



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

mgr Anna Aleksandra Radlicka

**Molekularne mechanizmy
związane z pozaruchowymi objawami choroby Parkinsona**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

dr hab. Jan Rodriguez Parkitna, prof. IF PAN
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Joanna Pera
Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków, 2022 r.

Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących ze środków statutowych Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, ze środków Środowiskowych Studiów Doktoranckich w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16, „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed oraz z projektu badawczego Preludium 19 „Analiza przestrzenna efektów L-DOPA na ekspresję genów w korze przedczołowej w mysim modelu choroby Parkinsona” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2020/37/N/NZ4/03672).

Dziękuję wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy oraz wszystkich publikacji i badań, jakie miałam okazję wykonać podczas studiów doktoranckich w Instytucie Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk. Dzięki nim zrozumiałam, że nauka jest dyscypliną drużynową, a ze wspieraną drużyną można nie tylko przyczynić się do rozwoju wiedzy, ale i samemu się rozwijać.

Łukasz, Zosiu, Łucjo, Marysiu, Judyto i Klaudio, dziękuję Wam za pomoc przy planowaniu, wykonywaniu i analizie doświadczeń behawioralnych oraz w opiece nad zwierzętami.

Magdo, Sławku, Basiu i Klaudio, dziękuję Wam za wsparcie i doradztwo przy realizacji doświadczeń molekularnych i barwień histologicznych. Szczególnie dziękuję **Magdzie** za niezliczone godziny wspólnie spędzone na poznawaniu i wdrażaniu metodyki profilowania przestrzennego ekspresji genów.

Mateuszu, Marcinie, Gosiu i Michale, dziękuję za Wasz olbrzymi wkład w analizę danych transkryptomicznych w doświadczeniach na mysim i szczurzym modelu choroby Parkinsona.

Julito, dziękuję za Twoje wsparcie w obrazowaniu preparatów.

Lidko, dziękuję za niezastąpioną pomoc przy załatwianiu spraw administracyjno-księgowych.

Serdecznie dziękuję **dr. hab. Grzegorzowi Kreinerowi** oraz **mgr Monice Bagińskiej i dr Katarzynie Rafie-Zabłockiej** za wielką pomoc przy doświadczeniach z modelem TIF-IA^{DATCreERT2}, w szczególności za wyhodowanie myszy oraz za udostępnienie aparatury do pomiarów funkcji ruchowych zwierząt i naukę korzystania z niej.

Dziękuję **dr. hab. Elżbiecie Lorenc-Koci** oraz **mgr Kindze Kamińskiej** za owocną współpracę przy doświadczeniach ze szczurzym modelem choroby Parkinsona.

Dziękuję **prof. dr. hab. Danielowi Wójcikowi** z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz **dr. Michałowi Lenarczykowi** z Uniwersytetu Jagiellońskiego za długotrwałą i wyrozumiałą współpracę przy tworzeniu publikacji.

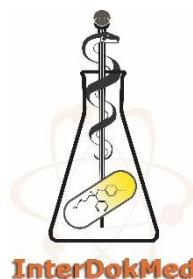
Dziękuję **dr. n. med. Małgorzacie Dec-Ćwiek**, **dr. n. med. Karolinie Porębskiej** oraz **lek. Katarzynie Sawczyńskiej** z Oddziału Klinicznego Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego za wielki wkład w doświadczenie z udziałem pacjentów.

Bardzo dziękuję obojgu Promotorom rozprawy:

dr. hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie, **prof. IF PAN** i **prof. dr. hab. Joannie Perze** za wprowadzenie mnie w świat nauki i za wielowymiarową, cierpliwą pomoc na każdym etapie mojej drogi doktoranckiej.

Specjalne podziękowania kieruję do moich najbliższych:

do **Rodziców**, którzy od mojego dzieciństwa żarliwie wspierali moje dążenia do bycia biologiem, i do **Pawła**, który nie pozwalał mi się poddawać.



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji
Środowiskowych Studiów Doktoranckich
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020,
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Spis treści

STRESZCZENIE	7
ABSTRACT	9
WSTĘP	11
<i>Choroba Parkinsona – definicja i epidemiologia</i>	11
<i>Objawy i diagnoza choroby Parkinsona</i>	13
<i>Przebieg choroby Parkinsona</i>	15
<i>Procesy neurodegeneracyjne w przebiegu choroby Parkinsona</i>	17
<i>Różnorodność fenotypowa choroby Parkinsona</i>	19
<i>Modele zwierzęce choroby Parkinsona</i>	20
<i>Transkryptomika w badaniach nad chorobą Parkinsona</i>	24
CEL PRACY	25
MATERIAŁY I METODY	26
BADANIA Z WYKORZYSTANIEM ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH	28
<i>Zwierzęta</i>	28
<i>Podania L-DOPA</i>	30
<i>Układ doświadczeń behawioralnych</i>	30
<i>Pomiary masy ciała</i>	32
<i>Badanie sposobu poruszania się przy użyciu systemu CatWalk XT</i>	32
<i>Test pręta obrotowego „rotarod”</i>	33
<i>Test instrumentalnego poszukiwania wrażeń</i>	34
<i>Test otwartego pola</i>	35
<i>Test rozpoznawania nowego obiektu</i>	35
<i>Test probabilistycznego przeuczania</i>	36
<i>Test znajdowania zakopanego jedzenia</i>	38
<i>Test preferencji sacharyny</i>	38
<i>Pobranie mózgowia i jego preparatyka</i>	39
<i>Utrwalenie i skrawanie tkanki – doświadczenie I</i>	39
<i>Zamrożenie tkanki – doświadczenie II</i>	39
<i>Barwienia immunofluorescencyjne na obecność hydroksylazy tyrozynowej</i>	40
PROFILOWANIE PRZESTRZENNE EKSPRESJI GENÓW MYSZY METODĄ TRANSKRYPTOMIKI PRZESTRZENNEJ	42
<i>Opis metodyki</i>	42
<i>Barwienie i obrazowanie skrawków</i>	43
<i>Synteza cDNA</i>	43
<i>Konstrukcja bibliotek i ich sekwencjonowanie</i>	44
<i>Izolacja RNA i jego analiza jakościowa</i>	45
<i>Wstępna analiza danych</i>	46
<i>Dopasowanie odczytów do nowej anotacji genomu</i>	46
ANALIZY STATYSTYCZNE	48
<i>Określenie efektów L-DOPA na ekspresję genów metodą transkryptomiki przestrzennej</i>	50
BADANIA Z UDZIAŁEM LUDZI	50
<i>Charakterystyka badanej grupy</i>	50
<i>Wywiad lekarski, ocena funkcji ruchowych i pozaruchowych oraz pobranie krwi</i>	51
BADANIE EKSPRESJI GENÓW WE KRWI OBWODOWEJ PACJENTÓW Z CHOROBA PAKINSONA	53
<i>Izolacja całkowitego RNA</i>	53
<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy</i>	53
<i>Analiza statystyczna danych kwestionariuszowych i poziomu ekspresji genów we krwi ludzkiej</i>	54

WYNIKI	55
DOŚWIADCZENIA PRZEPROWADZANE NA ZWIERZĘTACH	55
<i>Utrata neuronów dopaminergicznych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}</i>	56
<i>Zmiany masy ciała spowodowane postępującą utratą neuronów dopaminergicznych</i>	60
<i>Ocena rozwoju zaburzeń ruchowych u myszy</i>	63
<i>Badanie aktywności ruchowej i lęklivosti myszy w teście otwartego pola</i>	76
<i>Instrumentalne poszukiwanie wrażeń</i>	78
<i>Pamięć krótkotrwała i eksploracja obiektów w klatce</i>	82
<i>Ocena wrażliwości powonienia</i>	83
<i>Preferencja sacharyny u samców</i>	86
<i>Zachowanie samic myszy w teście probabilistycznego przeuczania</i>	87
PROFILOWANIE PRZESTRZENNE EKSPRESJI GENÓW POD WPŁYWEM L-DOPA	92
<i>Charakterystyka uzyskanych próbek</i>	92
<i>Identyfikacja transkryptów i analiza skupień</i>	95
<i>Wpływ L-DOPA na ekspresję genów w poszczególnych strukturach przodomózgowia</i>	100
BADANIA Z UDZIAŁEM LUDZI	107
<i>Efekty przyjmowania L-DOPA i leków przeciwparkinsonowskich na objawy ruchowe i pozaruchowe choroby Parkinsona</i>	107
<i>Wpływ przyjmowania leków dopaminergicznych na poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów</i>	112
DYSKUSJA	115
<i>Fenotyp parkinsonowski i objawy pozaruchowe u myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2}</i>	115
<i>Wpływ L-DOPA na ekspresję genów w przodomózgowiu u myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2}</i>	125
<i>Wpływ odstawienia leków dopaminergicznych na objawy choroby Parkinsona i zmiany w ekspresji genów we krwi</i>	130
WNIOSKI	137
BIBLIOGRAFIA	138
WYKAZ SKRÓTÓW	159
SPIS RYCIN	161
SPIS TABEL	163

STRESZCZENIE

Choroba Parkinsona (PD) to schorzenie neurodegeneracyjne o długim przebiegu i złożonej symptomatologii. Do charakterystycznych objawów ruchowych pozwalających postawić diagnozę PD należą: sztywność mięśniowa, spowolnienie ruchowe i drżenie spoczynkowe, jednak oprócz nich u pacjentów z PD rozwijają się jeszcze inne zaburzenia ruchowe i pozaruchowe. Pozaruchowe objawy PD mogą pojawiać się przed objawami ruchowymi i obejmują zaburzenia regulacji ciśnienia krwi, trawienia pokarmu, funkcjonowania narządów zmysłów (w szczególności powonienia), procesów poznawczych (w tym zaburzenia pamięci i uwagi) oraz zaburzeń afektywnych i lękowych.

W niniejszej pracy podjęłam się zbadania udziału dysfunkcji układu dopaminergicznego w powstawaniu wybranych objawów pozaruchowych PD. Badania zostały przeprowadzone na dwóch poziomach: behawioralnym i transkryptomicznym, zarówno na zwierzęcym modelu PD, jak i z udziałem pacjentów, z uwzględnieniem wpływu utraty neuronów dopaminergicznych oraz z zastosowaniem leczenia zwiększającego ilość dopaminy w mózgu. Doświadczenia z użyciem zwierząt obejmowały ocenę wrażliwości węchu, procesów poznawczych, tendencji do poszukiwania wrażeń i zachowań świadczących o anhedonii u genetycznie modyfikowanych myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2} z postępującą i selektywną utratą neuronów dopaminergicznych. U myszy z mutacją zmierzono efekty 14-dniowych podań L-DOPA na transkryptom poszczególnych struktur przodomózgowia przy pomocy metody analizy przestrzennej ekspresji genów. Nasilenie objawów pozaruchowych u pacjentów zbadano w dwóch punktach czasowych: podczas przyjmowania leków oddziałujących na przewodnictwo dopaminergiczne i po ich odstawieniu. Ponadto, w obu punktach czasowych pobrano krew obwodową i oznaczono poziom ekspresji wybranych genów metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń potwierdzają zróżnicowany udział układu dopaminergicznego w powstawaniu i leczeniu poszczególnych objawów pozaruchowych PD. U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych zaobserwowałam przejściową nadwrażliwość na nagrodę oraz obniżenie masy ciała w zaawansowanym stadium rozwoju fenotypu. Nie zanotowałam natomiast u nich oznak anhedonii, zaburzeń węchu, pamięci ani procesów uczenia się opartego o wykonywanie zadań instrumentalnych, w tym przeuczania. Myszy z upośledzonym przewodnictwem dopaminergicznym wykazywały natomiast przejściową zwiększoną aktywność w testach wymagających odpowiedzi instrumentalnych, co można interpretować jako nadwrażliwość

na nagrodę i nasilenie poszukiwania wrażeń. Efekty chronicznych podań L-DOPA były ograniczone do łagodnych zmian zachowań lękowych, niewielkich zmian w funkcjach ruchowych i obniżeniu preferencji sacharyny u samic. U pacjentów z zaawansowaną PD przyjmowanie leków dopaminergicznych znacząco zmniejszało nasilenie objawów ruchowych, było także korzystne względem funkcji poznawczych i do pewnego stopnia – lęku.

Badania transkryptomyczne wykazały specyficzne efekty L-DOPA wobec podwyższenia poziomu ekspresji genów w poszczególnych strukturach przodomózgowia myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Lek wpłynął znamienne na abundancję transkryptów 20 genów, w tym zaangażowanych w procesy regulacji transkrypcji i rytmy okołodobowe. Zmiany w poziomie ekspresji pod wpływem L-DOPA zidentyfikowano w następujących obszarach: w prążkowie grzbietowym, jądrze półleżącym przegrody, przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym, grzbietowej kory mózgu (warstwy 2/3 do 6b), części kory smakowej i kory gruszkowatej oraz tkance przylegające do komory bocznej mózgu. O ile w mózgowiu efekty leczenia dopaminergicznego u zwierząt z deficytem tego neuroprzekaźnika na transkryptom były wyraźne, wpływ leków dopaminergicznych na ekspresję genów we krwi nie został zaobserwowany. U pacjentów z zaawansowaną PD nie zanotowano różnic w abundancji transkryptów badanych genów we krwi obwodowej podczas stosowania leków i po ich odstawieniu.

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną rolę przekąźnictwa dopaminergicznego w powstawaniu i nasileniu objawów pozaruchowych PD. Znaczenie komponenty dopaminergicznej w mechanizmach związanych z zaburzeniami funkcji poznawczych pokazały wyniki doświadczeń z wykorzystaniem mysiego modelu choroby, jak i z udziałem pacjentów z zaawansowaną PD, jakkolwiek obserwowane zmiany dotyczyły różnych rodzajów zachowań. Wysoce specyficzne działanie L-DOPA względem struktur anatomicznych mózgu i poszczególnych genów pokazało nowe efekty działania tego leku wobec obszarów zaangażowanych w powstawanie ruchowych i pozaruchowych objawów PD, w tym procesów wykonawczych i motywacyjnych. Wyniki pracy wskazują, że u podłoża terapeutycznego lub niepożądanego działania L-DOPA może leżeć jej selektywne działanie na ekspresję genów w strukturach przodomózgowia, lecz aby potwierdzić te obserwacje potrzebne są dalsze badania transkryptomiczne na tkance ludzkiej.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder with complex symptomatology. The hallmark symptoms of PD include muscle rigidity, slowness of movement (bradykinesia) and resting tremors, nevertheless, it should be noted that PD is also associated with several non-motor symptoms. These include altered blood pressure, gastrointestinal dysfunctions, impaired sensory perception (hyposmia or anosmia in particular), cognitive impairments and also affective or anxiety disorders.

Here, I investigate the role of the midbrain dopamine system in the development of selected non-motor PD symptoms. The experiments were performed on two levels: behavioral and gene expression, on samples derived from human PD patients as well as an animal PD model, and taking into account the effects of treatment with L-DOPA. Analyses performed on animals assessed the effects of loss of dopaminergic neurons in genetically modified TIF-IA^{DATCreERT2} mice on olfactory acuity, cognitive functions, novelty seeking-like behaviors and symptoms similar to anhedonia. Mutant mice with advanced loss of dopaminergic neurons were subjected to two-week L-DOPA treatment and the used for spatial analysis of gene expression in the forebrain. In the case of human patients, non-motor PD symptoms were assessed during treatment with drugs affecting dopaminergic transmission and after pharmacotherapy was stopped. Gene expression analyses were performed on blood samples taken at both time-points, and used to assess expression of selected genes by quantitative PCR.

Results of my experiments reveal discrete roles of dopaminergic signaling in the emergence and treatment of non-motor PD symptoms. TIF-IA^{DATCreERT2} mice showed a mild decrease in body mass, as well as a transient increase in reward-driven behaviors in the early stage of dopaminergic degeneration. At the same time, there was no appreciable loss of olfactory acuity, no indication of anhedonia or impaired cognitive impairments in tasks requiring instrumental learning. Mutant mice exhibited temporary increase in activity in instrumental tasks, which suggests reward hypersensitivity and higher sensation seeking. The effects of L-DOPA treatment TIF-IA^{DATCreERT2} mice were limited to mild changes in anxiety like behaviors and motor performance, and also a decrease in saccharin preference in females. Treatment with dopaminergic drugs in human PD patients ameliorated motor deficits, improved cognitive performance and to an extent also anxiety-related symptoms.

Transcriptome analysis in TIF-IA^{DATCreERT2} mice revealed spatially-specific effects of L-DOPA treatment in the forebrain. The analysis identified 20 transcripts with significantly changed abundance, the majority of the associated with immediate-early gene expression and circadian rhythm regulation. The L-DOPA-induced changes were observed in the dorsal striatum, nucleus accumbens, dorsal cortical layers 2/3 to 6b, gustatory and piriform cortex and tissue adjacent to the lateral ventricle. Conversely, no significant effects of treatment on gene expression were observed in blood samples from PD patients.

Taken together, these results reveal discrete role of dopaminergic signaling in the development and treatment of non-motor PD symptoms. Cognitive functions were significantly affected in both humans as well as genetically modified mice, though the observed changes differed qualitatively. Gene-specific effects of L-DOPA treatment in discrete areas of the forebrain suggest differential contributions to motor and non-motor symptoms of PD, including executive functions and motivational processes. In summary, the results suggest that therapeutic and adverse effects of L-DOPA treatment may be linked to specific molecular changes in the brain, though the importance of observed gene expression patterns has to be validated in humans.

WSTĘP

Choroby neurozwyrodnieniowe są grupą schorzeń o zróżnicowanym podłożu, których wspólną cechą jest utrata populacji komórek nerwowych w określonych strukturach układu nerwowego. Procesy prowadzące do trwałych uszkodzeń układu nerwowego i zmian funkcjonalnych mają charakter postępujący, nie istnieje również skuteczna terapia przyczynowa tych chorób ani strategie zapobiegawcze. Ubytek neuronów, stan zapalny i glejoza oraz inne zmiany histopatologiczne (np. występowanie agregatów nieprawidłowo zwiniętych lub hiperfosforylowanych białek) obejmują często wiele obszarów mózgowia, rdzenia kręgowego, a także obwodowego układu nerwowego. Patofizjologiczne procesy przebiegające w układzie nerwowym osób dotkniętym chorobami neurozwyrodnieniowymi prowadzą do rozwoju objawów wynikających z uszkodzenia poszczególnych struktur. Stosowane obecnie metody leczenia chorób neurozwyrodnieniowych mają jednak niewielką skuteczność wobec wielu objawów. Z uwagi na złożoność i rozpowszechnienie zmian patologicznych w układzie nerwowym chorych, postępowanie choroby i diagnozowanie jej w dość zaawansowanym stadium, zidentyfikowanie procesów prowadzących do pojawienia się określonych zaburzeń lub dolegliwości jest wysoce utrudnione. Większość zachorowań na choroby neurodegeneracyjne ma charakter idiopatyczny, a dokładne molekularne mechanizmy prowadzące do rozwoju poszczególnych objawów pozostają nie do końca poznane. Brak pełnej wiedzy na temat mechanizmów leżących u podłoża objawów uniemożliwia opracowanie skutecznych i bezpiecznych metod ich leczenia.

Choroba Parkinsona – definicja i epidemiologia

Choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's disease*, PD) jest klasyfikowana jako schorzenie układu pozapiramidowego i stanowi drugą najpowszechniej występującą chorobę neurozwyrodnieniową na świecie (Feigin *et al.*, 2019). W 2019 roku liczebność osób ze zdiagnozowaną PD oszacowano na 8,5 miliona (The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020). Liczba rozpoznawanych przypadków PD wzrasta (Ou *et al.*, 2021); między 1990 a 2016 rokiem zanotowano wzrost szacowanej całkowitej liczby przypadków o 145% do 6,1 mln (Feigin *et al.*, 2019), a pomiędzy latami 2010 a 2019 wzrost częstości występowania wyniósł 30,9% (The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020). W ostatnich latach zanotowano również wzrost liczby zgonów oraz wzrost wskaźnika DALY(s) (ang. *disability-adjusted life year(s)*), tj. liczby lat skorygowanych niepełnosprawnością, a wzrost obu parametrów między rokiem 1990 a 2016 był największy spośród powszechnie występujących schorzeń neurologicznych (Feigin *et al.*, 2019). Większość chorych na PD w skali globalnej stanowią

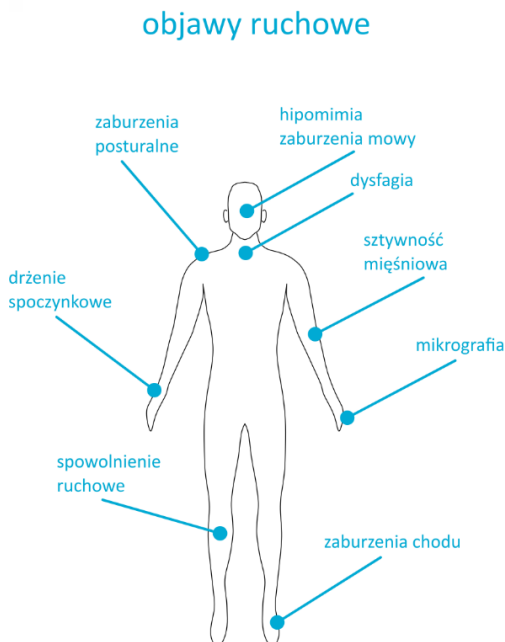
mężczyźni – stosunek mężczyzn do kobiet wśród chorych na PD wynosi 1,4 (Feigin *et al.*, 2019) i utrzymuje się na podobnym poziomie od 1990 roku (Ray Dorsey *et al.*, 2018), jednak w Japonii zaobserwowano większą proporcję kobiet w populacji chorych ze zdiagnozowaną PD (Kimura *et al.*, 2002), co być może sugeruje zróżnicowaną podatność na zachorowanie między populacjami. Podobnie jak w przypadku choroby Alzheimera, choroby Huntingtona i wielu innych schorzeń neurozwyrodnieniowych, wiek stanowi ważny czynnik ryzyka zachorowania na PD (Hou *et al.*, 2019) i to wśród osób po 60. roku życia PD jest najczęściej diagnozowana (Raket *et al.*, 2022). Według metaanalizy z 2014 roku przeprowadzonej przez Pringsheim i współpracowników (2014) na podstawie 47 badań, częstość występowania PD wzrasta z 41 chorych na 100 000 osób w przedziale wiekowym 40-49 lat, przez 428 w grupie wiekowej 60-69 lat do 1903 w grupie w wieku 80 lat i więcej. Biorąc pod uwagę trendy w państwach uprzemysłowionych do starzenia się społeczeństwa oraz wydłużania się średniej oczekiwanej długości życia, w najbliższych latach przewiduje się dalszy wzrost zachorowań na PD, a według niektórych autorów tak duża liczba chorych w ujęciu globalnym nosi cechy pandemii (Dorsey *et al.*, 2018).

Ze względu na zidentyfikowane podłoże wyróżnia się dwie postaci PD: idiopatyczną i genetyczną (dziedziczną). Większość pacjentów z PD choruje na postać idiopatyczną, a w ujęciu globalnym około 15% pacjentów ze zdiagnozowaną PD ma dodatni wywiad rodzinny, choć odsetek ten jest zróżnicowany między populacjami (Tran *et al.*, 2020). Dotychczas zidentyfikowano ponad 20 genów, których określone mutacje prowadzą do rozwoju jednogenowej PD (np.: *SNCA*, *LRRK2*, *PINK1*, *PRKN*) albo stanowią czynnik ryzyka zachorowania na PD, jak np. *GBA* (Blauwendraat *et al.*, 2020). Spośród wariantów związanych z PD allele o dużej penetracji są rzadkie, natomiast te o wyższym rozpowszechnieniu w populacji generalnej mają małą penetrację. Również u chorych z postacią idiopatyczną PD zidentyfikowano mutacje w ponad 40 loci związanych ze zmodyfikowanym ryzykiem zachorowania na PD (Tran *et al.*, 2020), dlatego niektórzy autorzy zauważają, że wyróżnianie tych dwóch postaci jest kontrowersyjne (Blauwendraat *et al.*, 2020). Obecnie uważa się, że do rozwoju PD przyczyniają się czynniki genetyczne, środowiskowe oraz procesy starzenia (Kalia & Lang, 2015; Pang *et al.*, 2019). Wśród czynników środowiskowych lub też związanych ze stanem zdrowia, zwiększających ryzyko zachorowania na PD wymienia się m.in.: ekspozycję na pestycydy o działaniu neurotoksycznym wobec neuronów dopaminergicznych: parakwat i rotenon, przyjmowanie beta-blokerów, spożywanie pokarmów bogatych w węglowodany i chorobę wrzodową żołądka (Bellou *et al.*, 2016; Ball *et al.*, 2019).

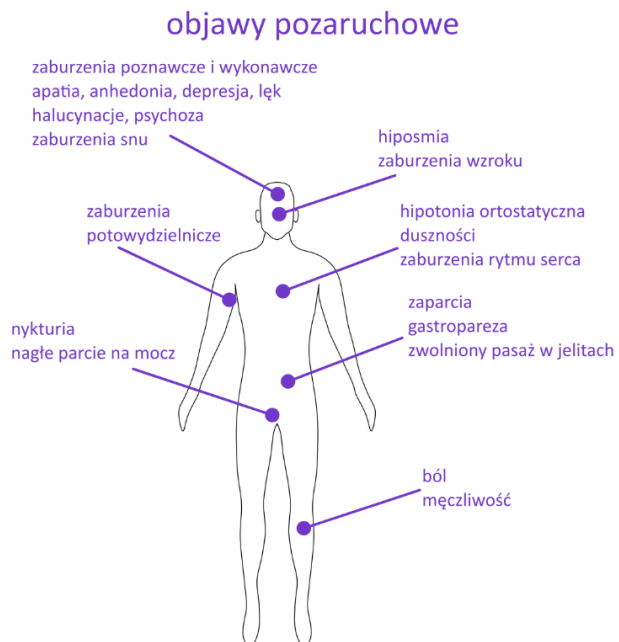
Objawy i diagnoza choroby Parkinsona

Do charakterystycznych ruchowych PD (Ryc. 1a) należą: spowolnienie ruchowe (bradykineza), sztywność mięśniowa (zwiększone napięcie mięśniowe) oraz drżenie spoczynkowe. Inne obserwowane w PD zaburzenia ruchowe to m.in. zaburzenia chodu (np. festynacja, zamrożenie chodu, trudności z inicjacją kroku, zmniejszenie długości kroków), zaburzenia posturalne (niestabilność, pochylenie tułowia do przodu, dystonia), zubożenie mimiki twarzy (tzw. „twarz maskowata”), mikrografia (Maetzler *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2012), a w bardziej zaawansowanym stadium choroby także objawy i fluktuacje ruchowe wynikające z długotrwałego leczenia L-DOPA, w tym dyskinezy (Bastide *et al.*, 2015).

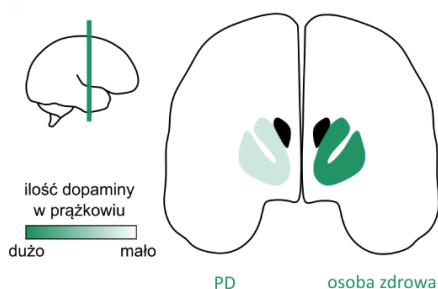
a.



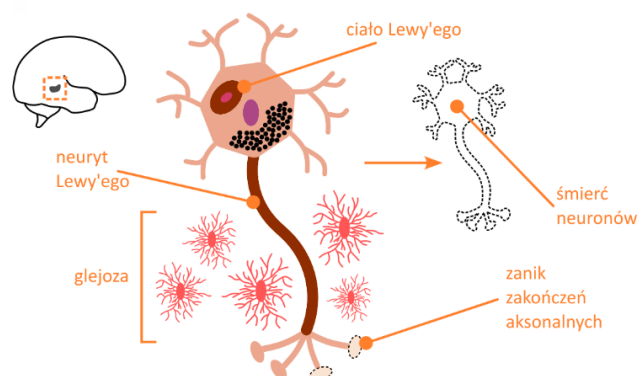
b.



c.



d.



Rycina 1. Wybrane elementy obrazu klinicznego i zmiany anatomopatologiczne powstające w przebiegu choroby Parkinsona. (a) Objawy ruchowe. (b) Objawy pozaruchowe. (c) Spadek ilości dopaminy wydzielanej w prążkowiu. (d) Ciała i neuryty Lewy'ego, zanik zakończeń aksonalnych, a w dalszej kolejności również śmierć neuronów dopaminergicznych oraz towarzysząca im glejoza,

należą do charakterystycznych zmian neuropatologicznych obserwowanych w części zbitnej istoty czarnej (kolorem czarnym przedstawiono ziarna neuromelaniny). Legenda: PD – choroba Parkinsona.

Kryteria rozpoznania PD według *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria* (Gibb & Lees, 1988; Hughes *et al.*, 1992) określają jako niezbędne do postawienia diagnozy PD obecność bradykinezji oraz towarzyszący jej co najmniej jeden dodatkowy objaw ruchowy spośród: sztywności mięśniowej, drżenia spoczynkowego (4-6 Hz) i niestabilności posturalnej. Dodatkowe kryteria wspierające diagnozę PD to: jednostronny początek obserwowanych objawów, drżenie spoczynkowe, postępujący charakter choroby, utrzymująca się asymetria objawów po stronie ciała, po której pojawiły się pierwsze objawy, bardzo dobra odpowiedź na podania L-DOPA, występowanie objawów płasawicznych po L-DOPA, odpowiedź na podania L-DOPA przez 5 lat i dłużej oraz czas trwania choroby przez 10 lat i dłużej. Kryteria wykluczające natomiast rozpoznanie choroby obejmują m.in. brak odpowiedzi na duże dawki L-DOPA, wielokrotne przebycie udaru wraz z progresją objawów parkinsonowskich, wielokrotne urazy głowy lub zapalenie mózgu w wywiadzie, objawy mózdkowe, objaw Babińskiego i wczesne pojawienie się otępienia.

Podobne do PD objawy ruchowe można zaobserwować w innych zespołach parkinsonowskich: pierwotnych (zanik wieloukładowy, postępujące porażenie nadjądrowe, zespół korowo-podstawny, otępienie z ciałami Lewy'ego; choroby genetyczne, m.in. choroba Wilsona) i wtórnych (parkinsonizm polekowy, parkinsonizm naczyniowy, parkinsonizm spowodowany nowotworem mózgu, parkinsonizm pourazowy, parkinsonizm spowodowany przyjęciem toksyn, parkinsonizm spowodowany przez infekcję i procesy zapalne, w tym zapalenie mózgu von Economo) (Keener & Bordelon, 2016; Höllerhage, 2019).

Nowsze kryteria opracowane przez *International Parkinson and Movement Disorder Society* (Postuma *et al.*, 2015) wskazują jako konieczne do diagnozy PD objawy parkinsonizmu, zdefiniowane jako bradykinezję wraz z występowaniem drżenia spoczynkowego i/lub sztywności mięśniowej (lecz nie zaburzenia posturalne). Jako kryteria wspierające diagnozę wymienia się wyraźną i silną odpowiedź na podawanie leków wpływających na przekąźnictwo dopaminergiczne, występowanie dyskinez wywołanych przez L-DOPA, drżenie spoczynkowe kończyny udokumentowane podczas badania fizykalnego oraz utratę węchu lub cechy odnerwienia włókien współczulnych serca w badaniu tomografią emisyjną pojedynczych fotonów (ang. *single-photon emission computed tomography*, SPECT) z użyciem ¹²³I-meta-jodobenzylguanidyny (MIBG). Oprócz tego kryteria te wymieniają objawy wykluczające, które wskazują na inne pochodzenie objawów (m.in. występowanie objawów mózdkowych, prawidłowy wynik badania neuroobrazowego presynaptycznych obszarów układu dopaminergicznego, brak obserwowalnej odpowiedzi na duże dawki L-DOPA pomimo co najmniej średniozaawansowanej choroby, podejrzenie parkinsonizmu polekowego) i „czerwone flagi”

(np. szybkie postępowanie zaburzeń chodu prowadzące do konieczności regularnego korzystania z wózka inwalidzkiego w ciągu 5 lat od pojawienia się pierwszych objawów). Autorzy tych kryteriów proponują rozpoznanie klinicznie ustalonej PD (ang. *clinically established PD*) lub klinicznie prawdopodobnej PD (*clinically probable PD*). Należy podkreślić, że w obu wytycznych występowanie objawów ruchowych stanowi najważniejszy warunek rozpoznania choć w nowszej z nich zwrócono również uwagę na istotną rolę objawów pozaruchowych.

W obrazie klinicznym PD obok objawów ruchowych obecne są zaburzenia neuropsychiatryczne, zaburzenia snu, przetwarzania bodźców zmysłowych oraz dysautonomia, które wspólnie określa się mianem objawów pozaruchowych (Schapira *et al.*, 2017). Objawy te występują z różną częstością w populacji chorych na PD, podobnie zresztą jak niektóre objawy ruchowe, na podstawie czego niektórzy autorzy wyróżniają poszczególne podtypy PD (Sauerbier *et al.*, 2017). Poszczególne objawy pozaruchowe PD pojawiają się na różnych etapach rozwoju choroby i obejmują zarówno dysfunkcje lub uszkodzenia struktur ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, zaburzając funkcjonowanie układu moczowo-płciowego, pokarmowego, sercowo-naczyniowego, gruczołów potowych, jak i narządów węchu i wzroku, a ponadto wpływając na nastrój, funkcje poznawcze i postrzeganie świata przez pacjentów. Ponadto, objawy te wykazują zróżnicowaną odpowiedź na leczenie dopaminergiczne (Chaudhuri & Schapira, 2009). Ponieważ tak wiele aspektów codziennego funkcjonowania chorych na PD jest zaburzonych przez występowanie objawów pozaruchowych, obok objawów ruchowych w istotny sposób przyczyniają się one do pogorszenia ich jakości życia (Kurihara *et al.*, 2020). Wybrane objawy pozaruchowe przedstawiono na rycinie 1b.

Przebieg choroby Parkinsona

PD jest chorobą postępującą i o wieloletnim przebiegu (Maetzler *et al.*, 2009; Kalia & Lang, 2015). Wyróżniono trzy główne fazy rozwoju PD: fazę przedkliniczną, podczas której nie obserwuje się żadnych objawów, fazę przedruchową lub prodromalną, w której chorzy zaczynają prezentować niektóre objawy pozaruchowe, oraz fazę ruchową cechującą się pojawieniem wyraźnych, postępujących zaburzeń ruchowych oraz nasilaniem się objawów pozaruchowych (Stern *et al.*, 2012; Mahlke *et al.*, 2015; Meles *et al.*, 2021). Podczas fazy przedklinicznej zachodzą już procesy neurodegeneracyjne (Meles *et al.*, 2021). W ujęciu innych autorów PD ma natomiast dwie fazy: przedruchową (nazywaną również przedkliniczną) i ruchową (Hawkes, 2008; Hawkes *et al.*, 2010). Niezależnie od stosowanej konwencji i nazewnictwa faz rozwoju PD, podkreśla się znaczenie objawów pozaruchowych poprzedzających pojawienie się charakterystycznych i wyraźnych objawów ruchowych prowadzących do postawienia diagnozy PD.

Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Chen i współpracowników (2015) wskazują, że w fazie prodromalnej PD najczęściej obserwowanymi objawami pozaruchowymi są hiposmia, objawy depresji, zaparcia, lęk, zaburzenia zachowania podczas snu REM (ang. *REM sleep behavior disorder*, RBD) i nadmierna senność w ciągu dnia. W innym badaniu przeprowadzonym na dużej liczbie uczestników zanotowano także dużą częstość występowania zaburzeń pamięci, ślinotoku, nagłego parcia na mocz i nokturii, bólu, zespołu niespokojnych nóg i hipotonii ortostatycznej (Durcan *et al.*, 2019). Żaden z wymienionych objawów nie wystąpił jednak w fazie prodromalnej w kohorcie badanych pacjentów z PD z częstością większą niż 36%, co sugeruje dużą zmienność osobniczą przebiegu tej fazy choroby. Berg i współpracownicy (2021) zwrócili uwagę na zróżnicowany przebieg tej fazy PD w poszczególnych podtypach PD na podstawie markerów neuropatologicznych, neuroobrazowych, genetycznych i objawów klinicznych, wyróżniając m.in. specyficzny podtyp pacjentów z RBD. W ramach badania „ONSET PD” zanotowano zróżnicowaną częstość objawów pozaruchowych w czasie względem pojawienia się objawów ruchowych – 10 lat i więcej przed ich pojawieniem się najczęstsze były: dysfunkcje układu pokarmowego, zaburzenia snu i termoregulacji, ból w klatce piersiowej. Wcześniej niż 2 lata przed pojawieniem się objawów ruchowych natomiast: zaburzenia pamięci i uwagi oraz anhedonia i apatia (Pont-Sunyer *et al.*, 2015). Ponadto, niektóre badania sugerują również obecność w fazie prodromalnej PD wybranych objawów ruchowych, takich jak: zaburzenia chodu, zaburzenia posturalne, sztywność mięśniowa i bradykineza (Mahlknecht *et al.*, 2015; Friederich *et al.*, 2019). Długość fazy prodromalnej, w zależności od zastosowanej metody (raportowanie pacjentów o początku objawów pozaruchowych, stwierdzenie objawów w badaniu, badania neuropatologiczne, neuroobrazowanie), szacuje się na kilka do nawet kilkudziesięciu lat i jest to cecha zróżnicowana także względem wieku, płci i podtypu choroby (Hawkes, 2008). Faza prodromalna PD ma zatem niejednorodny przebieg u różnych grup chorych, jednak powszechnie występują w niej objawy pozaruchowe.

Faza ruchowa PD trwa od momentu pojawienia się charakterystycznych dla PD objawów ruchowych i postawienia diagnozy do śmierci chorego. Podczas tej fazy objawy ruchowe i pozaruchowe nasilają się w miarę czasu trwania choroby, jednak ich rozwój nie zawsze ma charakter liniowy (Maetzler *et al.*, 2009; Poonja *et al.*, 2021). Przykładem pokazującym zróżnicowanie dynamiki rozwoju objawów ruchowych u pacjentów jest badanie Poonja i współpracowników (2021), którzy zaobserwowali kilka wzorców zmian sprawności funkcji ruchowych u pacjentów z PD: stabilny stan funkcji ruchowych przez lata, ich liniowe pogarszanie się, stabilny stan i szybkie pogarszanie się oraz występowanie poprawy i pogarszania się w różnej sekwencji czasowej. W zaawansowanej fazie ruchowej częstymi objawami pozaruchowymi są hipotonia ortostatyczna, nietrzymanie moczu, otępienie, depresja, halucynacje,

ból, przewlekłe zmęczenie, ślinienie, zaburzenia przełykania, trudności z porozumiewaniem się i zaburzenia snu oraz duszności (Wenning *et al.*, 1999; Hely *et al.*, 2005; Higginson *et al.*, 2012). Trzeba jednak zaznaczyć, że są znaczne różnice w raportowanej częstości występowania tych objawów między badaniami, np. w *Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease* (Hely *et al.*, 2005) hipotonia ortostatyczna występowała u 35% a nietrzymanie moczu u 41% pacjentów z PD, w pracy Wenninga i współpracowników (Wenning *et al.*, 1999), odpowiednio u 78% i 82% pacjentów, natomiast w badaniu Higginson i współpracowników (Higginson *et al.*, 2012) nietrzymanie moczu zanotowano u 52% chorych. Być może różnice te wynikają z innej metodologii badania (użycie różnych kwestionariuszy, czasu obserwacji), innego rozkładu wieku i czasu trwania choroby, charakterystyki badanej kohorty albo wielkości prób, które były małe: od 11 do 52 pacjentów. Pogarszanie się funkcji ruchowych jest widoczne we wzroście liczby punktów uzyskiwanych w kwestionariuszu Unified Parkinson's Disease Rating Scale III (UPDRS III) (Maetzler *et al.*, 2009). Objawy ruchowe początkowo jednostronne stają się dwustronne, pojawiają się zaburzenia postawy (Hoehn & Yahr, 1967). Poza upadkami o raportowanej częstości występowania u 36 (Higginson *et al.*, 2012) do 81% pacjentów z PD (Hely *et al.*, 2005), zanotowano także duży odsetek problemów z używaniem kończyn górnych i dolnych (Higginson *et al.*, 2012). Ponadto, wskutek długotrwałego przyjmowania leków, obserwuje się dyskinezy, fluktuacje ruchowe, zespół zaburzeń kontroli impulsów oraz różne inne objawy mogące wynikać także z samej PD, w tym halucynacje i hipotonia ortostatyczna (Wilson & Smith, 1989; Bastide *et al.*, 2015; You *et al.*, 2018). Wraz z postępem choroby zwiększa się zatem stopień niepełnosprawności chorych wskutek narastających zaburzeń ruchowych i pozaruchowych coraz bardziej ograniczających codzienne funkcjonowanie i, co za tym idzie, wzrasta poziom uzależnienia pacjentów od opieki osób drugih. Zaproponowana przez Hoehn i Yahra pięciostopniowa skala jest szeroko stosowanym sposobem oceny stopnia zaawansowania rozwoju PD względem objawów ruchowych i stopnia samodzielności (Hoehn & Yahr, 1967; Goetz *et al.*, 2004). Wieloletnie badanie obserwacyjne Alves i wsp. (2005) pokazało, że średnie roczne tempo postępowania PD względem skali objawów ruchowych UPDRS oraz skali Hoehn i Yahra wyniosło w obu przypadkach w przybliżeniu 3%.

Procesy neurozwyrodnieniowe w przebiegu choroby Parkinsona

Nazwa choroby pochodzi od nazwiska angielskiego lekarza Jamesa Parkinsona, który w 1817 roku w monografii „An Essay on the Shaking Palsy” (Parkinson, 1817) opublikował szczegółowy i wieloaspektowy opis *drżączki porażnej*, jak wówczas nazywano PD, wraz ze scharakteryzowaniem symptomatologii 6 chorych. Kluczowych odkryć na temat podłoża objawów PD dokonali Paul Blocq i Georges Marinesco, którzy opisali przypadek hemiparkinsonizmu u osoby z guzem umiejscowionym

w okolicy istoty czarnej po stronie przeciwnej do strony obserwowanego drżenia (Blocq & Marinesco, 1893; Opris *et al.*, 2017). Ta obserwacja zainspirowała Édouarda Brissauda do sformułowania hipotezy o tym, że u podłoża objawów PD stoją uszkodzenia istoty czarnej (Brissaud, 1895; Parent & Parent, 2010). Dowodów na poparcie tej hipotezy dostarczyły badania neuropatologiczne prowadzone na początku XX wieku przez Konstantina Trietiakowa, który ponadto zanotował obecność ciał Lewy’ego (złogów białkowych) w niektórych neuronach istoty zwartej osób z PD (Trietiakow, 1919; Parent & Parent, 2010). Oleh Hornykiewicz i Herbert Ehringer przeprowadzili badania nad poziomem noradrenaliny i dopaminy w prążkowie osób zmarłych ze zdiagnozowaną PD – zanotowali wówczas spadek ilości dopaminy w jądrze ogoniastym i skorupie w porównaniu do innych grup doświadczalnych (Hornykiewicz & Ehringer, 1960). Odkrycie to pozwoliło lepiej poznać podłoże objawów PD i opracować pierwsze skuteczne strategie ich leczenia.

Od czasu badań przeprowadzonych przez Lewy’ego, Trietiakowa oraz Hornykiewicza i Ehringera zrozumienie patologii PD na poziomie komórkowym, anatomicznym i funkcjonalnym uległo dużym zmianom. Obecnie spadek ilości dopaminy w prążkowie (Ryc. 1c), degeneracja neuronów istoty czarnej części zwartej, oraz występowanie ciał oraz neurytów Lewy’ego (Ryc. 1d) pozostają cechami charakterystycznymi dla PD i pomagają potwierdzić diagnozę tej choroby w badaniach anatomopatologicznych. Jednakże, wieloletnie badania wskazują na to, że PD to choroba obejmująca wiele struktur układu nerwowego a procesy neurozwyrodnieniowe wykraczają poza szlak czarno-prążkowiowy czy nawet sam układ dopaminergiczny.

Ciała oraz neuryty Lewy’ego to eozynofilowe złogi białkowo-lipidowe występujące na terenie cytoplazmy somy neuronów (ciała Lewy’ego) oraz w aksonie (neuryty Lewy’ego) (Braak *et al.*, 1999). Ze względu na budowę oraz lokalizację ciał Lewy’ego wyróżniono ich dwa rodzaje: znajdujące się m.in. W pniu mózgu okrągłe inkluzje z wyraźnie zaznaczonym rdzeniem i okalającym go pierścieniem oraz korowe ciała Lewy’ego, również o kolistym kształcie, lecz o bardziej nieuporządkowanej strukturze (Fares *et al.*, 2021). Dotychczas zidentyfikowano wiele elementów składowych ciał i neurytów Lewy’ego. Ultrastrukturalne badania ciał i neurytów Lewy’ego ujawniły, że w inkluzje te zawierają mitochondria (o prawidłowej budowie, jak i dysmorficzne), struktury pęcherzykowe (przypominające lizosomy i autofagosomy), pęcherzykowo-tubularne, filamentowe i błonowe, elementy cytoszkieletu oraz osłonki mielinowej (Forno & Norville, 1976; Shahmoradian *et al.*, 2019). Badania proteomiczne i immunohistochemiczne zidentyfikowały kilkaset białek obecnych w ciałach i neurytach Lewy’ego, wśród nich ubikwitynę, amyloid β A4, białka cytoszkieletu (tau, tubulinę, dyneinę, neurofilamenty), białka związane z synapsami (synpatotagmina), dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i cyklinozależną kinazę 5 (Brion & Couck, 1995; Leverenz *et al.*, 2007; Kanazawa *et al.*, 2008).

Jednakże, jednym z najpowszechniej badanych białek wchodzących w skład ciał i neurytów Lewy'ego jest α -synukleina, której obecność w tych strukturach odkryto w 1997 r. (Spillantini *et al.*, 1997). W tym samym roku ujawniono również związek jej mutacji z dziedziczną postacią PD (Polymeropoulos *et al.*, 1997).

Ciała i neuryty Lewy'ego stwierdza się w badaniach sekcyjnych w różnych obszarach ośrodkowego, trzewnego i obwodowego układu nerwowego. Na podstawie wykonania barwień przeciwko α -synukleinie w skrawkach pacjentów z PD Braak i wsp. (Braak *et al.*, 2003, 2004, 2006) wysnuli hipotezę o pojawianiu się złogów tego białka w określonej kolejności w układzie nerwowym, od struktur bardziej obwodowych (opuszka węchowa, jądro grzbietowe nerwu błędnego) przez jądro sinawe, jądra szwu, istotę czarną, jądro podstawne Meynerta, osiągając w końcowych stadiach choroby korę nową. Taka kolejność występowania zmian patologicznych miałaby odzwierciedlać kolejność pojawiania się poszczególnych objawów PD: pozaruchowych, następnie ruchowych, a w zaawansowanym stadium – silne zaburzenia poznawcze, otępienie. Chociaż hipoteza Braaka pozostaje kontrowersyjna m.in. w kwestii sprawczości ciał Lewy'ego wobec śmierci komórki i rozprzestrzeniania się ich w sposób prionopodobny, to jednak obrazuje ona potrzebę wyjaśnienia podłoża poszczególnych objawów pozaruchowych PD (Wolters & Braak, 2006), które angażują struktury wydzielające różne neuroprzekaźniki. W PD bowiem obserwuje się zwyrodnienie lub zaburzenie funkcji struktur związanych z różnymi układami neuroprzekaźników poza dopaminą, w tym adrenergicznych, serotonergicznymi, cholinergicznymi i histaminergicznymi (Scatron *et al.*, 1983; Rinne *et al.*, 2002; Bohnen *et al.*, 2007; Rochester *et al.*, 2012; Rylander, 2012; Buddhala *et al.*, 2015; Grosch *et al.*, 2016; Nazmuddin *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021). W rozpatrywaniu patofizjologii i etiopatogenezy objawów pozaruchowych PD trzeba więc wziąć pod uwagę złożoną anatomopatologię PD.

Różnorodność fenotypowa choroby Parkinsona

Na przebieg PD wpływ ma kilka czynników. Jednym z nich jest płeć – u kobiet postęp choroby jest powolniejszy, a drżenie występuje częściej niż u mężczyzn (Haaxma *et al.*, 2007). Różne postaci i podtypy choroby również różnią się między sobą w przebiegu i fenotypie. U większości pacjentów pierwsze objawy PD pojawiają się w późnym wieku. Tę postać choroby nazywa się PD o późnym początku (ang. *late-onset PD*), która w zależności od kryteriów wieku przyjętych przez różnych autorów rozpoczyna się po 50., po 60. lub nawet po 70. roku życia. Część zachorowań ma jednak miejsce przed 41. rokiem życia (według innych kryteriów: przed 55. rokiem życia), a nawet poniżej 20. roku życia i wówczas określa się je odpowiednio mianem PD o wczesnym początku (*early-onset PD*) lub

młodzieńczym PD (*juvenile-onset PD*; Camerucci et al., 2021; Mehanna & Jankovic, 2019), chociaż zauważono, że obie postaci wczesnej PD są do siebie mocno zbliżone i mogą stanowić jeden spójny fenotyp (Muthane et al., 1994). U pacjentów o wczesnym początku PD tempo progresji choroby jest mniejsze, a funkcje poznawcze są mniej zaburzone (Jankovic et al., 1990). Alves i wsp. (2005) również zanotowali wolniejszą progresję pogarszania się objawów ruchowych u osób o młodszym wieku pojawienia się pierwszych objawów, choć autorzy nie rozróżniali grup ze względu na wiek początku choroby.

Różnorodność fenotypowa PD wynika również z wpływu mutacji sprawczych lub zwiększających ryzyko PD. Mutacje takie mogą modyfikować tempo postępu PD oraz nasilenie poszczególnych objawów. Przykładowo, w porównaniu do osób z idiopatyczną formą PD, wolniejsze tempo postępu PD zaobserwowano u osób z mutacjami *PINK1* lub *PRKN*, a u nosicieli mutacji w *GBA* stwierdzono cięższe zaburzenia poznawcze, objawy neuropsychiatryczne i dysautonomię niż u pacjentów z idiopatyczną formą PD, (Kim & Alcalay, 2017; Mehanna & Jankovic, 2019). Rodzaj mutacji również wpływa na manifestację choroby – fenotyp związany z duplikacją *SNCA* objawia się podobnie do idiopatycznej formy PD, tryplikacja tego genu skutkuje szybkim postępowaniem choroby (śmierć nawet w ciągu 10 lat od pierwszych objawów ruchowych PD) i cięższym fenotypem oraz dodatkowymi objawami, np. miokloniami (Chartier-Harlin et al., 2004; Kasten & Klein, 2013).

Liczni autorzy podejmują się również klasyfikacji podtypów PD na podstawie występowania objawów ruchowych i pozaruchowych PD (Thenganatt & Jankovic, 2014; Mu et al., 2017; Rodriguez-Sanchez et al., 2021). Najwcześniej zidentyfikowanymi podtypami PD były postać z dominującym drżeniem (ang. *tremor-dominant*) oraz postać z dominującymi zaburzeniami postawy i chodu (*postural instability and gait difficulty, PIGD*), przy czym druga z grup charakteryzowała się bardziej nasilonymi objawami ruchowymi i poznawczymi (Jankovic et al., 1990).

Modele zwierzęce choroby Parkinsona

Modele zwierzęce choroby Parkinsona można podzielić na grup, biorąc pod uwagę sposób indukowania mechanizmów prowadzących do uszkodzenia i/lub degeneracji neuronów szlaku czarno-prądkowatego i rozwoju fenotypu parkinsonowskiego. Są to: modele oparte o podania neurotoksyn, modele genetycznej postaci PD, modele transgeniczne wykorzystujące system Cre/loxP do indukowania śmierci neuronów DAT-pozytywnych oraz modele wywoływania α -synukleinopatii poprzez domózgowe podania wektorów wirusowych ze zmutowanym genem *SNCA* lub preformowane fibryle α -synukleiny. Poszczególne modele cechuje również zróżnicowana trafność konstruktu

(tj. związek modelu z czynnikami wywołującymi parkinsonizm lub PD), trafność fasadowa (np. które cechy fenotypowe behawioralne i biochemiczne PD można u nich zaobserwować), trafność predykcyjna (jak działanie leków wpływa na model a jak na pacjentów z PD), czas rozwoju fenotypu od zastosowania czynnika wywołującego zmiany patologiczne do pojawienia się pierwszych zaburzeń behawioralnych lub zmian biochemicznych) oraz wykorzystanie poszczególnych gatunków zwierząt. Poza omawianymi poniżej modelami zwierzęcymi, badania przedkliniczne nad PD prowadzi się także z wykorzystaniem linii komórkowych (Xicoy *et al.*, 2017), indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych, organoidów (Marotta *et al.*, 2020), drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Delenclos *et al.*, 2019) oraz bezkręgowców (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Xiong & Yu, 2018) i różnych gatunków kręgowców (Simola *et al.*, 2007). W podrozdziale tym opisałam jednak tylko modele bazujące na gatunkach ssaków, ponieważ w modelach tych obserwuje się zarówno zmiany w zachowaniu, jak i w procesach biochemicznych, co było również przedmiotem moich badań.

Modele toksynowe są najstarszymi zwierzęcymi modelami PD (Tieu, 2011). Cechuje je wykorzystanie substancji powodujących śmierć neuronów dopaminergicznych, a w niektórych przypadkach również noradrenergicznych i serotoninergetycznych. Efekty behawioralne i biochemiczne uszkodzenia neuronów można zaobserwować w stosunkowo krótkim czasie po podaniu tych substancji. Jednym z najpowszechniej stosowanych sposobów na modelowanie PD jest zastosowanie 6-hydroksydopaminy (6-OHDA). Jest to neurotoksyna, której użycie pozwoliło na opracowanie pierwszego modelu zwierzęcego PD (Ungerstedt, 1968). 6-OHDA jest analogiem dopaminy i noradrenaliny, którego transport do cytoplazmy neuronów odbywa się poprzez transportery dla dopaminy (DAT) i dla noradrenaliny (NET) dzięki strukturalnemu podobieństwu do tych monoamin. Mechanizm neurotoksycznego działania 6-OHDA opiera się na generowaniu stresu oksydacyjnego poprzez syntezę reaktywnych form tlenu (H_2O_2 , chinony) oraz hamowaniu kompleksu i łańcucha oddechowego, co prowadzi do uszkodzenia białek, jądra komórkowego oraz funkcji mitochondriów (Simola *et al.*, 2007). 6-OHDA nie przechodzi przez barierę krew-mózg, dlatego podaje się ją stereotaktycznie do prążkowania (Sellnow *et al.*, 2020), istoty czarnej (Chiu *et al.*, 2015) lub prążka przyśrodkowego przodomózgowia (Radlicka *et al.*, 2021) w celu wywołania fenotypu parkinsonowskiego, a także rzadziej w innych badaniach farmakologicznych do kory mózgu (Crofts *et al.*, 2001) lub opuszki węchowej (Ilkiw *et al.*, 2019); najczęściej podaje się ją szczurom, lecz stosowano ją również m.in. U myszy, kawii domowej i naczelnych (Simola *et al.*, 2007). Stopień uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiowego zależy od miejsca podania 6-OHDA (Bagga *et al.*, 2015). Neurotoksyna ta jest używana do uszkodzenia struktury po jednej stronie mózgowia – wówczas wywołuje się tzw. hemiparkinsonizm – lub obustronnie, co skutkuje cięższym fenotypem.

U zwierząt z hemiparkinsonizmem stopień spadku ilości dopaminy w prążkowie można ocenić po zachowaniu się zwierzęcia w teście rotacji wywołanych podaniem apomorfiny lub D-amfetaminy (Ungerstedt, 1971; Hudson *et al.*, 1993). 6-OHDA po podaniu do prążka przyśrodkowego przodomózgowia powoduje drastyczny spadek poziomu dopaminy i noradrenaliny (zauważalny nawet, gdy chroni się neurony noradrenergiczne uprzednim podaniem dezypraminy przed infuzją 6-OHDA,) w prążkowie, istocie czarnej, hipokampie i korze przedczołowej oraz a w wyższych dawkach – także serotoniny we wszystkich wymienionych strukturach poza istotą czarną (Kamińska *et al.*, 2017). U zwierząt po infuzjach 6-OHDA obserwuje się upośledzenie różnych funkcji ruchowych i pozaruchowych, w tym poznawczych i nastroju (Deumens *et al.*, 2002; Westin *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013; Boix *et al.*, 2015; Grospe *et al.*, 2018).

Inną neurotoksyną szeroko stosowaną do wywołania u zwierząt fenotypu PD jest 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP; Langston *et al.*, 1984). MPTP stosuje się zazwyczaj u myszy lub naczelnych (Engeln *et al.*, 2015). MPTP podaje się obwodowo, następnie po przekroczeniu bariery krew-mózg zostaje ona przekształcona przez astrocyty w toksyczny metabolit, 1-metylol-4-fenylpirydynę (MPP+; Meredith & Rademacher, 2011). MPP+ dostaje się do cytoplazmy neuronów dopaminergicznych przez DAT i wywołuje śmierć komórki poprzez zahamowanie aktywności kompleksu i łańcucha oddechowego oraz stymulację syntezy reaktywnych form tlenu (Meredith & Rademacher, 2011). Jej mechanizm działania jest zatem zbliżony do 6-OHDA. Podania MPTP prowadzą do powstania stanu zapalnego tkanki nerwowej (Lofrumento *et al.*, 2010), co również jest cechą PD (Grote Meyer *et al.*, 2022). Niektórzy autorzy zaobserwowali powstawanie w modelu MPTP agregatów α -synukleiny (Kowall *et al.*, 2000; Jethva *et al.*, 2011), jednak nie jest to stała i całkowicie powtarzalna cecha modelu (Halliday *et al.*, 2009). Występowanie zaburzeń ruchowych u myszy po podaniach MPTP nie zawsze jest obserwowane (Meredith & Rademacher, 2011). U zwierząt po podaniach MPTP natomiast notuje się zaburzenia zachowania zbliżone do objawów pozaruchowych PD, takich jak: RBD (Verhave *et al.*, 2011), zaburzenia pamięci (Ferro *et al.*, 2005) i nadwrażliwość na ból (Park *et al.*, 2015). U makaka krabożernego z parkinsonizmem wywołanym MPTP po podaniach L-DOPA zaobserwowano poprawę upośledzonych funkcji ruchowych, ale jednocześnie pogorszenie funkcji poznawczych (Schneider *et al.*, 2013). W modelowaniu PD u ssaków używa się ponadto pestycydów (parakwatu, parakwatu z manebem, rotenonu) oraz rzadziej m.in.: rezerpiny, haloperidolu, amfetamin, pochodnych izochinoliny (Duty & Jenner, 2011; Tieu, 2011).

Odkrycie genów sprawczych dla postaci dziedzicznej PD pozwoliło wykorzystać tę wiedzę do zbadania zachowań i zmian biochemicznych w modelach mysich i szczurzych z mutacjami lub uszkodzeniami tychże genów. Jednak fenotyp tych modeli często mocno odbiega od PD. Przykładowo, u myszy

z wyłączonymi genami *Pink1*, *Dj-1*, *Prkn* nie obserwuje się uszkodzeń układu dopaminergicznego (Magen & Chesselet, 2010). Podobnie, niektóre modele opierające się na mutacjach *Snca* występujących u pacjentów z PD nie wykazują utraty neuronów dopaminergicznym istoty czarnej lub agregatów α -synukleiny, jak również duże jest zróżnicowanie wykształcania się zaburzeń ruchowych i pozaruchowych w czasie (Koprich *et al.*, 2017).

W innym podejściu do tworzenia modeli genetycznych wykorzystuje się system Cre/loxP do specyficznego wycięcia genu niezbędnego do funkcjonowania komórki w komórkach dopaminergicznym (wyrażających DAT), w konsekwencji wywołując ich śmierć. Stosując dodatkowo rekombinazę indukowaną CreERT2 można zapoczątkować rozwój fenotypu parkinsonowskiego poprzez podania tamoksyfenu w dowolnym stadium rozwoju zwierzęcia, np. u dorosłych myszy, minimalizując ryzyko ich przedwczesnej śmierci, w przeciwieństwie do modeli z mutacją obligatoryjną. W tych modelach genetycznym obserwuje się wydłużony okres czasu (tygodnie) do rozwoju fenotypu, który postępuje powoli, co w pewnym stopniu odzwierciedla dynamikę postępowania PD u ludzi. Konstrukty genetyczne używane do stworzenia takich modeli nie są jednak powiązane ze znanymi mutacjami sprawczymi u ludzi. Przykładowym modelem skonstruowanym w ten sposób jest mysz MitoPark, której genotyp ($DAT^{+/cre}$; $Tfam^{loxP/loxP}$) powoduje uszkodzenie genu mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A, co prowadzi do niedoboru białek łańcucha oddechowego i śmierci neuronów DAT-pozytywnym oraz spadku poziomu dopaminy w różnych strukturach mózgowia (prążkowie, pole brzuszne nakrywki, kora mózgu) i pogorszenia funkcji ruchowych (Ekstrand *et al.*, 2007). W modelu tym zaobserwowano powolny postęp zmian patologicznych i dobrą odpowiedź na L-DOPA (Galter *et al.*, 2010), oznaki zaburzeń funkcji poznawczych (Li *et al.*, 2013), rytmu okołodobowego (Fifel & Cooper, 2014) oraz dyskinezy wywołane L-DOPA (Gellhaar *et al.*, 2015).

Myszy *Cox10/DAT-cre* również cechuje zaburzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego w neuronach DAT-pozytywnym, osiągnięte poprzez wycięcie genu *Cox10* niezbędnego do dojrzewania jednej z podjednostek katalitycznych kompleksu IV łańcucha oddechowego; szczep ten cechuje się obok spadku liczby neuronów dopaminergicznym w istocie czarnej i obniżenia poziomu dopaminy w prążkowie upośledzeniem funkcji ruchowych i dobrą odpowiedzią na podania L-DOPA (Pinto *et al.*, 2016).

Inny szczep powstały na bazie systemu Cre/loxP to $Pitx3^{fl/fl}/DAT^{CreERT2}$, w którym podanie tamoksyfenu indukuje wyłączenie genu *Pitx3* potrzebnego do różnicowania się neuronów dopaminergicznym istoty czarnej (Wang *et al.*, 2021). W tym modelu fenotyp parkinsonowski rozwija się przez wiele miesięcy. O ile pierwsze oznaki uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiego zanotowano po 4 miesiącach od

podanie tamoksyfenu, to spadek liczby neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej był znamieny dopiero po 13 miesiącach, natomiast upośledzenie funkcji ruchowych było widoczne w 9. miesiącu po podaniach tamoksyfenu (Wang *et al.*, 2021).

Inne modele stosowane w badaniach nad PD wykorzystują wektory wirusowe do wprowadzenia do istoty czarnej konstruktów zmieniających lokalnie ekspresję genów (Koprich *et al.*, 2017). Ponadto, wykorzystuje się także domózgowe podania preformowanych fibryli α -synukleiny (Fortuna *et al.*, 2017).

Transkryptomika w badaniach nad chorobą Parkinsona

Profilowanie ekspresji genów w badaniach nad PD przeprowadza się na różnych tkankach pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną PD oraz na modelach zwierzęcych i hodowlach komórkowych. Celem takich badań jest najczęściej: zrozumienie molekularnego podłoża zmian patologicznych w PD (Dumitriu *et al.*, 2012, 2016; Lanoue *et al.*, 2013), odkrycie biomarkerów (pacjenci z PD; Arshad *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2020; Santiago & Potashkin, 2015), zidentyfikowanie nieznanych dotychczas efektów leczenia (pacjenci z PD, hodowle, modele; Pan *et al.*, 2005; Soreq *et al.*, 2013; Taravini *et al.*, 2016) lub mechanizmów związanych z powstawaniem i możliwym leczeniem dyskinez spowodowanych podaniami L-DOPA (modele; Charbonnier-Beaupel *et al.*, 2015; Konradi *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2016). Przez dziesięciolecia prowadzenia badań nad ekspresją genów w PD zmieniały się stosowane techniki badawcze – od hybrydyzacji *in situ*, przez mikromacierze i qPCR do RNA-seq. Różnorodność metodyczna tych badań (w tym również różne podania dawek L-DOPA w modelach zwierzęcych), duże zróżnicowanie prób w doświadczeniach z użyciem tkanek pacjentów i niewielka liczebność grup doświadczalnych sprawiają, że porównanie ich wyników jest utrudnione. Ich wyniki są również często niespójne (Borrageiro *et al.*, 2018). Porównanie wyników badań uzyskanych dzięki mikromacierzom i RNA-seq może być częściowo ułatwione dzięki analizom funkcjonalnym. Analizy te pokazują wzbogacenie list genów o zmienionym poziomie ekspresji: w terminy ontologii genów (ang. *Gene Ontology*, GO; Ashburner *et al.*, 2000; Carbon *et al.*, 2021), wspólne szlaki metaboliczne (np. *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), oddziaływanie ich produktów białkowych (*Protein-Protein Interaction*), czynniki regulacji ich transkrypcji (np. *Seqinspector*) albo ich wspólne funkcje. Przykładowo, w badaniach nad modelami zwierzęcymi PD po podaniach L-DOPA bez negatywnych efektów behawioralnych lub z dyskinezami dość powszechnie, acz nie uniwersalnie obserwuje się zmiany genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych w przodomózgowiu (Ferrario *et al.*, 2004; Konradi *et al.*, 2004; Charbonnier-Beaupel *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016; Radlicka *et al.*, 2021), choć wykazywane efekty wobec pojedynczych genów są różne.

W ostatnich latach pojawiły się nowe metody bazujące na hybrydyzacji *in situ* i RNA-seq: RNAscope, scRNA-seq i transkryptomika przestrzenna. Pozwalają one na dokładną kwantyfikację abundancji transkryptów i jednocześnie na zlokalizowanie ich w określonym typie komórek bądź części tkanki. Ich stosowanie pozwala zidentyfikować dotychczas nieznaną heterogeniczność populacji komórek i ich rolę w patofizjologicznych procesach związanych z PD (Aguila *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022; Kamath *et al.*, 2022). Aż do teraz metodyka transkryptomiki przestrzennej nie została jednak wykorzystana do identyfikacji efektów molekularnych leków przeciwparkinsonowskich.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie roli wydzielania dopaminy z neuronów śródmózgowia w rozwoju wybranych pozaruchowych objawów choroby Parkinsona. Jako główny model badawczy wybrałam genetycznie modyfikowane myszy, u których po osiągnięciu dorosłości indukcja mutacji powoduje stopniową i wybiórczą degenerację neuronów dopaminergicznych w brzuszynym śródmózgowiu. W oparciu o analizę zachowań myszy z mutacją podjęłam próbę wskazania roli utraty neuronów dopaminergicznych w rozwoju zaburzeń poznawczych, lękowych oraz zachowań mogących świadczyć o anhedonii, a także upośledzenia węchu. Zbadałam też, w jaki sposób podania L-DOPA wpłynęły na fenotyp zachowań myszy. Kończącym etapem badań w modelu zwierzęcych było profilowanie ekspresji genów z wykorzystaniem transkryptomiki przestrzennej w przodomózgowiu. Analizy wskazały na niejednorodne efekty L-DOPA na transkrypcję w korze i zwojach podstawy mózgu, w tym obszarach o prawdopodobnym znaczeniu dla zachowań podobnych do objawów pozaruchowych. Wyniki badań w modelu zwierzęcym zestawiam z danymi pochodzącymi z badań z udziałem pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona, u których objawy pozaruchowe były oceniane w trakcie przyjmowania leków dopaminergicznych oraz po przerwaniu podawania leków. Podjęłam też próbę zbadania zmian w ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej, które mogłyby korelować z nasileniem wybranych objawów pozaruchowych lub też być zależne od stosowanej farmakoterapii.

MATERIAŁY I METODY

Informacje dotyczące odczynników użytych w doświadczeniach są zawarte w tabeli 1.

Tabela 1. Spis materiałów i odczynników wykorzystanych w doświadczeniach przedstawionych w rozprawie.

Nazwa	Nazwa modelu/ Numer katalogowy	Producent
ODCZYNNIKI I MATERIAŁY – transkryptomika i transkryptomika przestrzenna		
RNA RNeasy Mini Kit (50)	74104	QIAGEN
PAXgene Blood miRNA Kit (50)	763134	PreAnalytiX
Agilent RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent
Agilent High Sensitivity DNA Kit	5067-4626	Agilent
Omniscript RT Kit (200)	205113	QIAGEN
Oligo(dT)12-18 primer	18418-012	Invitrogen
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	4318157	Applied Biosystems
TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM) XS (75 reactions/75 µL), inventoried	4453320	Applied Biosystems
Multiplate™ 96-Well PCR Plates, low profile, unskirted, clear	MLL9601	Bio-Rad
Microseal 'B' Adhesive Seals, Optical	MSB1001	Bio-Rad
Etylowy alkohol bezwodny 99,8% CZ.D.A., ODCZ. FP	396480111	POCh
2-Propanol	I9516-500ML	Sigma-Aldrich
Trizma base	T1503-1KG	Sigma
Hematoxylin solution according to Mayer	51275-100ML	Sigma-Aldrich
Eosin Y solution, aqueous	HT110216-500ML	Sigma-Aldrich
Bluing Buffer	CS702	Dako
Visium Spatial Gene Expression Slide & Reagent Kit, 4 rxns	PN-1000187	10xGenomics
Visium Spatial Gene Expression Slide & Reagent Kit, 16 rxns	PN-1000184	10xGenomics
Dual Index Kit TT Set A, 96 rxns	PN-1000215	10xGenomics
Visium Accessory Kit	PN-1000194	10xGenomics
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	AM9938	Invitrogen
TE Buffer	12090015	Invitrogen
SSC Buffer 20× Concentrate	S6639-1L	Sigma-Aldrich
2-Methylbutane	270342	Sigma-Aldrich
OCT EMBEDDING MATRIX	KMA-0100-00A	CellPath
Peel-A-Way® Embedding Mold	18646A-1	Polysciences

Nazwa	Nazwa modelu/ Numer katalogowy	Producent
KAPA Library Quantification Kit for Illumina Platforms	KK4824	Kapa Biosystems (Hoffmann-La Roche)
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	KK4600	Kapa Biosystems (Hoffmann-La Roche)
SPRIselect Reagent Kit	B23318	Beckman
Potassium Hydroxide Solution, 8M	P4494-50ML	Sigma-Aldrich
Buffer EB	19086	QIAGEN
Kwas solny roztwór mianowany 0,1M (0,1N)	PA-05-318965-4L	Honeywell
Kwas octowy		POCh
Metanol		POCh
ODCZYNNIKI I MATERIAŁY – barwienia immunofluorescencyjne		
Anti-Tyrosine Hydroxylase Antibody	AB1542	Sigma-Aldrich
Rabbit Anti-Sheep IgG Antibody (H+L), Fluorescein	FI-6000	Vector Laboratories
Donkey anti-Sheep IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A-11015	Invitrogen
PBS (10x)	42595.01	Serva
PBS (10X), pH 7.4	70011044	Gibco
Triton X-100	0694-1L	Amresco
Normal Swine Serum Blocking Solution	S-4000	Vector Laboratories
Thimerosal		
Paraformaldehyde, granulated, 1 kg		
Menzel Gläser, SuperFrost® Plus		Thermo Scientific
LEKI I SUBSTANCJE PODAWANE ZWIERZĘTOM		
Tamoksyfen	T5648	Sigma (MERCK)
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine - ≥98% (TLC)	D9628-5G	Sigma-Aldrich
Chlorowodorek benserazydu	B7283-1G	Sigma-Aldrich
Peletki podskórne do ciągłych podań L-DOPA	C-503 L-DOPA 0.7mg/pellet 14 Day Release	Innovative Research of America
Peletki podskórne do ciągłych podań placebo	C-111 Placebo for L-DOPA (0.7mg/pellet) 14 Day Release	Innovative Research of America
Sól fizjologiczna		Polpharma
Emla krem lidokaina/prylokaina 25 mg/g + 25 mg/g 1 tuba 30 g		AstraZeneca
Jodyna roztwór na skórę 3%	15481	Gemi
Histoacryl 0,5 ml	1050044	B Braun Surgical
Saccharin sodium salt hydrate	S1002-500G	Sigma

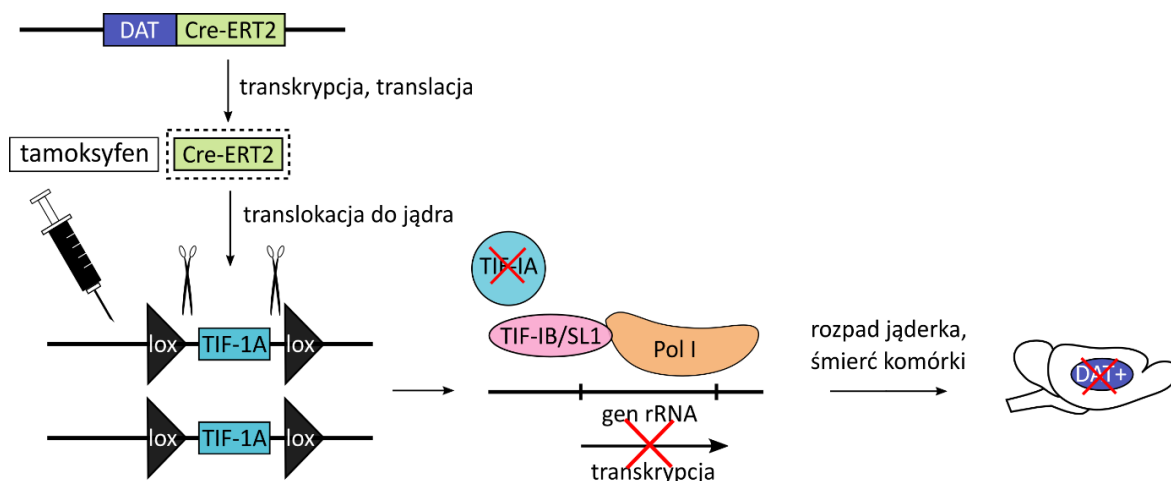
Badania z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych

Zwierzęta

Zwierzęta przebywały w przezroczystych klatkach domowych z pleksiglasu (31,5 × 17 × 14 cm) wystanych ściółką osikową i zawierających obiekty stanowiące wzbogacenie środowiska, w tym: materiał gniazdowy, drewniane klocki, porcelanowe miski na pokarm i/lub schronienie. W każdej klatce domowej przebywało po 2-4 osobników z jednego miotu, za wyjątkiem testów wymagających tymczasowego rozdzielania myszy, które opisano w kolejnych podrozdziałach. W pomieszczeniach bytowych utrzymywano temperaturę 22±2°C oraz wilgotność powietrza 55±10%. Cykl dobowy światło-ciemność trwał po 12 godzin, z wyłączeniem światła o godzinie 18 lub 19 (czasu CET/CEST). Zwierzęta miały zapewniony stały i nieograniczony dostęp do wody oraz do standardowej paszy dla gryzoni, za wyjątkiem procedury wymagającej deprywacji pokarmowej (*Test znajdowania zakopanego jedzenia*). Podczas wykonywania doświadczeń z udziałem zwierząt postępowano zgodnie z wytycznymi odpowiednich przepisów prawa polskiego i międzynarodowego, w tym Ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) oraz Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. W sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Protokoły doświadczeń zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie (numery uchwał: 28/2019 z dnia 24 stycznia 2019 r., 197/2019 i 198/2019 z dnia 8 sierpnia 2019 r., 197/2021 z dnia 10 czerwca 2021 r. i 92/2022 z dnia 7 kwietnia 2022 r.).

W badaniach wykorzystano transgeniczny szczep myszy TIF-IA^{DATCreERT2} (Rieker *et al.*, 2011) charakteryzujący się indukowaną, selektywną ablacją genu *TIF-1A* w komórkach wyrażających gen transportera dopaminy DAT (*Slc6a3*). Mutacja ta oparta jest na systemie Cre/loxP (Sauer & Henderson, 1988; Gu *et al.*, 1994; Tsien *et al.*, 1996) i zastosowaniu rekombinazy CreERT2, której aktywność indukowana jest poprzez podania tamoksyfenu (Feil *et al.*, 1997). Enzym ten rozpoznaje dwie sekwencje loxP umieszczone w sekwencji genu *TIF-1A* i na drodze rekombinacji usuwa fragment genu zlokalizowany między nimi. Białko TIF-1A to zwierzęcy homolog drożdżowego Rrn3p, oddziałuje z polimerazą i RNA i jest niezbędne do przebiegu procesów syntezy rRNA (Miller *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2002), natomiast jego brak prowadzi do zahamowania procesów powstawania nowych rybosomów, rozpadu jąderka i w konsekwencji do apoptozy komórki na drodze mechanizmu zależnego od białka p53 (Yuan *et al.*, 2005). U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} obserwuje się postępującą utratę neuronów dopaminergicznych śródmózgowia, tj. populacji istoty czarnej części zbitej i pola brzuszno nakrywki,

począwszy od 7. tygodnia po podaniach tamoksyfenu, natomiast od 13. tygodnia po podaniach tamoksyfenu wyraźnie pogarszają się ich zdolności ruchowe oceniane w teście pręta obrotowego (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). Podsumowanie procesów prowadzących do śmierci neuronów DAT+ u myszy tego szczepu zaprezentowano na rycinie 2.



Rycina 2. Schemat procesów prowadzących do indukowanej śmierci neuronów DAT+ u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}.

Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} były hodowane kongenicznie ze szczepem C57BL/6J przez dr. hab. Grzegorza Kreinera i mgr Monikę Bagińską w Zwierzętarni Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} były wykorzystane w dwóch doświadczeniach behawioralnych. W doświadczeniu I zbadano zachowanie samców i samic o genotypie zmutowanym [Cre Tg/0; flox/flox] i kontrolnym [Cre Tg/0; wt/wt], [Cre Tg/0; flox/wt] i [Cre 0/0]. Indukcję translokacji rekombinazy CreERT2 do jądra osiągnięto poprzez podania tamoksyfenu (Sigma, Niemcy) dootrzewnowo zwierzętom w wieku 9-11 tygodni (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). W doświadczeniu II wykorzystano samce [Cre Tg/0] i [Cre 0/0], którym podania tamoksyfenu wykonywano w wieku 12-14 tygodni. Tamoksyfen rozpuszczany był w spożywczym oleju słonecznikowym (20 mg/kg) i następnie przefiltrowywany przez filtr nitrocelulozowy o średnicy porów 22 µm. Tak przygotowaną zawiesinę podawano w dawce 2 mg/kg masy ciała w objętości 5 µl/g masy ciała raz dziennie przez 5 kolejnych dni. Doświadczenie II wykonano celem potwierdzenia części wyników behawioralnych oraz ich rozszerzenia o badania zachowań lękowych i pamięci krótkotrwałej, a także sprawdzenie efektów L-DOPA na ekspresję genów w przodomózgowiu.

Podania L-DOPA

Na początku 13. tygodnia po podaniach tamoksyfenu myszom w doświadczeniu I zostały wszczepione podskórnie w dolnej okolicy grzbietowej peletki z L-DOPA (dawka) lub placebo (Innovative Research of America, Stany Zjednoczone), które uwalniały lek przez 14 kolejnych dni. Zabieg polegał na rozcięciu znieczulonych miejscowo (Emla, AstraZeneca, Wielka Brytania) powłok skórnych, umieszczeniu pod nimi niewielkiej peletki przy pomocy pęsety i zamknięciu rany klejem do tkanek (Histoacryl, B Braun Surgical, Niemcy) i został wykonany przez dr Łucję Kudłę i mgr. Łukasza Szumca. Po operacjach podawano myszom namoczone jedzenie wprost na ściółkę, aby ułatwić zwierzętom pożywianie się.

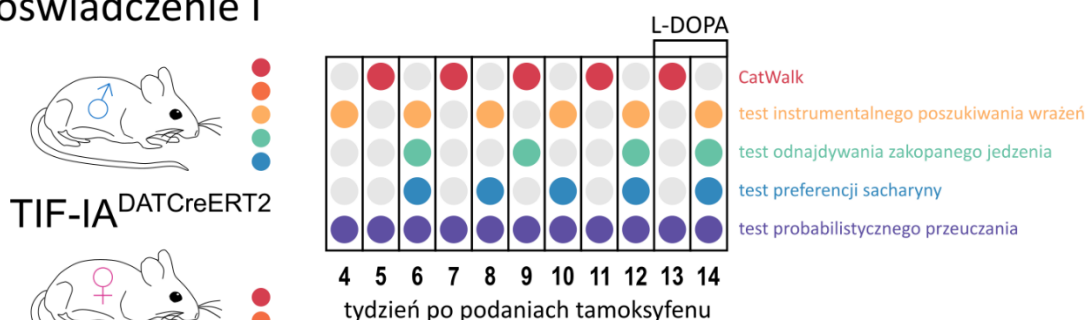
Myszy z doświadczenia II w 14. i 15. tygodniu po podaniach tamoksyfenu otrzymywały przez 14 kolejnych dni dwa dootrzewnowe podania. Jedna grupa zwierząt otrzymywała chlorowodorek benserazydu (Sigma) w dawce 5 mg/kg i objętości 5 μ l/g masy ciała i 30 minut później L-DOPA (Sigma) w dawce 18 mg/kg i objętości 10 μ l/g masy ciała, druga natomiast dwa podania soli fizjologicznej (Polpharma, Polska) w odstępie 30 minut i w objętości odpowiednio 5 i 10 μ l/g masy ciała. L-DOPA i chlorowodorek benserazydu zostały rozpuszczone w soli fizjologicznej, odpowiednio w stężeniu 1,8 mg/ml i 1 mg/ml, przy czym rozpuszczanie L-DOPA odbywało się z użyciem homogenizatora ultradźwiękowego. Począwszy od 13. lub 14. tygodnia po podaniach tamoksyfenu myszom z zaawansowanym fenotypem podawano namoczoną paszę na podłogę klatki.

Układ doświadczeń behawioralnych

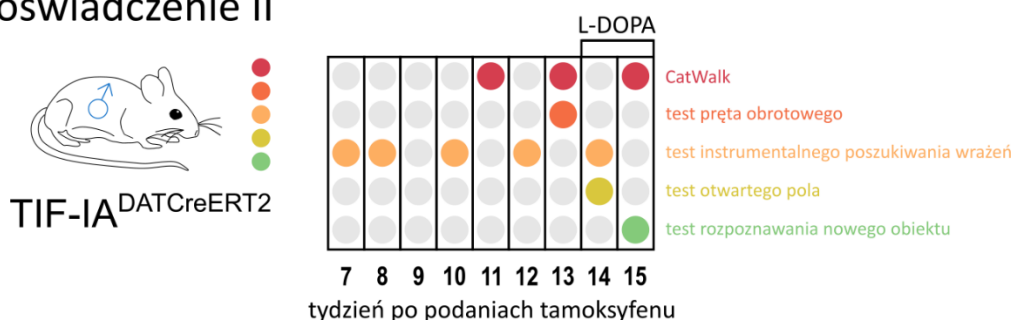
Badania zachowania zwierząt rozpoczęły się w 4. (doświadczenie I) lub 7. tygodniu (doświadczenie II) po zakończeniu podań tamoksyfenu. Przez kolejne tygodnie myszy były poddawane badaniom behawioralnym oraz pomiarom masy ciała. Podsumowanie badań behawioralnych zamieszczono na rycinie 3. Przeprowadzone testy miały na celu ocenę sprawności ruchowej myszy, ich funkcji poznawczych i wykonawczych, umiejętności uczenia się i pamięci, zdolności węchowych, lękliwości i preferencji picia słodkiej wody jako oznaki anhedonii. Doświadczenia obejmowały dwa okresy: okres rozwoju fenotypu, podczas którego obserwowano rozwój efektów mutacji, oraz okres podań L-DOPA. W doświadczeniu I myszy były poddane pierwszym procedurom w 25. dniu po podaniach tamoksyfenu, a testy odbywały się łącznie przez 15 tygodni, jednak prezentowane w rozprawie wyniki obejmują testy przeprowadzane od 4. do 14. tygodnia po tamoksyfenie włącznie, tj., do czasu ostatniego dnia podań L-DOPA. W doświadczeniu II myszy testowanie rozpoczęło się w 45. dniu po podaniach tamoksyfenu i trwało od 7. do końca 15. tygodnia. Różnice między doświadczeniami dotyczyły płci i wieku myszy używanych w doświadczeniach oraz wykonywanych testów behawioralnych i punktów czasowych wykonywania tychże. Różnica w płci użytych w obu doświadczeniach zwierząt wynikała z konieczności

zmniejszenia liczby zmiennych wpływających na zróżnicowanie ekspresji genów w doświadczeniu II. Inny wiek myszy zaś podyktowany był obserwacjami z doświadczenia I, że pierwsze wykrywalne zmiany behawioralne u zwierząt z mutacją obserwowane są w późniejszych punktach czasowych. Ponadto, jak wcześniej wspomniano, doświadczenie II stanowiło rozszerzenie wyników pierwszego z nich o dodatkowe testy behawioralne.

a. Doświadczenie I



b. Doświadczenie II



Rycina 3. Schemat doświadczeń behawioralnych wykonywanych z wykorzystaniem myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. (a) w doświadczeniu I badano zachowanie samców i samic w odmiennych testach na funkcje pozaruchowe. (b) w doświadczeniu II procedury wykonywano jedynie na samcach. Oba doświadczenia obejmowały testowanie różnorodnych funkcji ruchowych i pozaruchowych oraz 14-dniowe podania L-DOPA.

Liczebności zwierząt wykorzystanych w każdym z doświadczeń na początku ich przebiegu przedstawiono w tabeli 2. Dane w tabeli uwzględniają także osobniki, które nie uczestniczyły w dalszej części doświadczenia. Rzeczywista liczba myszy, które uczestniczyły w poszczególnych procedurach, była odmienna od przedstawionej ze względu na konieczność humanitarnego uśmiercenia pojedynczych osobników lub ich padnięcie. Ponadto, wskutek padnięcia jednego z dwóch osobników z jednej klatki, jeden z mutantów w doświadczeniu II był jedyną myszą w klatce bytowej podczas dwóch ostatnich tygodni wykonywania procedur. Tabela pokazuje zatem zbliżoną liczebność zwierząt o genotypie mutantu oraz kontrolnych na początku doświadczeń.

Tabela 2. Liczebności myszy wykorzystanych w doświadczeniach.

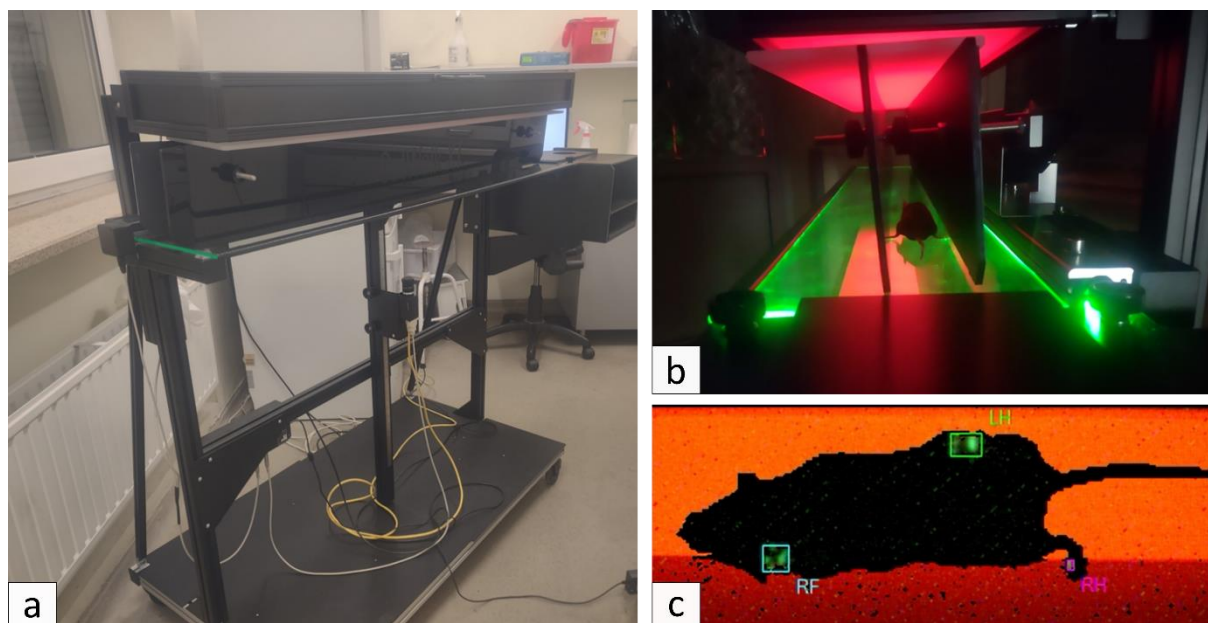
Kohorta zwierząt	Liczba mutantów	Liczba kontroli
Doświadczenie I – samice	9	13
Doświadczenie I – samce	10	12
Doświadczenie II – samce	13	17

Pomiary masy ciała

Podczas obu doświadczeń monitorowano masę ciała zwierząt w celu dobrania odpowiednich objętości podawanych substancji oraz oceny ich stanu zdrowia. Zwierzęta ważono pojedynczo, umieszczając je w naczyniach metalowych lub plastikowych. Pierwsze pomiary masy ciała wykonywano przez podaniem rozpoczęciem podań tamoksyfenu. Następnie, w okresie rozwoju fenotypu i podczas przyjmowania L-DOPA samce i samice z doświadczenia I ważono przed lub po wykonywaniu procedur behawioralnych (np. testu CatWalk) w odstępie 1-4 tygodni. W doświadczeniu II samce były ważone raz w tygodniu w okresie wykonywania testów behawioralnych oraz codziennie podczas podań L-DOPA.

Badanie sposobu poruszania się przy użyciu systemu CatWalk XT

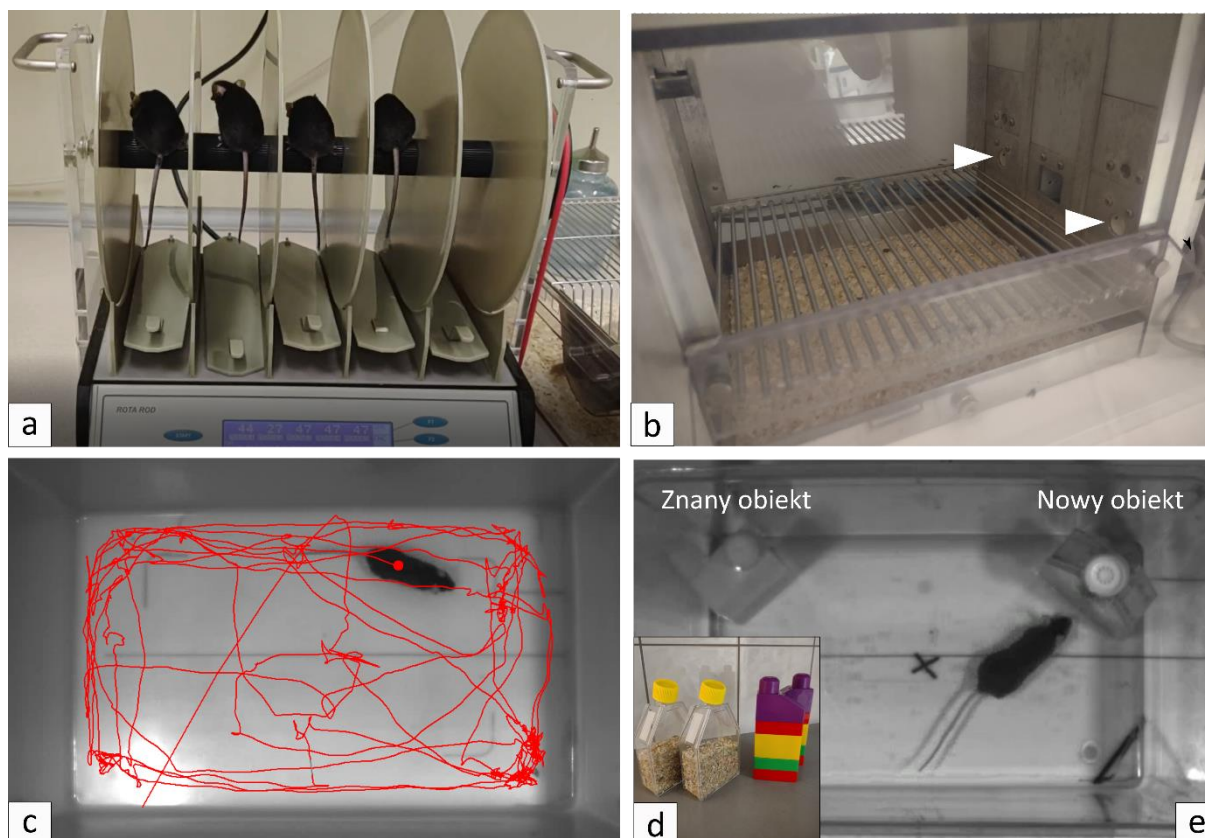
Ocena poruszania się była przeprowadzona u samic i samców z doświadczenia I (5., 7., 9., 11., 13., 15. i 17. tydzień po podaniach tamoksyfenu) oraz u samców z doświadczenia II (11., 13. i 15. tydzień po podaniach tamoksyfenu, godzinę po otrzymaniu drugiego zastrzyku) przy pomocy urządzenia CatWalk XT (Noldus, Holandia). Aparat CatWalk składa się ze szklanej płytki (130 × 20 × 0,5 cm) podświetlonej z boku na zielono, która jest przykryta czarnymi ściankami tworzącymi tunel i podświetlona od góry na czerwono (Ryc. 4a). W ciemności zwierzę swobodnie porusza się w tunelu aparatu. Pod spodem płytki znajduje się kamera, która rejestruje przechodzenie zwierzęcia po zdefiniowanym odcinku (Ryc. 4b). Na nagraniach (Ryc. 4c) spód łap w miejscu kontaktu z płytką jest podświetlony na zielono. Nagrania te były tworzone i następnie analizowane w programie CatWalkXT v10.6, w którym przypisanie odcisków do poszczególnych łap odbywało się automatycznie, lecz z korektą eksperymentatora. Na tej podstawie program obliczał ponad 200 parametrów opisujących prędkość ruchu, rozstaw łap i wielkość ich odcisków, kolejność stawiania kończyn podczas poruszania się i inne pokrewne pomiary. Podczas każdej sesji testowej uzyskiwano 2-6 nagrań przejść myszy po tunelu od każdego osobnika bez zatrzymywania się.



Rycina 4. Zdjęcia obrazujące działanie systemu CatWalk XT. (a) wygląd aparatu; (b) tunel, w którym porusza się mysz; (c) fragment klatki z nagrania z rozpoznanymi przez program odciskami łap: prawej przedniej (RF) i tylnej (RH) oraz lewej tylnej (LH).

Test pręta obrotowego „rotarod”

Test był wykonany na samcach z doświadczenia II (13. tydzień po podaniach tamoksyfenu). Wykonanie testu miało na celu ocenę koordynacji ruchowej zwierząt podczas poruszania się na urządzeniu Rotarod 47600 v04 (UGO BASILE, Włochy). Urządzenie składa się z poziomo umieszczonego walca, który obraca się w jedną stronę z zadaną prędkością i jest rozdzielony na 5 części, aby kilka myszy mogło jednocześnie uczestniczyć w teście (Ryc. 5a). Procedura trwała dwa dni. Pierwszego dnia (trening) myszy były umieszczone na 5 minut na pręcie obracającym się ze stałą prędkością 6 obrotów na minutę (ang. *rotations per minute*, rpm) przodem w kierunku przeciwnym do obrotu. Gdy mysz zmieniła kierunek poruszania, spadła lub pozostawała wczepiona do pręta, eksperymentator ponownie umieszczał ją na urządzeniu we właściwy sposób. Drugiego dnia podczas fazy testowej myszy były ponownie umieszczane na pręcie obracającym się z prędkością 6 rpm, a po 20 s od umieszczenia ostatniej myszy w danej turze aparat zwiększał prędkość z 6 do 40 rpm w ciągu 5 minut. Czas do upadku oraz odpowiadająca mu prędkość obrotu były zapisywane przez eksperymentatora.



Rycina 5. Zdjęcia wybranych testów behawioralnych przeprowadzanych na myszach TIF-IA^{DATCreERT2}. (a) Samce podczas treningu na pręcie obrotowym. (b) Klatka Skinnera używana podczas testu instrumentalnego poszukiwania wrażeń – strzałki wskazują otwory do odpowiedzi instrumentalnej. (c) klatka z nagrania myszy podczas testu otwartego pola analizowanego w programie EthoVision – czerwona linia reprezentuje drogę pokonaną przez mysz. (d) Obiekty wykorzystywane w teście rozpoznawania nowego obiektu oraz (e) klatka z nagrania tegoż testu przedstawiająca mysz eksplorującą jeden z obiektów.

Test instrumentalnego poszukiwania wrażeń

Test przeprowadzono na samcach w doświadczeniu I (po 3 sesje testowe co 2 tygodnie od 6. do 16. tygodnia po podaniach tamoksyfenu) i w doświadczeniu II (po 3 sesje testowe co 2 tygodnie od 8. do 14. tygodnia po podaniach tamoksyfenu, godzinę po otrzymaniu ostatniego zastrzyku); przed fazą testową zwierzęta zostały poddane treningowi, który trwał przez 5 kolejnych dni (w 4. i 7. tygodniu po podaniach tamoksyfenu odpowiednio w doświadczeniu I i II). W procedurze badano tendencję myszy do poszukiwania wrażeń, a także ich funkcje wykonawcze, zdolność uczenia się odruchu instrumentalnego i pamięć (Olsen & Winder, 2009; Rodriguez Parkitna *et al.*, 2013; Sikora *et al.*, 2019). W każdej sesji myszy były umieszczane pojedynczo na 1 godzinę w klatkach Skinnera ENV-307W (Med Associates, Stany Zjednoczone) umieszczonych w tłumiących dźwięk obudowach. W środku klatki była zapalona lampa i włączona wentylacja. Na jednej ze ścianek klatki, około 2 cm nad jej podłogą, rozmieszczone były dwa otwory (Ryc. 5b). Umieszczenie pyszczka w jednym z nich („otwór aktywny”)

było sprzężone z prezentacją bodźców, w drugim („otwór nieaktywny”) – nie miało konsekwencji. Podczas prezentacji bodźców lampka w klatce gaśla, umieszczona nad otworem aktywnym dioda migłała z częstotliwością 0,625, 1,25, 2,5 lub 5 Hz i czasem trwania sygnału 2, 4, 6 lub 8 s oraz rozlegał się monotonny dźwięk o częstotliwości 2,9 kHz generowany przez moduł ENV-323AW Sonalert. Przez cały czas trwania doświadczenia lokalizacja aktywnego otworu dla danej myszy pozostawała niezmienna. Liczba wetknięć pyszczka do obu otworów była odczytywana i zapisywana przy pomocy oprogramowania komputerowego MED-PC IV v4.2 (Med Associates).

Test otwartego pola

Test był wykonany na myszach z doświadczenia II (14. tydzień po podaniach tamoksyfenu, godzinę po podaniu drugiego zastrzyku), a jego wykonanie służyło ocenie aktywności lokomotorycznej oraz tendencji myszy do unikania otwartych przestrzeni i poruszania się przy ścianach, jako miarę lęklivosti (Simon *et al.*, 1994; Gould, 2009). Myszy były umieszczane pojedynczo na środku nowej, nieprzezroczystej klatki (53 × 32 × 19 cm) o natężeniu oświetlenia około 10-12 luksów, na 10 minut. Ich zachowanie było nagrywane przez umieszczoną około 1 m nad dnem klatki kamerę (acA1300 – 60 gm, Basler, Niemcy) przy pomocy oprogramowania EthoVision v11.5 (Noldus). Myszy przebywały w klatkach domowych w pokoju doświadczalnym co najmniej przez 15 minut przed rozpoczęciem testu. Po teście były umieszczane w oddzielnej klatce, dopóki ostatnia mysz z danej klatki domowej nie zakończyła testu. W pomieszczeniu doświadczalnym panował półmrok i był włączony odbiornik radiowy, aby zmniejszyć efekt hałasu otoczenia na zachowanie myszy. Na czas procedury eksperymentator opuszczał pomieszczenie i zamykał drzwi. Nagrania były analizowane za pomocą oprogramowania EthoVision v15.0 (Ryc. 5c). Wyznaczono w nim środkowy obszar o wymiarach 41 × 21 cm w celu analizy tendencji do przebywania myszy w bliskim sąsiedztwie ścianek klatki (do 5 cm). Program identyfikował mysz na nagraniu poprzez automatyczne ustawienia (zakres wartości czerni: 48 lub 49 do 255). Analizie poddano wybrane parametry: całkowity dystans przebyty podczas testu, średnie przyspieszenie, czas przebywania wewnątrz obszaru środkowego oraz poza nim.

Test rozpoznawania nowego obiektu

Test przeprowadzono na myszach w doświadczeniu II w 15. tygodniu po podaniach tamoksyfenu. Celem wykonania go było zbadanie pamięci krótkotrwałej myszy (Antunes & Biala, 2012) oraz pamięci rozpoznawczej. Test przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Leger i wsp. (2013). Procedura trwała 3 następujące po sobie dni (101., 102. i 103. po przyjęciu ostatniej dawki tamoksyfenu) i każda z części rozpoczynała się po godzinie od wykonania drugiego zastrzyku (L-DOPA lub sól fizjologiczna). Pierwszego dnia – podczas fazy habituacji – myszy były przyzwyczajane

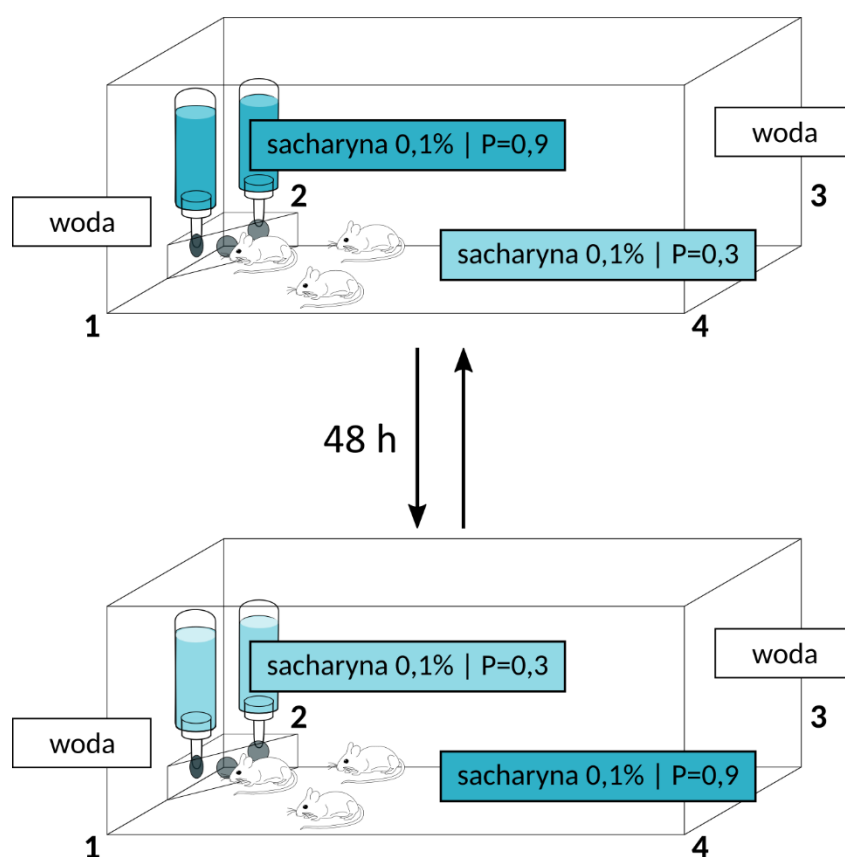
do nowej klatki testowej z przezroczystymi ściankami ($37 \times 21 \times 18,5$ cm) bez ściółki, w której przebywały przez 5 minut każda. Drugiego dnia przeprowadzono trening: do klatki wkładano dwa identyczne obiekty, umieszczone przy rogach jednej ze ścianek klatki. Obiektami tymi były: dwie butelki do hodowli komórkowej ($8 \times 3,8 \times 15,5$ cm) wypełnione do około połowy wysokości drobnym żwirem lub dwie ułożone z klocków (Mega Bloks, Kanada) budowle przypominające butelki ($6,2 \times 3 \times 15,5$ cm; obiekty przedstawia rycina 5d). Podczas treningu mysz przebywała w klatce z obiektami przez 10 minut. Trzeciego dnia miał miejsce właściwy test, który również trwał 10 minut, a w klatce testowej znajdował się jeden znany obiekt i jeden nieznaną obiekt, tj. butelka ze żwirem i budowla z klocków (Ryc. 3e). Umieszczenie nowego obiektu było pseudolosowe i ustalone *a priori* przez eksperymentatora tak, aby dla połowy myszy z danej grupy eksperymentalnej był on umieszczony po lewej stronie. Każdy z etapów procedury był nagrywany przez umieszczoną około 1 m nad dnem klatki kamerę (acA1300 – 60 gm, Basler) przy pomocy programu EthoVision v11.5 (Noldus). Czas eksploracji każdego z obiektów był wyznaczony podczas analizy nagrań przy pomocy oprogramowania BORIS v7.13.6 (Friard & Gamba, 2016). Jako eksplorację obiektu traktowano zdarzenie, podczas którego nos myszy był skierowany w kierunku obiektu i znajdował się w jego bezpośrednim sąsiedztwie a zachowanie myszy wskazywało na zainteresowanie tym obiektem, a nie np. chęć zbadania otoczenia. Wskaźnik rozpoznania nowego obiektu (ang. *recognition index*) został obliczony jako iloraz czasu spędzonego na eksploracji nowego obiektu do całkowitego czasu spędzonego na eksploracji obu obiektów (Antunes & Biala, 2012) i wyrażony w procentach. Z analizy danych wykluczono zwierzęta, których łączny czas eksploracji obu obiektów był mniejszy niż 5 s.

Każdorazowo myszy były umieszczane w klatkach domowych w pokoju eksperymentalnym co najmniej 14 minut przed rozpoczęciem procedury przez pierwszą z nich. W pokoju eksperymentalnym panował półmrok i było włączone radio, aby zmniejszyć lękowe reakcje myszy spowodowaną ewentualnym hałasem w pokojach obok. Na czas procedury eksperymentator opuszczał pomieszczenie i zamykał drzwi.

Test probabilistycznego przeuczania

Test był wykonany na samicach w doświadczeniu I i odbywał się w klatce ze zautomatyzowanym systemem obserwacji aktywności zwierząt IntelliCage (TSE Systems, Niemcy). W rogach przezroczystej klatki o wymiarach $55 \times 37,5 \times 20,5$ cm były umieszczone narożniki z butelkami o pojemności 250 ml oraz układem do detekcji zwierząt i regulowania dostępu do nosków butelek. Dostęp do nosków był zabezpieczony drzwiczkami i kontrolowany przez oprogramowanie odczytujące obecność myszy w rogu. Detekcja myszy przez czujnik zamieszczony w narożniku odbywała się dzięki transponderom

RFID (UNO PICO ID, AnimaLab, Polska) umieszczonym podskórnie w okolicy karku i łopatek myszy. Wszczepienie transponderów odbyło się w 4. tygodniu po podaniach tamoksyfenu i zostało przeprowadzone przez mgr. Łukasza Szumca. Po wszczepieniu transponderów myszy zostały umieszczone w dwóch klatkach testowych (po 11 osobników w każdej), w których przebywały do 18. tygodnia po podaniach tamoksyfenu, do zakończenia doświadczenia i były wyjmowane jedynie do przeprowadzenia innych procedur behawioralnych, pomiarów masy ciała i operacji. Na podłodze klatki znajdowała się ściółka oraz cztery obiekty służące jako schronienie; dostęp do pokarmu był zapewniony, jak w klatce domowej, na pokrywie klatki.



Rycina 6. Schemat przeprowadzenia testu probabilistycznego przeuczania w klatkach IntelliCage. W każdym z narożników klatki (1-4) umieszczone były programowalne przedziały regulujące dostęp do nosków dwóch butelek zawierających wodę (narożniki nr 1 i 3) lub roztwór sacharyny (2 i 4), których schemat pokazano w narożniku nr 2. Co 48 godzin w narożnikach nr 2 i 4 prawdopodobieństwo otwarcia drzwiczek do butelek z sacharyną zmieniało się z 0,3 a 0,9, co wymuszało u myszy przeuczanie, aby częściej korzystać z narożnika o $P=0,9$. Umieszczenie butelek z wodą i z sacharyną w poszczególnych narożnikach pozostawało niezmiennie a dostęp do butelek z wodą był zapewniony stale.

Procedura składała się z trzech etapów. W etapie pierwszym (4 doby) myszy przyzwyczajano do obecności w klatce i wchodzenia do narożników w celu napicia się. Wszystkie 8 butelek zawierało wodę. Mysz, która nie nauczyła się korzystać z narożników w ciągu doby, została odrzucona

z doświadczenia. W etapie drugim (7 dób) nastąpiła adaptacja do obecności słodkiego napoju i limitowania dostępu do niego. 4 butelki – po 2 w dwóch przeciwległych narożnikach – zawierały 0,1% (waga/obj.) roztwór sacharyny (Sigma). Dostęp do wody pozostawał nieograniczony, natomiast dostęp do roztworu sacharyny był blokowany w 10% próbach wypicia (prawdopodobieństwo uzyskania dostępu do nosków butelki $P = 0,9$). Co 2 doby zmieniała się lokalizacja narożników z butelkami wypełnionymi roztworem sacharyny. W etapie trzecim, testowym, lokalizacja narożników zawierających butelki z roztworem sacharyny pozostawała niezmienna, zmieniało się natomiast prawdopodobieństwo uzyskania dostępu do sacharyny w poszczególnych narożnikach (Ryc. 6). Jeden z narożników zapewniał dostęp do nosków butelek z roztworem sacharyny z $P = 0,3$, drugi z nich z $P = 0,9$. Zmiana następowała co 48 godzin o 1:00. Obecność myszy we wszystkich narożnikach („wizyty”), czas trwania wizyt, liczba liżnięć nosków butelek podczas picia były odczytywane i zapisywane przez wspomniane oprogramowanie. Dane te były przetworzone do dalszych procedur analitycznych przez skrypt w języku programowania R stworzony przez mgr Jodytę Jabłońską (<https://github.com/jmjablons>).

Test znajdowania zakopanego jedzenia

Test przeprowadzano na myszach z doświadczenia I (6., 9., 12. i 14. tydzień po podaniach tamoksyfenu) według protokołu opisanego przez Yang i Crawley (2009) z modyfikacjami. Celem wykonania testu była ocena występowania zaburzeń zmysłu węchu. Myszy były umieszczane pojedynczo w dużej, nieprzezroczystej klatce ($53 \times 32 \times 19$ cm) z warstwą ściółki osikowej o grubości 3 cm, którą to klatkę mogły swobodnie eksplorować przez 5 minut. Następnie były przekładane na chwilę do małej klatki, podczas gdy eksperymentator umieszczał przy jednym z rogów klatki pod ściółką krakers Sunbites (FritoLay, Polska) o masie około 2 g i smaku warzywnym. Pozycja krakersa była dla każdej myszy zmieniana z kolejną sesją, aby uniknąć zapamiętywania położenia. Mysz była następnie ponownie umieszczana w klatce, w rogu naprzeciwległym do pozycji krakersa. Eksperymentator mierzył czas do rozpoczęcia kopania w ściółce w miejscu, gdzie ukryty był krakers, oraz czas do pochwycenia krakersa, tj. jego odkopania lub rozpoczęcia spożycia. Przed każdą sesją krakersy były wkładane do klatek domowych myszy na dwa dni przed testem, a przed pierwszą sesją na dwa i trzy dni przed. Na dobę przed testem myszy były pozbawione dostępu do karmy.

Test preferencji sacharyny

Test został przeprowadzony na samcach myszy z doświadczenia I (6., 8., 10., 12. i 14. tydzień po podaniach tamoksyfenu). Celem przeprowadzenia procedury było wykrycie zachowań świadczących o anhedonii na podstawie braku preferencji smaku słodkiego (Papp *et al.*, 1991). Samce były

umieszczane pojedynczo w niewielkich, przezroczystych klatkach ($26 \times 20 \times 13,5$ cm) ze ściółką i pokarmem na 24 godziny. Myszy miały swobodny dostęp do picia dwóch roztworów: wody oraz 0,1% (wag./obj.) roztworu sacharyny (sól sodowa, Sigma), które umieszczone były w pipetach miarowych o objętości 25 ml. Po 24 godzinach eksperymentator zapisywał zmiany w objętości obu cieczy i na podstawie tych pomiarów obliczono objętość wypitych cieczy oraz preferencję sacharyny wyrażoną w procentach. Aby upewnić się, że pipety nie przeciekają, 30 minut przed rozpoczęciem testu pozostawiono je i odczytywano różnice w stosunku do poziomu wyjściowego. Natomiast końcowe pomiary równe lub przekraczające wypicie 20 ml którejkolwiek z cieczy zostały odrzucone z analiz ze względu na prawdopodobny ubytek cieczy w wyniku przeciekania butelki.

Pobranie mózgowia i jego preparatyka

Myszy zostały uśmiercone poprzez dyslokację kręgów szyjnych w 123. dniu (doświadczenie I) lub 107. dniu po ostatniej dawce tamoksyfenu (doświadczenie II, godzinę po otrzymaniu ostatniego zastrzyku z L-DOPA lub solą fizjologiczną). Ich mózgowia zostały pobrane na lodzie i użyte do dalszych analiz zgodnie z metodyką doświadczeń I i II.

Utrwalenie i skrawanie tkanki – doświadczenie I

Mózgi myszy z doświadczenia I zostały utrwalone w 4% (wag./obj.) roztworze paraformaldehydu (Roth, Niemcy) w 4°C przez dwie doby, a następnie umieszczone w 0,4% (wag./obj.) roztworze paraformaldehydu. Po 55 dniach tkankę przechowywano w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS; Serva, Niemcy) z 0,05% (obj./obj.) tiomersalem (Sigma). Mózgi były cięte na skrawki o grubości $40\ \mu\text{m}$ z użyciem wibratomu VT1200 (Leica, Niemcy), które umieszczano w studzienkach płytki 48-dołkowej wypełnionej $150\ \mu\text{l}$ PBS lub PBS z tiomersalem i przechowywano w 4°C aż do wykonania procedury barwienia. Skrawki pobierano z trzech okolic mózgowia, z przekroju w płaszczyźnie czołowej: głównej opuszki węchowej (Bregma $\sim 4,28$ do $3,92\ \text{mm}^1$), prążkowania (Bregma $\sim 1,54$ do $0,14\ \text{mm}$) oraz śródmózgowia (Bregma $\sim -2,92$ do $-3,16\ \text{mm}$).

Zamrożenie tkanki – doświadczenie II

Mózgi myszy z doświadczenia II po przepłukaniu w soli fizjologicznej i odsączeniu przy pomocy ręcznika papierowego były umieszczane w foremkach do zatapiania tkanki typu Peel-A-Way (Polysciences) i zatapiane w medium Optimal Cutting Temperature (OCT; Cell Path). Foremki były umieszczane w zlewce zawierającej izopentan (Sigma), znajdującej się w naczyniu z ciekłym azotem, dopóki OCT nie

¹ Koordynaty podano według atlasu mózgu mysiego autorstwa G. Paxinosa i K. Franklina (2001).

stawało się białe, co świadczyło o jego zamrożeniu. Foremki umieszczano w pojemniku z suchym lodem, a po zamrożeniu ostatniego mózgu bloczki przekładano do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml. Mózgi przechowywano w temperaturze -80°C .

Bloczki były krojone w płaszczyźnie czołowej przy użyciu kriostatu CM 3050 S (Leica) z temperaturą komory -20°C i temperaturą obiektu ustawioną na -13°C na skrawki o grubości $10\text{ }\mu\text{l}$ z trzech obszarów: Bregma $\sim 1,18\text{--}1,98\text{ mm}$ z przeznaczeniem na przestrzenne profilowanie ekspresji, następne 15 skrawków z obu półkul mózgu lub 30 skrawków z jednej z półkul z przeznaczeniem na ocenę jakości RNA oraz 12 skrawków z obszaru Bregma $\sim 0,02\text{ do }1,1\text{ mm}$ w celu ich wybarwienia na obecność hydroksylazy tyrozynowej. Tkanę i pobrane skrawki transportowano w pojemniku z suchym lodem. Szkiełka mikroskopowe, bloczki tkanki oraz probówki typu Eppendorf były umieszczane w komorze kriostatu co najmniej 30 minut przed rozpoczęciem krojenia w celu ustabilizowania ich temperatury i uniknięcia uszkodzeń tkanki.

Barwienia immunofluorescencyjne na obecność hydroksylazy tyrozynowej

W celu weryfikacji stopnia utraty neuronów dopaminergicznych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} wykonano barwienia na obecność hydroksylazy tyrozynowej (TH) metodą immunofluorescencji w wybranych strukturach mózgowia. Z uwagi na sposób utrwalenia chemicznego lub zamrożenia tkanki procedury te były odmienne dla skrawków pobranych w każdym z doświadczeń, jednak użyto w nich tych samych przeciwciał pierwszorzędowych: Anti-Tyrosine Hydroxylase Antibody, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone, nr kat. AB1542. W doświadczeniu I użyto przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fluoresceiną (Rabbit Anti-Sheep IgG Antibody (H+L), Fluorescein, Vector Laboratories, nr kat. FI-6000), natomiast w doświadczeniu II – skoniugowanych z barwnikiem Alexa 488 (Donkey anti-Sheep IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, Invitrogen, nr kat. A-11015).

W doświadczeniu I skrawki barwienie wykonano na skrawkach utrwalonych w paraformaldehydzie. Procedurę wykonano na podstawie opublikowanego wcześniej protokołu (Mustafa *et al.*, 2021). Utrwalone skrawki przepłukano w PBST (PBS z 0,2% (obj./obj.) Tritonem X-100 (Amresco, Stany Zjednoczone), a następnie przez 30 minut blokowano w roztworze blokującym, na który składała się 5% (obj./obj.) surowica świńska (Vector Laboratories, Stany Zjednoczone) w PBST. Skrawki inkubowano z roztworem przeciwciała pierwszorzędowego anti-TH (1:500 w roztworze blokującym) przez noc w 4°C na kołysce laboratoryjnej. Drugiego dnia przepłukano je trzykrotnie roztworem PBST i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (1:100 w roztworze blokującym) przez godzinę na kołysce, chroniąc przed światłem. Skrawki następnie przepłukano PBST i PBS i zamknięto preparaty

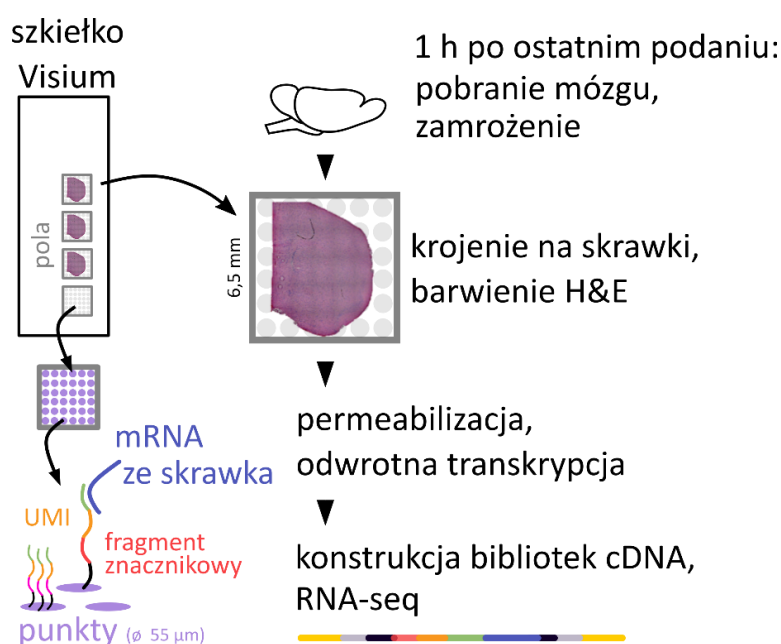
przy użyciu medium VECTASHIELD® HardSet™ Antifade Mounting Medium z DAPI. Gotowe preparaty przechowywano w 4°C w ciemności i obrazowano w ciągu 2 tygodni od wybarwienia przy pomocy mikroskopu Leica DMI8 w konfiguracji konfokalnej z systemem TCS SP8 X (Leica Microsystems, Niemcy) i obiektywami HC PL FLUOTAR 10x (0.30) i 40x (0.60) oraz przy użyciu programu Leica Application Suite X (Leica Microsystems). Wszystkie preparaty obrazowano przy jednakowych ustawieniach parametrów mikroskopu a gotowe obrazy w kanale zielonym (fluoresceiny) zapisywano ze zmienionym ustawieniem parametru gamma z 1 na 0,3.

W doświadczeniu II procedura barwienia przeciwko TH została zmodyfikowana doświadczalnie dla skrawków mroźniowych. Szkiełka z zamrożonymi skrawkami zostały przetransportowane z -80 °C w pojemniku z suchym lodem i umieszczone w probówce o pojemności 50 ml typu falkon z metanolem cz.d.a. (POCH, Polska) w -20°C przez 30 min. Po utrwaleniu były przepłukane lodowatym PBS i permeabilizowane przez 15 minut w PBST (PBS z 0,2% (obj./obj.) Tritonem X-100 na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu PBS przez 5 minut na kołysce skrawki poddano blokowaniu przez 30 minut w temperaturze pokojowej na kołysce w roztworze blokującym, na który składała się 5% (obj./obj.) surowica świńska (Vector Laboratories) w PBST. Następnie szkiełko umieszczono w kasetce Visium (10xGenomics), która oddzielała od siebie skrawki. Każdy skrawek inkubowano z roztworem przeciwciała pierwszorzędowego anti-TH (1:200 w roztworze blokującym) w 4°C na kołysce przez noc. Następnego dnia wyjęto szkiełko z kasetki i przepłukano dwukrotnie po 5 minut i jednokrotnie przez 15 minut w PBS na kołysce. Przepłukane szkiełko umieszczono ponownie w przepłukanej wodą kasetce. Skrawki inkubowano z roztworem przeciwciała drugorzędowego (1:400 w roztworze blokującym) przez godzinę w temperaturze pokojowej na kołysce, chroniąc przed światłem. Po inkubacji szkiełko wyjęto z kasetki, płukano trzykrotnie po 5 minut w PBS na kołysce. Po wyschnięciu skrawków, preparat zamykano medium z DAPI Mounting Medium With DAPI (Abcam, nr kat. ab104139) a krawędzie szkiełka nakrywkowego obwiedziono lakierem do paznokci, aby zabezpieczyć je przed przesunięciem lub wypłynięciem preparatu. Preparaty obrazowano przy pomocy mikroskopu Leica DMI8 w konfiguracji fluorescencyjnej z lampą EL6000 i kostką filtrującą do jednoczesnego wzbudzenia i detekcji w pasmach dla DA/FTC/TXR oraz z użyciem obiektywu HC PL FLUOTAR 10x NA: 0.30 (DRY). Obrazy zapisywano dzięki kamerze DFC 7000 i przy pomocy programu Leica Application Suite X v3.5.2.18963. Akwizycji obrazu dla każdego ze skrawków dokonano przy jednakowych ustawieniach parametrów mikroskopu i kamery a gotowe obrazy zawierające złączone kanały eksportowano ze zmienionym ustawieniem parametru gamma z 1 na 0,5.

Profilowanie przestrzenne ekspresji genów myszy metodą transkryptomiki przestrzennej

Opis metodyki

Profilowanie przestrzenne ekspresji genów zostało wykonane na skrawkach przodomózgowia zwierząt z doświadczenia II z wykorzystaniem techniki Visium (10xGenomics, Stany Zjednoczone). Najważniejsze etapy tej metodyki przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 7. Schematyczne przedstawienie głównych etapów metodyki Visium użytej do profilowania przestrzennego ekspresji genów myszy z doświadczenia II. 1 h po ostatnich podaniach L-DOPA lub soli fizjologicznej myszy były uśmiercone a ich mózgowia pobrano niezwłocznie i zamrożono. Skrawki przodomózgowia były umieszczane na kwadratowych polach szkiełek Visium zawierających 4992 punkty o średnicy 55 µm, z których każdy zawierał oligonukleotydowe startery wyróżniające się charakterystyczną dla danego punktu sekwencją znacznikową (kolor czerwony) oraz fragment unikatowego identyfikatora molekularnego (ang. Unique Molecular Identifier, UMI; kolor pomarańczowy) znakujący indywidualny starter. Wybarwione hematoksyliną i eozyną (H&E) skrawki były poddane następnie permeabilizacji, która umożliwiała uwolnienie poli(A) mRNA z komórek i jego hybrydyzację do starterów na szkiełku Visium. Na matrycy mRNA i starterów przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji. Gotowe biblioteki cDNA (na dole) zawierające fragment znacznikowy punktu i UMI były poddawane sekwencjonowaniu RNA.

Metoda ta opiera się na użyciu szkiełek podstawowych, które posiadają 4 pola o wymiarach 6,5 × 6,5 mm zawierające macierz 4992 punktów o średnicy 55 µm każdy. Jeden punkt zawiera miliony sekwencji oligonukleotydowych, które hybrydują do 3' końcowej sekwencji poli(A) cząsteczek mRNA w tkance skrawka nałożonego na pole. Każda z tych sekwencji, służących następnie jako starter do

reakcji odwrotnej transkrypcji, zawiera fragment znacznikowy (ang. *barcode*) unikalny dla danego punktu (16 nukleotydów), który staje się częścią cDNA, a następnie biblioteki poddawanej sekwencjonowaniu. Podczas analizy danych fragment znacznikowy odczytu pozwala zwiualizować pochodzenie transkryptu z konkretnego punktu w tkance. 12-nukleotydowy fragment unikatowego molekularnego identyfikatora (ang. *Unique Molecular Identifier, UMI*) umożliwia zidentyfikowanie indywidualnej cząsteczki mRNA, która hybryduje do tego startera.

Na procedurę składają się kolejno: barwienie i obrazowanie skrawków, permeabilizacja, synteza cDNA i drugiej nici, jego amplifikacja, konstrukcja bibliotek, sekwencjonowanie, analiza i wizualizacja danych. W procedurach postępowało według protokołów producenta: Visium Spatial Protocols – *Tissue Preparation Guide Rev. D, Methanol Fixation, H&E Staining & Imaging for Visium Spatial Protocol Rev. C, Visium Spatial Gene Expression User Guide Rev. E*. W niniejszym doświadczeniu metodą transkryptomiki przestrzennej zbadano 12 skrawków z użyciem 3 szkiełek Visium; każdy skrawek pochodził od innego osobnika: 5 skrawków uzyskano od mutantów TIF-IA^{DATCreERT2}, które otrzymywały benserazyd i L-DOPA, 5 od mutantów, które otrzymywały podania soli fizjologicznej oraz 2 od zwierząt kontrolnych traktowanych solą fizjologiczną.

Barwienie i obrazowanie skrawków

Skrawki o grubości 10 µm zostały utrwalone w metanolu (POCh) przez 30 minut w -20 °C a następnie wybarwione hematoksyliną i eozyną według protokołu załączonego do zestawu odczynników Visium. Ich obrazowanie miało miejsce tuż po wybarwieniu i zostało wykonane przy pomocy mikroskopu Leica DMI8 w konfiguracji jasnego pola i przy użyciu programu Leica Application Suite X v3.5.2.18963. Każdy ze skrawków był obrazowany oddzielnie z użyciem obiektywu HC PL FLUOTAR 10x NA: 0.30 (DRY) i kamery DFC 7000 z następującymi ustawieniami: głębia koloru 8 bit, rozdzielczość pojedynczej ramki 1920x1440 pikseli, gain 10, nasycenie koloru 22, intensywność 21, apertura 24, czas ekspozycji 4,5 ms. Obrazy zachowane w formacie .tif zostały następnie użyte do określenia pola powierzchni macierzy objętej tkanką w programie Loupe Browser v6.0 (10xGenomics) i wygenerowania plików .json służących do dalszych analiz w łańcuchu przetwarzania danych programu Space Ranger.

Synteza cDNA

Po obrazowaniu szkiełko ze skrawkami zostało umieszczone w kasetce pozwalającej na dodawanie odczynników oddzielnie na każdy skrawek. Kolejne kroki procedury (inkubacja skrawków, reakcje PCR) zostały przeprowadzone z użyciem termocyklera T100 (Bio-Rad). Skrawki następnie poddano permeabilizacji enzymatycznej przez 8 minut. Czas ten został dobrany doświadczalnie na podstawie wcześniej przeprowadzonej procedury optymalizacji (zestaw odczynników *Visium Spatial Tissue*

Optimization Reagents Kits), podczas której przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej sprawdza się intensywność i ostrość sygnału z wyznakowanego fluorescencyjnie cDNA ze skrawków poddanych permeabilizacji przez różną długość czasu. Dzięki etapowi permeabilizacji błon komórkowych mRNA obecne w komórkach zostaje z nich uwolnione i może dyfundować na szkiełko Visium ze starterami. Na matrycy cząsteczek mRNA uwolnionych z tkanki i zhybrydowanych do starterów zsyntetyzowano cDNA w temperaturze 53°C. W kolejnym etapie wykonano syntezę drugiej nici w temperaturze 65°C, po której przeniesiono po 35 µl próbek do 5 µl buforu Tris (1 M, pH 7,0) w probówkach typu Eppendorf wolnych od nukleaz i wymieszano przy pomocy wstrząsarki. Następnie przeprowadzono reakcję qPCR z użyciem KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Roche, Szwajcaria) i 1 µl roztworu cDNA w buforze. Linię progową ustalono, zgodnie z protokołem, na około 25% maksymalnej wartości sygnału fluorescencji na wykresie krzywej amplifikacji, tj. dla RFU (ang. *Relative Fluorescence Units*) wynoszącego około 265 lub 300 w przypadku każdego z 3 szkiełek. Odczytano wartości C_q odpowiadające linii progowej dla każdej próbki i na tej podstawie, zaokrąglając do liczb całkowitych, wyznaczono całkowitą liczbę cykli amplifikacji cDNA w kolejnym kroku. Namnożone cDNA zostało oczyszczone ze zbędnych składników roztworu przy pomocy paramagnetycznych kulek SPRIselect (Beckman Coulter, Stany Zjednoczone) w stosunku 1:0,6 (objętość mieszaniny kulek do objętości próbek po amplifikacji), separatora magnetycznego i 80% (obj./obj.) roztworu etanolu. Oczyszczone próbki cDNA eluowano buforem Buffer EB (QIAGEN). Uzyskano 40 µl próbek i wymieszano. 1 µl próbek został wykorzystany do oceny jakościowej i ilościowej cDNA z użyciem aparatu Bioanalyzer 2100 i zestawu odczynników High Sensitivity DNA Kit (Agilent). Na podstawie odczytanego stężenia wagowo-objętościowego obliczono całkowitą ilość uzyskanego cDNA.

Konstrukcja bibliotek i ich sekwencjonowanie

Następnego dnia po syntezie cDNA wykonano procedury służące uzyskaniu pełnych sekwencji bibliotek kompatybilnych z sekwenatorami Illumina. Do kolejnych etapów wykorzystano 25% całkowitej objętości uzyskanego cDNA, tj. 10 µl. Próbki zostały poddane fragmentacji, naprawie końców i dodania deoksyadenozyny na końcu 3' (ang. *A-tailing*). Następnie, przy pomocy kulek SPRIselect i separatora magnetycznego wykonano dwustronną selekcję rozmiaru cząsteczek, pozbywając się oligonukleotydów o zbyt dużej, a następnie zbyt małej długości (stosunek SPRIselect odpowiednio 0,3x i 0,8x). Uzyskano 50 µl roztworu wyselekcjonowanych cząsteczek w buforze EB. Następnie wykonano ligację adapterów i oczyszczenie próbek (stosunek objętości kulek SPRIselect 0,8x), uzyskując 30 µl próbek rozpuszczonych w buforze EB. W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję PCR z ligacją sekwencji indeksów i5 i i7 do bibliotek. Pary indeksów dobrano tak, aby były unikalne dla każdej z próbek i pozwalały na demultipleksowanie odczytów RNA-seq, tj. przypisanie ich do konkretnej

próbki. Liczbę cykli wybrano na podstawie ilości całkowitego uzyskanego cDNA. Po reakcji PCR wykonano dwustronną selekcję rozmiaru cząsteczek bibliotek (stosunek objętości kulek SPRIselect 0,6x i 0,8x). Uzyskano 35 µl oczyszczonych bibliotek w buforze EB. Próbkę przechowywano w -20°C. Ponadto, ich alikwoty rozcieńczono w stosunku 1:10 w buforze EB i 1 µl z każdego użyto do analizy jakościowej i ilościowej z wykorzystaniem aparatu Bioanalyzer 2100 i zestawu odczynników High Sensitivity DNA Kit.

Ponadto, rozcieńczeń alikwotów 1:10 użyto jako wyjściowych do przygotowania seryjnych rozcieńczeń w wodzie dejonizowanej: 1:100, 1:10 000, 1:100 000 i 1:1 000 000. Spośród nich trzy największe rozcieńczenia posłużyły także do oceny ilościowej cząsteczek bibliotek zawierających pełne sekwencje adapterów P5 i P7 przy użyciu zestawu odczynników KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms (Roche), którego użycie opiera się na reakcji qPCR. Reakcję wykonano zgodnie z protokołem firmy 10xGenomics dla zestawu odczynników Visium. Każde z rozcieńczeń zostało użyte w tryplikacie. Linia progowa została ustalona na poziomie ok. 25% maksymalnej wartości fluorescencji w fazie wzrostu wykładniczego, tj. między ok. 632 a 695 dla trzech reakcji wykonanych dla próbek z trzech szkiełek Visium. Wartości Cq różne o co najmniej 0,2 w tryplikatach były odrzucane. Wartości Cq następnie uśredniono i porównując ze średnimi wartościami dla standardów wyznaczono średnie stężenie każdej z bibliotek, zastosowawszy poprawkę na średnią wielkość fragmentów cząsteczek bibliotek wyznaczoną w analizie przy pomocy Bioanalyzera.

Sekwencjonowanie uzyskanych bibliotek zostało przeprowadzone przez firmę CeGaT (Niemcy). Próbkę łączono w równej molarności i sekwencjonowano z użyciem komory przepływowej SP (biblioteki ze szkiełka 1) lub S1 (biblioteki ze szkiełek 2 i 3) na urządzeniu NovaSeq 6000 z zastosowaniem 100 cykli i długością odczytów: Read 1: 28 pz, i7: 10 pz, i5: 10 pz, Read 2: 90 pz.

Izolacja RNA i jego analiza jakościowa

W celu oceny jakości RNA obecnego w mózgach myszy z doświadczenia II i przeznaczonych do badań metodą transkryptomiki przestrzennej pozyskano dodatkowe skrawki. Z nich wyizolowano całkowite RNA przy użyciu zestawu odczynników RNeasy Mini Kit (QIAGEN) oraz urządzenia do automatycznego procesowania próbek QIAcube (QIAGEN) z ustawionym programem „RNeasy Mini - Animal tissues and cells - Standard” i objętością elucji próbek 30 µl. 1 µl próbek został użyty do przeprowadzenia analizy ilościowej i jakościowej przy pomocy Bioanalyzera 2100 i zestawu odczynników RNA 6000 Nano Kit.

Wstępna analiza danych

Dane RNA-seq otrzymano w postaci nieprzyciętych, zdemultipleksowanych odczytów Read 1 (zawierających sekwencje znacznikowe identyfikujące punkt na skrawku, unikalny identyfikator molekularny transkryptu (*ang. Unique Molecular Identifier, UMI*)) oraz Read 2 (zawierających fragmenty cDNA) w formacie .fastq. Wykonano sprawdzenie sum kontrolnych potwierdzających poprawny transfer plików, następnie sprawdzenie jakości odczytów z użyciem programu fastQC v0.11.8. Wstępną analizę danych przeprowadzono z użyciem łańcucha przetwarzania danych (*ang. pipeline*) programu Space Ranger v1.3.1. W pierwszym kroku analizę wykonano oddzielnie dla odczytów każdej biblioteki przy pomocy funkcji „spaceranger count”. Funkcja ta łączy odczyty Read 1 i Read 2 na podstawie wspólnych identyfikatorów, przeprowadza dopasowanie i uliniowanie (*ang. alignment*) fragmentów cDNA w odczycie Read 2 do mysiego genomu referencyjnego mm10-2020-A (GENCODE vM23/Ensembl 98), zliczanie fragmentów znacznikowych i UMI, przypisywanie transkryptów do punktów w tkance na podstawie plików .json i .tif oraz analizę skupień punktów według poziomu abundancji transkryptów genów. Tak uzyskane dane wyjściowe posłużyły do kolejnych analiz.

Dopasowanie odczytów do nowej anotacji genomu

Dalsze analizy zostały wykonane przez mgr. Mateusza Ziębę i dr. Marcina Piechotę z Pracowni Farmakogenomiki przy pomocy stworzonej przez nich metodyki analizy danych RNA-seq, służącej ulepszeniu dopasowania odczytów do genomu referencyjnego.

W pierwszym etapie uliniowane do genomu referencyjnego odczyty w formacie .bam (uzyskane przez użycie „spaceranger count”) z każdej z 12 próbek osobno zostały złączone w 1 plik przy pomocy pakietu samtools. Następnie, plik ten został przeprocesowany przez algorytm MACS3 (<https://github.com/macs3-project/MACS>). Jest to rozwiązanie pozwalające na dopasowanie odczytów RNA-seq do opisanych sekwencji genomu, definiując nagromadzenie odczytów przy określonych koordynatach genomu jako tzw. „piki”. Piki te pozwalają na anotację odczytów RNA-seq jako transkryptów określonych genów lub sekwencji długich powtórzeń terminalnych (*ang. long terminal repeats, LTR*) charakterystycznych dla retrotranspozonów. Ponadto, metoda ta pozwala na odfiltrowanie odczytów, które są uliniowane do pozycji w genomie o małej liczbie przyporządkowanych odczytów. Odczyty zostały wstępnie anotowane do sekwencji genowych lub LTR w odległości do 30 000 pz od odpowiadającego im piku w obu kierunkach nici. Ustalono również nici DNA („+” lub „-”), z których pochodziły anotowane odczyty RNA-seq.

W drugim etapie porównano koordynaty pików do danych uzyskanych z sekwencjonowania RNA dwóch próbek mysich (próbki RNA uzyskane od myszy C57BL/6 z prądkowia samca i samicy) metodą Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). W tej metodzie sekwencjonowania uzyskuje się długie odczyty każdego z transkryptów, dzięki czemu możliwe jest dokładniejsza identyfikacja izoform mRNA. W ten sposób wyeliminowano z dalszych analiz fragmenty o niepewnym dopasowaniu do genomu.

W trzecim etapie zastosowano filtrowanie pików, posługując się następującymi kryteriami: amplituda pików > 600 , liczba zliczeń odczytów do pików > 1200 , stosunek zliczeń do amplitudy $> 1,4$, wartość score > 350 i $\text{summit.p.log} > 35$. Piki te anotowano do prawdopodobnej nici i genu lub LTR na podstawie zgodności ich sekwencji z orientacją nici, oraz odległości od końca sekwencji genu, stosując tym razem jednostronny margines odległości $< 30\,000$ bp pików od sekwencji genowej.

Na podstawie tak przetworzonych i anotowanych pików utworzono nowy transkryptom referencyjny przy pomocy funkcji „spaceranger mkref” na podstawie danych przefiltrowanych w dwóch poprzednich etapach i ponownie zastosowano funkcję „spaceranger count”. W wyniku tej operacji uzyskano informację o abundancji poszczególnych transkryptów w każdym z punktów tkanki wszystkich 12 skrawków.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę skupień na danych pochodzących ze wszystkich próbek przy pomocy pakietu Seurat v3 (<https://satijalab.org/seurat/> ; Stuart et al., 2019) stosując metodę wyszukiwania współdzielonych najbliższych sąsiadów (ang. *shared nearest neighbor*) przy wybranym parametrze rozdzielczości równym 1, który zapewnił uzyskanie optymalnej liczby klastrów tożsamej z cytoarchitektoniczną charakterystyką przedomózgowie. Uzyskane w ten sposób dane zostały zwizualizowane w środowisku R przy pomocy funkcji UMAPPlot z pakietu Seurat oraz na skrawkach z użyciem funkcji zdefiniowanych przez Mateusza Ziębę i dr. Marcina Piechotę. Przy pomocy pakietu Seurat i funkcji FindAllMarkers również wyznaczyłam geny markerowe dla poszczególnych skupień przy ustawieniach parametrów: $\text{min.pct} = 0,1$ i $\text{logfc.threshold} = 0,5$.

W ostatnim etapie dane zostały znormalizowane i poddane analizom statystycznym, które opisano poniżej.

Analizy statystyczne

Wyniki badań behawioralnych i pomiarów masy ciała analizowano w środowisku R v4.1.2. Analizę danych pozyskanych z większości testów behawioralnych i pomiarów masy ciała podzielono na dwa okresy – okres rozwoju fenotypu, w którym oceniano wpływ mutacji na zachowanie zwierząt, oraz okres podań L-DOPA, podczas którego sprawdzano, jakie efekty wywierają zarówno mutacja, jak i podawanie tego leku. Dla obu okresów wykonano oddzielne analizy. Testy: CatWalk, probabilistycznego przeuczania w klatkach IntelliCage, instrumentalnego poszukiwania wrażeń, preferencji sacharyny u samców, test znajdowania zakopanego jedzenia oraz pomiary masy ciała były analizowane w obu okresach. Ponadto, w analizach dla wspomnianych testów uwzględniono efekt czasu, wyrażony jako liczba tygodni po podaniach tamoksyfenu, z wyjątkiem testu probabilistycznego przeuczania, którego wyniki analizowano innymi przedziałami czasu (poniżej). Testy pręta obrotowego, otwartego pola i rozpoznawania obiektu były przeprowadzane jednorazowo i tylko w jednym z okresów.

Ze względu na specyfikę testów CatWalk i probabilistycznego przeuczania, dla wielowymiarowych danych uzyskanych w tych procedurach zastosowano dodatkowo ich redukcję i uśrednianie.

W teście CatWalk w dalszych analizach uwzględniono jedynie przejścia przez tunel aparatu z całkowitą liczbą wzorców kolejności stawiania łap (parametr „Number of Patterns”) ≥ 1 . Na podstawie wcześniejszych doniesień (wyniki wyszukiwania fraz: „catwalk” i „Parkinson*” w bazach PubMed i Scopus [data dostępu: 5.04.2022 r.]) wybrano 19 parametrów, dla których wykazano istotne różnice pomiędzy zwierzętami kontrolnymi a mysimi lub szczurzymi modelami choroby Parkinsona. Wartości tych parametrów uśredniono względem łap prawych i lewych (52 zmienne wynikowe), a następnie poddano analizom statystycznym.

Spośród odczytów uzyskanych w teście probabilistycznego przeuczania wybrano zakres danych dla procedury zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania sacharyny, następnie wykluczono z analiz dane z okresów, w których występowały problemy techniczne lub jedna z klatek była wyłączona (np. podczas testu CatWalk). Wartości dla każdego z 4 obliczanych parametrów (liczba wizyt, liczba wyborów, preferencja rogu z $P = 0,9$ i preferencja sacharyny) została najpierw wyznaczona dla danego dnia, a następnie zastosowano uśrednienie ich względem zakresów dni, tzw. „przedziałów”. Zakres dni oraz rzeczywista liczba dni uwzględnionych w każdym z przedziałów została podana w tabeli 3. Analizy statystyczne zostały prowadzone według przedziałów.

Tabela 3. Zakresy dni zawartych w poszczególnych przedziałach w teście probabilistycznego przeuczania.

Numer przedziału	Zakres dni od podania tamoksyfenu	Rzeczywista liczba dni*	Okres doświadczenia
1	38-47	10	Rozwój fenotypu
2	48-60	13	
3	61-73	10	
4	74-86	12	
5	88-99	12	Podania L-DOPA

*ze względu na problemy techniczne rzeczywista liczba dni jest mniejsza niż wskazywałby na to zakres dni w drugiej kolumnie tabeli

Wszystkie uzyskane dane zostały sprawdzone pod względem ich kompletności dla każdego zwierzęcia i dla każdego punktu czasowego pomiaru. Osobniki, które dla danego okresu nie posiadały kompletnych danych, tj. co najmniej 1 pomiaru dla danego parametru w każdym z punktów czasowych w danym przedziale lub tygodniu po podaniach tamoksyfenu, zostały usunięte z analizy przeprowadzanej dla tego parametru w tym okresie. W przypadku danych uzyskanych z testów i pomiarów masy ciała, które uśredniano w danej jednostce czasu, do analiz włączono pomiary z osobników, które posiadały co najmniej 50% liczby możliwych pomiarów w tej jednostce czasu. Z analizy danych okresu podań L-DOPA w teście probabilistycznego przeuczania odrzucono zwierzęta, które miały jedynie obserwacje z 2 lub 3 dni. Ponadto, z danych uzyskanych w doświadczeniu II usunięto pomiary dla osobnika, który posiadał cechy fenotypowe niezgodne z przewidywanymi wobec jego genotypu i w dużym stopniu różniące się od cech innych osobników o tym samym genotypie.

Analizy statystyczne mające na celu ustalenie znamienności genotypu na badane cechy fenotypowe zostały przeprowadzone dwójako. Dla danych uzyskanych z okresu rozwoju fenotypu zastosowano dwuczynnikową ANOVA z efektami mieszanymi i ich interakcją (czynniki: genotyp, czas) oraz w wariancie z powtarzanymi w czasie pomiarami – w przypadku procedur wykonywanych wielokrotnie lub z wielokrotnym próbkowaniem danych. Dane uzyskane z procedur przeprowadzanych podczas podań L-DOPA zostały analizowane ANOVA dwuczynnikową (czynniki: genotyp, lek) z analizą interakcją. Uzyskane dane analizowano oddzielnie dla płci i oddzielnie dla każdego parametru mierzonego w danej procedurze. Ponadto, zastosowano testy *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga na wielokrotną liczbę porównań w celu identyfikacji różnic między grupami w każdym punkcie czasowym. Poprawka została zastosowana na zestawach danych połączonych z obu okresów dla każdego z parametrów. Wartości $p < 0,05$ (dla testów *t*-Studenta – po zastosowaniu poprawki) były

uznawane za statystycznie istotne. Ponadto, poprawkę tę zastosowano również wobec wszystkich wyników łącznie dla parametrów badanych w teście CatWalk dla każdego okresu i dla każdej kohorty zwierząt oddzielnie.

Określenie efektów L-DOPA na ekspresję genów metodą transkryptomiki przestrzennej

Statystycznie istotne efekty stosowania L-DOPA u mutantów w każdym z klastrów z osobna obliczono przy pomocy testów *t*-Studenta funkcją `t.test` w środowisku R. Za istotne statystycznie zmiany po podaniach L-DOPA w każdym z klastrów punktów uznano geny, dla których $p < 0,05$. Geny z istotnie zmienionym poziomem ekspresji pod wpływem L-DOPA zostały poddane analizie wzbogacenia w kategorii ontologii genów opisujące przypisanie genów do trzech kategorii: procesów biologicznych, struktur komórki i funkcji molekularnych przy użyciu pakietu *EnrichR* (Kuleshov *et al.*, 2016). Istotne statystycznie były kategorie z wartością $p < 0,05$. Wyznaczono również spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *False Discovery Rate*, FDR) metodą permutacji dla każdego z klastrów.

Badania z udziałem ludzi

Charakterystyka badanej grupy

Do badania włączono pacjentów Oddziału Klinicznego Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie z chorobą Parkinsona. Rozpoznanie choroby zostało postawione w oparciu o kryteria UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria (Gibb & Lees, 1988; Hughes *et al.*, 1992). Byli to chorzy zaawansowaną PD kwalifikowani do zabiegu wszczepienia domózgowego elektrod do głębokiej stymulacji mózgu. U pacjentów oceniano stopień nasilenia objawów ruchowych i pozaruchowych w okresie przyjmowania („ON”²) i po odstawieniu („OFF”¹) leków przeciwparkinsonowskich działających na przekąźnictwo dopaminergiczne. W obu punktach czasowych pobrano także krew żylną obwodową. Czas pomiędzy punktami „ON” i „OFF” wynosił od 2 do 7 dni; podczas przeprowadzania badania pacjenci byli hospitalizowani. Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu, co obok pełnoletności, rozpoznania choroby Parkinsona i kwalifikacji do zabiegu głębokiej stymulacji mózgu było kryteriami włączenia badania. Kryteria wyłączenia obejmowały niespełnienie warunków włączenia oraz wycofanie zgody na udział. Badanie

² Stosowane w niniejszej pracy określenia „ON” i „OFF” nie odnoszą się do opisu fluktuacji skuteczności stosowania L-DOPA u pacjentów z chorobą Parkinsona, czyli tzw. okresów włączenia („ON”) i wyłączenia („OFF”).

uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (uchwała nr 1072.6120.39.28 z dnia 23 lutego 2018 r.). Podczas przeprowadzania eksperymentu, na każdym jego etapie przestrzegano przepisów prawa krajowego i międzynarodowego, regulujących przeprowadzanie eksperymentów medycznych, w tym zasad ochrony danych osobowych, a w szczególności Deklaracji Helsińskiej Światowego Stowarzyszenia Lekarzy, Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady 2016/679 z dn. 27.04.2016 r. ws. Ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE (ogólne rozporządzenie o ochronie danych) i Ustawy z dn. 05.12.1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz.U. 1997, poz. 152 z późn. zm., t.j. Dz.U. 2021, poz. 790).

W badaniu wzięło udział 18 pacjentów (5 kobiet i 13 mężczyzn). Pełne dane kliniczne oraz pobrania krwi w obu punktach zgromadzono dla 13 pacjentów (4 kobiety i 9 mężczyzn) w wieku od 53 do 73 lat (średnia $63,77 \pm 1,62$ lat) i to do tej grupy odnoszą się przedstawione dalej wyniki. Każda z badanych osób przyjmowała codziennie co najmniej 2 różne leki stosowane w leczeniu choroby Parkinsona (L-DOPA, agoniści receptorów dopaminergicznych, inhibitory katecholo-*O*-metylotransferazy, inhibitory monoaminooksydazy B, amantadyna), w tym co najmniej 1 preparat z L-DOPA. Codziennie przyjmowane dawki leków przeliczono na ekwiwalent dawki L-DOPA (ang. *L-DOPA equivalent dose*, LED) według Tomlison i wsp. (2010). Szczegółowe dane dotyczące dawek leków i wieku pojawienia się pierwszych objawów choroby przedstawiono w tabeli 4. Ponadto, niektórzy pacjenci byli leczeni farmakologicznie na współistniejące choroby, w tym: lekami przeciwnadciśnieniowymi (5 osób), stosowanymi w łagodnym przeroście gruczołu krokowego (2), statyną (2), lekami przeciwcukrzycowymi (1), przeciwpadaczkowymi (1) i na nadczynność tarczycy (1).

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanych pacjentów (N = 13).

	Średnia $\pm$ SEM (zakres)
Wiek w dniu badania [lata]	63,77 $\pm$ 1,62 (53-73)
Czas trwania choroby (od roku pojawienia się pierwszych objawów) [lata]	9,69 $\pm$ 1,11 (5-18)
Dzienna sumaryczna LED [mg]	1150,82 $\pm$ 107,47 (475-2410,63)

Wywiad lekarski, ocena funkcji ruchowych i pozaruchowych oraz pobranie krwi

Wywiad lekarski oraz ocena funkcji ruchowych i pozaruchowych zostały wykonane przed lekarzy specjalistów neurologów, pracujących w Oddziale Klinicznym Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego

dr n. med. Małgorzatę Dec-Ćwiek, dr n. med. Karolinę Porębską oraz lek. Katarzynę Sawczyńską. Do oceny występowania objawów poszczególnych funkcji wykorzystano dziewięć narzędzi (tabela 5). Od każdego z pacjentów pobrano krew z żyły łokciowej w objętości 2,5 ml do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (PAXgene) zgodnie z instrukcją producenta. Po pobraniu krwi, zmieszaniu ze stabilizatorem i inkubacji w temperaturze pokojowej próbki były przechowywane w -80°C do czasu izolacji RNA.

Tabela 5. Testy kwestionariuszowe użyte do oceny funkcji ruchowych i pozaruchowych u pacjentów.

Badane funkcje/objawy	Pełna angielska nazwa kwestionariusza	Skrót	Polska nazwa	Bibliografia
apatia	Apathy Evaluation Scale	AES	Skala oceny apatii	(Marin <i>et al.</i> , 1991)
funkcje poznawcze	Montreal Cognitive Assessment	MoCA	Montrealska skala oceny funkcji poznawczych	(Gierus <i>et al.</i> , 2015; Magierska <i>et al.</i> , 2012; Nasreddine <i>et al.</i> , 2005)
objawy pozaruchowe	Non-Motor Symptoms Scale for Parkinson's Disease	NMSS	Skala oceny pozaruchowych objawów choroby Parkinsona	(Chaudhuri <i>et al.</i> , 2007)
zaburzenia zachowania i psychiczne	Neuropsychiatric Inventory Questionnaire	NPI-Q	Inwentarz-kwestionariusz neuropsychiatryczny	(Cummings <i>et al.</i> , 1994; Kaufer <i>et al.</i> , 2000)
objawy ruchowe i pozaruchowe	Parkinson's Disease Questionnaire-8	PDQ-8	Kwestionariusz choroby Parkinsona	(Peto <i>et al.</i> , 1995, 1998)
lęk jako stan	State-Trait Anxiety Inventory – state	STAI-X1	Inwentarz stanu i cechy lęku, część X1: lęk-stan	(Spielberger <i>et al.</i> , 1983; Wrześniewski <i>et al.</i> , 2002)
lęk jako cecha osobowości	State-Trait Anxiety Inventory – trait	STAI-X2	Inwentarz stanu i cechy lęku, część X2: lęk-cecha	
funkcje ruchowe	Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part II: Motor Experiences of Daily Living	UPDRS II	Ujednolicona skala do oceny choroby Parkinsona, część II: ruchowe aspekty codziennego funkcjonowania	(Fahn <i>et al.</i> , 1987; Goetz <i>et al.</i> , 2008)
funkcje ruchowe	Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III: Motor Examination	UPDRS III	Ujednolicona skala do oceny choroby Parkinsona, część III: objawy ruchowe	

Badanie ekspresji genów we krwi obwodowej pacjentów z chorobą Parkinsona

Izolacja całkowitego RNA

Izolacja całkowitego RNA z krwi obwodowej została wykonana przy użyciu zestawu odczynników PAXgene Blood miRNA Kit (PAXgene) przez dr. Sławomira Gołdę. Stężenie wyizolowanego RNA zmierzono przy użyciu spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop) a stopień jego degradacji oceniono za pomocą aparatu Bioanalyzer 2100 i zestawu odczynników RNA 6000 Nano Kit (Agilent).

Reakcja odwrotnej transkrypcji i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Do syntezy cDNA na matrycy wyizolowanego mRNA użyto zestawu odczynników Omniscript (QIAGEN) i oligonukleotydowych starterów Oligo(dT) 12-18 Primer (Invitrogen). Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 600 ng RNA każdej próbki, rozcieńczonej wodą wolną od nukleaz (QIAGEN). Gotowy roztwór cDNA został rozcieńczony dziesięciokrotnie wodą do iniekcji (Polpharma). Próbkę cDNA były następnie użyte do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). Reakcję qPCR wykonano z użyciem sond molekularnych TaqMan (Applied Biosystems; tabela 6) i kompatybilnego z nimi TaqMan Universal PCR Master Mix, zawierającego mieszaninę polimerazy, deoksynukleotydów oraz odpowiednie bufony. Mieszanina reakcyjna, zawierająca 9 µl cDNA, 10 µl master mixu oraz 1 µl sondy TaqMan, została poddana reakcji na termocyklerze C1000 z modulem optycznym CFX96 (BioRad) i następującymi parametrami:

- a) Etap I: 50°C, 2 min,
- b) Etap II: 95°C, 10 min,
- c) Etap III: 95°C, 15 s,
- d) Etap IV: 60°C, 1 min,
- e) Powrót do etapu III; łącznie wykonano 40 cykli.

Wartość progową służącą do wyznaczenia wartości C_q ustalono na 110 na podstawie najniższej wartości obliczonej przez oprogramowanie (tj. około 111).

Tabela 6. Charakterystyka sond molekularnych TaqMan użytych do oceny ilościowej poziomu ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona.

Symbol genu	Identyfikator sondy	Wielkość produktu [pz]	Lokalizacja rozpoznawanej sekwencji
<i>CEBPA</i>	Hs00269972_s1	77	wewnątrz pojedynczego eksonu
<i>DDIT4</i>	Hs01111686_g1	68	eksony 2 i 3
<i>EGR1</i>	Hs00152928_m1	72	eksony 1 i 2
<i>FOS</i>	Hs04194186_s1	82	ekson 4
<i>HPRT1</i>	Hs02800695_m1	82	eksony 2 i 3
<i>IFNGR1</i>	Hs00988304_m1	159	eksony 7 i 8 lub eksony 6 i 7
<i>KLF4</i>	Hs00358836_m1	110	eksony 2 i 3
<i>MMP9</i>	Hs00234579_m1	54	eksony 12 i 13
<i>PER1</i>	Hs00242988_m1	66	eksony 21 i 22 lub eksony 22 i 23
<i>SGK1</i>	Hs00178612_m1	81	eksony 7 i 8 lub eksony 8 i 9
<i>SNCA</i>	Hs00240906_m1	62	eksony 3 i 4

Względną abundancję wybranych transkryptów obliczono poprzez odjęcie wartości C_q badanego genu od wartości C_q genu referencyjnego (*HPRT1*) tej samej próbki (ΔC_q), następnie wyznaczenie $2^{\Delta C_q}$ oraz końcową normalizację poprzez podzielenie każdej wartości $2^{\Delta C_q}$ przez średnią dla grupy referencyjnej, którą była grupa po odstawieniu leczenia farmakologicznego „OFF”. Wybór genów był podyktowany wcześniejszymi doniesieniami na temat wpływu L-DOPA na transkryptom mózgowia w zwierzęcych modelach PD.

Analiza statystyczna danych kwestionariuszowych i poziomu ekspresji genów we krwi ludzkiej

Dane uzyskane z testów kwestionariuszowych były analizowane w środowisku R. Efekt przyjmowania leczenia na wyniki każdego z testów kwestionariuszowych z osobna był wyznaczony przy pomocy testu *t*-Studenta. Efekty dawki przyjmowanych leków działających na przekaźnictwo dopaminergiczne (jako LED) i wieku pacjentów na liczbę punktów uzyskiwanych w testach kwestionariuszowych zbadano poprzez wykonanie analizy korelacji metodą Pearsona z poprawką Benjamini-Hochberga wartości *p*. Wartości $p < 0,05$ po zastosowaniu poprawki były uznawane za statystycznie istotne. Wpływ przyjmowania leczenia na znormalizowane wartości $2^{\Delta C_q}$ wybranych genów został zmierzony testem *t*-Studenta dla prób zależnych.

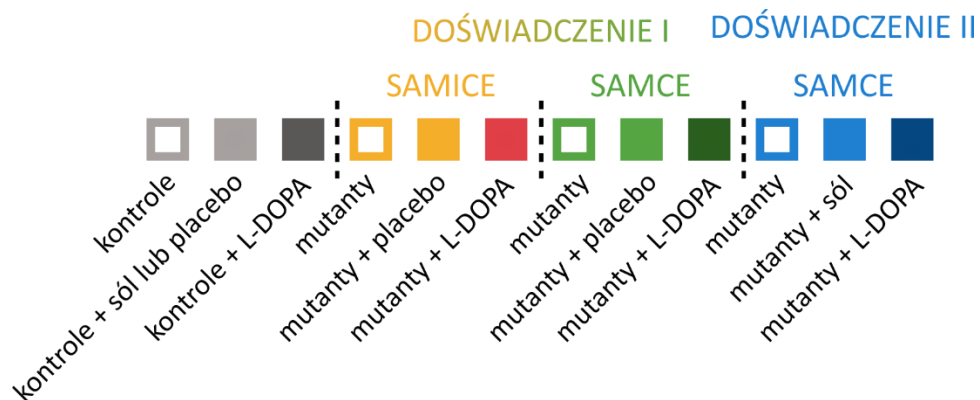
Opis wyników został podzielony na dwie części. W części pierwszej znajduje się omówienie wyników obu doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy, w drugiej przedstawiono wyniki badania z udziałem ludzi. Obie części w pierwszej kolejności odwołują się do zaobserwowanych zmian dotyczących zachowania i cech fenotypowych, w drugiej natomiast opisano wyniki profilowania ekspresji genów.

Doświadczenia przeprowadzane na zwierzętach

W celu ułatwienia rozróżnienia określeń czasu i grup zwierząt stosowanych w poniższej części przedstawianych wyników, poniżej przedstawiam ich znaczenie:

- a) Okres – doświadczenia behawioralne przeprowadzano w dwóch okresach czasu: w okresie rozwoju fenotypu, w którym obserwowano efekty postępującej utraty neuronów dopaminergicznych po podaniach tamoksyfenu u zwierząt z mutacją, oraz w okresie podań L-DOPA, w którym przez 14 dni podawano myszom L-DOPA podskórnie lub dootrzewnowo;
- b) Przedział czasowy – w teście probabilistycznego przeuczania analizę danych podzielono na 5 przedziałów o długości od 10 do 13 dni: 4 pierwsze przedziały obejmują okres rozwoju fenotypu a przedział nr 5 to okres podań L-DOPA;
- c) Kohorta – myszy jednej płci wykorzystane w danym doświadczeniu; kohorty między sobą różnią się procedurami, które na nich wykonano, oraz punktami czasowymi ich wykonania. Wyniki testów behawioralnych zaprezentowano oddzielnie dla każdej kohorty, lecz łącznie dla obu okresów;
- d) Grupa doświadczalna – w obrębie danej kohorty grupa zwierząt o danym genotypie, która otrzymywała w trakcie drugiego okresu podania L-DOPA lub placebo (doświadczenie I) albo soli fizjologicznej (doświadczenie II).

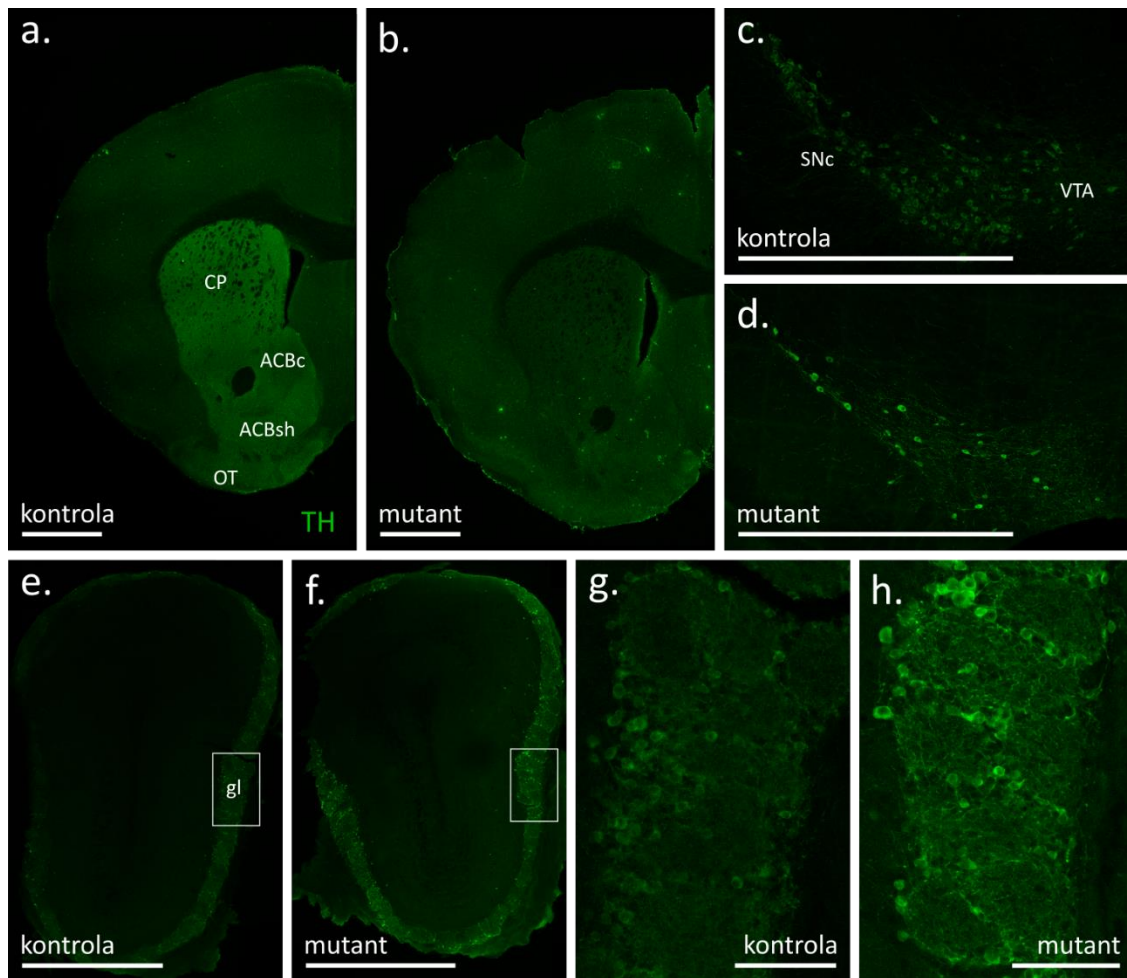
Wyniki dla poszczególnych grup doświadczalnych przedstawiono na wykresach osobno, według stałego schematu kolorystycznego, w którym zwierzęta o genotypie kontrolnym są oznaczone kolorem szarym reprezentowane przez barwy szare a myszy TIF-IA^{DATCreERT2} przez dwa kolory właściwe dla danej kohorty. Kolory te przedstawiono na rycinie 8. Słupki lub punkty bez wypełnienia przedstawione na wykresach dotyczą okresu rozwoju fenotypu a ich odpowiedniki z wypełnionym kolorem środkiem – okresu podać L-DOPA.



Rycina 8. Schemat kolorystyczny stosowany na wykresach jako reprezentacja poszczególnych kohort i grup doświadczalnych.

Utrata neuronów dopaminergicznych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}

Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} charakteryzują się postępującą degeneracją komórek, w których zachodzi ekspresja DAT. Dane literaturowe wskazują, że u myszy tego szczepu istotny spadek liczebności neuronów dopaminergicznych mających ciała komórkowe zlokalizowane w śródmózgowiu jest obserwowany po 7 lub 10 tygodniach od indukcji efektów mutacji poprzez podania tamoksyfenu i zwiększa się w ciągu kolejnych tygodni (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach wykonałam barwienia techniką immunofluorescencji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko TH, aby jakościowo potwierdzić efekty fenotypu u mutantów i zweryfikować efekty mutacji. Białko TH obecne jest bowiem w ciałach, aksonach i dendrytach neuronów wydzielających katecholaminy: dopaminę i noradrenalinę (Pickel *et al.*, 1975), a w obszarach, w których występuje tylko jedna z tych populacji, służy jako ich białko markerowe. TH używana jest powszechnie w badaniach z wykorzystaniem zwierzęcych modeli choroby Parkinsona do oceny liczebności i zagęszczenia neuronów dopaminergicznych i ich projekcji (Liu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2018).



Rycina 9. Obrazy mikroskopowe przedstawiające wyniki barwienia immunofluorescencyjnego skrawków mózgowia myszy TIF-IA^{DATCreERT2} z doświadczenia I na obecność hydroksylazy tyrozynowej w celu weryfikacji efektów mutacji. Barwienia wykonano na skrawkach przodomózgowia (a-b), śródmózgowia (c-d) oraz głównej opuszki węchowej (e-h). Legenda: ACBc – część środkowa jądra półleżącego przegrody, ACBsh – część przyśrodkowa jądra półleżącego przegrody, CP – prążkowie grzbietowe, gl – warstwa kłębuszkowa głównej opuszki węchowej, OT – guzek węchowy, SNc – część zbita istoty czarnej, VTA – pole bruszne nakrywki. Poziome linie odpowiadają długości 1 mm na zdjęciach a-f lub 100 μ m na zdjęciach g-h. Obrazy g i h stanowią powiększenie fragmentów zaznaczonych odpowiednio na obrazach e i f.

W doświadczeniu I myszy – samce i samice – zostały uśmiercone na początku 18. tygodnia po zakończeniu podań tamoksyfenu. Wybarwiono skrawki tkanki reprezentujące trzy rejony mózgowia: przodomózgowie (Ryc. 9a-b), śródmózgowie (Ryc. 9c-d) oraz opuszkę węchową (Ryc. 9e-h). Sygnał fluorescencji świadczący o obecności białka TH w tkance był intensywny w grzbietowym prążkowie, jądrze półleżącym przegrody oraz guzku węchowym myszy kontrolnych w porównaniu do otaczających je struktur (Ryc. 9a). U mutantów sygnał ten był niższy, bliski poziomowi tła (Ryc. 9b), co sugeruje mniejszą gęstość zakończeń nerwowych neuronów wydzielających dopaminę w tych strukturach.

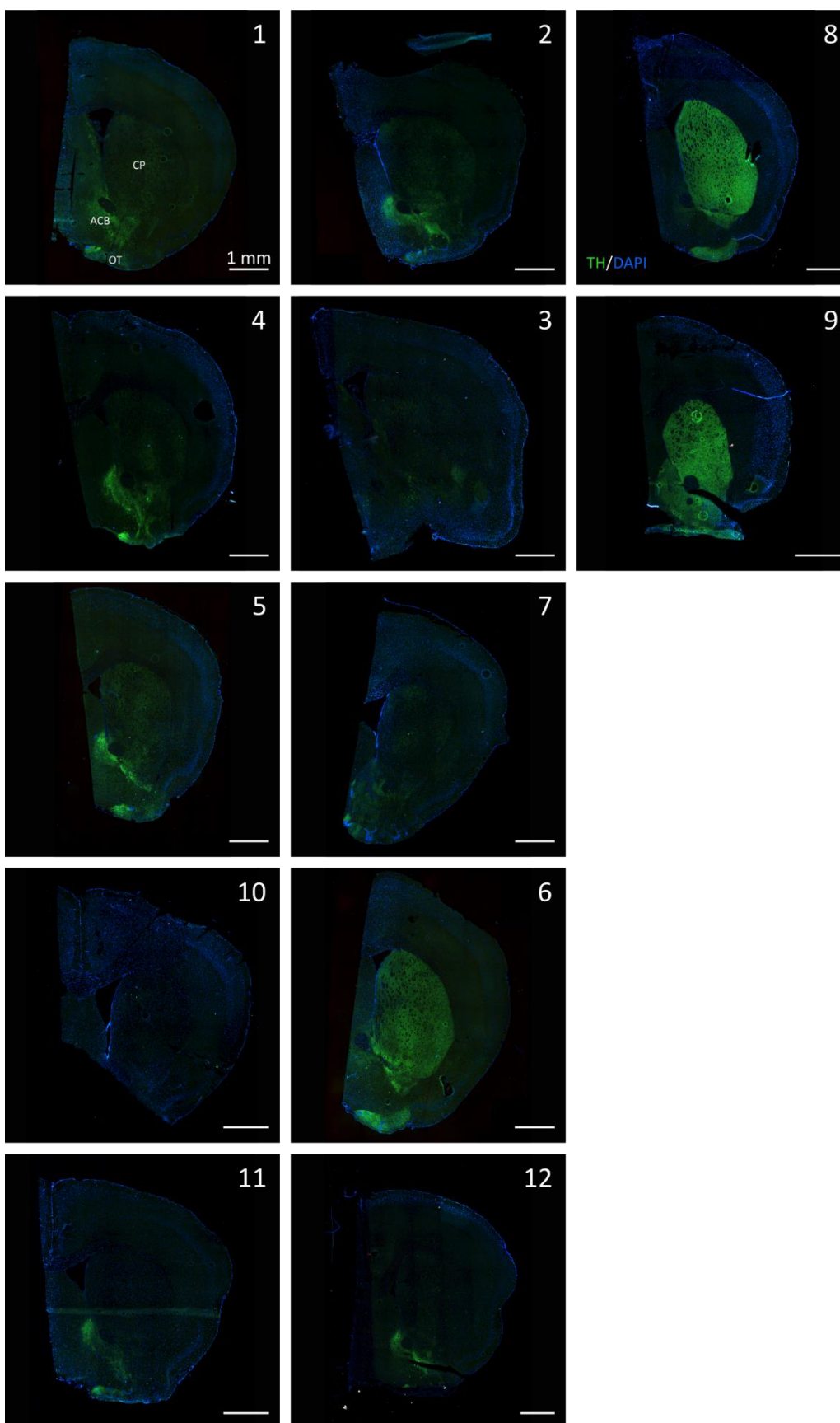
Obszary te są unerwiane przez neurony mające swe ciała w śródmózgowiu, należące do populacji części zbitiej istoty czarnej i pola brzuszno nakrywki. U zwierząt kontrolnych zaobserwowano liczne komórki TH+ w śródmózgowiu (Ryc. 9c), natomiast u mutantów widoczne były jedynie nieliczne wybarwione komórki (Ryc. 9d). W trzeciej z badanych struktur, opuszce węchowej, nie zanotowano widocznych różnic w sygnale fluorescencji związanej z obecnością TH między zwierzętami o odmiennych genotypach (Ryc. 9e-f). Populacja neuronów dopaminergicznych warstwy kłębuszkowej była liczna u kontroli, jak i mutantów (Ryc. 9g-h).

W doświadczeniu II samce zostały uśmiercone w ostatnim dniu 15. tygodnia od tygodnia podawania tamoksyfenu. W przodomózgowiu myszy kontrolnych (Ryc. 10) zaobserwowano, podobnie jak w doświadczeniu I, intensywny sygnał fluorescencji świadczący o obecności TH w prążkowie i guzku węchowym (próbka 8) oraz jądrze półleżącym przegrody (próbka 9). Natomiast u mutantów z obu grup doświadczalnych (pozostałe próbki) sygnał był ten wyraźnie słabszy, u pojedynczych osobników zlokalizowany zwłaszcza w brzusznej części jądra półleżącego (Ryc. 10). U jednej z myszy o genotypie mutantu zanotowano wysoki sygnał fluorescencji związany z obecnością TH w prążkowie grzbietowym, jądrze półleżącym przegrody i guzku węchowym (nr 6 na Ryc. 10). Wyniki tego osobnika w teście pręta obrotowego oraz jego masa ciała były również odstające od pozostałych mutantów, dlatego mysz ta została odrzucona z dalszych analiz behawioralnych.

mutanty + s3l fizjol.

mutanty + L-DOPA

kontrole + s3l fizjol.

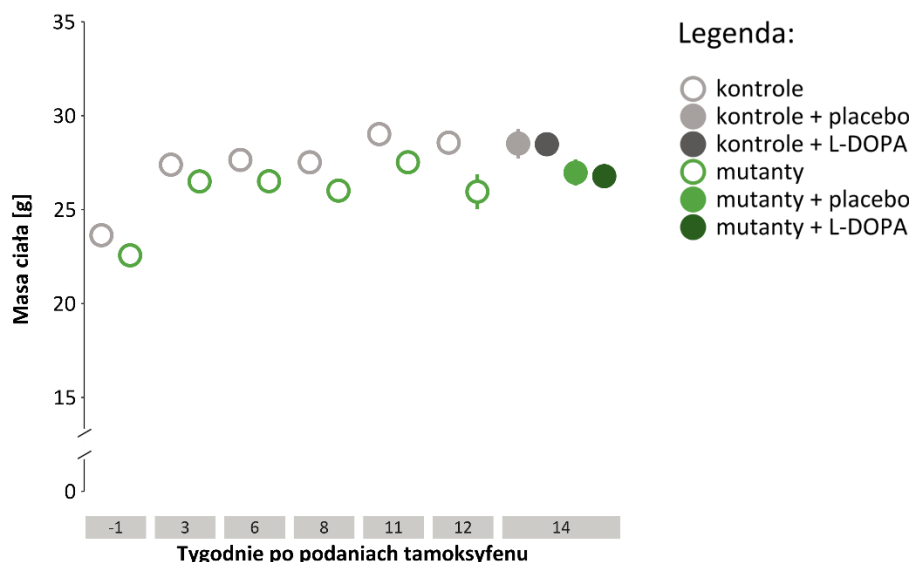


Rycina 10. Obrazy mikroskopowe przedstawiające sygnał immunofluorescencji pochodzący od hydroksylazy tyrozynowej (TH) i DAPI w przodomózgowiu myszy TIF-IA^{DATCreERT2} z doświadczenia II wykonane w celu weryfikacji efektów mutacji. Skrawki pochodzą od wszystkich osobników (1-12), od których pobrano próbki przeznaczone na profilowanie przestrzenne ekspresji genów pod wpływem L-DOPA. Legenda: ACB – jądro półleżące przegrody, CP – prążkowie grzbietowe, OT – guzek węchowy, TH – hydroksylaza tyrozynowa.

Przedstawione obserwacje pozwalają stwierdzić, że po 15-18 tygodniach od rozpoczęcia podawania tamoksyfenu u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} nastąpił wyraźny spadek liczby neuronów dopaminergicznych śródmózgowia i ich projekcji do przodomózgowia, natomiast populacje neuronów wydzielających dopaminę w opuszcze węchowej nie zostały u nich w widoczny sposób uszkodzone. Badania histologiczne potwierdzają więc skuteczność zastosowanego systemu Cre-loxP w wywołaniu uszkodzeń komórek dopaminergicznych śródmózgowia i ich zakończeń nerwowych w szlakach czarno-prążkowiowym i mezolimbicznym. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników jedno ze zwierząt zostało wykluczone z dalszych analiz behawioralnych.

Zmiany masy ciała spowodowane postępującą utratą neuronów dopaminergicznych

U pacjentów z chorobą Parkinsona często obserwuje się postępującą utratę masy ciała (Chen *et al.*, 2003). W każdym z doświadczeń częstotliwość pomiarów wagi była dostosowana była do planu prowadzonych testów, przez co ich częstość i odstępy czasowe od indukcji mutacji różnią się.

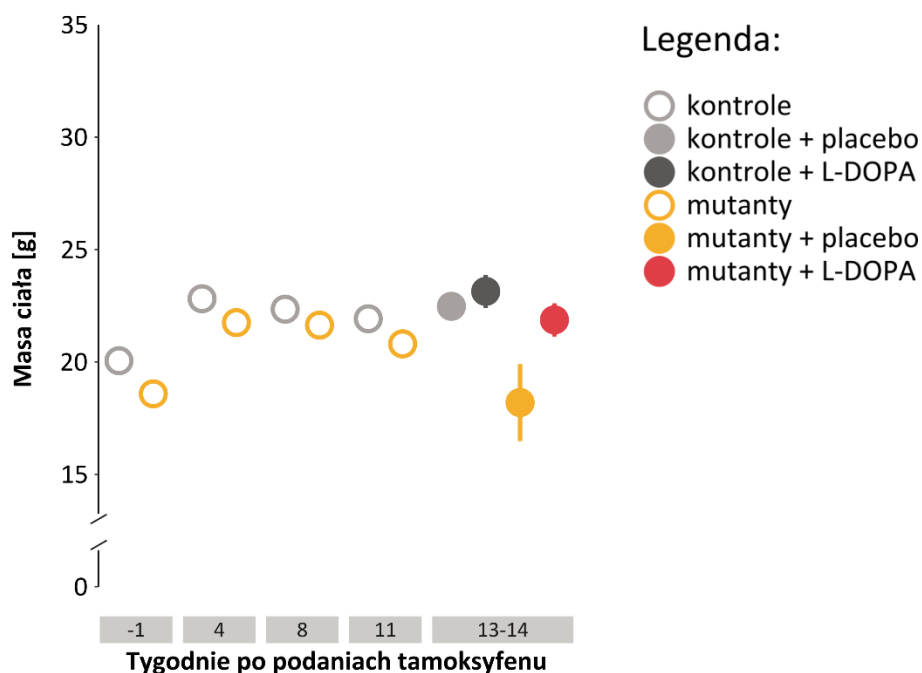


Rycina 11. Wyniki pomiarów masy ciała samców myszy z doświadczenia I. Punkty reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym punkcie czasowym, linie symbolizują SEM. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 1-12: kontrole: 11, mutanty: 9, tydzień 14 (od lewej do prawej): 6, 5, 3 i 5 osobników.

U samców z doświadczenia I mutacja powodowała istotny spadek masy ciała w czasie (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: genotyp: $F_{1,18} = 7,026$, $p = 0,0163$; genotyp $\times$ tygodnie: $F_{5,90} = 2,56$, $p = 0,0326$; Ryc. 11). Samce posiadające mutację przeciętnie ważyły w tym okresie doświadczenia (średnia $\pm$ SEM) $25,8 \pm 0,298$ g, podczas gdy samce kontrolne były o około 1,5 g cięższe ($27,3 \pm 0,266$ g). Należy przy tym zaznaczyć, że wraz z upływem czasu masa ciała wszystkich osobników tej kohorty ulegała zmianom ($F_{5,90} = 87,08$, $p < 0,0001$). Ponadto, jeszcze przed podaniem tamoksyfenu waga samców z mutacją (średnia $\pm$ SEM: $22,6 \pm 0,504$ g) była niższa niż zwierząt kontrolnych

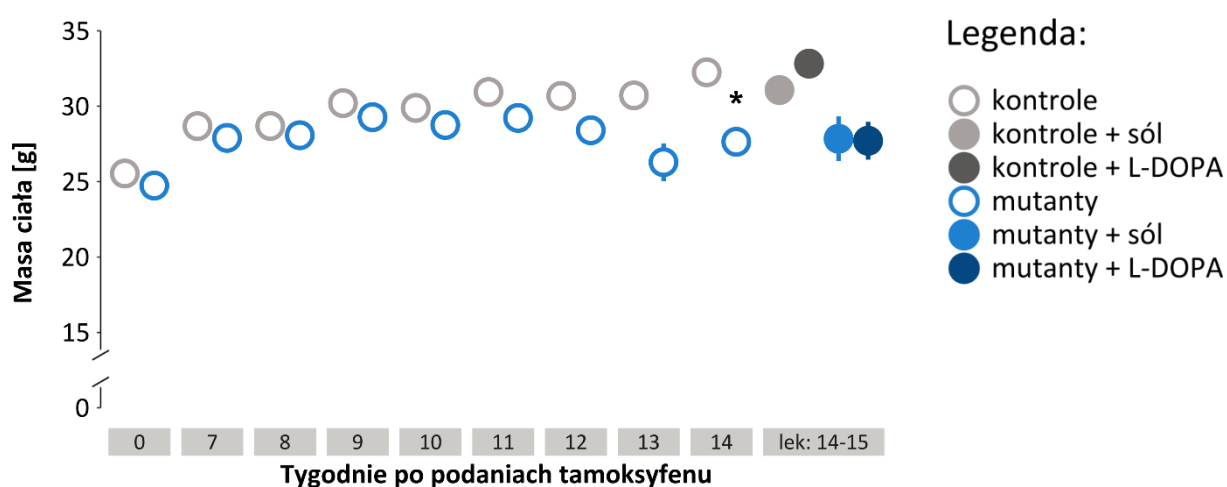
($23,6 \pm 0,380$ g), jednak różnica ta nie była znamienna (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,189$).

W późniejszym okresie podczas przyjmowania L-DOPA genotyp samców również istotnie wpływał na ich wagę (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,15} = 6,115$, $p = 0,0259$). Natomiast podania L-DOPA ($F_{1,15} = 0,021$, $p = 0,8858$) ani interakcja leku z genotypem zwierząt (lek: $F_{1,15} = 0,012$, $p = 0,9138$) nie wywierały znamiennych efektów. W okresie przyjmowania leku średnia masa ciała mutantów wyniosła (średnia $\pm$ SEM) $26,8 \pm 0,386$ g, natomiast u zwierząt kontrolnych była nieco większa: $28,5 \pm 0,454$ g (Ryc. 11). Różnica ta była istotna statystycznie (test t Welcha: $p = 0,013$).



Rycina 12. Wyniki pomiarów masy ciała samic myszy z doświadczenia I. Punkty reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym punkcie czasowym, linie symbolizują SEM. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 1-11: kontrole: 12, mutanty: 9, tygodnie 13-14 (od lewej do prawej): 5, 7, 5 i 3 osobniki.

U samic z doświadczenia I w trakcie rozwoju fenotypu ich genotyp nie wpłynął istotnie na masę ciała (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,19} = 3,32$, $p = 0,0842$, rycina 12). Masa ciała samic obu grup zmieniała się z czasem ($F_{3,57} = 128.663$, $p < 0,0001$), jednak Interakcja genotypu z upływającym czasem nie miała istotnego wpływu na masę ciała samic ($F_{3,57} = 1.773$, $p = 0.163$). Tym niemniej, samice o genotypie mutantu ważyły średnio w okresie rozwoju fenotypu nieco mniej (średnia $\pm$ SEM: $20,7 \pm 0,352$ g) niż samice kontrolne ($21,8 \pm 0,222$ g). Różnica ta była istotna statystycznie (test t Welcha: $p = 0,011$). Znamienne efekty genotypu zaobserwowano u samic natomiast w okresie przyjmowania leku (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,16} = 9,077$, $p = 0,00826$), kiedy stopień uszkodzenia układu dopaminergicznego był znaczny. Samice z mutacją ważyły wówczas średnio $19,6 \pm 1,25$ g, a kontrolne: $22,9 \pm 0,485$ g (Ryc. 12). Natomiast podania L-DOPA nie wpłynęły istotnie na masę ciała samic ($F_{1,16} = 2,847$, $p = 0,11094$), chociaż osobniki traktowane L-DOPA ważyły przeciętnie więcej niż myszy, które otrzymywały placebo (Ryc. 12). Różnice te, choć nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,085$), były najbardziej zauważalne wśród samic z mutacją (średnia $\pm$ SEM: mutanty + placebo: $18,6 \pm 1,12$ g, mutanty + L-DOPA: $21,9 \pm 0,474$ g). Nie wykazano także znamionnego efektu interakcji genotypu samic i podawanej im substancji na ich masę ciała ($F_{1,16} = 1,808$, $p = 0,19749$).



Rycina 13. Wyniki pomiarów masy ciała samców myszy z doświadczenia II. Punkty reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym punkcie czasowym, linie symbolizują SEM. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 0-14 (przed przyjęciem pierwszej dawki L-DOPA): kontrolne: 15, mutanty: 9, tygodnie 14-15 w okresie przyjmowania L-DOPA (od lewej do prawej): 7, 7, 5 i 4 osobniki. * $p < 0,05$ w stosunku do zwierząt o genotypie kontrolnym w teście t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

Samce z mutacją z doświadczenia II również cechowały się mniejszą masą ciała od kontroli (Ryc. 13). Znamienne efekty genotypu względem wagi zwierząt zaobserwowano w okresie rozwoju fenotypu

(dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: genotyp: $F_{1,22} = 4,55$, $p = 0,0443$). Masa ciała zwierząt zmieniała się wraz z upływem czasu ($F_{8,176} = 46,77$, $p < 0,0001$). Samce obu genotypów wykazywały tendencję do zwiększania swojej masy ciała wraz z kolejnymi pomiarami, jednak w 12. tygodniu po podaniach tamoksyfenu zaobserwowano jej spadek u samców z mutacją (Ryc. 13). Na odmienną dynamikę zmian masy ciała między grupami wskazuje znamieny efekt interakcji genotypu i liczby tygodni, jakie minęły od indukcji mutacji ($F_{8,176} = 10,46$, $p < 0,0001$). Różnica między genotypami była znamienna w 14. tygodniu po podaniach tamoksyfenu, tuż przed przyjęciem pierwszej dawki L-DOPA (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,03$). W okresie rozwoju fenotypu samce z mutacją ważyły przeciętnie (średnia $\pm$ SEM) $27,8 \pm 0,298$ g a samce kontrolne $29,7 \pm 0,253$ g.

Efekt genotypu był także istotny w okresie przyjmowania L-DOPA (dwuczynnikowa ANOVA z efektami interakcji: $F_{1,19} = 13,823$, $p = 0,00146$; Ryc. 10). Podczas przyjmowania L-DOPA średnia masa ciała samców z mutacją wyniosła (średnia $\pm$ SEM) $27,8 \pm 0,939$ g a samców o genotypie kontrolnym przeciętnie aż o 4,1 g więcej, tj. $31,9 \pm 0,655$ g. Natomiast podania L-DOPA nie wywarły istotnego wpływu na masę ciała mutantów ani kontroli ($F_{1,19} = 0,867$, $p = 0,36359$), podobnie jak interakcja genotypu i przyjmowanej substancji ($F_{1,19} = 0,704$, $p = 0,41195$).

We wszystkich trzech badanych kohortach myszy TIF-IA^{DATCreERT2} charakteryzowały się niższą masą ciała w stosunku do zwierząt o genotypie kontrolnym, które to różnice zaczęły być zauważalne w późniejszych sesjach pomiarowych, a więc przy większym stopniu utraty neuronów dopaminergicznych. L-DOPA nie wpływała w istotnym stopniu na wagę zwierząt, bez względu na płeć myszy lub sposób podań (doświadczenie I – uwalnianie podskórne, doświadczenie II – iniekcje dootrzewnowe).

Ocena rozwoju zaburzeń ruchowych u myszy

Zaburzenia w poruszaniu się, sztywność mięśniowa, problemy z inicjacją wykonania ruchów, ich precyzją, spowolnienie ruchowe, zaburzenia posturalne należą do charakterystycznych ruchowych objawów choroby Parkinsona. Wynikają one głównie z obumierania neuronów części zbitej istoty czarnej a ich wystąpienie świadczy o znacznym stopniu uszkodzenia tej struktury, jak również unerwienia prążkowia, które to zmiany narastają wraz z czasem trwania choroby (Fearnley & Lees, 1991; Shuang *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2010; Kordower *et al.*, 2013). W wykonanych doświadczeniach obserwacja zachowań myszy związanych z ich poruszaniem się posłużyła jako behawioralny wyznacznik stopnia rozwoju fenotypu parkinsonowskiego. Wykorzystano trzy testy pozwalające na ocenę funkcji ruchowych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}: system CatWalk mierzący parametry opisujące chód; test pręta

obrotowego pozwalający na ocenę koordynacji ruchu myszy w wymuszonych warunkach; test otwartego pola, podczas którego mysz swobodnie eksploruje klatkę i można ocenić pokonaną przez nią odległość, prędkość lub preferencję poruszania się przy ściankach klatki świadczącą dodatkowo o nasileniu zachowań lękowych.

Przy pomocy systemu CatWalk XT oceniono parametry opisujące stawianie łap podczas chodu u trzech kohort myszy: samic (Ryc. 14) i samców (Ryc. 15) w doświadczeniu I oraz samców w doświadczeniu II (Ryc. 16). Test przeprowadzano w odstępie 2 tygodni, tym samym monitorując rozwój fenotypu ruchowego. Dodatkowo, u zwierząt z doświadczenia I testowanie rozpoczęto na wczesnym etapie rozwoju fenotypu parkinsonowskiego u mutantów. W celu lepszego zrozumienia znaczenia poszczególnych parametrów mierzonych w teście wyjaśniam, że cykl chodu odnosi się do wszystkich etapów chodu od momentu kontaktu danej łapy z podłożem do ponownego jej zetknięcia z nim. Sam chód obejmuje fazę podporu oraz fazę przenoszenia łapy. Mierzone przez system CatWalk parametry chodu dotyczą zdarzeń następujących podczas obu faz chodu, w tym różnych wartości charakteryzujących pole powierzchni łapy mające styczność z podłożem podczas podporu, rozstawu łap, długości kroków i kadencji (ich liczby na jednostkę czasu), prędkości ruchu, czasu trwania cyklu chodu oraz poszczególnych faz chodu, pozycji łap tożsronnych wobec siebie podczas chodu (kolejności ich stawiania), sprzężenia ruchu poszczególnych łap w czasie i ich sekwencji stawiania. Nazwy badanych parametrów zostały przeze mnie przetłumaczone na język polski, jednak przy omawianiu wyników podaję również ich oryginalne, angielskie brzmienie pochodzące z oprogramowania CatWalk. Aby ułatwić interpretację przedstawionych wyników względem parametrów chodu mierzonych w teście, opis najważniejszych elementów charakteryzujących etapy chodu oraz przykładowe parametry powiązane z nimi mierzone przez system CatWalk XT zamieściłam w tabeli 7.

Tabela 7. Opis wybranych elementów etapów chodu i przykładowe parametry mierzone przez system CatWalk.

Nazwa polska (Nazwa angielska)	Opis	Przykład parametru [jednostki pomiaru]
Podpór (<i>Stand or Stance</i>)	Faza chodu, podczas której stopa/łapa pozostaje w kontakcie z podłożem.	Długość trwania fazy podporu tylnych łap [s]
Przenoszenie (<i>Swing</i>)	Faza chodu, podczas której stopa/łapa nie styka się z podłożem.	Długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap [s]
Cykl chodu (<i>Step cycle</i>)	Czas pomiędzy kontaktem stopy/łapy z podłożem a ponownym zetknięciem się tej samej stopy/łapy z podłożem; jest to czas równy sumie czasu trwania faz podporu i przenoszenia.	Długość trwania cyklu chodu przednich łap [s]

Nazwa polska (Nazwa angielska)	Opis	Przykład parametru [jednostki pomiaru]
Rozstaw łap (<i>Base of support</i>)	Średnia odległość pomiędzy dwiema łapami przednimi lub tylnymi.	Rozstaw tylnych łap [cm]
Kadencja (<i>Cadence</i>)	Liczba kroków na sekundę w pojedynczym przejściu.	Kadencja [liczba na s]
Sprzężenie ruchu dwóch łap (<i>Couplings</i>)	Zależność czasowa postawienia dwóch łap na podłożu podczas jednego cyklu chodu; odnosi się do momentu, w którym druga łapa dotyka podłoża względem czasu postawienia pierwszej z łap.	Sprzężenie ruchu dwóch łap: RF -> LF [%]
Sekwencja stawiania łap (<i>Step sequence</i>)	Kolejność stawiania 4 łap po kolei. W systemie CatWalk sklasyfikowano 6 wzorców, opisanych literami: AA: RF* -> RH -> LF -> LH AB: LF -> RH -> RF -> LH CA: RF -> LF -> RH -> LH CB: LF -> RF -> LH -> RH RA: RF -> LF -> LH -> RH RB: LF -> RF -> RH -> LH AA i AB to wzorce naprzemienne (ang. <i>alternate</i>), CA i CB – krzyżowe (<i>cruciate</i>), natomiast RA i RB – obrotowe (<i>rotate</i>)	Sekwencja stawiania łap AA [% wszystkich sekwencji w trakcie przejścia]
Maksymalny kontakt (<i>Max contact</i>)	Czas od początku przejścia, w którym największa powierzchnia łapy dotyka podłoża.	Maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem [wartość intensywności koloru pikseli od 0 do 255]
Pozycja łap (<i>Print positions</i>)	Odległość między łapami po tej samej stronie ciała mierzona, gdy przednia łapa została położona wcześniej niż tylna w ciągu jednego cyklu chodu.	Pozycja prawych łap [cm]

*LF – lewa przednia łapa

LH – lewa tylna łapa

RF – prawa przednia łapa

RH – prawa tylna łapa

Mutacja prowadząca do utraty neuronów dopaminergicznych wywierała odmienny wpływ na obserwowane w teście parametry chodu w każdej z kohort, dlatego wyniki te omówiono oddzielnie. Ze względu na obszerność uzyskanych wyników, w pracy zaprezentowano wykresy jedynie dla wybranych parametrów chodu. Podsumowanie najważniejszych wyników testu dla wszystkich grup przedstawiono w tabelach 8-10 oddzielnie dla każdej kohorty, skupiając się na zmiennych, na które wpływ miała mutacja, interakcja mutacji z L-DOPA lub z czasem, jaki upłynął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA.

Tabela 8. Parametry chodu samic z doświadczenia I, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA.

Badany parametr	Czynnik/Interakcja	Wartość p*	Wartość p po poprawce**	Okres doświadczenia
Kolejność stawiania lewych łap	genotyp × tygodnie	0,01096	0,10542	Rozwój fenotypu
Sekwencja stawiania łap „CA” (RF → LF → RH → LH)	genotyp × tygodnie	0,01149	0,10542	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: LF → RH	genotyp × tygodnie	0,03796	0,22779	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: LH → LF	genotyp	0,03565	0,22243	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: LH → RH	genotyp × tygodnie	0,02676	0,18153	Rozwój fenotypu
Średnia długość trwania pierwszej fazy podporu na obu przednich łapach	genotyp	0,03045	0,19795	Rozwój fenotypu
Sekwencja stawiania łap „AB” (LF → RH → RF → LH)	genotyp	0,04030	0,90899	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: RF*** → RH	genotyp	< 0,00001	0,00017	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: RH → RF	genotyp	0,00008	0,00604	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania fazy podporu na jednej łapie przedniej	genotyp	0,03552	0,90899	Podania L-DOPA

*dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami (okres rozwoju fenotypu) lub dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji (okres podań L-DOPA)

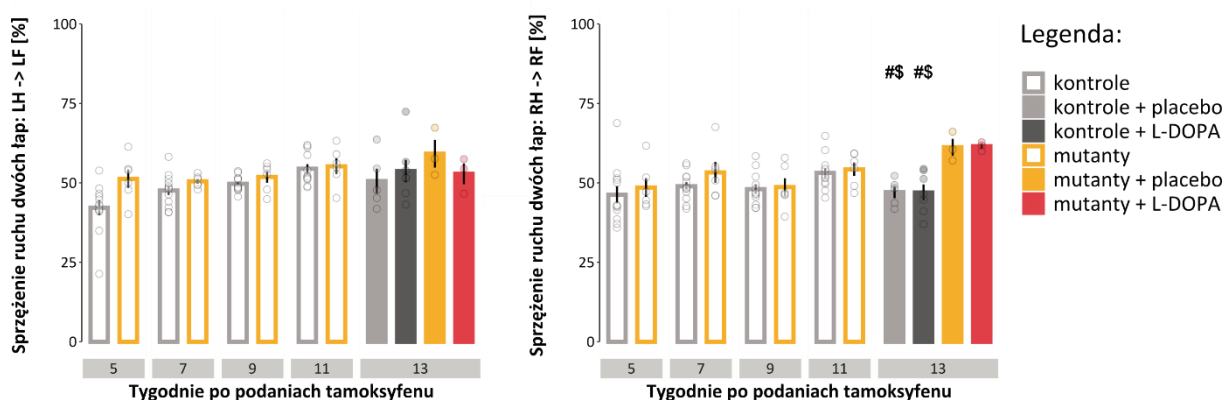
**poprawka Benjamini-Hochberga na liczbę porównań

*** oznaczenie łap: LF – lewa przednia, LH – lewa tylna, RF – prawa przednia, RH – prawa tylna

W okresie rozwoju fenotypu u samic z doświadczenia I zaobserwowano istotny wpływ genotypu na dwa parametry opisujące chód (tabela 8): na sprzężenie ruchu dwóch łap: LH → LF (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,16} = 5,263586$, $p = 0,03565$; Ryc. 14a) oraz na długość trwania pierwszej fazy podporu na obu przednich łapach (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,16} = 5,6357267$, $p = 0,03045$). Pierwszy z tych parametrów charakteryzuje czasowy związek położenia lewej tylnej i następnie lewej przedniej łapy w cyklu chodu (ang. *Couplings*) i opisuje stopień synchronizacji ruchu dwóch łap (Kloos *et al.*, 2005). Drugi natomiast odnosi się do czasu, w którym obie przednie łapy myszy są w kontakcie z podłożem po raz pierwszy w trakcie cyklu chodu (ang. *Initial Dual Stance*). W okresie rozwoju fenotypu sprzężenie ruchu łap LH → LF u samic o genotypie mutantu było średnio nieco większe (średnia ± SEM: $52,2 \pm 1,07\%$) niż u samic kontrolnych ($48,5 \pm 1\%$). Średnia długość pierwszej fazy podporu na obu przednich łapach była jednak krótsza u samic z mutacją ($0,0350 \pm 0,00593$ s) niż u samic kontrolnych ($0,0516 \pm 0,00618$ s). Należy jednak zauważyć, że w obu przypadkach różnice te są stosunkowo niewielkie a po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań efekt genotypu nie był dla tych zmiennych istotny statystycznie (tabela 8). Dla 4 zmiennych zaobserwowano wpływ interakcji genotypu oraz upływu czasu od indukcji efektów mutacji (tabela 8), jednak po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga na liczbę porównań wpływ ten nie był istotny ($p > 0,05$).

a.

b.



Rycina 14. Wybrane parametry chodu samic myszy z doświadczenia I zmierzone w systemie CatWalk. (a) Sprzężenie ruchu dwóch łap: LH → LF. (b) Sprzężenie ruchu dwóch łap: RH → RF. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 5-11: kontrole: 12, mutanty: 6, tydzień 13 (od lewej do prawej): 5, 7, 3 i 3 osobniki. # $p < 0,05$ w stosunku do grupy mutantów po traktowaniu L-DOPA oraz \$ $p < 0,05$ w stosunku do grupy mutantów otrzymujących placebo w teście t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

W okresie podań L-DOPA u samic zaobserwowano natomiast znamieny wpływ genotypu na cztery parametry: sprzężenie ruchu dwóch łap: RH → RF (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,14} = 30,312$, $p = 0,00008$; Ryc. 14b), sprzężenie ruchu dwóch łap: RF → RH ($F_{1,14} = 66,724$,

$p < 0,00001$), średnią długość trwania fazy podporu na jednej łapie przedniej ($F_{1,14} = 5,413$, $p = 0,0355$) oraz na sekwencję stawiania łap „AB” (LF → RH → RF → LH; $F_{1,14} = 5,107$, $p = 0,0403$). Istotny efekt mutacji na sprzężenie ruchu łap prawych w obu konfiguracjach (RH → RF oraz RF → RH) był nadal obecny po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań (tabela 8). W przypadku sprzężenia ruchu łap RH → RF w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu samice z mutacją miały większą wartość tej zmiennej (średnia $\pm$ SEM: $61,4 \pm 1,24$ %) niż osobniki kontrolne ($47,0 \pm 1,59$ %), natomiast dla parametru uwzględniającego odwrotną kolejność stawiania łap, tj. RF → RH, różnica miała odwrotny kierunek ($37,1 \pm 0,402$ % dla samic z genotypem mutantów i $49,9 \pm 1,02$ % dla samic kontrolnych). Dla obu zmiennych zaobserwowano istotne różnice między średnimi wartościami dla grup doświadczalnych kontrolnych i grup mutantów w okresie podań L-DOPA (testy *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga na liczbę porównań dla sprzężenia RH → RF: kontrole + placebo vs. mutanty + placebo: $p = 0,03$, kontrole + placebo vs. mutanty L-DOPA: $p = 0,00414$, kontrole + L-DOPA vs. mutanty + placebo: $p = 0,03$, kontrole + L-DOPA vs. mutanty + L-DOPA: $p = 0,00414$). Co ważne, nie stwierdzono znamionnego wpływu podań L-DOPA ani wpływu interakcji podań leku z genotypem na żadne parametry chodu u samic.

U samców z doświadczenia I w okresie rozwoju fenotypu zaobserwowano znamionny wpływ mutacji na 4 parametry chodu (tabela 9): sprzężenie ruchu dwóch łap: RH → LF (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,16} = 16,73$, $p = 0,000855$; Ryc. 15a), rozstaw tylnych łap (ang. *Base of Support*; $F_{1,17} = 4,972$, $p = 0,03952$), średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem (ang. *Max Contact Area*; $F_{1,17} = 5,995$, $p = 0,0255$) oraz średnia wielkość odcisku tylnej łapy (ang. *Print Area*; $F_{1,17} = 5,276$, $p = 0,0346$). Trzy ostatnie parametry opisują sposób rozkładania ciężaru na tylne kończyny. Spośród 4 zmiennych, po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga na liczbę porównań, istotny efekt genotypu zanotowano jedynie dla sprzężenia ruchu dwóch łap: RH → LF ($p = 0,00719$; Ryc. 15a). U samców z mutacją zanotowano w tym okresie mniejszą wartość tego parametru (średnia $\pm$ SEM: $72,4 \pm 3,38$ %) niż u samców o genotypie kontrolnym ($87,9 \pm 2,08$ %). W 5. tygodniu po podaniach tamoksyfenu różnica między genotypami była istotna statystycznie (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,00143$). Może to świadczyć o zaburzonej synchronizacji ruchu między kończynami.

Dla tego parametru zanotowano również statystycznie istotny efekt interakcji genotypu i liczby tygodni, które minęły od podania tamoksyfenu ($F_{3,48} = 3,161$, $p = 0,0329$).

Tabela 9. Parametry chodu samców z doświadczenia I, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA.

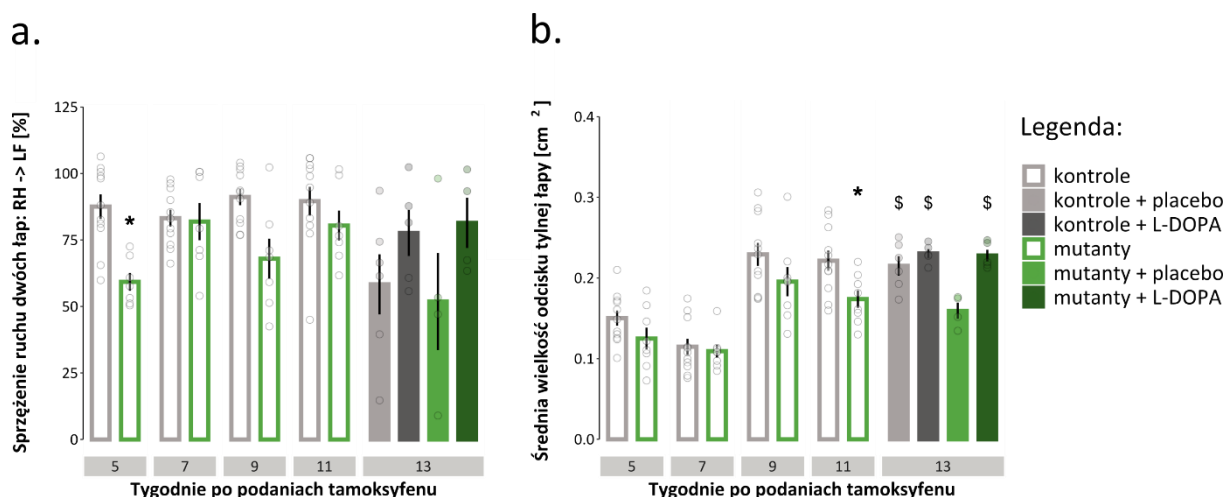
Badany parametr	Czynnik/ Interakcja	Wartość p*	Wartość p po poprawce **	Okres doświadczenia
Rozstaw tylnych łap	genotyp	0,03952	0,17617	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: LH -> RH	genotyp × tygodnie	0,01260	0,08544	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: RH -> LF	genotyp	0,00085	0,00719	Rozwój fenotypu
Sprężenie ruchu dwóch łap: RH -> LF	genotyp × tygodnie	0,03294	0,16059	Rozwój fenotypu
Średnia wielkość odcisku tylnej łapy	genotyp	0,03460	0,16355	Rozwój fenotypu
Średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem	genotyp	0,02549	0,14192	Rozwój fenotypu
Rozstaw przednich łap	genotyp × lek	0,00156	0,12198	Podania L-DOPA
Rozstaw przednich łap	genotyp	0,02200	0,34315	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: LF -> RF	genotyp × lek	0,01515	0,29539	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: LF -> RH	genotyp	0,01223	0,29076	Podania L-DOPA
Średnia maksymalna intensywność koloru pikseli odcisku tylnej łapy	genotyp × lek	0,00851	0,26546	Podania L-DOPA
Średnia wielkość odcisku tylnej łapy	genotyp × lek	0,01305	0,29076	Podania L-DOPA
Średnia wielkość odcisku tylnej łapy	genotyp	0,01958	0,33936	Podania L-DOPA
Średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem	lek	0,00333	0,17328	Podania L-DOPA
Średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem	genotyp × lek	0,00601	0,23420	Podania L-DOPA
Średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem	genotyp	0,03495	0,49571	Podania L-DOPA
Wielkość odcisku tylnej łapy	lek	0,00081	0,12198	Podania L-DOPA

*dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami (okres rozwoju fenotypu) lub dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji (okres podań L-DOPA)

**poprawka Benjamini-Hochberga na liczbę porównań

*** oznaczenie łap: LF – lewa przednia, LH – lewa tylna, RF – prawa przednia, RH – prawa tylna

Na rycinie widać jednak, że dla zwierząt obu genotypów średnie wartości fluktuowały między sesjami testowymi i nie zanotowano wyraźnej tendencji do zmian w czasie. Ponadto, efekt interakcji wobec tej miary nie był istotny po zastosowaniu poprawki ($p = 0,16059$). Interakcja ta okazała się również nieistotna wobec sprzężenia ruchu dwóch łap: LH $\rightarrow$ RH po zastosowaniu poprawki ($p = 0,08544$).



Rycina 15. Wybrane parametry chodu samców myszy z doświadczenia I zmierzone w systemie CatWalk. (a) Sprężenie ruchu dwóch łap: RH $\rightarrow$ LF. (b) Wielkość odcisku tylnej łapy. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 5-11: kontrola: 11, mutanci: 7 (a) albo 8 (b), tydzień 13 (od lewej do prawej): 6, 5, 4 i 5 osobników. * $p < 0,05$ w stosunku do grupy kontroli oraz \$ $p < 0,05$ w stosunku do grupy mutantów otrzymujących placebo w teście t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

W okresie przyjmowania L-DOPA u samców z doświadczenia I zaobserwowano istotny wpływ genotypu zwierząt na 4 zmienne ruchowe: średnią wielkość odcisku tylnej łapy (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,16} = 6,729$, $p = 0,019578$; Ryc. 15b), średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem ($F_{1,16} = 5,309$, $p = 0,03495$), rozstaw przednich łap ($F_{1,16} = 6,434$, $p = 0,022$) oraz sprężenie ruchu dwóch łap: LF $\rightarrow$ RH ($F_{1,16} = 7,974$, $p = 0,0122$). Dla trzech spośród tych parametrów zanotowano również znamienne efekty interakcji genotypu z otrzymywaną substancją: dla średniej wielkości odcisku tylnej łapy ($F_{1,16} = 7,797$, $p = 0,013047$), dla średniego maksymalnego pola powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem ($F_{1,16} = 10,016$, $p = 0,00601$) oraz dla rozstawu przednich łap ($F_{1,16} = 14,460$, $p = 0,00156$). Ponadto, interakcja obu czynników miała istotny wpływ na sprężenie ruchu łap: LF $\rightarrow$ RF ($F_{1,16} = 7,397$, $p = 0,0151$) i na średnią maksymalną intensywność koloru pikseli odcisku tylnej łapy ($F_{1,16} = 8,990$, $p = 0,00851$). Sam rodzaj podawanej substancji wpłynął na średnią wielkość odcisku tylnej łapy (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,16} = 16,954$, $p = 0,000806$; Ryc.15 b) oraz na średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap tylnych z podłożem ($F_{1,16} = 11,864$, $p = 0,00333$). Średni odcisk łapy samców o genotypie mutantu traktowanych placebo

był mniejszy (średnia $\pm$ SEM: $0,159 \pm 0,00998$) niż odciski samców kontrolnych (placebo: $0,215 \pm 0,0120$, L-DOPA: $0,230 \pm 0,00544$), a także te samców otrzymujących L-DOPA ($0,228 \pm 0,00720$). Może to świadczyć o pewnym normalizującym fenotyp ruchowy efekcie L-DOPA u mutantów. Jednakże, po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga genotyp, lek ani ich interakcja nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej względem wpływu na którykolwiek z parametrów chodu w tej kohorcie (tabela 9).

W trzeciej badanej kohorcie, u samców z doświadczenia II, w okresie rozwoju fenotypu wykazano istotne działanie genotypu względem 10 parametrów chodu (tabela 10), w tym rozstawu przednich łap (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,21} = 9,795$, $p = 0,00506$), średniego maksymalnego pola powierzchni kontaktu łap przednich z podłożem ($F_{1,21} = 5,09$, $p = 0,0349$), sprzężenia ruchu dwóch łap: RF $\rightarrow$ RH ($F_{1,21} = 6,122$, $p = 0,022$) i sekwencji stawiania łap „AA” (RF $\rightarrow$ RH $\rightarrow$ LF $\rightarrow$ LH; $F_{1,21} = 10,32$, $p = 0,00419$). Obserwowane różnice między zwierzętami o odmiennych genotypach były jednak niewielkie. Przykładowo, rozstaw przednich łap zwierząt z mutacją był średnio tylko o 0,11 cm większy niż u myszy kontrolnych (średnia $\pm$ SEM: mutanty: $1,46 \pm 0,0283$ cm, kontrole: $1,35 \pm 0,0272$ cm), a średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap przednich z podłożem mniejsze o 0,046 cm² (mutanty: $0,302 \pm 0,0163$ cm², kontrole: $0,348 \pm 0,00908$ cm²).

Tabela 10. Parametry chodu samców z doświadczenia II, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA.

Badany parametr	Czynnik/ Interakcja	Wartość p*	Wartość p po poprawce **	Okres doświadczenia
Pozycja prawych łap	genotyp	0,01885	0,24174	Rozwój fenotypu
Rozstaw przednich łap	genotyp	0,00506	0,12695	Rozwój fenotypu
Sekwencja stawiania łap „AA” (RF $\rightarrow$ RH $\rightarrow$ LF $\rightarrow$ LH)	genotyp	0,00419	0,12695	Rozwój fenotypu
Sekwencja stawiania łap „AB” (LF $\rightarrow$ RH $\rightarrow$ RF $\rightarrow$ LH)	genotyp	0,02521	0,26219	Rozwój fenotypu
Sprzężenie ruchu dwóch łap: LF $\rightarrow$ LH	genotyp	0,04986	0,38891	Rozwój fenotypu
Sprzężenie ruchu dwóch łap: RF $\rightarrow$ RH	genotyp	0,02197	0,24479	Rozwój fenotypu

Badany parametr	Czynnik/ Interakcja	Wartość p*	Wartość p po poprawce **	Okres doświadczenia
Sprężenie ruchu dwóch łap: RH -> RF	genotyp	0,00950	0,16459	Rozwój fenotypu
Średnia długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap	genotyp × tygodnie	0,03727	0,34203	Rozwój fenotypu
Średnia intensywność koloru pikseli odcisku tylnej łapy	genotyp	0,01200	0,17016	Rozwój fenotypu
Średnie maksymalne pole powierzchni kontaktu łap przednich z podłożem	genotyp	0,03486	0,33986	Rozwój fenotypu
Długość kroku -- łapy przednie	genotyp	0,02339	0,29259	Podania L-DOPA
Długość kroku – łapy tylne	genotyp	0,03047	0,33950	Podania L-DOPA
Kadencja	genotyp × lek	0,00629	0,19628	Podania L-DOPA
Pozycja lewych łap	genotyp × lek	0,04860	0,44596	Podania L-DOPA
Rozstaw tylnych łap	genotyp × lek	0,01971	0,29259	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: LH -> LF	genotyp	0,03965	0,41241	Podania L-DOPA
Sprężenie ruchu dwóch łap: RF -> RH	genotyp	0,02101	0,29259	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania cyklu chodu przednich łap	genotyp × lek	0,00437	0,17028	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania cyklu chodu tylnych łap	genotyp × lek	0,02438	0,29259	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania fazy podporu na jednej łapie przedniej	genotyp × lek	0,00815	0,21197	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania fazy podporu na jednej łapie tylnej	genotyp × lek	0,01385	0,29259	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania fazy podporu na łapach przednich	genotyp × lek	0,00240	0,15949	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania fazy przenoszenia przednich łap	genotyp × lek	0,02095	0,29259	Podania L-DOPA

Badany parametr	Czynnik/ Interakcja	Wartość p*	Wartość p po poprawce **	Okres doświadczenia
Średnia długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap	genotyp × lek	0,02122	0,29259	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania ostatniej fazy podporu na obu przednich łapach	genotyp × lek	0,00283	0,15949	Podania L-DOPA
Średnia długość trwania pierwszej fazy podporu na obu przednich łapach	genotyp × lek	0,00307	0,15949	Podania L-DOPA
Średnia prędkość przejścia	genotyp × lek	0,04797	0,44596	Podania L-DOPA

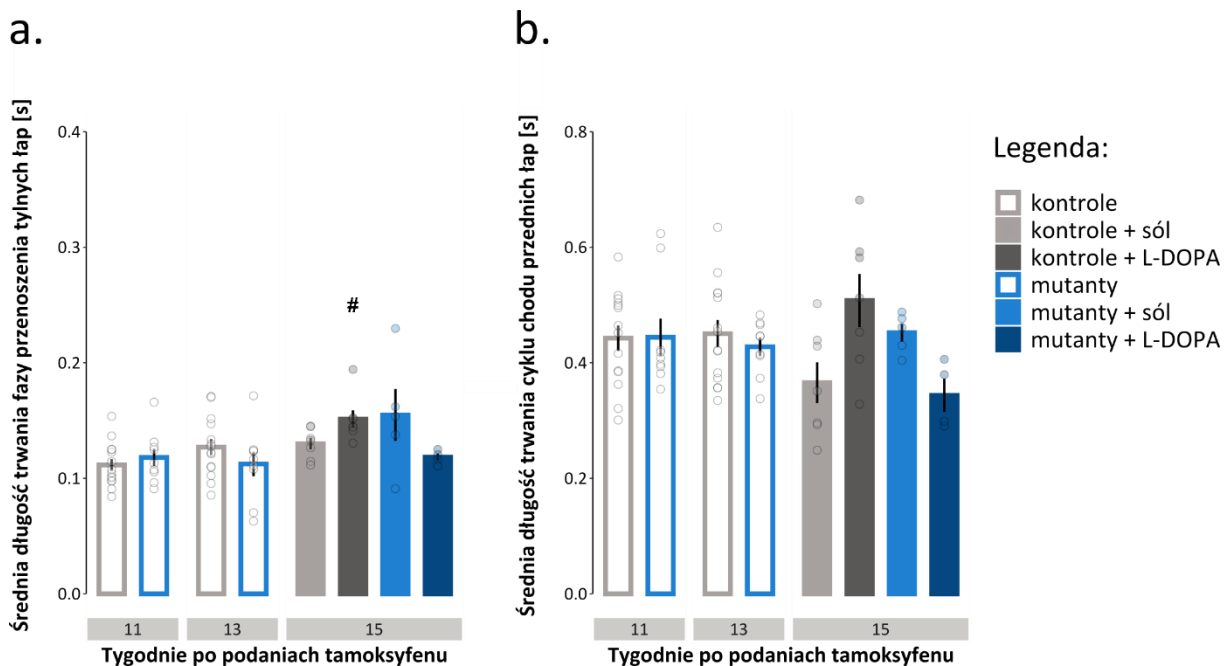
*dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami (okres rozwoju fenotypu) lub dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji (okres podań L-DOPA)

**poprawka Benjamini-Hochberga na liczbę porównań

*** oznaczenie łap: LF – lewa przednia, LH – lewa tylna, RF – prawa przednia, RH – prawa tylna

Interakcja genotypu i czasu, jaki upłynął od podań tamoksyfenu, miała istotny efekt na jedną zmienną – średnią długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap (ang. *Swing*; $F_{1,21} = 4,945$, $p = 0,0373$; Ryc. 16a). Nie zanotowano jednak znamiennych różnic między pomiarami uzyskanymi dla zwierząt o genotypie mutantu ani kontrolnych między sesjami testowymi (Ryc. 16a; test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga). Trzeba jednak zaznaczyć, że po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań ani genotyp, ani jego interakcja z czasem, jaki upłynął od indukcji efektów mutacji, nie miały znamiennego wpływu na żaden parametr chodu w tej kohorcie.

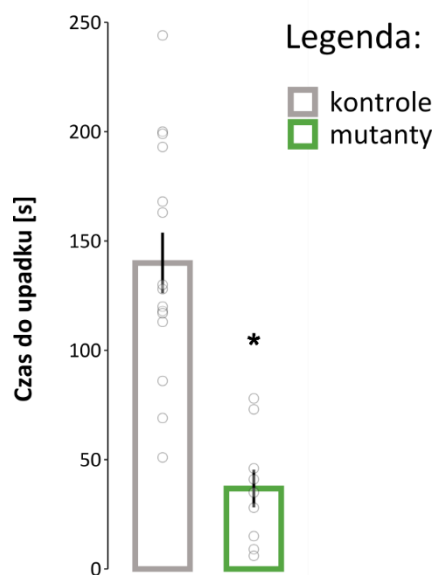
W okresie przyjmowania L-DOPA u samców myszy z doświadczenia II zaobserwowano, że genotyp wpływał istotnie na sprzężenie ruchu dwóch łap: LH → LF (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 4,880$, $p = 0,0397$), sprzężenie ruchu dwóch łap: RF → RH ($F_{1,19} = 6,331$, $p = 0,021$), na długość kroku łap przednich ($F_{1,19} = 6,078$, $p = 0,0234$), a także tylnych ($F_{1,19} = 5,467$, $p = 0,0305$). Interakcja genotypu z przyjmowaną substancją (L-DOPA lub solą fizjologiczną) miała znamienny efekt wobec aż 13 zmiennych opisujących parametry chodu.



Rycina 16. Wybrane parametry chodu samców myszy z doświadczenia II zmierzone w systemie CatWalk. (a) Średnia długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap. (b) Średnia długość trwania cyklu chodu przednich łap. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 11-13: kontrola: 14, mutanci: 9, tydzień 15 (od lewej do prawej): 7, 7, 5 i 4 osobniki. # $p < 0,05$ w stosunku do grupy mutantów po traktowaniu L-DOPA w teście t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

Wśród nich wymienić można m.in. średnią długość trwania fazy przenoszenia tylnych łap (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 6,308$, $p = 0,0212$; Ryc. 16a), średnią długość trwania cyklu chodu przednich łap ($F_{1,19} = 10,460$, $p = 0,00437$; Ryc. 16b), kadencję ($F_{1,19} = 9,430$, $p = 0,00629$), rozstaw tylnych łap ($F_{1,19} = 6,484$, $p = 0,0197$) i pozycję lewych łap ($F_{1,19} = 4,441$, $p = 0,0486$). Na wykresach dla średniej długości trwania fazy przenoszenia tylnych łap (Ryc. 16a) i średniej długości trwania cyklu chodu przednich łap (Ryc. 16b) widać tendencję do obniżania wartości obu miar przez L-DOPA u myszy z mutacją do poziomu bliskiego wartości średniej dla zwierząt kontrolnych traktowanych solą fizjologiczną. W przypadku pierwszej zmiennej wykazano ponadto znamiennej różnicę między dwoma grupami doświadczalnymi otrzymującymi L-DOPA (test t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,032$). Zastosowanie poprawki Benjamini-Hochberga wobec wyników analiz wariancji nie doprowadziło jednak do identyfikacji żadnych znamiennych efektów genotypu, L-DOPA ani interakcji obu czynników.

Podsumowując wyniki badania zaburzeń ruchowych przy pomocy systemu CatWalk u wszystkich trzech kohort myszy, można wyciągnąć następujące wnioski. Po pierwsze, wykazano wpływ utraty neuronów dopaminergicznych na wiele różnorodnych parametrów chodu, w tym na długość kroku, rozkładanie ciężaru ciała na łapy (rozstaw łap, wielkość odcisku łap, maksymalne pole powierzchni kontaktu łap z podłożem) i koordynację ruchu poszczególnych kończyn (sprzężenie ruchu dwóch łap, sekwencja stawiania łap). Obserwowane różnice między osobnikami z mutacją a myszami kontrolnymi były zazwyczaj niewielkie i w przeważającej części charakterystyczne dla danej kohorty zwierząt, tj. wyniki nie były spójne między kohortami i doświadczeniami. Po drugie, postępowanie efektów mutacji prowadziło do rozwoju zmian w chodzie myszy TIF-IA^{DATCreERT2} zidentyfikowanych w późniejszych sesjach testowych, co było zauważalne w przypadku parametrów, dla których wpływ genotypu wykazano dopiero w fazie stosowania L-DOPA (np. długość kroku u samców z doświadczenia II). Podobne obserwacje poczyniono dla zmiennych, dla których zanotowano znamiennej interakcję genotypu z liczbą tygodni po podaniach tamoksyfenu, jednakże względem nich nie zanotowano wyraźnego trendu do obniżania się ani podwyższania wartości w czasie, a jedynie fluktuacje między sesjami (np. sprzężenie ruchu dwóch łap: RH → LF u samców z doświadczenia I), różnice w czasie, które nie były statystycznie istotne. Po trzecie, wpływ L-DOPA na chód myszy TIF-IA^{DATCreERT2} wykazano dla różnorodnych parametrów, w tym względem wielkości odcisku tylnej łapy u samców z doświadczenia I. L-DOPA nie poprawiała jednak wszystkich parametrów upośledzonych przez utratę neuronów dopaminergicznych (np. sprzężenie ruchu dwóch łap: RH → RF u samic). Po czwarte, większość znamienych zaobserwowanych efektów genotypu, L-DOPA, interakcji genotypu z czasem lub z L-DOPA przestawała być istotna po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga na liczbę porównań względem wartości p. Poprawka ta była potrzebna ze względu na dużą liczbę wyników uzyskanych w tej części badań, a więc żeby wyeliminować błędy I rodzaju. Po jej zastosowaniu zidentyfikowano jedynie trzy znamienne wyniki, które stanowiły wpływ genotypu na trzy sprzężenia ruchu dwóch łap u samic i samców z doświadczenia I.



Rycina 17. Wynik testu pręta obrotowego przeprowadzonego na samcach z doświadczenia II w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu. Jako miarę koordynacji ruchowej, wytrzymałości i umiejętności zachowania równowagi zastosowano czas do upadku myszy z pręta. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły: kontrola: 15, myszy z mutacją: 9. * $p < 0,05$ w stosunku do zwierząt o genotypie kontrolnym w teście t-Studenta.

O ile test CatWalk pozwolił wykryć jedynie niewielkie różnice w sposobie poruszania się myszy TIF-IA^{DATCreERT2}, test pręta obrotowego pozwolił wykryć duże różnice w takich funkcjach ruchowych, jak wytrzymałość, koordynacja, umiejętność zachowania równowagi w warunkach przyspieszenia. Wyniki testu ujawniły znaczące różnice w czasie pozostawania na obracającym się pręcie do momentu upadku między samcami o genotypie zmutowanym a zwierzętami kontrolnymi w doświadczeniu II (Ryc. 17) w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu, a więc przy znacznym stopniu utraty neuronów dopaminergicznych (Rieker *et al.*, 2011). Myszy o genotypie mutantu utrzymywały się na pręcie średnio niecałe 37 s (średnia $\pm$ SEM: $36,8 \pm 8,65$ s), podczas gdy myszy kontrolne ponad 3 razy dłużej ($140 \pm 13,9$ s). Różnice między grupami były statystycznie istotne (test t-Studenta: $p < 0,0001$). W teście tym wykazano tym samym istnienie zaburzeń ruchowych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu.

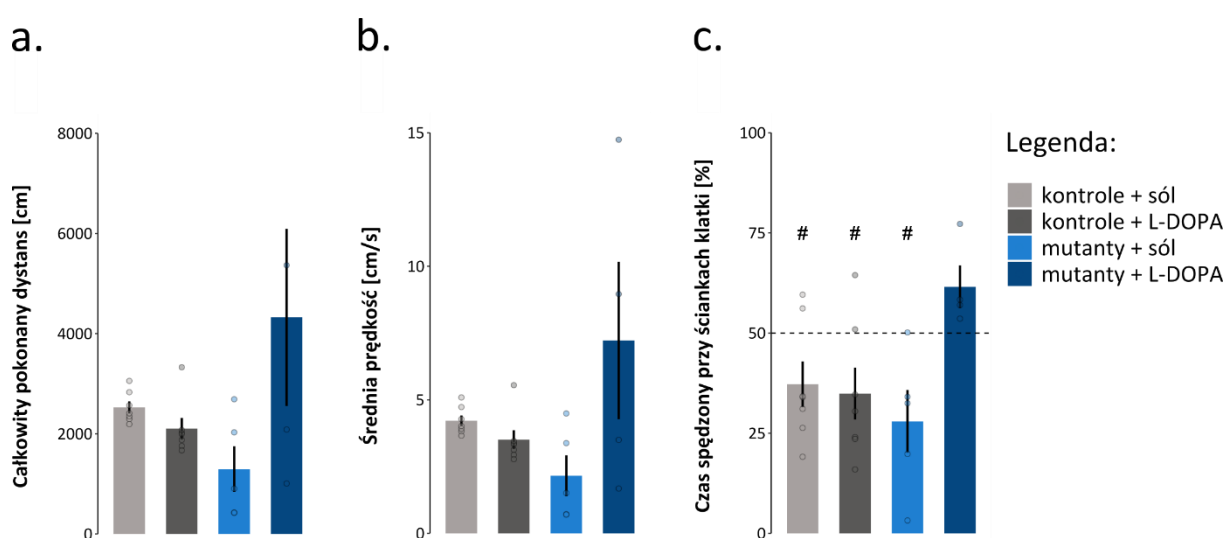
Badanie aktywności ruchowej i lęklivosti myszy w teście otwartego pola

W teście otwartego pola sprawdzono aktywność podczas swobodnej eksploracji klatki przez mysz. W ten sposób oceniono jej zdolności ruchowe oraz lęklivość – jako silniejszą tendencję do przebywania w bliskiej odległości od ścianek klatki. W doświadczeniu II analizom poddano trzy

parametry: całkowity przebyty przez mysz dystans, średnią prędkość poruszania się oraz procent czasu spędzonego w odległości nie większej niż 5 cm od ścianek klatki (Ryc. 18). W ten sposób zbadano zachowanie związane z objawami choroby Parkinsona – spowolnieniem ruchowym oraz zaburzeniami lękowymi, które to zaburzenia występują ze średnią częstością 31% u chorych (Broen *et al.*, 2016).

Genotyp myszy nie miał istotnego wpływu na całkowity dystans pokonany przez nie w teście (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 0,250$, $p = 0,623$; Ryc. 18a). Nie zaobserwowano także znamiennego wpływu podań L-DOPA na ruchliwość myszy ($F_{1,19} = 2,071$, $p = 0,166$). Na zachowanie to znamienny wpływ miała jednak interakcja obu zmiennych ($F_{1,19} = 6,989$, $p = 0,016$). Myszy o genotypie mutantu traktowane L-DOPA średnio pokonały największy dystans w trakcie trwania testu (średnia $\pm$ SEM: 4326 ± 1768 cm), jednak należy zaznaczyć, że grupa ta była mało liczna ($N = 4$) i jeden z osobników pokonał szczególnie duży dystans. Różnice między grupami nie były jednak znamienne (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga:).

Analogiczne obserwacje poczyniono dla średniej prędkości poruszania się myszy w teście (Ryc. 18b). Przy braku istotnych efektów genotypu (dwuczynnikowa ANOVA z efektami interakcji: $F_{1,19} = 0,253$, $p = 0,621$) i podań L-DOPA ($F_{1,19} = 2,085$, $p = 0,1651$), interakcja obu czynników okazała się mieć znamienny wpływ na średnią prędkość poruszania się myszy ($F_{1,19} = 7,012$, $p = 0,0159$). Zwierzęta o genotypie mutantu wykazały największą średnią prędkość poruszania się (średnia $\pm$ SEM: $7,22 \pm 2,95$ cm), jednak różnice między grupami doświadczalnymi nie były znamienne (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).



Rycina 18. Wyniki przeprowadzenia testu otwartego na samcach z doświadczenia II. W teście zbadano (a) całkowity pokonany dystans w czasie 10 minut trwania testu, (b) średnią prędkość poruszania się myszy oraz (c) czas spędzony w pobliżu ścianek klatki. Słupki reprezentują średnią

wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno (od lewej do prawej): 7, 7, 5 i 4 osobniki. # $p < 0,05$ w stosunku do grupy mutantów po traktowaniu L-DOPA w teście t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

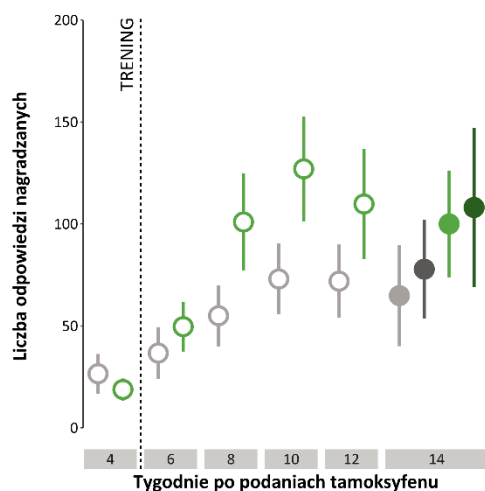
Mutanty otrzymujące L-DOPA cechował również największy odsetek czasu spędzonego w pobliżu ścianek klatki (średnia $\pm$ SEM: 61.5 ± 5.33 %; Ryc. 18c), co może świadczyć o nasilonej lęklivosti tej grupy zwierząt. Różnice te były istotne statystycznie względem każdej z pozostałych grup (testy t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: $p = 0,028$ dla porównania grupy mutantów traktowanych L-DOPA z każdą z pozostałych grup). Również dla tej zmiennej wykazano istotny wpływ interakcji genotypu i L-DOPA (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 7,113$, $p = 0,0152$), przy braku znamionnego wpływu samego genotypu ($F_{1,19} = 1,038$, $p = 0,3210$) lub samych podań L-DOPA ($F_{1,19} = 3,129$, $p = 0,0930$).

Podsumowując, dla obu badanych zmiennych mierzących cechy poruszania się myszy – całkowitego pokonanego dystansu oraz średniej prędkości poruszania się – wykazano znamienne efekty interakcji genotypu oraz podawanej substancji. Mutanty otrzymujące L-DOPA wykazywały się średnio największymi wartościami obu miar, jednakże różnice między każdą z grup nie były znamienne statystycznie. Grupa ta charakteryzowała się również nasiloną lęklnością w teście, spędzając większy odsetek czasu trwania testu przy ściankach klatki.

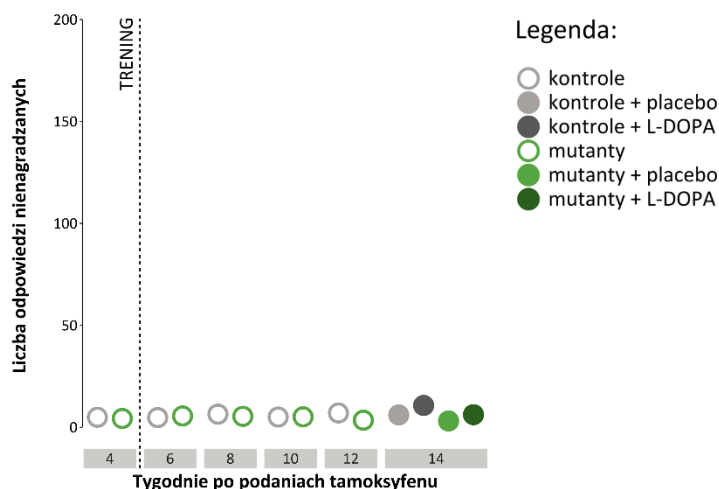
Instrumentalne poszukiwanie wrażeń

Test instrumentalnego poszukiwania wrażeń został wykonany na samcach z obu doświadczeń i miał na celu ocenę zdolności wykonawczych, poznawczych, uczenia się i poszukiwania wrażeń. Choć u pacjentów z chorobą Parkinsona tendencja do poszukiwania wrażeń jest mało poznana, według jednego z doniesień wykazują oni osłabioną tendencję do ich poszukiwania (Evans *et al.*, 2006). Zaburzenia wykonawcze i poznawcze należą natomiast do powszechnych objawów pozaruchowych tej choroby (Aarsland *et al.*, 2010).

a.



b.



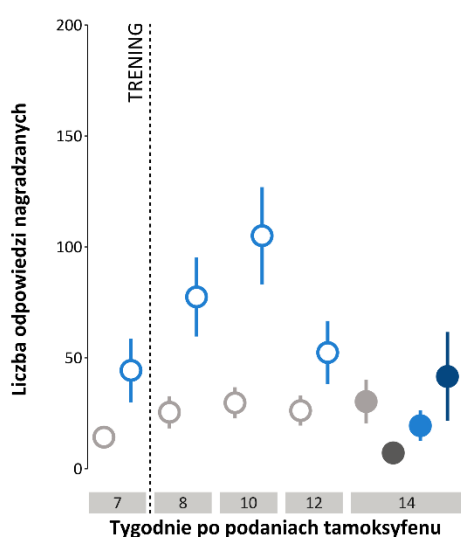
Rycina 19. Wyniki przeprowadzenia testu badającego instrumentalne poszukiwanie wrażeń u samców z doświadczenia I. (a) Liczba odpowiedzi nagradzanych prezentacją bodźców. (b) Liczba odpowiedzi nienagradzanych. Punkty reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym tygodniu, linie symbolizują SEM. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 4-12: kontrole: 11, mutanty: 9, tydzień 14 (od lewej do prawej): 6, 5, 3 i 5 osobników.

W okresie rozwoju fenotypu samce z mutacją z doświadczenia I wykonywały przeciętnie więcej odpowiedzi nagradzanych prezentacją bodźców (średnia $\pm$ SEM: $81,2 \pm 10,7$) w danej sesji testowej niż osobniki kontrolne ($52,6 \pm 6,88$; Ryc. 19a). Może to sugerować większe zainteresowanie prezentacją bodźców u samców TIF-IA^{DATCreERT2}, ich większą aktywnością lub ciekawością. Jednakże, analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu genotypu na liczbę odpowiedzi nagradzanych (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,18} = 1,747$, $p = 0,203$). Zaobserwowano natomiast znamienne wpływy czasu ($F_{4,72} = 21,51$, $p < 0,0001$) oraz interakcji genotypu i czasu ($F_{4,72} = 3,46$, $p = 0,0121$) na ten parametr, co świadczy o odmiennej dynamice zachowania obu grup zwierząt w kolejnych sesjach testowych. Do około 10. tygodnia po podaniach tamoksyfenu obserwowano stopniowe zwiększanie się liczby wykonywanych odpowiedzi nagradzanych, potem natomiast niewielką tendencję do zmniejszenia, ale różnice między wartościami uzyskiwanymi przez zwierzęta o danym genotypie w poszczególnych tygodniach nie były istotne statystycznie (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).

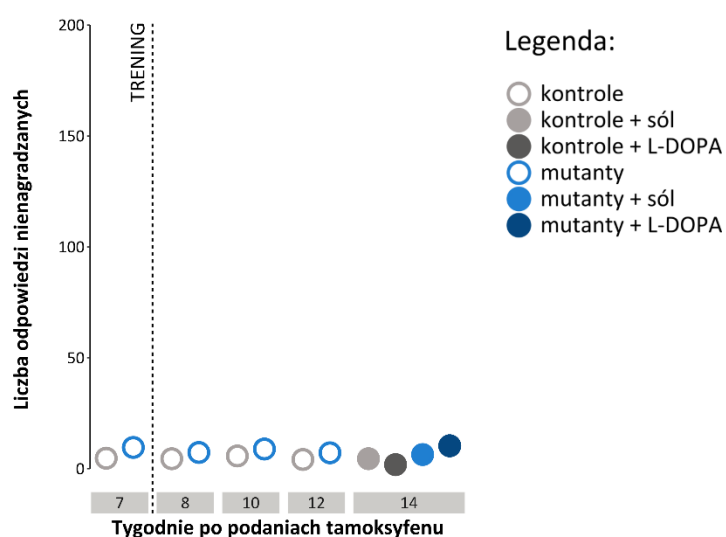
W okresie przyjmowania L-DOPA genotyp również nie wpłynął na liczbę wykonywanych odpowiedzi nagradzanych w teście w stopniu znamionym statystycznie ($F_{1,15} = 1,260$, $p = 0,279$). Również podawana substancja ($F_{1,15} = 0,128$, $p = 0,726$), ani interakcja obu czynników ($F_{1,15} = 0,006$, $p = 0,938$) nie różnicowały zwierząt pod względem tego zachowania.

Samce obu grup wykonywały zdecydowanie mniej odpowiedzi niezwiązanych z prezentacją bodźców (Ryc. 19b) niż nagradzanych, co było widoczne już na etapie treningu. W okresie rozwoju fenotypu samce z mutacjami wykonywały ich średnio (średnia $\pm$ SEM) $4,78 \pm 0,422$ w danej sesji testowej, a więc podobnie niewiele, co samce kontrolne: $5,64 \pm 0,524$. Sugeruje to, że obie grupy zwierząt szybko nauczyły się, który otwór powiązany jest ze zmianami w środowisku i wykazywały wobec niego preferencję. Genotyp zwierząt (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,18} = 0,579$, $p = 0,457$) nie wpływał na liczbę odpowiedzi nienagradzanych. Ich liczba również nie zmieniała się istotnie w czasie ($F_{4,72} = 0,650$, $p = 0,628$) i pozostawała na zbliżonym poziomie w obu grupach samców, bez istotnego wpływu interakcji genotypu i czasu ($F_{4,72} = 1,891$, $p = 0,121$). W okresie przyjmowania L-DOPA obecność mutacji (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,15} = 0,938$, $p = 0,348$), stosowanie leku ($F_{1,15} = 1,535$, $p = 0,234$) ani interakcja obu czynników ($F_{1,15} = 0,058$, $p = 0,814$) nie miały znamionnego efektu na liczbę odpowiedzi nienagradzanych.

a.



b.



Rycina 20. Wyniki przeprowadzenia testu badającego instrumentalne poszukiwanie wrażeń u samców z doświadczenia II. (a) Liczba odpowiedzi nagradzanych prezentacją bodźców. (b) Liczba odpowiedzi nienagradzanych. Punkty reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym tygodniu, linie symbolizują SEM. Liczebności grup wynosiły kolejno: tygodnie 7-12: kontrola:15 , mutanty:9 , tydzień 14 (od lewej do prawej): 7, 7, 5 i 4 osobniki.

W doświadczeniu II w okresie rozwoju fenotypu samce z mutacją wykonywały wyraźnie więcej odpowiedzi nagradzanych (średnia $\pm$ SEM: $69,8 \pm 9,23$; Ryc. 20a) w sesji testowej niż samce kontrolne ($23,9 \pm 3,22$). Analiza ujawniła znamionny efekt mutacji względem tego zachowania (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,22} = 11,18$, $p = 0,00294$). Zaobserwowano

także istotny wpływ czasu ($F_{3,66} = 10,526$, $p < 0,00001$) i interakcji obu czynników ($F_{3,66} = 6,703$, $p = 0,000512$). O ile u samców kontrolnych poziom zainteresowania otworem aktywnym pozostawał na względnie podobnym poziomie w czasie, u samców o genotypie mutantu zanotowano tendencję wzrostową liczby odpowiedzi nagradzanych do 10. tygodnia po podaniach tamoksyfenu, a następnie zmniejszenie tej liczby. Trzeba jednak zaznaczyć, że różnice względem tego parametru między sesjami pomiarowymi nie były istotne (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).

Liczba odpowiedzi nagradzanych spadła w późniejszych tygodniach na tyle, że w okresie podań L-DOPA genotyp nie miał już istotnego efektu względem tego zachowania (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 1,137$, $p = 0,2996$; Ryc. 20a). Jednocześnie zanotowano znamienny wpływ interakcji genotypu i podań L-DOPA ($F_{1,19} = 5,214$, $p = 0,0341$): samce z mutacją po traktowaniu L-DOPA wykonywały średnio najwięcej odpowiedzi nagradzanych w tym okresie, a samce kontrolne po podaniach L-DOPA – najmniej. Sama L-DOPA nie wykazała jednak znamiennego efektu na badane zachowanie ($F_{1,19} = 0,328$, $p = 0,5736$) a różnice między 4 grupami doświadczalnymi w tym okresie nie były istotne statystycznie (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).

Obserwacje z doświadczenia I względem mniejszej liczby odpowiedzi nienagradzanych niż nagradzanych potwierdzono także w doświadczeniu II u zwierząt o obu genotypach (Ryc. 20b). W okresie rozwoju fenotypu samce o genotypie mutantu wykonywały średnio więcej odpowiedzi nienagradzanych (średnia $\pm$ SEM: $8,25 \pm 1,04$) niż myszy kontrolne ($4,80 \pm 0,665$). Genotyp nie miał jednak względem tego zachowania znamiennego wpływu (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,22} = 3,083$, $p = 0,093$). Liczba odpowiedzi nienagradzanych pozostawała zbliżona w czasie (tygodnie: $F_{3,66} = 1,009$, $p = 0,394$) u zwierząt obu grup, bez istotnego efektu interakcji (genotyp $\times$ tygodnie: $F_{3,66} = 0,346$, $p = 0,792$). W okresie podań L-DOPA zaobserwowano natomiast znamienny efekt genotypu na liczbę nienagradzanych odpowiedzi (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,19} = 4,845$, $p = 0,0403$). Zwierzęta z mutacją ponownie wykazywały średnio więcej tych odpowiedzi (średnia $\pm$ SEM: $8,15 \pm 2,61$) niż kontrole ($3,19 \pm 0,734$), jak zaprezentowano na rycinie 20b. Nadal jednak wartości te były dużo mniejsze niż liczba odpowiedzi nagradzanych, co świadczy o rozróżnianiu obu otworów i preferowaniu wykonywaniu odpowiedzi względem otworu aktywnego. Przyjmowana substancja ($F_{1,19} = 0,002$, $p = 0,963$) ani interakcji obu czynników ($F_{1,19} = 2,130$, $p = 0,1607$) nie wpłynęły na to zachowanie w stopniu istotnym statystycznie.

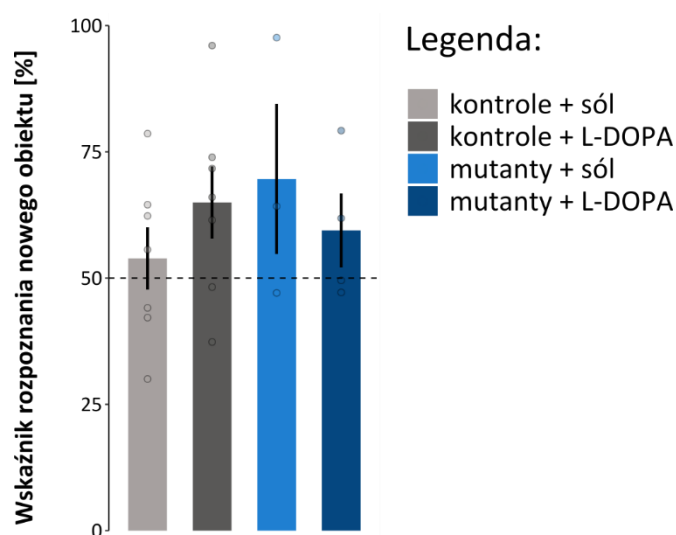
W teście instrumentalnego poszukiwania wrażeń zaobserwowano, że myszy z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych mają nasiloną tendencję do poszukiwania wrażeń, która była widoczna w zachowaniu zwierząt jako większa liczba wykonywanych odpowiedzi instrumentalnych związanych z prezentacją bodźców wzrokowych i słuchowych. Obserwacja ta być może świadczy o nadwrażliwości

na nagrodę myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Myszy obu genotypów poprawnie nauczyły się rozróżniać oba otwory w klatce Skinnera w przeprowadzonej procedurze i wykonywały więcej odpowiedzi nagradzanych niż nienagradzanych. Sugeruje to brak zaburzeń w uczeniu się odruchów instrumentalnych u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Nie zidentyfikowano również oznak zaburzeń funkcji wykonawczych, np. całkowitego zaprzestania wykonywania odpowiedzi instrumentalnych lub wykonywania podobnej liczby odpowiedzi na obu otworach klatki. Trzeba jednak zaznaczyć, że pojedyncze osobniki obu genotypów nie wykonywały odpowiedzi instrumentalnych lub wykonywały je sporadycznie, tj. średnio < 2 odpowiedzi nagradzanych lub nienagradzanych w sesji. U samców z mutacją obserwowano stopniowy wzrost liczby nagradzanych odpowiedzi w teście do około 10. tygodnia po podaniach tamoksyfenu, a następnie tendencję spadkową, co być może wynika z osłabienia zwierząt, będącego skutkiem znacznego stopnia zmniejszenia się liczby neuronów dopaminergicznych, znajdującego potwierdzenie także w zmianach masy ciała zwierząt. Początkowy wzrost i późniejszy spadek aktywności myszy TIF-IA^{DATCreERT2} w wykonywaniu odpowiedzi instrumentalnych zanotowany w obu kohortach może również świadczyć o wykształceniu się mechanizmów kompensujących do pewnego stopnia śmierć neuronów dopaminergicznych. W jednej z badanych kohort zanotowano ponadto efekty działania L-DOPA na myszy z mutacją nasilające zachowanie eksploracyjne względem obu otworów w klatce.

Pamięć krótkotrwała i eksploracja obiektów w klatce

Zaburzenia pamięci krótkotrwałej obserwuje się już u nowo zdiagnozowanych pacjentów z chorobą Parkinsona, których poprawę uzyskuje się po podaniach L-DOPA (Marini *et al.*, 2003). Test rozpoznawania nowego obiektu posłużył jako narzędzie oceny procesów poznawczych u myszy: pamięci rozpoznawczej i krótkotrwałej. Na procedurę składają się trzy etapy – habituacja, trening i test. Podczas fazy testu myszy mogły dokonywać eksploracji jednego obiektu poznanego podczas etapu treningu dzień wcześniej oraz jednego nowego obiektu. Spodziewanym zachowaniem zwierząt jest większe zainteresowanie nowym obiektem i poświęcenie większej ilości czasu na jego eksplorację niż znajomego obiektu, a więc wskaźnik rozpoznania nowego obiektu powinien wynosić ponad 50%. Ma to świadczyć o przechowywaniu w pamięci informacji o starym obiekcie i o zdolności do rozpoznania zmiany w środowisku. Procedurę wykonano na samcach z doświadczenia II w 15. tygodniu po podaniach tamoksyfenu, a więc przy spodziewanym znacznym stopniu utraty neuronów dopaminergicznych u mutantów. W przeprowadzonym przeze mnie teście zaobserwowałam duże rozbieżności w zdolności do rozpoznania nowego obiektu wewnątrz grup doświadczalnych (Ryc. 21). W każdej z grup od 1 do 3 osobników uzyskało wartość wskaźnika rozpoznania nowego obiektu poniżej 50%, a więc myszom tym nie udało się prawidłowo rozpoznać zmiany w środowisku lub też nie wykazywały one nasilonego zachowania eksploracyjnego wobec nowego obiektu.

Analiza statystyczna nie ujawniła istotnego wpływu genotypu (dwuczynnikowa ANOVA: $F_{1,17} = 0,265$, $p = 0,613$), leku ($F_{1,17} = 0,257$, $p = 0,619$) ani interakcji obu czynników ($F_{1,17} = 1,545$, $p = 0,231$). Ponadto, nie zaobserwowano różnic między grupami doświadczalnymi w teście *t*-Studenta (p po poprawce Benjamini-Hochberga $> 0,05$).



Rycina 21. Wynik przeprowadzenia testu rozpoznawania nowego obiektu na samcach z doświadczenia II. Jako miarę preferencji eksploracji nowego obiektu i pamięci krótkotrwałej zastosowano wskaźnik rozpoznania nowego obiektu, wyrażony jako procent czasu spędzonego na badaniu nowego obiektu wobec całkowitego czasu eksploracji obu obiektów podczas testu w czasie 10 minut. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno (od lewej do prawej): 7, 7, 3 i 4 osobniki.

Utrata neuronów dopaminergicznych ani stosowanie L-DOPA nie wpłynęły zatem na preferencję eksploracji nowego obiektu. Ponieważ jednak we wszystkich grupach zaobserwowano osobniki o małym zainteresowaniu nowym obiektem, wnioskowanie o braku zaburzeń pamięci krótkotrwałej lub innych procesów poznawczych należy przyjmować ostrożnie.

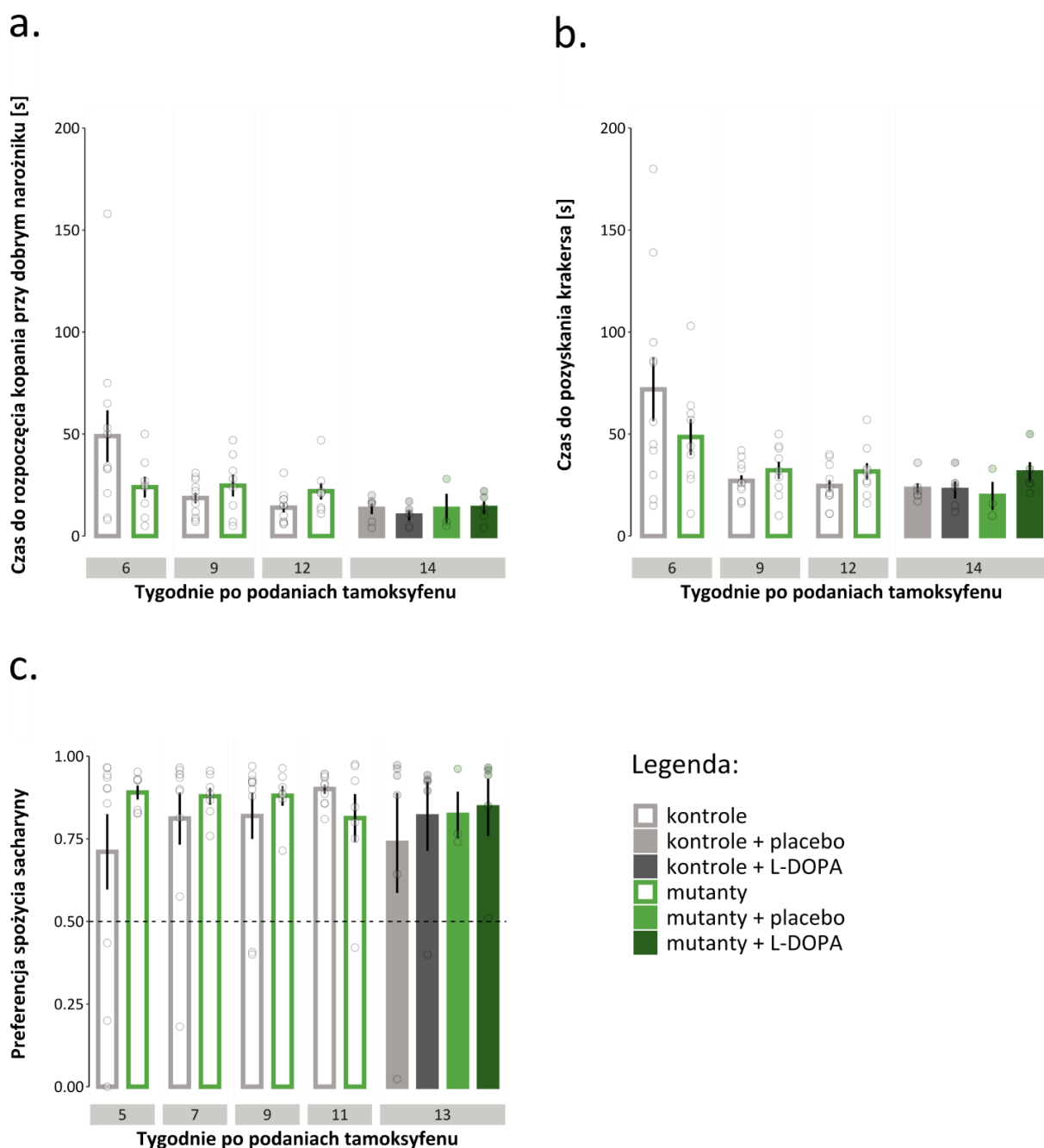
Ocena wrażliwości powonienia

Zaburzenia odczuwania i rozróżniania zapachu w postaci hiposmii lub anosmii dotyczą większości pacjentów z chorobą Parkinsona (Haehner *et al.*, 2009) i należą one do objawów pojawiających się jeszcze w fazie prodromalnej choroby (Ross *et al.*, 2008; Roos *et al.*, 2022). Procesy odczuwania i rozróżniania zapachów są regulowane przez przekąźnictwo dopaminergiczne (Hsia *et al.*, 1999; Escanilla *et al.*, 2009). Aby zbadać, czy u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} wraz z postępowaniem efektów mutacji rozwijają się zaburzenia węchu, przeprowadzono test znajdowania zakopanego jedzenia. Zastosowano dwie miary zachowania zwierząt w teście: czas do rozpoczęcia kopania przy właściwym narożniku (przy

którym pod ściółką ukryty był krakers) oraz czas do pozyskania krakersa, tzn. jego odkopania lub rozpoczęcia jedzenia.

Pierwszy z dwóch parametrów miał pomóc ocenić wrażliwość powonienia z możliwie najmniejszym wpływem funkcji ruchowych. Jak wynika z przeprowadzonej analizy (Ryc. 22a), genotyp zwierząt w okresie rozwoju fenotypu TIF-IA^{DATCreERT2} nie miał statystycznie istotnego wpływu na czas rozpoczęcia kopania w miejscu, gdzie zakopany był krakers (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,17} = 0,338$, $p = 0,569$). Wraz z kolejnymi sesjami testowymi myszy coraz szybciej odnajdywały właściwe miejsce ($F_{2,34} = 5,87$, $p = 0,006$; Ryc. 22a). Stwierdzono również statystycznie istotny efekt interakcji czynników genotypu i czasu ($F_{2,34} = 3,887$, $p = 0,03017$) w tym okresie. W 14. tygodniu od podań tamoksyfenu zbadano również efekty podań L-DOPA. W tym okresie genotyp zwierząt również nie miał istotnego wpływu na czas odnalezienia miejsca zakopania krakersa (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,15} = 0,267$, $p = 0,613$), podobnie jak stosowanie L-DOPA ($F_{1,15} = 0,259$, $p = 0,618$). Interakcja obu zmiennych także nie wykazała istotnego efektu na badany parametr ($F_{1,15} = 0,284$, $p = 0,602$). Ponadto, nie zanotowano istotnych różnic między średnimi wartościami uzyskanymi dla poszczególnych grup w różnych punktach czasowych (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga; Ryc. 22a).

Drugi z badanych parametrów – czas do pozyskania krakersa – został przeanalizowany w analogiczny sposób do pierwszego (Ryc. 22b). W okresie rozwoju fenotypu genotyp nie wpłynął znamienne na czas pozyskania krakersa (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,18} = 0,281$, $p = 0,602$). Z czasem jednak myszy coraz szybciej pozyskiwały krakersa ($F_{2,36} = 10,85$, $p = 0,000205$; Ryc. 22b). Wpływ interakcji obu czynników nie był istotny statystycznie ($F_{2,36} = 2,169$, $p = 0,129$). W okresie przyjmowania L-DOPA nie zaobserwowano znamiennych efektów ani genotypu (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,15} = 0,788$, $p = 0,389$), ani L-DOPA ($F_{1,15} = 0,947$, $p = 0,346$), ani też interakcji obu czynników ($F_{1,15} = 1,759$, $p = 0,205$). Różnice między grupami w różnych punktach czasowych nie były znamienne (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga; Ryc. 22b).



Rycina 22. Wyniki testów znajdowania zakopanego jedzenia oraz preferencji sacharyny na samcach z doświadczenia I. (a) Czas do rozpoczęcia kopania przy dobrym narożniku oraz (b) czas do pozyskania krakersa to dwie miary, jakimi posługiwano się przy badaniu wrażliwości powonienia u myszy w teście znajdowania zakopanego jedzenia. (c) Preferencja spożycia sacharyny wyrażona jako frakcja spożytej objętości 0,1% (waga/obj.) roztworu sacharyny wobec sumarycznej objętości spożytej wody i roztworu sacharyny była metodą oceny zachowań mogących świadczyć o anhedonii u myszy. Słupki reprezentują średnią wartość dla każdej grupy, linie symbolizują SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno: (a) tygodnie 6-12: kontrolne: 11, mutanty: 8, tydzień 14 (od lewej do prawej): 6, 5, 3 i 5 osobników; (b) tygodnie 6-12: kontrolne: 11, mutanty: 9, tydzień 14 (od lewej do prawej): 6, 5, 3 i 5 osobników; (c) tygodnie 5-11: kontrolne: 10, mutanty: 7, tydzień 13 (od lewej do prawej): 6, 5, 3 i 5 osobników.

W teście znajdowania zakopanego jedzenia nie zaobserwowano zatem istotnych różnic we wrażliwości powonienia między myszami z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych a zwierzętami

o genotypie kontrolnym. Stosowanie L-DOPA również nie wpłynęło znamienne na obserwowane w teście zachowanie myszy. Myszy obu genotypów z czasem uczyły się szybciej odnajdywać i odkopywać krakers, pomimo umieszczania go podczas każdej sesji testowej w innym miejscu w klatce, chociaż różnice między sesjami były większe dla myszy o genotypie kontrolnym, co potwierdza znamienna interakcja czynników genotypu i czasu względem czasu do rozpoczęcia kopania we właściwym miejscu. Mimo to, myszy obu genotypów w każdym punkcie czasowym uzyskiwały podobny czas do znalezienia i pozyskania krakersa.

Preferencja sacharyny u samców

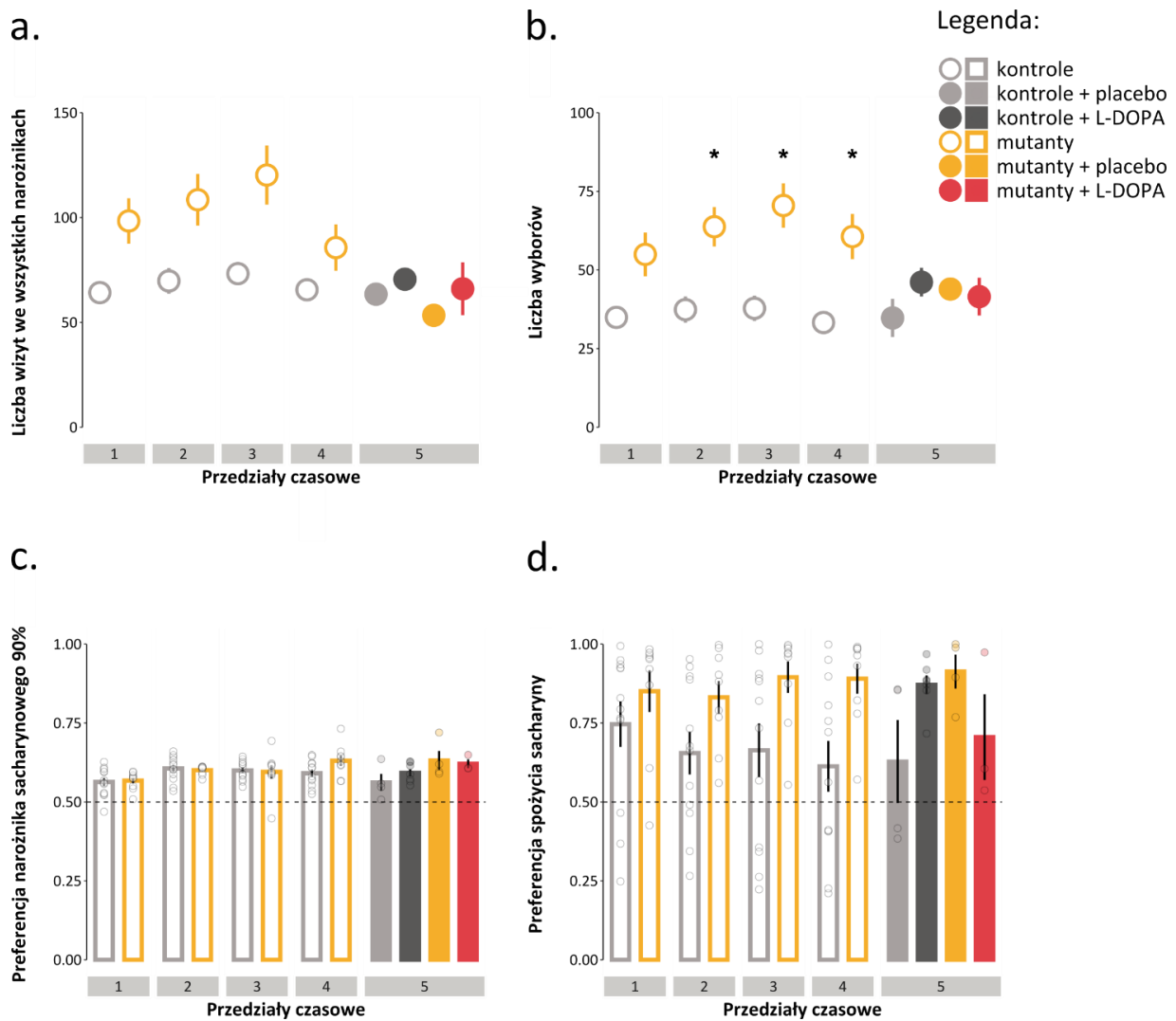
Anhedonia, czyli niezdolność odczuwania przyjemności, jest rozpoznawana z różną częstością u pacjentów z chorobą Parkinsona (Loas *et al.*, 2012), w niektórych badaniach dotycząc nawet 40% (Lemke *et al.*, 2005) lub więcej pacjentów z PD (Isella *et al.*, 2003). Jedną z metod służących do wykrywania zachowań mogących świadczyć o anhedonii u gryzoni laboratoryjnych jest test preferencji spożycia słodkich napojów (Papp *et al.*, 1991). W doświadczeniu I zastosowałam test preferencji sacharyny, słodzika pozbawionego wartości odżywczych, aby zbadać zachowania mogące świadczyć o anhedonii u samców i samic TIF-IA^{DATCreERT2}. U samców test był wykonywany co dwa tygodnie, natomiast u samic spożycie sacharyny i wody było monitorowane w sposób ciągły w klatkach IntelliCage – wyniki te przedstawiono w kolejnym podrozdziale.

U samców nie zaobserwowałam różnic między grupami doświadczalnymi w preferencji sacharyny (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga). Myszy obu genotypów wykazywały podobnie wysoką średnią preferencję spożycia roztworu słodzika (Ryc. 22c), która przekraczała 0,5, choć zdarzało się, że u pojedynczych osobników preferencja ta była poniżej 0,5. W okresie rozwoju fenotypu nie zanotowano istotnego wpływu efektu genotypu (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,15} = 1,29$, $p = 0,274$), upływu czasu ($F_{3,45} = 0,465$, $p = 0,708$) ani interakcji obu czynników ($F_{3,45} = 1,159$, $p = 0,336$) na preferencję sacharyny. W okresie przyjmowania L-DOPA również nie zaobserwowano statystycznie znamiennego wpływu mutacji (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,15} = 0,250$, $p = 0,625$). Przyjmowanie L-DOPA również nie wpłynęło na preferencję sacharyny ($F_{1,15} = 0,206$, $p = 0,657$), podobnie jak interakcja obu czynników ($F_{1,15} = 0,051$, $p = 0,824$). Samce TIF-IA^{DATCreERT2} nie miały obniżonej preferencji spożycia słodkiej sacharyny, więc nie zaobserwowano w tym teście zachowań mogących świadczyć o anhedonii.

Zachowanie samic myszy w teście probabilistycznego przeuczania

Celem wykonania procedury było kompleksowe badanie aktywności zwierząt, ich funkcji wykonawczych, motywacji, zdolności uczenia się oraz preferencji sacharyny. Procedura została przeprowadzona według protokołu opublikowanego we wcześniejszej (Jabłońska *et al.*, 2021). Zaburzenia poznawcze i wykonawcze to częste objawy pozaruchowe choroby Parkinsona (Aarsland *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). U pacjentów obserwuje się zaburzenia w obszarze różnych domen poznawczych, w tym pamięci i uwagi (Aarsland *et al.*, 2010), co ujawnia się poprzez pogorszone wyniki w zadaniach wymagających użycia specyficznych operacji umysłowych, w tym probabilistycznego przeuczania (Peterson *et al.*, 2009). Co więcej, stosowanie L-DOPA pogarszało wykonywanie zadania polegającego na przeuczaniu u pacjentów (Graef *et al.*, 2010). Podczas testu probabilistycznego przeuczania badano zachowanie samic z doświadczenia I w klatkach IntelliCage. Zastosowano cztery miary pozwalające na ocenę aktywności (liczba wizyt we wszystkich narożnikach klatki, liczba wizyt trwających > 2s w narożnikach oferujących roztwór sacharyny, zdolności uczenia się/przeuczania (preferencja narożnika z wyższym prawdopodobieństwem uzyskania roztworu sacharyny) i ich preferencję spożycia sacharyny (Ryc. 23). Ponieważ doświadczenie trwało wiele tygodni, uzyskane dane analizowano w przedziałach czasowych: czterech podczas okresu rozwoju fenotypu oraz jednego podczas 2-tygodniowego przyjmowania L-DOPA.

Samice z mutacją wykonywały średnio niemal 35 więcej wizyt w danym przedziale czasowym we wszystkich narożnikach niż samice kontrolne przez cały okres rozwoju fenotypu (Ryc. 23a). Przeprowadzona analiza wskazała na statystycznie istotny wpływ genotypu na liczbę wizyt (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,19} = 11,21$, $p = 0,00338$) oraz znamienne efekty przedziału czasowego ($F_{3,57} = 6,240$, $p = 0,000972$). Efekt interakcji obu czynników nie wpływał istotnie na liczbę wizyt ($F_{3,57} = 2,712$, $p = 0,053352$).



Rycina 23. Wyniki badania zachowania samic z doświadczenia I w teście probabilistycznego przeuczania przeprowadzonym w klatkach IntelliCage. (a) Liczba wizyt we wszystkich narożnikach w przedziałach czasowych. (b) Liczba wyborów, czyli wizyty dłuższe niż 2 s w narożnikach oferujących dostęp do 0,1% (waga/obj.) roztworu sacharyny. (c) Preferencja odwiedzania narożnika oferującego sacharynę z większym prawdopodobieństwem jej uzyskania ($P = 0,9$) wyrażona jako ułamek wszystkich wizyt w dwóch narożnikach oferujących roztwór sacharyny ($P = 0,9$ i $P = 0,3$). (d) Preferencja spożycia sacharyny wyrażona jako frakcja liżnięć nosków butelek z 0,1% (waga/obj.) roztworem sacharyny wobec sumarycznej liczby liżnięć nosków wszystkich butelek. Miary przedstawione w a-c oceniały aktywność, funkcje poznawcze i zdolność probabilistycznego przeuczania u myszy TIF-IADATCreERT2, natomiast preferencja sacharyny posłużyła do oceny zachowań mogących świadczyć o anhedonii. Duże punkty (a-b) oraz słupki (c-d) reprezentują średnią wartość dla każdej grupy w danym przedziale czasowym, linie symbolizują SEM, a małe punkty (c-d) to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Liczebności grup wynosiły kolejno: przedziały 1-4: kontrole: 12, mutanty: 9, przedział 5 (od lewej do prawej): 4, 7, 4 i 3 osobniki. * $p < 0,05$ w stosunku do zwierząt o genotypie kontrolnym w teście t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga.

W okresie przyjmowania L-DOPA, czyli w przedziale czasowym nr 5, genotyp zwierząt nie wpłynął istotnie na liczbę wizyt (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,14} = 1,982$, $p = 0,181$). Również

przyjmowanie L-DOPA nie wywarło istotnego efektu na obserwowane zachowanie ($F_{1,14} = 2,050$, $p = 0,174$), podobnie jak interakcja obu czynników ($F_{1,14} = 0,173$, $p = 0,684$). Różnice między średnimi wartościami uzyskanymi dla poszczególnych grup w różnych przedziałach czasowych nie były istotne (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).

Jeśli zawęzić obszar analizy aktywności samic w klatkach IntelliCage do ponad dwusekundowych wizyt jedynie w narożnikach oferujących roztwór sacharyny (Ryc. 23b), to zanotowano, że podczas okresu rozwoju fenotypu samice o genotypie mutantu również dokonywały więcej takich wyborów (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,19} = 16,04$, $p = 0,000757$). Zanotowano również znamienny efekt przedziału czasowego ($F_{3,57} = 4,019$, $p = 0,0116$), lecz interakcja obu czynników nie wpływała istotnie na liczbę wyborów ($F_{3,57} = 1,897$, $p = 0,1403$). Analogicznie do analiz wykonanych dla liczby wizyt, w okresie przyjmowania L-DOPA ani genotyp zwierząt (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,14} = 0,033$, $p = 0,859$), ani podawanie leku ($F_{1,14} = 1,3$, $p = 0,273$) nie wywarły istotnego wpływu na liczbę wyborów. Interakcja obu czynników była nieznamienna ($F_{1,14} = 1,750$, $p = 0,207$). Statystycznie istotne różnice między grupami w poszczególnych punktach czasowych zaobserwowano między myszami o genotypie zmutowanymi i kontrolnym w przedziałach czasowych nr 2, 3 i 4 (test *t*-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga: wartości *p* odpowiednio: 0,015, 0,01 i 0,0167).

Trzecią zbadaną miarą zachowania w teście probabilistycznego przeuczania była preferencja narożników oferujących roztwór sacharyny o wyższym prawdopodobieństwie uzyskania go ($P = 0,9$). Umieszczenie tego narożnika zmieniało się co 48 godzin, wymuszając rozpoznanie nowej reguły przez każdego osobnika i zmianę strategii. W okresie rozwoju fenotypu samice obu genotypów wykazywały podobnie wysoką preferencję narożnika $P = 0,9$ (Ryc. 23c), który odwiedzały częściej niż ten z $P = 0,3$ w okresie rozwoju fenotypu nie zaobserwowano istotnego wpływu genotypu na tę preferencję (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,19} = 0,413$, $p = 0,528$). Preferencja ta zmieniała się istotnie między czterema przedziałami ($F_{3,57} = 7,275$, $p = 0,000325$), natomiast interakcja nie miała znamiennego wpływu na tę miarę ($F_{3,57} = 2,119$, $p = 0,107860$). W okresie przyjmowania L-DOPA analiza wskazała istotny efekt genotypu wobec preferencji narożnika z wyższym prawdopodobieństwem uzyskania dostępu do butelek z roztworem sacharyny (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,14} = 4,690$, $p = 0,0481$). Preferencja ta była średnio nieco wyższa u samic z mutacjami (średnia $\pm$ SEM: $0,627 \pm 0,0453$) niż u samic o genotypie kontrolnym ($0,581 \pm 0,0408$). Jednakże, stosowanie L-DOPA ($F_{1,14} = 0,437$, $p = 0,5195$) ani interakcja genotypu i podawanej substancji nie wykazały znamiennego wpływu na badaną preferencję

($F_{1,14} = 0,878$, $p = 0,3645$). Ponadto, analizy nie wskazały na istotne różnice między grupami w poszczególnych przedziałach czasowych (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga).

Podobnie jak u samców z doświadczenia I, u samic TIF-IA^{DATCreERT2} również zbadano preferencję spożycia roztworu sacharyny w celu zidentyfikowania zachowań mogących świadczyć o anhedonii. Samice obu genotypów wykazywały preferencję spożycia roztworu słodzika (Ryc. 23d). Należy przy tym zaznaczyć, że osobniki o genotypie mutanta cechowały się podwyższoną preferencją (średnia $\pm$ SEM: $0,867 \pm 0,0264$) w stosunku do myszy o genotypie kontrolnym ($0,669 \pm 0,0378$). Znamiennego wpływ genotypu na badaną miarę potwierdziła analiza statystyczna (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji i powtarzanymi pomiarami: $F_{1,19} = 4,557$, $p = 0,046$). Preferencja ta nie zmieniała się znacząco między przedziałami czasu ($F_{3,57} = 1,648$, $p = 0,1884$). Interakcja obu czynników również nie wpłynęła na preferencję spożycia sacharyny w okresie rozwoju fenotypu, choć zanotowano tendencję ($F_{3,57} = 2,689$, $p = 0,0548$). W okresie przyjmowania leku genotyp nie wpłynął istotnie na preferencję spożycia sacharyny (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,14} = 0,261$, $p = 0,617$). Stosowanie L-DOPA także nie miało znaczących efektów na tę miarę ($F_{1,14} = 0,588$, $p = 0,456$). Jednakże, interakcja obu czynników miała istotny wpływ na preferencję spożycia sacharyny ($F_{1,14} = 7,505$, $p = 0,016$); średnio największą preferencję wykazywały osobniki z mutacją traktowane placebo (średnia $\pm$ SEM: $0,913 \pm 0,0536$) oraz osobniki o genotypie kontrolnym traktowane L-DOPA ($0,871 \pm 0,0294$). Trzeba jednak zaznaczyć, że różnice między grupami w poszczególnych przedziałach czasowych nie były istotne (test t -Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga) a każda grupa doświadczalna charakteryzowała się preferencją spożycia roztworu sacharyny.

Podsumowując, w teście probabilistycznego przeuczania zanotowano szereg zmian w zachowaniu samic z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych. Samice te wykonywały średnio więcej wizyt we wszystkich narożnikach, jak i więcej wyborów niż samice o genotypie kontrolnym w okresie rozwoju fenotypu. Świadczy to o ich zwiększonej aktywności i być może silnej motywacji do poszukiwania nagród, wrażeń lub zwiększonym pragnieniu. W okresie przyjmowania leku, a więc przy znacznym stopniu utraty neuronów dopaminergicznych śródmózgowia, efekt genotypu na tę aktywność zanikał. Samice-mutanty wykazywały podobnie wysoką preferencję odwiedzania narożnika z większym prawdopodobieństwem uzyskania roztworu sacharyny, co samice o genotypie kontrolnym, chociaż w okresie przyjmowania L-DOPA zanotowano istotny wpływ genotypu mutantów na podwyższenie tej preferencji. Obserwacje te sugerują, że utrata neuronów dopaminergicznych nie wpłynęła u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} na upośledzenie funkcji poznawczych ani też nie zaburzyła procesów uczenia się i probabilistycznego przeuczania. Samice TIF-IA^{DATCreERT2} nie wykazywały oznak anhedonii podczas testu; przeciwnie, zaobserwowano wyższą preferencję spożycia sacharyny niż u zwierząt kontrolnych.

Podania L-DOPA nie wpłynęły znamienne na obserwowane zachowania u mutantów, choć należy zauważyć, że preferencja sacharyny była nieco niższa u samic TIF-IA^{DATCreERT2}, którym podawano L-DOPA niż u tych, które otrzymywały placebo, co jednak nie świadczy o anhedonii.

Reasumując badania behawioralne, wykonano dwa doświadczenia na myszach TIF-IA^{DATCreERT2} z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych. Podsumowanie wyników badań behawioralnych i przeprowadzonych pomiarów masy ciała przedstawiono w tabeli 11. W przeprowadzonych procedurach histologicznych potwierdzono zmniejszenie immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej w śródmózgowiu oraz prążkowi grzbietowym zwierząt z mutacją. Dodatkowo, zanik neuronów dopaminergicznych wpłynął na obniżenie masy ciała myszy w bardziej zaawansowanym etapie rozwoju efektów mutacji. Szczep ten charakteryzował się zaburzeniami funkcji ruchowych, które były wyraźnie zauważalne w teście pręta obrotowego i, w dużo bardziej umiarkowanym stopniu, w teście oceniającym parametry chodu przy użyciu sytemu CatWalk. Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} nie wykazywały w testach zachowań mogących świadczyć o upośledzeniu węchu lub anhedonii. Nie zaobserwowano także u nich zaburzeń uczenia się i przeuczania, zapamiętywania, odtwarzania zapamiętanych informacji w procedurach polegających na pamięci krótkotrwałej ani długotrwałej, upośledzenia funkcji wykonawczych. Zwierzęta z uszkodzeniami układu dopaminowego cechowało natomiast zintensyfikowanie zachowań związanych z poszukiwaniem wrażeń, uzyskaniem napoju słodkiego lub wody, co może świadczyć o nasilonym działaniu ukierunkowanym na różnego rodzaju nagrodę. Ponadto, u mutantów traktowanych L-DOPA zanotowano zwiększoną lękliwość, a także zwiększoną aktywność ruchową. U zwierząt z mutacją zanotowano również częściowy wpływ L-DOPA na poprawę niektórych cech chodu, na zwiększenie liczby odpowiedzi instrumentalnych nagradzanych i nienagradzanych w teście instrumentalnego poszukiwania wrażeń, a także na niewielkie zmniejszenie preferencji spożycia sacharyny.

Tabela 11. Podsumowanie wyników badań behawioralnych wykonanych na myszach TIF-IA^{DATCreERT2}.

Nazwa procedury	Badane cechy fenotypowe	Wpływ mutacji	Wpływ L-DOPA
Ważenie	Zmiany masy ciała	Tak – obniżenie masy ciała	Nie
Test CatWalk	Parametry chodu	Niewielki, jedynie na niektóre parametry	Jedynie na pojedyncze parametry, ale nieistotny statystycznie po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań
Test pręta obrotowego	Koordinacja ruchowa, wytrzymałość, zachowanie równowagi	Tak – krótszy czas	Nie badano
Test otwartego pola	Aktywność ruchowa, prędkość poruszania się	Interakcja z efektami L-DOPA	Tak – u mutantów zwiększenie aktywności ruchowej i średniej prędkości

Nazwa procedury	Badane cechy fenotypowe	Wpływ mutacji	Wpływ L-DOPA
Test otwartego pola	Lękliwość	Interakcja z efektami L-DOPA	Tak – u mutantów zwiększona lękliwość
Test instrumentalnego poszukiwania wrażeń	Tendencja do poszukiwania wrażeń	Tak – nasiloną tendencją do poszukiwania wrażeń (ale znamienny efekt mutacji jedynie w 1 z 2 kohort)	Częściowy, w 1 z 2 badanych kohort u mutantów – zwiększenie liczby odpowiedzi instrumentalnych obu rodzajów
Test instrumentalnego poszukiwania wrażeń	Funkcje wykonawcze, uczenie się, pamięć	Nie	Nie
Test rozpoznawania nowego obiektu	Pamięć krótkotrwała, zachowania eksploracyjne	Nie	Nie
Test znajdowania zakopanego jedzenia	Wrażliwość powonienia	Nie	Nie
Test preferencji sacharyny	Anhedonia (samce)	Nie	Nie
Test probabilistycznego przeuczania	Pamięć, uczenie się, przeuczanie	Nie	Nie
Test probabilistycznego przeuczania	Aktywność, zachowania eksploracyjne	Tak – większa liczba wizyt i wyborów	Nie
Test probabilistycznego przeuczania – badanie preferencji sacharyny	Anhedonia (samice)	Brak oznak anhedonii, ale zwiększona preferencja spożycia sacharyny	Tak – u mutantów niewielkie zmniejszenie preferencji, ale brak oznak anhedonii

Profilowanie przestrzenne ekspresji genów pod wpływem L-DOPA

Charakterystyka uzyskanych próbek

Profilowanie przestrzenne ekspresji genów u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} zostało wykonane w celu identyfikacji jakościowej i ilościowej wpływu L-DOPA na transkryptom komórek w poszczególnych obszarach anatomicznych lub funkcjonalnych przedomózgowia. Nasza wcześniejsza praca wskazywała na działanie L-DOPA na korę czołową w szurzym modelu hemiparkinsonizmu (Radlicka *et al.*, 2021) względem różnych populacji neuronów, gleju i komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Liczne publikacje innych autorów opisywały również efekty leku na prążkowie grzbietowe (Konradi *et al.*, 2004; Heiman *et al.*, 2014; Charbonnier-Beaupel *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016). Jednak wpływ tego leku na ekspresję genów w poszczególnych obszarach przedomózgowia z dokładnością do warstw kory mózgowej lub poszczególnych części wyodrębnionych w badaniach anatomicznych był dotychczas nieznany. Poznanie molekularnych mechanizmów działania L-DOPA w poszczególnych obszarach

przodomózgowia w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona jest istotne z kilku powodów. Po pierwsze, aby móc lepiej zrozumieć podłoże leczniczego i ubocznego działania L-DOPA względem objawów ruchowych i pozaruchowych. Po drugie, aby zidentyfikować dotychczas nieznane populacje komórek podlegające zmianom funkcjonalnym pod wpływem L-DOPA w mózgu ze zmniejszoną ilością uwalnianej dopaminy, które mogą powodować powstawanie pozaruchowych objawów choroby lub utrudniać ich leczenie. Po trzecie, aby lepiej zrozumieć rolę przekazywania dopaminergicznego i jego wpływu na zachowanie. Dlatego też przestrzenne profilowanie ekspresji genów zostało użyte jako narzędzie badania zmian molekularnych w przodomózgowiu myszy TIF-IA^{DATCreERT2} pod wpływem L-DOPA.

W wyniku zastosowania metodyki Visium uzyskano 12 bibliotek cDNA, które zostały poddane RNA-seq: 5 bibliotek pochodzących od mutantów po traktowaniu solą fizjologiczną, 4 biblioteki od mutantów, które otrzymywały L-DOPA, 2 biblioteki pochodzące od myszy kontrolnych po podaniach soli fizjologicznych (jako dodatkowe próbki poprawiające klastrowanie wyników) oraz 1 biblioteka od zwierzęcia traktowanego L-DOPA o niejasnym fenotypie niezgodnym z genotypem. Ostatnia biblioteka była początkowo zaklasyfikowana jako pochodząca od myszy z mutacją, na co wskazywały wyniki genotypowania, jednakże wyniki barwienia immunofluorescencyjnego na obecność TH w prążkowie, jak i masa ciała zwierzęcia oraz dane uzyskane w teście pręta obrotowego sugerowały, że zwierzę to posiada cechy fenotypowe charakterystyczne dla myszy kontrolnych.

Biblioteki uzyskano ze skrawków tkanki z jednej z półkul mózgu, za wyjątkiem próbek 10 i 11, które ze względów technicznych (pęknięty bloczek tkanki) zawierały znaczną część przekroju drugiej półkuli. Parametry uzyskanych bibliotek przedstawiono w tabeli 12. Próbkę różniły się między sobą liczbą punktów obejmujących skrawek (od 36 do 67% pokrycia pola), z których każdy miał średnicę 55 µm, ilością cDNA uzyskaną średnio z punktu (od 95,38 do 307,88 pg) i średnim stężeniem uzyskanych bibliotek (między 23,19 a 80,46 nM), natomiast średnia wielkość fragmentów bibliotek była zbliżona (między 407 a 438 pz). Wielkość ta jest bliska do spodziewanej średniej wielkości fragmentów bibliotek podanej przez producenta, tj. 450 pz.

Tabela 12. Parametry cDNA i bibliotek uzyskanych z doświadczenia II.

Numer próbki	Grupa doświadczalna (genotyp, lek)	Całkowita ilość uzyskanego cDNA [ng]	Średnia ilość cDNA na punkt [pg]	Średnie stężenie bibliotek [nM]	Średnia wielkość fragmentów bibliotek [pz]	Liczba punktów na tkance (procent pokrycia pola)
1	mutant, sól fizjologiczna	289,41	148,49	33,64	407	1949 (39%)
2	mutant, L-DOPA	335,89	187,02	39,36	447	1796 (36%)
3	mutant, L-DOPA	356,87	164,91	59,58	438	2164 (43%)
4	mutant, sól fizjologiczna	381,12	161,70	31,32	418	2357 (47%)
5	mutant, sól fizjologiczna	184,86	95,83	30,75	422	1929 (39%)
6	mutant o fenotypie kontroli, L-DOPA	719,2	307,88	72,71	410	2336 (47%)
7	mutant, L-DOPA	399,37	218,23	65,76	436,5	1830 (37%)
8	kontrola, sól fizjologiczna	661,05	261,59	80,46	407	2527 (51%)
9	kontrola, sól fizjologiczna	424,91	233,60	29,82	429	1819 (36%)
10	mutant, sól fizjologiczna	709,23	212,98	34,26	417	3330 (67%)
11	mutant, sól fizjologiczna	616,45	206,24	25,45	405,5	2989 (60%)
12	mutant, L-DOPA	507,61	193,60	23,19	419,5	2622 (53%)

Biblioteki zostały następnie poddane sekwencjonowaniu przez firmę zewnętrzną na sekwenatorze Illumina NovaSeq 6000. Parametry RNA-seq zostały dobrane według zaleceń producenta odczynników i przy założeniu 50% pokrycia pola przez skrawek, aby uzyskać co najmniej 125 milionów sparowanych odczytów, czyli 250 milionów całkowitych odczytów. Średnio z każdej biblioteki uzyskano w przybliżeniu 224 milionów całkowitych odczytów, co przekładało się na średnio około 92 322 całkowitych odczytów lub 46 161 sparowanych odczytów na punkt objęty skrawkiem. Jest to więc nieco mniej niż sugerowana przez producenta wartość, tj. 50 000 sparowanych odczytów na punkt objęty skrawkiem. Podsumowując, uzyskane próbki cDNA oraz biblioteki cechowała duża różnorodność stężenia uzyskanego materiału, co częściowo wynika z odmiennego stopnia pokrycia pola szkiełka Visium przez skrawek. Biblioteki charakteryzowały się właściwym rozmiar fragmentów a

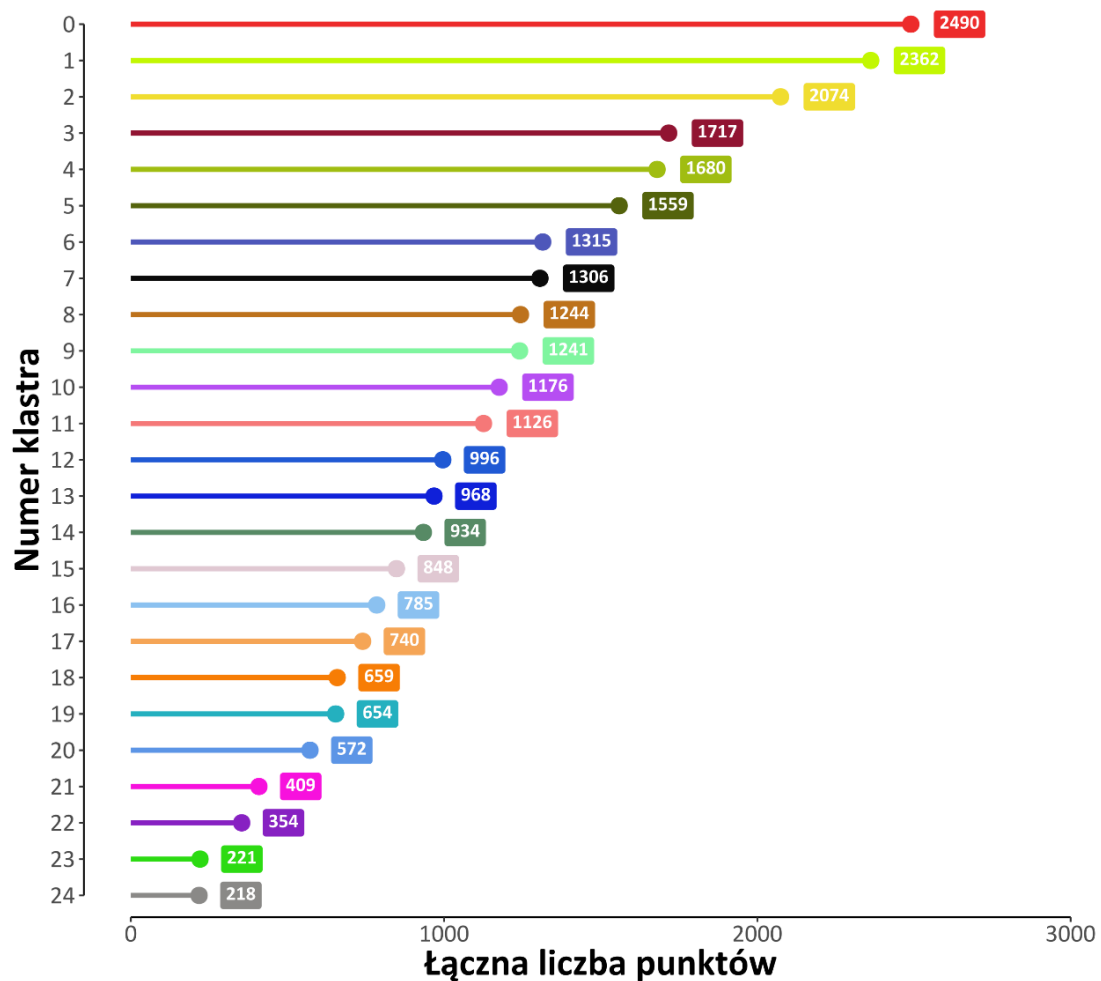
z każdej z próbek uzyskano zadowalającą ilość zsekwencjonowanych danych, choć nieco mniejszą niż spodziewana.

Identyfikacja transkryptów i analiza skupień

Pierwsza analiza odczytów RNA-seq w funkcji spaceranger count umożliwiła wygenerowanie plików .bam oraz połączenie danych transkryptomicznych z rozmieszczeniem punktów szkiełka pokrytych przez skrawek. Po jej zastosowaniu z użyciem genomu referencyjnego mm10-2020-A zidentyfikowano łącznie 24 209 unikalnych genów odpowiadających 24 224 identyfikatorom Ensembl. W tej wersji genomu całkowita liczba sekwencji genowych wynosiła 55 335 (https://www.gencodegenes.org/mouse/stats_M23.html; data dostępu: 01.07.2022 r.). Program MACS3 zidentyfikował z odczytów RNA-seq łącznie 230 773 pików. Podczas kolejnych etapów udoskonalania referencyjnego genomu – filtrowania według zgodności z przewidywaną nicią, wielkością parametrów, dopasowaniem do odczytów uzyskanych w metodzie Nanopore³ – odrzucono łącznie 215 747 z nich, a 15 026 pików odpowiadających 10 503 genom i tyluż identyfikatorom Ensembl zostało włączonych do nowego pakietu referencyjnego. Został on użyty przy ponownym przeprowadzeniu analizy łączącej odczyty RNA-seq z położeniem punktów objętych skrawkiem. Nowy pakiet referencyjny dla transkryptomu myszy był oparty na wcześniej zidentyfikowanych odczytach, dlatego odczyty RNA-seq przypisano do takiej samej liczby pików i genów, co zawarta w referencji. Większość wcześniejszych odczytów została zatem odrzucona, co zapewniło jednak przypisanie odczytów do genomu z większą dokładnością i wyższym prawdopodobieństwem zgodności.

Tak przygotowane dane posłużyły do wykonania analizy skupień. Jej celem była z jednej strony integracja profili transkrypcyjnych pochodzących z punktów objętych skrawkami z 12 mózgów myszy TIF-IA^{DATCreERT2}, z drugiej znalezienie podobieństw i różnic między profilami transkrypcyjnymi punktów w taki sposób, aby ich skupienia odzwierciedlały różnorodność strukturalną przedomózgowia dorosłej myszy. Analizę skupień przeprowadzono dla różnych ustawień parametru rozdzielczości (ang. *resolution*), co prowadziło do uzyskania odmiennej liczby skupień, zwanych również klastrami. Przy zadanej wartości rozdzielczości równej 1 uzyskano 25 klastrow, numerowanych od 0 do 24, w kolejności od skupienia, które zawierało najwięcej punktów. Liczba punktów w poszczególnych klastrach wynosiła od 2490 do 218 (Ryc. 24), a więc średnio od 207,5 do 18,17 w przeliczeniu na skrawek. Dla ułatwienia interpretacji graficznej rozmieszczenia punktów przypisanych do poszczególnych klastrow oraz ich identyfikacji na rycinach zastosowano kod kolorystyczny.

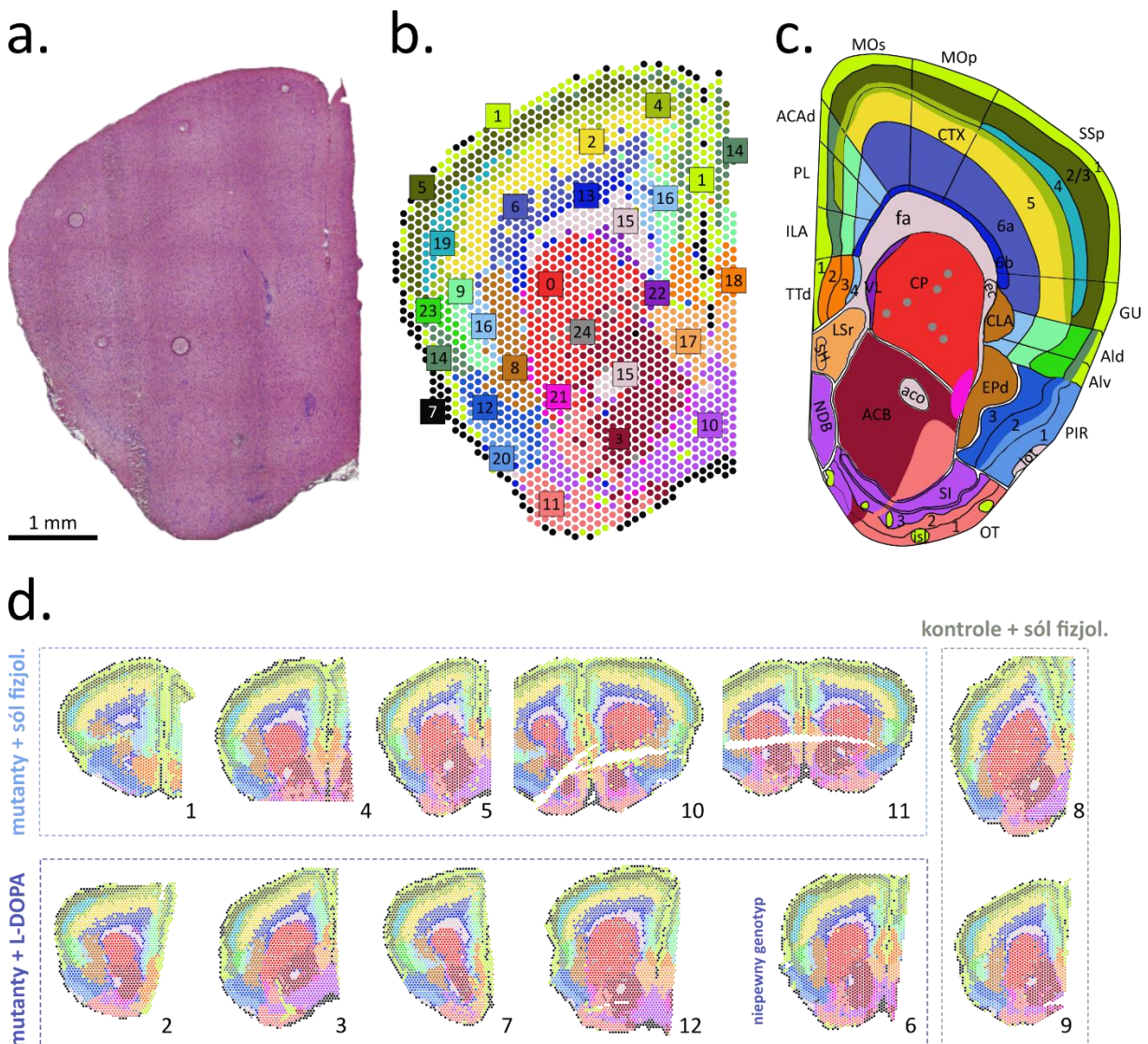
³ Szczegółowy opis metodyki związanej z wykorzystaniem techniki Nanopore do poprawy referencyjnego genomu znajduje się w pracy magisterskiej mgr Magdaleny Chrószcz (Chrószcz, 2022).



Rycina 24. Liczba punktów przypisanych do poszczególnych klastrów w 12 skrawkach łącznie na podstawie podobieństwa ich profili transkrypcyjnych w wyniku przeprowadzenia analizy skupień.

25 klastrów punktów cechowało rozmieszczenie charakterystyczne dla występujących w mysim przodomózgowiu struktur: jąder podstawy, warstw i obszarów kory mózgowej wydzielonych na podstawie ich funkcji oraz istoty białej, komórek bocznych i opon mózgowo-rdzeniowych i innych obszarów (Ryc. 25). Znaczącą zgodność rozmieszczenia punktów przypisanych do poszczególnych skupień z anatomią ilustruje rycina 25a-c na jednym z reprezentacyjnych skrawków wybarwionych hematoksyliną i eozyną (a), punktami zaklasyfikowanymi do poszczególnych klastrów na tym skrawku (b) oraz na schemacie anatomicznym opartym na atlasie referencyjnym mysiego mózgu Instytutu Allena dla Nauk o Mózgu (c; (Allen Institute for Brain Science)). Przykładowo, najliczniej reprezentowany klaster #0 obejmuje grzbietowe prążkowie, klaster #33 – jądro półleżące przegrody, klaster #7 – opony mózgowo-rdzeniowe, klaster #15 – istotę białą w kleszczach przednich spoidła wielkiego oraz w spoidle przednim. Należy przy tym podkreślić dokładność przypisania punktów do poszczególnych warstw kory, a także wydzielenie jako osobnych klastrów warstw kory gruszkowatej

oraz obszaru agranularnego kory wyspy. Dodatkowo, to samo zgodne z aktualną wiedzą anatomiczną rozmieszczenie klastrów było obecne we wszystkich badanych próbkach, z zachowaniem różnic wynikających z pochodzenia skrawka w płaszczyźnie czołowej względem odległości od punktu Bregma (Ryc. 25d, próbka nr 1). We wspomnianej próbce nr 1 nie stwierdzono punktów zaklasyfikowanych do klastrów #0, #3, #21, #24 i #11, odpowiadające strukturom prążkowiec grzbietowych, jądra półleżącego przegrody i guzka węchowego. Obserwacja ta jest spójna z lokalizacją prążkowiec grzbietowych i jądra półleżącego w mózgowiu myszy (Paxinos & Franklin, 2001), jednakże według odpowiadającego temu skrawkowi schematu (Bregma ~ 1,98 mm) powinien on zawierać również punkty przypisane do klastra opisującego guzek węchowy, tj. #11.

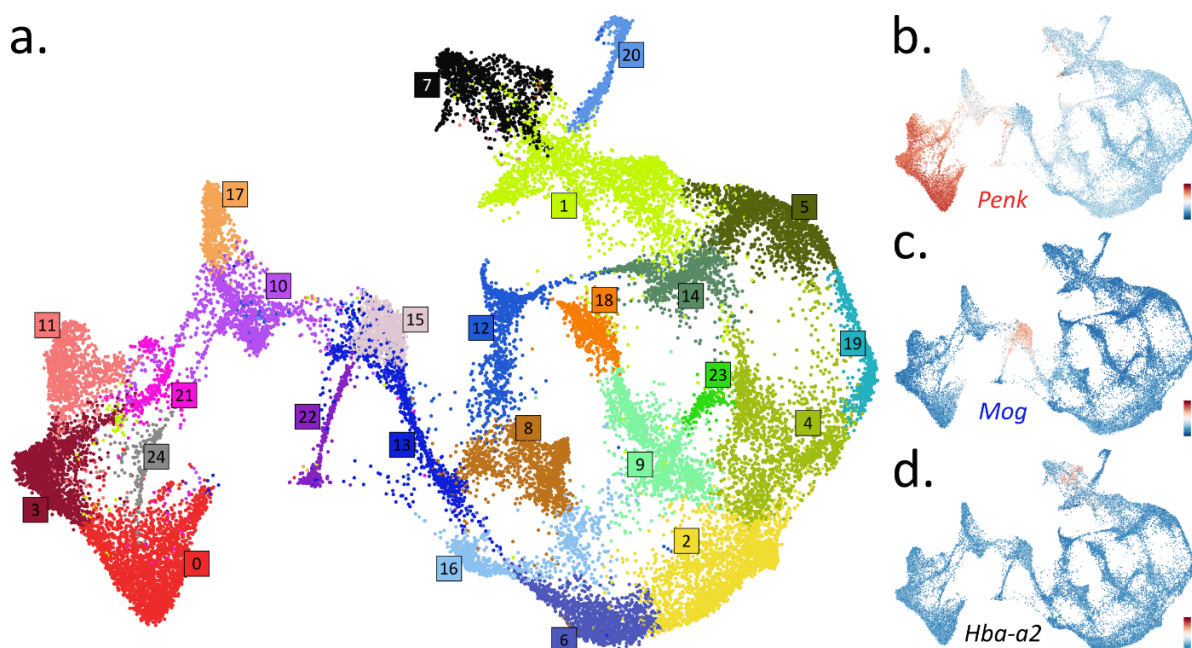


Rycina 25. Rozmieszczenie punktów przypisanych do poszczególnych klastrów oraz jego zgodność z anatomią przodomózgowia myszy. (a) Zdjęcie mikroskopowe jednego ze skrawków przodomózgowia poddanego analizie transkryptomowej – próbka nr 5. (b) Klaster i ich rozmieszczenie na skrawku z punktu a. (c) Schemat anatomii przodomózgowia myszy stworzony na podstawie ryciny z atlasu referencyjnego mysiego mózgu Instytutu Allena dla Nauk o Mózgu odpowiadającego skrawkowi na rycinie a. Poszczególne obszary anatomiczne zostały wyznakowane kolorami zgodnymi

z przewidywanym klastrem, który je obejmuje. Legenda do schematu: 1, 2, ... 6b – numery warstw poszczególnych struktur, ACAd – przednia część kory zakrętu obręczy – część grzbietowa, ACB – jądro pólne przegrody, aco – spoidło przednie, Ald – agranularna kora wyspy – część grzbietowa, Alv – agranularna kora wyspy – część brzuszna, CLA – przedmurze, CP – prążkowie grzbietowe (jądro ogoniaste + skorupa), CTX – kora mózgu, ec – torebka zewnętrzna, EPd – jądro wewnątrzgruszkowate – część grzbietowa, fa – spoidło wielkie – kleszcze przednie, GU – kora smakowa, ILA – kora śródlimbiczna, isl – wyspy Calleji, lot – droga węchowa boczna, LSr – jądro boczne przegrody – część dziobowa, MOp – pierwszorzędowa kora ruchowa, MOs – dodatkowa kora ruchowa, NDB – jądra prążka przekątnego, OT – guzek węchowy, PIR – kora gruszkowata, PL – kora przedlimbiczna, SH – jądro przegrodowo-hipokampalne, SI – istota bezimienna, SSp – pierwszorzędowa kora somatosensoryczna, TTd – prążek podłużny boczny – część grzbietowa, VL – komora boczna mózgu. (d) Rozmieszczenie punktów przypisanych do poszczególnych klastrow na wszystkich skrawkach z doświadczenia II, z których skonstruowano biblioteki. Ryciny rozmieszczono według genotypu myszy i otrzymywanej przez nie substancji. Poniżej każdego schematu umieszczono odpowiadający mu numer próbki.

Zaklasyfikowanie punktów do poszczególnych klastrow i ich porównanie z atlasami mózgowia myszy ujawniło również heterogenność niektórych ze struktur. Na rejon prążkowie grzbietowe składają się punkty z klastra #0, stanowiące większość jego pola powierzchni na schematach, oraz najmniej liczny klasterek #24, którego pojedyncze punkty są rozmieszczone nierównomiernie w obrębie tej struktury. Klasterek #24 można zinterpretować jako oddzielne profile transkrypcyjne np. striosomów lub włókien przechodzących przez tę strukturę. Na obszarze jądra pólne zaobserwowano oprócz klastra #3 również bocznie zlokalizowany, niewielki i zwarty obszar punktów przypisanych do klastra #21. Rozmieszczenie niektórych punktów np. z klastrow #21 i #11 nie pokrywa się dokładnie z granicami struktur, ale ich obecność jest obserwowana wśród większości próbek w tych samych rejonach, co być może ujawnia nieznaną dotychczas heterogenność struktur jąder podstawy i guzka węchowego. Innym przykładem świadczącym o różnicach między schematami anatomicznymi a wynikiem analizy skupień jest obecność dwóch oddzielnych klastrow obejmujących obszar kory gruszkowatej (#12 i #20), przy czym struktura ta posiada 3 warstwy. Na schematach rozmieszczenia klastrow (Ryc. 25d) oba skupienia obejmują podobnie wielki obszar; klasterek #20 obejmuje najbardziej zewnętrzną warstwę 1 (molekularną) oraz część 2 (piramidową) a klasterek #12 część 2 i 3 (polimorficzną). Poza tym, pojedyncze punkty przypisane do danego klastra mają nietypowe rozmieszczenie na niektórych skrawkach, co jest prawdopodobnie artefaktem. Należy jednak podkreślić fakt, że przypisanie punktów na podstawie ich transkryptomu do klastrow było nienadzorowane, bez zakładania *a priori* ich dokładności podziału anatomicznego. Po weryfikacji wyników analizy skupień dla różnych wartości parametru rozdzielczości wybrano opcję najbardziej optymalną, w której liczba klastrow zapewniała z jednej strony wystarczająco szczegółowy obraz rozmieszczenia klastrow na skrawku, z drugiej nie miała cech nadmiernego dopasowania.

Wysoką skuteczność przeprowadzonej konstrukcji bibliotek, a także poprawność analizy skupień potwierdza również fakt, że przedstawienie każdego z profili transkrypcyjnych punktów przypisanych do poszczególnych klastrow na tzw. wykresie UMAP (ang. *Uniform Manifold Approximation and Projection*) ujawnia ich duże podobieństwo w obrębie skupień reprezentujących zbliżone funkcjonalnie i anatomicznie struktury (Ryc. 26a). Wykres UMAP stanowi sposób przedstawienia wielowymiarowych danych na płaszczyźnie, a im większe podobieństwo między punktami względem wielu cech (wymiarów), tym bliższe ich rozmieszczenie na tym wykresie. Podobieństwo między klastrami dodatkowo zobrazowano wykresami UMAP przedstawiającymi poziom ekspresji wybranych genów markerowych populacji komórek przodomózgowia. Znajdujące się po lewej stronie wykresu na rycinie 26 a klastry #0, #21, #24, #3 i #11 odnoszą się odpowiednio do rejonów prążkowania grzbietowego, jądra półleżącego i guzka węchowego. Punkty należące do tych klastrow posiadają relatywnie wysoki poziom ekspresji 20 wspólnych genów markerowych, w tym *Penk* (genu proenkefaliny; ryc. 26b), *Drd1* (genu receptora dopaminy D1) i *Rgs9* (genu regulatora ścieżki sygnałowej mediowanej przez białko G 9). Klastry #13, #15 i #22 (środek wykresu UMAP) obejmują punkty znajdujące się w obrębie istoty białej, komory bocznej i w sąsiedztwie spoidła wielkiego a wspólnych genów markerowych jest 72, przy czym wiele z nich jest specyficznie wyrażanych w komórkach glejowych: m.in. *Mog* (glikoproteina mieliny oligodendrocytów; ryc. 26c) i *Olig1* (oligodendrocytarny czynnik transkrypcyjny 1). Świadczy to o wysokim udziale oligodendrogleju w populacjach komórek z punktów zaklasyfikowanych do tych klastrow. Dalej, genów charakterystycznych wyłącznie dla klastra #7 (kolor czarny po prawej stronie) zlokalizowanego na obwodzie półkuli mózgu jest #129, między innymi geny kodujące podjednostki kolagenu, w tym *Col6a1*, oraz podjednostki hemoglobiny alfa 1 i 2: *Hba-a1* i *Hba-a2* (ryc. 26d), co wyróżnia ten klaster pod względem znaczącej obecności komórek tkanki łącznej i komórek krwi i sugeruje, że klaster ten może obejmować opony mózgowo-rdzeniowe.



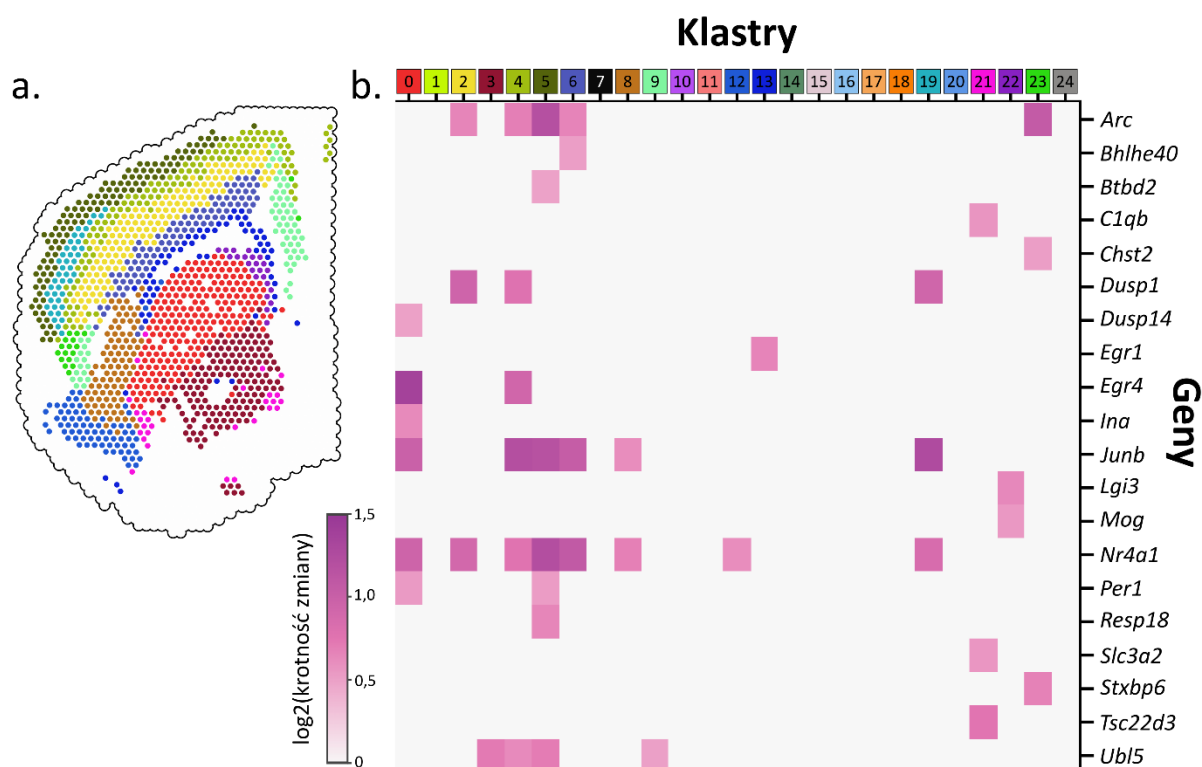
Rycina 26. Przedstawienie podobieństwa profili transkrypcyjnych punktów zaklasyfikowanych do poszczególnych klastrow na wykresach UMAP. Jeden punkt na wykresie odpowiada jednemu punktowi pochodzącemu z jednej spośród 12 próbek. Bliskość punktów na wykresie odzwierciedla ich zbliżony profil transkrypcyjny. (a) Kolory punktów i ich numery odpowiadają klastrom, do których zostały przyporządkowane. (b) – (d) Poziom ekspresji wybranych genów markerowych dla poszczególnych populacji – kolor czerwony wskazuje na dużą abundancję transkryptów danego genu. *Penk* (b) jest genem o wysokim poziomie ekspresji w klastrach #0, #3, #11, #21 i #24 obejmujących rejony prążkowiec grzbietowy, jądra pólzającego przegrody i guzka węchowego. (c) *Mog* jest specyficznym wyrażanym w oligodendrocytach; jest on markerem klastrow #13, #15 i #22, prawdopodobnie wzbogaconych o obecność tych komórek glejowych. (d) *Hba-a2* to jeden z genów specyficznym wyrażanym w klastrze #7.

Podsumowując, w wyniku konstrukcji bibliotek, ich sekwencjonowania oraz dalszych analiz prowadzących do uzyskania skupień punktów o zbliżonych profilach transkrypcyjnych uzyskano 25 klastrow, których rozmieszczenie na wszystkich uzyskanych skrawkach jest w dużej mierze zgodne z anatomią przodomózgowia myszy. Tak sklastrowane profile transkrypcyjne punktów tkanki pozwoliły na wykonanie dalszych analiz statystycznych uwzględniających ich pochodzenie anatomiczne.

Wpływ L-DOPA na ekspresję genów w poszczególnych strukturach przodomózgowia

W celu identyfikacji efektów L-DOPA na transkryptom populacji komórek należących do poszczególnych struktur przodomózgowia myszy TIF-IA^{DATCreERT2} – zdefiniowanych w doświadczeniu jako klastry – wykonano testy *t*-Studenta względem stosowanej substancji. Analizom poddano 5 próbek mutantów traktowanych solą fizjologiczną oraz 4 próbki mutantów traktowanych L-DOPA. Przed wykonaniem analiz statystycznych dane zostały dodatkowo poddane normalizacji, aby zapewnić porównywalność wyników między próbkami. W wyniku przeprowadzonej normalizacji do analiz

wpływu L-DOPA na ekspresję genów zostało włączonych 11 737 pików odpowiadających 9 871 genom, których transkrypty były wykryte we wszystkich próbkach, poza genem *Isl1*, którego ekspresji nie zaobserwowano w próbce 1, tj. zorientowanej najdalej od punktu Bregma.



Rycina 27. Wyniki profilowania przestrzennej ekspresji genów pod wpływem L-DOPA u mutantów TIF-IA^{DATCreERT2} z doświadczenia II. (a) Schemat lokalizacji klastrów, w których zanotowano znamienne zmiany ekspresji genów po podaniach L-DOPA. (b) Mapa ciepła prezentuje istotne statystycznie zmiany w ekspresji genów (oś y) w poszczególnych klastrach (oś x). Poziom zmian wyrażono jako średni log₂ krotności zmiany poziomu ekspresji w próbkach pochodzących od myszy traktowanych L-DOPA względem poziomu w próbkach pobranych od myszy, którym podawano sól fizjologiczną. Wartość 0 na skali (kolor jasnoszary) oznacza brak statystycznie znamiennych zmian po podaniu L-DOPA.

Dla każdego z klastrów przeprowadzono następnie osobną analizę efektów podania leku. Statystycznie istotny wpływ podań L-DOPA na abundancję transkryptów u mutantów był ograniczony do wybranych struktur. Łącznie zidentyfikowano 20 genów, których poziom ekspresji zmieniał się pod wpływem podań L-DOPA w stopniu istotnym statystycznie (test *t*-Studenta; $p < 0,05$). Zmiany w ekspresji genów pod wpływem L-DOPA cechowała wysoka specyficzność wobec populacji struktur przodomózgowia (Ryc. 27a). Geny, których poziom ekspresji zmieniał się pod wpływem L-DOPA u samców TIF-IA^{DATCreERT2} w poszczególnych klastrach przedstawiono na rycinie 27b.

Statystycznie istotne obniżenie lub podwyższenie abundancji transkryptów stwierdzono w punktach należących do 15 klastrów (Ryc. 27). L-DOPA znamienne wpłynęła na transkryptom klastrów obejmujących różne obszary przodomózgowia (Ryc. 27a: prążkowie grzbietowe (klastry #0, #21), jądro pólne przegrody (#3), przedmurze i jądro wewnątrzgruszkowate (#8), komorę boczną ze strefą

okołokomorową (#22), oraz poszczególne strefy kory: warstwy 2/3 (#4, #5), 5 (#2, #9), 4 (#19), 6a (#6), 6b (#13), części kory smakowej (#23) i kory gruszkowatej (#12). Efekty L-DOPA zanotowano zatem w dużej części kory mózgowej (oprócz warstwy 1 – klastery #1, warstwy 6a i 6b kory smakowej – #16, części warstwy 2/3 – #14 i warstwy molekularnej kory gruszkowatej – #20), a także w niektórych strukturach podkorowych i w klastrze obejmującym komorę boczną mózgu. L-DOPA nie wpłynęła natomiast istotnie na transkryptom części prążkowania grzbietowego (#24), jądra bocznego przegrody (#17), jądra prążka przekątnego i istoty bezmiennej (#10), wzgórkę węchowego i bocznej części jądra półleżącego przegrody (#11), głębszych warstw grzbietowej części prążka podłużnego bocznego (#18), a także spoidła (#15) i komórek wchodzących w skład klastra opon mózgowo-rdzeniowych/powierzchni mózgowia (#7). Działanie molekularne L-DOPA w czasie 1 godziny po podaniu w przodomózgowiu myszy TIF-IA^{DATCreERT2} cechuje zatem jednocześnie wysoka specyficzność przestrzenna odpowiedzi, tj. ograniczenie do określonych warstw lub części kory mózgu, prążkowania grzbietowego, jądra półleżącego przegrody, jak i oddziaływanie na wiele obszarów anatomicznych przodomózgowia, różniących się funkcjonalnie i strukturalnie. Ten swoisty „odcisk molekularny” L-DOPA sugeruje, że jej efekty fizjologiczne i mogą dotyczyć różnorodnych funkcji i zachowań, w tym ruchowych i poznawczych, w tym procesów wykonawczych i motywacyjnych.

Najwięcej istotnych statystycznie zmian w ekspresji genów zanotowano w klastrze nr 5 (kolor ciemnozielony na schemacie), obejmującym obszar warstwy 2/3 kory mózgu (Ryc. 25), w którym 7 genów miało zmienioną abundancję transkryptów (Ryc. 27b). Liczne zmiany transkryptomowe zaobserwowano także w sąsiednim klastrze nr 4 (kolor jasnozielony) oraz w prążkowiu grzbietowym (klastery #0, kolor czerwony) – w każdym zidentyfikowano 6 genów ze zmienioną abundancją transkryptów. Efekty L-DOPA względem abundancji transkryptów pojedynczych genów zanotowano w jądrze półleżącym przegrody (#3) i niektórych warstwach i częściach kory (#9, 12, 13).

Wszystkie geny, których poziom ekspresji uległ zmianie po podaniach L-DOPA, należą do genów kodujących białka. Są one zaangażowane w różnorodne funkcje w organizmie, np. mechanizmy plastyczności synaptycznej (*Arc*) (Korb & Finkbeiner, 2011), tworzenie osłonki mielinowej (*Mog*) (Solly *et al.*, 1996), regulację rytmów okołodobowych (*Per1*) (Liu & Chu, 2013) i egzocytozę (*Stxbp6*) (Scales *et al.*, 2002). Wśród genów podlegających zmianom ekspresji wskutek podań L-DOPA znajduje się 6 genów regulowanych aktywnością neuronalną komórek, które zostały wcześniej zidentyfikowane jako geny wczesnej odpowiedzi komórkowej: *Arc*, *Dusp1*, *Egr1*, *Egr4*, *Junb* i *Nr4a1* (Crosby *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1993; Molnar *et al.*, 1994; Pelto-Huikko *et al.*, 1995; Horita *et al.*, 2010; Minatohara *et al.*, 2016).

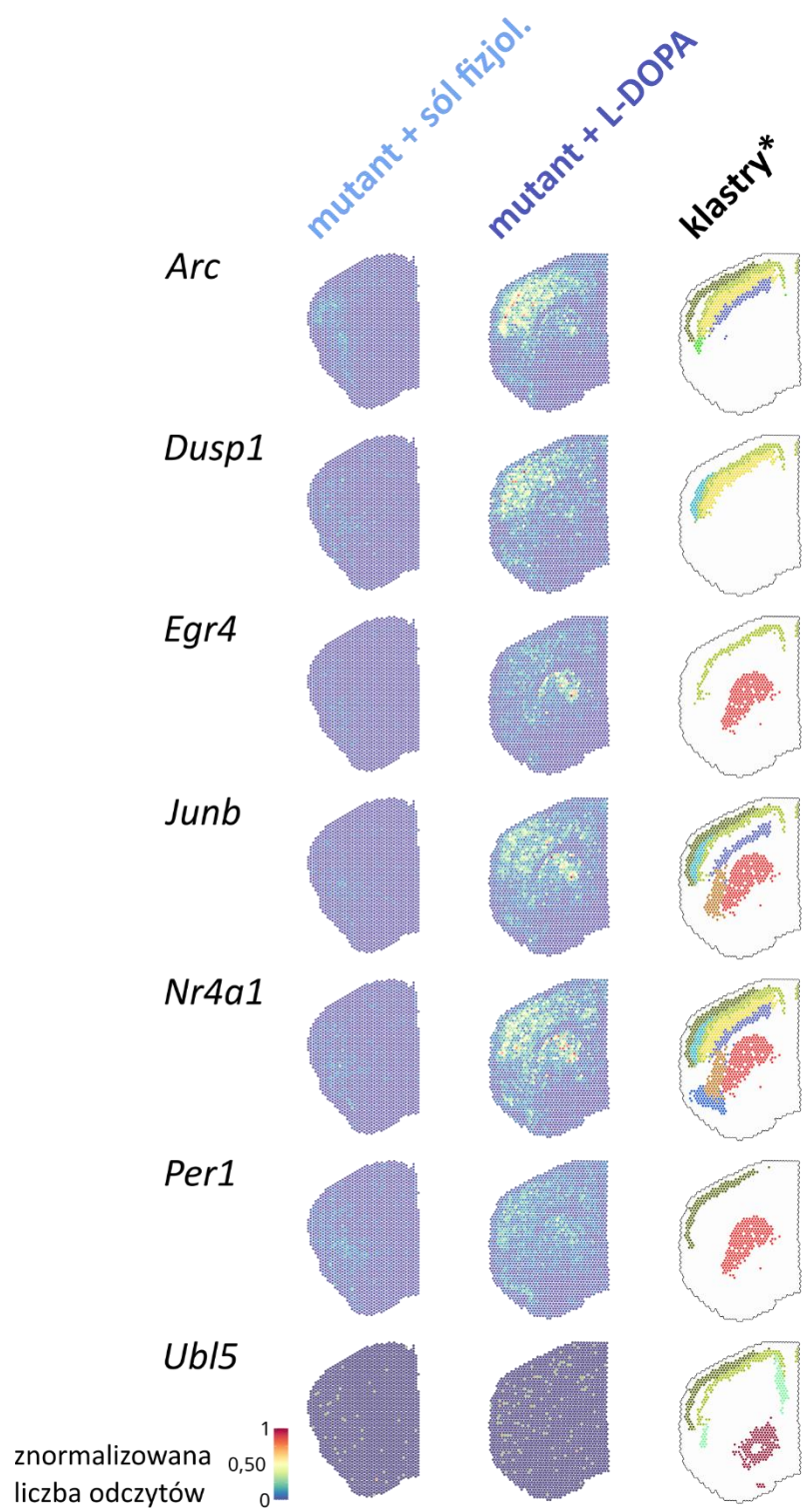
W celu zidentyfikowania, czy geny, których poziom ekspresji uległ zmianie po L-DOPA, mają wspólne funkcje fizjologiczne wykonano analizę wzbogacenia zestawu tych genów w kategorii ontologii GO. Pozwala ona na porównanie danego zestawu genów z listami tych, które są związane z konkretnymi procesami biologicznymi, funkcjami molekularnymi oraz lokalizacją białek w komórce. Analiza ta ujawniła, że wśród genów podlegających zmianom ekspresji po podaniach L-DOPA są geny zaangażowane w 4 procesy biologiczne: związane z funkcjami zegara biologicznego (*Per1*, *Bhlhe40*) lub ścieżkami sygnałowymi, w których uczestniczą białka MAPK (*Per1*, *Dusp1*). Ponadto, zidentyfikowano 28 kategorii ontologicznych opisujących funkcje molekularne genów, których abundancja transkryptów uległa zmianie po podaniach L-DOPA, jednak większość z tych kategorii miała przypisane w ten sposób jedynie 1 lub 2 geny. Statystycznie istotne wzbogacenie w kategorii funkcji molekularnych wykazano dla 10 genów: *Stxbo6*, *Dusp1*, *Egr1*, *Egr4*, *Junb*, *Nr4a1*, *Chst2*, *Slc3a2*, *Bhlhe40* oraz *Per1*. Większość wynikowych kategorii GO dla funkcji molekularnych była powiązana z wiązaniem białek do DNA i procesami transkrypcji oraz jej regulacją (geny: *Egr1*, *Egr4*, *Nr4a1*, *Junb*, *Per1* i *Bhlhe40*) albo aktywnością transporterów (*Slc3a2*) lub fosfataz związanych ze szlakiem kinaz MAPK (*Dusp1*). Ponadto, wśród wyników tych znalazły się pojedyncze kategorie dla aktywności sulfotransferazy (*Chst2*) lub heterodimeryzacji białek (*Nr4a1*, *Bhlhe40*), wiązanie się do receptora glikokortykoidowego (*Nr4a1*) i adhezja między komórkami przy udziale kadheryn (*Stxbp6*). Szczegółowe wyniki analiz GO dla funkcji molekularnych genów przedstawiono w tabeli 13 dla kategorii, w których liczność genów z nimi związanych wynosiła co najmniej 4. Żadna kategoria z klasy ontologii GO związanych ze strukturami komórki nie miała statystycznie istotnego wzbogacenia w listę genów, których poziom ekspresji zmienił się po L-DOPA w niniejszym doświadczeniu. Wyniki analizy ontologii GO należy jednak interpretować ostrożnie, gdyż geny, których poziom ekspresji zmieniał się po podaniach L-DOPA, charakteryzowały się różnorodną specyficznością anatomiczną zmian abundancji transkryptów (Ryc. 27). Niektóre geny, w tym kilka genów regulowanych aktywnością komórek, miały zmieniony poziom ekspresji w kilku klastrach, natomiast dla 13 genów zanotowano zmiany abundancji mRNA w 1 klastrze.

Tabela 13. Wyniki analizy wzbogacenia listy genów regulowanych przez L-DOPA w kategorii ontologii genów GO.

Kategorie	Wartość p po poprawce na liczbę porównań	Geny
wiązanie do specyficznej sekwencji dwuniciowego DNA <i>sequence-specific double-stranded DNA binding</i> (GO:1990837)	0,003	<i>Egr1, Nr4a1, Per1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do dwuniciowego DNA <i>double-stranded DNA binding</i> (GO:0003690)	0,007	<i>Egr1, Nr4a1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do specyficznej sekwencji DNA <i>sequence-specific DNA binding</i> (GO:0043565)	0,007	<i>Egr1, Nr4a1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do specyficznej sekwencji DNA – regionu cis-regulatorowego polimerazy II RNA <i>RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding</i> (GO:0000978)	0,007	<i>Egr1, Nr4a1, Per1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do specyficznej sekwencji DNA – regionu cis-regulatorowego polimerazy II RNA <i>cis-regulatory region sequence-specific DNA binding</i> (GO:0000987)	0,007	<i>Egr1, Nr4a1, Per1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do specyficznej sekwencji DNA – regionu regulatorowego polimerazy II RNA <i>RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding</i> (GO:0000977)	0,014	<i>Egr1, Nr4a1, Per1, Egr4, Bhlhe40, Junb</i>
wiązanie do DNA <i>DNA binding</i> (GO:0003677)	0,029	<i>Egr1, Nr4a1, Egr4, Junb</i>

Różnice w poziomie ekspresji *Nr4a1* zanotowano w najliczniejszej liczbie klastrów, tj. w 8: w grzbietowych warstwach kory, w korze gruszkowatej, w przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym oraz w prążkowie grzbietowym (Ryc. 28). Zbliżony wzorzec zmian ekspresji miał *Junb* (Ryc. 27 i 28), natomiast ekspresja *Arc* i *Dusp1* była podwyższona w grzbietowych warstwach kory. *Egr4* miał zwiększony poziom ekspresji w jednym klastrze korowym oraz w prążkowie grzbietowym, dla *Egr1* natomiast wykazano zmiany abundancji w warstwie 6b kory mózgowej. L-DOPA zatem indukowała ekspresję genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych głównie

w grzbietowych warstwach kory oraz w prążkowie grzbietowym. Podobny wzorzec zmian ekspresji miał też *Per1* (Ryc. 28), a w prążkowie grzbietowym zanotowano także podwyższony poziom *Dusp14* oraz *Ina*. Genem, który charakteryzował się relatywnie dużym rozpowszechnieniem zmian w 4 klastrach, był *Ubl5*, którego białkowy produkt prawdopodobnie jest zaangażowany w procesy odpowiedzi komórki na stres i mechanizmy naprawy DNA (da Costa & Schmidt, 2020; Chanarat, 2021). Poziom ekspresji *Ubl5* był podwyższony w niektórych warstwach kory oraz w jądrze pólężącym przegrody (Ryc. 28). W klastrze #5 w warstwach 2/3 kory poza genami wczesnej odpowiedzi komórkowej, *Per1* i *Ubl5* zaobserwowano także podwyższony poziom ekspresji *Btbd2* i *Resp18*. Ponadto, w mało licznej klastrze #23 warstw 2/3 kory smakowej, wraz z *Arc* zwiększył się poziom ekspresji *Chst2* i *Stxbp6*. W klastrze obejmującym komorę boczną zaobserwowano podwyższenie poziomu *Mog* oraz *Lgi3*, a więc odpowiednio genu markerowego oligodendrocytów (Scolding et al., 1989) oraz genu białka zaangażowanego w procesy endocytozy (Okabayashi & Kimura, 2008). Zmiany w poziomie ekspresji *C1qb*, innego genu charakterystycznego dla innego typu komórek – mikrogleju i komórek układu odpornościowego – zaobserwowano w klastrze #21 wraz z *Slc3a2* i *Tsc22d3*.



*w których poziom ekspresji genu zmienił się w stopniu istotnym statystycznie

Rycina 28. Poziom ekspresji wybranych genów, których poziom ekspresji uległ zmianie po podaniach L-DOPA u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} pokazany na reprezentatywnych skrawkach z obu porównywanych grup wraz z zaznaczeniem na schemacie klastrów, w których zaobserwowano statystycznie istotne różnice.

Należy podkreślić, że obserwowane zmiany w ekspresji, jak i ich rozpiętość nie są duże. Najmniejsza zaobserwowana zmiana abundancji transkryptów na poziomie istotności statystycznej na skali

logarytmicznej wyniosła w przybliżeniu 0,51, a największa: 1,38 (*Egr4* w prążkowie grzbietowym – klaster #0), co odpowiednio przedkłada się na wzrost o 42% i 160% tej abundancji po zastosowaniu L-DOPA względem efektów podań soli fizjologicznej. Jednocześnie, nie zanotowano wpływu L-DOPA na obniżenie poziomu ekspresji genów, co być może wynika ze sposobu przeprowadzenia analiz i odcięcia transkryptów o zbyt małej liczbie odczytów lub normalizacji wyników.

Wykonanie profilowania przestrzennego ekspresji genów pod wpływem L-DOPA u myszy transgeniczných z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych pozwoliło na identyfikację struktur przodomózgowia, na które oddziałuje tenże lek. Dzięki zastosowaniu wieloetapowego przygotowania transkryptomu referencyjnego i nienadzorowanej analizy skupień w mysim przodomózgowiu wykryto 25 klastrow profili transkrypcyjnych, które z dużą dokładnością odzwierciedlają przestrzenną lokalizację obszarów anatomicznych tej części mózgowia oraz ich złożoność strukturalną. Zastosowanie tejże metody pozwoliło na zidentyfikowanie 15 klastrow, w których L-DOPA wpłynęła istotnie na ekspresję genów. Efekty leku zaobserwowano w prążkowie grzbietowym i jądrze półleżącym przegrody, w wybranych obszarach kory mózgu oraz w przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym, a także w komorze bocznej. L-DOPA spowodowała podwyższenie poziomu ekspresji 20 genów, w tym genów regulowanych przez aktywność komórek neuronalnych, genów zaangażowanych w regulację rytmów okołodobowych i procesy egzocytozy oraz regulacji odpowiedzi komórki na stres. Podwyższenie abundancji transkryptów było ograniczone do poszczególnych klastrow. Powyższe wyniki pokazują, że L-DOPA wpływa na transkryptom wielu obszarów przodomózgowia w mózgowiu pozbawionym dopaminy w sposób wysoce specyficzny wobec lokalizacji przestrzennej, a jej działanie wykracza poza wpływ na szlak czarno-prążkowiowy.

Badania z udziałem ludzi

Efekty przyjmowania L-DOPA i leków przeciwparkinsonowskich na objawy ruchowe i pozaruchowe choroby Parkinsona

Celem badania było zbadanie wpływu odstawienia leków dopaminergicznych na nasilenie objawów pozaruchowych i ruchowych PD oraz na ekspresję wybranych genów we krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowaną i leczoną PD. Wszyscy badani pacjenci byli powyżej 50. roku życia i przeciętnie chorowali od blisko 10 lat, przy czym czas od momentu pojawienia się pierwszych objawów ruchowych choroby do udziału w badaniu wyniósł od 5 do 18 lat, a więc stopień zaawansowania PD u poszczególnych pacjentów mógł być zróżnicowany. Jednakże, każdy z pacjentów posiadał

zaawansowaną PD, o czym świadczy ich uczestniczenie w kwalifikacji do operacji wszczepienia systemu do głębokiej stymulacji mózgu.

Pacjenci z chorobą Parkinsona zostali poddani ocenie funkcji ruchowych i pozaruchowych przy użyciu badań kwestionariuszowych w dwóch punktach czasowych: w trakcie przyjmowania leków („ON”) i po ich odstawieniu („OFF”). Odsetek pacjentów, u których przyjmowanie leków działających na przekąźnictwo dopaminergiczne poprawiło wyniki uzyskane w poszczególnych testach, był bardzo zróżnicowany w zależności od funkcji i objawów mierzonych w poszczególnych narzędziach kwestionariuszowych. Odstawienie leków dopaminergicznych skutkowało pogorszeniem objawów ruchowych u wszystkich pacjentów (tabela 14). 92% (12 z 13) pacjentów również wykazało pogorszenie w punkcie „OFF” w teście MoCA na zdolności poznawcze. Korzystny wpływ leków działających na przekąźnictwo dopaminergiczne zaobserwowano u większości pacjentów względem funkcji mierzonych w obu częściach kwestionariusza STAI, tj. lęku, oraz w teście PDQ-8 oceniającym różne aspekty PD (odpowiednio: 77, 69 i 54% pacjentów wykazało poprawę w wymienionych testach). U mniej niż połowy badanych (46%) w punkcie „ON” zanotowano poprawę w pomiarach objawów pozaruchowych NMSS lub w kwestionariuszu neuropsychiatrycznym NPI-Q, a u mniej niż ¼ zastosowanie leku wpłynęło pozytywnie na objawy apatii (AES). Zatem odpowiedź pacjentów na stosowane leczenie dopaminergiczne względem objawów pozaruchowych była mocno zróżnicowana, natomiast funkcje ruchowe wszystkich pacjentów ulegały poprawie po włączeniu ponownie tych leków.

W celu identyfikacji statystycznie znamiennych efektów stosowania leków działających na przekąźnictwo dopaminergiczne na wyniki uzyskiwane w poszczególnych testach zastosowano testy *t*-Studenta dla prób zależnych z zastosowaniem poprawki Benjamini-Hochberga. Wyniki wskazały na trzy znamienne efekty leków (tabela 14). Odstawienie leków przeciwparkinsonowskich wzmacniających przekąźnictwo dopaminergiczne znamienne zwiększyło średnią liczbę punktów uzyskiwanych w testach UPDRS części II i III (obie wartości $p < 0,001$ po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga): z 6,38 na 21,7 na i 22,7 na 55,4 na punktów, co świadczyło o mniejszym nasileniu objawów ruchowych przy stosowaniu leczenia.

Odstawienie leków przeciwparkinsonowskich istotnie wpłynęło również na zmniejszenie średniej liczby punktów uzyskiwanych w teście MoCA oceniającym zdolności poznawcze ($p = 0,00414$ po poprawce BH). Ponadto, przyjmowanie tych leków również w sposób znamienny zwiększyło średnią liczbę punktów uzyskiwanych w kwestionariuszu STAI w części X1 z 31,8 na 40,2, co oznacza zwiększenie poczucia lęku jako stanu. Jednakże, po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań zanotowano jedynie tendencję do podwyższania lęku przez odstawienie leków dopaminergicznych ($p = 0,0673$).

Odstawienie leków przeciwparkinsonowskich nie miało natomiast istotnego wpływu na cechy i funkcje mierzone w pozostałych testach, tj. lęku jako cechy, apatii i innych objawów pozaruchowych mierzonych w pozostałych narzędziach kwestionariuszowych.

Tabela 14. Wpływ przyjmowania leczenia na liczbę punktów uzyskiwanych przez pacjentów w badaniach kwestionariuszowych

Nazwa kwestionariusza* i stan przyjmowania leczenia	Sumaryczna liczba uzyskanych punktów: średnia $\pm$ SEM (zakres)	Wartość p dla efektu przyjmowania leczenia** (w nawiasie wartości po poprawce BH)	U ilu pacjentów zaobserwowano poprawę w stanie „ON” (%)
AES OFF	28,6 $\pm$ 1,38 (19-35)	0,967	23
AES ON	28,7 $\pm$ 1,99 (22-49)	(0,967)	
MoCA OFF	18,9 $\pm$ 1,28 (10-26)	$1,3 \times 10^{-3}$	92
MoCA ON	21,4 $\pm$ 1,55 (11-29)	(0,004)	
NMSS OFF	56,5 $\pm$ 13,1 (11-180)	0,897	46
NMSS ON	58,5 $\pm$ 12,2 (2-155)	(0,967)	
NPI-Q OFF	14,8 $\pm$ 5,77 (0-77)	0,794	46
NPI-Q ON	16,5 $\pm$ 6,66 (0-74)	(0,967)	
PDQ-8 OFF	18,9 $\pm$ 1,92 (9-31)	0,519	54
PDQ-8 ON	17,3 $\pm$ 2,12 (8-31)	(0,934)	
STAI-X1 OFF	40,2 $\pm$ 2,96 (26-55)	0,03	77
STAI-X1 ON	31,8 $\pm$ 2,47 (20-52)	(0,067)	
STAI-X2 OFF	40 $\pm$ 2,59 (25-56)	0,918	69
STAI-X2 ON	39,8 $\pm$ 2,96 (23-56)	(0,967)	
UPDRS II OFF	21,7 $\pm$ 2,63 (7-41)	$2,39 \times 10^{-5}$	100
UPDRS II ON	6,38 $\pm$ 1,25 (0-13)	($1,08 \times 10^{-4}$)	
UPDRS III OFF	55,4 $\pm$ 3,08 (42-87)	$1,35 \times 10^{-7}$	100
UPDRS III ON	22,7 $\pm$ 1,37 (13-29)	($1,22 \times 10^{-6}$)	

*AES – Skala Oceny Apatii

MoCA – Montrealska skala oceny funkcji poznawczych

NMSS – Skala oceny pozaruchowych objawów choroby Parkinsona

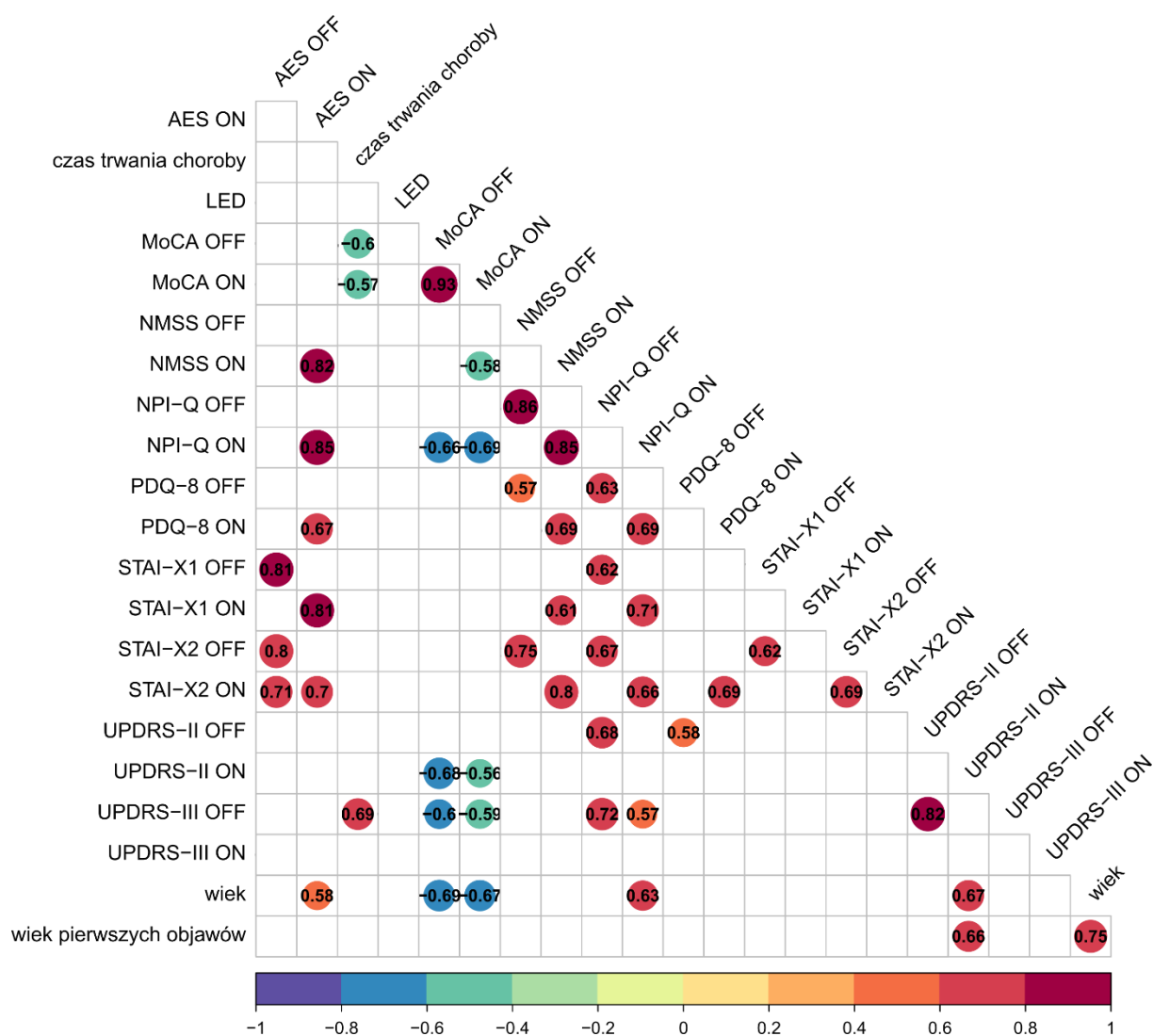
NPI-Q – Inwentarz-Kwestionariusz Neuropsychiatryczny

STAI – Inwentarz Stany i Cechy Lęku (X1: lęk-stan, X2: lęk-cecha)

UPDRS – Ujednolicona Skala do Oceny Choroby Parkinsona

** test t-Studenta dla prób zależnych z poprawką Benjamini-Hochberga wartości p na liczbę powtórzeń

Wyniki uzyskiwane przez pacjentów w poszczególnych testach skorelowano również z dawką przyjmowanych leków działających wzmacniająco na przekąźnictwo dopaminergiczne, wyrażoną jako ekwiwalent dawki L-DOPA (LED) oraz danymi dotyczącymi ich wieku, wieku wystąpienia pierwszych objawów i czasu trwania choroby. Zanotowano 47 istotnych korelacji między zmiennymi, przy $p < 0,05$ odpowiadającemu $|R| > 0,55$ (Ryc. 29). Jednakże, po zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberga kryteria znamienności spełniło 10 korelacji przy $|R| > 0,79$ (tabela 15), przy czym wszystkie te zależności były korelacjami dodatnimi.



Rycina 29. Wykres korelacji między liczbą punktów uzyskiwanych przez pacjentów w poszczególnych testach, dawką przyjmowanych leków oraz wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby. Kolory oraz wielkość kół wskazują na wartość R Pearsona. Zaprezentowano jedynie kółka prezentujące statystycznie istotne korelacje ($p < 0,05$), jednak przed zastosowaniem poprawki.

Dawka przyjmowanych leków działających na przekąźnictwo dopaminergiczne wyrażona jako LED nie wykazała znamiennej korelacji z którymkolwiek z wyników testu, podobnie jak zmienne związane z wiekiem pacjentów. Wśród korelacji między wynikami testów zaobserwowano jednak kilka prawdziwości. Po pierwsze, liczba uzyskanych punktów w skali apatii AES korelowała z innymi skalami oceniającymi objawy pozaruchowe: NMSS, NPI-Q i STAI-X1 w trakcie przyjmowania leczenia oraz ze skalami STAI-X1 i STAI-X2 po odstawieniu leków przeciwparkinsonowskich. Punkty uzyskane w skalach NMSS i STAI-X2 podczas farmakoterapii także wykazały korelację. Ponadto, wyniki uzyskane w testach kwestionariuszowych funkcji pozaruchowych NMSS i zaburzeń zachowania NPI-Q wykazywały między sobą korelację, zarówno wobec liczby punktów uzyskanych w stanie „ON” i „OFF”. Wyniki uzyskane przez pacjentów w teście oceny zdolności poznawczych MoCA były zbliżone do siebie w obu punktach czasowych, dlatego też wykazywały między sobą silną korelację ($R > 0,93$). Oceny funkcji ruchowych w częściach II i III UPDRS były również skorelowane dla obserwacji poczynionych po odstawieniu leków.

Tabela 15. Znamienne korelacje między liczbą punktów uzyskanych w poszczególnych testach kwestionariuszowych.

Zmienne korelujące		Współczynnik korelacji R	Wartość p^{**}	Wartość p po poprawce***
AES* ON	NMSS ON	0,821	$5,83 \times 10^{-4}$	0,024
AES ON	NPI-Q ON	0,853	$2,1 \times 10^{-4}$	0,012
MoCA OFF	MoCA ON	0,930	$4,09 \times 10^{-6}$	0,001
NMSS OFF	NPI-Q OFF	0,856	$1,87 \times 10^{-4}$	0,012
NMSS ON	NPI-Q ON	0,853	$2,08 \times 10^{-4}$	0,012
STAI-X1 OFF	AES OFF	0,812	$7,41 \times 10^{-4}$	0,024
STAI-X1 ON	AES ON	0,808	$8,41 \times 10^{-4}$	0,024
STAI-X2 OFF	AES OFF	0,796	$1,14 \times 10^{-3}$	0,026
STAI-X2 ON	NMSS ON	0,799	$1,04 \times 10^{-3}$	0,026
UPDRS II OFF	UPDRS III OFF	0,818	$6,33 \times 10^{-4}$	0,024

*AES – Skala oceny apatii

MoCA – Montrealska skala oceny funkcji poznawczych

NMSS – Skala oceny pozaruchowych objawów choroby Parkinsona

NPI-Q – Inwentarz-kwestionariusz neuropsychiatryczny

STAI – Inwentarz stany i cechy lęku (x1: lęk-stan, x2: lęk-cecha)

UPDRS – Ujednolicona skala do oceny choroby Parkinsona

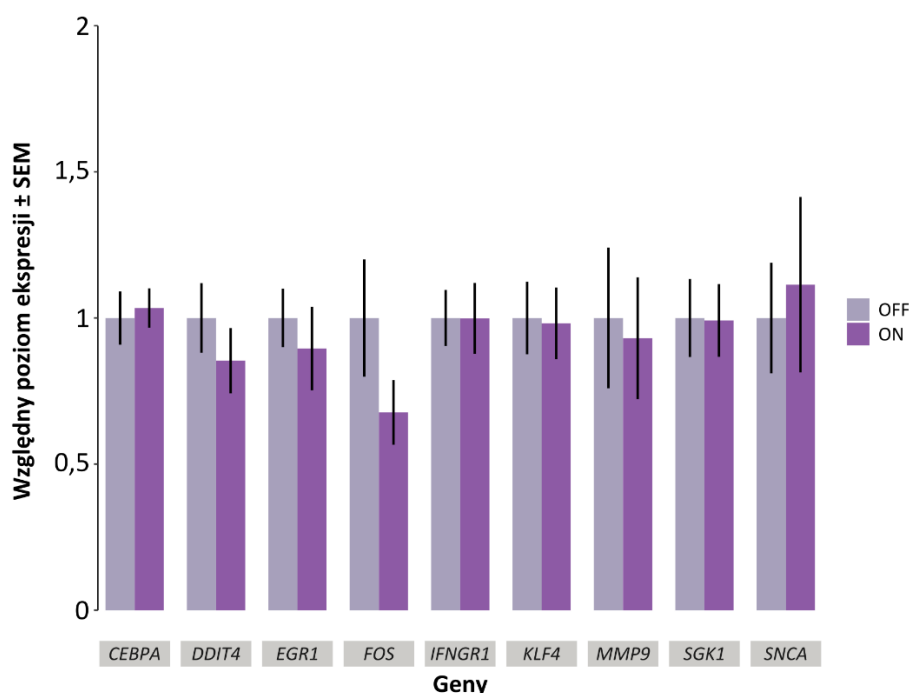
**korelacja Pearsona

***poprawka Benjamini-Hochberga na liczbę porównań

Z powyższych obserwacji wynika, że objawy pozaruchowe oceniane w skalach apatii (AES), zaburzeń zachowania (NPI-Q), lęku (STAI) oraz NMSS wykazują pewien związek, tworząc spójny zespół objawów, które są w podobnym stopniu obecne u pacjentów. Sugeruje to zatem, że nasilenie lub występowanie poszczególnych dysfunkcji pozaruchowych mierzonych w tych testach może być ze sobą powiązane. Natomiast wyniki uzyskiwane w testach mierzących nasilenie objawów pozaruchowych i ruchowych nie były ze sobą istotnie skorelowane. Ponadto, biorąc pod uwagę silny i znamieny efekt podawania leków dopaminergicznych na poprawę funkcji ruchowych w UPDRS-II i -III oraz brak lub niewielki wpływ na objawy pozaruchowe, można spekulować, że udział komponenty dopaminergicznej w powstawaniu i leczeniu objawów jest większy w przypadku objawów ruchowych, aniżeli pozaruchowych. Należy jednak zaznaczyć, że w badaniu uczestniczyła mała liczba osób, co w połączeniu z dużą zmiennością osobniczą (np. LED, czas trwania choroby, schorzenia współistniejące) mogło wpłynąć na wyniki analiz statystycznych.

Wpływ przyjmowania leków dopaminergicznych na poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów

W kolejnym kroku sprawdziłam, czy ekspresja genów we krwi żyłnej pacjentów zmienia się pod wpływem zastosowania leków działających na przekaźnictwo dopaminergiczne. Wówczas być może udałoby się powiązać poziom ekspresji genów we krwi z nasileniem objawów pozaruchowych bądź ruchowych w kontekście odpowiedzi na leczenie dopaminergiczne. W tym celu wykonałam oznaczenie abundancji wybranych transkryptów metodą qPCR. W doświadczeniu użyto sond molekularnych TaqMan pozwalających na detekcję mRNA 10 genów. 7 genów wybrano ze wspomnianego wyżej badania własnego z zastosowania L-DOPA w szczurzym modelu hemiparkinsonizmu i analizy transkryptomu kory czołowej (*CEBPA*, *DDIT4*, *IFNGR1*, *KLF4*, *MMP9*, *PER1* i *SGK1*), kierując się specyficznością komórkową wyrażania tych genów w korze czołowej (Radlicka *et al.*, 2021). Dwa kolejne geny należą do grupy regulowanych przez aktywność komórek (*FOS*, *EGR1*) i wykazano zmiany abundancji ich transkryptów w prążkowiu u zwierzęcych modeli parkinsonizmu po podaniach L-DOPA (Ebihara *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2016). Zmierzono również poziom mRNA genu *SNCA*, którego mutacje są jedną z przyczyn dziedzicznej formy choroby Parkinsona (Blauwendraat *et al.*, 2020), a zmiany poziomu ekspresji we krwi są charakterystyczne dla poszczególnych synukleinopatii, tj. otępienia z ciałami Lewy'ego i choroby Parkinsona (Marsal-García *et al.*, 2021).



Rycina 30. Względny poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona przy odstawieniu leków przeciwparkinsonowskich („OFF”) i podczas ich przyjmowania („ON”) uzyskany metodą qPCR. Na osi x zaprezentowano wyniki dla każdego z badanych genów w obu punktach czasowych prezentuje jeden z genów. Liczebność grup wynosiła 13 w obu punktach czasowych dla pomiarów abundancji transkryptów każdego z genów.

Ilość mRNA *PER1* była w większości próbek poniżej poziomu detekcji przy zastosowanych parametrach reakcji, dlatego nie wykonano dalszych analiz względem tego genu. Dla pozostałych 9 genów wyznaczono względny poziom transkryptów w odniesieniu do genu referencyjnego *HPRT1* i znormalizowano względem wartości w punkcie czasowym „OFF”. Na rycinie 30 zaprezentowano średni względny poziom znormalizowanej ekspresji w obu punktach czasowych dla *CEBPA*, *DDIT4*, *EGR1*, *FOS*, *IFNGR1*, *KLF4*, *MMP9*, *SGK1* oraz *SNCA*. Różnice w średnim poziomie ekspresji tych genów między okresem zażywania leków a ich odstawieniem były niewielkie: największy średni wzrost ekspresji po przyjmowaniu leków zanotowano dla genu *SNCA* (względny średni poziom ekspresji: 1,11), natomiast największy spadek w przypadku genu *FOS* (ok. 0,68). Jednakże, dla żadnego z genów nie zaobserwowałam znamiennych zmian w abundancji transkryptów po podaniach ww. leków (test *t*-Studenta dla prób zależnych z poprawką Benjamini-Hochberga na liczbę porównań; tabela 16). Ponieważ abundancja transkryptów badanych genów nie ulegała zmianie ze względu na włączenie/wyłączenie leczenia dopaminergicznego, nie przeprowadziłam testów pozwalających na powiązanie efektów molekularnych leczenia i jego wpływu na nasilenie objawów pozaruchowych.

Tabela 16. Wyniki analizy statystycznej porównania poziomu ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z PD po odstawieniu leków oddziałujących na przekąźnictwo dopaminergiczne („OFF”) oraz podczas przyjmowania ich („ON”).

Gen	Wartość p*	Wartość p po poprawce**	Liczba pacjentów, u których względny poziom ekspresji genu podwyższył się w punkcie „ON”
<i>CEBPA</i>	0,798	0,992	8
<i>DDIT4</i>	0,429	0,992	5
<i>EGR1</i>	0,598	0,992	5
<i>FOS</i>	0,106	0,954	2
<i>IFNGR1</i>	0,992	0,992	6
<i>KLF4</i>	0,911	0,992	6
<i>MMP9</i>	0,828	0,992	9
<i>SGK1</i>	0,963	0,992	6
<i>SNCA</i>	0,767	0,992	5

* test t-Studenta dla prób zależnych

** poprawka Benjamini-Hochberga na liczbę porównań

Co więcej, jak zaprezentowano na rycinie 30, nie zanotowano żadnej tendencji do zwiększenia lub zmniejszenia abundancji mRNA genów pod wpływem przyjmowania leczenia ukierunkowanego na wzmocnienie przekąźnictwa dopaminergicznego. Zaobserwowałam także dużą rozbieżność w uzyskanych wynikach na poziomie pojedynczych pacjentów (tabela 16); u niektórych osób w fazie „ON” względny poziom ekspresji danego genu był wyższy, u innych – niższy niż w fazie „OFF”. W niniejszym doświadczeniu nie wykazano więc związku między stosowaniem leczenia a poziomem ekspresji wymienionych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona.

Leki oddziałujące na przekąźnictwo dopaminergiczne u 13 pacjentów z zaawansowaną PD wpływały u nich na dużą poprawę funkcji ruchowych, jednak w bardzo niewielkim zakresie wpłynęły na zaburzenia pozaruchowe, czego efekt był zauważalny jedynie w teście oceniającym zdolności poznawcze oraz w mniejszym stopniu w ocenie odczuwania lęku. Stosowanie tych leków nie wpłynęło na poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów, w tym również w przypadku genu *SNCA* o dużym znaczeniu diagnostycznym i klinicznym PD.

DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń potwierdzają zróżnicowany udział układu dopaminergicznego w powstawaniu i leczeniu poszczególnych objawów pozaruchowych PD. Myszy z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych charakteryzowały się gorszą wytrzymałością w teście pręta obrotowego i zmianami chodu. Miały one także mniejszą masę ciała niż zwierzęta kontrolne, co ujawniło się w zaawansowanym stadium rozwoju fenotypu. U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} nie stwierdzono zaburzeń węchu ani zachowania świadczącego o anhedonii. Nie występowały u nich także zaburzenia pamięci, uczenia opartego o instrumentalne wykonywanie zadań, ani przeuczania. Zaobserwowano natomiast, że zwierzęta z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych wykazywały większą aktywność wobec pozyskiwania nagród, jednak w bardziej zaawansowanym stadium rozwoju fenotypu aktywność ta była podobna w obu grupach.

Podania L-DOPA wpłynęły na pojedyncze parametry chodu w poszczególnych kohortach myszy, jednak efekty leku nie były statystycznie znamienne po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań. Choć sama mutacja nie wpłynęła na aktywność lokomotoryczną, średnią prędkość poruszania się, ani lękliwość w teście otwartego pola, to podania L-DOPA podnosiły wartość wszystkich trzech parametrów w tej grupie myszy. L-DOPA obniżyła również nieco preferencję spożycia sacharyny u samic z mutacją w porównaniu do pozostałych grup, jednak preferencja ta nadal była wysoka. W grupie badanych pacjentów z PD odstawienie leków dopaminergicznych pogorszyło wyniki uzyskiwane w badaniach kwestionariuszowych oceniających funkcje ruchowe oraz poznawcze. Nie wpłynęło natomiast istotnie na odczuwanie lęku, apatię, występowanie zaburzeń neuropsychiatrycznych, ani na wyniki uzyskiwane w wielowymiarowych testach objawów NMSS (pozaruchowe) i PDQ-8 (ruchowe i pozaruchowe).

Fenotyp parkinsonowski i objawy pozaruchowe u myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2}

Barwienia immunofluorescencyjne na obecność TH potwierdziły utratę komórek dopaminergicznych w wybranych obszarach mózgowia. W obu doświadczeniach zaobserwowano wyraźne obniżenie sygnału TH w prążkowie grzbietowym u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}, co sugerowało znaczny zanik aksonów neuronów dopaminergicznych istoty czarnej części zbitej wysyłających swoje projekcje w szlaku czarno-prążkowiowym. W doświadczeniu I ponadto zanotowano mniejsze zagęszczenie ciał komórek

TH-pozytywnych w istocie czarnej i polu brzusznej nakrywki, co dodatkowo potwierdza skuteczność mutacji względem spowodowania utraty neuronów dopaminergicznych śródmózgowia. Spadek sygnału TH w prążkowie grzbietowym oraz w obu wymienionych strukturach śródmózgowia widoczny w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach w 15. i w 18. tygodniu po indukcji mutacji u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, w których pokazano zmniejszenie ilości TH w strukturach tych w 7., 10. lub 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu w tym szczepie (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019).

W swoich badaniach nie przeprowadziłam jednakże analiz stereologicznych, które pozwoliłyby na ilościową analizę poziomu TH na skrawkach i określenie stopnia utraty neuronów TH-pozytywnych w śródmózgowiu lub ich zakończeń w przodomózgowiu. Z tego powodu niemożliwym jest dokładne porównanie tempa obumierania neuronów DAT-pozytywnych z innymi publikacjami. Należy jednak zauważyć, że tempo to jest nieco inne w obu wcześniejszych pracach: w publikacji z 2011 roku zanotowano istotne zmniejszenie liczby komórek TH+ w istocie czarnej już w 7. tygodniu od podań tamoksyfenu (Rieker *et al.*, 2011), natomiast w późniejszej w kolejnym punkcie czasowym, w 10. tygodniu od podań tamoksyfenu. Stopień zaburzenia przekazywania dopaminergicznego i tempo rozwoju fenotypu mogą zatem różnić się między kohortami. Niemniej jednak wyraźne obniżenie sygnału TH w prążkowie grzbietowym u mutantów w porównaniu do zwierząt kontrolnych było przeze mnie obserwowane na wszystkich wybarwionych skrawkach, poza przypadkiem jednego mutantu, który posiadał również inne cechy fenotypowe bliskie zwierzętom kontrolnym. Sugeruje to wysoką skuteczność indukcji mutacji i jej efektywność względem uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiego u badanych myszy. Ponadto, badania wskazują, że objawy ruchowe PD u ludzi pojawiają się, gdy spadek liczby zakończeń nerwowych istoty czarnej w skorupie osiąga co najmniej 50% (Kordower *et al.*, 2013) a utrata komórek dopaminergicznych istoty czarnej ok. 30% (Cheng *et al.*, 2010).

Poza barwieniami na obecność TH w mózgu, fenotyp parkinsonowski u mutantów TIF-IA^{DATCreERT2} został potwierdzony także wynikami testów behawioralnych. Samce z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych z doświadczenia II miały pogorszoną sprawność ruchową, tj. zdolność do utrzymania się na bieżni w teście pręta obrotowego wymagającą zachowania równowagi i przyspieszenia kroku, w 13. tygodniu po indukcji mutacji. Test ten służy powszechnie do oceny obecności zaburzeń ruchowych w mysich modelach PD (Rial *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Kao *et al.*, 2020). Uzyskany wynik w tym punkcie czasowym jest zgodny z wcześniejszymi pracami z użyciem tego modelu (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). Spośród testów mierzących sprawność ruchową zwierząt to właśnie wynik uzyskany tą metodą pokazał największe różnice między myszami z mutacją a osobnikami kontrolnymi.

W teście otwartego pola sam genotyp nie wpłynął ani na średnią prędkość, ani na aktywność lokomotoryczną; zanotowano jednak istotną interakcję genotypu oraz podań L-DOPA. Różnice między grupami nie były statystycznie istotne, co łącznie sugeruje brak wyraźnych efektów mutacji w tym teście, pomimo wykonania go na etapie zaawansowanego rozwoju fenotypu, tj. w 14. tygodniu po podaniach tamoksyfenu. U myszy MitoPark, również z postępującą utratą neuronów DAT-pozytywnych, w podobnym okresie rozwoju fenotypu zanotowano obniżenie aktywności lokomotorycznej (całkowity pokonany dystans w teście), jednak test ten trwał 30 minut (Kao *et al.*, 2020). Brak różnic w tym parametrze zanotowano w mysim modelu MPTP (Park *et al.*, 2015), gdy test ten trwał 5 minut, oraz w mysim modelu genetycznej PD *Pink1* *-/-* w czasie 30 minut obserwacji, jednak w badaniu tym sama mutacja nie obniżyła sygnału TH w prążkowie ani istocie czarnej (Matheoud *et al.*, 2019). W trwającym 5 minut wariancie testu zaobserwowano odmienne wyniki w 3 szczurzych modelach: obniżenie aktywności lokomotorycznej u zwierząt z nadekspresją α -synukleiny i w grupie z podaną wyższą dawką 6-OHDA (8 μ g) oraz brak różnic ze szczurami kontrolnymi w grupie z niższą dawką 6-OHDA (6 μ g) i w modelu parakwatowym (Campos *et al.*, 2013). Jednocześnie wykazano statystycznie istotne upośledzenie funkcji ruchowych w teście pręta obrotowego we wszystkich modelach szczurzych (Campos *et al.*, 2013) i w wymienionych badaniach z użyciem MPTP (Park *et al.*, 2015) i w modelu MitoPark (Kao *et al.*, 2020). Obserwacje te świadczą o tym, że obniżenie aktywności lokomotorycznej nie zawsze jest obecne w zwierzęcych modelach PD, pomimo upośledzenia motorycznego stwierdzonego w teście pręta obrotowego.

Trzeci zastosowany przeze mnie test pozwalał śledzić rozwój zmian funkcji ruchowych w czasie. Metoda CatWalk opiera się na precyzyjnych pomiarach wielu parametrów, dlatego wybrałam ją, aby móc zidentyfikować nawet bardzo niewielkie różnice w sposobie poruszania się między myszami TIF-IA^{DATCreERT2} a kontrolnymi. Test CatWalk jest często wykorzystywany w badaniach na mysich i szczurzych modelach PD, zarówno neurochemicznych, jak i genetycznych (Timotius *et al.*, 2019). Wśród często stwierdzanych różnic między osobnikami o fenotypie PD a kontrolnymi są: wydłużony czas fazy podporu, fazy przenoszenia i dłuższy czas trwania cyklu chodu, mniejsza prędkość przenoszenia łap, mniejsza długość kroków, mniejsza kadencja oraz mniejszy obszar kontaktu łap z podłożem (Chuang *et al.*, 2010, 2017; Vandeputte *et al.*, 2010; Baiguera *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Westin *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2015; Kordys *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2017; Tsang *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019). Przegląd literatury sugeruje jednakże występowanie pewnych rozbieżności między doniesieniami. Na przykład, wielkość rozstawu łap przednich była raportowana jako zmniejszona (Westin *et al.*, 2012; Janickova *et al.*, 2017) lub zwiększona (Baiguera *et al.*, 2012) u osobników o fenotypie PD. Rozstaw łap tylnych był u tych zwierząt obserwowany zazwyczaj jako

zwiększony (Chuang *et al.*, 2010, 2017; Baiguera *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017), natomiast w modelu VAcHTen1-Cre-flox/flox był mniejszy (Janickova *et al.*, 2017). Częściowe zróżnicowanie wyników testu CatWalk u zwierzęcych modeli PD między publikacjami wynika m.in.: z odmiennej charakterystyki poszczególnych modeli (stopień uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiowego i innych struktur), metodyki (np. punktów czasowych przeprowadzania sesji testowych, kryteriów przejść uwzględnionych w analizie) oraz wybiórczości badanych parametrów. Ponadto, wartości uzyskiwane w teście CatWalk są również uzależnione od wagi, płci, wieku i tła genetycznego (Pitzer *et al.*, 2021).

W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach w teście CatWalk zanotowałam rozbieżności między badanymi kohortami względem wpływu utraty neuronów dopaminergicznych na chód myszy. Mogą one częściowo wynikać ze wspomnianego wpływu płci na wyniki tego testu (Pitzer *et al.*, 2021). Zważywszy na dużą liczbę analizowanych parametrów, zastosowałam poprawkę na liczbę porównań, aby zminimalizować liczbę wyników obciążonych błędem i rodzaju. W ten sposób uzyskałam niewiele wyników istotnych statystycznie, w tym żadnego dla samców z doświadczenia II. Efekty mutacji były znamienne łącznie dla 3 parametrów: u samic z doświadczenia I dla sprzężenia ruchu dwóch łap RH → RF (większa wartość dla mutantów) i RF → RH (mniejsza) w okresie podań L-DOPA oraz u samców z doświadczenia dla tego samego parametru dla łap RH → LF w okresie rozwoju fenotypu. W przypadku samic być może obserwacje te świadczą o zaburzonej koordynacji stawiania łap u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} i o zwiększonym czasie podporu na przednich łapach, co mogłoby także sugerować ich osłabione podparcie na tylnych łapach. Za tą interpretacją przemawia średnio większa wartość analogicznego parametru dla łap LH → LF u mutantów w okresie rozwoju genotypu. Mnogość wyników świadczących o efektach genotypu lub interakcji genotypu i czasu w różnych kohortach (z pominięciem poprawki) na sprzężenie ruchu określonych łap przednich i tylnych, ale również względem sekwencji stawiania łap sugeruje, że koordynacja rozmieszczenia łap podczas chodu jest zmieniona u mutantów, co może być oznaką upośledzenia funkcji ruchowych. Zmienne te są rzadko raportowane w badaniach nad modelami PD (Timotius *et al.*, 2019). Vlamings i wsp. (2007) zbadali wpływ dwustronnego podania 6-OHDA na udział krzyżowych i naprzemiennych sekwencji stawiania kroków i nie znaleźli różnic między grupą 6-OHDA a zwierzętami kontrolnymi. W mysim modelu *Pink1* ^{-/-} zanotowano upośledzoną koordynację ruchu łap w jednej zmiennej sprzężenia ruchu dwóch łap i w 4 zmiennych zbliżonych miarą do sprzężenia ruchu – dyspersji faz dla par kończyn przeciw- i tożstronnych (Glasl *et al.*, 2012), choć model ten nie charakteryzuje się uszkodzeniem przekazywania dopaminergicznego. U pacjentów z PD zaburzenia koordynacji ruchu kończyn dolnych i górnych podczas chodzenia oraz wykonywania czynności wymagających zaangażowania przynajmniej dwóch kończyn są powszechnie obserwowane (Lazarus & Stelmach, 1992; Verschueren *et al.*, 1997; Roemmich *et al.*, 2013), a ich

obecność jest powiązana z bradykinezją i sztywnością mięśniową (Winogrodzka *et al.*, 2005). Stosowanie L-DOPA u pacjentów z PD poprawia ich koordynację ruchową (Carpinella *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2021). U badanych przeze mnie myszy TIF-IA^{DATCreERT2} zaobserwowano pojedynczy przypadek znamiennej interakcji genotypu ze stosowaniem L-DOPA dla sprzężenia ruchu dwóch łap: LF → RF u samców z doświadczenia I, a wynik ten nie spełnił kryterium znamienności $p < 0,05$ po poprawce.

U samców o genotypie mutantu zanotowano zwiększony rozstaw przednich łap oraz zmniejszony rozstaw tylnych łap (bez uwzględnienia poprawki), co może świadczyć o oparciu większej części ciężaru ciała na przednich kończynach i odciążeniu tylnych przez te myszy. Obserwacje te są odmienne od większości raportowanych zmian w modelach PD z uszkodzeniem układu dopaminergicznego. Ponadto, u samców TIF-IA^{DATCreERT2} zanotowano znamienny efekt leczenia L-DOPA względem normalizacji rozstawu łap, co sugeruje silną komponentę dopaminergiczną tych zmian. Kierunek obserwowanych różnic w tych parametrach był ten sam w obu kohortach samców, jednakże poszczególne wyniki wskazujące na ich istotność były odmienne, np. w okresie rozwoju genotypu w kohorcie I zanotowano efekt genotypu dla tylnych łap, a dla kohorty II – dla przednich. Należy jednak zauważyć, że efekty te były znamienne bez uwzględnienia poprawki na liczbę porównań. U chorych z PD odpowiednikiem rozstawu łap stosowanym w badaniach może być szerokość kroku, która średnio jest większa niż u osób zdrowych (Bovonsunthonchai *et al.*, 2014). Chód charakterystyczny dla PD cechuje ponadto m.in.: krótsza długość kroku, festynacja (skręcanie długości kroku wraz ze wzrostem kadencji), mniejsza szybkość poruszania się, wydłużony czas cyklu chodu i czasu trwania fazy podparcia (Rehman *et al.*, 2019). Ponadto, u pacjentów z PD występuje pochylenie ciała do przodu i związane z nim oparcie większej masy ciała na palcach stóp niż u zdrowych osób (Nieuwboer *et al.*, 1999). U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} zanotowałam oznaki wpływu genotypu oraz interakcji genotypu i podań L-DOPA względem długości kroku, długości fazy podparcia oraz parametrów opisujących pole powierzchni stopy z podłożem. Jednakże, obserwowane efekty nie zawsze wskazywały jednorodny kierunek zmian między sesjami pomiarowymi. Pomimo tego, że zaobserwowałam różnice w sposobie poruszania się myszy z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych, to należy jednak zauważyć, że obserwacje te nie powtarzały się w poszczególnych kohortach myszy i większość zanotowanych zmian nie była znamienna po zastosowaniu poprawki na liczbę porównań. Zatem wpływ mutacji u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} na występowanie zaburzeń chodu charakterystycznych dla PD był niewielki. Podobne wnioski można wysnuć względem wpływu podań L-DOPA na chód. Jednakże, badania przeprowadzone na pacjentach z PD pokazują ograniczoną skuteczność L-DOPA względem poprawienia wybranych parametrów chodu (np. wydłużenie kroku), a wyniki uzyskiwane w tych badaniach są często niespójne (Ferrandez & Blin, 1991; Sethi, 2008; Mirelman *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2020). Zestawienie moich wyników oraz obserwacji poczynionych u pacjentów z PD sugeruje zatem niewielki udział dysfunkcji

układu dopaminergicznego w zaburzeniach chodu. Doniesienia wskazują na istotny udział dysfunkcji innych układów w zaburzeniach chodu, w tym cholinergicznego (Rochester *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2015; Janickova *et al.*, 2017). Rozbieżności między moim wynikami a badaniami z użyciem innych modeli może wynikać z różnic w charakterystyce biochemicznych zmian między modelami. Wyniki testu CatWalk nie zaprzeczają jednak fenotypowi parkinsonowskiemu u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}.

Kolejną cechą unikalną dla zwierząt z mutacją TIF-IA^{DATCreERT2} była mniejsza masa ciała. Wyraźne różnice pojawiały się w późniejszych punktach czasowych we wszystkich trzech kohortach, choć u samic dopiero były znamienne w okresie podań L-DOPA. Mniejszą masę ciała obserwuje się też w innym modelach PD, w tym u myszy MitoPark (Galter *et al.*, 2010) i myszy po podaniach 6-OHDA (Masini *et al.*, 2021). Niższa masa ciała jest typowa dla pacjentów PD i wynika ona ze zwiększonego zapotrzebowania energetycznego chorych, a różnice w masie ciała zaczynają pojawiać się w fazie przedruchowej (Chen *et al.*, 2003). Regulacja zachowań związanych z odczuwaniem głodu i pożywaniem się jest zależna od interakcji wielu struktur i układów ośrodkowych, w tym angażujących przekaznictwo oreksynergiczne i dopaminergiczne (Volkow *et al.*, 2011; Kistner *et al.*, 2014). Utrata neuronów oreksynergicznych jest obecna w patologii PD (Fronczek *et al.*, 2007), co może wskazywać na częściowe źródło utraty wagi u pacjentów. Rola dopaminy w regulacji pożywania się została wykazana u ludzi (Volkow *et al.*, 2003), jak i u myszy (Szczypka *et al.*, 1999). U myszy niesyntezujących dopaminy już jednokrotne podanie L-DOPA prowadziło do krótkotrwałego zwiększenia aktywności i ilości zjedanego pokarmu do optymalnych wartości przy podniesieniu poziomu dopaminy w prążkowi do 9% tego u myszy typu dzikiego (Szczypka *et al.*, 1999). W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach w żadnej z badanych kohort myszy TIF-IA^{DATCreERT2} chroniczne podania L-DOPA nie miały wpływu na zmiany masy ciała zwierząt, bez względu na drogę podania leku, tj. ciągłe uwalnianie podskórne czy też iniekcje doodtrzewnowe. U chorych na PD obserwuje się natomiast, że samo stosowanie L-DOPA w tej grupie może przyczyniać się do utraty wagi, choć podeszły wiek również odgrywa rolę w tym procesie (Vardi *et al.*, 1976; Pålhagen *et al.*, 2005). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, można wnioskować, że utrata neuronów dopaminergicznych częściowo przyczynia się do spadku masy ciała w przebiegu PD, co być może wynika z osłabienia chorych, zmniejszenia ich aktywności ruchowej, ale z drugiej strony również może być związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu pokarmowego (Kistner *et al.*, 2014). Potrzebne są jednak dalsze badania, aby wyjaśnić podobne efekty obniżenia poziomu dopaminy w modelach zwierzęcych i podań L-DOPA u pacjentów na masę ciała w przebiegu PD, a więc działania przeciwnego względem poziomu dopaminy.

Podsumowując, zarówno barwienia immunofluorescencyjne na obecność TH w neuronach szlaku czarno-prążkowiowego oraz badania behawioralne funkcji ruchowych potwierdziły fenotyp parkinsonowski u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Myszy te mają zmniejszoną liczbę neuronów dopaminergicznych śródmózgowia. Uszkodzenie przekaźnictwa dopaminergicznego było związane z częściowym upośledzeniem funkcji ruchowych u tych myszy oraz z obniżoną masą ich ciała. Stosowanie L-DOPA częściowo wpłynęło na poprawę funkcji ruchowych. Warto ponadto zaznaczyć, że wyniki prowadzonych w kilku punktach czasowych pomiarów masy ciała oraz parametrów chodu w teście CatWalk potwierdzają stopniowy rozwój fenotypu parkinsonowskiego, która to dynamika jest bliska tej u osób chorych na PD. Szczep TIF-IA^{DATCreERT2} stanowi zatem dobry model do badania wpływu utraty neuronów dopaminergicznych na podłoże objawów pozaruchowych PD.

Udział dysfunkcji układu dopaminergicznego w powstawaniu objawów pozaruchowych PD jest zróżnicowany, na co wskazuje ograniczona skuteczność leków dopaminergicznych względem wielu z nich (Chaudhuri & Schapira, 2009). Zidentyfikowanie stopnia wpływu komponenty dopaminergicznej na występowanie poszczególnych objawów pozaruchowych PD pozwoli na lepsze poznanie etiopatogenezy choroby, a także pomoże opracować skuteczne strategie ich leczenia. Jest to jednak o tyle złożona kwestia, że procesy fizjologiczne upośledzone w przebiegu PD są regulowane często przez wiele układów neuroprzekaźnikowych, jak w przypadku objawów neuropsychiatrycznych. Stosowanie w badaniach modeli zwierzęcych ukierunkowanych na uszkodzenie pojedynczych układów neuroprzekaźników, jak TIF-IA^{DATCreERT2}, pozwala na śledzenie wpływu dysfunkcji wybranego układu neuroprzekaźników na zachowanie i zmiany biochemiczne zwierząt.

Zbadanie wpływu utraty neuronów dopaminergicznych na funkcje poznawcze i wykonawcze u myszy było jednym z głównych celów badań behawioralnych. Zastosowano trzy testy pozwalające na ocenę różnych funkcji poznawczych i wykonawczych: zdolności uczenia się instrumentalnego i przeuczania, pamięci krótkotrwałej, rozpoznawczej i długotrwałej (w testach przeprowadzanych przez wiele tygodni), wrażliwości na nagrodę i tendencji do poszukiwania bodźców.

U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} nie zaobserwowano wpływu utraty neuronów dopaminergicznych na pamięć krótkotrwałą i rozpoznawczą w teście rozpoznawania nowego obiektu. Co więcej, podania L-DOPA ani interakcja obu czynników również nie wykazały istotnego efektu na zachowanie zwierząt w tym teście. Trzeba jednak zaznaczyć, że grupy doświadczalne mutantów cechowała mała liczebność (odpowiednio 3 i 4 osobniki w grupie mutantów traktowanych solą fizjologiczną i L-DOPA) a pojedyncze osobniki w każdej z grup doświadczalnych nie wykazały preferencji zainteresowania nowym obiektem, tj. współczynnik rozpoznania nowego obiektu < 50%. Może to sugerować nieprawidłowe wykonanie testu

lub też dużą zmienność zachowań eksploracyjnych wewnątrz grup doświadczalnych. Test rozpoznawania nowego obiektu wymaga: nabycia informacji (ang. *acquisition*), ich konsolidacji (*consolidation*), odpamiętania (*retrieval*) i uaktualnienia (*update*) w kolejnych fazach wykonania zadania. Wykonanie tego testu angażuje przekąźnictwo dopaminergiczne układu mezkortykolimbicznego; jest ono niezbędne zwłaszcza dla zajścia procesów konsolidacji i „odpamiętania” (Osorio-Gómez *et al.*, 2022). Sugeruje to, że w momencie przeprowadzenia badania układ ten nie był na tyle uszkodzony, żeby objawiło się to upośledzeniem wykonania testu. Zaburzenia w wykonaniu tego testu zaobserwowano w szczurzym modelu 6-OHDA; były one odwracane po jednorazowym, ale nie chronicznym podaniu L-DOPA (Loiodice *et al.*, 2019).

Zaburzenia pamięci krótkotrwałej były wielokrotnie obserwowane u pacjentów z chorobą Parkinsona. U nowo zdiagnozowanych pacjentów Marini i wsp. (2003) zanotowali zwiększony efekt pierwszeństwa i obniżony efekt świeżości podczas zapamiętywania nowych informacji. Po roku stosowania L-DOPA u tych pacjentów ich wyniki nie różniły się na tle populacji referencyjnej, co mogłoby sugerować poprawę pamięci po L-DOPA. Należy jednak przy tym zaznaczyć, że zaobserwowane deficyty pamięci krótkotrwałej są niewielkie a stosowanie L-DOPA nie prowadziło do dużych zmian w funkcjach poznawczych u tych pacjentów. W zadaniu oceniających pamięć krótkotrwałą pacjenci z idiopatyczną postacią PD nie wykazywali różnic ze względu na odstawienie lub stosowanie leków dopaminergicznych (Degos *et al.*, 2018). W jeszcze innym doniesieniu pacjenci po odstawieniu leków dopaminergicznych wykazywali się lepszym wykonaniem zadania wymagającego użycia pamięci krótkotrwałej niż przy stosowaniu leczenia, ale także lepiej niż osoby zdrowe (Fallon *et al.*, 2019). Ponadto, Flowers i wsp. (1984) zanotowali brak zaburzeń pamięci rozpoznawczej u pacjentów. Łącznie, powyższe informacje sugerują potrzebę wykonania dalszych badań nad rolą zaburzeń transmisji dopaminergicznej i stosowania L-DOPA wobec zadań wymagających zaangażowania pamięci krótkotrwałej i rozpoznawczej.

Oprócz braku zaburzeń pamięci krótkotrwałej, myszy z utratą neuronów dopaminergicznych nie wykazywały również zachowań świadczących o upośledzeniu pamięci długotrwałej, uczenia instrumentalnego ani przeuczania. U pacjentów z PD zaobserwowano jednak zaburzone przeuczanie. Timmer i wsp. (2017) zanotowali zaburzone przeuczanie w zadaniu ze zmiennym wskazaniem nagrody i kary, jednak tylko u pacjentów z objawami depresji, a stosowanie leczenia dopaminergicznego nie wpłynęło na ich wyniki w teście. Cools i wsp. zanotowali natomiast poprawę (2007) lub pogorszenie (2001) w wykonywaniu zadań zależnych od przeuczania po podaniu pacjentom L-DOPA. W nowszym z doświadczeń poprawa przeuczania była związana z działaniem leku w jądrze półleżącym przegrody. Badania na zwierzętach pokazały, że w proces przeuczania są zaangażowane: kora okołoczołowa, prążkowie grzbietowe oraz ciało migdałowe (Bissonette & Powell, 2012). Ponieważ u myszy

TIF-IA^{DATCreERT2} występuje spadek unerwienia dopaminergicznego prążkowie grzbietowego, można by się spodziewać, że u samicy o genotypie mutantki pod koniec doświadczenia zaobserwujemy zaburzenia przeuczania, na które będzie miała wpływ L-DOPA. Nie zaobserwowano jednak efektów genotypu ani leku na preferencję narożnika $P=0,9$, która była wyższa niż 50% przez cały okres trwania doświadczenia. Być może wpływ na to miał kontekst społeczny (Kiryk *et al.*, 2011) i myszy z mutacją podążały za myszami kontrolnymi, zwłaszcza, że w późniejszym okresie obserwacji zmniejszyła się aktywność mutantów wobec wizyt i wyborów w teście. Potrzebne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tych obserwacji.

W procesy przetwarzania nagród zaangażowane są populacje neuronów dopaminergicznych, jak i serotonergicznych (Bari *et al.*, 2010; Kranz *et al.*, 2010; Beierholm *et al.*, 2013; Lammel *et al.*, 2014). Wyniki naszych badań pokazują, że sama utrata neuronów dopaminergicznych prowadzi do nadwrażliwości na nagrodę u myszy obu płci i wynikającej z niej zwiększonej aktywności w zadaniach instrumentalnych na wczesnych etapach utraty neuronów dopaminergicznych. W użytym modelu utrata neuronów dopaminergicznych występuje zarówno w istocie czarnej, jak i polu brzusznej nakrywki (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019), jednak znamienny poziom utraty neuronów w polu brzusznej nakrywki zaobserwowano nie wcześniej niż w 10. tygodniu. Ponieważ zaobserwowana nadwrażliwość na nagrodę miała charakter przejściowy i zaczynała ulegać zmniejszeniu do poziomu porównywalnego ze zwierzętami kontrolnymi po upływie ok. 10 tygodni od indukcji mutacji, można przypuszczać, że dużą rolę w nadwrażliwości myszy na nagrodę odgrywa utrata neuronów istoty czarnej. Również u pacjentów z PD stwierdza się zaburzone procesowanie nagrody. Pacjenci PD nie wykazują zmian w aktywności kory ruchowej przy zadaniu związanym z nagrodą, co jednak ulega zmianie po podaniu pramipeksolu, lecz nie L-DOPA (Kapogiannis *et al.*, 2011). Nadwrażliwość na nagrodę jest natomiast obecna u pacjentów z PD, którzy mają objawy zespołu zaburzeń kontroli impulsów; była ona obecna po odstawieniu leków dopaminergicznych, natomiast podczas ich przyjmowania ich wrażliwość na nagrodę była podobnie wysoka, co u pacjentów bez tych zaburzeń (Drew *et al.*, 2020). Badania u zdrowych osób wskazują, że nadwrażliwość na nagrodę jest komponentą impulsywności (Jauregi *et al.*, 2018), natomiast badania z udziałem pacjentów z PD demonstrują istotne znaczenie komponenty dopaminergicznej na występowanie tej nadwrażliwości. Co istotne w kontekście moich wyników, zespół zaburzeń kontroli impulsów rozwija się u pacjentów z PD wskutek przyjmowania agonistów receptorów dopaminowych (Weintraub & Nirenberg, 2012). Przejściowa nadwrażliwość na nagrodę u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} stoi więc w sprzeczności z obserwacjami pacjentów z PD. Być może u myszy tych przejściowo występują mechanizmy kompensujące utratę neuronów dopaminergicznych istoty czarnej, jednak wymaga to potwierdzenia doświadczalnego.

Nasilone przejściowo instrumentalne poszukiwanie wrażeń samców TIF-IA^{DATCreERT2}, stoi w opozycji do obserwacji poczynionych u pacjentów z PD, którzy mieli zmniejszoną tendencję do takiego zachowania (Evans *et al.*, 2006). Należy jednak podkreślić tymczasowe nasilenie tej tendencji u myszy, jak i odmienną metodologię badania tej cechy u ludzi i zwierząt. Nasilona tendencja do poszukiwania wrażeń jest silnie powiązana z przekąźnictwem dopaminergicznym; zarówno w badaniach z wykorzystaniem zwierząt, jak i u ludzi zwiększone poszukiwanie wrażeń jest związane z nadwrażliwością na psychostymulanty, natomiast u zwierząt o zwiększonym nasileniu tej cechy obserwuje się zmniejszoną liczbę receptorów D2 w prążkowie (Norbury & Husain, 2015). Łącznie, wyniki te mogą sugerować, że u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} występuje przejściowe zmniejszenie ekspresji receptorów D2, jednakże wymagane jest potwierdzenie histologiczne tej hipotezy. Nie ulega jednak wątpliwości, że zwiększone poszukiwanie wrażeń u myszy tych wynika ze zmian w przekąźnictwie dopaminergicznym i jest związane ze spadkiem poziomu dopaminy w prążkowie i śmiercią komórek w istocie czarnej (Rieker *et al.*, 2011).

Zaburzenia węchu były wykazywane w badaniach z wykorzystaniem różnych zwierzęcych modeli PD (McDowell & Chesselet, 2012), a badania z udziałem ludzi sugerują złożone ich podłoże, z wpływem dysfunkcji także innych neuroprzekąźników niż dopamina (Doty, 2012). W wykonanych przeze mnie barwieniach nie zanotowałam widocznych oznak zmian liczebności komórek TH-pozytywnych w opuszce, jednak nie zostały wykonane badania stereologiczne. Badania na zwierzęcych toksynowych modelach PD demonstrują, że uszkodzenie neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej prowadzi do zaburzeń węchu, ale w opuszce – do jego poprawy (Huisman *et al.*, 2004; Kurtenbach *et al.*, 2013; Ilkiw *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Obustronne podanie preformowanych fibryli α -synukleiny do opuszki węchowej myszy spowodowało pogorszenie ich wrażliwości węchowej w teście rozpoznawania zapachów, jednak nie zaobserwowano u nich zaburzeń węchu w teście zakopanego peletu (Johnson *et al.*, 2020). W wykonanym przeze mnie doświadczeniu sprawdziłam wrażliwość węchu myszy jedynie przy pomocy testu zakopanego jedzenia, zatem nie mogę w pełni wykluczyć możliwości, iż pewne aspekty funkcjonowania zmysłu powonienia, jak rozróżnianie zapachów, mogą być zaburzone u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Nie miały one jednak zaburzonej recepcji lokalizacji zapachu krakersa i pozyskiwały go w czasie zbliżonym do osobników kontrolnych. W mysim modelu MPTP zaobserwowano dłuższy czas do znalezienia przysmaku w teście zakopanego jedzenia przy jednoczesnym zachowaniu aktywności ruchowej zbliżonej do osobników kontrolnych (Kurtenbach *et al.*, 2013), co by sugerowało, że u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} również powinnam zaobserwować pogorszone znajdowanie krakersa. Z drugiej jednak strony, u myszy *Pink* α -/- pogorszenie rozróżniania zapachów było związane ze zmniejszeniem ilości komórek serotonergicznych w opuszce węchowej (Glasl *et al.*,

2012). Potrzebne są zatem dalsze badania wyjaśniające podłoże neurobiologiczne poszczególnych składowych zaburzeń węchu (rozróżnianie zapachów *versus* identyfikowanie nasilenia zapachu).

Brak oznak anhedonii mierzony poprzez wyższą niż 50% preferencję spożycia sacharyny względem spożycia wody był wykazany w długotrwałych badaniach u samic i samców TIF-IA^{DATCreERT2}. Nie wykazywał on zmian podobnych do tych obserwowanych w aktywności zwierząt w testach wymagających odpowiedzi instrumentalnych (czyli najpierw wzrostu, potem spadku, wraz ze śmiercią neuronów dopaminergicznych śródmózgowia). Obserwacje te sugerują brak wpływu postępującej utraty neuronów dopaminergicznych na zachowania mogące świadczyć o anhedonii. Zachowania świadczące o obniżonym nastroju, w tym obniżenie spożycia słodkich roztworów, obserwowano jednak w innych modelach zwierzęcych PD. W szczurzym modelu 6-OHDA zanotowano obniżoną preferencję spożycia roztworu sacharozy, która została podwyższona wskutek podań L-DOPA (Carvalho *et al.*, 2013). Również w modelu MPTP zaobserwowano obniżoną preferencję spożycia roztworu sacharozy, co autorzy powiązali z obniżonym poziomem ekspresji receptora 5-HT_{2B} na astrocytach (Zhang *et al.*, 2015). W przypadku modelu 6-OHDA również nie można całkowicie wykluczyć wpływu układu serotonergicznego na obserwowane zmiany, choć podana dawka neurotoksyny była niższa niż ta, dla której opisywano obniżenie poziomu tego neuroprzekaźnika w większości badanych struktur (Kamińska *et al.*, 2017). Z drugiej jednak strony, podkreśla się istotną rolę przekazywania dopaminergicznego w powstawaniu anhedonii (Gorwood, 2008), przez co moje wyniki zdają się być sprzeczne z danymi literaturowymi. Być może ma to podłoże w zwiększonej wrażliwości na nagrodę, która maskuje w pewien sposób zachowania mogące świadczyć o anhedonii, jednak wrażliwość ta maleje w późniejszych tygodniach rozwoju fenotypu PD. Ponadto, literatura sugeruje odwrotną zależność: przeuczania się zależnego od nagrody od występowania objawów depresji w PD (Timmer *et al.*, 2017). Potrzebne są dalsze badania, aby wyjaśnić niespójności tych wyników.

Wpływ L-DOPA na ekspresję genów w przodomózgowie u myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2}

Stosowanie L-DOPA u myszy z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych wpłynęło na podwyższenie poziomu ekspresji 20 genów w wybranych strukturach przodomózgowia myszy. Przy pomocy nienadzorowanej analizy skupień zidentyfikowano zmiany na obszarze prążkowie grzbietowego, jądra półleżącego przegrody, przedmurza i jądra wewnątrzgruszkowatego, komory bocznej, grzbietowej kory mózgu (warstwy 2/3 do 6b), części kory smakowej oraz kory gruszkowatej. Zestaw genów, na których ekspresję wpłynęła L-DOPA, był wzbogacony w geny związane z mechanizmami regulacji transkrypcji (m.in. *Egr1*, *Nr4a1*, *Junb*), a ponadto zaangażowane w procesy

zegara biologicznego (*Per1*, *Bhlhe40*) oraz ścieżki sygnałowej, w których uczestniczą białka MAPK (*Per1*, *Dusp1*). Inne spośród tych genów są powiązane m.in. z endocytozą (*Lgi3*), naprawą DNA (*Ubl5*), plastycznością synaptyczną (*Arc*) i transportem przez błonę komórkową (*Slc3a2*). L-DOPA indukowała ekspresję genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych głównie w grzbietowych warstwach kory oraz w prążkowie grzbietowym. Wzorzec zmian ekspresji genów wywołanych wielokrotnymi podaniami L-DOPA w przodomózgowiu myszy TIF-IA^{DATCreERT2} sugeruje wpływ tego leku na struktury zaangażowane w regulację funkcji ruchowych, motywację, funkcje wykonawcze i odczuwanie zapachu.

Wpływ L-DOPA na wzmocnienie ekspresji genów implikowanych w tak wielu funkcjach komórkowych sugeruje, że jej efekty wobec procesów w przodomózgowiu są bardzo szerokie i wieloaspektowe. Należy jednak zauważyć, że w większości przypadków związane z daną funkcją geny regulowane przez L-DOPA były pojedyncze i rozpatrywanie wpływu L-DOPA na szereg procesów na podstawie efektów wobec transkryptów jednego genu jest zbyt dużą generalizacją. Z drugiej strony, nie można wykluczyć, że część genów regulowanych przez L-DOPA została odrzucona z wyników wskutek rygorystycznych, złożonych kroków analizy odczytów. Wśród tych operacji było zastosowanie poprawki FDR na dużą liczbę porównań, która ze względu na specyfikę metodyki i dużą liczbę odczytów prawdopodobnie doprowadziło do odrzucenia wielu wyników. Zwiększenie próby być może pozwoliłoby na identyfikację większej liczby transkryptów, na których abundancję miała wpływ L-DOPA.

W niniejszym doświadczeniu zanotowano, że L-DOPA stymulowała ekspresję kilku genów związanych z regulacją transkrypcji (*Egr1*, *Egr4*, *Junb* i in.), co może oznaczać, że pośrednio L-DOPA wpływa na jeszcze więcej transkryptów i procesów w komórce. Zmiany te zbadano tylko w jednym punkcie czasowym: w chronicznym reżimie podań, 1 godzinę po ostatniej dawce. Charbonnier-Beaupel i wsp. (2015) obserwowali efekty jednorazowego podania L-DOPA na transkryptom prążkowie szczurzego po odnerwieniu 6-OHDA w 3 punktach czasowych: po 1, 3 i 6 godzinach od podania. Zanotowali oni kilka wzorców zmian ekspresji genów w czasie. Po 1 godzinie swój największy (lecz krótkotrwały) poziom ekspresji osiągnęło wiele genów regulowanych aktywnością komórek, w tym: *Egr4*, *Per1*, *Dusp1*, *Junb* i *Arc*. Sugeruje to duże podobieństwo wyników tego doświadczenia z naszymi wynikami, choć ekspresja *Dusp1* i *Arc* była w moim doświadczeniu podniesiona po podaniach leku nie w prążkowie, a w klastrach korowych. W kolejnych godzinach zanotowano kolejno zmiany w genach powiązanych (GO) m.in. z długotrwałym osłabieniem synaptycznym, następnie – aktywnością regulatorową fosfataz, natomiast wśród genów, których poziom ekspresji stopniowo wzrastał lub spadał przez 5 godzin były te zaangażowane w transmisję synaptyczną i regulację plastyczności synaptycznej. Zestawienie wyników obu badań pozwala na wysnucie wniosków, że podania L-DOPA w pierwszej kolejności aktywują w przodomózgowiu (lub bardziej szczegółowo: w prążkowie) ekspresję genów związanych z regulacją

transkrypcji, a molekularne skutki jej działania są zauważalne co najmniej przez kilka kolejnych godzin. Geny należące do grupy genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych (inaczej: *geny wczesnej odpowiedzi komórkowej*) miały zmienioną abundancję transkryptów po podaniach L-DOPA w wielu innych opisywanych badaniach przedomózgowia w zwierzęcych modelach PD (Konradi *et al.*, 2004; Ebihara *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2016).

Również w naszym wcześniejszym doświadczeniu w korze czołowej szczura z hemiparkinsonizmem po 6-OHDA zanotowaliśmy wpływ chronicznych podań L-DOPA na ekspresję genów regulowanych aktywnością komórki metodą znajdowania sieci genów współregulowanych (Radlicka *et al.*, 2021). Jednakże, wśród genów wspólnych z tym doświadczeniem, których poziom ekspresji był znamienne podwyższony, był jedynie *Per1*. Różnice te mogą wynikać z innej dawki L-DOPA, czasu uśmiercenia zwierząt od podania ostatniej dawki lub dokładności anatomicznej badania transkryptomu między transkryptomiką przestrzenną a RNA-seq całego wycinka tkanki. U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} ekspresja tego genu była podwyższona po podaniach L-DOPA w prążkowie oraz warstwie 2/3 kory grzbietowej. W szczurzym modelu dyskinez po L-DOPA zanotowano natomiast obniżenie poziomu ekspresji *Per1* w prążkowie (Smith *et al.*, 2016). Co istotne, jest to gen zaangażowany w regulację cykliów okołodobowych. Badania wykonane z udziałem pacjentów z PD wskazują zmiany poziomu ekspresji niektórych genów związanych z cyklami okołodobowymi, tj. *BMAL1* (Cai *et al.*, 2010), lub ich metylacji – *NPAS2* (Lin *et al.*, 2012), lecz nie *PER1*. Można by zatem przypuszczać, że to L-DOPA wpływa na zmiany jego ekspresji, zakłócając tym samym rytmy okołodobowe pacjentów. Jednakże, inne doniesienia nie wskazują na taką interpretację: L-DOPA ma poprawiać (Yang *et al.*, 2021) lub pogarszać (Li *et al.*, 2017) regulację zegara biologicznego u szczurów z uszkodzeniami po podaniach 6-OHDA, ale w żadnym z tych badań nie mierzono ekspresji *Per1*, tylko innych genów z nim powiązanych funkcjonalnie (*Bmal1*, *Clock*, *Per2*). Drugim genem związanym z regulacją rytmów okołodobowych, którego poziom ekspresji zmienił się po podaniach L-DOPA u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}, był *Bhlhe40*, jednak trudno rozpatrywać łącznie ich rolę (pomimo wspólnego terminu GO), gdyż jego ekspresja była zmieniona w innej warstwie kory, niż w przypadku *Per1*.

Wśród genów, których ekspresję promowała L-DOPA w mysim modelu PD, można doszukać się tych o potencjalnym znaczeniu w mechanizmach związanych z rozwojem tej choroby. *Ubl5* jest jednym z genów zaangażowanych w mitochondrialną odpowiedź na nieprawidłowo zwinięte białka; po traktowaniu komórek linii SH-SY5Y MPTP zanotowano czasowy wzrost ekspresji genów związanych z tym procesem, w tym samego *UBL5* (Hu *et al.*, 2021). Autorzy wskazali na neuroprotektoryjne właściwości aktywacji tego procesu, co pośrednio też może wskazywać na także działanie *Ubl5*. Być może świadczy to o tym, że L-DOPA wykazuje pewne właściwości neuroprotektoryjne w PD. Jednakże,

sugestię tę należy traktować bardzo ostrożnie. Trzeba pamiętać o tym, że w użytym przeze mnie modelu nie zanotowano zaburzeń zwijania się białek ani też ich patologicznego agregowania; nie był to model α -synukleinopatii ani powstały z użyciem MPTP. Ponadto, potencjalne właściwości neuroprotektoryjne lub spowalniające rozwój choroby (Fahn *et al.*, 2004; Verschuur *et al.*, 2019) nie są jednoznacznie wykazywane w literaturze, a wręcz istnieją badania demonstrujące jej możliwe działanie neurotoksyczne (Borah & Mohanakumar, 2007; Bhattacharjee *et al.*, 2016). Przykłady *Ubl5* i *Per1* pokazują trudności w szerszej interpretacji wyników wpływu L-DOPA na pojedyncze geny.

Ważne zagadnienie względem wyników niniejszych doświadczeń stanowi powiązanie danych transkryptomicznych z obserwowanymi u myszy zmianami zachowania pod wpływem L-DOPA. Interpretację przedstawionych wyników profilowania ekspresji względem objawów pozaruchowych ułatwiłoby skorelowanie ich ze zmianami zachowania zwierząt. Jedną z metod stosowaną do powiązania cech fenotypowych z wynikami wysokoprzepustowych metod badania transkryptomu, jest metoda WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008). Jednakże, zastosowanie analizy korelacji jak i WGCNA w przypadku niniejszego doświadczenia jest ograniczone niską liczebnością grup doświadczalnych. Aby móc wnioskować o zależnościach zmian ekspresji genów i zachowania pod wpływem L-DOPA w modelu PD, trzeba by więc zwiększyć próbę.

Warto zatem rozważyć efekty podań L-DOPA względem poszczególnych obszarów przodomózgowia. W przypadku zastosowanej metody nienadzorowanego analizy skupień do rozdziału profili transkrypcyjnych pojedynczych punktów na klastry osiągnęliśmy wynik o bardzo dużym odwzorowaniu szczegółów i podobieństw anatomii przodomózgowia myszy, o czym świadczy m.in. zróżnicowanie poziomu ekspresji genów markerowych w poszczególnych klastrach. Jest to wynik dużo lepszy niż na znalezionym przykładzie w literaturze – na skrawku ludzkiej kory przedczołowej (Maynard *et al.*, 2021), na co być może ma wpływ zastosowana metodyka analiz, odrzucająca dużo transkryptów o niskim poziomie transkrypcji. Można zatem z dość dużą pewnością opisywać anatomiczne aspekty różnic w ekspresji względem zidentyfikowanych klastrów.

Badania wpływu L-DOPA lub substancji o działaniu dopaminergicznym na transkryptom mózgowia skupiały się dotychczas głównie na wybranych strukturach, zwłaszcza na prążkowie, które jest bogato unerwione przez projekcje dopaminergiczne ze śródmózgowia. Bardziej rozszerzone względem struktur badania transkryptomiczne lub proteomiczne pozwalały na wizualizację efektów tych substancji na skrawkach, jednak będąc opartymi o używanie sond lub przeciwciał były wybiórcze względem otrzymanych wyników i dokładności kwantyfikacji sygnału (Berke *et al.*, 1998; Svenningsson *et al.*, 2000; Ebihara *et al.*, 2011; Bastide *et al.*, 2014). Spośród tych prac, najbliższa efektom mojej jest autorstwa Berke i wsp. (Berke *et al.*, 1998). Na szczurzym modelu hemiparkinsonizmu wywołanego

6-OHDA zaprezentowano efekty działania agonisty receptorów typu D1, SKF38393. Zaobserwowane zmiany dotyczyły indukcji ekspresji poszczególnych genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (m.in. *Egr1*, *Junb*, *Arc*, *Nr4a1*, *Jund*, *Fosb*) w prążkowi i korze mózgowej. Pokazane w publikacji skrawki pochodzą z obszarów zlokalizowanych bardziej doogonowo niż badane przeze mnie, a w połączeniu z inną dokładnością wykazywanych zmian i punktem czasowym szczegółowe porównanie wyników obu doświadczeń jest niemożliwe. Chciałabym jednak podkreślić, że w obu pracach wykazano wpływ leków dopaminergicznych na różne obszary i warstwy kory mózgowej oraz na prążkowie w zwierzęcych modelach PD, choć wizualnie można dostrzec pewne różnice. Przykładowo, SKF38393 indukował ekspresję *Arc* w podobnie dużym stopniu w prążkowi grzbietowym i brzuszny oraz w wielu warstwach kory mózgowej, natomiast w naszym badaniu wpływ L-DOPA na ekspresję tego genu był istotny jedynie w wybranych warstwach kory grzbietowej (2/3, 5, 6a).

Badania neuroobrazowe u pacjentów z PD demonstrują wpływ podań L-DOPA na zmienioną aktywność i połączenia różnych obszarów przedomózgowia, w tym na pierwszorzędową i dodatkową korę ruchową oraz na lewą korę przedczołową (Buhmann *et al.*, 2003; Orcioli-Silva *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020). W przeprowadzonym doświadczeniu nie mogłam ocenić efektów leku względem tych poszczególnych domen funkcjonalnych grzbietowej kory, ponieważ klastrowanie ujawniło większe podobieństwo profili transkrypcyjnych w warstwach kory. Należy jednak zauważyć, że efekt L-DOPA względem klastrów obecnych na terenie mysiej kory przedczołowej (Laubach *et al.*, 2018), tj. #1, #9 i #14 był znikomy i ograniczony do podwyższonej ekspresji *Ubl5* w klastrze #9. Niemniej jednak, moje wyniki pokazują, że L-DOPA wpływa funkcjonalnie na komórki w różnych obszarach przedomózgowia, zaangażowanych w procesy poznawcze, motywacyjne i przetwarzanie nagrody, węchowe, jak i funkcje ruchowe, co pokazuje, że lek ten wpływa na obszary regulujące funkcje zaburzone w PD. Ponadto, badanie to prezentuje również, że L-DOPA wpływa na procesy molekularne na obszarach, które mają niewielkie lub nie mają wcale unerwienia dopaminergicznego, np. jądro zewnątrzgruszkowate i kora gruszkowata (Berger *et al.*, 1976, 1991). Stanowi to przesłankę do dalszego badania molekularnych efektów farmakologii L-DOPA w mózgowiu o cechach PD.

Przeprowadzone doświadczenie pokazało przydatność metody transkryptomiki przestrzennej w badaniach neurofarmakologicznych i nad schorzeniami układu nerwowego. Wadą tej techniki jest to, że jej rozdzielczość nie jest bliska wielkości pojedynczej komórki, co powoduje, że na profil transkrypcyjny pojedynczego punktu składają się transkryptomy kilku komórek, często różnego typu, np. neurony o odmiennym fenotypie, oligodendrocyty i astrocyty. Utrudnia to dokładniejszą interpretację zmian ekspresji genów, jednakże na tle RNA-seq całych fragmentów technika ta ujawnia nieznana dotychczas heterogeniczność tkanki w odpowiedzi na różne bodźce. Ponadto, metodyka ta

jest kosztowna na tle „zwykłego” RNA-seq, co limituje liczebność próbek używanych w doświadczeniach i zwiększa tzw. efekt „batchu”. Mimo tych wad metodycznych, użycie transkryptomiki przestrzennej pozwoliło na zidentyfikowanie nowych mechanizmów komórkowych związanych m.in.: z chorobą Alzheimera (Chen *et al.*, 2020), stwardnieniem zanikowym bocznym (Maniatis *et al.*, 2019) i stwardnieniem rozsianym (Kaufmann *et al.*, 2022). Wyniki naszego doświadczenia pozwoliły po raz pierwszy zidentyfikować wpływ L-DOPA względem poszczególnych struktur przodomózgowia mysiego modelu PD z zastosowaniem transkryptomiki przestrzennej.

Wpływ odstawienia leków dopaminergicznych na objawy choroby Parkinsona i zmiany w ekspresji genów we krwi

Wyniki doświadczenia profilowania przestrzennego przodomózgowia myszy TIF-IA^{DATCreERT2} po podaniach L-DOPA oraz wyniki badania efektów leczenia dopaminergicznego na abundancję wybranych transkryptów we krwi pacjentów prowadzą do odmiennych wniosków. Podczas gdy w pierwszym przypadku odpowiedź na leczenie dopaminergiczne poprzez indukcję zmian ekspresji genów była wyraźna, we krwi pacjentów nie zaobserwowano takich efektów. Przyjmowanie lub odstawienie leków dopaminergicznych u pacjentów z PD nie wpływało na poziom ekspresji badanych genów w ich krwi. Leki te nie miały zatem wpływu na abundancję niektórych transkryptów implikowanych w PD (*SNCA*, *SGK1*), genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych (*EGR1*, *FOS*) ani o wysokiej specyficzności dla różnych populacji komórek krwi i śródbłonna naczyń krwionośnych (*CEBPA*, *DDIT4*, *IFNGR1*, *KFL4*, *MMP9*). Być może zatem leczenie dopaminergiczne u pacjentów z zaawansowaną PD nie wpływa na transkryptom komórek krwi. Należy jednak zaznaczyć, że brak różnic między punktami czasowymi może wynikać z małej liczebności próby i dużego jej zróżnicowania, w tym dawki przyjmowanych leków i chorób współistniejących. Ponadto, badanie skupiło się wybiórczo na niewielkiej liczbie transkryptów.

Porównanie wyników obu przeprowadzonych doświadczeń jest trudne z kilku powodów. Po pierwsze, badania dotyczyły dwóch odmiennych tkanek. Efekty podań L-DOPA na różne struktury mózgowia w tym samym modelu PD mogą być wysoce odmienne, co sugeruje, że porównywanie profili ekspresji genów między mózgiem a komórkami krwi może nie być jednoznacznie interpretowalne. Z drugiej strony, różni badacze podejmowali się porównania transkryptomów różnych struktur mózgowia i komórek krwi obwodowej. Opisywano niskie lub umiarkowane podobieństwo zmian transkryptomicznych poszczególnych genów między komórkami krwi a różnymi strukturami mózgowia, w tym kory przedczołowej i podwzgórza (Sullivan *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2022), lecz również dużą zgodność między sieciami genów lub powiązanymi z genami ścieżkami molekularnymi

zmienionymi w obu rodzajach próbek pod wpływem chronicznej okresowej ekspozycji na etanol (Ferguson *et al.*, 2022) lub w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Iturria-Medina *et al.*, 2020). Po drugie, istotnym czynnikiem jest różnica gatunkowa i wynikające z niej różnice w mechanizmach kompensacyjnych (Kreiner, 2015), jak i tempo postępowania śmierci neuronów dopaminergicznych wynikająca z drastycznie odmiennej długości życia. Po trzecie, należy wziąć pod uwagę metodologiczne ograniczenia badania z udziałem ludzi, do których należy przede wszystkim niska liczebność próby oraz wybiórczość względem analizowanych transkryptów. Biorąc pod uwagę duże zmiany fenotypowe u pacjentów pod wpływem leczenia dopaminergicznego i mnogość doniesień na temat zmian transkryptomicznych pod wpływem L-DOPA w zwierzęcych modelach PD, nie można całkowicie wykluczyć, że leki dopaminergiczne wpływają na transkryptom komórek krwi u chorych na PD.

Co istotne, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, w tym limfocyty T i B, posiadają receptory dopaminy typu D1 i D2 (Penedo *et al.*, 2021; Wysokiński *et al.*, 2021; Wieber *et al.*, 2022), jak również dopamina jest syntezowana przez limfocyty (Bergquist *et al.*, 1994; Buttarelli *et al.*, 2011). Wykazano rolę dopaminy w regulacji fizjologii i różnicowania limfocytów T (Buttarelli *et al.*, 2011), zaobserwowano także, że podania L-DOPA promowały proliferację tych komórek u myszy (Carr *et al.*, 2003). W badaniu Barbanti i wsp. (1999) u pacjentów z PD zanotowano większe zagęszczenie receptorów typu D1 i D2 na limfocytach krwi obwodowej, które zostało zmniejszone do poziomu kontrolnego po podaniach L-DOPA lub bromokryptyny. Ponadto, L-DOPA lub agonisty receptorów wpływają także na proteom limfocytów T u pacjentów z PD (Alberio *et al.*, 2012). Doniesienia te sugerują wspólnie, że stosowanie leczenia dopaminergicznego u chorych na PD wpływa na komórki krwi obwodowej, dlatego można by oczekiwać, że uda się zaobserwować również zmiany w ekspresji genów pod ich wpływem. W przeprowadzonym doświadczeniu nie zaobserwowałam jednak różnic w fazie „ON” i „OFF” względem ekspresji badanych genów: *SNCA*, *SGK1*, *FOS*, *EGR1*, *MMP9*, *CEBPA*, *DDIT4*, *KLF4* i *IFNGR1* we krwi.

Spośród wszystkich badanych genów, najbardziej spodziewałam się zanotować wpływ leczenia dopaminergicznego na poziom ekspresji *SNCA*. Całkowity poziom ekspresji mRNA *SNCA* we krwi we wczesnym stadium PD jest obniżony u osób z PD w porównaniu do osób zdrowych (Locascio *et al.*, 2015), natomiast poziom białka α -synukleiny w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej jest podwyższony (Kim *et al.*, 2004). Badania Marsal-García i wsp. (2021) pokazały ponadto, że różne izoformy mRNA tego genu mają odmienne kierunki zmian abundancji w korze skroniowej i krwi, a dodatkowo mogą zmieniać się z wiekiem. Sprzeczne są doniesienia na temat ilości α -synukleiny w osoczu pacjentów z PD w porównaniu do osób zdrowych (Henchcliffe, 2014); raportowane jest zmniejszenie poziomu całkowitej α -synukleiny (Gorostidi *et al.*, 2012), jednak nie u nosicieli mutacji

w genie *LRRK2*, brak różnic (Shi *et al.*, 2010) oraz jej podwyższenie (Lee *et al.*, 2006). Badania na zwierzęcych modelach PD demonstrują wpływ L-DOPA na zmniejszenie agregacji α -synukleiny w polu CA1 hipokampa, korze skroniowej i skorupie (Deffains *et al.*, 2021) oraz na zmniejszenie akumulacji fosforylowanej α -synukleiny w istocie czarnej (Shimozawa *et al.*, 2019). Również we krwi pacjentów z PD zaobserwowano skutki działania L-DOPA względem α -synukleiny: lek ten podniósł poziom metylacji genu *SNCA*, który u pacjentów z PD był hipometylowany (Schmitt *et al.*, 2015). W swojej pracy Duran i wsp. (2010) zanotowali podwyższenie poziomu α -synukleiny w osoczu nowo zdiagnozowanych, nieleczonych pacjentów z PD w porównaniu do osób zdrowych, natomiast poziom ten nie był istotnie odmienny w porównaniu do pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą i przyjmujących leki dopaminergiczne. Dane literaturowe wskazują, że L-DOPA może wpływać na ekspresję α -synukleiny u chorych z PD lub modelach zwierzęcych w różnych frakcjach krwi i w mózgu. Z drugiej strony, zmiany w poziomie ekspresji mogą być ograniczone do pojedynczych izoform, a brak zaobserwowanego wpływu leków dopaminergicznych na poziom ekspresji *SNCA* może wynikać z zastosowania sondy TaqMan komplementarnej do wszystkich wariantów transkrypcyjnych, a nie specyficznej wobec wybranych izoform. Co więcej, długość trwania choroby i jej zróżnicowanie w próbie również mogły mieć wpływ na ekspresję poszczególnych izoform, których abundancja maleje z rozwojem PD. Być może rolę w uzyskanym wyniku odgrywa również genotyp badanej grupy oraz różnice w dawkach przyjmowanych leków dopaminergicznych.

Inne geny, których poziom ekspresji zmierzyłam we krwi pacjentów, zostały wybrane do doświadczenia na podstawie danych literaturowych. Duża część doniesień o wpływie leków dopaminergicznych stosowanych w terapii PD na transkryptom mózgowia to prace wykonane na myszach i szczurach z uszkodzeniami układu dopaminergicznego spowodowanymi podaniami 6-OHDA. W pracach tych wśród genów podlegających zmianom pod wpływem L-DOPA powtarzają się geny regulowane aktywnością komórek nerwowych, w tym: *Fos* i *Egr1*. Nasilenie lub osłabienie ekspresji *Fos* wskutek podań L-DOPA zanotowano po uszkodzonej stronie w prążkowie, jądrze półleżącym przegrody, korze zakrętu obręczy, jądrze migdałowatym podstawnym bocznym i jądrze niskowzgórzowym (Morelli *et al.*, 1993; Kashihara *et al.*, 1995; Soghomonian, 2006; Ebihara *et al.*, 2011; Charbonnier-Beaupel *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016). Natomiast w przypadku *Egr1* analogiczne zmiany zaobserwowano w prążkowie, jądrze półleżącym przegrody, pierwszorzędowej korze ruchowej oraz części siateczkowatej istoty czarnej (Bastide *et al.*, 2015; Charbonnier-Beaupel *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016). Pozostałe geny zostały wybrane z mojej wcześniejszej pracy, również wykonanej na modelu 6-OHDA. Wpływ L-DOPA na ekspresję genów wykazałam dla 48 genów (Radlicka *et al.*, 2021), w tym dla *Sgk1*, *Ddit4*, *Klf4*, *Cebpa*, *Mmp9* i *Ifngr1*, natomiast ich wybór do sprawdzenia w doświadczeniu był podyktowany ich zróżnicowaną frekwencją ekspresji w poszczególnych typach komórek mózgu (Allen

Brain Institute, 2018), co można częściowo interpretować jako specyficzność ekspresji w stosunku do typu komórek. Brak wpływu leczenia dopaminergicznego na abundancję transkryptów powyższych 8 genów we krwi pacjentów z PD można ponownie tłumaczyć zbyt małą próbą, nie zarejestrowaniem zmian na poziomie pojedynczych izoform i zróżnicowaniem grupy badanej. Co więcej, wpływ L-DOPA na ekspresję tych genów może być ograniczony wyłącznie do wybranych struktur mózgowia.

Na podstawie wykonanego doświadczenia nie można uznać poziomu ekspresji *SNCA*, *FOS*, *EGR1*, *SGK1*, *DDIT4*, *KLF4*, *CEBPA*, *MMP9*, ani *IFNGR1* we krwi za markery stosowania i wpływu leczenia dopaminergicznego PD na objawy tej choroby. Jednakże, aby móc zweryfikować i uzupełnić wyniki doświadczenia, należałoby zastosować wysoko przepustową metodę ilościowej analizy transkryptomicznej lub proteomicznej, lub też zwiększyć próbę, rozszerzyć listę badanych genów, czy też ograniczyć analizy do specyficznych populacji komórek krwi. Tak wykonane badanie pozwoliłoby lepiej poznać molekularne skutki odstawienia i długotrwałego stosowania leków dopaminergicznych w terapii PD, jak również mogłoby pozwolić zbadać korelację między efektami tych leków względem objawów pozaruchowych i ruchowych oraz zmianami transkryptomu lub proteomu krwi. Ponadto, wyniki te miałyby potencjalne znaczenie w poszukiwaniu nie tylko molekularnego podłoża poszczególnych objawów PD, lecz również ich biomarkerów.

Odstawienie leków dopaminergicznych miało wpływ na pogorszenie funkcji ruchowych (UPDRS-II oraz -III), poznawczych (MoCA) oraz w niewielkim stopniu zwiększyło odczuwanie lęku (STAI-X1). Świadczy to o terapeutycznym wpływie leczenia dopaminergicznego na poprawę tych funkcji u chorych na zaawansowaną PD. Na zaburzenia funkcji poznawczych i wykonawczych duży wpływ ma przekąźnictwo dopaminergiczne i cholinergiczne (Calabresi *et al.*, 2006). Uważa się, że na wczesnych etapach rozwoju PD obserwowane są zaburzenia funkcji poznawczych związane z utratą neuronów dopaminergicznych, natomiast w zaawansowanym stadium przewagę w obrazie klinicznym nabierają objawy otępienia związanego z uszkodzeniami struktur cholinergicznych (Kehagia *et al.*, 2010; Stuart *et al.*, 2020). Wyniki naszego doświadczenia sugerują, że nawet w zaawansowanym PD dysfunkcje poznawcze mogą ulegać częściowej poprawie po zastosowaniu terapii dopaminergicznej. Należy jednak zauważyć, że większość uczestników badania nie miała oznak otępienia, a jedynie łagodnych zaburzeń funkcji poznawczych. Nie wykazano wpływu komponenty dopaminergicznej na wyniki pozostałych testów, co z jednej strony może sugerować niewielki jej udział względem występowania apatii i zaburzeń zachowania, a z drugiej trzeba zauważyć, że kwestionariusze wielowymiarowe (NMSS, PDQ-8) ze względu na swoją specyfikę oceniają nasilenie różnorodnych objawów pozaruchowych, zatem wyodrębnienie wpływu odstawienia leków dopaminergicznych na ich poszczególne składowe wymagałoby podzielenia wyników względem pytań kwestionariuszy.

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną rolę przekąźnictwa dopaminergicznego w powstawaniu i nasileniu objawów pozaruchowych PD. Znaczenie komponenty dopaminergicznej w mechanizmach związanych z zaburzeniami funkcji poznawczych pokazały na dwojaki sposób wyniki doświadczeń z wykorzystaniem mysiego modelu choroby, jak i z udziałem pacjentów z zaawansowaną PD. Postępująca utrata neuronów dopaminergicznych wywołała przejściowo wzmocnienie zachowań nastawionych na nagrodę u myszy, natomiast u pacjentów zaobserwowano pogorszenie funkcji poznawczych po odstawieniu leków dopaminergicznych. Pierwsza z tych obserwacji sugeruje istnienie mechanizmów kompensacyjnych wobec utraty neuronów szlaku czarno-prążkowiowego, które być może w stadium zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych przestają być efektywne lub zostają przeważone przez utratę kolejnych populacji neuronów, tj. pole brzuszne nakrywki. Druga z obserwacji wskazuje natomiast, że nawet w zaawansowanym stadium PD u pacjentów przyjmujących przez wiele lat L-DOPA, objawy poznawcze wciąż mogą mieć znaczącą komponentę dopaminergiczną, nie tylko cholinergiczną. Brak oznak upośledzenia procesów pamięciowych i uczenia się u myszy z uszkodzonym układem dopaminergicznym był sprzeczny danymi literaturowymi, co może również sugerować istnienie mechanizmów kompensacyjnych, które w skali czasowej doświadczeń zachowały skuteczność. Być może wskazuje również na to, że do wykształcenia się tych zaburzeń niezbędne jest uszkodzenie lub dysfunkcja innych układów neuroprzekąźników bądź odmiennych mechanizmów. L-DOPA nie wpłynęła na procesy poznawcze myszy z utratą neuronów dopaminergicznych, co być może wynika ze zbyt późnego ich włączenia, tj. po okresie nadwrażliwości na nagrodę. Masa ciała zwierząt z utratą neuronów dopaminergicznych uległa zmniejszeniu w zaawansowanym stadium rozwoju fenotypu, co jednak nie wynikało z zaburzeń węchu ani anhedonii mogących zmniejszyć przyjmowanie pokarmu, a leczenie L-DOPA jej nie poprawiło. Sugeruje to złożone podłoże mechanizmów mogących leżeć u podstaw utraty masy ciała tych myszy. Ponadto, prawdopodobne osłabienie myszy-mutantów związane z utratą ich masy ciała być może tłumaczy obniżenie się aktywności samic i samców w zadaniach instrumentalnych w na etapie bardziej zaawansowanego deficytu dopaminy.

Leki dopaminergiczne miały odmienny wpływ na zachowania lękowe w wykonanych doświadczeniach: w mysim modelu PD L-DOPA powodowała ich nasilenie, natomiast u pacjentów leki te wykazywały tendencję do ich łagodzenia lęku jako stanu – lęk ten ulegał nasileniu po ich odstawieniu. Te rozbieżności mogą wynikać z odmiennych metodologii obu doświadczeń lub z odmiennego spektrum działania L-DOPA w mózgowiu pacjentów z zaawansowanymi procesami uszkodzeń wielu układów przekąźników aniżeli u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}.

Anhedonia i apatia to dwa zaburzenia nastroju, które obserwuje się w PD. Mają one związek z obniżeniem nastroju i występują w przebiegu epizodów depresji. Tak w badaniach na mysim modelu,

jak i u pacjentów z PD nie zaobserwowano istotnego wpływu komponenty dopaminergicznej na te objawy. Podobnie, większość pozostałych badanych cech fenotypowych w doświadczeniach (węch, uczenie się, pamięć u myszy; zaburzenia zachowania, lęk jako cecha, wielowymiarowa ocena funkcji pozaruchowych u ludzi) nie wykazała zmian względem dysfunkcji i leczenia dopaminergicznego. Znaczenie w ich powstawaniu mogą mieć zatem przynajmniej częściowo inne układy neuroprzekazników. Nie można jednak wykluczyć, że wpływ na te wyniki miała niska liczebność badanych grup.

Profilowanie przestrzenne ekspresji genów w mysim modelu PD L-DOPA wpływa na procesy komórkowe nie tylko w prążkowie, jądrze półleżącym i specyficznych warstwach grzbietowej kory czołowej, lecz także w przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym i częściach kory somatosensorycznej oraz gruszkowatej. U zwierząt z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych L-DOPA stymulowała podwyższenie ekspresji genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych i zaangażowanych w regulację rytmu okołodobowego, procesów transportu i wydzielania zewnątrzkomórkowego i innych. Wysoce specyficzne działanie L-DOPA względem struktur anatomicznych mózgu i poszczególnych genów pokazało nowe efekty działania tego leku wobec obszarów zaangażowanych w powstawanie ruchowych i pozaruchowych objawów PD, w tym procesów wykonawczych i motywacyjnych. Wykazanie działania L-DOPA na procesy molekularne w obszarach przodomózgowia związanych z regulacją funkcji poznawczych, wykonawczych i ruchowych PD może pomóc znaleźć nowe strategie ich leczenia. Potwierdziłam wpływ L-DOPA na wzmocnienie transkrypcji genów regulowanych aktywnością komórek nerwowych w korze mózgu i grzbietowym prążkowie. Geny te powinny zatem znaleźć się w centrum poszukiwania nowych terapii objawów pozaruchowych PD, jak i dyskinez wywoływanych długotrwałym stosowaniem tego leku. Odstawienie leczenia dopaminergicznego u pacjentów nie spowodowało istotnych zmian w ekspresji wybranych genów we krwi. Jednakże, zwiększenie próby oraz zastosowanie innej metody mogłoby doprowadzić do identyfikacji transkryptów zmieniających swoją ekspresję w zależności od stosowania terapii dopaminergicznej. W ten sposób można by wykryć transkrypty o znaczeniu markerowym wobec poprawy lub pogorszenia się objawów u pacjentów.

Celem przedstawionych w rozprawie badań było wyizolowanie efektów przekazywania dopaminergicznego na powstawanie i leczenie objawów pozaruchowych PD. Należy jednak mieć na względzie, że utrata neuronów dopaminergicznych prowadzi do zmian funkcjonowania wielu obszarów mózgowia. Przykładowo, podania L-DOPA na późniejszych etapach choroby, gdy układ dopaminergiczny jest bardzo uszkodzony, prowadzą do produkcji dopaminy przez neurony serotoninergetyczne, spadku produkcji serotoniny i zmniejszenia ciał neuronów w grzbietowym jądrze

szwu (de Deurwaerdère *et al.*, 2017). W modelach selektywnych uszkodzeń struktur dopaminergicznych warto by zatem zbadać także ich wpływ na inne układy neuroprzekaźników. Ponadto, rozpatrując zaburzenia tak złożonych funkcji, jak szeroko pojęte funkcje poznawcze, powinno się wziąć pod uwagę zwyrodnienie obszarów poza szlakami dopaminergicznymi i ich interakcje. W przebiegu PD obserwuje się m.in. obniżenie ilości dopaminy oraz noradrenaliny w przedmurzu, które jest zaangażowane w regulację funkcji ruchowych i pozaruchowych PD (Sitte *et al.*, 2017). Zatem użycie w badaniach nad PD modeli selektywnych i postępujących zakłóceń przekazywania dopaminergicznego oraz adrenergicznego, serotonergicznego lub cholinergicznego pozwoliłoby z jednej strony na ulepszenie trafności fasadowej modelu, z drugiej – na poznanie wpływu interakcji obu układów neuroprzekaźnikowych na powstawanie wybranych objawów pozaruchowych PD.

WNIOSKI

Wykonane przeze mnie badania wskazują na dalszą potrzebę badania udziału komponenty dopaminergicznej w postawaniu objawów pozaruchowych PD. Doświadczenia z wykorzystaniem mysiego modelu tej choroby zademonstrowały, że na wczesnych etapach utraty neuronów dopaminergicznych występuje zwiększenie wrażliwości na nagrodę. Wykazałam także, że podania L-DOPA w tymże modelu mogą nasilać zachowania lękowe. Uszkodzenie układu dopaminergicznego nie doprowadziły do upośledzenia uczenia się, procesów pamięciowych, węchu ani zachowań świadczących o anhedonii. Odstawienie leków dopaminergicznych u pacjentów z zaawansowaną PD nie wpłynęło na większość objawów pozaruchowych, w tym na apatię i zaburzenia zachowania. Po raz pierwszy zaprezentowałam efekty podań L-DOPA na ekspresję genów w przodomózgowiu mysiego modelu PD metodą transkryptomiki przestrzennej. Wyniki tego doświadczenia pokazują, że lek wywołuje zmiany molekularne w poszczególnych obszarach kory mózgu i jąder podstawy, co może być związane z efektami terapeutycznymi i pomóc znaleźć nowe punkty uchwytu dla nowych leków działających wybiórczo wobec danej grupy objawów pozaruchowych PD. Efekty odstawienia leków dopaminergicznych u pacjentów sugerują, że w zaawansowanym stadium PD wzmacnianie przekąźnictwa dopaminergicznego nadal odgrywa ważną rolę w leczeniu zaburzeń poznawczych oraz lękowych. Badania ekspresji wybranych genów we krwi tych pacjentów nie doprowadziły do zidentyfikowania markerów działania leków dopaminergicznych wobec objawów pozaruchowych, jednak metoda wysokoprzepustowej analizy transkryptomicznej mogłaby pomóc takowe znaleźć.

Aby lepiej poznać podłoże molekularne objawów pozaruchowych PD potrzebne są dalsze szeroko zakrojone badania z udziałem pacjentów i modeli zwierzęcych. Wykorzystanie modeli łączących postępującą utratę neuronów dopaminergicznych oraz noradrenergicznych, serotoninergicznych lub cholinergicznych mogłoby pomóc rozszerzyć wyniki przeprowadzonych badań. Ważne jest zapewnienie dużej próby w badaniach z udziałem pacjentów, jak i tych z wykorzystaniem zwierząt, aby zniwelować efekty zmienności osobniczej i zwiększyć porównywalność wyników z innymi doniesieniami. Stworzenie jednolitego modelu etiopatogenezy poszczególnych objawów pozaruchowych PD pozwoliłoby na znalezienie skutecznych i bezpiecznych terapii, poprawiając tym samym jakość życia pacjentów. Dlatego ważne jest kontynuowanie badań na różnych modelach zwierzęcych oraz z udziałem pacjentów PD i z zastosowaniem nowatorskich, wieloprzepustowych technik, łącząc je z obserwacjami zachowania.

BIBLIOGRAFIA

- Aarsland, D., Bronnick, K., Williams-Gray, C., Weintraub, D., Marder, K., Kulisevsky, J., Burn, D., Barone, P., Pagonabarraga, J., Allcock, L., Santangelo, G., Foltynie, T., Janvin, C., Larsen, J.P., Barker, R.A., & Emre, M. (2010) Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. *Neurology*, **75**, 1062–1069.
- Aguila, J., Cheng, S., Kee, N., Cao, M., Wang, M., Deng, Q., & Hedlund, E. (2021) Spatial RNA Sequencing Identifies Robust Markers of Vulnerable and Resistant Human Midbrain Dopamine Neurons and Their Expression in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*, **14**.
- Alberio, T., Pippione, A.C., Comi, C., Olgiati, S., Cecconi, D., Zibetti, M., Lopiano, L., & Fasano, M. (2012) Dopaminergic therapies modulate the T-CELL proteome of patients with Parkinson's disease. *IUBMB Life*, **64**, 846–852.
- Allen Brain Institute (2018) Allen Cell Types Database Transcriptomics 1–15.
- Allen Institute for Brain Science (2022) Allen Reference Atlas-Mouse Brain [brain atlas] [WWW Document]. URL atlas.brain-map.org
- Alves, G., Wentzel-Larsen, T., Aarsland, D., & Larsen, J.P. (2005) Progression of motor impairment and disability in Parkinson disease A population-based study.
- Antunes, M. & Biala, G. (2012) The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, **13**, 93–110.
- Arshad, A.R., Sulaiman, S.A., Saperi, A.A., Jamal, R., Mohamed Ibrahim, N., & Abdul Murad, N.A. (2017) MicroRNAs and target genes as biomarkers for the diagnosis of early onset of parkinson disease. *Front Mol Neurosci*, **10**.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., & Sherlock, G. (2000) Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat Genet*,.
- Bagga, V., Dunnett, S.B., & Fricker, R.A. (2015) The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease - Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. *Behavioural Brain Research*, **288**, 107–117.
- Baiguera, C., Alghisi, M., Pinna, A., Bellucci, A., de Luca, M.A., Frau, L., Morelli, M., Ingrassia, R., Benarese, M., Porrini, V., Pellitteri, M., Bertini, G., Fabene, P.F., Sigala, S., Spillantini, M.G., Liou, H.-C., Spano, P.F., & Pizzi, M. (2012) Late-onset Parkinsonism in NF B/c-Rel-deficient mice. *Brain*, **135**, 2750–2765.
- Ball, N., Teo, W.P., Chandra, S., & Chapman, J. (2019) Parkinson's disease and the environment. *Front Neurol*,.
- Barbanti, P., Fabbrini, G., Ricci, A., Cerbo, R., Bronzetti, E., Caronti, B., Calderaro, C., Felici, L., Stocchi, F., Meco, G., Amenta, F., & Lenzi, G.L. (1999) Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord*, **14**, 764–771.
- Bari, A., Theobald, D.E., Caprioli, D., Mar, A.C., Aidoo-Micah, A., Dalley, J.W., & Robbins, T.W. (2010) Serotonin modulates sensitivity to reward and negative feedback in a probabilistic reversal learning task in rats. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 1290–1301.
- Bastide, M.F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C.E., Fernagut, P.O., & Bézard, E. (2014) Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*, **62**, 179–192.
- Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., Bourdenx, M., Engel, M., Navailles, S., de Deurwaerdère, P., Ko, W.K.D., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.C.,

- Gurevich, E. v., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Angela Cenci, M., & Bézard, E. (2015) Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*,.
- Beierholm, U., Guitart-Masip, M., Economides, M., Chowdhury, R., Düzel, E., Dolan, R., & Dayan, P. (2013) Dopamine modulates reward-related vigor. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1495–1503.
- Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., Evangelou, E., & Ioannidis, J.P.A. (2016) Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord*,.
- Berg, D., Borghammer, P., Fereshtehnejad, S.M., Heinzl, S., Horsager, J., Schaeffer, E., & Postuma, R.B. (2021) Prodromal Parkinson disease subtypes — key to understanding heterogeneity. *Nat Rev Neurol*,.
- Berger, B., Gaspar, P., & Verney, C. (1991) Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci*, **14**, 21–27.
- Berger, B., Thierry, A.M., Tassin, J.P., & Moyne, A.M.A. (1976) DOPAMINERGIC INNERVATION OF THE RAT PREFRONTAL CORTEX: A FLUORESCENCE HISTOCHEMICAL STUDY. *Brain Res*, **106**, 133–145.
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., & Ewing, A. (1994) Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12912–12916.
- Berke, J.D., Paletzki, R.F., Aronson, G.J., Hyman, S.E., & Gerfen, C.R. (1998) A Complex Program of Striatal Gene Expression Induced by Dopaminergic Stimulation. *The Journal of Neuroscience*, **18**, 5301–5310.
- Bhattacharjee, N., Mazumder, M.K., Paul, R., Choudhury, A., Choudhury, S., & Borah, A. (2016) L-DOPA treatment in MPTP-mouse model of Parkinson's disease potentiates homocysteine accumulation in substantia nigra. *Neurosci Lett*, **628**, 225–229.
- Bissonette, G.B. & Powell, E.M. (2012) Reversal learning and attentional set-shifting in mice. *Neuropharmacology*, **62**, 1168–1174.
- Blauwendraat, C., Nalls, M.A., & Singleton, A.B. (2020) The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **19**, 170–178.
- Blocq, P. & Marinesco, G. (1893) Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiparétique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cérébral. *Mémoir. Soc. Biol*, **27**, 105–111.
- Bohnen, N.I., Kaufer, D.I., Hendrickson, R., Constantine, G.M., Mathis, C.A., & Moore, R.Y. (2007) Cortical cholinergic denervation is associated with depressive symptoms in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **78**, 641–643.
- Boix, J., Padel, T., & Paul, G. (2015) A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural Brain Research*, **284**, 196–206.
- Borah, A. & Mohanakumar, K.P. (2007) Long-term L-DOPA treatment causes indiscriminate increase in dopamine levels at the cost of serotonin synthesis in discrete brain regions of rats. In *Cellular and Molecular Neurobiology*. pp. 985–996.
- Borrageiro, G., Haylett, W., Seedat, S., Kuivaniemi, H., & Bardien, S. (2018) A review of genome-wide transcriptomics studies in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, **47**, 1–16.
- Bovonsunthonchai, S., Vachalathiti, R., Pisarnpong, A., Khobhun, F., & Hiengkaew, V. (2014) Spatiotemporal Gait Parameters for Patients with Parkinson's Disease Compared with Normal Individuals. *Physiotherapy Research International*, **19**, 158–165.
- Braak, H., Bohl, J.R., Müller, C.M., Rüb, U., de Vos, R.A.I., & del Tredici, K. (2006) Stanley Fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Movement Disorders*, **21**, 2042–2051.
- Braak, H., del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., & Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197–211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & del Tredici, K. (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*,.

- Braak, H., Sandmann-Keil, D., Gai, W., & Braak, E. (1999) Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett*, **265**, 67–69.
- Brion, J.-P. & Couck, A.-M. (1995) Cortical and Brainstem-Type Lewy Bodies Are Immunoreactive for the Cyclin-Dependent Kinase 5. *American Journal of Pathology*, **147**.
- Brissaud, É. (1895) Nature et pathogénie de la maladie de Parkinson. In Meige, H. (ed), *Leçon Sur Les Maladies Nerveuses (Salpêtrière, 1893-1894)*. Masson, Paris, pp. 488–501.
- Broen, M.P.G., Narayen, N.E., Kuijf, M.L., Dissanayaka, N.N.W., & Leentjens, A.F.G. (2016) Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*,.
- Buddhala, C., Loftin, S.K., Kuley, B.M., Cairns, N.J., Campbell, M.C., Perlmutter, J.S., & Kotzbauer, P.T. (2015) Dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic deficits in Parkinson disease. *Ann Clin Transl Neurol*, **2**, 949–959.
- Buhmann, C., Glauche, V., Stürenburg, H.J., Oechsner, M., Weiller, C., & Büchel, C. (2003) Pharmacologically modulated fMRI - Cortical responsiveness to levodopa in drug-naïve hemiparkinsonian patients. *Brain*, **126**, 451–461.
- Buttarelli, F.R., Fanciulli, A., Pellicano, C., & Pontieri, F.E. (2011) The Dopaminergic System in Peripheral Blood Lymphocytes: From Physiology to Pharmacology and Potential Applications to Neuropsychiatric Disorders, *Current Neuropharmacology*.
- Cai, Y., Liu, S., Sothorn, R.B., Xu, S., & Chan, P. (2010) Expression of clock genes Per1 and Bmal1 in total leukocytes in health and Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, **17**, 550–554.
- Calabresi, P., Picconi, B., Parnetti, L., & di Filippo, M. (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol*, **5**, 974–983.
- Camerucci, E., Stang, C.D., Hajeb, M., Turcano, P., Mullan, A.F., Martin, P., Ross, O.A., Bower, J.H., Mielke, M.M., & Savica, R. (2021) Early-Onset Parkinsonism and Early-Onset Parkinson's Disease: A Population-Based Study (2010-2015). *J Parkinsons Dis.*
- Campos, F.L., Carvalho, M.M., Cristovão, A.C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A.J., Kim, Y.S., & Sousa, N. (2013) Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci.*
- Carbon, S., Douglass, E., Good, B.M., Unni, D.R., Harris, N.L., Mungall, C.J., Basu, S., Chisholm, R.L., Dodson, R.J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P.D., Albou, L.P., Ebert, D., Kesling, M.J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Mushayahama, T., LaBonte, S.A., Siegele, D.A., Antonazzo, G., Attrill, H., Brown, N.H., Garapati, P., Marygold, S.J., Trovisco, V., dos Santos, G., Falls, K., Tabone, C., Zhou, P., Goodman, J.L., Strelets, V.B., Thurmond, J., Garmiri, P., Ishtiaq, R., Rodríguez-López, M., Acencio, M.L., Kuiper, M., Lægreid, A., Logie, C., Lovering, R.C., Kramarz, B., Saverimuttu, S.C.C., Pinheiro, S.M., Gunn, H., Su, R., Thurlow, K.E., Chibucos, M., Giglio, M., Nadendla, S., Munro, J., Jackson, R., Duesbury, M.J., Del-Toro, N., Meldal, B.H.M., Paneerselvam, K., Perfetto, L., Porras, P., Orchard, S., Shrivastava, A., Chang, H.Y., Finn, R.D., Mitchell, A.L., Rawlings, N.D., Richardson, L., Sangrador-Vegas, A., Blake, J.A., Christie, K.R., Dolan, M.E., Drabkin, H.J., Hill, D.P., Ni, L., Sitnikov, D.M., Harris, M.A., Oliver, S.G., Rutherford, K., Wood, V., Hayles, J., Bähler, J., Bolton, E.R., de Pons, J.L., Dwinell, M.R., Hayman, G.T., Kaldunski, M.L., Kwitek, A.E., Laudederkind, S.J.F., Plasterer, C., Tutaj, M.A., Vedi, M., Wang, S.J., D'Eustachio, P., Matthews, L., Balhoff, J.P., Aleksander, S.A., Alexander, M.J., Cherry, J.M., Engel, S.R., Gondwe, F., Karra, K., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Simison, M., Skrzypek, M.S., Weng, S., Wong, E.D., Feuermann, M., Gaudet, P., Morgat, A., Bakker, E., Berardini, T.Z., Reiser, L., Subramaniam, S., Huala, E., Arighi, C.N., Auchincloss, A., Axelsen, K., Argoud-Puy, G., Bateman, A., Blatter, M.C., Boutet, E., Bowler, E., Breuza, L., Bridge, A., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Casas, C.C., Coudert, E., Denny, P., Es-Treicher, A., Famiglietti, M.L., Georgiou, G., Gos, A.N., Gruaz-Gumowski, N., Hatton-Ellis, E., Hulo, C., Ignatchenko, A., Jungo, F., Laiho, K., le Mercier, P., Lieberherr, D., Lock, A., Lussi, Y., MacDougall, A., Ma-Grane, M., Martin, M.J., Masson, P., Natale, D.A., Hyka-Nouspikel, N., Orchard, S., Pedruzzi, I., Pourcel, L., Poux, S., Pundir, S., Rivoire, C., Speretta, E., Sundaram, S., Tyagi, N., Warner, K., Zaru, R., Wu, C.H., Diehl, A.D., Chan, J.N., Grove, C., Lee, R.Y.N., Muller, H.M., Raciti,

- D., van Auken, K., Sternberg, P.W., Berriman, M., Paulini, M., Howe, K., Gao, S., Wright, A., Stein, L., Howe, D.G., Toro, S., Westerfield, M., Jaiswal, P., Cooper, L., & Elser, J. (2021) The Gene Ontology resource: Enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res*, **49**, D325–D334.
- Carpinella, I., Crenna, P., Marzegan, A., Rabuffetti, M., Rizzone, M., Lopiano, L., & Ferrarin, M. (2007) Effect of L-dopa and subthalamic nucleus stimulation on arm and leg swing during gait in Parkinson's Disease. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, **2007**, 6665–6668.
- Carr, L., Tucker, A., & Fernandez-Botran, R. (2003) The enhancement of T cell proliferation by L-dopa is mediated peripherally and does not involve interleukin-2. *J Neuroimmunol*, **142**, 166–169.
- Carvalho, M.M., Campos, F.L., Coimbra, B., Pêgo, J.M., Rodrigues, C., Lima, R., Rodrigues, A.J., Sousa, N., & Salgado, A.J. (2013) Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener*, **8**, 12–14.
- Chan, F.K.W., Brown, E.R., Ericsson, A., Kovacs, K.J., & Sawchenko, P.E. (1993) A Comparison of Two Immediate-Early Genes, c-fos and NGFI-B, as Markers for Functional Activation in Stress-related Neuroendocrine Circuitry, *The Journal of Neuroscience*.
- Chanarat, S. (2021) UBL5/Hub1: An atypical ubiquitin-like protein with a typical role as a stress-responsive regulator. *Int J Mol Sci*.
- Charbonnier-Beaupel, F., Malerbi, M., Alcacer, C., Tahiri, K., Carpentier, W., Wang, C., During, M., Xu, D., Worley, P.F., Girault, J.A., Herve, D., & Corvol, J.C. (2015) Gene expression analyses identify narp contribution in the development of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience*, **35**, 96–111.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., & Destée, A. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, **364**, 1167–1169.
- Chaudhuri, K.R., Martinez-Martin, P., Brown, R.G., Sethi, K., Stocchi, F., Odin, P., Ondo, W., Abe, K., MacPhee, G., MacMahon, D., Barone, P., Rabey, M., Forbes, A., Breen, K., Tluk, S., Naidu, Y., Olanow, W., Williams, A.J., Thomas, S., Rye, D., Tsuboi, Y., Hand, A., & Schapira, A.H.V. (2007) The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: Results from an international pilot study. *Movement Disorders*, **22**, 1901–1911.
- Chaudhuri, K.R. & Schapira, A.H. (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*.
- Chen, H., Zhang, S.M., Hernán, M.A., Willett, W.C., & Ascherio, A. (2003) Weight loss in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **53**, 676–679.
- Chen, H., Zhao, E.J., Zhang, W., Lu, Y., Liu, R., Huang, X., Ciesielski-Jones, A.J., Justice, M.A., Cousins, D.S., & Peddada, S. (2015) Meta-analyses on prevalence of selected Parkinson's nonmotor symptoms before and after diagnosis. *Transl Neurodegener*, **4**.
- Chen, W.T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., Qian, X., Laláková, J., Kühnemund, M., Voytyuk, I., Wolfs, L., Mancuso, R., Salta, E., Balusu, S., Snellinx, A., Munck, S., Jurek, A., Fernandez Navarro, J., Saido, T.C., Huitinga, I., Lundeberg, J., Fiers, M., & de Strooper, B. (2020) Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease. *Cell*, **182**, 976-991.e19.
- Cheng, H.C., Ulane, C.M., & Burke, R.E. (2010) Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol*, **67**, 715–725.
- Chiu, W.-H., Depboylu, C., Hermanns, G., Maurer, L., Windolph, A., Oertel, W.H., Ries, V., & Höglinger, G.U. (2015) Long-term treatment with L-DOPA or pramipexole affects adult neurogenesis and corresponding non-motor behavior in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, **95**, 367–376.
- Chrószcz, M. (2022) Expression of the Oprm1 gene in the mouse striatum and prefrontal cortex.
- Chuang, C. sen, Chang, J.C., Cheng, F.C., Liu, K.H., Su, H.L., & Liu, C.S. (2017) Modulation of mitochondrial dynamics by treadmill training to improve gait and mitochondrial deficiency in a rat model of Parkinson's disease. *Life Sci*, **191**, 236–244.

- Chuang, C. sen, Su, H.L., Cheng, F.C., Hsu, S.H., Chuang, C.F., & Liu, C.S. (2010) Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Biomed Sci*, **17**, 1–10.
- Cools, R., Barker, R.A., Sahakian, B.J., & Robbins, T.W. (2001) Enhanced or impaired cognitive function in Parkinson's disease as a function of dopaminergic medication and task demands. *Cereb Cortex*, **11**, 1136–1143.
- Cools, R., Lewis, S.J.G., Clark, L., Barker, R.A., & Robbins, T.W. (2007) L-DOPA disrupts activity in the nucleus accumbens during reversal learning in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 180–189.
- Cooper, J.F. & Van Raamsdonk, J.M. (2018) Modeling Parkinson's disease in *C. elegans*. *J Parkinsons Dis*, **8**, 17–32.
- Crofts, H.S., Dalley, J.W., Collins, P., Van Denderen, J.C.M., Everitt, B.J., Robbins, T.W., & Roberts, A.C. (2001) Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set. *Cerebral Cortex*, **11**, 1015–1026.
- Crosby, S.D., Puetz, J.J., Simburger, K.S., Fahrner, T.J., & Milbrandt, J. (1991) The Early Response Gene NGFI-C Encodes a Zinc Finger Transcriptional Activator and Is a Member of the GCGGGGGCG (GSG) Element-Binding Protein Family, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- Cummings, J.L., Mega, M., Gray, K., Rosenberg-Thompson, S., Carusi, D.A., & Gornbein, J. (1994) The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, **44**, 2308–2314.
- da Costa, I.C. & Schmidt, C.K. (2020) Ubiquitin-like proteins in the DNA damage response: The next generation. *Essays Biochem*,.
- de Deurwaerdère, P., di Giovanni, G., & Millan, M.J. (2017) Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. *Prog Neurobiol*,.
- Deffains, M., Canron, M.H., Teil, M., Li, Q., Dehay, B., Bezard, E., & Fernagut, P.O. (2021) L-DOPA regulates α -synuclein accumulation in experimental parkinsonism. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **47**, 532–543.
- Degos, B., Ameqrane, I., Rivaud-Péchoux, S., Pouget, P., & Missal, M. (2018) Short-term temporal memory in idiopathic and Parkin-associated Parkinson's disease. *Sci Rep*, **8**.
- Delenclos, M., Burgess, J.D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T.F., Vekrellis, K., & McLean, P.J. (2019) Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J Neurochem*, **150**, 566–576.
- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, **175**, 303–317.
- Dorsey, E.R., Sherer, T., Okun, M.S., & Bloem, B.R. (2018) The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis*, **8**, S3–S8.
- Doty, R.L. (2012) Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis*, **46**, 527–552.
- Drew, D.S., Muhammed, K., Baig, F., Kelly, M., Saleh, Y., Sarangmat, N., Okai, D., Hu, M., Manohar, S., & Husain, M. (2020) Dopamine and reward hypersensitivity in Parkinson's disease with impulse control disorder. *Brain*, **143**, 2502–2518.
- Dumitriu, A., Golji, J., Labadorf, A.T., Gao, B., Beach, T.G., Myers, R.H., Longo, K.A., & Latourelle, J.C. (2016) Integrative analyses of proteomics and RNA transcriptomics implicate mitochondrial processes, protein folding pathways and GWAS loci in Parkinson disease. *BMC Med Genomics*, **9**.
- Dumitriu, A., Latourelle, J.C., Hadzi, T.C., Pankratz, N., Garza, D., Miller, J.P., Vance, J.M., Foroud, T., Beach, T.G., & Myers, R.H. (2012) Gene expression profiles in Parkinson disease prefrontal cortex implicate FOXO1 and genes under its transcriptional regulation. *PLoS Genet*, **8**.
- Duran, R., Barrero, F.J., Morales, B., Luna, J.D., Ramirez, M., & Vives, F. (2010) Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov Disord*, **25**, 489–493.
- Durcan, R., Wiblin, L., Lawson, R.A., Khoo, T.K., Yarnall, A.J., Duncan, G.W., Brooks, D.J., Pavese, N., & Burn, D.J. (2019) Prevalence and duration of non-motor symptoms in prodromal Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, **26**, 979–985.

- Duty, S. & Jenner, P. (2011) Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, **164**, 1357–1391.
- Ebihara, K., Ishida, Y., Takeda, R., Abe, H., Matsuo, H., Kawai, K., Magata, Y., & Nishimori, T. (2011) Differential expression of FosB, c-Fos, and Zif268 in forebrain regions after acute or chronic L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **496**, 90–94.
- Ekstrand, M.I., Terzioglu, M., Galter, D., Zhu, S., Hofstetter, C., Lindqvist, E., Thams, S., Bergstrand, A., Hansson, F.S., Trifunovic, A., Hoffer, B., Cullheim, S., Mohammed, A.H., Olson, L., & Larsson, N.G. (2007) Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1325–1330.
- Engeln, M., de Deurwaerdère, P., Li, Q., Bezard, E., & Fernagut, P.O. (2015) Widespread monoaminergic dysregulation of both motor and non-motor circuits in parkinsonism and dyskinesia. *Cerebral Cortex*, **25**, 2783–2792.
- Escanilla, O., Yuhás, C., Marzan, D., & Linster, C. (2009) Dopaminergic Modulation of Olfactory Bulb Processing Affects Odor Discrimination Learning in Rats. *Behavioral Neuroscience*, **123**, 828–833.
- Evans, A.H., Lawrence, A.D., Potts, J., MacGregor, L., Katzenschlager, R., Shaw, K., Zijlmans, J., & Lees, A.J. (2006) Relationship between impulsive sensation seeking traits, smoking, alcohol and caffeine intake, and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **77**, 317–321.
- Fahn, S., Elton, R., & and Members of the UPDRS Development Committee (1987) The Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In Fahn, S., Marsden, C.D., Calne, D.B., & Goldstein, M. (eds), *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Macmillan Health Care Information, Florham Park, NJ, pp. 153–163.
- Fahn, S., Oakes, D., Shoulson, I., Kieburtz, K., Rudolph, A., Lang, A., Olanow, C.W., Tanner, C., Marek, K., & Parkinson Study Group (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **351**, 2498–2508.
- Fallon, S.J., Gowell, M., Maio, M.R., & Husain, M. (2019) Dopamine affects short-term memory corruption over time in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*, **5**.
- Fares, M.B., Jagannath, S., & Lashuel, H.A. (2021) Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? *Nat Rev Neurosci*, **22**, 111–131.
- Fearnley, J.M. & Lees, A.J. (1991) AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY, Brain.
- Feigin, V.L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M.S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W.J., Dorsey, E.R., Elbaz, A., Ellenbogen, R.G., Fisher, J.L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S.L., Johnson, C.O., Kassebaum, N.J., Logroscino, G., Marin, B., Mountjoy-Venning, W.C., Nguyen, M., Ofori-Asenso, R., Patel, A.P., Piccininni, M., Roth, G.A., Steiner, T.J., Stovner, L.J., Szoek, C.E.I., Theadom, A., Vollset, S.E., Wallin, M.T., Wright, C., Zunt, J.R., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Aboyans, V., Abraha, H.N., Acharya, D., Adamu, A.A., Adebayo, O.M., Adeoye, A.M., Adsuar, J.C., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmed, M.B., Aichour, A.N., Aichour, I., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Akseer, N., Al-Eyadhy, A., Al-Shahi Salman, R., Alahdab, F., Alene, K.A., Aljunid, S.M., Altirkawi, K., Alvis-Guzman, N., Anber, N.H., Antonio, C.A.T., Arabloo, J., Aremu, O., Ärnlöv, J., Asayesh, H., Asghar, R.J., Atalay, H.T., Awasthi, A., Ayala Quintanilla, B.P., Ayuk, T.B., Badawi, A., Banach, M., Banoub, J.A.M., Barboza, M.A., Barker-Collo, S.L., Barnighausen, T.W., Baune, B.T., Bedi, N., Behzadifar, M., Behzadifar, M., Béjot, Y., Bekele, B.B., Belachew, A.B., Bennett, D.A., Bensenor, I.M., Berhane, A., Beuran, M., Bhattacharyya, K., Bhutta, Z.A., Biadgo, B., Bijani, A., Bililign, N., Bin Sayeed, M.S., Blazes, C.K., Brayne, C., Butt, Z.A., Campos-Nonato, I.R., Cantu-Brito, C., Car, M., Cárdenas, R., Carrero, J.J., Carvalho, F., Castañeda-Orjuela, C.A., Castro, F., Catalá-López, F., Cerin, E., Chaiah, Y., Chang, J.C., Chatziralli, I., Chiang, P.P.C., Christensen, H., Christopher, D.J., Cooper, C., Cortesi, P.A., Costa, V.M., Criqui, M.H., Crowe, C.S., Damasceno, A.A.M., Daryani, A., De la Cruz-Góngora, V., De La Hoz, F.P., De Leo, D., Degefa, M.G., Demoz, G.T., Deribe, K., Dharmaratne, S.D., Diaz, D., Dinberu, M.T., Djalalinia, S., Doku, D.T., Dubey, M., Dubljanin, E., Duken, E.E., Edvardsson, D., El-Khatib, Z., Endres, M., Endries, A.Y., Eskandarieh, S., Esteghamati, A., Esteghamati, S., Farhadi,

F., Faro, A., Farzadfar, F., Farzaei, M.H., Fatima, B., Fereshtehnejad, S.M., Fernandes, E., Feyissa, G.T., Filip, I., Fischer, F., Fukumoto, T., Ganji, M., Gankpe, F.G., Garcia-Gordillo, M.A., Gebre, A.K., Gebremichael, T.G., Gelaw, B.K., Geleijnse, J.M., Geremew, D., Gezae, K.E., Ghasemi-Kasman, M., Gidey, M.Y., Gill, P.S., Gill, T.K., Gnedovskaya, E. V., Goulart, A.C., Grada, A., Grosso, G., Guo, Y., Gupta, R., Gupta, R., Haagsma, J.A., Hagos, T.B., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Hankey, G.J., Hao, Y., Haro, J.M., Hassankhani, H., Hassen, H.Y., Havmoeller, R., Hay, S.I., Hegazy, M.I., Heidari, B., Henok, A., Heydarpour, F., Hoang, C.L., Hole, M.K., Homaie Rad, E., Hosseini, S.M., Hu, G., Igumbor, E.U., Ilesanmi, O.S., Irvani, S.S.N., Islam, S.M.S., Jakovljevic, M., Javanbakht, M., Jha, R.P., Jobanputra, Y.B., Jonas, J.B., Józwiak, J.J., Jürisson, M., Kahsay, A., Kalani, R., Kalkonde, Y., Kamil, T.A., Kanchan, T., Karami, M., Karch, A., Karimi, N., Kasaeian, A., Kassa, T.D., Kassa, Z.Y., Kaul, A., Kefale, A.T., Keiyyoro, P.N., Khader, Y.S., Khafaie, M.A., Khalil, I.A., Khan, E.A., Khang, Y.H., Khazaie, H., Kiadaliri, A.A., Kiirithio, D.N., Kim, A.S., Kim, D., Kim, Y.E., Kim, Y.J., Kisa, A., Kokubo, Y., Koyanagi, A., Krishnamurthi, R. V., Kuate Defo, B., Kucuk Bicer, B., Kumar, M., Lacey, B., Lafranconi, A., Lansingh, V.C., Latifi, A., Leshargie, C.T., Li, S., Liao, Y., Linn, S., Lo, W.D., Lopez, J.C.F., Lorkowski, S., Lotufo, P.A., Lucas, R.M., Lunevicius, R., Mackay, M.T., Mahotra, N.B., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Manafi, N., Mansournia, M.A., Mantovani, L.G., März, W., Mashamba-Thompson, T.P., Massenburg, B.B., Mate, K.K.V., McAlinden, C., McGrath, J.J., Mehta, V., Meier, T., Meles, H.G., Melese, A., Memiah, P.T.N., Memish, Z.A., Mendoza, W., Mengistu, D.T., Mengistu, G., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mestrovic, T., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Miller, T.R., Mini, G.K., Mirrahimov, E.M., Moazen, B., Mohajer, B., Mohammad Gholi Mezerji, N., Mohammadi, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Mohammadibakhsh, R., Mohammadnia-Afrouzi, M., Mohammed, S., Mohebi, F., Mokdad, A.H., Monasta, L., Mondello, S., Moodley, Y., Moosazadeh, M., Moradi, G., Moradi-Lakeh, M., Moradinazar, M., Moraga, P., Moreno Velásquez, I., Morrison, S.D., Mousavi, S.M., Muhammed, O.S., Muruet, W., Musa, K.I., Mustafa, G., Naderi, M., Nagel, G., Naheed, A., Naik, G., Najafi, F., Nangia, V., Nego, I., Nego, R.I., Newton, C.R.J., Ngunjiri, J.W., Nguyen, C.T., Nguyen, L.H., Ningrum, D.N.A., Nirayo, Y.L., Nixon, M.R., Norrving, B., Noubiap, J.J., Nourollahpour Shiadeh, M., Nyasulu, P.S., Ogbo, F.A., Oh, I.H., Olagunju, A.T., Olagunju, T.O., Olivares, P.R., Onwujekwe, O.E., Oren, E., Owolabi, M.O., A, M.P., Pakpour, A.H., Pan, W.H., Panda-Jonas, S., Pandian, J.D., Patel, S.K., Pereira, D.M., Petzold, M., Pillay, J.D., Piradov, M.A., Polanczyk, G. V., Polinder, S., Postma, M.J., Poulton, R., Poustchi, H., Prakash, S., Prakash, V., Qorbani, M., Radfar, A., Rafay, A., Rafiei, A., Rahim, F., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M.H.U., Rahman, M.A., Rajati, F., Ram, U., Ranta, A., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Reinig, N., Reis, C., Renzaho, A.M.N., Resnikoff, S., Rezaeian, S., Rezai, M.S., Rios González, C.M., Roberts, N.L.S., Roeber, L., Ronfani, L., Roro, E.M., Roshandel, G., Rostami, A., Sabbagh, P., Sacco, R.L., Sachdev, P.S., Saddik, B., Safari, H., Safari-Faramani, R., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahathevan, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Salamati, P., Salehi Zahabi, S., Salimi, Y., Samy, A.M., Sanabria, J., Santos, I.S., Santric Milicevic, M.M., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarvi, S., Sathian, B., Satpathy, M., Sawant, A.R., Sawhney, M., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schwebel, D.C., Seedat, S., Sepanlou, S.G., Shabaninejad, H., Shafieesabet, A., Shaikh, M.A., Shakir, R.A., Shams-Beyranvand, M., Shamsizadeh, M., Sharif, M., Sharif-Alhoseini, M., She, J., Sheikh, A., Sheth, K.N., Shigematsu, M., Shiri, R., Shirkoobi, R., Shiue, I., Siabani, S., Siddiqi, T.J., Sigfusdottir, I.D., Sigurvinsdottir, R., Silberberg, D.H., Silva, J.P., Silveira, D.G.A., Singh, J.A., Sinha, D.N., Skiadaresi, E., Smith, M., Sobaih, B.H., Sobhani, S., Soofi, M., Soyiri, I.N., Sposato, L.A., Stein, D.J., Stein, M.B., Stokes, M.A., Sufiyan, M.B., Sykes, B.L., Sylaja, P., Tabarés-Seisdedos, R., Te Ao, B.J., Tehrani-Banihashemi, A., Temsah, M.H., Temsah, O., Thakur, J.S., Thrift, A.G., Topor-Madry, R., Tortajada-Girbés, M., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Tran, K.B., Truelsen, T.C., Tsadik, A.G., Tudor Car, L., Ukwaja, K.N., Ullah, I., Usman, M.S., Uthman, O.A., Valdez, P.R., Vasankari, T.J., Vasanthan, R., Veisani, Y., Venketasubramanian, N., Violante, F.S., Vlassov, V., Vosoughi, K., Vu, G.T., Vujcic, I.S., Wagniew, F.S., Waheed, Y., Wang, Y.P., Weiderpass, E., Weiss, J., Whiteford, H.A., Wijeratne, T., Winkler, A.S., Wiysonge, C.S., Wolfe, C.D.A., Xu, G., Yadollahpour, A., Yamada, T., Yano, Y., Yaseri, M., Yatsuya, H., Yimer, E.M.,

- Yip, P., Yisma, E., Yonemoto, N., Yousefifard, M., Yu, C., Zaidi, Z., Zaman, S. Bin, Zamani, M., Zandian, H., Zare, Z., Zhang, Y., Zodpey, S., Naghavi, M., Murray, C.J.L., & Vos, T. (2019) Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*, **18**, 459–480.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 752–757.
- Feng, G., Zhang, Z., Bao, Q., Zhang, Z., Zhou, L., Jiang, J., & Li, S. (2014) Protective Effect of Chinonin in MPTP-Induced C57BL/6 Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biol Pharm Bull*, **37**, 1301–1307.
- Ferguson, L.B., Roberts, A.J., Mayfield, R.D., & Messing, R.O. (2022) Blood and brain gene expression signatures of chronic intermittent ethanol consumption in mice. *PLoS Comput Biol*, **18**.
- Ferrandez, A.-M. & Blin, O. (1991) A comparison between the effect of intentional modulations and the action of L-Dopa on gait in Parkinson's disease, Behavioural Brain Research.
- Ferrario, J.E., Taravini, I.R.E., Mourlevat, S., Stefano, A., Delfino, M.A., Raisman-Vozari, R., Murer, M.G., Ruberg, M., & Gershanik, O. (2004) Differential gene expression induced by chronic levodopa treatment in the striatum of rats with lesions of the nigrostriatal system. *J Neurochem*, **90**, 1348–1358.
- Ferro, M.M., Bellissimo, M.I., Anselmo-Franci, J.A., Angellucci, M.E.M., Canteras, N.S., & da Cunha, C. (2005) Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*, **148**, 78–87.
- Fifel, K. & Cooper, H.M. (2014) Loss of dopamine disrupts circadian rhythms in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **71**, 359–369.
- Flowers, K.A., Pearce, I., & Pearcet, J. (1984) Recognition memory in Parkinson's disease, Neurosurgery, and Psychiatry.
- Forno, L.S. & Norville, R.L. (1976) Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta Neuropathol*, **34**, 183–197.
- Fortuna, J.T.S., Gralle, M., Beckman, D., Neves, F.S., Diniz, L.P., Frost, P.S., Barros-Aragão, F., Santos, L.E., Gonçalves, R.A., Romão, L., Zamberlan, D.C., Soares, F.A.A., Braga, C., Foguel, D., Gomes, F.C.A., De Felice, F.G., Ferreira, S.T., Clarke, J.R., & Figueiredo, C.P. (2017) Brain infusion of α -synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. *Behavioural Brain Research*, **333**, 150–160.
- Friard, O. & Gamba, M. (2016) BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol Evol*, **7**, 1325–1330.
- Friederich, A., Flinspach, A., Suenkel, U., Eschweiler, G.W., Greulich, K., Maetzler, W., Berg, D., & Heinzel, S. (2019) Prodromal features of Parkinson's disease: Self-reported symptoms versus clinically assessed signs. *Movement Disorders*, **34**, 144–146.
- Fronczek, R., Overeem, S., Lee, S.Y.Y., Hegeman, I.M., van Pelt, J., van Duinen, S.G., Lammers, G.J., & Swaab, D.F. (2007) Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease. *Brain*, **130**, 1577–1585.
- Galter, D., Pernold, K., Yoshitake, T., Lindqvist, E., Hoffer, B., Kehr, J., Larsson, N.G., & Olson, L. (2010) MitoPark mice mirror the slow progression of key symptoms and L-DOPA response in Parkinson's disease. *Genes Brain Behav*, **9**, 173–181.
- Gellhaar, S., Marcellino, D., Abrams, M.B., & Galter, D. (2015) Chronic L-DOPA induces hyperactivity, normalization of gait and dyskinetic behavior in MitoPark mice. *Genes Brain Behav*, **14**, 260–270.
- Gibb, W.R. & Lees, A.J. (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **51**, 745–752.
- Glasl, L., Kloos, K., Giesert, F., Roethig, A., di Benedetto, B., Kühn, R., Zhang, J., Hafen, U., Zerle, J., Hofmann, A., Hrabé de Angelis, M., Winkhofer, K.F., Hölter, S.M., Vogt Weisenhorn, D.M., & Wurst, W. (2012) Pink1-deficiency in mice impairs gait, olfaction and serotonergic innervation of the olfactory bulb. *Exp Neurol*, **235**, 214–227.

- Goetz, C.G., Poewe, W., Rascol, O., Sampaio, C., Stebbins, G.T., Counsell, C., Giladi, N., Holloway, R.G., Moore, C.G., Wenning, G.K., Yahr, M.D., & Seidl, L. (2004) Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. *Movement Disorders*, **19**, 1020–1028.
- Goetz, C.G., Tilley, B.C., Shaftman, S.R., Stebbins, G.T., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stern, M.B., Dodel, R., Dubois, B., Holloway, R., Jankovic, J., Kulisevsky, J., Lang, A.E., Lees, A., Leurgans, S., LeWitt, P.A., Nyenhuis, D., Olanow, C.W., Rascol, O., Schrag, A., Teresi, J.A., van Hilten, J.J., LaPelle, N., Agarwal, P., Athar, S., Bordelan, Y., Bronte-Stewart, H.M., Camicioli, R., Chou, K., Cole, W., Dalvi, A., Delgado, H., Diamond, A., Dick, J.P., Duda, J., Elble, R.J., Evans, C., Evidente, V.G., Fernandez, H.H., Fox, S., Friedman, J.H., Fross, R.D., Gallagher, D., Goetz, C.G., Hall, D., Hermanowicz, N., Hinson, V., Horn, S., Hurtig, H., Kang, U.J., Kleiner-Fisman, G., Klepitskaya, O., Kompoliti, K., Lai, E.C., Leehey, M.L., Leroi, I., Lyons, K.E., McClain, T., Metzger, S.W., Miyasaki, J., Morgan, J.C., Nance, M., Nemeth, J., Pahwa, R., Parashos, S.A., Schneider, J.S., Sethi, K., Shulman, L.M., Siderowf, A., Silverdale, M., Simuni, T., Stacy, M., Stern, M.B., Stewart, R.M., Sullivan, K., Swope, D.M., Wadia, P.M., Walker, R.W., Walker, R., Weiner, W.J., Wiener, J., Wilkinson, J., Wojcieszek, J.M., Wolfrath, S., Wooten, F., Wu, A., Zesiewicz, T.A., & Zweig, R.M. (2008) Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Movement Disorders*, **23**, 2129–2170.
- Gorostidi, A., Bergareche, A., Ruiz-Martínez, J., Martí-Massó, J.F., Cruz, M., Varghese, S., Qureshi, M.M., Alzahmi, F., Al-Hayani, A., de Munáin, A.L., & El-Agnaf, O.M.A. (2012) α -Synuclein Levels in Blood Plasma from LRRK2 Mutation Carriers. *PLoS One*, **7**.
- Gorwood, P. (2008) Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci*, **10**, 291–299.
- Gould, T.D. (2009) *Springer Protocols Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests*.
- Graef, S., Biele, G., Krüge, L.K., Marzinzik, F., Wahl, M., Wotka, J., Klostermann, F., & Heekeren, H.R. (2010) Differential influence of levodopa on reward-based learning in Parkinson's disease. *Front Hum Neurosci*, **4**.
- Grosch, J., Winkler, J., & Kohl, Z. (2016) Early degeneration of both dopaminergic and serotonergic axons – a common mechanism in parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, **10**.
- Grospe, G.M., Baker, P.M., & Ragozzino, M.E. (2018) Cognitive Flexibility Deficits Following 6-OHDA Lesions of the Rat Dorsomedial Striatum. *Neuroscience*, **374**, 80–90.
- Grotemeyer, A., McFleder, R.L., Wu, J., Wischhusen, J., & Ip, C.W. (2022) Neuroinflammation in Parkinson's Disease – Putative Pathomechanisms and Targets for Disease-Modification. *Front Immunol*.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., & Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, **265**, 103–106.
- Haaxma, C.A., Bloem, B.R., Borm, G.F., Oyen, W.J.G., Leenders, K.L., Eshuis, S., Booij, J., Dluzen, D.E., & Horstink, M.W.I.M. (2007) Gender differences in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **78**, 819–824.
- Haehner, A., Boesveldt, S., Berendse, H.W., Mackay-Sim, A., Fleischmann, J., Silburn, P.A., Johnston, A.N., Mellick, G.D., Herting, B., Reichmann, H., & Hummel, T. (2009) Prevalence of smell loss in Parkinson's disease - A multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord*, **15**, 490–494.
- Halliday, G., Herrero, M.T., Murphy, K., McCann, H., Ros-Bernal, F., Barcia, C., Mori, H., Blesa, F.J., & Obeso, J.A. (2009) No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP parkinsonism. *Movement Disorders*, **24**, 1519–1523.
- Hawkes, C.H. (2008) The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: Does it exist and if so how long is it? *Movement Disorders*.
- Hawkes, C.H., del Tredici, K., & Braak, H. (2010) A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*.
- Heiman, M., Heilbut, A., Francardo, V., Kulicke, R., Fenster, R.J., Kolaczyk, E.D., Mesirov, J.P., Surmeier, D.J., Cenci, M.A., & Greengard, P. (2014) Molecular adaptations of striatal spiny

- projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 4578–4583.
- Hely, M.A., Morris, J.G.L., Reid, W.G.J., & Trafficante, R. (2005) Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: Non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Movement Disorders*, **20**, 190–199.
- Henchcliffe, C. (2014) Blood and cerebrospinal fluid markers in Parkinson's disease: current biomarker findings. *Curr Biomark Find*, **1**.
- Higginson, I.J., Gao, W., Saleem, T.Z., Chaudhuri, K.R., Burman, R., McCrone, P., & Leigh, P.N. (2012) Symptoms and Quality of Life in Late Stage Parkinson Syndromes: A Longitudinal Community Study of Predictive Factors. *PLoS One*, **7**.
- Hoehn, M.M. & Yahr, M.D. (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, **17**, 427–442.
- Höllerhage, M. (2019) Secondary parkinsonism due to drugs, vascular lesions, tumors, trauma, and other insults. *Int Rev Neurobiol*, **149**, 377–418.
- Horita, H., Wada, K., Rivas, M. v., Hara, E., & Jarvis, E.D. (2010) The *dusp1* immediate early gene is regulated by natural stimuli predominantly in sensory input neurons. *Journal of Comparative Neurology*, **518**, 2873–2901.
- Hornykiewicz, O. & Ehringer, H. (1960) Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr*, **38**, 1236–1239.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., & Bohr, V.A. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, **15**, 565–581.
- Hsia, A.Y., Vincent, J.D., & Lledo, P.M. (1999) Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, **82**, 1082–1085.
- Hu, D., Liu, Z., & Qi, X. (2021) UPRmt activation protects against MPP+-induced toxicity in a cell culture model of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **569**, 17–22.
- Huang, J., Liu, L., Qin, L., Huang, H., & Li, X. (2022) Single-Cell Transcriptomics Uncovers Cellular Heterogeneity, Mechanisms, and Therapeutic Targets for Parkinson's Disease. *Front Genet*, **13**.
- Hudson, J.L., van Horne, C.G., Strömberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B.J., & Gerhardt, G.A. (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*, **626**, 167–174.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., & Lees, A.J. (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **55**, 181–184.
- Huisman, E., Uylings, H.B.M., & Hoogland, P. v. (2004) A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in parkinson's disease. *Movement Disorders*, **19**, 687–692.
- Ilkiw, J.L., Kmita, L.C., Targa, A.D.S., Nosedá, A.C.D., Rodrigues, L.S., Dorieux, F.W.C., Fagotti, J., dos Santos, P., & Lima, M.M.S. (2019) Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, **56**, 1082–1095.
- Isella, V., Iurlaro, S., Piolti, R., Ferrarese, C., Frattola, L., & Appollonio, I. (2003) Physical anhedonia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **74**, 1308–1311.
- Iturria-Medina, Y., Khan, A.F., Adewale, Q., & Shirazi, A.H. (2020) Blood and brain gene expression trajectories mirror neuropathology and clinical deterioration in neurodegeneration. *Brain*, **143**, 661–673.
- Jabłońska, J., Szumiec, Ł., Zieliński, P., & Rodríguez Parkitna, J. (2021) Time elapsed between choices in a probabilistic task correlates with repeating the same decision. *European Journal of Neuroscience*, **53**, 2639–2654.
- Janickova, H., Rosborough, K., Al-Onaizi, M., Kljakic, O., Guzman, M.S., Gros, R., Prado, M.A.M., & Prado, V.F. (2017) Deletion of the vesicular acetylcholine transporter from pedunculopontine/laterodorsal tegmental neurons modifies gait. *J Neurochem*, **140**, 787–798.

- Jankovic, J., McDermott, M., Carter, J., Gauthier, S., Goetz, C., Golbe, L., Huber, S., Koller, W., Olanow, C., & Shoulson, I. (1990) Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology*, **40**, 1529–1534.
- Jauregi, A., Kessler, K., & Hassel, S. (2018) Linking cognitive measures of response inhibition and reward sensitivity to trait impulsivity. *Front Psychol*, **9**.
- Jethva, P.N., Kardani, J.R., & Roy, I. (2011) Modulation of α -synuclein aggregation by dopamine in the presence of MPTP and its metabolite. *FEBS Journal*, **278**, 1688–1698.
- Jin, X., Li, J., Li, W., Wang, X., Du, C., Geng, Z., Geng, Y., Kang, L., Zhang, X., Wang, M., & Tian, S. (2020) Weighted gene co-expression network analysis reveals specific modules and biomarkers in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **728**.
- Johnson, M.E., Bergkvist, L., Mercado, G., Stetzk, L., Meyerdirk, L., Wolfrum, E., Madaj, Z., Brundin, P., & Wesson, D.W. (2020) Deficits in olfactory sensitivity in a mouse model of Parkinson's disease revealed by plethysmography of odor-evoked sniffing. *Sci Rep*, **10**.
- Kalia, L. v. & Lang, A.E. (2015) Parkinson's disease. *The Lancet*,.
- Kamath, T., Abdurauof, A., Burris, S.J., Langlieb, J., Gazestani, V., Nadaf, N.M., Balderrama, K., Vanderburg, C., & Macosko, E.Z. (2022) Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **25**, 588–595.
- Kamińska, K., Lenda, T., Konieczny, J., Czarnecka, A., & Lorenc-Koci, E. (2017) Depressive-like neurochemical and behavioral markers of Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle. *Pharmacological Reports*, **69**, 985–994.
- Kanazawa, T., Uchihara, T., Takahashi, A., Nakamura, A., Orimo, S., & Mizusawa, H. (2008) Three-layered structure shared between Lewy bodies and Lewy neurites - Three-dimensional reconstruction of triple-labeled sections. *Brain Pathology*, **18**, 415–422.
- Kao, C.Y., Xu, M., Wang, L., Lin, S.C., Lee, H.J., Duraine, L., Bellen, H.J., Goldstein, D.S., Tsai, S.Y., & Tsai, M.J. (2020) Elevated COUP-TFII expression in dopaminergic neurons accelerates the progression of Parkinson's disease through mitochondrial dysfunction. *PLoS Genet*, **16**.
- Kapogiannis, D., Mooshagian, E., Campion, P., Grafman, J., Zimmermann, T.J., Ladit, K.C., & Wassermann, E.M. (2011) Reward processing abnormalities in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, **26**, 1451–1457.
- Kashihara, K., Ishihara, T., Akiyama, K., Kuroda, S., Morimasa, T., & Shomori, T. (1995) Levodopa induces AP-1 and CREB DNA-binding activities in the rat striatum, Psychiatry and Clinical Neurosciences.
- Kasten, M. & Klein, C. (2013) The many faces of alpha-synuclein mutations. *Movement Disorders*, **28**, 697–701.
- Kaufer, D.I., Cummings, J.L., Ketchel, P., Vanessa Smith Audrey MacMillan, Me., Timothy Shelley, C., Oscar Lopez, M.L., & DeKosky, S.T. (2000) Validation of the NPI-Q, a Brief Clinical Form of the Neuropsychiatric Inventory, The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.
- Kaufmann, M., Schaupp, A.L., Sun, R., Coscia, F., Dendrou, C.A., Cortes, A., Kaur, G., Evans, H.G., Mollbrink, A., Navarro, J.F., Sonner, J.K., Mayer, C., DeLuca, G.C., Lundberg, J., Matthews, P.M., Attfield, K.E., Friese, M.A., Mann, M., & Fugger, L. (2022) Identification of early neurodegenerative pathways in progressive multiple sclerosis. *Nat Neurosci*, **25**, 944–955.
- Keener, A.M. & Bordelon, Y.M. (2016) Parkinsonism. *Semin Neurol*, **36**, 330–334.
- Kehagia, A.A., Robbins FRS, T.W., Robbins, T.W., Kehagia, A.A., & Barker, R.A. (2010) Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **9**, 1200–1213.
- Kim, C.Y. & Alcalay, R.N. (2017) Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol*,.
- Kim, S., Jeon, B.S., Heo, C., Im, P.S., Ahn, T., Seo, J., Kim, H., Park, C.H., Choi, S.H., Cho, S., Lee, W.J., & Suh, Y. (2004) α -Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocytes in Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, **18**, 1615–1617.

- Kimura, H., Kurimura, M., Wada, M., Kawanami, T., Kurita, K., Suzuki, Y., Katagiri, T., Daimon, M., Kayama, T., & Kato, T. (2002) Female preponderance of Parkinson's disease in Japan. *Neuroepidemiology*, **21**, 292–296.
- Kiryk, A., Mochol, G., Filipkowski, R.K., Wawrzyniak, M., Lioudyno, V., Knapska, E., Gorkiewicz, T., Balcerzyk, M., Leski, S., Leuven, F. van, Lipp, H.-P., Wojcik, D.K., & Kaczmarek, L. (2011) Cognitive Abilities of Alzheimer's Disease Transgenic Mice are Modulated by Social Context and Circadian Rhythm. *Curr Alzheimer Res*, **8**, 883–892.
- Kistner, A., Lhommée, E., & Krack, P. (2014) Mechanisms of body weight fluctuations in Parkinson's disease. *Front Neurol*, **5**, 1–15.
- Kloos, A.D., Fisher, L.C., Detloff, M.R., Hassenzahl, D.L., & Basso, D.M. (2005) Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, **191**, 251–265.
- Konradi, C., Westin, J.E., Carta, M., Eaton, M.E., Kuter, K., Dekundy, A., Lundblad, M., & Cenci, M.A. (2004) Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*, **17**, 219–236.
- Koprach, J.B., Kalia, L. v., & Brotchie, J.M. (2017) Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat Rev Neurosci*, **18**, 515–529.
- Korb, E. & Finkbeiner, S. (2011) Arc in synaptic plasticity: From gene to behavior. *Trends Neurosci*, **34**, 591–598.
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., & Bartus, R.T. (2013) Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*, **136**, 2419–2431.
- Kordys, E., Apetz, N., Schneider, K., Duncan, E., Büschbell, B., Rohleder, C., Sué, M., Drzezga, A., Neumaier, B., Timmermann, L., & Endepols, H. (2017) Motor impairment and compensation in a hemiparkinsonian rat model: correlation between dopamine depletion severity, cerebral metabolism and gait patterns. *EJNMMI Res*, **7**.
- Kowall, N.W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., McKee, A.C., & Ferrante, R.J. (2000) MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*, **11**, 211–213.
- Kranz, G.S., Kasper, S., & Lanzenberger, R. (2010) Reward and the serotonergic system. *Neuroscience*, **166**, 1023–1035.
- Kreiner, G. (2015) Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: Are the mice better than humans? *Front Cell Neurosci*, **9**, 1–6.
- Kreiner, G., Rafa-Zabłocka, K., Barut, J., Chmielarz, P., Kot, M., Bagińska, M., Parlato, R., Daniel, W.A., & Nalepa, I. (2019) Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. *Sci Rep*, **9**, 1–9.
- Kuleshov, M. v., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., McDermott, M.G., Monteiro, C.D., Gundersen, G.W., & Maayan, A. (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*, **44**, W90–W97.
- Kurihara, K., Nakagawa, R., Ishido, M., Yoshinaga, Y., Watanabe, J., Hayashi, Y., Mishima, T., Fujioka, S., & Tsuboi, Y. (2020) Impact of motor and nonmotor symptoms in Parkinson disease for the quality of life: The Japanese Quality-of-Life Survey of Parkinson Disease (JAQPAD) study. *J Neurol Sci*, **419**, 117172.
- Kurtenbach, S., Wewering, S., Hatt, H., Neuhaus, E.M., & Lübbert, H. (2013) Olfaction in three genetic and two MPTP-induced Parkinson's disease mouse models. *PLoS One*, **8**.
- Lammel, S., Lim, B.K., & Malenka, R.C. (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, **76**, 351–359.
- Langfelder, P. & Horvath, S. (2008) WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, **9**.

- Langston, J.W., Forno, L.S., Rebert, C.S., & Irwin, I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res*, **292**, 390–394.
- Lanoue, A.C., Blatt, G.J., & Soghomonian, J.J. (2013) Decreased parvalbumin mRNA expression in dorsolateral prefrontal cortex in Parkinson's disease. *Brain Res*, **1531**, 37–47.
- Lau, B., Welter, M.-L., Belaid, H., Fernandez Vidal, S., Bardinet, E., Grabli, D., & Karachi, C. (2015) The integrative role of the pedunculopontine nucleus in human gait. *Brain*, **138**, 1284–1296.
- Laubach, M., Amarante, L.M., Swanson, K., & White, S.R. (2018) What, if anything, is rodent prefrontal cortex? *eNeuro*, **5**.
- Lazarus, J.-A.C. & Stelmach, G.E. (1992) Interlimb Coordination in Parkinson's Disease, Movement Disorders.
- Lee, P.H., Lee, G., Park, H.J., Bang, O.Y., Joo, I.S., & Huh, K. (2006) The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm*, **113**, 1435–1439.
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013) Object recognition test in mice. *Nat Protoc*, **8**, 2531–2537.
- Lemke, M.R., Brecht, H.M., Koester, J., Kraus, P.H., & Reichmann, H. (2005) Anhedonia, depression, and motor functioning in Parkinson's disease during treatment with pramipexole. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **17**, 214–220.
- Leverenz, J.B., Umar, I., Wang, Q., Montine, T.J., McMillan, P.J., Tsuang, D.W., Jin, J., Pan, C., Shin, J., Zhu, D., & Zhang, J. (2007) Proteomic identification of novel proteins in cortical Lewy bodies. *Brain Pathology*, **17**, 139–145.
- Li, S.Y., Wang, Y.L., Liu, W.W., Lyu, D.J., Wang, F., Mao, C.J., Yang, Y.P., Hu, L.F., & Liu, C.F. (2017) Long-term levodopa treatment accelerates the circadian rhythm dysfunction in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, **130**, 1085–1092.
- Li, X., Redus, L., Chen, C., Martinez, P.A., Strong, R., Li, S., & O'Connor, J.C. (2013) Cognitive Dysfunction Precedes the Onset of Motor Symptoms in the MitoPark Mouse Model of Parkinson's Disease. *PLoS One*, **8**.
- Lin, Q., Ding, H., Zheng, Z., Gu, Z., Ma, J., Chen, L., Chan, P., & Cai, Y. (2012) Promoter methylation analysis of seven clock genes in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **507**, 147–150.
- Liu, H.F., Ho, P.W.L., Leung, G.C.T., Lam, C.S.C., Pang, S.Y.Y., Li, L., Kung, M.H.W., Ramsden, D.B., & Ho, S.L. (2017) Combined LRRK2 mutation, aging and chronic low dose oral rotenone as a model of Parkinson's disease. *Sci Rep*, **7**, 1–15.
- Liu, Z. & Chu, G. (2013) Chronobiology in mammalian health. *Mol Biol Rep*, **40**, 2491–2501.
- Loas, G., Krystkowiak, P., & Godefroy, O. (2012) Anhedonia in Parkinson's disease: an overview. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **24**, 444–451.
- Locascio, J.J., Eberly, S., Liao, Z., Liu, G., Hoising, A.N., Duong, K., Trisini-Lipsanopoulos, A., Dhima, K., Hung, A.Y., Flaherty, A.W., Schwarzschild, M.A., Hayes, M.T., Wills, A.M., Shivraj Sohur, U., Mejia, N.I., Selkoe, D.J., Oakes, D., Shoulson, I., Dong, X., Marek, K., Zheng, B., Iverson, A., Hyman, B.T., Growdon, J.H., Sudarsky, L.R., Schlossmacher, M.G., Ravina, B., & Scherzer, C.R. (2015) Association between α -synuclein blood transcripts and early, neuroimaging-supported Parkinson's disease. *Brain*, **138**, 2659–2671.
- Lofrumento, D.D., Saponaro, C., Cianciulli, A., de Nuccio, F., Mitolo, V., Nicolardi, G., & Panaro, M.A. (2010) MPTP-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. *Neuroimmunomodulation*, **18**, 79–88.
- Loiodice, S., Wing Young, H., Rion, B., Méot, B., Montagne, P., Denibaud, A.S., Viel, R., & Drieu La Rochelle, C. (2019) Implication of nigral dopaminergic lesion and repeated L-dopa exposure in neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, **360**, 120–127.
- Lu, Y., Zhang, X., Zhao, L., Yang, C., Pan, L., Li, C., Liu, K., Bai, G., Gao, H., & Yan, Z. (2018) Metabolic disturbances in the striatum and substantia nigra in the onset and progression of MPTP-induced Parkinsonism model. *Front Neurosci*, **12**, 1–10.

- Maetzler, W., Liepelt, I., & Berg, D. (2009) Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol*,.
- Magen, I. & Chesselet, M.F. (2010) *Genetic Mouse Models of Parkinson's Disease. The State of the Art*, Progress in Brain Research. Elsevier B.V.
- Mahlknecht, P., Seppi, K., & Poewe, W. (2015) The concept of prodromal Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*,.
- Maniatis, S., Äijö, T., Vickovic, S., Braine, C., Kang, K., Mollbrink, A., Fagegaltier, D., Andrusivová, Ž., Saarenpää, S., Saiz-Castro, G., Cuevas, M., Watters, A., Lundeberg, J., Bonneau, R., Phatnani, H., & Zuckerman Mind Brain Behavior, M.B. (2019) Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science (1979)*, **364**, 89–93.
- Marin, R.S., Biedrzycki, R.C., & Firinciogullari, S. (1991) Reliability and validity of the Apathy Evaluation Scale. *Psychiatry Res*, **38**, 143–162.
- Marini, P., Ramat, S., Ginestroni, A., & Paganini, M. (2003) Deficit of short-term memory in newly diagnosed untreated parkinsonian patients: Reversal after L-dopa therapy. *Neurological Sciences*, **24**, 184–185.
- Marotta, N., Kim, S., & Krainc, D. (2020) Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, **15**, 427–441.
- Marsal-García, L., Urbizu, A., Arnaldo, L., Campdelacreu, J., Vilas, D., Ispuerto, L., Gascón-Bayarri, J., Reñé, R., Álvarez, R., & Beyer, K. (2021) Expression levels of an alpha-synuclein transcript in blood may distinguish between early dementia with lewy bodies and parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, **22**, 1–15.
- Masini, D., Plewnia, C., Bertho, M., Scalbert, N., Caggiano, V., & Fisone, G. (2021) A guide to the generation of a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease for the study of non-motor symptoms. *Biomedicines*, **9**.
- Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A.M., Ramet, L., Fahmy, A.M., Ducrot, C., Laplante, A., Bourque, M.J., Zhu, L., Cayrol, R., le Campion, A., McBride, H.M., Gruenheid, S., Trudeau, L.E., & Desjardins, M. (2019) Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1 $-/-$ mice. *Nature*, **571**, 565–569.
- Maynard, K.R., Collado-Torres, L., Weber, L.M., Uytingco, C., Barry, B.K., Williams, S.R., Catallini, J.L., Tran, M.N., Besich, Z., Tippani, M., Chew, J., Yin, Y., Kleinman, J.E., Hyde, T.M., Rao, N., Hicks, S.C., Martinowich, K., & Jaffe, A.E. (2021) Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, **24**, 425–436.
- Mazzoni, P., Shabbott, B., & Cortés, J.C. (2012) Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, 1–17.
- McDowell, K. & Chesselet, M.F. (2012) Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **46**, 597–606.
- Mehanna, R. & Jankovic, J. (2019) Young-onset Parkinson's disease: Its unique features and their impact on quality of life. *Parkinsonism Relat Disord*,.
- Meles, S.K., Oertel, W.H., & Leenders, K.L. (2021) Circuit imaging biomarkers in preclinical and prodromal Parkinson's disease. *Molecular Medicine*,.
- Meredith, G.E. & Rademacher, D.J. (2011) MPTP mouse models of Parkinson's disease: An update. *J Parkinsons Dis*, **1**, 19–33.
- Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., & Zomerdijs, J.C.B.M. (2001) hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO Journal*, **20**, 1373–1382.
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016) Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front Mol Neurosci*, **8**.
- Mirelman, A., Bonato, P., Camicioli, R., Ellis, T.D., Giladi, N., Hamilton, J.L., Hass, C.J., Hausdorff, J.M., Pelosin, E., & Almeida, Q.J. (2019) Gait impairments in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*,.

- Molnar, G., Crozat, A., & Pardee, A.B. (1994) The Immediate-Early Gene Egr-1 Regulates the Activity of the Thymidine Kinase Promoter at the Go-to-G1 Transition of the Cell Cycle, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- Morelli, M., Cozzolino, A., Pinna, A., Fenu, S., Carta, A., Chiara, G. di, & Morelli, M. (1993) L-Dopa stimulates c-fos expression in dopamine denervated striatum by combined activation of D-1 and D-2 receptors, *Brain Research*.
- Mu, J., Chaudhuri, K.R., Bielza, C., de Pedro-Cuesta, J., Larrañaga, P., & Martinez-Martin, P. (2017) Parkinson's disease subtypes identified from cluster analysis of motor and non-motor symptoms. *Front Aging Neurosci*, **9**, 1–10.
- Mustafa, R., Rawas, C., Mannal, N., Kreiner, G., Spittau, B., Kamińska, K., Yilmaz, R., Pötschke, C., Kirsch, J., Liss, B., Tucker, K.L., & Parlato, R. (2021) Targeted ablation of primary cilia in differentiated dopaminergic neurons reduces striatal dopamine and responsiveness to metabolic stress. *Antioxidants*, **10**.
- Muthane, B., Swam, H.S., Satishchandra, P., Subhash, S.N., Rao, B.S., & Subbakrishna, % (1994) Early Onset Parkinson's Disease: Are Juvenile-and Young-Onset Different? *Movement Disorders*, **9**, 539–544.
- Nazmuddin, M., van Dalen, J.W., Borra, R.J.H., Stormezand, G.N., van der Horn, H.J., van der Zee, S., Boertien, J., & van Laar, T. (2021) Postural and gait symptoms in de novo Parkinson's disease patients correlate with cholinergic white matter pathology. *Parkinsonism Relat Disord*, **93**, 43–49.
- Nieuwboer, A., de Weerd, W., Dom, R., Peeraer, L., Lesaffre, E., Hilde, F., & Baunach, B. (1999) Plantar force distribution in Parkinsonian gait: a comparison between patients and age-matched control subjects. *Scand J Rehabil Med*, **31**, 185–192.
- Norbury, A. & Husain, M. (2015) Sensation-seeking: Dopaminergic modulation and risk for psychopathology. *Behavioural Brain Research*, **288**, 79–93.
- Olsen, C.M. & Winder, D.G. (2009) Operant sensation seeking engages similar neural substrates to operant drug seeking in C57 mice. *Neuropsychopharmacology*, **34**, 1685–1694.
- Opris, I., Nestianu, V.S., Nestianu, A., Bilteanu, L., & Ciurea, J. (2017) George Marinesco in the constellation of modern neuroscience. *Front Neurosci*, **11**, 1–11.
- Orcioli-Silva, D., Vitória, R., Nóbrega-Sousa, P., da Conceição, N.R., Beretta, V.S., Lirani-Silva, E., & Gobbi, L.T.B. (2020) Levodopa Facilitates Prefrontal Cortex Activation During Dual Task Walking in Parkinson Disease. *Neurorehabil Neural Repair*, **34**, 589–599.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2022) Dopamine activity on the perceptual salience for recognition memory. *Front Behav Neurosci*,.
- Ou, Z., Pan, J., Tang, S., Duan, D., Yu, D., Nong, H., & Wang, Z. (2021) Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Front Public Health*, **9**, 776847.
- Pålhagen, S.E., Lorefält, B., Carlsson, M., Ganowiak, W., Toss, G., Unosson, M., & Granérus, A.K. (2005) Does L-dopa treatment contribute to reduction in body weight in elderly patients with Parkinson's disease? *Acta Neurol Scand*, **111**, 12–20.
- Pan, T., Xie, W., Jankovic, J., & Le, W. (2005) Biological effects of pramipexole on dopaminergic neuron-associated genes: Relevance to neuroprotection. *Neurosci Lett*, **377**, 106–109.
- Pang, S.Y.Y., Ho, P.W.L., Liu, H.F., Leung, C.T., Li, L., Chang, E.E.S., Ramsden, D.B., & Ho, S.L. (2019) The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*,.
- Papp, M., Willner, P., & Muscat, R. (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*, **104**, 255–259.
- Parent, M. & Parent, A. (2010) Substantia nigra and Parkinson's disease: A brief history of their long and intimate relationship. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, **37**, 313–319.

- Park, J., Lim, C.S., Seo, H., Park, C.A., Zhuo, M., Kaang, B.K., & Lee, K. (2015) Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Mol Pain*, **11**, 1–12.
- Parkinson, J. (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*, Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. Sherwood, Neely and Jones, London.
- Paxinos, G. & Franklin, K.B. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edi. edn. Academic Press.
- Pelto-Huikko, M., Dagerlind, A., Kononen, J., Lundberg, J.M., Villar, M., Koistinaho, J., Bravo, R., & Hlikfelt, T. (1995) Neuronal Regulation of C-fos, C-jun, and junB Immediate-Early Genes in Rat Adrenal Medulla, *The Journal of Neuroscience*.
- Penedo, M.A., Rivera-Baltanás, T., Pérez-Rodríguez, D., Allen, J., Borrajo, A., Alonso-Crespo, D., Fernández-Pereira, C., Nieto-Araujo, M., Ramos-García, S., Barreiro-Villar, C., Caruncho, H.J., Olivares, J.M., & Agís-Balboa, R.C. (2021) The role of dopamine receptors in lymphocytes and their changes in schizophrenia. *Brain Behav Immun Health*.
- Peterson, D.A., Elliott, C., Song, D.D., Makeig, S., Sejnowski, T.J., & Poizner, H. (2009) Probabilistic reversal learning is impaired in Parkinson's disease. *Neuroscience*, **163**, 1092–1101.
- Peto, V., Jenkinson, C., & Fitzpatrick, R. (1998) PDQ-39: a review of the development, validation and application of a Parkinson's disease quality of life questionnaire and its associated measures. *J Neurol*, **245 Suppl 1**, S10-4.
- Peto, V., Jenkinson, C., Fitzpatrick, R., & Greenhall, R. (1995) The development and validation of a short measure of functioning and well being for individuals with Parkinson's disease. *Qual Life Res*, **4**, 241–248.
- Pickel, V.M., Joh, T.H., Field, P.M., Becker, C.G., & Reis, D.J. (1975) Cellular localization of tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **23**, 1–12.
- Pinto, M., Nissanka, N., Peralta, S., Brambilla, R., Diaz, F., & Moraes, C.T. (2016) Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. *Mol Neurodegener*, **11**, 1–15.
- Pitzer, C., Kurpiers, B., & Eltokhi, A. (2021) Gait performance of adolescent mice assessed by the CatWalk XT depends on age, strain and sex and correlates with speed and body weight. *Sci Rep*, **11**.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., di Iorio, G., Golbe, L.I., & Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* (1979), **276**, 2045–2047.
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., Mas, N., Hofeneder, D., Brücke, T., Bayés, A., Wenzel, K., Infante, J., Zach, H., Pirker, W., Posada, I.J., Álvarez, R., Ispuerto, L., de Fàbregues, O., Callén, A., Palasí, A., Aguilar, M., Martí, M.J., Valldeoriola, F., Salamero, M., Poewe, W., & Tolosa, E. (2015) The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease (the onset pd study). *Movement Disorders*, **30**, 229–237.
- Poonja, S., Miyasaki, J., Fu, X., Camicioli, R., Sang, T., Yuan, Y., & Ba, F. (2021) The Trajectory of Motor Deterioration to Death in Parkinson's Disease. *Front Neurol*, **12**.
- Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B.R., Adler, C.H., & Deuschl, G. (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, **30**, 1591–1601.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T.D.L. (2014) The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, **29**, 1583–1590.
- Radlicka, A., Kamińska, K., Borczyk, M., Piechota, M., Korostyński, M., Pera, J., Lorenc-Koci, E., & Parkitna, J.R. (2021) Effects of l-dopa on gene expression in the frontal cortex of rats with unilateral lesions of midbrain dopaminergic neurons. *eNeuro*, **8**, 1–13.

- Raket, L.L., Oudin Åström, D., Norlin, J.M., Kellerborg, K., Martinez-Martin, P., & Odin, P. (2022) Impact of age at onset on symptom profiles, treatment characteristics and health-related quality of life in Parkinson's disease. *Sci Rep*, **12**, 1–13.
- Ray Dorsey, E., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J.C., Ansha, M.G., Brayne, C., Choi, J.Y.J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H.P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S.M., Foreman, K.J., Gankpe, F.G., Gupta, R., Hankey, G.J., Hay, S.I., Hegazy, M.I., Hibstu, D.T., Kasaeian, A., Khader, Y., Khalil, I., Khang, Y.H., Kim, Y.J., Kokubo, Y., Logroscino, G., Massano, J., Ibrahim, N.M., Mohammed, M.A., Mohammadi, A., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Nguyen, B.T., Nirayo, Y.L., Ogbo, F.A., Owolabi, M.O., Pereira, D.M., Postma, M.J., Qorbani, M., Rahman, M.A., Roba, K.T., Safari, H., Safiri, S., Satpathy, M., Sawhney, M., Shafieesabet, A., Shiferaw, M.S., Smith, M., Szoeki, C.E.I., Tabarés-Seisdedos, R., Truong, N.T., Ukwaja, K.N., Venketasubramanian, N., Villafaina, S., Weldegewergs, K.G., Westerman, R., Wijeratne, T., Winkler, A.S., Xuan, B.T., Yonemoto, N., Feigin, V.L., Vos, T., & Murray, C.J.L. (2018) Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*, **17**, 939–953.
- Rehman, R.Z.U., del Din, S., Guan, Y., Yarnall, A.J., Shi, J.Q., & Rochester, L. (2019) Selecting Clinically Relevant Gait Characteristics for Classification of Early Parkinson's Disease: A Comprehensive Machine Learning Approach. *Sci Rep*, **9**, 1–12.
- Rial, D., Castro, A.A., Machado, N., Garção, P., Gonçalves, F.Q., Silva, H.B., Tomé, Â.R., Köfalvi, A., Corti, O., Raisman-Vozari, R., Cunha, R.A., & Prediger, R.D. (2014) Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: Looking for early preclinical features of Parkinson's disease. *PLoS One*, **9**.
- Rieker, C., Engblom, D., Kreiner, G., Domanskyi, A., Schober, A., Stotz, S., Neumann, M., Yuan, X., Grummt, I., Schutz, G., & Parlato, R. (2011) Nucleolar Disruption in Dopaminergic Neurons Leads to Oxidative Damage and Parkinsonism through Repression of Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *Journal of Neuroscience*, **31**, 453–460.
- Rinne, J.O., Anichtchik, O. v., Eriksson, K.S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., Røyttä, M., & Panula, P. (2002) Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem*, **81**, 954–960.
- Rochester, L., Yarnall, A.J., Baker, M.R., David, R. v., Lord, S., Galna, B., & Burn, D.J. (2012) Cholinergic dysfunction contributes to gait disturbance in early Parkinson's disease. *Brain*, **135**, 2779–2788.
- Rodriguez Parkitna, J., Sikora, M., Gołda, S., Gołombiowska, K., Bystrowska, B., Engblom, D., Bilbao, A., & Przewlocki, R. (2013) Novelty-seeking behaviors and the escalation of alcohol drinking after abstinence in mice are controlled by metabotropic glutamate receptor 5 on neurons expressing dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry*, **73**, 263–270.
- Rodriguez-Sanchez, F., Rodriguez-Blazquez, C., Bielza, C., Larrañaga, P., Weintraub, D., Martinez-Martin, P., Rios, A., Schrag, A., & Chaudhuri, K.R. (2021) Identifying Parkinson's disease subtypes with motor and non-motor symptoms via model-based multi-partition clustering. *Sci Rep*, **11**, 1–10.
- Roemmich, R.T., Field, A.M., Elrod, J.M., Stegemöller, E.L., Okun, M.S., & Hass, C.J. (2013) Interlimb coordination is impaired during walking in persons with Parkinson's disease. *Clinical Biomechanics*, **28**, 93–97.
- Roos, D.S., Klein, M., Deeg, D.J.H., Doty, R.L., & Berendse, H.W. (2022) Prevalence of Prodromal Symptoms of Parkinson's Disease in the Late Middle-Aged Population. *J Parkinsons Dis*, **12**, 967–974.
- Ross, G.W., Petrovitch, H., Abbott, R.D., Tanner, C.M., Popper, J., Masaki, K., Launer, L., & White, L.R. (2008) Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **63**, 167–173.
- Rylander, D. (2012) The serotonin system: A potential target for anti-dyskinetic treatments and: Biomarker discovery. *Parkinsonism Relat Disord*, **18**.
- Santiago, J.A. & Potashkin, J.A. (2015) Blood biomarkers associated with cognitive decline in early stage and drug-naïve Parkinson's disease patients. *PLoS One*, **10**.

- Sauer, B. & Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5166–5170.
- Sauerbier, A., Rosa-Grilo, M., Qamar, M.A., & Chaudhuri, K.R. (2017) *Nonmotor Subtyping in Parkinson's Disease*, 1st edn, International Review of Neurobiology. Elsevier Inc.
- Scales, S.J., Hesser, B.A., Masuda, E.S., & Scheller, R.H. (2002) Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 28271–28279.
- Scatron, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B., & Agid, Y. (1983) Reduction of Cortical Dopamine, Noradrenaline, Serotonin and Their Metabolites in Parkinson's Disease, Brain Research.
- Schapira, A.H.V., Chaudhuri, K.R., & Jenner, P. (2017) Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*,.
- Schmitt, I., Kaut, O., Khazneh, H., deBoni, L., Ahmad, A., Berg, D., Klein, C., Fröhlich, H., & Wüllner, U. (2015) L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Movement Disorders*, **30**, 1794–1801.
- Schneider, J.S., Pioli, E.Y., Jianzhong, Y., Li, Q., & Bezard, E. (2013) Levodopa improves motor deficits but can further disrupt cognition in a macaque parkinson model. *Movement Disorders*, **28**, 663–667.
- Sellnow, R.C., Steece-Collier, K., Altwal, F., Sandoval, I.M., Kordower, J.H., Collier, T.J., Sortwell, C.E., West, A.R., & Manfredsson, F.P. (2020) Striatal NurR1 facilitates the dyskinetic state and exacerbates levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, **40**, 3675–3691.
- Sethi, K. (2008) Levodopa unresponsive symptoms in Parkinson disease. *Movement Disorders*, **23**, 521–533.
- Shahmoradian, S.H., Lewis, A.J., Genoud, C., Hensch, J., Moors, T.E., Navarro, P.P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K.N., Sütterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A.J.M., Wang, J., Paepe, A. de, Erny, J., Staempfli, A., Hoernschemeyer, J., Großerüschkamp, F., Niedieker, D., El-Mashtoly, S.F., Quadri, M., van IJcken, W.F.J., Bonifati, V., Gerwert, K., Bohrmann, B., Frank, S., Britschgi, M., Stahlberg, H., van de Berg, W.D.J., & Lauer, M.E. (2019) Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci*, **22**, 1099–1109.
- Shen, Y., Hu, J., Chen, Y., Liu, W., Li, Y., Yan, L., Xie, C., Zhang, W., Yu, M., & Liu, W. (2020) Levodopa Changes Functional Connectivity Patterns in Subregions of the Primary Motor Cortex in Patients With Parkinson's Disease. *Front Neurosci*, **14**.
- Shi, M., Zabetian, C.P., Hancock, A.M., Ghingina, C., Hong, Z., Yearout, D., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Leverenz, J.B., & Zhang, J. (2010) Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **480**, 78–82.
- Shimozawa, A., Fujita, Y., Kondo, H., Takimoto, Y., Terada, M., Sanagi, M., Hisanaga, S.I., & Hasegawa, M. (2019) Effect of l-dopa/benserazide on propagation of pathological α -synuclein. *Front Neurosci*, **13**.
- Shuang, " ", Ma, Y., Roytta, M., Rinne, J.O., Collan, Y., & Rinne, U.K. (1997) Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts, Journal of Neurological Sciences.
- Sikora, M., Skupio, U., Jastrzebska, K., Rodriguez Parkitna, J., & Przewlocki, R. (2019) Antagonism of μ -opioid receptors reduces sensation seeking-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, **359**, 498–501.
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A.R. (2007) The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, **11**, 151–167.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994) Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, **61**, 59–64.
- Sitte, H.H., Piffl, C., Rajput, A.H., Hörtnagl, H., Tong, J., Lloyd, G.K., Kish, S.J., & Hornykiewicz, O. (2017) Dopamine and noradrenaline, but not serotonin, in the human claustrum are greatly reduced in

- patients with Parkinson's disease: possible functional implications. *European Journal of Neuroscience*, **45**, 192–197.
- Smith, L.M., Parr-Brownlie, L.C., Duncan, E.J., Black, M.A., Gemmell, N.J., Dearden, P.K., & Reynolds, J.N.J. (2016) Striatal mRNA expression patterns underlying peak dose L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA hemiparkinsonian rat. *Neuroscience*, **324**, 238–251.
- Soghomonian, J.J. (2006) L-DOPA-induced dyskinesia in adult rats with a unilateral 6-OHDA lesion of dopamine neurons is paralleled by increased c-fos gene expression in the subthalamic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, **23**, 2395–2403.
- Solly, S.K., Thomas, J.L., Monge, M., Demerens, C., Lubetzki, C., Gardinier, M. v, Matthieu, J.M., & Zalc, B. (1996) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia*, **18**, 39–48.
- Son, M., Han, S.H., Lyoo, C.H., Lim, J.A., Jeon, J., Hong, K.B., & Park, H. (2021) The effect of levodopa on bilateral coordination and gait asymmetry in Parkinson's disease using inertial sensor. *NPJ Parkinsons Dis*, **7**.
- Soreq, L., Salomonis, N., Bronstein, M., Greenberg, D.S., Israel, Z., Bergman, H., & Soreq, H. (2013) Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced and splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front Mol Neurosci*,.
- Spielberger, C.D., Gorsuch, R.L., Lushene, R., Vagg, P.R., & Jacobs, G.A. (1983) Manual for the State-Trait Anxiety Inven-tory: STAI (Form Y).
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839–840.
- Stern, M.B., Lang, A., & Poewe, W. (2012) Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Movement Disorders*,.
- Stuart, S., Morris, R., Giritharan, A., Quinn, J., Nutt, J.G., & Mancini, M. (2020) Prefrontal Cortex Activity and Gait in Parkinson's Disease With Cholinergic and Dopaminergic Therapy. *Movement Disorders*, **35**, 2019–2027.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., & Satija, R. (2019) Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, **177**, 1888–1902.e21.
- Sullivan, P.F., Fan, C., & Perou, C.M. (2006) Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics*, **141 B**, 261–268.
- Svenningsson, P., Gunne, L., & Andren, P.E. (2000) L-DOPA produces strong induction of c-fos messenger RNA in dopamine-denervated cortical and striatal areas of the common marmoset. *Neuroscience*, **99**, 457–468.
- Szczypka, M.S., Rainey, M.A., Kim, D.S., Alaynick, W.A., Marck, B.T., Matsumoto, A.M., & Palmiter, R.D. (1999) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12138–12143.
- Taravini, I.R., Larramendy, C., Gomez, G., Saborido, M.D., Spaans, F., Fresno, C., González, G.A., Fernández, E., Murer, M.G., & Gershanik, O.S. (2016) Contrasting gene expression patterns induced by levodopa and pramipexole treatments in the rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, **101**, 576–589.
- The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) (2020) GBD 2019 Cause and Risk Summary: [Level 3 cause/Parkinson's disease]. Seattle, USA.
- Thenganatt, M.A. & Jankovic, J. (2014) Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol*, **71**, 499–504.
- Tieu, K. (2011) A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**, a009316–a009316.
- Timmer, M.H.M., Sescousse, G., van der Schaaf, M.E., Esselink, R.A.J., & Cools, R. (2017) Reward learning deficits in Parkinson's disease depend on depression. *Psychol Med*, **47**, 2302–2311.
- Timotius, I.K., Canneva, F., Minakaki, G., Mocerì, S., Plank, A.C., Casadei, N., Riess, O., Winkler, J., Klucken, J., Eskofier, B., & von Hörsten, S. (2019) Systematic data analysis and data mining in

- CatWalk gait analysis by heat mapping exemplified in rodent models for neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods*, **326**, 108367.
- Tomlinson, C.L., Stowe, R., Patel, S., Rick, C., Gray, R., & Clarke, C.E. (2010) Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, **25**, 2649–2653.
- Tran, J., Anastacio, H., & Bardy, C. (2020) Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis.*
- Trietiakow, K. (1919) *Contribution à l'étude de l'anatomie Pathologique Du Locus Niger de Soemmering Avec Quelques Deductions Relatives a La Pathogenie Des Troubles Du Tonus Musculaire et de La Maladie de Parkinson*. Jouve, Paris.
- Tsang, A.R., Rajakumar, N., & Jog, M.S. (2019) Botulinum toxin A injection into the entopeduncular nucleus improves dynamic locomotory parameters in hemiparkinsonian rats. *PLoS One*, **14**, e0223450.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., & Tonegawa, S. (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, **87**, 1317–1326.
- Ungerstedt, U. (1968) 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. *Eur J Pharmacol*, **5**, 107–110.
- Ungerstedt, U. (1971) Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour. *Acta Physiol Scand*, **82**, 49–68.
- Vandeputte, C., Taymans, J.M., Casteels, C., Coun, F., Ni, Y., van Laere, K., & Baekelandt, V. (2010) Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci*, **11**.
- Vardi, J., Oberman, Z., Rabey, I., Streifler, M., Ayalon, D., & Herzberg, M. (1976) Weight loss in patients treated long-term with levodopa. Metabolic aspects. *J Neurol Sci*, **30**, 33–40.
- Verhave, P.S., Jongsma, M.J., van den Berg, R.M., Vis, J.C., Vanwersch, R.A.P., Smit, A.B., van Someren, E.J.W., & Philippens, I.H.C.H.M. (2011) REM sleep behavior disorder in the marmoset MPTP model of early Parkinson disease. *Sleep*, **34**, 1119–1125.
- Verschuere, S.M., Swinnen, S.P., Dom, R., & de Weerd, W. (1997) Interlimb coordination in patients with Parkinson's disease: motor learning deficits and the importance of augmented information feedback. *Exp Brain Res*, **113**, 497–508.
- Verschuur, C.V.M., Suwijn, S.R., Boel, J.A., Post, B., Bloem, B.R., van Hilten, J.J., van Laar, T., Tissingh, G., Munt, A.G., Deuschl, G., Lang, A.E., Dijkgraaf, M.G.W., de Haan, R.J., & de Bie, R.M.A. (2019) Randomized Delayed-Start Trial of Levodopa in Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, **380**, 315–324.
- Vlamings, R., Visser-Vandewalle, V., Koopmans, G., Joosten, E.A.J., Kozan, R., Kaplan, S., Steinbusch, H.W.M., & Temel, Y. (2007) High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves speed of locomotion but impairs forelimb movement in Parkinsonian rats. *Neuroscience*, **148**, 815–823.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., & Baler, R.D. (2011) Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends Cogn Sci*, **15**, 37–46.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Maynard, L., Jayne, M., Fowler, J.S., Zhu, W., Logan, J., John Gatley, S., Ding, Y.S., Wong, C., & Pappas, N. (2003) Brain dopamine is associated with eating behaviors in humans. *International Journal of Eating Disorders*, **33**, 136–142.
- Wang, Q., Zhang, Z., Li, L., Wen, H., & Xu, Q. (2014) Assessment of cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: Prevalence and risk factors. *Clin Interv Aging*, **9**, 275–281.
- Wang, X.H., Lu, G., Hu, X., Tsang, K.S., Kwong, W.H., Wu, F.X., Meng, H.W., Jiang, S., Liu, S.W., Ng, H.K., & Poon, W.S. (2012) Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci*.
- Wang, Y., Chen, X., Wang, Y., Li, S., Cai, H., & Le, W. (2021) The essential role of transcription factor Pitx3 in preventing mesodiencephalic dopaminergic neurodegeneration and maintaining neuronal subtype identities during aging. *Cell Death Dis*, **12**, 1–11.

- Weintraub, D. & Nirenberg, M.J. (2012) Impulse control and related disorders in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, **11**, 63–71.
- Wen, P., Li, M., Xiao, H., Ding, R., Chen, H., Chang, J., Zhou, M., Yang, Y., Wang, J., Zheng, W., & Zhang, W. (2015) Low-frequency stimulation of the pedunculopontine nucleus affects gait and the neurotransmitter level in the ventrolateral thalamic nucleus in 6-OHDA Parkinsonian rats. *Neurosci Lett*, **600**, 62–68.
- Wenning, G.K., Scherfler, C., Granata, R., Bösch, S., Verny, M., Chaudhuri, K.R., Jellinger, K., Poewe, W., & Litvan, I. (1999) Time course of symptomatic orthostatic hypotension and urinary incontinence in patients with postmortem confirmed parkinsonian syndromes: A clinicopathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **67**, 620–623.
- Westin, J.E., Janssen, M.L.F., Sager, T.N., & Temel, Y. (2012) Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. *Behavioural Brain Research*, **226**, 519–528.
- Wieber, K., Fleige, L., Tsiami, S., Reinders, J., Braun, J., Baraliakos, X., & Capellino, S. (2022) Dopamine receptor 1 expressing B cells exert a proinflammatory role in female patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep*, **12**.
- Wilson, J., Alcock, L., Yarnall, A.J., Lord, S., Lawson, R.A., Morris, R., Taylor, J.P., Burn, D.J., Rochester, L., & Galna, B. (2020) Gait Progression Over 6 Years in Parkinson's Disease: Effects of Age, Medication, and Pathology. *Front Aging Neurosci*, **12**, 1–13.
- Wilson, J.A. & Smith, R.G. (1989) The prevalence and aetiology of long-term L-dopa side-effects in elderly parkinsonian patients. *Age Ageing*, **18**, 11–16.
- Winogrodzka, A., Wagenaar, R.C., Booij, J., & Wolters, E.C. (2005) Rigidity and bradykinesia reduce interlimb coordination in Parkinsonian gait. *Arch Phys Med Rehabil*, **86**, 183–189.
- Wolters, E.C. & Braak, H. (2006) Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm*, **70**, 309–319.
- Wrześniewski, K., Sosnowski, T., & Matusik, D. (2002) Inwentarz Stanu i Cechy Lęku STAI. Polska adaptacja STAI.
- Wysokiński, A., Kozłowska, E., Szczepocka, E., Łucka, A., Agier, J., Brzezińska-Błaszczuk, E., & Sobierajska, K. (2021) Expression of Dopamine D1–4 and Serotonin 5-HT1A-3A Receptors in Blood Mononuclear Cells in Schizophrenia. *Front Psychiatry*, **12**.
- Xiao, H., Li, M., Cai, J., Li, N., Zhou, M., Wen, P., Xie, Z., Wang, Q., Chang, J., & Zhang, W. (2017) Selective cholinergic depletion of pedunculopontine tegmental nucleus aggravates freezing of gait in parkinsonian rats. *Neurosci Lett*, **659**, 92–98.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G.J.M. (2017) The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*, **12**, 1–11.
- Xiong, Y. & Yu, J. (2018) Modeling Parkinson's disease in Drosophila: What have we learned for dominant traits? *Front Neurol*, **9**.
- Yang, M. & Crawley, J.N. (2009) Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*, 1–12.
- Yang, S., Wan, Y., Wu, N., Song, L., Liu, Z., Zhao, J., Liu, Y., Liu, Z., & Gan, J. (2021) L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Recovers Circadian Rhythm Disturbances in the Rat Models of Parkinson's Disease by Regulating the D1R-ERK1/2-mTOR Pathway. *Front Aging Neurosci*, **13**.
- You, H., Mariani, L.L., Mangone, G., le Febvre de Nailly, D., Charbonnier-Beaupel, F., & Corvol, J.C. (2018) Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*.
- Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., & Grummt, I. (2002) Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAFI subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep*, **3**, 1082–1087.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Gröne, H.J., Schütz, G., & Grummt, I. (2005) Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, **19**, 77–87.

- Zhang, W., Sun, C., Shao, Y., Zhou, Z., Hou, Y., & Li, A. (2019) Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Sci Rep*, **9**.
- Zhang, X., Song, D., Gu, L., Ren, Y., Verkhatsky, A., & Peng, L. (2015) Decrease of gene expression of astrocytic 5-HT_{2B} receptors parallels development of depressive phenotype in a mouse model of Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, **9**.
- Zheng, Z.V., Cheung, C.Y., Lyu, H., Chan, H.Y., Li, Y., Bian, Z.X., Wang, K.K.W., & Poon, W.S. (2019) Baicalein enhances the effect of low dose Levodopa on the gait deficits and protects dopaminergic neurons in experimental Parkinsonism. *Journal of Clinical Neuroscience*, **64**, 242–251.
- Zhou, C., Guo, T., Bai, X., Wu, J.J., Gao, T., Guan, X., Liu, X., Gu, L., Huang, P., Xuan, M., Gu, Q., Xu, X., Zhang, B., & Zhang, M. (2021) Locus coeruleus degeneration is associated with disorganized functional topology in Parkinson's disease. *Neuroimage Clin*, **32**.
- Zhou, M., Zhang, W., Chang, J., Wang, J., Zheng, W., Yang, Y., Wen, P., Li, M., & Xiao, H. (2015) Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **584**, 184–189.

WYKAZ SKRÓTÓW

ACAd – przednia część kory zakrętu obręczy – część grzbietowa

ACB – jądro półleżące przegrody

ACBc – jądro półleżące przegrody – część środkowa

ACBsh – jądro półleżące przegrody – część przysiódkowa

aco – spoidło przednie

AES – Skala Oceny Apatii

Ald – agranularna kora wyspy – część grzbietowa

Alv – agranularna kora wyspy – część brzuszna

ANOVA – analiza wariancji

cDNA – komplementarny DNA

CLA – przedmurze

CP – prążkowie grzbietowe (jądro ogoniaste + skorupa)

CTX – kora mózgu

DAT – transporter dopaminy

ec – torebka zewnętrzna

EPd – jądro śródgruszkowe – część grzbietowa

fa – spoidło wielkie – kleszcze przednie

gl – warstwa kłębuszkowa głównej opuszki węchowej
GO – ontologia genów
GU – kora smakowa
H&E – hematoksylina i eozyna
ILA – kora śródlimbiczna
isl – wyspy Calleji
L-DOPA – L-3,4-dihydroksyfenyloalanina, lewodopa
LED – ekwiwalent dawki L-DOPA
LF – lewa przednia łapa myszy
LH – lewa tylna łapa myszy
lot – droga węchowa boczna,
LSr – jądro boczne przegrody – część dziobowa
LTR – długie powtórzenia terminalne
MAPK – kinazy aktywowane mitogenami
MIBG – meta-jodobenzyloguanidyna, 3-jodobenzyloguanidyna
MoCA – Montrealska skala oceny funkcji poznawczych
MOp – pierwszorzędowa kora ruchowa
MOs – dodatkowa kora ruchowa
MPTP – 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
NDB – jądra prążka przekątnego
NET – transporter noradrenaliny
NMSS – Skala oceny pozaruchowych objawów choroby Parkinsona
NPI-Q – Inwentarz-Kwestionariusz Neuropsychiatryczny
OT – guzek węchowy
PBS – roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej
PBST – roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej z dodatkiem Tritonu X-100
PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy
PD – choroba Parkinsona
PIGD – postać choroby Parkinsona z dominującymi zaburzeniami postawy i chodu
PIR – kora gruszkowata
PL – kora przedlimbiczna
qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RBD – zaburzenia zachowania podczas snu REM
RF – prawa przednia łapa myszy
RH – prawa tylna łapa myszy

SEM – standardowy błąd pomiaru

SH – (septohippocampal nucleus) jądro przegrodowo-hipokampalne

SI – istota bezimienna,

SNC – istota czarna – część zbita

SPECT – tomografia emisyjna pojedynczych fotonów

SSp – pierwszorzędowa kora somatosensoryczna

STAI – Inwentarz Stany i Cechy Lęku (X1: lęk-stan, X2: lęk-cecha)

Tg – transgen

TH – hydroksylaza tyrozynowa

Ttd – (taenia tecta, dorsal part) prążek podłużny boczny – część grzbietowa

UMI – unikatowy molekularny identyfikator

UPDRS – Ujednolicona Skala do Oceny Choroby Parkinsona

VL – komora boczna mózgu

VTA – pole brzuszne nakrywki

SPIS RYCIN

Rycina 1. Wybrane elementy obrazu klinicznego i zmiany anatomopatologiczne powstające w przebiegu choroby Parkinsona. _____	13
Rycina 2. Schemat procesów prowadzących do indukowanej śmierci neuronów DAT+ u myszy TIF-IA ^{DATCreERT2} . _____	29
Rycina 3. Schemat doświadczeń behawioralnych wykonywanych z wykorzystaniem myszy TIF-IA ^{DATCreERT2} . _____	31
Rycina 4. Zdjęcia obrazujące działanie systemu CatWalk XT. _____	33
Rycina 5. Zdjęcia wybranych testów behawioralnych przeprowadzanych na myszach TIF-IA ^{DATCreERT2} . _____	34
Rycina 6. Schemat przeprowadzenia testu probabilistycznego przeuczania w klatkach IntelliCage. _____	37
Rycina 7. Schematyczne przedstawienie głównych etapów metodyki Visium użytej do profilowania przestrzennego ekspresji genów myszy z doświadczenia II. _____	42
Rycina 8. Schemat kolorystyczny stosowany na wykresach jako reprezentacja poszczególnych kohort i grup doświadczalnych. _____	56
Rycina 9. Obrazy mikroskopowe przedstawiające wyniki barwienia immunofluorescencyjnego skrawków mózgowia myszy TIF-IA ^{DATCreERT2} z doświadczenia I na obecność hydroksylazy tyrozynowej w celu weryfikacji efektów mutacji. _____	57
Rycina 10. Obrazy mikroskopowe przedstawiające sygnał immunofluorescencji pochodzący od hydroksylazy tyrozynowej (TH) i DAPI w przodomózgowiu myszy TIF-IA ^{DATCreERT2} z doświadczenia II wykonane w celu weryfikacji efektów mutacji. _____	60
Rycina 11. Wyniki pomiarów masy ciała samców myszy z doświadczenia I. _____	60
Rycina 12. Wyniki pomiarów masy ciała samic myszy z doświadczenia I. _____	61

Rycina 13. Wyniki pomiarów masy ciała samców myszy z doświadczenia II. _____	62
Rycina 14. Wybrane parametry chodu samic myszy z doświadczenia I zmierzone w systemie CatWalk.. _____	67
Rycina 15. Wybrane parametry chodu samców myszy z doświadczenia I zmierzone w systemie CatWalk. _____	70
Rycina 16. Wybrane parametry chodu samców myszy z doświadczenia II zmierzone w systemie CatWalk. _____	74
Rycina 17. Wynik testu pręta obrotowego przeprowadzonego na samcach z doświadczenia II w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu. _____	76
Rycina 18. Wyniki przeprowadzenia testu otwartego na samcach z doświadczenia II. _____	77
Rycina 19. Wyniki przeprowadzenia testu badającego instrumentalne poszukiwanie wrażeń u samców z doświadczenia I. _____	79
Rycina 20. Wyniki przeprowadzenia testu badającego instrumentalne poszukiwanie wrażeń u samców z doświadczenia II. _____	80
Rycina 21. Wynik przeprowadzenia testu rozpoznawania nowego obiektu na samcach z doświadczenia II. _____	83
Rycina 22. Wyniki przeprowadzenia testów znajdowania zakopanego jedzenia oraz preferencji sacharyny na samcach z doświadczenia I. _____	85
Rycina 23. Wyniki badania zachowania samic z doświadczenia I w teście probabilistycznego przeuczania przeprowadzanym w zautomatyzowanych klatkach IntelliCage. _____	88
Rycina 24. Liczba punktów przypisanych do poszczególnych klastrów w 12 skrawkach łącznie na podstawie podobieństwa ich profili transkrypcyjnych w wyniku przeprowadzenia analizy skupień. _____	96
Rycina 25. Rozmieszczenie punktów przypisanych do poszczególnych klastrów oraz jego zgodność z anatomią przodomózgowia myszy. _____	97
Rycina 26. Przedstawienie podobieństwa profili transkrypcyjnych punktów zaklasyfikowanych do poszczególnych klastrów na wykresach UMAP. _____	100
Rycina 27. Wyniki profilowania przestrzennego ekspresji genów pod wpływem L-DOPA u mutantów TIF-IA ^{DATCreERT2} z doświadczenia II. _____	101
Rycina 28. Poziom ekspresji wybranych genów, których poziom ekspresji uległ zmianie po podaniach L-DOPA u myszy TIF-IA ^{DATCreERT2} pokazany na reprezentatywnych skrawkach z obu porównywanych grup wraz z zaznaczeniem na schemacie klastrów, w których zaobserwowano statystycznie istotne różnice. _____	106
Rycina 29. Wykres korelacji między liczbą punktów uzyskiwanych przez pacjentów w poszczególnych testach, dawką przyjmowanych leków oraz wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby.. _____	110
Rycina 30. Względny poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona przy odstawieniu leków przeciwparkinsonowskich („OFF”) i podczas ich przyjmowania („ON”) uzyskany metodą qPCR. _____	113

SPIS TABEL

Tabela 1. Spis materiałów i odczynników wykorzystanych w doświadczeniach przedstawionych w rozprawie. _____	26
Tabela 2. Liczebności myszy wykorzystanych w doświadczeniach. _____	32
Tabela 3. Zakresy dni zawartych w poszczególnych przedziałach w teście probabilistycznego przeuczania. _____	49
Tabela 4. Charakterystyka grupy badanych pacjentów (N = 13). _____	51
Tabela 5. Testy kwestionariuszowe użyte do oceny funkcji ruchowych i pozaruchowych u pacjentów. _____	52
Tabela 6. Charakterystyka sond molekularnych TaqMan użytych do oceny ilościowej poziomu ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona. _____	54
Tabela 7. Opis wybranych elementów etapów chodu i przykładowe parametry mierzone przez system CatWalk. _____	64
Tabela 8. Parametry chodu samic z doświadczenia I, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA. _____	66
Tabela 9. Parametry chodu samców z doświadczenia I, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA. _____	69
Tabela 10. Parametry chodu samców z doświadczenia II, na które istotny wpływ miała mutacja i/lub jej interakcja z L-DOPA albo jej interakcja z czasem, jaki minął od podań tamoksyfenu, lub też sama L-DOPA. _____	71
Tabela 11. Podsumowanie wyników badań behawioralnych wykonanych na myszach TIF-IA ^{DATCreERT2} . _____	91
Tabela 12. Parametry cDNA i bibliotek uzyskanych z doświadczenia II. _____	94
Tabela 13. Wyniki analizy wzbogacenia listy genów regulowanych przez L-DOPA w kategorii ontologii genów GO. _____	104
Tabela 14. Wpływ przyjmowania leczenia na liczbę punktów uzyskiwanych przez pacjentów w badaniach kwestionariuszowych _____	109
Tabela 15. Znamienne korelacje między liczbą punktów uzyskiwanych w poszczególnych testach kwestionariuszowych. _____	111
Tabela 16. Wyniki analizy statystycznej porównania poziomu ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów z PD po odstawieniu leków oddziałujących na przekąźnictwo dopaminergiczne („OFF”) oraz podczas przyjmowania ich („ON”). _____	114