PT, Breton A, Nathanson L, Nielsen PV, Lund MC, Carlsen SL, Gramsbergen JB, Finsen B, Stubbe J, Frich LH, Stolp H, Brambilla R, Anthony DC, Meyer M, Lambertsen KL. TNF deficiency causes alterations in the spatial organization of neurogenic zones and alters the number of microglia and neurons in the cerebral cortex. Brain Behav Immun. 2019 Nov;82:279-297. doi: 10.1016/j.bbi.2019.08.195.
1017. Jensen KL, Runegaard AH, Weikop P, Gether U, Rickhag M. Assessment of Dopaminergic Homeostasis in Mice by Use of High-performance Liquid Chromatography Analysis and Synaptosomal Dopamine Uptake. J Vis Exp. 2017 Sep 21;(127):56093. doi: 10.3791/56093.
1018. Benarroch EE. Locus coeruleus. Cell Tissue Res. 2018 Jul;373(1):221-232. doi: 10.1007/s00441-017-2649-1.

1019. Hou L, Sun F, Sun W, Zhang L, Wang Q. Lesion of the Locus Coeruleus Damages Learning and Memory Performance in Paraquat and Maneb-induced Mouse Parkinson's Disease Model. Neuroscience. 2019 Nov 1;419:129-140. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.09.006.
1020. Devoto P, Flore G, Saba P, Fà M, Gessa GL. Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. J Neurochem. 2005 Jan;92(2):368-74. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02866.x.
1021. Alberico SL, Cassell MD, Narayanan NS. The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. Basal Ganglia. 2015 Aug 1;5(2-3):51-55. doi: 10.1016/j.baga.2015.06.001.
1022. Steinbusch HWM, Dolatkhah MA, Hopkins DA. Anatomical and neurochemical organization of the serotonergic system in the mammalian brain and in particular the involvement of the dorsal raphe nucleus in relation to neurological diseases. Prog Brain Res. 2021;261:41-81. doi: 10.1016/bs.pbr.2021.02.003.
1023. Alex KD, Yavanian GJ, McFarlane HG, Pluto CP, Pehek EA. Modulation of dopamine release by striatal 5-HT2C receptors. Synapse. 2005 Mar 15;55(4):242-51. doi: 10.1002/syn.20109.
1024. De Deurwaerdère P, Lagière M, Bosc M, Navailles S. Multiple controls exerted by 5-HT2C receptors upon basal ganglia function: from physiology to pathophysiology. Exp Brain Res. 2013 Oct;230(4):477-511. doi: 10.1007/s00221-013-3508-2.
1025. Matsuyama S, Nei K, Tanaka C. Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT1A receptors in guinea pig dentate gyrus. Brain Res. 1996 Jul 29;728(2):175-80. doi: 10.1016/0006-8993(96)00395-2.
1026. Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. J Neurol. 2000 Apr;247 Suppl 2:II25-35. doi: 10.1007/pl00007757.
1027. Campanelli F, Natale G, Marino G, Ghiglieri V, Calabresi P. Striatal glutamatergic hyperactivity in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2022 Jun 15;168:105697. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105697.
1028. Calon F, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Di Paolo T. Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2003 Dec;14(3):404-16. doi: 10.1016/j.nbd.2003.07.003.
1029. Wu C, Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. Metab Brain Dis. 2015 Apr;30(2):367-79. doi: 10.1007/s11011-014-9560-1.
1030. Albaugh DL, Huang C, Ye S, Paré JF, Smith Y. Glutamatergic inputs to GABAergic interneurons in the motor thalamus of control and parkinsonian monkeys. Eur J Neurosci. 2021 Apr;53(7):2049-2060. doi: 10.1111/ejn.14763.
1031. Nilsson M, Eriksson PS, Rönnbäck L, Hansson E. GABA induces Ca2+ transients in astrocytes. Neuroscience. 1993 Jun;54(3):605-14. doi: 10.1016/0306-4522(93)90232-5.
1032. Zaichick SV, McGrath KM, Caraveo G. The role of Ca^{2+} signaling in Parkinson's disease. Dis Model Mech. 2017 May 1;10(5):519-535. doi: 10.1242/dmm.028738.
1033. Foehring RC, Zhang XF, Lee JC, Callaway JC. Endogenous calcium buffering capacity of substantia nigral dopamine neurons. J Neurophysiol. 2009 Oct;102(4):2326-33. doi: 10.1152/jn.00038.2009.
1034. Bryson A, Hatch RJ, Zandt BJ, Rossert C, Berkovic SF, Reid CA, Grayden DB, Hill SL, Petrou S. GABA-mediated tonic inhibition differentially modulates gain in functional subtypes of cortical interneurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Feb 11;117(6):3192-3202. doi: 10.1073/pnas.1906369117.
1035. Terkelsen MH, Hvingelby VS, Pavese N. Molecular Imaging of the GABAergic System in Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonisms. Curr Neurol Neurosci Rep. 2022 Dec;22(12):867-879. doi: 10.1007/s11910-022-01245-z.
1036. Figura M, Kuśmierska K, Bucior E, Szlufik S, Koziorowski D, Jamrozik Z, Janik P. Serum amino acid profile in patients with Parkinson's disease. PLoS One. 2018 Jan 29;13(1):e0191670. doi: 10.1371/journal.pone.0191670.

1037. Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Vargas C, Gómez P, Navarro JA, Benito-León J, Ortí-Pareja M, Gasalla T, Cisneros E, Arenas J. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. J Neurol Sci. 1996 Sep 15;141(1-2):39-44. doi: 10.1016/0022-510x(96)00115-3.
1038. Ohtsuki S, Yamaguchi H, Kang YS, Hori S, Terasaki T. Reduction of L-type amino acid transporter 1 mRNA expression in brain capillaries in a mouse model of Parkinson's disease. Biol Pharm Bull. 2010;33(7):1250-2. doi: 10.1248/bpb.33.1250.
1039. Olson KE, Gendelman HE. Immunomodulation as a neuroprotective and therapeutic strategy for Parkinson's disease. Curr Opin Pharmacol. 2016 Feb;26:87-95. doi: 10.1016/j.coph.2015.10.006.
1040. Liu TW, Chen CM, Chang KH. Biomarker of Neuroinflammation in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2022 Apr 8;23(8):4148. doi: 10.3390/ijms23084148.

OPINIA KOMISJI ETYCZNEJ

UCHWAŁA NR WAW2/120/2018

z dnia 25 lipca 2018 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1[1] ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.:"Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurozapalne, neurotransmisji oraz neurodegeneracyjne w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy" z dnia 16 lipca 2018 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, adres: ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Ilonę Joniec-Maciejak[2]

przy udziale[3] -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

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

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe: układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[4]:

Gatunek	Wiek/stadium	Liczba
Mysz domowa (*Mus musculus*), szczep: C57Bl/6J	10-12 miesięcy	290

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Joniec-Maciejak Ilona, Łukasz Poniatowski, Ewa Wojnar, Wawer Adriana, Sznejder-Pachołek Anna.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[5] od 30.07.2018 do 30.07.2022.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[6]: -.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: -.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/~~nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej.

---

[1] Niewłaściwy zapis usunąć
[2] imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia
[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.
[4] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju
[5] Nie dłużej niż 5 lat
[6] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po ocenie wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach.

Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

§ 4

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

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
II Lokalna Komisja Etyczna
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8
tel. 22 59-35822

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA
II Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW
/Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska/

(Podpis przewodniczącego komisji)

Pouczenie:

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

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

Otrzymuje:

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

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

ZAŁĄCZNIKI

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawa, dn. 10-06-2020

Kierownik projektu: lek. Łukasz Poniatowski
Opiekun Projektu: prof. dr hab. n. med. Mirowska-Guzel
Jednostka: Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej

Szanowni Państwo,

uprzejmie informuję, że projekt młodego badacza numer MB/M/29(53) pod tytułem: Analiza stopnia nasilenia procesów neurozapalnych i neurodegeracyjnych po domózgowym podaniu Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsowa wywołanym 1-metylo-4fenylo-1,2,3,6tetrahydropirydyna (MPTP) u myszy

został zakwalifikowany do realizacji w latach 2020-2021.

Na realizację projektu przyznano: 20000 PLN

Numer źródła finansowania: **1M9/M/MB1/N/20**

Dysponentem środków jest: prof. dr hab. n med. Mirowska-Guzel

Szczegółowe zasady realizacji projektu określone są w Regulaminie konkursu Młodych Badaczy. Regulamin dostępny jest na stronach internetowych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, na stronie Rady Dyscypliny Nauk Medycznych https://radydyscyplin.wum.edu.pl/node/1179 oraz na stronach Pionu ds. Nauki i Transferu Technologii http://pnitt.wum.edu.pl/nauka-konkursy.

W sprawie realizacji projektu proszę o kontakt z Działem Nauki aen@wum.edu.pl.

Z gratulacjami,

Przewodniczący Rady
Dyscypliny Nauk Medycznych WUM
prof. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak

ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
tel.: 22 57 20 222, faks: 22 57 20 266
e-mail: radydyscyplin@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

Submit by Email | Print Form

NYU/New York University School of Medicine

MTA Expediting Form for Providing Materials

Please return this form via fax (212-263-8189) and/or email (jill.gold@med.nyu.edu)

NYU/NYUSM Information		Other Institution/Company	
Scientist:	Chuanju Liu	Institution:	Medical University of Warsaw
Department:	Orhtopedic Surgery	Scientist (PI):	Łukasz A. Poniatowski
Email:	Chuanju.Liu@nyumc.org	Address:	Żwirki i Wigury 61 Street
Phone Number:	212-598-2373		02-091 Warsaw, Poland
		Phone:	48221166160
		Fax:	48221166202
		Email:	lukasz.poniatowski@wum.edu.pl

Material(s)

Please provide the name and quantity of the materials to the be sent

Atsttrin, an engineered peptide

Funding Source of Materials

Provider 1: National Institutes of Health
Provider 2: Department of Defense
Provider 3: Atreaon Inc.

1. Will the Material you are sending be used in a collaboration with another Institution or Company?
☒ Yes ☐ No (If yes, please explain)

2. Was the Material developed solely in your lab at NYUSM? ☒ Yes ☐ No
If no, where was it developed and by whom?
List all inventors and their Institution at the time of the invention.

3. Was the Material received under an agreement with a third party, such as a Material Transfer Agreement?
☐ Yes ☒ No
If yes, please explain

4. Did you use any third party technology or material to develop the Material? ☐ Yes ☒ No
If yes, please list provider, technology and material.

5. Is the Material available from any other sources? ☐ Yes ☒ No ☐ Not Sure
If no, list other source(s).

6. Is Material patented, patent pending or copyrighted? ☒ Yes ☐ No ☐ Not Sure

7. Are there any fees involved in the transfer of the Material? ☒ Yes ☐ No
If yes, specify amount and who will pay: supplier

8. What is the likelihood of an invention resulting from research conducted by the Recipient of this Material? Highly Possible ☐ Somewhat Possible ☐ Not Expected ☒
Please describe:

To the best of my knowledge, the above information is true and correct. Furthermore, I agree to abide by the terms and conditions of the resultant Material Transfer Agreement on behalf of NYU/NYUSM.

Signature: Date: 5/30/18

Signature: Łukasz A. Poniatowski Date: 29-06-2018

KIEROWNIK
Katedra i Zakładu Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Centrum Badań Przedklinicznych CePT
dr hab. med. Dagmara Kusiska-Guzel

PROREKTOR
ds. Nauki i Transferu Technologii
prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

GŁÓWNY SPECJALISTA
Dział Nauki
mgr Anna Magiera

Załącznik nr 3 do Procedury Antyplagiatowej
(Stanowiącej załącznik nr 1 do zarządzenia nr 12/2024 Rektora WUM z dnia 12 lutego 2024 r.)

Łukasz Adrian Poniatowski
ul. Wrzeciono 5 m. 26
01-951 Warszawa
tel. +48 512-538-779
e-mail: lukasz.poniatowski@gmail.com

Zgoda na udostępnienie do wglądu rozprawy doktorskiej

Wyrażam zgodę na udostępnienie wersji papierowej i elektronicznej mojej rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurodegeneracyjne i rozwój reakcji zapalnej w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy” do wglądu dla celów badawczych lub poznawczych przez użytkowników biblioteki na terenie czytelni Biblioteki Głównej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w tym za pośrednictwem końcówek systemu informatycznego (terminali).

Jednocześnie oświadczam, że przesłana wersja papierowa mojej rozprawy doktorskiej jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

…….…….. ...……

miejsce i data podpis autora rozprawy doktorskiej