

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana O. Radovanović

ZNAČAJ PARVALBUMINSKIH INTERNEURONA
I SINAPTIČKE REORGANIZACIJE
HIPOKAMPUSA I RETIKULO-TALAMIČKOG
JEDRA U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA
PARKINSONOVE BOLESTI

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana O. Radovanović

THE ROLE OF PARVALBUMIN-EXPRESSING
INTERNEURONS AND SYNAPTIC
REORGANIZATION IN THE HIPPOCAMPUS
AND RETICULO-THALAMIC NUCLEUS IN
EXPERIMENTAL MODELS OF PARKINSON'S
DISEASE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

Dr Jelena Petrović, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Dr Marija Adžić Bukvić, viši naučni saradnik
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Jasna Šaponjić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Dr Sanja Dacić, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Željko Pavković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na Odeljenju za neurobiologiju u okviru laboratorije za neurobiologiju spavanja u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja“ (projekat OI 173022) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i u okviru plana rada Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, a na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO uz finansijsku podršku Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija (451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007, 451-03-136/2025-03/200007).

Upotreba životinja i ekperimentalni protokol ove doktorske disertacije odobreni su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (odobrenje broj: 01-1926 od 18.11.2021.) po rešenju Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (rešenje broj: 323-07-10509/2020-05/1 od 13.10.2020.) i u skladu sa Evropskom direktivom o zaštiti životinja koje se koriste u ekperimentalne i druge naučne svrhe (Direktiva 2010/63/EU).

~ Zahvalnica ~

Veliko hvala mojoj mentorki **dr Jeleni Petrović** na strpljenju, podršci i izuzetnoj sposobnosti da veruje u ovaj rad čak i kada sam ja ozbiljno sumnjala u sve, uključujući i sopstveni izbor karijere. Neprocenjivo je imati nekoga ko sa vama uzvikne „KOPNO“ i onda kada pred sobom vidite samo vodu.

Dr Jasni Šaponjić hvala na postavljanju i negovanju visokih standarda, istrajnosti i doslednosti, koji su me podstakli da svaki rezultat preispitam još jednom (i još nekoliko puta). Iako je taj proces često bio izazovan, nesumnjivo je doprineo kvalitetu ovog rada i razvoju radnih navika koje ću dugo pamtiti i primenjivati.

Dr Pavlu Andusu, redovnom profesoru u penziji, hvala za sve smernice i podršku tokom ovog značajnog akademskog puta.

Dr Mariji Adžić-Bukvić, dr Sanji Dacić i dr Željku Pavkoviću zahvaljujem na pažljivom pregledu ove doktorske disertacije, korisnim savetima i sugestijama koje su značajno unapredile njen kvalitet.

Zahvalna sam i svojim eksperimentalnim životinjama koje su, iako nesvesne svog doprinosa nauci, značajno učestvovala u nastanku ove disertacije.

Dr Jeleni Perišić, životnom lektoru, prijatelju, nepresušnom izvoru podrške i mojoj lisici, hvala na stručnoj pomoći, savetima i beskrajnom strpljenju kako tokom čitavog života, tako i tokom izrade ove doktorske disertacije. Ti nisi lisica slična stotinama drugih – ti si moja lisica.

Koleginici Katarini Hočevar hvala što je bila moj kritičar i drag prijatelj, na podršci i svakodnevnim razgovorima. Zajedno smo rasli i napredovali kao pravi mutualistički partneri.

Hvala i svim mojim prijateljima i kolegama, čija podrška, druženje i razmena ideja učinili ovaj akademski put bogatijim i prijatnijim.

Mojoj porodici, koja je sa neizmernim strpljenjem, razumevanjem i ljubavlju pratila svaki korak ovog dugog i zahtevnog puta, hvala što ste uvek tu. Neki od njih, nažalost, nisu dočekali dugoiščekivani završetak ovog putovanja, ali njihova podrška, toplina i uspomene zauvek ostaju deo mene. Ovu disertaciju posvećujem upravo njima.

Filipe hvala na izuzetnom strpljenju – nije lako nekog ogrnuti zvezdama ko je živeo u totalnom mraku. **Adi**, moj mali istraživaču, hvala što si pisanje ovog doktorata učinio zabavnijim svojim osmesima, malim nestašlucima i povremenim „pomoćnim intervencijama“ na tastaturi. Bez tebe i tvog tate, ništa od ovoga ne bi imalo isti smisao.

Na kraju, zahvalna sam sebi na upornosti i istrajnosti tokom ovog dugog, ali izuzetno vrednog procesa, čak i u trenucima kada je odustajanje izgledalo primamljivo.

Značaj parvalbuminskih interneurona i sinaptičke reorganizacije hipokampusa i retikulo-talamičkog jedra u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

SAŽETAK

Parkinsonova bolest (PB) predstavlja progresivnu multisistemsku neurodegenerativnu bolest koja, pored motoričkih, obuhvata i brojne nemotoričke simptome, među kojima se posebno izdvajaju poremećaji spavanja i kognitivnih funkcija. Prisustvo nemotoričkih simptoma već u prodromalnoj fazi bolesti ukazuje na složene i još uvek nerazjašnjene mehanizme rane neurodegeneracije, nevezano od degeneracije dopaminergičkog sistema. U cilju boljeg razumevanja multisistemskog karaktera bolesti, posebno uloge GABA-ergičkog neurotransmiterskog sistema, kao i vremenske dinamike ranih patofizioloških procesa, ova doktorska disertacija imala je za predmet da ispita ćelijske (parvalbuminski (PV+) interneuroni) i sinaptičke (MAP2 i PSD-95 proteini) izmene u različitim eksperimentalnim modelima PB za vreme prodromalnih poremećaja spavanja i memorijskih funkcija. Istraživanje je sprovedeno na mužjacima pacova Wistar soja u kojima su selektivnim lezijama dopaminergičkog i/ili holinergičkog sistema indukovane različite neuropatologije PB (holinopatija PB, hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Analiza spavanja obuhvatila je procenu arhitekture i EEG mikrostrukture spavanja, kao i dinamike vretena spavanja. Memorijske funkcije su procenjene testovima prostorne habituacije i prepoznavanja novog objekta. Promene u broju PV+ interneurona i ekspresiji sinaptičkih markera MAP2 i PSD-95 u hipokampusu i retikulo-talamičkom (RT) jedru analizirane su imunohistohemijskim metodama na početku indukovane neuropatologije i tokom njene progresije. Poremećaji spavanja i memorijskih funkcija kao rane nemotoričke manifestacije su prisutne u svim eksperimentalnim modelima PB na početku indukovane neurodegeneracije. U modelu holinopatije PB ove poremećaje paralelno prate dugotrajna destabilizacija sinapsi (smanjenje ekspresije MAP2 proteina) u hipokampusu i smanjena ekscitacija (smanjenje ekspresije PSD-95 proteina) u RT jedru, a tokom dalje progresije neuropatologije i povećanje broja PV+ interneurona hipokampusa. U modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB hronično pojačanu ekscitaciju (povećana ekspresija PSD-95 proteina) u hipokampusu i RT jedru tokom progresije neuropatologije prati smanjenje broja PV+ interneurona i pojačana ekspresija MAP2 u obe strukture. Nasuprot tome, u modelu hemiparkinsonizma nije bilo izmena na ćelijskom i sinaptičkom nivou. Dobijeni rezultati ukazuju da sinaptička reorganizacija predstavlja primarnu posledicu neurodegenerativnih i funkcionalnih izmena u eksperimentalnim modelima PB, dok se izmena broja PV+ interneurona javlja sekundarno kao odgovor na sinaptičku reorganizaciju ili na prodromalne poremećaje spavanja tokom dalje progresije neuropatologije.

Ključne reči: Parkinsonova bolest, neurodegeneracija, GABA parvalbuminski (PV+) interneuroni, sinaptička reorganizacija, MAP2 protein, PSD-95 protein, hipokampus, retikulo-talamičko jedro, poremećaji spavanja, poremećaji memorijskih funkcija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

The role of parvalbumin interneurons and synaptic reorganization in the hippocampus and reticulo-thalamic nucleus in experimental models of Parkinson's disease

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive multisystem neurodegenerative disorder that, in addition to motor symptoms, includes numerous non-motor manifestations, with sleep and cognitive disturbances being particularly prominent. The presence of non-motor symptoms even in the prodromal phase indicates complex and still unresolved mechanisms of early neurodegeneration, independent of dopaminergic system degeneration. To better understand the multisystem nature of the disease, particularly the role of the GABAergic neurotransmitter system and the temporal dynamics of early pathophysiological processes, this doctoral dissertation examined cellular (parvalbumin (PV+) interneurons) and synaptic (MAP2 and PSD-95 proteins) changes in experimental models of PD during prodromal sleep and memory disturbances. The study was conducted on male Wistar rats with selective lesions of the dopaminergic and/or cholinergic systems to induce different PD-related neuropathologies (PD cholinopathy, hemiparkinsonism, and hemiparkinsonism with PD cholinopathy). Sleep analysis included assessment of sleep architecture, EEG microstructure, and sleep spindle dynamics. Memory functions were evaluated using the spatial habituation and novel object recognition tests. Changes in the number of PV+ interneurons and the synaptic markers MAP2 and PSD-95 expression in the hippocampus and reticular thalamic (RT) nucleus were analyzed by immunohistochemical methods at the onset of induced neuropathology and during its progression. Sleep and memory disturbances, as early non-motor manifestations, were present in all experimental PD models at the beginning of induced neurodegeneration. In the PD cholinopathy, these disturbances were accompanied by long-lasting synaptic destabilization (MAP2 suppression) in the hippocampus and reduced excitation (PSD-95 suppression) in the RT nucleus, followed by an increased number of PV+ interneurons during further neuropathology progression. In the hemiparkinsonism with PD cholinopathy, chronic hyperexcitation (PSD-95 overexpression) in the hippocampus and RT nucleus was followed by reduced number of PV+ interneurons and increased MAP2 expression in both structures during neuropathology progression. In contrast, no cellular or synaptic alterations were observed in the hemiparkinsonism model. These results indicate that synaptic reorganization is a primary consequence of neurodegenerative and functional changes in experimental PD models, whereas changes in PV+ interneuron number occur secondarily as a response to synaptic reorganization or to prodromal sleep disturbances during further neuropathology progression.

Keywords: Parkinson's disease, neurodegeneration, GABAergic parvalbumin (PV+) interneurons, synaptic reorganization, MAP2 protein, PSD-95 protein, hippocampus, reticular-thalamic nucleus, sleep disturbances, memory impairments.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Neurobiology

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Parkinsonova bolest	2
1.2	Poremećaji spavanja kao nemotorički simptomi Parkinsonove bolesti	4
1.2.1	Poremećaji ponašanja tokom REM faze spavanja – RBD	6
1.3	Poremećaji kognitivnih funkcija kao nemotorički simptomi PB	7
1.3.1	Poremećaji memorijskih funkcija	8
1.3.2	Hipokampus	9
1.4	Neurotransmitterski sistemi u Parkinsonovoj bolesti.....	13
1.4.1	Holinergički sistem	13
1.4.1.1	PPT jedro.....	14
1.4.2	Dopaminergički sistem	15
1.4.2.1	SN jedro	16
1.4.3	GABA-ergički sistem.....	18
1.4.3.1	Parvalbuminski interneuroni	19
1.5	Retikulo-talamičko jedro.....	20
1.6	Sinapsa i sinaptički proteini	22
1.6.1	Protein 2 povezan sa mikrotubulama	23
1.6.2	Protein postsinaptičke gustine 95.....	24
1.7	Animalni modeli neuropatologije Parkinsonove bolesti	24
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3	MATERIJAL I METODE	29
3.1	Eksperimentalne životinje.....	30
3.2	Eksperimentalne grupe i protokol	30
3.3	Operativna procedura	34
3.3.1	Implantacija EEG i EMG elektroda za hronično registrovanje spavanja	34
3.3.2	Selektivne lezije PPT i SNpc jedara	35
3.4	Procedura registrovanja spavanja.....	36
3.5	Testovi ponašanja.....	36
3.6	Priprema tkiva za histološke analize	40
3.7	Identifikacija i kvantifikacija lezija.....	40
3.7.1	Identifikacija lezije PPT jedra.....	40
3.7.2	Identifikacija lezije SNpc jedra	41
3.7.3	Kvantifikacija lezija	41

3.8	Imunohistohemijsko bojenje GABA-ergičkih PV+ interneurona i sinaptičkih proteina (MAP2 i PSD-95).....	42
3.8.1	Kvantifikacija GABA-ergičkih PV+ interneurona	42
3.9	Analiza spavanja	43
3.9.1	Razdvajanje osnovnih faza spavanja.....	43
3.9.2	Dinamika epizoda spavanja	45
3.9.3	EEG mikrostruktura	45
3.9.4	Dinamika vretena spavanja	45
3.10	Statistička analiza podataka	46
4	REZULTATI	47
4.1	Eksperimentalni modeli Parkinsonove bolesti – histološka identifikacija i kvantifikacija lezija	48
4.1.1	Holinopatija Parkinsonove bolesti	48
4.1.2	Hemiparkinsonizam	49
4.1.3	Hemiparkinsonizam sa holinopatijom Parkinsonove bolesti	50
4.2	Prodromalni poremećaji spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti ..	53
4.2.1	Lokalne izmene u arhitekturi spavanja i dinamici epizoda spavanja.....	53
4.2.2	Lokalne izmene u EEG mikrostrukturi NREM i REM faze spavanja	56
4.2.3	Dinamika vretena spavanja	58
4.3	Ćelijska osnova i sinaptička reorganizacija prodromalnih poremećaja spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti	62
4.3.1	Značaj parvalbuminskih interneurona hipokampusa u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja.....	62
4.3.2	Značaj sinaptičke reorganizacije hipokampusa u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja	67
4.3.3	Značaj parvalbuminskih interneurona i sinaptičke reorganizacije retikulo-talamičkog jedra u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja.....	72
4.4	Poremećaji memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti ..	75
4.4.1	Spontana bazalna lokomotorna aktivnost	75
4.4.2	Poremećaj prostorne hipokampus-zavisne memorije	75
4.4.3	Poremećaj neprostorne hipokampus-zavisne memorije.....	78
4.5	Ćelijska osnova poremećaja memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti.....	83
4.5.1	Značaj parvalbuminskih interneurona hipokampusa u poremećajima memorijskih funkcija	83
4.6	Značaj parvalbuminske ekspresije i sinaptičke reorganizacije hipokampusa i retikulo-talamičkog jedra u progresiji neurodegeneracije.....	87

4.6.1	Holinopatija Parkinsonove bolesti	87
4.6.2	Hemiparkinsonizam	87
4.6.3	Hemiparkinsonizam sa holinopatijom Parkinsonove bolesti	87
5	DISKUSIJA	94
5.1	Prodromalni poremećaji spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti ..	95
5.1.1	Lokalne izmene u arhitekturi spavanja i dinamici epizoda spavanja	96
5.1.2	Lokalne izmene u EEG mikrostrukturi NREM i REM faze spavanja	97
5.1.3	Dinamika vretena spavanja	97
5.2	Poremećaji memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti ..	98
5.2.1	Spontana bazalna lokomotorna aktivnost	98
5.2.2	Poremećaj prostorne hipokampus-zavisne memorije	99
5.2.3	Poremećaj neprostorne hipokampus-zavisne kratkotrajne i dugotrajne memorije	100
5.3	Ćelijska osnova i sinaptička reorganizacija za vreme poremećaja spavanja i memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti	101
5.4	Značaj parvalbuminske ekspresije i sinaptičke reorganizacije hipokampus i retikulo-talamičkog jedra u progresiji neurodegeneracije	104
5.4.1	Holinopatija PB	104
5.4.2	Hemiparkinsonizam	106
5.4.3	Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB	106
6	ZAKLJUČCI	107
7	LITERATURA	111
8	PRILOZI	133
8.1	PRILOG A	134
8.2	PRILOG B	140

LISTA SKRAĆENICA

AB – Alchajmerova bolest;
ACh – acetilholin/holinergički;
alv – lat. *stratum alveus hippocampi*;
AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina;
AMY – amigdala; lat. *corpus amygdaloideum*;
ANS – autonomni nervni sistem;
ARAS – uzlazni retikularni aktivacioni sistem; lat. *formatio reticularis ascendens*;
BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat;
BG – bazalne ganglije; lat. *nuclei basales*;
CA1/2/3/4 – lat. *cornu ammonis*;
cc – lat. *corpus callosum*;
CCK – holecistokinin;
cg – lat. *gyrus cinguli*;
CNS – centralni nervni sistem;
CPGs – centralni lokomotorni generatori; engl. *central pattern generators*;
Cx – lat. *cortex cerebri*;
DA – dopamin/dopaminergički;
DAB – 3,3'-diaminobenzidin;
DG – lat. *gyrus dentatus*;
DLB – demencija sa LB;
DMSO – dimetil sulfoksid;
DR – dorzalno jedro rafe; lat. *nucleus raphe dorsalis*;
EC – entorinalni korteks; lat. *cortex entorhinalis*;
EEG – elektroencefalografija;
E/I – ekcitatorno/inhibitorni;
EKG – elektrokardiografija;
EMG – elektromiografija;
EOG – elektrookulografija;
eml – lat. *lamina medullaris externa*;
fi – lat. *fimbria hippocampi*;
FFT – brza Furijeova transformacija;
FR – lat. *formatio reticularis*;
GABA – gama-aminobuterna kiselina;
GABA_AR – GABA_A jonotropni receptor;
GABA_BR – GABA_B metabotropni receptor;
GABA_CR – GABA_C jonotropni receptor;
GAD-67 – dekarboksilaza glutaminske kiseline-67;
GBA – glukocerebrozidaza;
GP – lat. *globus pallidus*;
GPe – spoljašnji deo bledeg jedra; lat. *globus pallidus externus*;
GPI – unutrašnji deo bledeg jedra; lat. *globus pallidus internus*;
GrDG – lat. *stratum granulare*;
GK – engl. *guanylate kinase-like*;
hif – lat. *fornix hippocampi*;
Hipp – hipokampus;
HMWMAP2 – MAP2 protein visoke molekulske mase;
HT – lat. *hypothalamus*;
HVS – visokovoltazna vretena; engl. *high voltage spindles*;
IBO – ibotenična kiselina;

ic – unutrašnja čaura; lat. *capsula interna*;
IG – lat. *indusium griseum*;
LB – Luvijevo telo;
LC – lat. *locus coeruleus*;
L-DOPA – levodopa; L-3,4-dihidroksifenilalanin;
LID – L-DOPA indukovana diskinezija;
LDT – laterodorzalno tegmentalno jedro; lat. *nucleus tegmentum laterodorsalis*;
LGN – lat. *nucleus geniculatus lateralis thalami*;
Lmol – lat. *stratum lacunosum-moleculare*;
LRRK2 – kinaza sa leucinskim ponavljanjima 2;
LMWMAP2 – MAP2 niske molekulske mase;
LPS – lipopolisaharid;
MAP – protein povezan sa mikrotubulama; engl. *microtubule-associated protein*;
MAP2 – protein 2 povezan sa mikrotubulama; engl. *microtubule-associated protein 2*;
MAGUK – engl. *membrane-associated guanylate kinase*;
MCI – blago kognitivno oštećenje; engl. *mild cognitive impairment*;
MCx – motorna kora;
MD – lat. *nucleus mediodorsalis thalami*;
MFB – medijalni snop prednjeg mozga; lat. *fasciculus medialis telencephali*;
MGN – lat. *nucleus geniculatus medialis thalami*;
MnR – lat. *nucleus raphe medianus*;
MoDG – lat. *stratum moleculare*;
MPP+ – 1-metil-4-fenilpiridinijum;
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin;
MRF – medularna retikularna formacija; lat. *formatio reticularis medialis*;
MSA – multipla sistemska atrofija;
MTL – medijalni temporalni režanj; lat. *lobus temporalis medialis*;
NAc – lat. *nucleus accumbens*;
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat;
NB – bazalno (Mejnertovo) jedro; lat. *nucleus basalis*;
NBT – nitro plavi tetrazolijum hlorid;
NC – repato jedro; lat. *nucleus caudatus*;
NDS – normalni magareći serum; engl. *normal donkey serum*
NMDA – N-metil-D-aspartat;
NORT – test prepoznavanja novog objekta; engl. *novel object recognition test*;
NORT F – faza familijarizacije;
NORT T1 – test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije;
NORT T2 – test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije;
NPY – neuropeptid Y; *neuropeptide Y*;
NREM – engl. *non-rapid eye movement*;
OFT – test otvorenog polja; engl. *open field test*;
Or – lat. *stratum oriens*;
PAG – lat. *substantia grisea periaqueductalis*;
PB – Parkinsonova bolest;
PBS – natrijum-fosfatni pufer;
PDZ – engl. *PSD-95/discs large/zonula occludens 1*;
PFA – paraformaldehid;
PFC – prefrontalni korteks; lat. *cortex praefrontalis*;
PGO – ponto-genikulo-okcipitalni talasi;
PHC – parahipokampalni korteks; lat. *cortex parahippocampalis*;
PI – indeks preference; engl. *preference index*;
PnO – lat. *nucleus pontinus oralis*;

PoDG – lat. *stratum multiforme*;
PPT – pedunkulopontinsko jedro; lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus*;
PPTd – lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus pars dissipata*;
PPTc – lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus pars compacta*;
PRh – peririnalni korteks; lat. *area perirhinalis*;
PSD – postsinaptička gustina; engl. *postsynaptic density*;
PSD-95 – protein postsinaptičke gustine 95; engl. *postsynaptic density 95*;
Put – putamen; lat. *putamen*;
PV – parvalbumin;
PV+ – PV imunoreaktivni neuron;
PVP40 – polivinilpirolidon;
Py – lat. *stratum pyramidale*;
Rad – lat. *stratum radiatum*;
RBD – poremećaj ponašanja tokom REM faze spavanja; engl. *REM sleep behavior disorder*;
REM – engl. *rapid eye movement*;
RN – lat. *nuclei raphes*;
Rt – lat. *nucleus reticularis thalami*;
SCD – subjektivni kognitivni pad;
SH3 – engl. *SRC homology 3*;
SHT – test prostorne habituacije;
SLD – sublaterodorsalno jedro; lat. *nucleus sublaterodorsalis*;
SLu – lat. *stratum lucidum*;
SN – lat. *substantia nigra*;
SNpc – lat. *pars compacta substantiae nigrae*;
SNpr – lat. *pars reticulata substantia nigrae*;
SOM – somatostatin;
SS – prirodna vretena spavanja; engl. *sleep spindles*;
STN – lat. *nucleus subthalamicus*;
Str – lat. *striatum*;
SubC – subceruleus jedro; lat. *locus subcoeruleus*;
TB – lat. *telencephalon basale*;
TC neuroni – talamo-kortikalnim neuroni;
Th – talamus; lat. *thalamus*;
TH – tirozin-hidroksilaza;
Tx-100 – triton X 100;
VIP – vazoaktivni intestinalni peptid;
VLPO – ventrolateralno preoptičko jedro hipotalamusa; lat. *nucleus preopticus ventrolateralis*;
VPL – lat. *nucleus ventralis posterolateralis thalami*;
VPLpc – lat. *nucleus ventralis posterolateralis thalami, pars parvicellularis*;
VPM – lat. *nucleus ventralis posteromedialis thalami*;
VPMpc – *nucleus ventralis posteromedialis thalami, pars parvocellularis*;
VTA – lat. *area tegmentalis ventralis*;
xscp – lat. *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*;
ZI – lat. *zona incerta*;
α-sin – α-sinuklein;
β – NADPH – β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-Na-4 so;
6-OHDA – 6-hidroksidopamin.

1 UVOD

Neurodegenerativne bolesti čine heterogenu grupu poremećaja koji su povezani sa starošću i koje karakteriše sporo, ali nepovratno slabljenje moždanih funkcija nastalo usled selektivnog gubitka specifičnih populacija neurona (Blaszczyk, 2016). Iako se u osnovi neurodegeneracije nalazi disfunkcija i odumiranje neurona, sam proces je usko povezan sa patološkim promenama specifičnih proteina (usled čega oni postaju skloni agregaciji i formiranju unutarćelijskih i vanćelijskih inkluzija), kao i sa promenama na sinapsama i neuralnim mrežama (Kulkarni i sar., 2022). Patološke promene se najpre javljaju samo u određenim regionima mozga, u ćelijama koje su posebno podložne tome (lokalna disfunkcija), a kasnije se šire i na druge moždane strukture. Klinička slika ovih bolesti je specifična i zavisi od regiona mozga koji je zahvaćen neurodegenerativnim promenama. Generalno, kod osoba koje boluju od neurodegenerativnih bolesti u velikoj meri su ugrožene osnovne funkcije poput govora, kretanja, koordinacije, stabilnosti i ravnoteže, ali dolazi i do poremećaja spavanja, autonomnih i kognitivnih funkcija, kao i poremećaja raspoloženja i ponašanja (Schapira i sar., 2017).

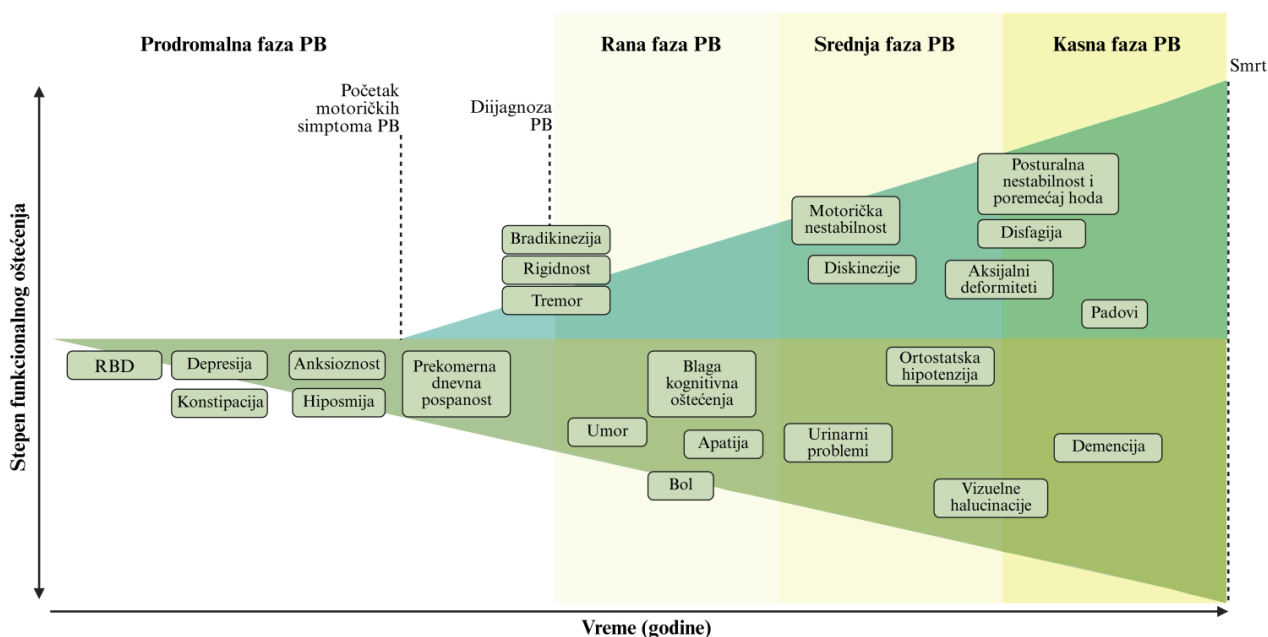
Starenje je prirodan proces koji sa sobom nosi određene promene u organizmu, uključujući i promene u nervnom sistemu. Sa starenjem ljudske populacije neurodegenerativne bolesti kao što su Alchajmerova bolest (AB) i Parkinsonova bolest (PB) postaju učestalije, a promene koje se dešavaju u nervnom sistemu tokom starenja mogu biti povezane sa povećanim rizikom od nastanka neurodegenerativnih bolesti (Mayeux i Stern, 2012). Činjenica je da tokom starenja svi funkcionalni domeni prolaze kroz patofiziološke promene, ali još uvek nije dovoljno poznato kada i kako kompenzatorni mehanizmi postaju nedovoljni da prevaziđu ove starenjem izazvane promene i kako fiziološko starenje nervnog sistema prerasta u neurodegeneraciju. Demografski trend starenja svetske populacije nameće sve veću potrebu za novim, kako kliničkim, tako i bazičnim istraživanjima. Međutim, iako su već decenijama predmet intenzivnih istraživanja, neurodegenerativne bolesti i dalje ostaju neizlečive, a svi terapijski pristupi koje pruža savremena medicina usmereni su na ublažavanje i usporavanje simptoma.

1.1 Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest koja pretežno utiče na motorički sistem kao rezultat gubitka dopaminergičkih (DA) neurona u okviru SNpc jedra (lat. *pars compacta substantiae nigrae*), jedra srednjeg mozga (Murua-Goyena i sar., 2019). Sa prevalencom između 1% i 3% kod starijih od 65 godina, odnosno > 4% kod starijih od 80 godina, PB predstavlja drugi najčešći neurodegenerativni poremećaj, odmah posle AB (Alharbi i sar., 2024). Degeneracija i gubitak DA neurona su povezani sa brojnim molekularnim i ćelijskim promenama, uključujući i agregaciju različitih proteina, disfunkciju obrade proteina, ekscitotoksičnost, oksidativni stres, apoptozu i disfunkciju mitohondrija. Jedna od najznačajnijih teorija koja objašnjava gubitak nigrostrijatnih neurona u PB je agregacija i stvaranje inkluzija pogrešno savijenih proteina α -sinukleina (α -sin) uz učešće i drugih proteina, pri čemu dolazi do formiranja velikih nerastvorljivih fibrila u vidu Luvijevih tela (LB) koja ujedno predstavljaju i glavni neuropatološki nalaz ove bolesti (Dong-Chen i sar., 2023; Khan i sar., 2025; Maiti i sar., 2017). Topografska i vremenska sekvenca pojave i progresije LB prati pojavu neuropatoloških promena i kliničku manifestaciju PB. Smatra se da pojava inkluzija najpre kreće u perifernim delovima centralnog nervnog sistema (CNS) i da se vremenom sa progresijom bolesti, patologija LB širi na neokortikalne i kortikalne regione (Braak i sar., 2003; Murua-Goyena i sar., 2019; Tysnes i Storstein, 2017).

Klinička dijagnoza PB se već decenijama dominantno zasniva na identifikaciji motoričkih poremećaja kao što su bradikinezija, rigidnost, tremor u mirovanju, problemi sa držanjem tela i hodom (**Slika 1.1**) (Blaszczyk, 2016; Poewe i sar., 2017). Iako su motorički poremećaji jedan od glavnih patoloških obeležja PB i označavaju početak kliničkog parkinsonizma, oni se javljaju jako kasno, kada već postoji ozbiljna nigrostrijatna DA neurodegeneracija. Naime, smatra se da je u trenutku pojave prvih kliničkih simptoma i postavljanja dijagnoze PB kod pacijenata već izgubljeno oko 60% DA neurona u SNpc jedru, odnosno oko 80% DA neurona u strijatumu (Cheng i sar., 2010;

Murueta-Goyena i sar., 2019). Ovako kasna dijagnostika uveliko umanjuje mogućnosti za uspeh bilo kakvog medicinskog tretmana.



Slika 1.1. Progresija kliničke manifestacije PB. Dijagnoza PB se uspostavlja pojavom motoričkih simptoma, međutim ovoj fazi prethodi prodromalna faza koja traje godinama ili čak decenijama, a koju karakterišu specifični i brojni nemotorički simptomi. Progresijom bolesti nemotorički simptomi postaju sve izraženiji, a u različitom stepenu mogu biti prisutni u svim fazama PB. Poremećaji ponašanja tokom REM (engl. *rapid eye movement*) faze spavanja (RBD, engl. *REM sleep behavior disorder*). Šema je kreirana korišćenjem platforme Biorender uz dozvolu izdavača Springer Nature BV; Nature reviews disease primers; Poewe i sar., 2017; ©2017.

Međutim, u poslednjih nekoliko godina, koncept patologije PB je promenjen: umesto da se smatra motoričkom bolešću izazvanom selektivnim gubitkom DA neurona u okviru SNpc jedra, PB se sada prepoznaje kao težak multisistemski neurodegenerativni poremećaj (Postuma i Berg, 2019). Trenutni dokazi sugerišu da pored DA sistema i drugi neurotransmiterski sistemi, kao što su serotonergički, noradrenergički, holinergički (ACh), GABA-ergički (GABA, gama-aminobuterna kiselina) i glutamatergički sistem, podležu patološkim promenama i doprinose sveukupnoj kliničkoj slici PB (Aslan i sar., 2026; Murueta-Goyena i sar., 2019; Sanjari Moghaddam i sar., 2017; Wiesman i sar., 2024). Šta više, upravo je disfunkcija ovih neurotransmiterskih sistema povezana sa čitavim spektrom nemotoričkih poremećaja, koji ne samo da prate, nego mogu i da prethode motoričkim poremećajima (Poewe, 2008). Nemotorički simptomi se mogu manifestovati u bilo kojoj fazi bolesti, a do sada je otkriveno oko 30 različitih nemotoričkih simptoma (Kumaresan i Khan, 2021; Mehndiratta i sar., 2011). Neke od najčešćih nemotoričkih manifestacija PB, karakteristične za prekliničku (prodromalnu) fazu ove bolesti su poremećaji spavanja, kognitivni deficiti (poremećaji pažnje i koncentracije, učenja i pamćenja), promene u ponašanju (anksioznost, depresija), disfunkcija gastrointestinalnog, olfaktornog i autonomnog nervnog sistema (ANS) uz senzorne abnormalnosti (**Slika 1.1**) (Kumaresan i Khan, 2021; Murueta-Goyena i sar., 2019; Poewe, 2008).

Iako imaju važan klinički značaj, nemotorički simptomi PB su prilično zanemareni (Kumaresan i Khan, 2021). Za razliku od dobro definisane patofiziologije motoričkih poremećaja, neuroanatomske i molekularne osnove nemotoričkih simptoma PB, prisutnih u ranim fazama bolesti, još uvek su nedovoljno istražene. Nemotorički simptomi mogu pogoršati kvalitet života pacijenta, a njihovo rano otkrivanje može značajno pomoći u dijagnozi PB. Mnogi od ovih simptoma mogu se javiti godinama ili čak i decenijama pre motoričkih simptoma, što pruža jedinstvenu mogućnost za

istraživanje progresije PB, identifikaciju potencijalnih prodromalnih markera, otkrivanje bolesti u presimptomatskoj fazi i moguće rane terapijske intervencije.

1.2 Poremećaji spavanja kao nemotorički simptomi Parkinsonove bolesti

Spavanje je prirodan, homeostatski regulisan proces koji se može definisati kao reverzibilno stanje imobilnosti i smanjenog odgovora na senzorne stimuluse (Datta i McLean, 2007). Ovo složeno ponašanje je prisutno kod svih sisara, i mada postoje specifične razlike, opšta organizacija spavanja, kao i fiziološke karakteristike osnovnih faza budnosti i spavanja su evolutivno očuvane i pokazuju veliku sličnost među različitim vrstama (Siegel, 2008). Spavanje nije homogeno stanje, već predstavlja kombinaciju različitih stanja koja su okarakterisana specifičnim obrascima moždane aktivnosti, mišićnog tonusa i autonomnih funkcija.

Na osnovu elektroencefalografskih (EEG) i elektromiografskih (EMG) karakteristika moguće je razlikovati dve osnovne faze spavanja: NREM (engl. *non-rapid eye movement*) i REM (engl. *rapid eye movement*) koje se ciklično smenjuju tokom spavanja (Datta i McLean, 2007). NREM fazu karakteriše sinhronizovana, sporotalasna visokoamplitudna moždana aktivnost (delta ritam; 1-4 Hz), smanjen mišićni tonus i usporene autonomne funkcije. Posebnu EEG karakteristiku NREM spavanja, na prelazima NREM u REM fazu, čine vretena spavanja (sigma ritam; 10-15 Hz) i K-kompleks talasa (spore oscilacije; 0-1 Hz). Tokom NREM spavanja senzacije i percepcije su smanjenje ili potpuno odsutne, a pokreti su epizodični i nevoljni. REM fazu spavanja, poznatu i kao paradoksalno spavanje, karakterišu brze niskoamplitudne desinhronizovane oscilacije u kori velikog mozga (izrazito visok nivo kortikalne aktivnosti nalik budnom stanju, beta oscilacije; 15-30 Hz), dok je u hipokampalnom EEG-u prisutan teta ritam (8-10 Hz). U toku REM faze spavanja antigravitaciona muskulatura je u atoniji, javljaju se brzi pokreti očnih jabučica, autonomne funkcije su iregularne. Za razliku od spavanja, budnost karakteriše desinhronizovana, niskovoltazna visokofrekventna moždana aktivnost (brzi ritmovi koji odražavaju aktivnu obradu informacija i povećanu kortikalnu aktivnost: alfa – 8-15 Hz; beta – 15-30 Hz; gama – > 30 Hz), zatim prisustvo mišićnog tonusa, voljni pokreti, eksterno generisane senzacije i stabilne autonomne funkcije (Datta i McLean, 2007).

Poremećaji spavanja su najčešći nemotorički simptomi kod pacijenata sa PB, sa prevalencom od 60% do 70% (Medeiros i sar., 2019). Ovi poremećaji obuhvataju čitav spektar stanja kao što su insomnija, prekomerna dnevna pospanost (Abbott i sar., 2005), fragmentacija sna, sindrom nemirnih nogu (Wong i sar., 2014), problemi sa uspavlivanjem i održavanjem sna, narkolepsija, poremećaji disanja u toku spavanja, uključujući i opstruktivnu apneju u snu (Kumaresan i Khan, 2021), kao i poremećaji REM faze spavanja, pre svega poremećaji ponašanja tokom REM faze spavanja –RBD (engl. *REM sleep behavioral disorder*) (Iranzo i sar., 2006; Medeiros i sar., 2019). Najčešće se javljaju pojedinačno, ali kod određenog broja pacijenata može biti prisutno i više različitih poremećaja spavanja (Dodet i sar., 2024). Problemi sa snom se mogu manifestovati prodromalno, pre motoričkih i autonomnih simptoma (Kumaresan i Khan, 2021; Melka i sar., 2019), kao i u ranoj fazi bolesti (Dodet i sar., 2024). Kako bolest napreduje, poremećaji spavanja su sve učestaliji, progresivno se pogoršavaju i negativno utiču na kvalitet života pacijenata (Neikrug i sar., 2013). Standardna terapija antiparkinsonicima ne samo da ne ublažava simptome poremećaja spavanja, već ih u nekim slučajevima još više pogoršava (Medeiros i sar., 2019). Prekomerna dnevna pospanost i iznenadni napadi pospanosti mogu biti pogoršani određenim lekovima, kao što su agonisti DA receptora. Takođe, primena DA terapije može indukovati simptome nalik narkolepsiji (Schapira, 2000; Schapira i sar., 2017). Pored toga, njihovoj progresiji dodatno doprinose pridruženi psihijatrijski poremećaji (anksioznost, poremećaji raspoloženja), motorički simptomi, kao i sama dužina i patofiziologija PB (Dodet i sar., 2024; Kumaresan i Khan, 2021; Menza i sar., 2010). Sa druge strane, pokazano je da poremećaji spavanja mogu da podstaknu komplikacije motoričkih simptoma izazvanih standardnom farmakološkom terapijom (Galati i sar., 2015), čime se dodatno usložnjava patologija PB.

Regulacija budnosti i spavanja je složen proces koji podrazumeva interakciju više različitih regiona mozga, i neurotransmiterskih sistema, od kojih su mnogi narušeni u PB (Schapira i sar., 2017; Stefani i Högl, 2020). Ključne strukture uključene u regulaciju ciklusa spavanje–budnost nalaze se u hipotalamusu, srednjem mozgu, moždanom stablu i prednjem mozgu. GABA-ergički neuroni ventrolateralnog preoptičkog jedra hipotalamusa (VLPO, lat. *nucleus preopticus ventrolateralis*) promovisu spavanje inhibicijom sistema za pobuđivanje – uzlazni retikularni aktivacioni sistem (ARAS, lat. *formatio reticularis ascendens*) u moždanom stablu i hipotalamusu. Budnost održavaju noradrenergički neuroni jedra *locus coeruleus* – LC, serotonergički neuroni dorzalnog rafe jedra (DR, lat. *nucleus raphe dorsalis*), histaminergički neuroni tuberomamilarnog jedra (lat. *nucleus tuberomamillaris*) u posteriornom hipotalamusu i holinergički neuroni pedunkulopontinskog (PPT, lat. *nucleus tegmentalis pedunculo pontinus*) i laterodorzalnog tegmentalnog jedra (LDT, lat. *nucleus tegmentum laterodorsalis*). Neuroni ARAS-a obezbeđuju visok nivo moždane aktivnosti aktivacijom talamo-kortikalne i kortikalne mreže (desinhronizacija). Stabilnost između stanja spavanja i budnosti obezbeđuju oreksinergički neuroni lateralnog hipotalamusa, koji podešavaju aktivnost centara za pobuđivanje i sprečavaju nagle prelaze između ova dva stanja. Pored toga, talamus i talamo-kortikalne mreže imaju ključnu ulogu u generisanju EEG obrazaca karakterističnih za različite faze spavanja, uključujući sporotalasnu aktivnost i vretena spavanja, dok hipokampus i korteks učestvuju u procesima sinaptičke plastičnosti i konsolidacije memorije tokom sna (Saper i sar., 2010; Brown i sar., 2012).

Odnos između spavanja i neurodegeneracije je kompleksan, a razumevanje ovog odnosa je od izuzetne važnosti. Smatra se da poremećaji spavanja u PB nastaju kao posledica neurodegenerativnih procesa koji zahvataju strukture zadužene za regulaciju spavanja. Naime, Braak i saradnici su na osnovu distribucije LB u *post-mortem* mozgovima sugerisali da rana patologija PB započinje u olfaktornim strukturama ili produženoj moždini, odakle se descedentno ili ascedentno širi ka moždanom stablu, pre samog uticaja na bazalne ganglije (BG, lat. *nuclei basales*), limbički sistem i moždanu koru (Braak i sar., 2003). Vremensku i prostornu sekvencu LB patologije prati pojava i progresija specifičnih nemotoričkih i motoričkih simptoma bolesti. Prema ovoj teoriji, taloženje α -sin u holinergičkim i monoaminergičkim neuronima moždanog stabla, koje se dešava u ranim fazama bolesti, smatra se odgovornim za pojavu poremećaja spavanja kod pacijenata sa PB (Braak i sar., 2003; Boeve i sar., 2007). Ovo sugerišu i istraživanja na animalnim modelima koja pokazuju da je prekomerna ekspresija α -sin i njegova akumulacija u moždanom stablu i kori povezana sa poremećajem spavanja kod miševa (McDowell i sar., 2014; Schapira i sar., 2017).

Iako su, za razliku od motoričkih poremećaja, dugo bili zapostavljeni, poremećaji spavanja kao nemotorički simptomi PB nisu sasvim nepoznati. Čak i sam Džejms Parkinson u svojoj čuvenoj monografiji pominje loš kvalitet sna kod pacijenata sa PB (Parkinson, 1817). Rano prepoznavanje i adekvatno lečenje poremećaja spavanja kod ovih pacijenata su od suštinskog značaja. Sama činjenica da se mogu javiti i decenijama pre kliničkog parkinsonizma ukazuje na značaj ovih simptoma kao prodromalnih markera PB, a njihovo praćenje pomaže u predviđanju toka bolesti i personalizaciji terapije pre nego što nastupe teži invaliditeti. Jedan od trenutno najjačih prodromalnih kliničkih markera neurodegeneracije jeste RBD (Boeve i sar., 2007). Rana identifikacija pacijenata sa visokim rizikom od razvoja PB pruža mogućnost za istraživanje patogeneze i progresije ove neurodegenerativne bolesti, kao i za razvoj novih terapijskih pristupa. Međutim, iako više od 70% pacijenata u ranoj fazi PB ima probleme sa spavanjem, oni u većini slučajeva ostaju nedijagnostifikovani i bez adekvatne terapije, jer ih lekari često previde, a pacijenti zanemaruju (Dodet i sar., 2024).

1.2.1 Poremećaji ponašanja tokom REM faze spavanja – RBD

RBD je parasomnija¹ čija se klinička manifestacija karakteriše jednostavnim ili složenim abnormalnim pokretima koji se javljaju tokom REM faze spavanja i koji su povezani sa povišenim tonusom mišića tokom ove faze (Schenck i sar., 1986). Naime, kod pacijenata sa RBD-om se tokom REM spavanja umesto normalne fiziološke mišićne atonije, javlja nevoljna mišićna aktivnost, u vidu odbrambenih ili agresivnih pokreta. Ovi pokreti su često praćeni gestovima i vokalizacijom i javljaju se kao odgovor na intenzivne, neprijatne, zastrašujuće snove (De Cock i sar., 2007; Diaconu i sar., 2021).

Prema klasičnoj podeli, RBD može biti idiopatski ili izolovani, kada predstavlja primarno oboljenje (odsustvo drugih neuroloških poremećaja) i simptomatski ili sekundarni, kada je izazvan farmakološki (najčešće antidepresivima) (Ju i sar., 2011), ili se javlja u kombinaciji sa drugim neurološkim ili neurodegenerativnim poremećajima (Iranzo i sar., 2006), autoimunim bolestima (Ju i sar., 2011) ili lezijama u regionu moždanog stabla (McCarter i sar., 2015; Xi i Luning, 2009).

Klinička dijagnoza RBD-a podrazumeva video-polisomnografski zapis² kako bi se potvrdilo postojanje abnormalne motoričke aktivnosti (ponovljene epizode vokalizacije u snu ili složeno motoričko ponašanje) i odsustvo mišićne atonije tokom REM faze spavanja (Schenck, 2023; Stefani i Högl, 2021).

Smatra se da patofiziološku osnovu RBD-a čine neurodegenerativni procesi u regionu moždanog stabla, akumulacija potencijalno neurotoksičnih proteina, pre svega, α -sin, kao i disbalans različitih neurotransmiterskih sistema (Oliveira i sar., 2025; Schenck, 2023). Dosadašnja istraživanja ukazuju da RBD nastaje usled oštećenja struktura i neuronskih mreža zaduženih za regulaciju REM spavanja. Centralnu ulogu u regulaciji REM mišićne atonije ima sublateralno jedro (SLD, lat. *nucleus sublateralis*) kod pacova, odnosno subceruleus jedro (SubC, lat. *locus subcoeruleus*) kod ljudi. Naime, tokom REM spavanja glutamatergički neuroni SLD jedra direktno ili indirektno preko medularne retikularne formacije (MRF, lat. *formatio reticularis medialis*) inhibiraju spinalne motoneurone, što dovodi do mišićne atonije. Zapravo, tokom REM faze, SLD glutamatergički neuroni aktiviraju inhibitorne neurone u produženoj moždini koji u kičmenoj moždini oslobađaju GABA i glicin direktno na motoneurone (Lu i sar., 2006; Peever i sar., 2014). Smanjenje ekscitacije od strane glutamatergičkog, noradrenergičkog, serotonergičkog, dopaminergičkog i holinergičkog sistema smanjuje aktivnost motoneurona i time dodatno doprinosi REM atoniji. Pored toga, pretpostavlja se da procesi koji smanjuju aktivaciju centralnih lokomotornih generatora (CPGs, engl. *central pattern generators*) doprinose održavanju fiziološke REM atonije. Odsustvo mišićne atonije, odnosno izostanak inhibicije spinalnih motoneurona tokom REM faze spavanja nastaje kao posledica oštećenja ili disfunkcije SLD jedra (Boeve i sar., 2007; Schenck, 2023). Sa druge strane, pojačana fazna lokomotorna aktivnost, nastala kao posledica disbalansa neurotransmitera i pojačane ekscitacije, bi mogla objasniti kompleksno motorno ponašanje, prisutno kod pacijenata sa RBD-om (Boeve i sar., 2007; Peever i sar., 2014).

¹ Parasomnija je zajednički naziv za heterogenu grupu poremećaja spavanja koja uključuju abnormalne pokrete, ponašanja, emocije ili doživljaje, a javljaju se prilikom uspavlivanja, spavanja ili buđenja. Prema međunarodnoj klasifikaciji poremećaja spavanja (American Academy of Sleep Medicine, 2023) dele se na NREM parasomnije (npr. mesečarenje, noćni strahovi, konfuzno buđenje), REM parasomnije (npr. RBD i noćne more) i ostale oblike (npr. škriganje zubima, noćno mokrenje, paraliza sna).

² Polisomnografski zapis predstavlja simultano registrovanje više fizioloških parametara tokom spavanja: moždanu aktivnost (EEG – elektroencefalografija), pokrete očiju (EOG – elektrookulografija), mišićnu aktivnost (EMG – elektromiografija), srčanu aktivnost (EKG – elektrokardiografija) kao i respiratorne parametre.

Tokom proteklih decenija brojne kliničke i patološke studije su potvrdile jaku vezu između RBD-a i neurodegenerativnih bolesti iz grupe sinukleinopatija kao što su PB (RBD prisutan kod 16% – 47% pacijenata), demencija sa LB (DLB; RBD prisutan kod 80% pacijenata) i multiple sistemske atrofije (MSA; RBD prisutan kod 100% pacijenata) (Boeve i sar., 2007, 2013; Vetrugno i sar., 2004). Naime, višegodišnje praćenje pacijenata sa dijagnozom (kliničkog) izolovanog RBD-a pokazalo je da čak 90% njih u periodu od 10 do 15 godina nakon inicijalne dijagnoze razvije neku od bolesti iz grupe sinukleinopatija (Högl i sar., 2018). Procenjuje se da RBD u oko 45% slučajeva progredira u PB, u 45% slučajeva u DLB, a u svega 5% slučajeva u MSA (Pérez-Carbonell i Iranzo, 2025). Upravo zbog činjenice da se može javiti i do 40 godina pre kliničke manifestacije motoričkih i kognitivnih simptoma, idiopatski RBD se dugo godina smatrao najranijim i najjačim prediktorom PB (Boeve i sar., 2007). Prodromalna manifestacija RBD-a je u skladu sa konceptom prostorne i vremenske progresije LB patologije, odnosno rane α -sin patologije koja zahvata generatore REM atonije u moždanom stablu (Braak i sar., 2003). Međutim, RBD ne mora uvek da prethodi parkinsonizmu, već se može manifestovati istovremeno sa motoričkim simptomima PB, ili nakon što je PB klinički dijagnostikovana (Stefani i Högl, 2020).

Poslednjih godina koncept RBD-a se menja. Neverovatno visoka stopa konverzije izolovanog RBD-a u sinukleinopatiju sugerise da više nije pitanje da li će, nego kada će se kod pacijenata pojaviti prvi simptomi bolesti. Upravo ova neminovnost razvoja neurodegeneracije sve više navodi naučnike i lekare da RBD ne gledaju samo kao parasomniju, već kao manifestaciju prodromalne faze sinukleinopatije, posebno u PB (Högl i sar., 2018; Schenck, 2023; Stefani i Högl, 2020; Stefani i Högl, 2021).

Decenijska istraživanja usmerena na DA sistem, nigrostrijatnu degeneraciju i hipotezu oksidativnog stresa dovele su do razvoja simptomatske terapije za PB koja se sa svim svojim ograničenjima, manje ili više uspešno, primenjuje u praksi. Svako novo saznanje doprinosilo je poboljšanju terapijskog pristupa. Međutim, i pored ublažavanja simptoma i usporavanja progresije, PB i dalje ostaje neizlečiva bolest. Do danas nije razvijen ni jedan obećavajući terapijski pristup, što je u izvesnoj meri posledica i suviše dugog fokusa na motoričke aspekte bolesti. Stoga, mogućnost identifikacije prodromalne neurodegeneracije pre pojave simptoma bolesti ima veliki naučni i klinički značaj. RBD predstavlja jedinstvenu priliku za istraživanje i razvoj novih neuroprotektivnih terapija za prevenciju neurodegeneracije.

1.3 Poremećaji kognitivnih funkcija kao nemotorički simptomi PB

Kognitivne disfunkcije su jedan od glavnih kliničkih nemotoričkih simptoma PB koji ne samo da remete svakodnevne aktivnosti pacijenta, već i utiču na dobrobit članova porodice. Kognitivna oštećenja su i do šest puta češća kod osoba sa PB u odnosu na zdrave osobe (Aarsland i sar., 2021) i mogu se javiti u bilo kojoj fazi bolesti. Izvesne, najčešće blage kognitivne promene mogu se uočiti već u početnoj fazi PB. Kako bolest napreduje, ovi poremećaji postaju sve izraženiji i sve više otežavaju samostalno svakodnevno funkcionisanje. Težina kliničke slike, kognitivni domeni koji su pogođeni, kao i stopa progresije se izuzetno razlikuju među obolelima. Pad kognitivnih sposobnosti kod pacijenata sa PB kreće se od subjektivnog kognitivnog pada (SCD, engl. *subjective cognitive decline*), preko blagog kognitivnog oštećenja (MCI, engl. *mild cognitive impairment*) do izražene demencije, koja se najčešće javlja u uznapredovaloj fazi bolesti (Aarsland i sar., 2017, 2021). Pacijenti sa PB doživljavaju širok spektar kognitivnih oštećenja od poremećaja pažnje, govora, učenja i pamćenja, do usporene obrade informacija i vizuelno-prostornih funkcija što dodatno otežava efikasno planiranje i organizaciju. Studije pokazuju da se kod pacijenata sa PB koji nisu dementni najveća oštećenja uočavaju u domenu memorije, u vidu otežanog prizivanja informacija, a ne nemogućnosti njihovog pamćenja (Chiaravalloti i sar., 2014; Zhang i sar., 2020). Međutim istraživanja Das i saradnika (2019) sugerisu da, uz poznate probleme sa prisećanjem, pacijenti sa PB imaju promene u hipokampusu koje mnogo ranije utiču na memoriju.

Dva najčešća kognitivna sindroma kod pacijenata sa PB su MCI i demencija koje su operativno definisani u smernicama za dijagnostiku i procenu od strane Međunarodnog društva za Parkinsonovu bolest i poremećaje kretanja (Aarsland i sar., 2017; Emre i sar., 2007; Litvan i sar., 2012). MCI se definiše kao postepen pad kognitivnih funkcija, primećen bilo od strane pacijenta, bilo od strane lekara, sa odgovarajućim testom kao potvrdom izmenjenog kognitivnog statusa. U slučaju demencije, deficiti se javljaju u najmanje dva od četiri kognitivna domena (izvršne funkcije, pažnja, vizuelno-prostorne funkcije i pamćenje) i toliko su ozbiljni da ometaju svakodnevni život, nezavisno od oštećenja koja se mogu pripisati motoričkim ili autonomnim simptomima.

Iako još uvek nisu u potpunosti poznati svi patofiziološki mehanizmi, smatra se da kognitivni poremećaji u PB nastaju kao posledica neurodegenerativnih promena u regionu limbičkog sistema i korteksa. Studije pokazuju da se pojava demencije javlja usled deficita DA, pri čemu su glavni patološki pokretači kognitivnog pada sinergistički efekat između akumulacije proteina α -sin i patologije nalik patologiji AB (inkluzije amiloid β i fosforilisanog tau proteina) (Aarsland i sar., 2021; Halliday i sar., 2014). Upravo je patologija povezana sa LB najvažniji faktor koji dovodi do razvoja kognitivnih oštećenja u PB, o čemu svedoče i studije u kojima je pokazano da je težina kognitivnih oštećenja u korelaciji sa LB, posebno u frontalnom girusu (lat. *gyrus frontalis*) i cingularnom girusu (lat. *gyrus cinguli*) (Halliday i sar., 2014; Mattila i sar., 2000). Kod pacijenata sa demencijom takođe je zabeleženo povećanje LB u neokortikalnim i limbičkim oblastima (Apaydin i sar., 2002; Halliday i sar., 2014), kao i temporalnom režnju (lat. *lobus temporalis*), u poređenju sa pacijentima sa PB bez demencije (Halliday i sar., 2014; Harding i Halliday, 2001). Prisustvo ovih patologija je u korelaciji sa izraženim gubitkom dopamina, serotonina i acetilholina u neuronima koji se projektuju na limbički sistem i korteks. Genetski faktori kao što su mutacije gena koji kodiraju protein α -sin doprinose povećanju rizika od nastanka demencije (Halliday i sar., 2014). Istraživanja pokazuju da je rano smanjenje preuzimanja dopamina u frontalnom režnju od ključnog značaja za kognitivna oštećenja koja se javljaju u PB (Brück i sar., 2005). Takođe, dokazano je da neurodegenerativne promene holinergičkog sistema u moždanom stablu i kortiko-strijatnim putevima mogu biti uključene u patofiziologiju kognitivnih poremećaja u PB (Bohnen i Albin, 2011; Fang i sar., 2020).

Uprkos intenzivnim istraživanjima u protekle dve decenije, znanje o kognitivnim poremećajima u PB i njihovo lečenje i dalje zaostaju u poređenju sa motoričkim simptomima. Poremećaji kognitivnih funkcija u velikoj meri osiromašuju kvalitet života pacijenata sa PB, čak i u početnim fazama bolesti. Kako bi se identifikovali PB pacijenti sa povećanim rizikom od ranog i brzog razvoja kognitivnog pada, poslednjih godina istraživanja su usmerena na rane subkliničke kognitivne promene. Tradicionalno se smatralo da su kognitivne disfunkcije karakteristične za kasnu fazu bolesti, međutim na osnovu rezultata brojnih studija danas se MCI posmatra kao preteča demencije kod PB (Fang i sar., 2020), odnosno kao tranzitorno stanje između normalne kognicije i demencije (Aarsland i sar., 2021). U tom smislu, poseban značaj ima suptilni pad kognitivnih sposobnosti koje prijavljuju sami pacijenti, a koji još uvek ne ispunjava kliničke kriterijume kognitivnog poremećaja (Aarsland i sar., 2021). Stoga je važno da se u svakoj fazi bolesti utvrdi kognitivni status pacijenata. Ovakva klinička praksa i dalja istraživanja imaju za cilj bolje razumevanje prirode kognitivnih poremećaja kao nemotoričkih simptoma bolesti, kao i adekvatan i pravovremeni tretman obolelih.

1.3.1 Poremećaji memorijskih funkcija

Blaga kognitivna oštećenja u PB bez demencije javljaju se u oko 20% – 50% slučajeva, a podrazumevaju poremećaje u različitim kognitivnim domenima kao što su izvršne funkcije, vizuelno-prostorne sposobnosti, jezičke i memorijske funkcije (Goldman i Litvan, 2011).

Memorija ili pamćenje predstavlja složeni mentalni proces koji se može definisati kao promena u ponašanju prouzrokovana prethodnim iskustvom. Formira se kroz učenje, odnosno kroz proces prikupljanja informacija neophodnih za formiranje memorije (Okano i sar., 2000). U

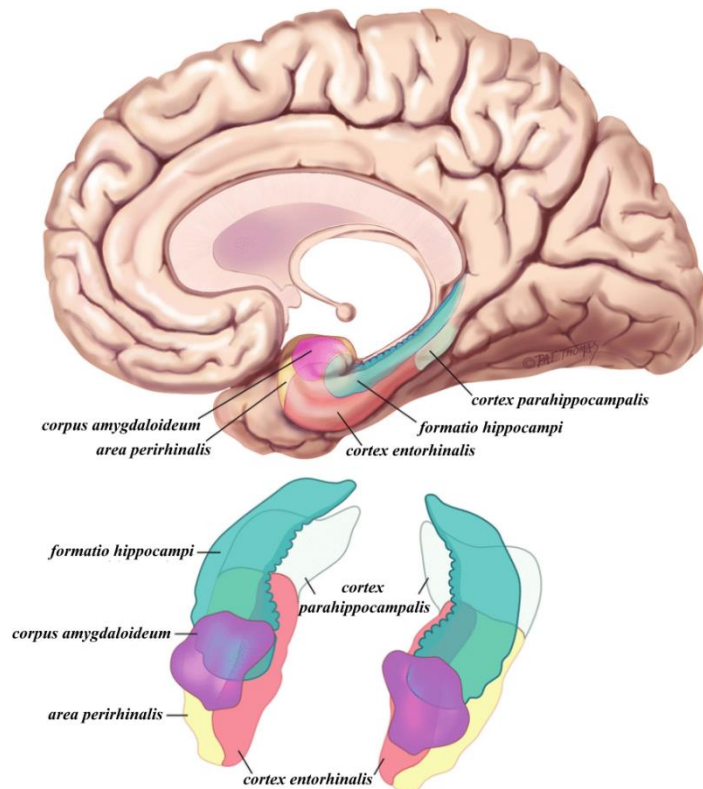
fiziološkim uslovima, memorija je proces putem koga se znanje o svetu kodira, skladišti i po potrebi priziva (reprodukuje). Prema dužini trajanja pamćenje može biti senzorno (nekoliko sekundi), kratkotrajno (traje od nekoliko sekundi do nekoliko sati) i dugotrajno (traje danima, godinama). Formiranje dugotrajne memorije uključuje nekoliko faza: kodiranje (inicijalna faza učenja informacija), skladištenje (zadržavanja informacija tokom vremena), konsolidaciju (proces prelaska informacija iz kratkotrajne u dugotrajnu memoriju) i prisećanje (proces aktivnog korišćenja prethodno skladištenih informacija). Memorija koja je aktivno vraćena u svest nakon prisećanja još uvek nije stabilna. Tek procesom rekonsolidacije, odnosno naknadne stabilizacije, postiže se dugotrajan efekat pamćenja. U suprotnom, može doći do gubitka informacija (Das i sar., 2019).

Dugotrajna memorija obuhvata eksplicitno (deklarativno, svesno) i implicitno (nedeklarativno, nesvesno) pamćenje. Deklarativna memorije se formira epizodičnim pamćenjem (autobiografski događaji), semantičkim pamćenjem (opšte znanje) i emocionalnim pamćenjem (pamćenje emocionalnih iskustava, događaja ili informacija) (Watson i Leverenz, 2010). Nedeklarativno pamćenje podrazumeva sposobnost implicitnog pamćenja, kao što je asocijativno klasično uslovljavanje, primovanje koje se ispoljava kroz olakšano prepoznavanje objekata i reči, kao i proceduralno učenje kognitivnih i motoričkih veština (Camina i Güell-Pelayo, 2017). Ovi podtipovi memorije su međusobno nezavisni, pokreću ih različiti moždani regioni, koji su različito zahvaćeni tokom progresije bolesti. Deklarativnu memoriju uglavnom pokreću medijalni temporalni režanj i hipokampus, dok je nedeklarativna memorija pretežno povezana sa frontalnim kortikalnim oblastima, BG i malim mozgom (Camina i Güell-Pelayo, 2017; Watson i Leverenz, 2010). Memorijske funkcije često predstavljaju jedan od prvih kognitivnih domena koji se mogu oštetiti u ranim fazama PB, kao i u drugim demencijama (Bezdicek i sar., 2019; Costa i sar., 2014; Decourt i sar., 2021). Kod pacijenata sa PB, kognitivni deficiti se najčešće odnose na poremećaj izvršnih funkcija i radne memorije, dok je deklarativna (posebno epizodična memorija) očuvana u prodromalnim fazama bolesti, pri čemu se deficiti mogu javiti u bilo kojoj fazi (kodiranje, skladištenje, konsolidacija, prisećanje). Adekvatna obrada memorije zahteva sposobnost osobe da usmeri pažnju na stimuluse (za proces kodiranja informacija) i da koristi izvršne funkcije koje omogućavaju pronalaženje uskladištenih informacija u određenom kontekstu. Višestruki deficiti ponašanja i kognicije, kao što je sam deficit pažnje, pokreću oštećenje memorije koje je tipično povezano sa PB. Pored toga, pacijenti sa PB imaju poteškoće u učenju novih informacija, što je povezano sa smanjenim performansama prisećanja (Goldman i Litvan, 2011).

Smatra se da epizodična memorija, kao podtip deklarativne memorije, u značajnoj meri zavisi od hipokampusa koji zajedno sa prefrontalnim korteksom (PFC, lat. *cortex prefrontalis*) čini mrežu koja doprinosi formiranju pamćenja, konsolidaciji, prepoznavanju i prisećanju. Istraživanja na životinjama sugerisu da selektivna oštećenja hipokampusa ili okolnih regiona dovode do poremećaja deklarativne memorije (Das i sar., 2019), dok kliničke studije ukazuju da je kod pacijenta sa PB prisutna atrofija regiona medijalnog temporalnog režnja (MTL, lat. *lobus temporalis medialis*), koja u velikoj meri korelira sa fazom i težinom bolesti (Overdorp i sar., 2014).

1.3.2 Hipokampus

Hipokampalna formacija (lat. *formatio hippocampi*) je deo limbičkog sistema koji se nalazi u MTL, koji pored hipokampalnog regiona obuhvata peririnalni korteks (PRh, lat. *area perirhinalis*), entorinalni korteks (EC, lat. *cortex entorhinalis*) i parahipokampalni korteks (PHC, lat. *cortex parahippocampalis*) koji zajedno čine parahipokampalni girus (lat. *gyrus parahippocampalis*) (**Slika 1.2**). Primarna funkcija MTL-a ogleda se u deklarativnoj memoriji i prostornoj navigaciji (Squire i sar., 2007). Hipokampalnu formaciju čini *indusium griseum*, *longitudinal striae*, *gyrus fasciolaris*, *hippocampus proper* (CA1- 4, lat. *cornu ammonius*), dentatni girus (DG, lat. *gyrus dentatus*) i subikularna kora (lat. *subiculum*) i deo *uncus*-a (Chauhan i sar., 2021). Međutim, često se termin hipokampus koristi u užem smislu, pa se u animalnim studijama odnosi na DG i CA regione, dok se u humanim studijama odnosi na DG, CA regione i *subiculum* (Strange i sar., 2014).



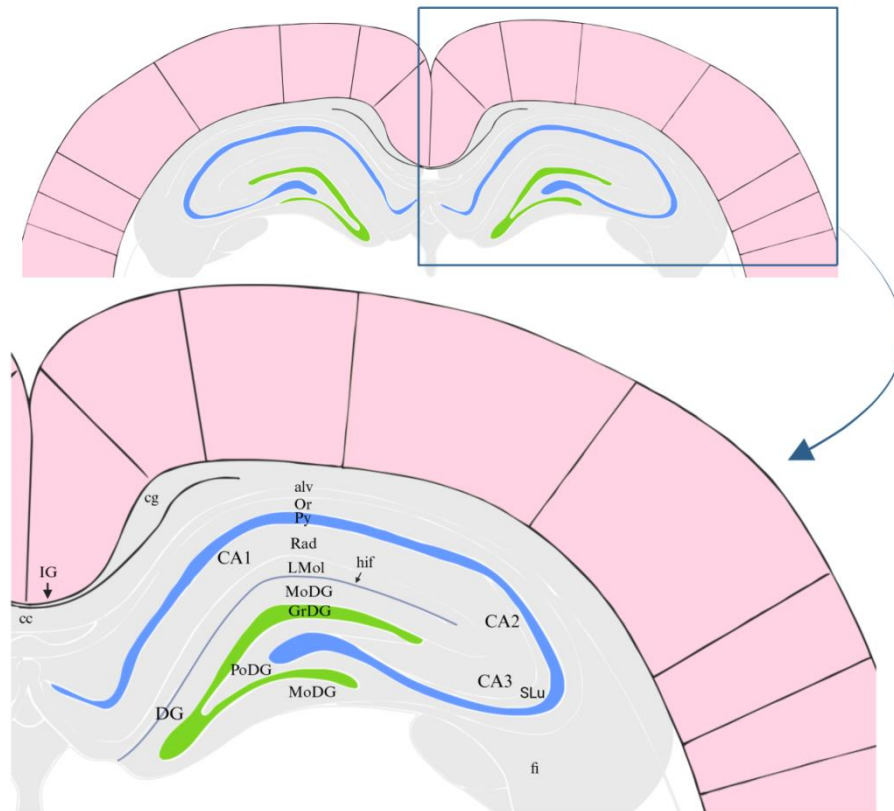
Slika 1.2. Strukturna organizacija medijalnog temporalnog režnja. Medijalni temporalni režanj (MTL) se sastoji od hipokampalne formacije (*formation hippocampi*) koja je smeštena rostralno i parahipokampalnog girusa (*gyrus parahippocampalis*) koji se nalazi kaudalno, dok se amigdala (lat. *corpus amygdaloideum*) nalazi u prednjem delu MTL. Rinalni korteks se sastoji od entorinalnog korteksa (*cortex entorhinalis*) koji se nalazi medijalno i peririnalnog korteksa (*area perirhinalis*) koji se nalazi lateralno. Entorinalni, peririnalni i parahipokampalni korteks čine parahipokampalni girus. Parahipokampalni korteks (*cortex parahippocampalis*) zauzima posteriorni deo parahipokampalnog girusa. Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača American Society of Neuroradiology; American Journal of Neuroradiology; Raslau i sar., 2015; ©2015.

Hipokampus je slojevita struktura sa kompleksnom organizacijom (**Slika 1.3**). Kao i u slučaju bilo koje druge kortikalne mreže i u organizaciji hipokampusa je moguće razlikovati tri komponente: (1) populaciju glavnih ekscitatornih neurona (homogena populacija glutamatergičkih neurona) koji obezbeđuju glavne izlazne projekcije; (2) glavne ulazne ekscitatorne projekcije koje aktiviraju ove neurone i (3) lokalnu mrežu interneurona (heterogena populacija GABA-ergičkih neurona) koji regulišu interakciju aferentnih i eferentnih projekcija strukture (Amaral i Witter, 1989). Iako je osnovna strukturalna organizacija ista u celoj hipokampalnoj formaciji, pojedini regioni se međusobno razlikuju po organizaciji slojeva. U okviru CA regiona moguće je razlikovati 5 slojeva: (1) *stratum alveolus* sačinjen od aksona piramidalnih neurona; (2) *stratum oriens* koji uglavnom sadrži bazalne dendrite piramidalnih neurona i interneurone označene kao korpaste ćelije; (3) *stratum pyramidale* koji se sastoji od nekolioko slojeva velikih piramidalnih neurona (glavni ekscitatorni neuroni hipokampusa); (4) *stratum radiatum* koji sadrži apikalne dendrite piramidalnih neurona i (5) *stratum lacunosum-moleculare* koji se sastoji od dendrita piramidalnih ćelija, nekih interneurona i sinapsi (Mazher i Hassan, 2020). CA3 region hipokampusa karakteriše prisustvo još jednog dodatnog sloja – *stratum lucidum*, kroz koji prolaze mahovinasta vlakna (engl. *mossy fiber*) poreklom iz DG, koja prenose aferentne informacije ka piramidalnim neuronima CA3 regiona. Nasuprot tome, u okviru DG-a moguće je razlikovati 3 sloja: (1) *stratum moleculare* koji je relativno bez ćelija i uglavnom ga čine dendriti granularnih ćelija, vlakna perforatnog puta iz EC, kao i mali broj interneurona i vlakna poreklom iz raznih spoljašnjih ulaza; (2) *stratum granulare* koji predstavlja glavni ćelijski sloj i

sastoji se od gusto zbijenih granularnih ćelija i (3) *stratum multiforme* koji sadrži mnoge tipove ćelija, među kojima su najistaknutije mahovinaste ćelije (Amaral i sar., 2007).

Integracija i obrada informacija u neuronskoj mreži hipokampusa ostvaruje se kroz tzv. trisinaptički put. Zahvaljujući hijerarhijskoj organizaciji MTL-a, informacije se najpre prikupljaju preko PRh i PHC, da bi se potom preko EC-a (glavni ulaz) prenele do hipokampusa. EC je izvor većine kortikalnih senzornih informacija koje hipokampus koristi za obavljanje svojih funkcija i koje dospevaju do DG preko vlakana perforatnog puta. DG se smatra prvim korakom u obradi informacija koje na kraju dovode do nastanka epizodne memorije. Nakon obrade informacije se iz DG-a prosleđuju u CA3 region hipokampusa preko aksona granularnih ćelija DG-a (nazivaju se još i mahovinasta vlakna). Na samom kraju piramidalne ćelije CA3 regiona šalju svoje aksone (Šaferova kolateralna) na CA1 region, odakle se informacije preko subikuluma i EC prosleđuju ka fornixu (lat. *fornix*) (Witter i Amaral, 2004).

Hipokampus posreduje u nekoliko viših moždanih funkcija, kao što su učenje, deklarativna memorija, prostorno kodiranje i regulacija emocionalnog ponašanja (Jonas i Lisman, 2014). Pored toga, hipokampus je glavni generator teta ritma koji je povezan sa integrativnim procesima kritičnim za više kognitivne funkcije (Nuñez i Buño, 2021). Hipokampalne funkcije mogu biti ugrožene neuropatologijom PB. Volumetrijske analize hipokampusa pokazuju da se u odnosu na zdrave kontrolne pacijente kod PB pacijenata sa demencijom može uočiti atrofija MTL, ali u daleko manjem stepenu nego kod pacijenata sa AB, čak i onih koji se nalaze u ranoj fazi bolesti (Brück i sar., 2004). Rezultati studija baziranih na strukturnom i funkcionalnom oslikavanju mozga potvrđuju vezu hipometabolizma i atrofije hipokampusa sa progresivnim oštećenjima memorije i razvojem demencije kod pacijenata sa PB (González-Redondo i sar., 2014; Martín-Bastida i sar., 2021), pri čemu je demencija korelisana sa α -sin patologijom (Braak i sar., 2003). Smatra se da je progresija LB patologije od subkortikalnih ka limbičkim i kortikalnim strukturama mozga glavni pokretač za razvoj demencije (Das i sar., 2019). Međutim, pokazano je da postoji određena selektivnost kada je u pitanju osetljivost na LB patologiju i da su zapravo pojedini regioni hipokampusa, poput CA2/3 i subikuluma više osetljivi na strukturne i funkcionalne promene uslovljene patologijom PB (Das i sar., 2019).



Slika 1.3. Osnovna strukturna organizacija hipokampalne formacije. Prikazan je koronalni presek mozga pacova na stereotaksičkom opsegu 3,60 mm posteriorno od bregme. Na slici nisu predstavljeni svi delovi hipokampalne formacije.

alv – *alveus hippocampi*; **Or** – *stratum oriens*; **Py** – *stratum pyramidale*; **Rad** – *stratum radiatum*; **Lmol** – *stratum lacunosum-moleculare*; **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum polymorphum gyri dentati*; **SLu** – *stratum lucidum*; **CA** – *Cornu ammonis*; **DG** – *gyrus dentatus*; **fi** – *fimbria hippocampi*; **cc** – *corpus callosum*; **cg** – *gyrus cinguli*; **IG** – *indusium griseum*; **hif** – *fornix hippocampi*. Šema je kreirana pomoću Biorender softvera uz dozvolu izdavača Elsevier Science & Technology Journals; The rat brain in stereotaxic coordinates - the new coronal set; Paxinos i Watson, 2005; ©2005.

1.4 Neurotransmitterski sistemi u Parkinsonovoj bolesti

Danas se sa sigurnošću zna da je PB ozbiljan multisistemski neurodegenerativni poremećaj. Osim disfunkcije DA sistema koji leži u osnovi motoričkih oštećenja, mnogi drugi neurotransmitterski sistemi podležu patološkim promenama i doprinose nemotoričkim simptomima PB (Poewe, 2008; Schapira i sar., 2017). Neurotransmiteri kao što su ACh, serotonin, noradrenalin, glutamat i GABA, imaju važnu ulogu u patofiziologiji PB (Sanjari Moghaddam i sar., 2017).

1.4.1 Holinergički sistem

Holinergički sistem centralnog nervnog sistema sisara čine dve funkcionalno različite grupe neurona. Prvu grupu čine neuroni smešteni u okviru struktura **bazalnog prednjeg mozga**: bazalno jedro (NB, lat. *nucleus basalis*) ili Mejnertovo jedro, *substantia innominata* i *stria diagonalis* (Sarter i sar., 2009). **Holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga**, kao glavni kortikalni izvor ACh inervacije kore velikog mozga, moduliše funkcionalno i prostorno različite regione neokorteksa, talamusa, hipokampusa i amigdalnu (Ballinger i sar., 2016; Bohnen i sar., 2022). Drugu grupu čine neuroni smešteni u okviru jedara **moždanog stabla**: PPT i LDT (Newman i sar., 2012; Rye, 1997; Semba i Fibiger, 1989; Semba i Fibiger, 1992). Za razliku od holinergičkog sistema bazalnog prednjeg mozga kao dominantnog izvora direktne ACh inervacije kore velikog mozga, **holinergički sistem moždanog stabla** deluje indirektno putem talamo-kortikalnih projekcija i modulacija subkortikalnih struktura uključujući bazalni prednji mozak, hipotalamus i BG (Bohnen i sar., 2022). Važno je napomenuti da projekcije ACh neurona moždanog stabla pokazuju rostro-kaudalnu topografsku organizaciju, gde je PPT jedro koje se nalazi u rostralnom delu moždanog stabla povezano sa motornim krugovima i pretežno se projektuje na dorzolateralni strijatum (lat. *striatum dorsolateralis*), dok je LDT jedro koje se nalazi u kaudalnom delu moždanog stabla povezano sa limbičkim sistemom i projektuje se na dorzomedijalni strijatum (lat. *striatum dorsomedialis*) i *nucleus accumbens* – NAc (Dautan i sar., 2016). Pored toga, ACh neuroni su prisutni i u strijatumu, gde imaju funkciju lokalnih interneurona. Strijatum zapravo ima najveću gustinu ACh markera u mozgu, što ukazuje na značajnu, ali nedovoljno istraženu strijatnu funkciju ACh interneurona (Bohnen i sar., 2022).

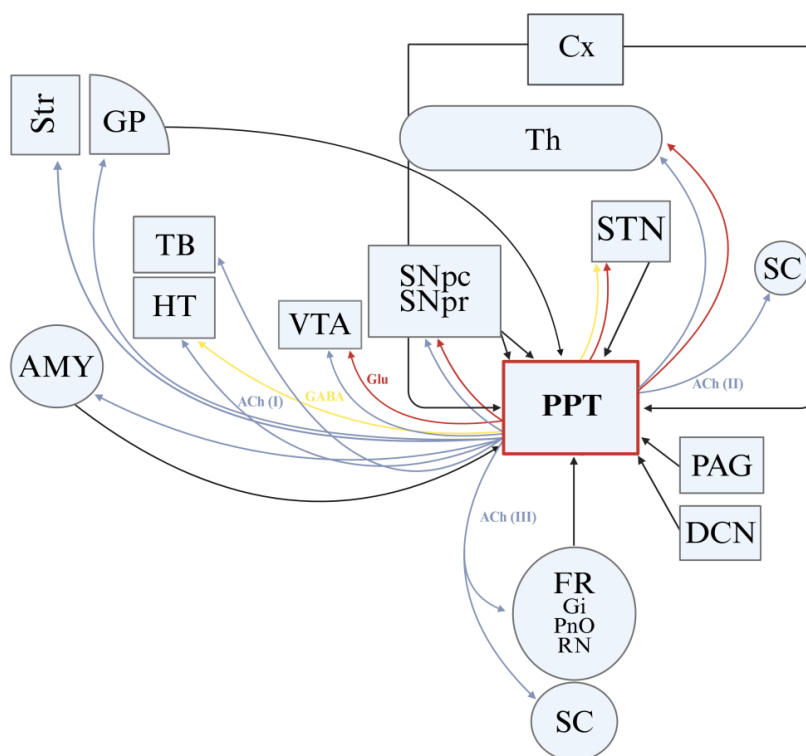
ACh sistem reguliše mnoge funkcije ljudskog ponašanja kao što su obrada senzornih informacija, pažnja, kognicija, kretanje i homeostaza budnosti i spavanja. Projekcije ACh neurona su izuzetno razgranate i inervišu različite regione mozga, pri čemu u interakciji sa drugim neurotransmitterskim sistemima imaju modulatornu, pre nego ekscitatornu ili inhibitornu funkciju (Pasquini i sar., 2021). Svoju modulatornu ulogu ACh sistem ostvaruje tako što menja ekscitabilnost neurona, utiče na presinaptičko otpuštanje neurotransmitera i koordinira aktivnost grupe neurona, pri čemu krajnji efekat (ekscitacija ili inhibicija) zavisi od mesta oslobađanja acetilholina, tipa receptora i ciljne neuronske populacije (Picciotto i sar., 2012).

Neurodegenerativne bolesti poput PB mogu ugroziti integritet ACh sistema. Dosadašnja istraživanja ukazuju da je disfunkcija i degeneracija kortikalnog i subkortikalnog ACh sistema povezana sa kompleksnom patologijom kognitivnih, posturalnih i lokomotornih poremećaja koji se javljaju kod pacijenata sa PB. Naime, neuropatološke studije, kao i *in vivo* studije oslikavanja mozga sugerišu da je poremećaj centralne ACh transmisije u PB povezan sa kognitivnim poremećajima, problemima u hodu, smrzavanjem hoda, čestim i naglim padovima, RBD-om, neuropsihijatrijskim manifestacijama i olfaktornom disfunkcijom (Pasquini i sar., 2021). Patologija bazalnog prednjeg mozga se javlja istovremeno sa nigrostrijatnom denervacijom, a degeneracija NB jedra je povezana sa visokim rizikom od razvoja kognitivnih poremećaja i demencije (Bohnen i Albin, 2011). Nasuprot tome, patologija u pontinskim jedrima može se javiti i nekoliko godina pre pojave motoričkih simptoma PB (Boeve i sar., 2007), a atrofija PPT jedra je povezana sa poremećajima hoda i ravnoteže, čestim padovima i RBD-om (Bohnen i Albin, 2011). Disfunkcije ACh i DA sistema, zajedno sa

disfunkcijom drugih neurotransmitterskih sistema, doprinose nastanku niza kliničkih manifestacija PB i stoga se „holinergički fenotip“ može identifikovati kod pacijenata koji imaju kognitivna oštećenja, padove i RBD (Pasquini i sar., 2021).

1.4.1.1 PPT jedro

PPT jedro je heterogena struktura moždanog stabla, sastoji se od glutamatergičnih, holinergičkih, GABA-ergičnih i glicinergičkih neurona (Chambers i sar., 2020; Pienaar i van de Berg, 2013) koji koeksprimiraju različite neuropeptide i neuromodule (azot-oksidi, supstancu P, atriopeptin, NADPH dijaforazu, proteine koji vezuju kalcijum kao i faktor oslobađanja kortikotropina) (Austin i sar., 1995; Chambers i sar., 2020; D’Onofrio i sar., 2015; Martinez-Gonzalez i sar., 2014; Standaert i sar., 1986; Vincent i sar., 1983). Jedro je funkcionalno podeljeno na dve komponente, **rostralni deo**, ranije označavan kao PPT *pars dissipata* (PPTd, lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus pars dissipata*), koji sadrži difuzno raspoređene GABA-ergičke, glutamatergičke i retke ACh neurone i **kaudalni deo**, ranije označavan kao PPT *pars compacta* (PPTc, lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus pars compacta*), koji se sastoji uglavnom od kompaktno raspoređenih ACh i glutamatergičkih neurona (Chambers i sar., 2020; Dautan i sar., 2016).



Slika 1.4. Aferentno-eferentne veze PPT jedra. Šematski prikaz aferentnih veza (crno) i eferentnih holinergičkih (plavo), GABA-ergičkih (žuto) i glutamatergičkih (crveno) veza PPT jedra.

ACh – acetilholin/holinergičke projekcije; **AMY** – *corpus amygdaloideum*; **Cx** – *cortex cerebri*; **DCN** – *nuclei cerebellares*; **FR** – *formatio reticularis*; **GABA** – gama-aminobuterna kiselina; **Glu** – glutamat/glutamatergičke projekcije; **Gi** – *nucleus gigantocellularis*; **GP** – *globus pallidus*; **HT** – *hypothalamus*; **PAG** – *substantia grisea periaqueductalis*; **PnO** – *nucleus pontinus oralis*; **PPT** – *nucleus tegmentalis pedunculopontinus*; **RN** – *nuclei raphes*; **SNpc** – *pars compacta substantiae nigrae*; **SNpr** – *pars reticulata substantiae nigrae*; **STN** – *nucleus subthalamicus*; **SC** – *colliculus superior*; **Str** – *striatum*; **TB** – *telencephalon basale*; **Th** – *thalamus*; **VTA** – *area tegmentalis ventralis*. Šema je kreirana korišćenjem platforme Biorender uz dozvolu izdavača Elsevier; Neurobiology of Disease; Nowacki i sar., 2019; ©2019.

Aksoni pojedinačnih neurona PPT jedra su izuzetno razgranati i inervišu udaljene moždane regione u okviru srednjeg mozga, prednjeg mozga i donjeg dela moždanog stabla (**Slika 1.4**). Rostralni deo jedra šalje projekcije prvenstveno u motorne strukture, uključujući *substantia nigra* (SN) i dorzolateralni strijatum, kao i na talamus, dok se kaudalni deo projektuje na limbičke strukture poput VTA (lat. *area tegmentalis ventralis*), dorzomedijalnog strijatuma i NAc koje igraju ključnu ulogu u procesima nagrade i motivacije (Chambers i sar., 2020; Dautan i sar., 2016). Pored toga, neuroni PPT jedra šalju silazne projekcije u jedra malog mozga, zatim i u strukture koje učestvuju u modulaciji pokreta i održavanju mišićnog tonusa poput struktura moždanog stabla kao što su *nucleus pontinus oralis* i *nucleus gigantocellularis*, i u kičmenu moždinu (Chambers i sar., 2020; Martinez-Gonzalez i sar., 2014; Spann i Grofova, 1989). Projekcije neholinergičkih neurona su daleko manje razgranate i uglavnom su usmerene na srednji mozak i produženu moždinu (Mena-Segovia i Bolam, 2017).

Na osnovu široko rasprostranjenih veza sa drugim strukturama mozga i kičmene moždine, PPT jedro je uključeno u niz neurofizioloških procesa – motoričke funkcije, regulisanje pobuđenosti i ciklusa budnost-spavanje, procesuiranje senzornih informacija i kognitivne funkcije (Mena-Segovia i Bolam, 2017). PPT jedro učestvuje u generisanju i održavanju brzih ritmova kore velikog mozga, karakterističnih za budnost i REM spavanje, doprinosi procesu senzorne integracije i obradi informacija. Zahvaljujući svojim projekcijama ka balaznom prednjem mozgu i talamusu, PPT jedro integriše funkcije kortikalnog i talamo-kortikalno ACh sistema čime kontroliše njihov sinergistički uticaj na aktivaciju kore velikog mozga (Dringenberg i Olmstead, 2003). Kada je u pitanju regulacija spavanja, posebno je važna uloga PPT jedra u kontroli REM spavanja (Lu i sar., 2006). Naime, PPT jedro ima centralnu ulogu u regulaciji celokupnog REM fenomena, uključujući i motornu kontrolu (REM atonija). Svaka komponenta REM fenomena, generisana od strane specifičnih subpopulacija neurona (aktivacija kore velikog mozga, hipokampalni teta ritam, ponto-genikulo-okcipitalni (PGO) talasi, brzi pokreti očnih jabučica, mišićna atonija, disregulacija disanja i srčanog ritma) je modulirana od strane PPT jedra (Datta i McLean, 2007). Zahvaljujući recipročnim vezama sa strukturama BG, posebno sa izlaznim jedrima i subtalamičkim jedrom (STN, lat. *nucleus subthalamicus*), PPT jedro utiče na aktivnost BG. Ova veza je od izuzetne važnosti za fiziološku funkciju obe strukture. Istovremeno sa kontrolnom funkcijom, PPT jedro ima relejnu funkciju jer predstavlja strukturu preko koje BG ostvaruju vezu sa kičmenom moždinom (Mena-Segovia i sar., 2004).

ACh neuroni takođe podležu neurodegeneraciji u PB. Neuropatološke studije su potvrdile značajan gubitak (40% – 50%) ACh neurona u PPT jedru pacijenata sa PB (Hirsch i sar., 1987; Rinne i sar., 2008) i direktno povezale motoričke simptome poput akinezije i poremećaja hoda, ravnoteže i čestih padova sa ACh deficitom (Bohnen i sar., 2013). Smanjena ACh inervacija talamusa kod PB pacijenata koji su skloni padovima (Bohnen i sar., 2012), kao i drastično smanjenje broja padova nakon terapije inhibitorima acetilholinesteraze (Chung i sar., 2016), dodatno potvrđuju povezanost između narušenog integriteta ACh sistema PPT jedra i poremećaja hoda, kao i posturalne nestabilnosti. Pored toga, subkortikalna ACh denervacija na nivou talamusa povezana je i sa RBD-om (Bohnen i Albin, 2011).

1.4.2 Dopaminergički sistem

Dopamin je neurotransmiter koji igra ključnu ulogu u funkcionisanju nervnog sistema i uključen je u brojne fiziološke procese koji obuhvataju regulaciju voljnih pokreta, kognitivne funkcije i memoriju, modulaciju raspoloženja, kontrolu apetita, regulacija endokrinog sistema i regulaciju ciklusa spavanja i budnosti (Speranza i sar., 2025). Kao deo mezolimbickog sistema za nagrađivanje DA sistem je ključan za osećaj zadovoljstva i motivaciju (Salamone i Correa, 2012). DA se sintetise u kateholaminskim neuronima kao intermedijer tokom formiranja noradrenalina i adrenalina (Stokes i sar., 1999; Zhou i sar., 2023).

DA neuroni čine heterogenu grupu ćelija lokalizovanih u srednjem mozgu, međumozgu i olfaktornim bulbusima. Iako nisu preterano brojni, ovi neuroni su izuzetno razgranati i imaju snažan uticaj na brojne funkcije mozga. Skoro svi DA neuroni nalaze se u ventralnom delu srednjeg mozga grupisani u okviru SNpc jedra, VTA regiona i retrorubralnog polja (Arias-Carrión i sar., 2010; Björklund i Dunnett, 2007). Projekcije ovih neurona idu ka medijalnom snopu prednjeg mozga (MFB, lat. *fasciculus medialis telencephali*) i unutrašnjoj čauri (ic, lat. *capsula interna*), odakle dalje divergiraju ka ciljnim strukturama. Generalno, DA sistem srednjeg mozga je organizovan u tri transmisiona puta (Hung i Lee, 1998; Moore i Bloom, 1978; Sanjari Moghaddam i sar., 2017):

- (1) **nigrostrijatni (mezostrijatni) put** koji je pretežno uključen u motornu kontrolu – projekcije koje dominantno polaze iz SNpc-a do strijatuma (repatu jedro – NC, lat. *nucleus caudatus* i putamen – lat. *putamen*);
- (2) **mezolimbički put** koji primarno reguliše emocionalna stanja – projekcije koje dominantno polaze od VTA do NAc;
- (3) **mezokortikalni put** koji reguliše više kognitivne (poput pažnje, radne memorije, donošenja odluka, planiranja i kontrole ponašanja) i izvršne funkcije – projekcije koje dominantno polaze od VTA ka kori velikog mozga, naročito PFC.

Disfunkcija DA sistema povezana je sa mnogim patološkim stanjima, uključujući PB (Zhou i sar., 2023). Mehanizam kojim DA doprinosi neurodegeneraciji je izuzetno složen. Glavna patološka karakteristika PB je progresivni gubitak DA neurona i posledično smanjenje nivoa DA u SNpc jedru i strijatumu. Poremećaj sinteze, vezikularnog skladištenja, transporta i metaboličke razgradnje DA su faktori koji promovišu neurodegeneraciju DA neurona u različitim modelima PB. Poznato je da poremećaj funkcije mitohondrija i oksidativni stres značajno doprinose razvoju PB. Specifičan oksidativni stres u DA neuronima nastaje autooksidacijom citosolnog DA pri čemu se stvaraju hinoni i slobodni radikali koji dovode do smrti DA neurona (Zhou i sar., 2008; Zhou i Lim, 2009; Zhou i sar., 2023).

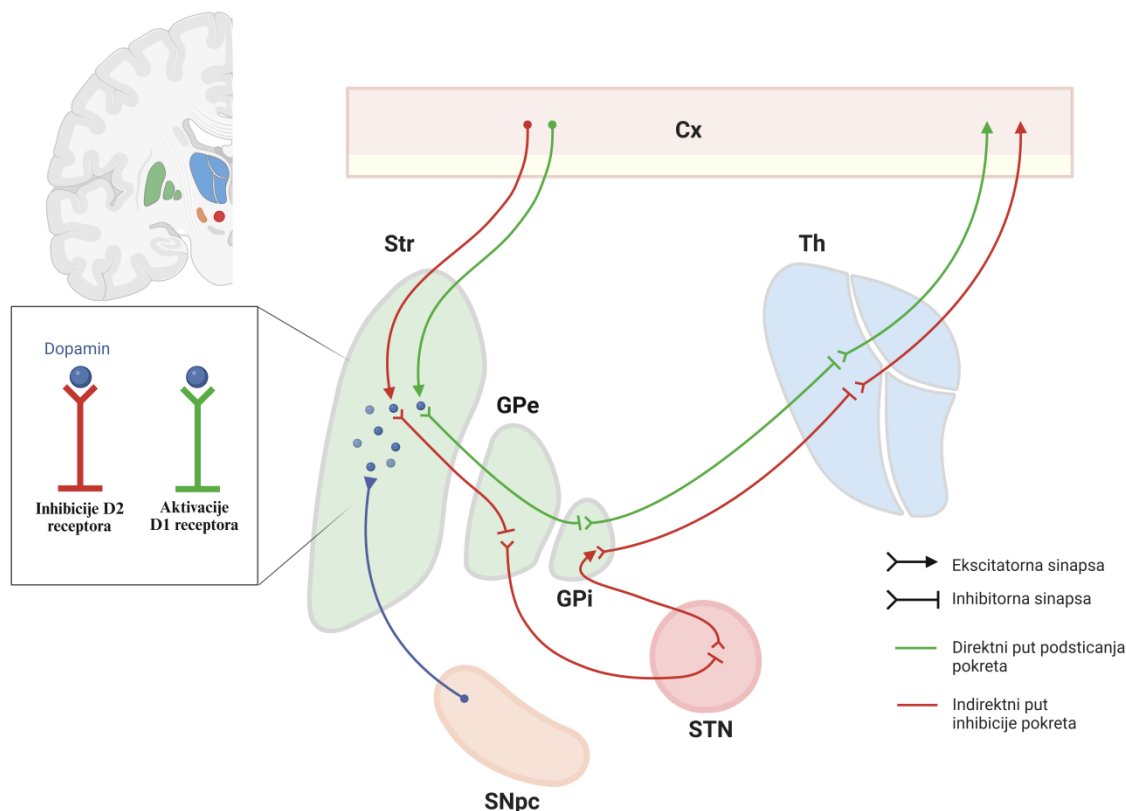
1.4.2.1 SN jedro

Crna supstanca (lat. *substantia nigra* – SN) je DA jedro srednjeg mozga koje ima ključnu ulogu u modulaciji pokreta i funkcijama nagrađivanja kao deo mreže BG (Hodge i Butcher, 1980). Jedro je funkcionalno i morfološki podeljeno na dva dela: *pars compacta* (SNpc, lat. *pars compacta substantiae nigrae*) koji sadrži DA neurone i *pars reticulata* (SNpr, lat. *pars reticulata substantiae nigrae*) sa inhibitornim GABA-ergičkim neuronima. DA deo jedra (SNpc) se projektuje na dorzalni strijatum i klasično se smatra primarnim ulazom u kolo BG. Ove projekcije se označavaju kao nigrostrijatni put i imaju važnu ulogu u motornoj kontroli. GABA-ergički deo jedra (SNpr) se projektuje na talamus i predstavlja izlaz iz BG (Guatteo i sar., 2009).

BG predstavljaju grupu međusobno povezanih subkortikalnih jedara koja kontrolišu funkcije kao što su voljni pokreti, planiranje, emocije i sistem nagrađivanja, pa čak i kognicija i memorija (Lanciego i sar., 2012). BG pored SN čine još i strijatum (dorzalni strijatum: putamen i NC); ventralni strijatum: NAc i olfaktorne tuberkule), STN i blede jedro (GP, *globus pallidus*) koje sadrži unutrašnji (GPi, lat. *globus pallidus internus*) i spoljašnji deo (GPe, lat. *globus pallidus externus*). Svaka od ovih struktura ima složenu anatomsku, funkcionalnu i neurohemijsku organizaciju. BG su anatomski i funkcionalno podeljene u krugove koji obrađuju različite tipove informacija. Osnovni neuronski krug zadužen za finu kontrolu voljnih pokreta, povezuje moždanu koru, strijatum, palidum i ponovo se vraća na moždanu koru. Generalno, strijatum i STN predstavljaju glavni ulaz u BG (primaju ekscitatorne glutamatergičke projekcije korteksa i talamusa), dok GPi (zajedno sa SNpr) predstavlja izlaz iz BG koji je isključivo inhibitorni i koji se preko talamusa dalje projektuje na motornu koru (Sanjari Moghaddam i sar., 2017). Palidum (GPe i GPi) povezuje ulaz i izlaz BG i ima veoma važnu funkciju u modulaciji motornog obrasca. SNpc, kao deo ovog sistema, ima ulogu u modulaciji

aktivnosti BG. DA neuroni iz ove strukture ostvaruju sinaptičke projekcije ka dvema odvojenim populacijama neurona. Prvu populaciju čine neuroni koji ekspimiraju D1 receptore i formiraju inhibitorne projekcije ka GPi, čime učestvuju u direktnom putu BG. Drugu populaciju predstavljaju neuroni koji ekspimiraju D2 receptore i formiraju projekcije preko GPe, koji dalje inhibira STN, čineći indirektan put BG. BG prvenstveno funkcionišu po principu dezinhibicije. Direktni put dovodi do direktne inhibicije GPi, dok indirektni put posredno dovodi do stimulacije GPi. Interakcija ova dva puta uspostavlja ravnotežu aktivnosti u GPi, koja je ključna za regulaciju iniciranja motoričkog odgovora. GPi se kao glavno izlazno jedro BG projektuje ka motoričkim jedrima talamusa i na taj način učestvuje u kontroli početka motoričkog odgovora. U zavisnosti od balansa između ekscitatornog direktnog puta i inhibitornog indirektnog puta, odgovor može biti ili inhibicija neželjenog motoričkog odgovora, putem inhibicije talamičkih jedara ili dezinhibicija motoričkog izlaza, čime se talamusu omogućava da stimuliše motornu koru (Sonne i sar. 2024). Na **Slici 1.5** je prikazana ova složena fiziološka i anatomska organizacija BG.

Oštećenje ili disfunkcija BG dovodi do poremećaja pokreta, ali može uzrokovati i značajne deficite u drugim nervnim funkcijama kao što su kognicija, percepcija i intelektualne funkcije (Fazl i Fleisher, 2018). Odavno je poznato da degeneracija nigrostrijatnog puta vodi u PB. Selektivno odumiranje DA neurona u SNpc jedru i smanjenje strijatnog DA dovodi do pojave motoričkih simptoma PB. Gubitak DA i sinaptičke promene predstavlja ključni patofiziološki mehanizam koji dovodi do disfunkcije kortiko-strijatnih veza (Zhou i sar., 2023). Narušena neurohemijska interakcija između elemenata BG i narušen balans između direktnog i indirektnog puta, sa prekomernom aktivnošću indirektnog puta (manjak dezinhibicije) i smanjenom aktivnošću direktnog puta (povećanje inhibicije), dovodi do pada aktivnosti korteksa i porasta neadekvatne kortikalne aktivnosti što dovodi do hipokinetskog poremećaja (Calabresi i sar., 2014).



Slika 1.5. Šematski prikaz anatomske i funkcionalne organizacije bazalnih ganglija.

Cx – cortex cerebri; **SNpc** – pars compacta substantiae nigrae; **GPe** – globus pallidus externus; **GPI** – globus pallidus internus; **STN** – nucleus subthalamicus; **Str** – striatum; **Th** – thalamus. Šema je napravljena uz pomoć Biorender platforme.

1.4.3 GABA-ergički sistem

GABA je glavni inhibitorni neurotransmiter centralnog i perifernog nervnog sistema čija je osnovna funkcija regulacija ekscitatorno/inhibitornog (E/I) balansa u mozgu (Alharbi i sar., 2024). Kao jedan od najrasprostranjenijih neurotransmitera, GABA je prisutna u skoro svim moždanim regionima, posebno u hipokampusu, talamusu, BG, hipotalamusu i moždanom stablu. Smatra se da GABA učestvuje u oko 40% inhibitornih sinapsi (Ochoa de la Paz i sar., 2021) i da je primarno oslobađaju lokalni interneuroni u cilju regulacije kortikalnih i subkortikalnih neuronskih mreža. GABA-ergička signalizacija moduliše široki spektar fizioloških funkcija uključujući senzornu percepciju, obradu informacija, kognitivne funkcije, kao i spavanje (Błaszcyk, 2016).

Svoju inhibitornu funkciju GABA ostvaruje preko dva osnovna tipa receptora, jonotropnih GABA_A i GABA_C receptora (ligand-zavisan Cl⁻ jonski kanal; GABA_AR i GABA_CR) i metabotropnog GABA_B receptora (vezan za G protein; GABA_BR) (Mahul-Mellier i sar., 2020). Aktivacija GABA_AR izaziva brzu inhibiciju sinaptičke transmisije usled hiperpolarizacije postsinaptičke membrane. U slučaju GABA_BR, odgovor je spora i produžena inhibicija. Međutim, u zavisnosti da li se radi o presinaptičkom ili postsinaptičkom GABA_BR, krajnji efekat može biti inhibicija ili dezinhibicija sinaptičke aktivnosti (Ochoa-de la Paz i sar., 2021).

GABA je glavni neurotransmiter spavanja (Gottesmann, 2002; Saper i Fuller., 2017). Regulacija spavanja je izuzetno složena i uključuje mnoge neurotransmitterske sisteme među kojima GABA-ergički sistem zauzima posebno mesto. Naime, spavanje započinje aktivacijom GABA-ergičkih neurona VLPO jedra koji dalje inhibiraju specifične populacije neurona, zadužene za regulaciju budnosti (histaminergički neuroni tuberomamilarnog jedra, oreksin/hipokretin neuroni lateralnog hipotalamusa, noradrenergički neuroni LC, serotonergički neuroni DR, ACh neuroni PPT/LDT jedra). GABA na ovaj način suprimira oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera budnosti i podstiče spavanje, posebno NREM spavanje (Lu i sar., 2006). Poznato je da GABA agonisti poput barbiturata i benzodiazepina koji se već decenijama koriste u kliničkoj praksi za lečenje insomnije, pojačavaju GABA efekat u mozgu i doprinose poboljšanju kvaliteta sna (Gottesmann, 2002). Pored toga, GABA agonisti se koriste i u analgeziji i anesteziji. Supstance poput propofola i pentobarbiturata spadaju u GABA anestetike koji svoju sedativnu i hipnotičku aktivnost ostvaruju aktiviranjem endogenog puta za regulaciju NREM spavanja (Nelson i sar., 2002).

GABA-ergički sistem ima veoma veliki i fiziološki i patofiziološki značaj. Naime, GABA disregulacija je uzrok mnogih neuroloških i psihijatrijskih poremećaja, kao što su epilepsija, anksioznost, šizofrenija, depresija, alkoholizam, zatim poremećaji spavanja kao što je insomnija, kao i neurodegenerativnih bolesti poput fronto-temporalne demencije, Hantingtonove horee, AB i PB. Sa druge strane, modulacija GABA-ergičke transmisije je osnova mnogih farmakoloških tretmana koji se intenzivno koriste u neurologiji, psihijatriji i anesteziji (Zhang i sar., 2021).

Disfunkcija GABA-ergičkog sistema je važan deo patofiziologije PB. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su prodromalne nemotoričke manifestacije PB, kao i neki motorički fenomeni bolesti, nesumnjivo povezani sa izmenjenom GABA-ergičkom neurotransmisijom (Błaszcyk, 2016; Murueta-Goyena i sar., 2019). Smatra se da GABA ima važnu funkciju u regulaciji inhibitornog tonusa BG-a kao i u sprečavanju kortikalne hiperekscitacije. Nedavno je kod pacijenata sa PB potvrđena GABA-ergička disregulacija u BG (O’Gorman Tuura i sar., 2018), kao i smanjena ekspresija dva najvažnija GABA markera (GAD-67, dekarboksilaza glutaminske kiseline-67 i PV, Ca²⁺-vezujući protein parvalbumin), u regionu dorzolateralnog PFC (Murueta-Goyena i sar., 2019). Pored toga, pokazano je da GABA agonisti ublažavaju motoričke simptome bolesti i štite DA neurone u mišjem modelu PB (Hajj i sar., 2015; Lozovaya i sar., 2018), ublažavaju simptome RBD fenotipa

u transgenim miševima koji nastaje kao posledica deficita inhibicije posredovane glicinom i GABA_A receptorima (Brooks i Peever, 2011).

1.4.3.1 Parvalbuminski interneuroni

GABA-ergički interneuroni imaju esencijalnu ulogu u održavanju E/I balansa u CNS-u. Ovi neuroni pokazuju izuzetnu varijabilnost u pogledu anatomskih, molekularnih i fizioloških svojstava. Jedna od osnovnih klasifikacija GABA neurona zasniva se na ekspresiji specifičnih molekularnih markera i prema ovoj klasifikaciji moguće je razlikovati 5 grupa GABA-ergičkih neurona koji eksprimiraju (Nahar i sar., 2021):

- (1) Ca²⁺-vezujući protein parvalbumin (PV);
- (2) neuropeptid somatostatin (SOM);
- (3) neuropeptid Y (NPY);
- (4) vazoaktivni intestinalni peptid (VIP);
- (5) holecistokinin (CCK).

Poseban značaj u patofiziologiji PB imaju GABA-ergički neuroni koji eksprimiraju PV (PV+ interneuroni). PV+ interneuroni predstavljaju glavni tip GABA-ergičkih inhibitornih neurona u mozgu i karakterišu se kratkotrajnim akcionim potencijalima i visokom frekvencijom generisanja i odašiljanja akcionih potencijala (Hijazi i sar., 2020). Ovi interneuroni su gusto povezani sa drugim PV+ i ne-PV+ neuronima putem hemijskih i električnih sinapsi, i imaju funkciju u modulaciji neuronske ekscitabilnosti. Zahvaljujući izuzetno razgranatoj dendritskoj mreži PV+ interneuroni primaju ulaze raznih aferentnih puteva, dok sa druge strane preko brojnih aksonskih završetaka ostvaruju sinapsu sa ekscitatornim neuronima, što skupa doprinosi integriranoj inhibitornoj kontroli, kako lokalnih, tako i udaljenih neuronskih mreža (Hijazi i sar., 2020; Klausberger i Somogyi, 2008; Klausberger, 2009). Kao Ca²⁺-vezujući protein, PV reguliše koncentraciju i metabolizam ćelijskog Ca²⁺ i na taj način kontroliše efikasnost inhibicije. Pored uloge u inhibiciji, PV+ interneuroni učestvuju i u regulaciji senzornih odgovora, generisanju i održavanju gama oscilacija u hipokampusu, učenju i plastičnosti (Hu i sar., 2014; Ruden i sar., 2021). GABA-ergički PV neuroni su ključni za procese pamćenja, posebno za proces konsolidacije prostorne memorije u hipokampusu (Ognjanovski i sar., 2017; Verret i sar., 2012; Yi i sar., 2014).

Disfunkcija PV+ GABA-ergičkih inhibitornih neurona doprinosi patofiziologiji nekoliko važnih neuropsihijatrijskih poremećaja uključujući šizofreniju, autizam, bipolarnu poremećaje, neurodegenerativne bolesti, starenje i kognitivne poremećaje (Hijazi i sar., 2020). Smatra se da su promene GABA-ergičkog signalnog puta u neuropatologiji PB usko povezane sa poremećajem Ca²⁺ ćelijske signalizacije (Błaszczuk, 2016). Sve moždane strukture, iako anatomski i fiziološki različite, koriste isti mehanizam kontrole aktivnosti i metabolizma koji se zasniva na složenoj interakciji između GABA/Ca²⁺-zavisne neurotransmisije i ćelijskog Ca²⁺ metabolizma. Ovim GABA/Ca²⁺ mehanizmom se relativno brza aktivnost neurona prilagođava i usklađuje sa znatno sporijim biohemijskim i metaboličkim procesima u ćeliji (Błaszczuk, 2016). Aktivacija GABA receptora rezultira dugotrajnom inhibicijom sinaptičke transmisije. Za to vreme voltažno-zavisni kanali za Ca²⁺ su blokirani, što ćeliju štiti od Ca²⁺ toksičnosti (nema daljeg influksa Ca²⁺) i daje joj vremena da ukloni višak Ca²⁺ jona. Ovaj proces je izuzetno zahtevan, kako energetski, tako i vremenski. U slučaju poremećaja mitohondrijalne funkcije, dugotrajno unutarćelijsko opterećenje Ca²⁺ dovodi do oksidativnog stresa što doprinosi daljoj neurodegeneraciji (Alharbi i sar., 2024; Błaszczuk, 2016). Patološka akumulacija Ca²⁺ u kombinaciji sa agregacijom α -sin proteina oštećuje DA neurone izazivajući ekscitotoksičnost i apoptozu. Smatra se da je u PB odumiranje DA neurona u SNpc jedru posledica smanjenja sposobnosti GABA-ergičkog sistema da reguliše količinu Ca²⁺ koja ulazi u ćelije (Alharbi i sar., 2024; Filipovic i sar., 2013).

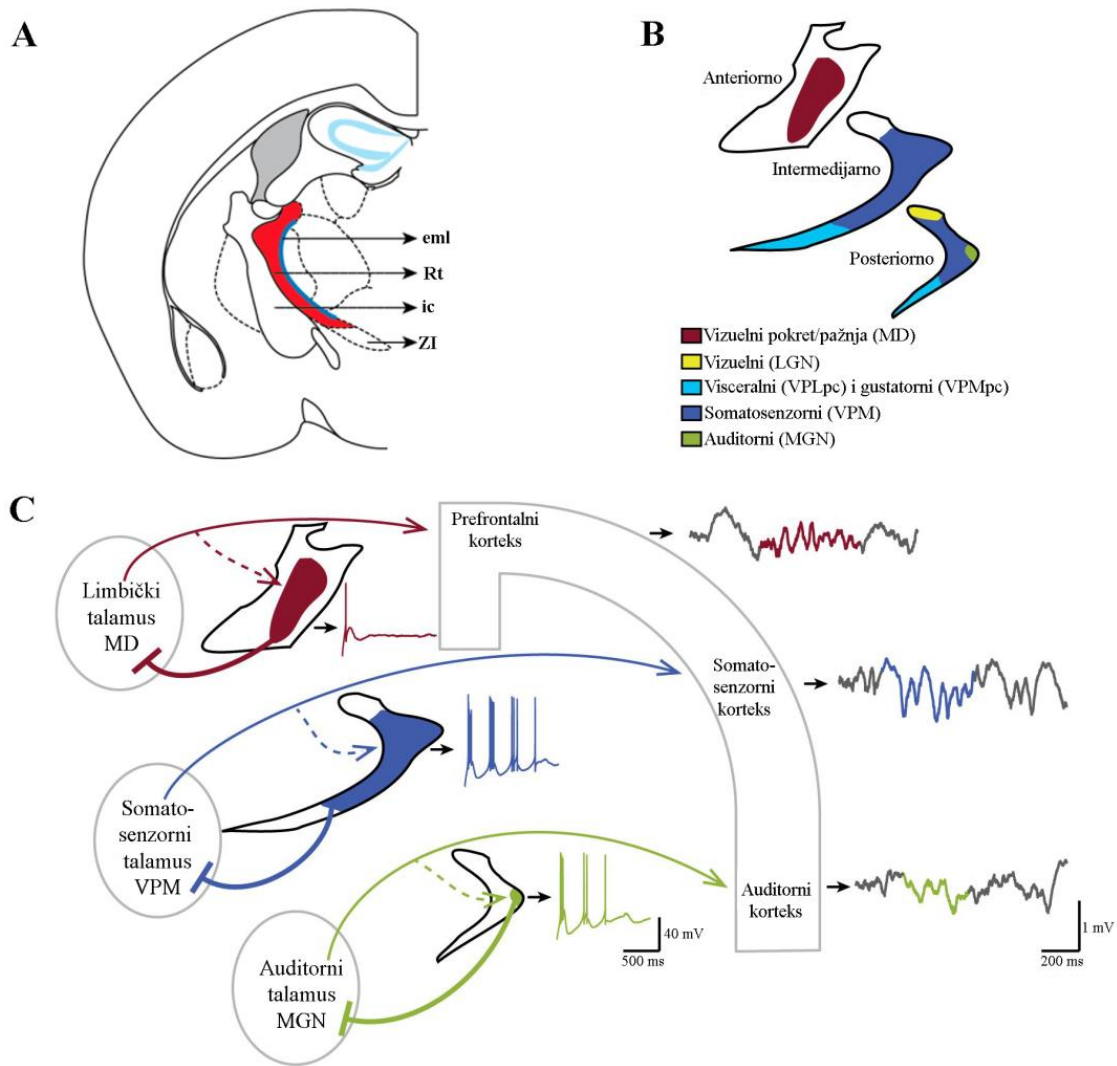
1.5 Retikulo-talamičko jedro

RT jedro je veoma važna struktura talamusa, sastavljena od tankog sloja GABA-ergičkih neurona koji su međusobno povezani hemijskim i električnim sinapsama i okružuju ostala talamička jedra (Landisman i sar., 2002). RT jedro je jedno od naistaknutijih moždanih jedara koje sintetiše GABA-u i predstavlja glavni izvor inhibicije svih talamičkih jedara (Fernandez i Lüthi, 2020). Pored GABA-e, većina RT neurona eksprimira i PV (Lüthi, 2014).

Ovo jedro generalno pokazuje veliku anatomsku, morfološku i neurohemijsku heterogenost, a funkcionalno je podeljeno na nekoliko delimično preklapajućih domena koji primaju topografski organizovane senzorne informacije (Pinault, 2004; Vantomme i sar., 2019). Prema poretku subkortikalnih i kortikalnih aferentnih i talamičkih eferentnih projekcija moguće je razlikovati: (1) **postero-dorzalni deo** koji je povezan sa obradom auditornih, vizuelnih i somatosenzornih modaliteta; (2) **ventralni deo** koji je uključen u obradu gustatornih i visceralnih informacija; (3) **anteriorni deo** koji je povezan sa motoričkim i limbičkim strukturama. Svaka od ovih primarnih senzornih RT zona je topografski povezana sa različitim talamičkim jedrima i odgovarajućim kortikalnim regionima (Vantomme i sar., 2019).

Primarne ulazne projekcije RT jedra dolaze iz korteksa i talamusa. Ove aferentne projekcije su glutamatergičke i ekscitatorne. Pored toga, RT jedro prima GABA-ergičke, ACh, serotonergičke i DA projekcije. Masivne GABA-ergičke projekcije dolaze iz GPe (Kayahara i Nakano, 1998), SNpr jedra (Gulcebi i sar., 2012) i neurona bazalnog prednjeg mozga (Jourdain i sar., 1989). ACh inervacija RT jedra potiče od bazalnog prednjeg mozga, PPT i LDT jedra moždanog stabla (Beierlein, 2014). DA inervacija dolazi iz SNpc jedra (Anaya-Martinez i sar., 2006), dok serotonergička inervacija potiče od DR (Pratt i Morris, 2015). Eferentne RT projekcije idu ka svim jedrima talamusa, kao i ka talamo-kortikalnim neuronima (TC neuroni). Projekcije ka talamusu su topografski dobro organizovane tako da pojedinačni RT neuroni inervišu ograničene teritorije unutar pojedinačnih jedara talamusa (Pinault, 2004; Takata, 2020).

RT jedro ima bitnu ulogu u modulaciji senzornih informacija i regulaciji talamo-kortikalnih komunikacija. Sve senzorne informacije osim olfaktornih prolaze kroz talamus. Međutim, ovo je jedino jedro talamusa koje se ne projektuje na korteks, iako je izuzetno inervisano od strane korteksa. Stoga se modulacija senzornih informacija odvija kroz modulaciju informacija koje prolaze kroz talamus preko drugih jedara. Obezbeđujući GABA-ergičku inhibitornu kontrolu putem povratne sprege, RT jedro kontroliše komunikaciju između talamičkih jedara, kao i talamo-kortikalne petlje. S obzirom da primarne aferentne (ekscitatorne) projekcije RT jedra dolaze od korteksa i talamusa, a eferentne (inhibitorne) projekcije idu nazad ka talamusu, RT jedro ima ulogu senzorne kapije koja kontroliše protok informacija ka korteksu (Takata, 2020).



Slika 1.6. Topografska organizacija retikulo-talamičkog jadra. Retikulo-talamičko (RT) jedro je heterogeno jedro koje moduliše lokalno spavanje kroz paralelne talamo-kortikalne petlje. (A) Šematski prikaz koronalnog preseka mozga miša koji prikazuje anatomske položaje RT jadra. Preuzeto i modificirano iz Vantomme, 2020. (B) Šematski prikaz anteriornog, intermedijarnog i posteriornog dela RT jadra kao i uloge u različitim funkcionalnim modalitetima. (C) Koronalne šeme prikazuju tri paralelne talamo-kortikalne petlje, naglašavajući važnost topografski različitih obrazaca pražnjenja RT neurona u različitim funkcionalnim zonama RT jadra, kao i njihov uticaj na lokalnu aktivnost korteksa. Šeme (B i C deo) su preuzete iz Vantomme i sar., 2019 i modificirane.

Rt – *nucleus reticularis thalami*; **eml** – *lamina medullaris externa*; **ic** – *internal capsule*; **ZI** – *zona incerta*; **MD** – *nucleus mediodorsalis thalami*; **LGN** – *nucleus geniculatus lateralis thalami*; **VPLpc** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami, pars parvocellularis*; **VPMpc** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami, pars parvocellularis*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **MGN** – *nucleus geniculatus medialis thalami*.

Pored uloge u modulaciji senzornih informacija, RT jedro ima ključnu ulogu i u generisanju ritmova spavanja (delta ritam – 0,5-4 Hz i sporotalasne oscilacije – < 0,5 Hz), posebno u generisanju vretena spavanja (Pratt i Morris, 2015; Vantomme i sar., 2019). Vretena spavanja (SS, engl. *sleep spindles*) su specifični obrasci moždane aktivnosti i predstavljaju jednu od glavnih karakteristika prelaznih NREM/REM faza spavanja. U EEG signalu SS se detektuju kao kratkotrajne (0,5 – 3 s) sinusoidalne oscilacije u sigma frekventnom opsegu (10-15 Hz) čija amplituda postepeno raste, a

zatim opada, zbog čega oblikom podsećaju na vreteno (De Gennaro i Ferrara, 2003; Fernandez i Lüthi, 2020). Njihova osnovna uloga je regulacija protoka senzornih informacija ka korteksu, čime doprinose kontinuitetu sna, konsolidaciji memorije i sinaptičkoj plastičnosti (Fernandez i Lüthi, 2020; Fogel i Smith, 2011; Urakami, 2012). SS nastaju kao rezultat interakcije više moždanih regiona, uključujući TC i RT neurone, hipokampus i neokorteks: primarno se generišu u talamusu i projektuju ka neokorteksu, dok hipokampus aktivno učestvuje u njihovoj funkcionalnoj integraciji, posebno tokom procesa konsolidacije memorije (Sullivan i sar., 2014; Warby i sar., 2014). Za razliku od SS, visokovoltazna vretena (HVS, engl. *high voltage spindles*) su spontane sinhronizovane oscilacije u vidu šiljak-talas kompleksa, nalik na epileptogenu aktivnost, ali frekvencije 6-9 Hz i trajanja 1-4 s (Buzsáki i sar., 1990). Ovaj oblik vretena je karakterističan za glodare i uglavnom se javlja tokom mirnog budnog stanja ili u stanju imobilnosti životinje. Sklonost ka pojavi HVS varira među različitim sojevima glodara, a i u okviru istog soja nisu sve jedinke podjednako podložne pojavi ovih vretena. Pored toga, starost životinje u velikoj meri korelira sa incidencom HVS (Radek i ar., 1994). Nastanak HVS u velikoj meri zavisi od ACh i DA neuromodulatornog tonusa i njihovog uticaja na RT kao generatora ritma (Buzsáki i sar., 1990). Karakteristike SS i HVS vretena, uključujući njihovu gustinu, frekvenciju i trajanje, a u slučaju HVS vretena i njihovu pojavu, odražavaju integritet neuronskih mreža uključenih u njihovo generisanje (Warby i sar., 2014). Njihove izmene mogu imati značajnu dijagnostičku vrednost u različitim patološkim stanjima poput autizma (Farmer i sar., 2018), šizofrenije (Castelnovo i sar., 2025), poremećaja pažnje sa hiperaktivnošću (Özbudak i sar., 2022; Ruiz-Herrera i sar., 2021), ali i neurodegenerativnih bolesti poput AB (Weng i sar., 2020) i PB (Christensen i sar., 2015; Latreille i sar., 2015).

U osnovi ovih oscilacija nalazi se recipročna veza između ekscitatornih TC neurona i inhibitornih RT neurona (Steriade i sar., 1993; Pinault, 2004). Smatra se da su PV+ neuroni u RT jedru zbog svojih elektrofizioloških karakteristika, glavni generator vretena spavanja (Clemente-Perez i sar., 2017). Ova neuronska mreža je takođe odgovorna i za generisanje gama ritma (30-90 Hz) koji ima funkciju u modulisanju ulaznih ACh i monoaminergičkih projekcija RT jedra (Pinault i Deschênes, 1992). Osim toga, nedavno je sugerisano da RT jedro putem paralelnih talamo-kortikalnih petlji učestvuje i u regulaciji heterogenosti spavanja (Vantomme i sar., 2019). Naime, RT jedro prima ekscitatorne kortikalne projekcije i deo je recipročno i topografski povezanih talamo-kortikalnih petlji (Vantomme i sar., 2019). U ovoj mreži kortikalna aktivnost bi mogla da pokreće RT jedro koje bi za uzvrat topografski uticalo na koru velikog mozga. Kako se RT neuroni međusobno razlikuju po svojim elektrofiziološkim karakteristikama (Fernandez i sar., 2018), a uz to imaju i topografski specifične projekcije, krajnji efekat na koru velikog mozga je lokalnog karaktera (Vantomme i sar., 2019).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da talamo-kortikalna funkcija može biti ugrožena neuropatologijom PB, što može doprineti daljem razvoju bolesti. Naime, GABA-ergički neuroni RT jedra su osetljivi na promene u aktivnosti DA neurona, tako da promene DA inervacije talamusa mogu uticati na oslobađanje GABA i inhibitornu funkciju RT jedra (Contreras-Murillo i Magdaleno-Madrigal, 2020). Ove promene su heterogene, počinju u premotornoj fazi parkinsonizma i mogu uticati na mnoge nemotoričke fenomene bolesti, kao što su poremećaji pažnje, izvršnih funkcija i spavanja (Monje i sar., 2020).

1.6 Sinapsa i sinaptički proteini

Jedno od najvažnijih i najfascinantnijih svojstava mozga kičmenjaka, a naročito sisara, jeste njegova plastičnost, odnosno sposobnost mozga da se menja i prilagođava kao rezultat iskustva. U osnovi ovog procesa nalazi se sinaptička plastičnost. Sinapsa je osnovna strukturna i funkcionalna komponenta komunikacije između neurona u mozgu i karakteriše se dinamičnim promenama. Jačina i efikasnost postojećih sinapsi se menjaju u zavisnosti od aktivnosti sinaptičke transmisije, što se označava kao sinaptička plastičnost. Kao rezultat neuronske aktivnosti, sinaptička transmisija može

biti pojačana ili smanjena u okviru postojećih sinapsi, ali se takođe mogu formirati nove ili eliminisati suvišne i stare sinapse (Citri i Malenka, 2008).

Sinaptička plastičnost je veoma osetljiva i može biti narušena različitim patološkim stanjima. Kako bi se obezbedio efikasan prenos informacija između neurona, sinapsa mora biti anatomski intaktna. Narušavanje sinaptičke strukture može ozbiljno ugroziti sinaptičku funkciju, što dovodi do izmene u aktivnosti neuronskih mreža i dalje do kliničke manifestacije bolesti. Neurodegenerativne bolesti često rezultiraju gubitkom sinaptičkih veza između neurona, što može biti posledica degeneracije neurona ili poremećaja u komunikaciji između neurona. Promene u strukturi i funkciji sinaptičkih veza mogu uzrokovati njihovu disfunkciju, što može rezultirati smanjenom sposobnošću neurona da prenose signale ili da komuniciraju sa drugim neuronima. Razumevanje mehanizama sinaptičke reorganizacije je od ključne važnosti za razvoj terapijskih strategija usmerenih na usporavanje ili zaustavljanje napredovanja neurodegenerativnih bolesti.

1.6.1 Protein 2 povezan sa mikrotubulama

Neurone, kao osnovne jedinice nervnog sistema, čija je funkcija obrada informacija, karakteriše složena morfologija. Neuroni poseduju aksoni i dendrite koji im omogućavaju uspostavljanje sinaptičkih veza na visoko regulisan način. Osim toga, zreli neuroni su podvrgnuti malim plastičnim promenama koje im služe za regulisanje sinaptičkog prenosa. Svaki korak razvoja neurona je genetski kontrolisan endogenim determinantama, kao i signalima iz okoline, uključujući i međucelijske kontakte, vanćelijski matriks i difuzione signale. Komponente citoskeleta su među glavnim proteinskim metama koje podležu promenama kao odgovor na većinu vanćelijskih signala koji na kraju određuju i samu morfologiju neurona (Sánchez i sar., 2000).

Mikrotubule predstavljaju komponentu citoskeleta, a sastavljene su od heterodimera α - i β -tubulina. Imaju centralnu ulogu u transportu organela, rastu i izduživanju aksona i ćelijskoj arhitekturi u neuronima. Polimerizacija, stabilizacija i raspored mikrotubula mogu biti modulirani u interakciji sa nizom proteina koji su povezani sa mikrotubulama (MAP, engl. *microtubule associated protein*). Na osnovu molekulske težine ovi proteini se dele u dve grupe: Tip I koja obuhvata, familiju MAP1A/MAP1B i Tip II koja se sastoji od neuronskih MAP2 – protein 2 povezan sa mikrotubulama (engl. *microtubule associated protein 2*) i tau proteina i ne-neuronskih proteina MAP3/MAP4. U mozgu sisara postoje dve izoforme MAP2 proteina: MAP2 visoke molekulske težine (HMWMAP2) i MAP2 niske molekulske težine (LMWMAP2). HMWMAP2 se sastoji od MAP2a i MAP2b koji su zasebno eksprimirani u neuronima, dok LMWMAP2 uključuju MAP2c i MAP2d koji su prisutni u ćelijama glije (Shin i sar., 1991; Zhang i Dong, 2012).

Jedan od glavnih mehanizama kojim se kontroliše citoskelet neurona je modifikacija putem fosforilacije proteina, odnosno promena u relativnim aktivnostima protein kinaza i fosfataza unutar neurona. Proteini MAP2 familije predstavljaju značajnu i brojnu komponentu citoskeleta, ali i supstrat za većinu protein kinaza i fosfataza u neuronima (Zhang i Dong, 2012). Fosforilacija je jedna od najvažnijih posttranslacionih modifikacija proteina mikrotubula. *In vivo* studije su pokazale da fosforilacija utiče na sposobnost MAP2 da veže i stabilizuje mikrotubule i razvojno je regulisana. Proces fosforilacije kontrolišu specifične protein kinaze i fosfataze, uz preciznu prostornu i vremensku regulaciju (Sánchez i sar., 2000). Stoga MAP2 proteini predstavljaju primarne ciljeve u kontroli neuronskog polariteta i plastičnosti neurona (Avila i sar., 1993; Gundersen i Cook, 1999; Sánchez i sar., 2000).

Izmene u citoskeletu neurona mogu dovesti do poremećaja aksonskog transporta i značajno doprinose progresiji gubitka neurona u mozgu pacijenata sa PB (D'Andrea i sar., 2001). Pokazano je da su u mozgovima pacijenata obolelih od AB nivoi MAP2 proteina smanjeni (Abraha i sar., 2000; Augustinack i sar., 2002). Disfunkcija familije MAP2/tau proteina dovodi do poremećaja strukture mikrotubula i aksonskog transporta, i posledično do apoptoze neurona (Zhang i Dong, 2012).

1.6.2 Protein postsinaptičke gustine 95

Postsinaptička gustina (PSD, engl. *postsynaptic density*) je specijalizovana proteinska struktura unutar dendritskih trnova ekscitatornih sinapsi koja se sastoji od receptora, kinaza, strukturnih proteina i signalnih molekula koji učestvuju u prenosu i obradi postsinaptičkih signala čime regulišu sinaptičku plastičnost. Najzastupljeniji protein ove strukture je protein postsinaptičke gustine 95 (PSD-95, engl. *postsynaptic density protein 95*) koji ima ulogu u organizaciji i održavanju proteinskih kompleksa unutar ćelije. Osim toga uključen je u stabilizaciju i regrutovanje NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) receptora u postsinaptičku membranu. Naime, PSD-95 interaguje sa oba tipa glutamatergičkih receptora protein-protein interakcijama i na taj način učestvuje u prostornoj organizaciji glutamatergičkih receptora, i njihovom povezivanju sa postsinaptičkim kaskadnim signalnim proteinima. PSD-95 je esencijalna komponenta uključena u glutamatergički prenos, sinaptičku plastičnost i morfogenezu dendritskih trnova tokom razvoja (Coley i Gao, 2018) i koristi se kao marker ekscitatornih sinapsi.

PSD-95 pripada MAGUK porodici membranskih proteina (MAGUK, engl. *membrane-associated guanylate kinase*) koji su povezani sa guanilat kinazom, a njegova uloga je povezivanje ćelijske membrane sa receptorima, kanalima i signalnim molekulima, čime omogućava preciznu sinaptičku signalizaciju i plastičnost (Porras i sar., 2012). Sastoji se od 3 PDZ domena (engl. *PSD-95/discs large/zonula occludens 1*), 1 SH3 domena (engl. *SRC homology 3*) i 1 GK domena (engl. *guanylate kinase-like*). Ovi domeni su organizovani u dva nezavisna supramodula (prvi sadrži 2 PDZ domena, a drugi sadrži treći PDZ, SH3 i GK domen). Ovi supramoduli mogu modulirati afinitet vezivanja liganda putem intra- i interdomenskih dinamika (Levy i sar., 2022).

PSD-95 je ključan za sazrevanje hipokampalnih neurona tokom razvika. Naime, tokom razvoja hipokampusa ekspresija PSD-95 proteina se povećava u postsinaptičkom odeljku, gde je neophodan za učvršćivanje glutamatergičkih receptora i drugih sinaptičkih komponenti kao što su signalni i citoskeletni proteini i adhezioni molekuli (Mardones i sar., 2019). Promene u ekspresiji PSD-95 proteina, njegovoj distribuciji ili protein-protein interakcijama doprinose sinaptičkoj disfunkciji što predstavlja jedan od najranijih i centralnih patofizioloških događaja u brojnim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima (Sheng i Kim, 2011). Smanjena PSD-95 ekspresija, posebno u regionu PFC i hipokampusa, je povezana sa neuropsihijatrijskim poremećajima kao što su depresija (Silva i sar., 2024), šizofrenija i autizam (Coley i Gao, 2019). Izmene u ekspresiji PSD-95 proteina povezane su i sa AB, gde je smanjena ekspresija PSD-95 proteina zabeležena, kako u moždanom tkivu mišjih modela AB, tako i u moždanom tkivu obolelih od AB. Istovremeno, eksperimentalni podaci ukazuju da povećanje ekspresije PSD-95 može imati protektivni efekat i ublažiti A β -indukovanu sinaptičku toksičnost i sprečiti gubitak sinapsi izazvan toksičnošću A β (Dore i sar., 2021). Nasuprot tome u modelu L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin ili levodopa) indukovane diskinezije (LID), nivoi PSD-95 proteina u strijatumu su povećani, a uočava se prekomerna signalizacija putem dopaminergičkih (D1) i glutamatergičkih (NMDA) receptora koja za posledicu ima neželjene pokrete. Ustanovljeno je da PSD-95 stabilizuje oba tipa receptora, a da smanjenje ili blokada njegove interakcije sa D1 receptorima može smanjiti diskineziju, bez smanjenja efekta L-DOPA terapije (Porras i sar., 2012).

1.7 Animalni modeli neuropatologije Parkinsonove bolesti

Upotreba životinja kao modela humane anatomije i fiziologije datira još iz antičkog perioda. Ovakva komparativna istraživanja, koja su u velikoj meri bila opservaciona, su tokom istorije dovodila do velikih otkrića i doprinosila boljem razumevanju ljudske fiziologije. Vremenom se sa prostog posmatranja prešlo na eksperimentalnu upotrebu životinja, a istraživanja su se postepeno usmeravala ka izučavanju bolesti kod ljudi i njihove patofiziologije. Danas je upotreba eksperimentalnih životinja široko rasprostranjena, posebno u biomedicini i translacionim studijama,

gde eksperimentalni modeli često predstavljaju neizostavni deo istraživanja. Upotreba ovakvih modela pre svega omogućava istraživanja koja nisu moguća na ljudima, doprinosi boljem razumevanju patofizioloških mehanizama bolesti i pruža mogućnost za razvoj novih farmakoloških pristupa u terapiji, inovativnih strategija lečenja i efikasniju prevenciju.

Kvalitet eksperimentalnog modela pre svega zavisi od komplementarnosti modela sa humanom patologijom koja je predmet istraživanja (slična etiologija, simptomi, patofiziološki mehanizam, kao i odgovor na terapiju), ali i od morfološke i fiziološke sličnosti izabrane vrste sa morfologijom i fiziologijom čoveka. Nažalost, većina eksperimentalnih modela ispunjava samo deo ovih uslova. Stoga je finalni izbor najadekvatnijeg eksperimentalnog modela na istraživaču i zavisi od konkretnih ciljeva istraživanja, a ekstrapolacija dobijenih rezultata mora uzeti u obzir sve prednosti i nedostatke izabranog modela (Blesa i Przedborski, 2014).

Postoji više različitih eksperimentalnih modela PB koji se koriste u istraživanjima i koji se na osnovu metodološkog pristupa mogu podeliti u dve osnovne grupe: **neurotoksične i genetske modele**. **Neurotoksični modeli**, zasnovani su na sistemskej ili lokalnoj primeni toksina koji direktno ili indirektno izaziva neurodegeneraciju specifičnih populacija neurona, u ovom slučaju DA neurona. Najčešće korišćeni neurotoksini su: 6-OHDA (6-hidroksidopamin), MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin), LPS (lipopolisaharid) i rotenon, kao i hemijska sredstva koja se koriste u poljoprivredi, poput parakvata i maneba. **Genetski modeli** nastali su manipulacijom gena uključenih u patologiju naslednih oblika PB (SNCA, PARKIN, PINK1 Dj1, PARK7, GBA, LRRK2). Međutim, nijedan od trenutno dostupnih eksperimentalnih modela nije potpuno komplementaran patologiji PB. Naime, modeli selektivnih neurotoksičnih lezija izazivaju snažan i brz gubitak DA neurona, kao i ispoljavanje motoričkih simptoma bolesti i promene u ponašanju, ali izostaje LB patologija. Nasuprot tome, genetski modeli dobro oslikavaju osnovne molekularne mehanizme patologije proteina, i postepeni razvoj bolesti, ali ne izazivaju degeneraciju DA sistema (Blesa i Przedborski, 2014). Pored toga, patologija PB kao multisistemskog neurodegenerativnog poremećaja nije ograničena samo na DA sistem, već uključuje neurodegenerativne promene i drugih neurotransmiterskih sistema. Stoga su modeli koji su zasnovani na neurodegeneraciji ne-DA neurona, kao na primer model holinopatije PB (Petrovic i sar., 2013a), od posebne važnosti u istraživanjima ove kompleksne neurodegenerativne bolesti.

Modeli neurotoksičnih lezija su eksperimentalni modeli koji se najčešće koriste za istraživanje patogeneze PB i koji su ujedno pogodni za proučavanje poremećaja spavanja, neuropsihijatrijskih i kognitivnih deficita u PB (McDowell i Chesselet, 2012; Blesa i Przedborski, 2014; Ciric i sar., 2019). Prednosti ovih modela ogleda se u specifičnosti i selektivnosti. Specifična selektivna lezija postiže se izborom odgovarajućeg neurotoksina koji će izazvati neurodegeneraciju određene neuronske populacije, odnosno određenog tipa neurona. Dodatna selektivnost može se postići korišćenjem tehnike stereotaksički navođene mikroinfuzije koja omogućava precizno i kontrolisano ubrizgavanje neurotoksina u određeno područje mozga (Bové i Perier, 2012; Cannon i Greenamyre, 2010; El-Gamal i sar., 2021).

Jedan od najčešće korišćenih neurotoksičnih modela PB je lezija nigrostrijatnih DA neurona primenom neurotoksina 6-OHDA kod pacova (Ungerstedt, 1968). Kao selektivni kateholaminski neurotoksin, 6-OHDA izaziva oštećenje ne samo DA, već i noradrenergičkih neurona. Zaštita noradrenergičkog sistema i selektivno oštećenje DA sistema postiže se istovremenom primenom dezipramina (Schwartzing i Huston, 1996). 6-OHDA se najčešće ubrizgava unilaterarno u SNpc jedro, MFB, strijatum (Blandini i sar., 2008; Blesa i Przedborski, 2014) ili intraventrikularno (Rodríguez Díaz i sar., 2001). Stepen i brzina razvoja DA neurodegeneracije zavisi od mesta i načina lezije. Mikroinfuzija 6-OHDA u SNpc i MFB izaziva masovnu i brzu degeneraciju DA neurona tokom nekoliko dana. Za razliku od toga, strijatna mikroinfuzija izaziva sporu progresivnu retrogradnu DA neurodegeneraciju u SNpc i VTA regionu tokom perioda od nekoliko nedelja. Generalno,

presinaptički aksonski završeci pokazuju veću osetljivost na 6-OHDA u poređenju sa ostatkom aksona i telima neurona (Blesa i Przedborski, 2014).

Pored modela zasnovanog na primeni 6-OHDA, u istraživanju PB često se koriste i drugi neurotoksični modeli koji izazivaju selektivnu degeneraciju DA neurona nigrostrijatnog puta. Jedan od najznačajnijih među njima je model zasnovan na primeni neurotoksina MPTP. MPTP prolazi krvno-moždanu barijeru i u astrocitima se metaboliše pomoću enzima monoamin-oksidge B u aktivni metabolit MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinijum). Ovaj metabolit selektivno preuzimaju DA neuroni putem transportera za DA, gde inhibira mitohondrijalni kompleks I respiratornog lanca, što posledično dovodi do poremećaja energetske homeostaze, povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i konačno degeneracije neurona (Blesa i sar., 2014; Saponjic i sar., 2024). LPS izaziva selektivnu degeneraciju DA neurona u SN slično 6-OHDA i MPTP, a primarni mehanizam nije direktna citotoksičnost, već aktivacija mikroglije i neuroinflamacija (Saponjic i sar., 2024). Još jedan od značajnih neurotoksičnih modela zasniva se na primeni pesticida rotenona, koji takođe deluje kao inhibitor mitohondrijalnog kompleksa I. Sistemska primena rotenona dovodi do progresivne neurodegeneracije DA neurona, smanjenja nivoa DA u strijatumu i pojave motoričkih simptoma karakterističnih za PB. U eksperimentalnim istraživanjima koriste se i modeli zasnovani na primeni parakvata koji je herbicid i maneba koji je insekticid, koji takođe izazivaju oksidativni stres i oštećenje DA neurona. Iako ovi modeli imaju određena ograničenja u pogledu reprodukcije kompletne patologije PB, predstavljaju značajan alat za proučavanje uloge faktora životne sredine u nastanku neurodegeneracije (Blesa i sar., 2014; Saponjic i sar., 2024).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U cilju boljeg razumevanja multisistemskog karaktera PB kao i još uvek nerazjašnjenih kompleksnih mehanizama neurodegeneracije, posebno patofizioloških mehanizama prodromalne faze bolesti, predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje ćelijske (promena broja PV+ interneurona) i sinaptičke (ekspresija MAP2 i PSD-95 proteina) osnove prodromalnih poremećaja spavanja i memorijskih funkcija u različitim eksperimentalnim modelima neuropatologije PB.

Glavni cilj ovog istraživanja je bio da u uslovima indukovane neurodegeneracije, izazvane selektivnom lezijom dopaminergičkog i/ili holinergičkog sistema, utvrdi značaj PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije na početku neuropatologije i tokom njene progresije.

U skladu sa glavnim ciljem istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- ⊙ Ispitivanje poremećaja spavanja kao ranih nemotoričkih manifestacija u različitim eksperimentalnim modelima PB na početku neuropatologije analizom:
 - arhitekture spavanja (dužina trajanja svih faza spavanja);
 - dinamike epizoda spavanja (broj i trajanje epizoda svake faze spavanja);
 - EEG mikrostrukture NREM/REM faze spavanja (vrednost relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG ritmova);
 - dinamike vretena spavanja (gustina, unutrašnja frekvencija i trajanje vretena spavanja);
- ⊙ Ispitivanje poremećaja memorijskih funkcija kao nemotoričkih manifestacija u različitim eksperimentalnim modelima PB na početku neuropatologije i tokom njene progresije analizom promena u prostornoj i neprostornoj hipokampus-zavisnoj memoriji;
- ⊙ Ispitivanje promena u broju PV+ interneurona u hipokampusu i RT jedru kao ćelijske osnove lokalnih prodromalnih poremećaja spavanja i poremećaja memorijskih funkcija u različitim eksperimentalnim modelima PB tokom progresije neuropatologije;
- ⊙ Ispitivanje izmena u ekspresiji MAP2 i PSD-95 proteina (sinaptička reorganizacija) hipokampusa i RT jedra kao sinaptičke osnove lokalnih prodromalnih poremećaja spavanja i poremećaja memorijskih funkcija u različitim eksperimentalnim modelima PB tokom progresije neuropatologije;
- ⊙ Detaljna analiza dinamike izmena ćelijske osnove i sinaptičke reorganizacije hipokampusa i RT jedra u različitim eksperimentalnim modelima PB tokom progresije neuropatologije.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje

Za eksperimentalni deo doktorske disertacije korišćeni su odrasli mužjaci pacova Wistar soja, starosti 2-2,5 meseca i prosečne težine od 250 do 290 grama. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Životinje su gajene u standardnim uslovima koji podrazumevaju grupni smeštaj u kavezima sa prostirkom od sterilisane strugotine (2-3 životinje po kavezu), konstantnu temperaturu 23 ± 2 °C, relativnu vlažnost vazduha 60%-70%, svetlosni režim 12 h svetlo/12 h mrak i slobodan pristup vodi i hrani. Nakon operacije i tokom eksperimentalnog protokola životinje su bile individualno smeštene u providne kaveze od pleksiglasa (dimenzija 30 x 30 x 30 cm).

Upotreba životinja i eksperimentalni protokol ove doktorske disertacije odobreni su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (odobrenje broj: 01-1926 od 18.11.2021.) po rešenju Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (rešenje broj: 323-07-10509/2020-05/1 od 13.10.2020.) i u skladu sa Evropskom direktivom o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe (Direktiva 2010/63/EU).

3.2 Eksperimentalne grupe i protokol

Za potrebe eksperimenata ove doktorske disertacije korišćeno je 100 mužjaka pacova Wistar soja. Eksperimenti su bili podeljeni u dva dela (*Eksperiment 1* i *Eksperiment 2*) i izvođeni su prema protokolima prikazanim na **Slikama 3.1 i 3.2**.

U *Eksperimentu 1*, za razliku od fizioloških kontrola gde su u toku operativne procedure pacovi bili podvrgnuti samo implantaciji elektroda za hronično registrovanje spavanja, u svim ostalim eksperimentalnim grupama pored implantacije elektroda, pacovi su bili podvrgnuti i određenoj selektivnoj leziji dubokih moždanih struktura važnih u patofiziologiji PB.

U *Eksperimentu 2* pacovi nisu podvrgavani operativnoj proceduri implantacije elektroda za hronično registrovanje spavanja, već samo specifičnim selektivnim lezijama dubokih moždanih struktura važnih u patofiziologiji PB.

Pacovi su bili podeljeni u 5 eksperimentalnih grupa:

- **Intaktna kontrola** – kontrolni pacovi bez bilo kakvih operativnih manipulacija;
- **Fiziološka kontrola** – kontrolni pacovi implantirani za hronično registrovanje spavanja i bez oštećenja specifičnih jedara u mozgu;
- **Holinopatija PB** – pacovi sa bilateralnom lezijom PPT jedra;
- **Hemiparkinsonizam** – pacovi sa unilateralnom lezijom SNpc jedra;
- **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB** – pacovi sa kombinovanom unilateralnom lezijom SNpc jedra i bilateralnom lezijom PPT jedra.

U okviru *Eksperimenta 1* (**Slika 3.1**) ispitivani su poremećaji spavanja kao prodromalne nemotoričke manifestacije u različitim modelima PB. Pored toga, praćene su i promene u broju PV+ interneurona, zajedno sa sinaptičkom reorganizacijom hipokampusa i RT jedra.

Za potrebe *Eksperimenta 1* u svim eksperimentalnim grupama, osim u intaktnoj kontroli, pacovima su implantirane EEG i EMG elektrode za hronično registrovanje spavanja (Ćirić i sar., 2018, 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a, 2021b). Tokom iste operativne procedure u odgovarajućim eksperimentalnim grupama je izvršena bilateralna lezija PPT jedra, kao i unilateralna lezija SNpc jedra sa ili bez bilateralne lezije PPT jedra (Ćirić i sar., 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a; Radovanović i sar., 2021).

U svim modelima PB, kao i u fiziološkoj kontroli, spavanje je registrovano u dva termina, 14 i 42 dana nakon operativne procedure implantacije EEG i EMG elektroda i selektivnih lezija. Međutim, kako bi se ispitali najraniji (prodromalni) poremećaji spavanja u istraživanjima vezanim za ovu doktorsku disertaciju analizirano je spavanje samo 14 dana nakon operativne procedure. Pored toga, nedelju dana nakon registrovanja spavanja u oba terminima, u svakoj eksperimentalnoj grupi je testirana bazalna lokomotorna aktivnost pacova (test otvorenog polja) i prostorna habituacija. U *Eksperimentu 1* za ispitivanje promena broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije korišćeni su svi raspoloživi mozgovi iz svih eksperimentalnih grupa i termina registracije spavanja, a nakon testova ponašanja (od 52 do 100 dana nakon specifičnih lezija).

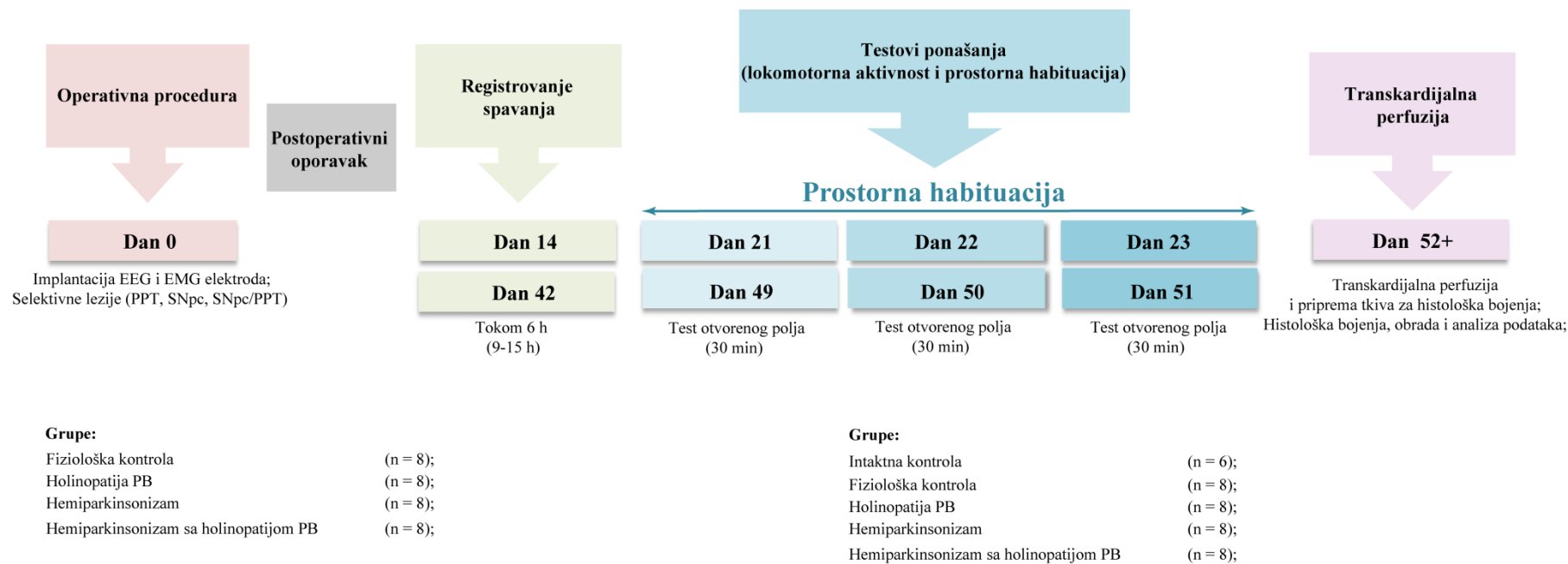
Za analizu podataka dobijenih iz *Eksperimenta 1* je korišćen sledeći broj pacova po svakoj eksperimentalnoj grupi:

- **Intaktna kontrola** n = 6;
- **Fiziološka kontrola** n = 8;
- **Holinopatija PB** n = 8;
- **Hemiparkinsonizam** n = 8;
- **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB** n = 8.

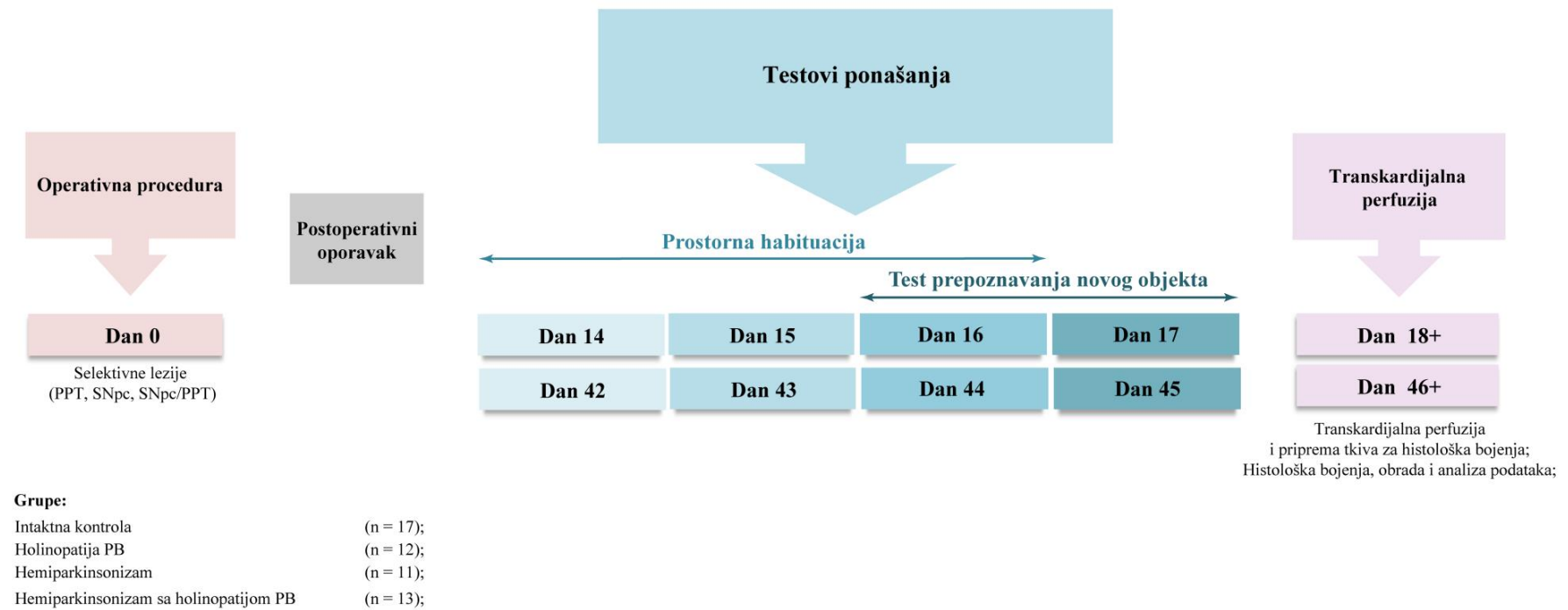
U okviru *Eksperimenta 2* (**Slika 3.2**) ispitivana je bazalna lokomotorna aktivnost pacova (test otvorenog polja) kao i poremećaji memorijskih funkcija, kao moguće prodromalne nemotoričke manifestacije, u različitim pacovskim modelima PB, zajedno sa promenom broja PV+ interneurona u hipokampusu.

Za potrebe *Eksperimenta 2* u odgovarajućim eksperimentalnim grupama je izvršena bilateralna lezija PPT jedra, unilateralna lezija SNpc jedra ili unilateralna lezija SNpc sa bilateralnom lezijom PPT jedra, osim intaktnih kontrola koje nisu prošle operativnu proceduru (Ćirić i sar., 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a; Radovanović i sar., 2021, 2026). Poremećaji memorijskih funkcija i izmene na ćelijskom novou praćene su u dva termina, 14 i 42 dana nakon operativne procedure (Radovanović i sar., 2023a, 2026). Za analizu podataka dobijenih iz *Eksperimenta 2* korišćen je sledeći broj pacova po svakoj eksperimentalnoj grupi:

- **Intaktna kontrola** n = 17;
- **Holinopatija PB** n = 12;
- **Hemiparkinsonizam** n = 11;
- **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB** n = 13.



Slika 3.1. Šematski prikaz ekperimentalnog protokola za Eksperiment 1.



Slika 3.2. Šematski prikaz eksperimentalnog protokola Eksperimenta 2.

3.3 Operativna procedura

U toku operativne procedure u odgovarajućim eksperimentalnim grupama izvršena je implantacija EEG i EMG elektroda za hronično registrovanje spavanja sa ili bez selektivnog oštećenja neurohemijski specifičnih neurona dubokih moždanih struktura važnih u patofiziologiji PB.

Operativna procedura implantacije elektroda, kao i selektivnih oštećenja specifičnih dubokih moždanih jedara tehnikom stereotaksički navođene mikroinfuzije toksina je urađena po protokolu naše laboratorije (Ćirić i sar., 2018, 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a, 2021b; Radovanović i sar., 2021; Saponjić i sar., 2016). Sve životinje su uvedene u opštu anesteziju, intraperitonealnim (*i.p.*) davanjem ketamin/diazepam anestetika (50 mg/kg, *i.p.*, Zoletil® 50, Virbac, Karo, Francuska). Nakon postavljanja životinje u stereotaksički ram (Stoelting Co., Dublin, Irska), krzno glave pacova je očišćeno i obrijano, a zatim je skalpelom napravljen rez duž sagitalnog šava lobanje. Kost lobanje su oslobođene i očišćene od kože, potkožnog i mišićnog tkiva kako bi se omogućio pristup orijentacionim stereotaksičkim tačkama (bregma i lambda). Zatim su na osnovu stereotaksičkog atlasa za pacove (Paxinos i Watson, 2005) razmerena stereotaksička mesta za otvore na kostima lobanje za implantaciju EEG elektroda, odnosno za stereotaksički navođenu mikroinfuziju toksina (postavljanje Hamilton šprica/mikroinfuzione igle) u duboka moždana jedra (Ćirić i sar., 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a; Radovanović i sar., 2021). Prema Paxinos i Watson (2005) osnovni stereotaksički uslov koji je neophodno ispuniti za preciznost u stereotaksičkim operacijama i mikroinfuzijama toksina u duboka moždana jedra je da pacovi moraju biti težine do 290 grama, a rastojanje između bregme i lambda je predviđeno da bude 9 mm.

3.3.1 Implantacija EEG i EMG elektroda za hronično registrovanje spavanja

Bušilicom sa čeličnim borerom (prečnik 1 mm) su napravljeni otvori na parijetalnim i frontalnim kostima lobanje na svim prethodno razmerenim koordinatama, a potom su epiduralno postavljene parne EEG šraf elektrode (Model broj 2035, O.D. 1,4 mm; dužina 3,5 mm; Professional Logistic, Beograd, Srbija) u region motorne kore (MCx), kao i parne, teflonom obložene, žičane elektrode (Medwire, Mount Vernon, Njujork) u CA1 region hipokampusa (Hipp). Takođe su parne, teflonom obložene, žičane EMG elektrode (Medwire, Mount Vernon, Njujork) implantirane u dorzalnu vratnu muskulaturu za registrovanje mišićne aktivnosti. Referentna šraf elektroda je implantirana u nazalnu kost pacova. Izvodi svih elektroda (EEG, EMG i referentne elektrode) su skupljeni i uvučeni u plastični, minijturni konektor (39F1401, Newark Electronics, Šomberg, Ilinois, SAD), koji je potom pričvršćen za šraf elektrode i kosti lobanje uz pomoć dentalnog cementa i akrilata (Biocryl-RN, Galenika a.d. Beograd, Srbija) (Ćirić i sar., 2018, 2019; Petrović i sar., 2013a; Petrović i sar., 2021a, 2021b; Radovanović i sar., 2021; Saponjić i sar., 2016).

Stereotaksičke koordinate za položaj EEG elektroda, određene prema stereotaksičkom atlasu za pacove (Paxinos i Watson, 2005) bile su:

za **motornu koru** (MCx):

- anteriorno/posteriorno: +1,00 mm od bregme;
- desno/levo: 2,00 mm od sagitalnog šava;
- dorzalno/ventralno: 1,00 mm od površine lobanje;

za **hipokampus** (Hipp):

- anteriorno/posteriorno: -3,60 mm od bregme;
- desno/levo: 2,50 mm od sagitalnog šava;
- dorzalno/ventralno: 2,50 mm od površine mozga.

Operativna procedura implantacije EEG i EMG elektroda je izvedena u svim eksperimentalnim grupama u okviru *Eksperimenta 1*, osim u grupi intaktnih kontrola.

3.3.2 Selektivne lezije PPT i SNpc jedara

Nakon što su čeličnim borerom napravljeni otvori na prethodno razmerenim stereotaksičkim koordinatama, u odgovarajućim eksperimentalnim grupama (*Eksperiment 1* i *Eksperiment 2*) izvršena je stereotaksički navođena mikroinfuzija toksina koji oštećuju neurohemijski specifične neurone dubokih moždanih struktura (SNpc i/ili PPT jedra) važnih u patofiziologiji PB. Sve mikroinfuzije su urađene pomoću digitalizovanog standardnog laboratorijskog stereotaksičkog aparata (Stoelting Co., Dablin, Irska) sa stereotaksičkim injektorom (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, SAD) i Hamiltonovim špricom (1 μ l ili 10 μ l, sa 26 ga iglom).

Holinopatija PB predstavlja eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB i izazvana je bilateralnom lezijom PPT jedra korišćenjem stereotaksički navođene mikroinfuzije ekscitotoksina ibotenične kiseline (IBO, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Na osnovu prethodno određenih stereotaksičkih koordinata u PPT jedro je ubrizgano 100 nl IBO (0,1 M rastvor IBO u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu (PBS), pH = 7,4) u jednom pulsu, trajanja 60 sekundi. Koncentracija IBO je određena na osnovu prethodnih studija (Inglis i Semba, 1997). Nakon mikroinfuzije IBO u PPT jedro sa jedne strane, igla Hamiltonovog šprica je ostajala u mestu mikroinfuzije 5 minuta, a zatim je nakon izvlačenja iz moždanog tkiva na površinu lobanje i ispiranja fiziološkim rastvorom, stereotaksički postavljena u kontralateralno PPT jedro za narednu mikroinfuziju (Petrovic i sar., 2013a, 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026).

Stereotaksičke koordinate za ekscitotoksično oštećenje **PPT jedra** (Paxinos i Watson, 2005) bile su:

- anteriorno/posteriorno: -7,80 mm od bregme;
- desno/levo: 1,90 mm od sagitalnog šava;
- dorzalno/ventralno: 7,00 mm od površine mozga.

Hemiparkinsonizam predstavlja klasičan, najčešće korišćen životinjski model PB. U našim eksperimentima hemiparkinsonizam je izazvan unilateralnom lezijom DA neurona SNpc jedra. Naime, unilateralna lezija uvek desnog SNpc jedra je izvedena stereotaksički navođenom mikroinfuzijom rastvora 6-OHDA (6-hidroksidopamin hidrobromid so; Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Na osnovu prethodno određenih stereotaksičkih koordinata u SNpc jedro je ubrizgan 1 μ l 6-OHDA (6-OHDA koncentracije 6 μ g/ μ l rastvoren u hladnom 0,9% fiziološkom rastvoru sa dodatkom antioksidansa u obliku 0,2% askorbinske kiseline), kontinuiranom infuzijom od 200 nl/min, tokom 5 minuta kako bi rastvor toksina ravnomerno difundovao u strukturu. Koncentracija 6-OHDA je određena na osnovu prethodnih studija (Rodriguez i sar., 1999; Gilmour i sar., 2011; Pienaar i van de Berg, 2013; Oliveira i sar., 2017). Kako bi se postigla selektivnost pri oštećenju SNpc jedra i kako bi se očuvao noradrenergički sistem, pacovima je 30 minuta pre anesteziiranja aplikovan dezipramin-hidrohlorid (28,42 mg/kg, *i.p.*, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD; pH = 7,4) (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026; Schwarting i Huston, 1996).

Stereotaksičke koordinate za selektivno oštećenje **SNpc jedra** (Paxinos i Watson, 2005) bile su:

- anteriorno/posteriorno: -5,30 mm od bregme;
- desno: 2,40 mm od sagitalnog šava;
- dorzalno/ventralno: 7,40 mm od površine mozga.

Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB predstavlja model neuropatologije PB sa udruženom ACh i DA denervacijom izazvanom kombinovanom unilateralnom lezijom SNpc jedra i bilateralnom lezijom PPT jedra. Pacovima je 30 minuta pre anesteziranja intraperitonealno dat dezipramin hidrohlorid, zatim je prema prethodno navedenim koordinatama najpre stereotaksički navođenom mikroinfuzijom 6-OHDA unilateralno oštećeno desno SNpc jedro, a potom je mikroinfuzijom IBO bilateralno oštećeno PPT jedro (Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026).

Na kraju operativne procedure stereotaksički navođene mikroinfuzije toksina za izazivanje različitih neuropatologija PB (uspostavljanje različitih eksperimentalnih modela PB) sa ili bez implantacije elektroda za hronično registrovanje spavanja okolno tkivo je dezinfikovano i koža zašivena. Nakon operativne procedure pacovi su smeštani u individualne kaveze da se oporave 2 nedelje, uz svakodnevni obilazak, brigu i postoperativnu negu, nakon čega su podvrgnuti daljim snimanjima i testiranjima. Prethodna istraživanja su pokazala da je nakon hronične implantacije EEG i EMG elektroda neophodno najmanje 7–10 dana za zarastanje rane i uspostavljanje fiziološke arhitekture spavanja (Saponjic i sar., 2007; Tang i sar., 2007). Naime, spavanje u ranom postoperativnom periodu odražava efekte hirurške intervencije, inflamatornog odgovora i primenjene anestezije, te je praćeno prolaznim promenama (izmenjena arhitektura spavanja i EEG ritmovi) koje se postepeno normalizuju tokom oporavka (Tang i sar., 2007). U našim eksperimentima koji uključuju lezije dubokih moždanih struktura, postoperativni period je bio produžen na 14 dana.

3.4 Procedura registrovanja spavanja

Nakon 14 dana postoperativnog oporavka, sa izuzetkom intaktne kontrole, svim životinjama u okviru *Eksperimenta 1* je registrovano spavanje u trajanju od 6 sati, uvek u istom periodu od 9 do 15 časova u toku fiziološki neaktivne cirkadijalne faze za pacove (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2013a; Petrovic i sar., 2021a, 2021b; Radovanovic i sar., 2021; Saponjic i sar., 2016).

EEG i EMG aktivnosti u toku spavanja su diferencijalno (bipolarno) registrovane. Diferencijalna tehnika snimanja je podrazumevala 6 ulaza (levi MCx, desni MCx, levi Hipp, desni Hipp, levi EMG, desni EMG), svaki sa (+) na levoj strani i (–) na desnoj strani, i svi su imali isto uzemljenje (referentna šraf elektroda implantirana u nazalnu kost). Snimanje i digitalizacija analognih signala je izvršena korišćenjem *DataWave SciWorks Experimenter Version 8.0* akvizicionog softvera (DataWave Technologies, Longmont, Kolorado, SAD). EEG i EMG signali su adekvatno pojačani (pojačivač sa 16 kanala; A-M System Inc., Model 3600, Karlsborg, Vašington, SAD), filtrirani (pojasni filter 0,3-100 Hz), digitalizovani (frekvencija od 256 uzoraka u sekundi) i sačuvani na disku za dalju analizu (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2013a; Petrovic i sar., 2021a, 2021b; Radovanovic i sar., 2021; Saponjic i sar., 2016).

3.5 Testovi ponašanja

Testovi ponašanja su urađeni u dva termina, 14 i 42 dana nakon operativne procedure. Svi pacovi u okviru *Eksperimenta 1* i *Eksperimenta 2* su prošli ove testove. Eksperimenti su sprovedeni između 9 i 15 časova, u toku fiziološki neaktivne cirkadijalne faze za pacove. Pre svakog testa pacovi su ostavljeni najmanje 30 minuta kako bi se adaptirali na eksperimentalnu prostoriju, a zatim su bili podvrgnuti testovima ponašanja. Pacovima je rukovao uvek isti eksperimentator, a posebna pažnja je bila usmerena na uklanjanje mirisa i nečistoća arena u kojima su se izvodili testovi. Između testiranja, arene su detaljno očišćene mehaničkim uklanjanjem nečistoća, brisanjem površina vodom i ubrusom, 20% etanolom i na kraju destilovanom vodom uz brisanje do potpunog sušenja.

Svi testovi ponašanja su rađeni u Opto-Varimex kavezima od pleksiglasa (otvorena arena dimenzija 44,2 × 43,2 × 20 cm) sa sistemom Auto-Track (Version 3.0 A, Columbus Instruments,

Kolumbus, Ohajo, SAD). Bazalna lokomotorna aktivnost je merena testom otvorenog polja (OFT, engl. *open field test*). Za ispitivanje prostorne i neprostorne hipokampus-zavisne memorije korišćena su dva neaverzivna memorijska testa: (1) test prostorne habituacije (SHT, engl. *spatial habituation task*) i (2) test prepoznavanja novog objekta (NORT, engl. *novel object recognition test*). Oba testa su testovi za hipokampus-zavisnu memoriju i zasnivaju se na prirodnoj sklonosti životinje da istražuje novinu (Cohen i Stackman, 2015; Ennaceur, 2010; Leussis i Bolivar, 2006). Smanjenje eksploratorne aktivnosti tokom SHT-a, odnosno smanjeno ispitivanje poznatog objekta tokom NORT-a ukazuje na očuvane memorijske funkcije. Nasuprot tome, izrazita (ili nesmanjena) eksploratorna aktivnost bilo prostora (SHT), bilo starog u odnosu na novi objekat (NORT) sugerišu poremećaj memorijskih funkcija (Ennaceur, 2010; Leussis i Bolivar, 2006). Protokol korišćen za testove ponašanja prikazan je na **Slici 3.3**.

Bazalna lokomotorna aktivnost je merena tokom habituacije na otvorenu arenu u trajanju od 30 minuta (ukupna lokomotorna aktivnost), pri čemu je vremenski profil aktivnosti utvrđen na osnovu vrednosti očitanih na svakih 5 minuta (Circic i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar. 2021, 2023a, 2026).

SHT je podrazumevao trodnevnu habituaciju u otvorenoj areni i korišćen je kao indirektna mera prostorne memorije. Vreme testiranja, odnosno trajanje svake sesije, tokom 3 dana, je bilo 30 minuta, a interval između sesija je bio 24 sata (**Slika 3.3**, Dan 1 – Dan 3). Merena je lokomotorna aktivnost (pređeno rastojanje) za svakih 5 minuta sesije i ukupna motorička aktivnost za celokupno 30-minutno trajanje svake sesije (Circic i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2026). Dugotrajna prostorna habituacija je definisana na osnovu razlika u ukupnoj motoričkoj aktivnosti između sesija.

Nakon SHT testa izveden je NORT (**Slika 3.3**, Dan 3 – Dan 4) koji se sastojao se iz tri faze (svaka faza trajanja 20 minuta), u istim eksperimentalnim arenama u kojima se izvodio i SHT. Umesto osnovnog (Ennaceur, 2010), korišćen je modifikovani protokol za NORT sa produženom habituacijom (30 minuta habituacije tokom 3 dana) kako bi se umanjila relevantnost konteksta u kojoj se životinja nalazi. Modifikacije su takođe uključivale dugu fazu familijarizacije u trajanju od 20 minuta, kako bi se aktivirala hipokampus-zavisna memorija (Cohen i Stackman, 2015). Kao što je naglašeno, test se sastojao iz tri faze: prva faza ili faza familijarizacije (NORT F, Dan 3) je podrazumevala period upoznavanja životinje sa dva identična objekta (A + A/B + B). Druga faza ili Test 1 (NORT T1, Dan 3) je podrazumevala test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije, a realizovana je 60 minuta nakon NORT F faze. U NORT T1 fazi jedan objekat iz NORT F faze je zamenjen novim objektom (A + B/B + A objekti). Treća faza ili Test 2 (NORT T2, Dan 4) je test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije prepoznavanja sa retencionim intervalom od 24 h. Pozicija objekata u NORT T2 fazi je ista kao u NORT T1 fazi (A + B/B + A). U svakoj od tri faze NORT-a objekti su postavljeni u uglove arene (Radovanovic i sar., 2023a, 2026).

Ponašanje životinja tokom NORT-a snimljeno je kamerom i kvantitativno analizirano. Eksploratorna aktivnost (vreme provedeno u istraživanju objekata) je analizirana na svakih 5 minuta, a sabiranjem svih vrednosti dobijeno je ukupno vreme eksploracije svakog objekta tokom 20 minuta za svaku od faza testa (NORT F, NORT T1, NORT T2). Prilikom kvantifikacije, kao eksploratorna aktivnost je računato ako bi životinja njuškom dotakla predmet i/ili ako je njuška životinje usmerena ka predmetu na udaljenosti manjoj ili jednakoj 2 cm. Oblici ponašanja kao što su trčanje oko predmeta, sedenje na predmetu ili penjanje na njega nije beleženo kao eksploratorna aktivnost (Ennaceur i Delacour, 1988). Nakon izvršene kvantifikacije, za svaku životinju i za sve faze testa je određena: (1) opšta eksploratorna aktivnost tokom NORT-a (% životinja unutar svake eksperimentalne grupe koje aktivno istražuju objekte tokom svakog 5-minutnog intervala) i (2) vremenski profil eksploratorne aktivnosti (% vremena provedenog u istraživanju objekata tokom svakog 5-minutnog intervala izražen u odnosu na ukupno vreme eksploracije tokom 20 minuta testa uzetih kao 100%) (Radovanovic i sar., 2026).

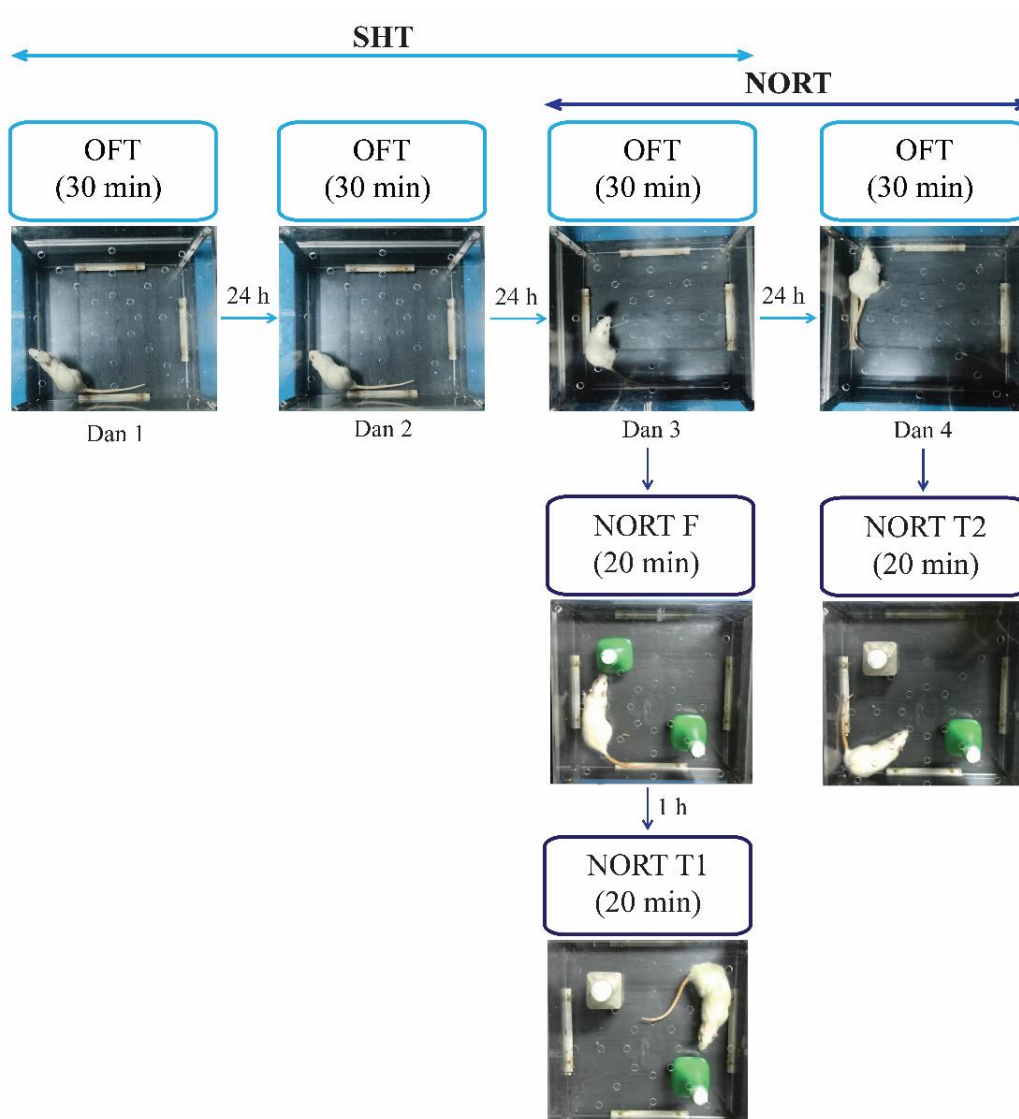
Nakon toga je za svaku fazu testa izračunat indeks preference (PI, engl. *preference index*) kao mera prepoznavanja novog objekta (Antunes i Biala, 2012; Gulinello i sar., 2019; Radovanovic i sar., 2023a, 2026). PI predstavlja količnik vremena istraživanja novog objekta (T_{novi}) i zbira vremena istraživanja familijarnog ($T_{\text{familiari}}$) i novog objekta (T_{novi}) i računa se prema formuli:

$$PI = T_{\text{novi}} / (T_{\text{familiari}} + T_{\text{novi}}).$$

Ovaj indeks može imati vrednosti od 0 do 1, pri čemu vrednosti preko 0,5 označava preferencu ka novom objektu, vrednosti ispod 0,5 označavaju preferencu ka poznatom objektu, a vrednosti oko 0,5 označavaju nepostojanje preference (Antunes i Biala, 2012; Hammond i sar., 2004; Radovanovic i sar., 2026).

Iako je PI inicijalno izračunat za svaki 5-minutni interval, kao i za ukupnih 20 minuta svake faze testa, finalna analiza je obuhvatila samo PI iz prvih 5 minuta. Naime, analiza eksploratorne aktivnosti je pokazala da se najintenzivnije istraživanje objekata javlja tokom prvih 5 minuta testa, bez obzira na eksperimentalnu grupu i fazu testa. Tokom ovog perioda sve životinje su bile aktivne i istraživale objekte. Od ovog perioda do kraja sesija nastupa globalni pad eksploratorne aktivnosti (manji broj aktivnih životinja provodi manje vremena u istraživanju objekata). Stoga je finalna analiza kratkotrajne i dugotrajne hipokampus-zavisne memorije obuhvatila samo prvih 5 minuta testa (Radovanovic i sar., 2026).

Sve životinje su najpre morale na adekvatan način da prođu NORT F fazu, što je podrazumevalo podjednaku eksploraciju oba predmeta ($PI \approx 0,5$; nema preference ka predmetima). Životinje koje nisu imale adekvatnu NORT F fazu su izbačene iz dalje analize. Zatim u NORT T1 fazi intenzivna eksploracija novog objekta u odnosu na familijarni objekat predstavlja sposobnost životinje da prepozna novi objekat ($PI > 0,5$; preferenca ka novom objektu) i ukazuje na očuvane memorijske funkcije. Fiziološki odgovor u NORT T2 fazi je podjednaka eksploracija oba predmeta ($PI \approx 0,5$; nema preference ka predmetima) što ukazuje da je životinji očuvana dugotrajna hipokampus-zavisna memorija prepoznavanja i da je u stanju da prepozna objekte iz NORT T1 faze (Antunes i Biala, 2012; Hammond i sar., 2004).



Slika 3.3. Prikaz protokola testa prostorne habituacije i testa prepoznavanja novog objekta. OFT – test otvorenog polja; SHT – test prostorne habituacije; NORT – test prepoznavanja novog objekta; NORT F – faza familijarizacije; NORT T1 – test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije; NORT T2 – test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije.

3.6 Priprema tkiva za histološke analize

Nakon procedure registrovanja spavanja (*Eksperiment 1*) i realizovanih testova ponašanja (*Eksperiment 1* i *Eksperiment 2*) sve životinje su duboko anestetizirane u ketamin/diazepam anesteziji (100 mg/kg, *i.p.*), a mozgovi su transkardijalno perfundovani. Transkardijalna perfuzija mozgovna je započinjana uvek ispiranjem fiziološkim rastvorom (200-250 ml 0,9% NaCl, brzinom 40 ml/min) sve do obezbojavanja jetre. Zatim je moždano tkivo fiksirano 4% rastvorom paraformaldehida (PFA, Sigma-Aldrich, Taufkirhen, Nemačka) u 0,1 M PBS-u (200-250 ml; prvih 100 ml brzinom 40 ml/min, a zatim 30 ml/min) i na kraju dehidratirano 10% rastvorom saharoze u 0,1 M PBS-u (200-250 ml; 30 ml/min). Pacovi su zatim dekapitovani, njihovi mozgovi izolovani, očišćeni od moždanih ovojnica i krvnih sudova, postfiksirani u PFA 24 sata na temperaturi + 4 °C, a potom su dehidratirani u 30% rastvoru saharoze nekoliko dana (dok mozak ne padne na dno bočice). Nakon dehidratacije mozgovi su isečeni na koronalne preseke debljine 40 µm u čitavoj antero-posteriornoj dimenziji odgovarajuće strukture (hipokampus, PPT, SNpc i RT jedro) korišćenjem kriotoma (Thermo Fisher NX70, Voltam, Masačusets, SAD). Preseci su sakupljeni u rastvor antifrizna (40% rastvor etilen-glikola u 0,1 M kalijum-acetatu pH = 6,5 koji sadrži 1% polivinilpirolidon (PVP40, Sigma-Aldrich, Taufkirhen, Nemačka)) i čuvani u zamrzivaču na -20 °C do daljih histohemijskih i imunohistohemijskih bojenja na slobodnoplutajućim presecima (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026).

3.7 Identifikacija i kvantifikacija lezija

Kako bi se verifikovali eksperimentalni modeli PB, korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji, najpre je urađena identifikacija i kvantifikacija, kako ACh (lezija PPT jedra), tako i DA (lezija SNpc jedra) deficita. Na osnovu potvrđenih i kvantifikovanih lezija formirane su eksperimentalne grupe koje su korišćene u analizi poremećaja spavanja i memorijskih funkcija, kao i ćelijske osnove ovih poremećaja. Dakle, samo pacovi koji su imali identifikovane i kvantifikovane ACh, DA, kao i udružene (ACh i DA) deficite, zavisno od modela PB, su bili uključeni u dalje analize.

3.7.1 Identifikacija lezije PPT jedra

Identifikacija ACh deficita u PPT jedru je urađena primenom metode nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) – dijaforaza histohemijskog bojenja (Paxinos i sar., 2009; Vincent i sar., 1983). Slobodnoplutajući preseci iz regiona PPT jedra su isprani 3 puta po 10 minuta u 0,1 M PBS-u (pH = 7,4), a zatim su inkubirani 1 h na + 37 °C u rastvoru za bojenje koji sadrži mešavinu supstratnog rastvora sa β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom-Na-4 soli (β – NADPH, Serva, Hajdelberg, Nemačka) i dimetil sulfoksidom (DMSO, Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka). Osnovu supstratnog rastvora su činili nitro plavi tetrazolijum hlorid (NBT, Serva, Hajdelberg, Nemačka) i 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP, Serva, Hajdelberg, Nemačka) u supstratnom puferu (pH = 9,5; 0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Kako bi se redukovali nespecifični artefakti usled prisustva endogene alkalne fosfataze u tkivu, u rastvor za bojenje je dodat specifični inhibitor – levamizol (Sigma-Aldrich, Taufkirhen, Nemačka) koncentracije 2 mM (Petrovic i sar., 2013a). Preseci su nakon inkubacije isprani 3 puta po 10 minuta u 0,1 M PBS-u, a zatim su navučeni na pločice i ostavljeni da se osuše preko noći na sobnoj temperaturi. Kako bi se uklonile sve nečistoće, osušene pločice su stavljene u ksilol 24 h (Zorka Pharma, Šabac, Srbija), a nakon toga su pokrivene DPX medijumom (Sigma-Aldrich, Berlington, Masačusets, SAD) i pokrovnim staklom i ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026). Pripremljeni preparati su analizirani i slikani na *Leica* svetlosnom mikroskopu sa kamerom (Leica, Veclar, Nemačka).

3.7.2 Identifikacija lezije SNpc jedra

Identifikacija DA deficita u SNpc jedru je urađena primenom tirozin-hidroksilaza (TH) imunohistohemijskog bojenja (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026). Slobodnoplutajući preseći iz regiona SNpc jedra su isprani 3 puta po 10 minuta u 0,1 M rastvoru PBS-a. Kako bi se neutralizovala aktivnost endogene peroksidaze u tkivu preseći su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u 0,1 M rastvoru PBS-a koji je sadržao 3% vodonik-peroksid i 10% metanol. Preseći su zatim isprani 3 puta po 5 minuta u 0,1 M rastvoru PBS-a. Blokiranje mesta za nespecifično vezivanje antitela je postignuto inkubacijom preseka u 0,1 M rastvoru PBS-a koji je sadržao 5% serum magarca (NDS, engl. *normal donkey serum*; D9663, Sigma-Aldrich, Berlington, Masačusets, SAD) tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Sledeći korak je podrazumevao inkubaciju preseka 48 sati na + 4 °C u primarnom mišjem monoklonskom anti-TH antitelu (T2928, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) koje je razblaženo 1:16000 u 0,1 M PBS-u sa 0,5% Triton X-100 (Tx-100; Sigma-Aldrich, Berlington, Masačusets, SAD). Nakon inkubacije u primarnom antitelu preseći su najpre isprani 3 puta po 5 minuta u 0,1 M PBS-u, a zatim su 90 minuta inkubirani u poliklonskom zečjem anti-mišjem sekundarnom antitelu (P0260, Agilent Dako, Glostrup, Danska) razblaženom 1:100 u 0,1 M PBS-u. Imunoreakcija je vizuelizovana korišćenjem 1% 3,3'-diaminobenzidina (DAB; 11208, Acros organics, Gel, Belgija) rastvorenog u 0,1 M PBS-u sa 0,3% vodonik-peroksidom. Nakon primene rastvora DAB-a preseći su isprani u česmenskoj vodi, zatim u destilovanoj vodi i na kraju u 0,1 M PBS-u. Preseći su navučeni na mikroskopske pločice u 0,1 M PBS-u i ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi. Narednog dana preseći su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola (70%, 96% i 100% etanol; Zorka Pharma, Šabac, Srbija), isprani ksilolom, prekriveni DPX medijumom i pokrovnim staklom i ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi. Pripremljeni preparati su analizirani i slikani na *Leica* svetlosnom mikroskopu sa kamerom.

3.7.3 Kvantifikacija lezija

Kvantifikacija gubitka ACh i DA neurona je urađena prebrojavanjem broja NADPH – dijaforaza ili TH pozitivno obojenih ćelija na .tif slikama korišćenjem ImageJ 1.46 softvera (NIH, Betesda, Merilend, SAD) (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2013a; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026). Način na koji su deficiti kvantifikovani predstavlja više procenu veličine oštećenja koja su nastala tehnikom mikroinfuzije toksina (100 nl IBO, odnosno 1 µl 6-OHDA), nego utvrđivanje apsolutnog broja ACh i DA neurona.

Kvantifikacija ACh deficita (bilateralna lezija PPT jedra) u eksperimentalnim modelima holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB je urađena u odnosu na kontrolnu grupu. Za te potrebe definisana su tri stereotaksička opsega, u okviru celokupne antero-posteriorne dimenzije PPT jedra (Paxinos i sar., 2009). Definisani stereotaksički opsezi za PPT jedro su bili: 6,90 – 7,40 mm; 7,50 – 8,00 mm i 8,10 – 8,60 mm posteriorno od bregme. Preseći su uslikani na mikroskopu, a zatim su raspoređeni u definisane stereotaksičke opsege (Ciric i sar., 2018; Petrovic i sar., 2013a; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026). Prebrojavanje NADPH – dijaforaza pozitivnih neurona PPT jedra je rađeno za svaku životinju na tri koronalna preseka (po jedan presek za svaki stereotaksički opseg), zasebno za svaku stranu mozga (dve vrednosti po preseku). Za svaku eksperimentalnu grupu i svaki stereotaksički opseg određena je srednja vrednost broja ACh neurona po strani PPT jedra. Na isti način su prebrojani i NADPH – dijaforaza pozitivni neuroni PPT jedra u fiziološkim kontrolama. Potom je ACh deficit po strani mozga, a za svaki stereotaksički opseg, iskazan kao razlika procenata broja NADPH – dijaforaza pozitivnih neurona u odnosu na kontrolne srednje vrednosti uzete kao 100% (Ciric i sar., 2018; Petrovic i sar., 2013a; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026).

Kvantifikacija DA deficita (unilateralna lezija SNpc jedra) u eksperimentalnim modelima hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB je urađena u odnosu na kontralateralnu stranu mozga koja je smatrana neoštećenom (kontrolnom) (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026). Kao i u slučaju ACh deficita, definisana su tri stereotaksička opsega, u okviru celokupne antero-posteriorne dimenzije SNpc jedra (Paxinos i sar., 2009). Definisani stereotaksički opsezi za SNpc jedro su bili: 4,60 – 5,10 mm; 5,20 – 5,70 mm i 5,80 – 6,30 mm posteriorno od bregme. Prebrojavanje TH pozitivnih neurona, kako lediranog, tako i kontrolnog, kontralateralnog SNpc jedra je urađeno za svaku životinju i za svaki stereotaksički opseg. Zatim je DA deficit izražen kao razlika procenata broja TH pozitivnih neurona lediranog SNpc jedra u odnosu na kontrolne srednje vrednosti kontralateralnog SNpc jedra, uzetih kao 100% (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2021a; Radovanovic i sar., 2021, 2026).

3.8 Imunohistohemijsko bojenje GABA-ergičkih PV+ interneurona i sinaptičkih proteina (MAP2 i PSD-95)

GABA-ergički PV+ interneuroni i sinaptička reorganizacija praćeni su na presecima u regionu hipokampusa (*Eksperiment 1* i *Eksperiment 2*) i RT jedra (*Eksperiment 1*). Sinaptička reorganizacija je identifikovana analizom dva postsinaptička proteina: MAP2 i PSD-95 (markera ekscitatornih sinapsi) (Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2023b, 2026).

Početak imunohistohemijske procedure je podrazumevao ispiranje preseka u 0,1 M PBS-u, 3 puta po 5 minuta. Kako bi se neutralizovala aktivnost endogene peroksidaze u tkivu preseci su inkubirani 15 minuta u 0,1 M rastvoru PBS-a sa 3% vodonik-peroksidom i 10% metanolom. Preseci su zatim ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,1 M PBS-u. Inkubacijom preseka u 0,1 M PBS-u sa 5% NDS tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi blokirana su mesta za nespecifično vezivanje antitela. Zatim su preseci inkubirani 24 sata na + 4 °C sa primarnim antitelom. Za metodu bojenja PV interneurona korišćeno je mišje monoklonsko anti-PV antitelo (P3088, Sigma-Aldrich, Berlington, Masačusets, SAD) razblaženo 1:2000 u 0,1 M PBS puferu sa 0,3% Tx-100 (Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2023b, 2026; Rajkovic i sar., 2019). Primarno antitelo koje je korišćeno u eksperimentalnoj proceduri za MAP2 je mišje monoklonsko anti-MAP2 antitelo (MAB378, Merck Milipore, Berlington, Masačusets, SAD) razblaženo 1:6000 u 0,1 M PBS-u sa 0,1% Tx-100, dok je za PSD-95 korišćeno mišje monoklonsko anti-PSD-95 antitelo (MAB1598, Merck Milipore, Berlington, Masačusets, SAD) razblaženja 1:200 u 0,1M PBS-u sa 0,1% Tx-100 (Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2023b). Nakon inkubacije u primarnom antitelu preseci su najpre isprani 3 puta po 5 minuta u 0,1 M PBS-u, a zatim su 90 minuta inkubirani u poliklonskom zečjem anti-mišjem sekundarnom antitelu razblaženom 1:100 u 0,1 M PBS-a. Imunoreakcija je vizuelizovana korišćenjem 1% DAB-a rastvorenog u 0.1 M PBS-u sa 0,3% vodonik-peroksidom. Nakon primene rastvora DAB-a preseci su isprani u česmenskoj vodi, zatim u destilovanoj vodi i na kraju u 0,1 M PBS-u. Preseci su navučeni na mikroskopske pločice u 0,1 M PBS-u i ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi. Narednog dana preseci su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola (70%, 96% i 100% etanol), a zatim su isprani ksilolom. Iz ksilola mikroskopske pločice sa presecima su prekrivene DPX medijumom i pokrovnim staklom i ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi (Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2023b). Preparati su analizirani i slikani na *Leica* svetlosnom mikroskopu sa kamerom.

3.8.1 Kvantifikacija GABA-ergičkih PV+ interneurona

Kvantitativna analiza GABA-ergičkih PV+ interneurona u nivou DG hipokampusa sprovedena je na .tif slikama primenom ImageJ 1.46 softvera (Radovanovic i sar., 2021, 2023a, 2023b, 2026; Rajkovic i sar., 2019). Nakon slikanja na svetlosnom mikroskopu svi preseci odgovarajućih eksperimentalnih grupa su raspoređeni u tri stereotaksička opsega koji pokrivaju čitavu antero-posteriornu dimenziju hipokampusa (Paxinos i sar., 2009). Definisani stereotaksički

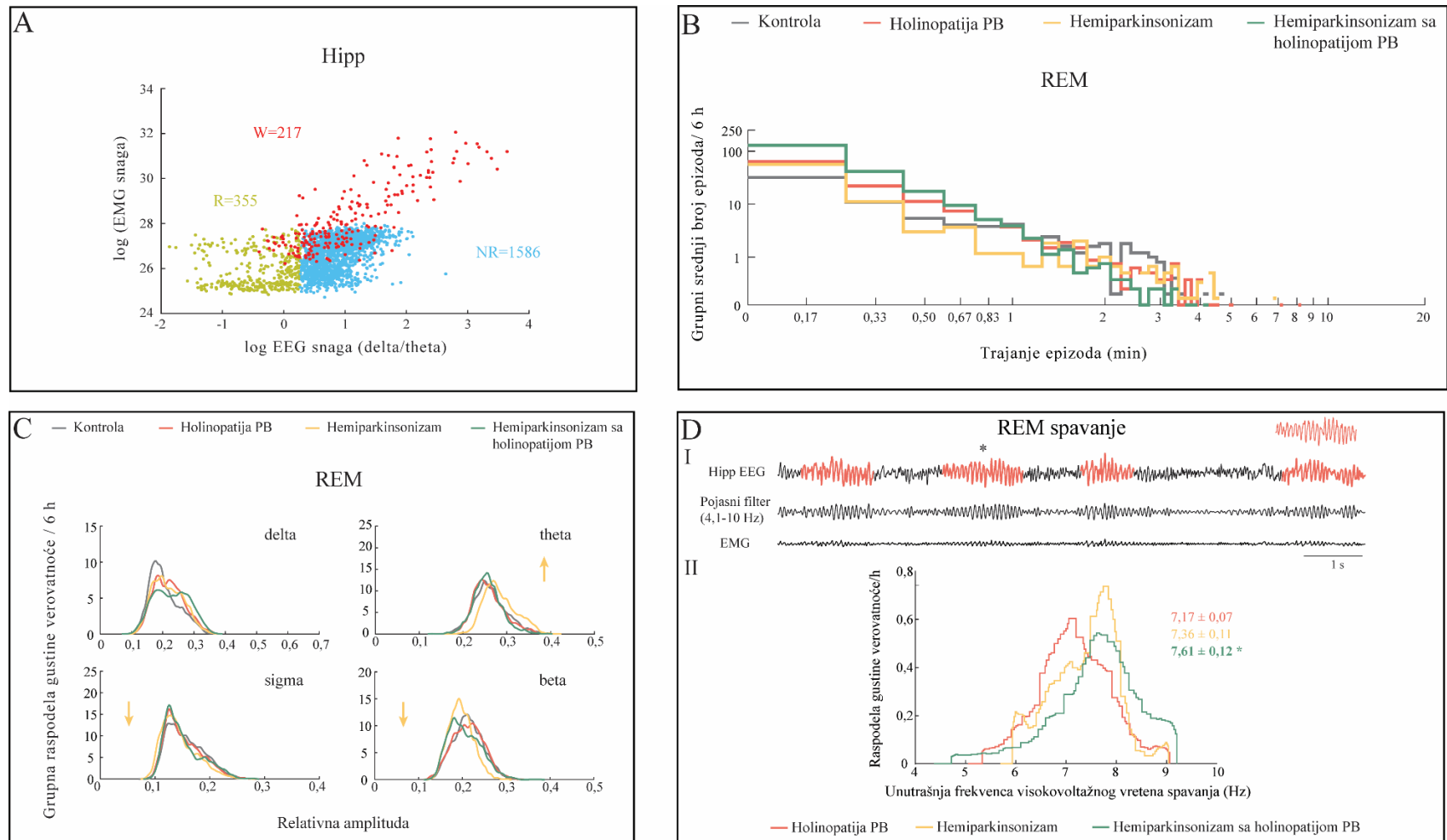
opsezi za hipokampus su bili: 1,50 – 3,00 mm; 3,10 – 4,60 mm i 4,70 – 6,20 mm posteriorno od bregme. PV+ interneuroni u DG su prebrojani u svim eksperimentalnim grupama, po svakoj strani mozga, na svakom stereotaksičkom opsegu i broj PV+ interneurona je izražen kao srednja vrednost + SE.

3.9 Analiza spavanja

Analiza spavanja i EEG signala je urađena korišćenjem softvera originalno razvijenog u MATLAB 6.5, koji je potom nadograđen za MATLAB R2011a (MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, SAD). Analiza je obuhvatala sve signale odgovarajućeg kvaliteta i bez artefakata snimljenih u grupi implantiranih kontrolnih životinja, kao i svih eksperimentalnih modela neuropatologije PB iz *Eksperimenta 1* u kojima je prethodno verifikovana lezija. Analizom je za svaku eksperimentalnu grupu definisana (**Slika 3.4**): (1) arhitektura spavanja (dužina trajanja faza spavanja), (2) dinamika epizoda spavanja (broj i trajanje epizoda svake faze spavanja), (3) EEG mikrostruktura (vrednosti relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG ritmova) i (4) dinamika vretena spavanja (gustina, unutrašnja frekvencija i trajanje vretena spavanja) (Ćirić i sar., 2018, 2019; Petrović i sar., 2013a, 2021a, 2021b; Radovanović i sar., 2021; Saponjić i sar., 2016).

3.9.1 Razdvajanje osnovnih faza spavanja

Na signale dobijene nakon šestočasovnog snimanja primenjena je Furijeova transformacija ili FFT algoritam (brza Furijeova transformacija) da bi se potom na osnovu EEG i EMG karakteristika, svaka od 2160 Furijeovih epoha, dužine 10 sekundi, diferencirala kao jedna od tri osnovne faze spavanja – budnost, NREM ili REM faza spavanja (**Slika 3.4A**). Osnovne faze spavanja razdvajane su u dva koraka. Najpre su korišćenjem EEG signala motorne kore (MCx) ili hipokampusa (Hipp) na osnovu proizvoda snaga EEG sigma i teta frekventnog opsega na y – osi, i ukupne snage EMG signala na x – osi izdvojene 10-sekundne epohe budnosti (visoka ukupna snaga EMG-a, a niske vrednosti proizvoda snage sigma i teta frekventnog opsega) od epoha spavanja (niska ukupna snaga EMG-a i visoka vrednost proizvoda snage EEG sigma i teta frekventnog opsega). U sledećem koraku su na osnovu količnika snaga delta i teta frekventnog opsega na x – osi i ukupne snage EMG-a na y – osi 10-sekundne epohe spavanja razdvojene na NREM (viša ukupna snaga EMG signala i veći količnik snaga delta i teta frekventnog opsega) i REM fazu (niža ukupna snaga EMG signala i manji količnik snaga delta i teta frekventnog opsega). Diferencijacija svih epoha budnosti/NREM/REM spavanja izvršena je korišćenjem algoritma K-sredine za dva grupisanja, a radi boljeg razdvajanja na x – i y – osi vrednosti su logaritmovane (Ćirić i sar., 2018, 2019; Petrović i sar., 2013a, 2021a, 2021b; Radovanović i sar., 2021; Saponjić i sar., 2016).



Slika 3.4. Analiza spavanja i EEG signala. (A) Arhitektura spavanja – primer razdvajanja 10-sekundnih epoha budnosti (W grupisanje – crvene tačke), NREM (NR grupisanje – plave tačke) i REM faze spavanja (R grupisanje – zelene tačke) u hipokampusu; (B) Dinamika epizoda spavanja – primer grupne distribucije srednjeg broja REM epizoda različitih trajanja u hipokampusu; (C) EEG mikrostruktura – primeri izmene relativnih EEG amplituda tokom REM faze spavanja u hipokampusu; (D) Dinamika vretena spavanja – primer hipokampalnih HVS vretena (crveno) (I) i grupne distribucije njihove unutrašnje frekvencije (II) tokom REM faze spavanja.

Na ovaj način je za svaku životinju i svaku strukturu (MCx i Hipp) definisana arhitektura spavanja, odnosno trajanje budnosti, NREM i REM faze spavanja, a potom i arhitektura spavanja svake eksperimentalne grupe.

Pored razdvajanja osnovnih faza spavanja, u ovoj doktorskoj disertaciji posebno je analizirano lokalno spavanje (spavanje motorne kore ili hipokampalno spavanje) (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a, 2021b). Za analizu lokalnog spavanja posebno su izdvojene istovremene (simultane, zajedničke) i neistovremene (nesimultane, svojstvene) 10-sekundne epohe budnosti/NREM/REM spavanja motorne kore i hipokampusu. Na primer, kada bi se prilikom razdvajanja faza spavanja 10-sekundna NREM epoha simultano pojavila i u motornoj kori i u hipokampusu, bila je definisana kao istovremena NREM epoha. Nasuprot tome, kada bi se simultano u motornoj kori pojavila NREM epoha, a u hipokampusu REM epoha, ove epohe su bile definisane kao neistovremene NREM/REM epohe (neistovremeni NREM motorne kore, odnosno neistovremeni REM hipokampusu) (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a, 2021b).

3.9.2 Dinamika epizoda spavanja

Nakon inicijalnog razdvajanja osnovnih faza spavanja analizirana je i dinamika epizoda budnosti/NREM/REM stanja, kako motorne kore, tako i hipokampusu (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a). Za svako stanje (budnost/NREM/REM) definisane su i prebrojane epizode koje su bile različitog trajanja (**Slika 3.4B**). Naime, epizodom budnosti/NREM/REM stanja smatrana je svaka pojedinačna 10-sekundna epoha tog stanja (10-sekundna epizoda) ili više uzastopnih 10-sekundnih epoha (20-sekundna epizoda, 30-sekundna epizoda...). Prosečno trajanje epizode svakog stanja je izračunato spajanjem (konkatenacijom) epizoda svakog stanja i deljenjem dobijenog ukupnog trajanja (izraženog u minutima) sa brojem svih epizoda (10-s, 20-s, 30-s itd.) (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a).

3.9.3 EEG mikrostruktura

Analiza EEG mikrostrukture je podrazumevala praćenje izmena relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG ritmova ($\delta = 0,3-4$ Hz; $\theta = 4,1-8$ Hz; $\sigma = 10,1-15$ Hz; $\beta = 15,1-30$ Hz; $\gamma = 30,1-50$ Hz), za svaku fazu spavanja (budnost, NREM i REM), prethodno definisanu samo na osnovu istovremenih (zajedničkih) 10-sekundnih epoha (**Slika 3.4C**) (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2021a). Da bi se eliminisao bilo kakav uticaj individualnih variranja apsolutnih amplituda signala, izračunate su relativne Furijeove amplitude (Petrovic i sar., 2013a, 2014; Saponjic i sar., 2016). Pomoću PDE funkcije (procena gustine verovatnoće) u MATLAB R2011a softveru izračunata je grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih amplituda svake faze spavanja. Naime, PDE analiza je rađena na ansamblu relativnih amplituda, objedinjavanjem vrednosti za svaku fazu spavanja i za svaki frekventni opseg svih pacova koji pripadaju određenoj eksperimentalnoj grupi (Ciric i sar., 2018, 2019; Petrovic i sar., 2013a, 2021a; Saponjic i sar., 2016). Za statističku analizu grupne raspodele gustine verovatnoće relativnih amplituda izračunate su srednje vrednosti amplituda na svakih 60 minuta za budnost i NREM fazu, odnosno na svakih 30 minuta za REM fazu spavanja.

3.9.4 Dinamika vretena spavanja

U okviru dinamike vretena spavanja analizirana su dva tipa vretena – SS i HVS vretena. Analiza je obuhvatala gustinu, trajanje i unutrašnju frekvenciju ovih vretena. Oba tipa vretena su automatski detektovana tokom 1 sata NREM i REM spavanja, izdvojenog uvek između 3. i 4. sata snimanja spavanja, istovremeno u MCx i Hipp (Ciric i sar., 2017, 2018, 2019; Lazic i sar., 2019; Radovanovic i sar., 2021). Za detekciju vretena korišćena je kontinualna transformacija talasa sa osnovnim talasom pomoću „cmorl-2“ funkcije, koja označava kompleksni Morletov talas centralne frekvencije 2 ($f_0 = 2$) (Adamczyk i sar., 2015; Ciric i sar., 2017, 2018, 2019; Lazic i sar., 2019; Radovanovic i sar., 2021). Kriterijumi automatske detekcije SS vretena su bili pojasni filter 11–17

Hz i trajanje od minimalno 0,5 sekundi. Kriterijumi za detekciju HVS vretena su bili pojasni filter 4,1–10 Hz i trajanje od minimalno 1 sekunde (**Slika 3.4D**). Zbog velikog broja pogrešno detektovanih vretena, morala je biti izvršena vizuelna validacija prethodno automatski detektovanih vretena (Ciric i sar., 2017, 2018, 2019; Lazic i sar., 2019; Radovanovic i sar. 2021). Nakon vizuelne validacije sva detektovana SS i HVS vretena su izdvojena i konkatenerana za svakog pacova, svaku strukturu (motorna kora ili hipokampus), svako stanje (NREM ili REM spavanje) i svaku ekperimentalnu grupu u okviru *Eksperimenta 1*, kako bi se u okviru finalne analize dinamike vretena spavanja odredile grupne srednje vrednosti gustine, trajanja i unutrašnje frekvencije SS i HVS vretena.

3.10 Statistička analiza podataka

Svi rezultati istraživanja su predstavljeni kao grupne srednje vrednosti \pm SE. Celokupna statistička obrada podataka je obavljena korišćenjem softverskog paketa *IBM SPSS Statistics 25* (IBM Corporation 2017, Armonk, Njujork, SAD). Rezultati testa prepoznavanja novog objekta (PI vrednosti) su analizirani primenom Studentovog t-testa za jedan uzorak, a nakon provere normalnosti podataka Shapiro-Wilk testom. Opšta eksploratorna aktivnost tokom NORT-a je procenjena na osnovu granične vrednosti koja je iznosila 50% (eksploratorna aktivnost \geq 50% – grupa aktivna; eksploratorna aktivnost $<$ 50% – grupa neaktivna). Analiza svih ostalih statističkih razlika srednjih vrednosti je izvršena korišćenjem neparametarske jednofaktorske Kruskal-Wallis ANOVA (χ^2 vrednosti) analize sa dvostranim post-hoc Mann-Whitney U testom (z vrednosti), dok je za analizu korelacionih odnosa korišćen Pirsonov koeficijent linearne korelacije. Statistički značajnim su smatrane sve vrednosti $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

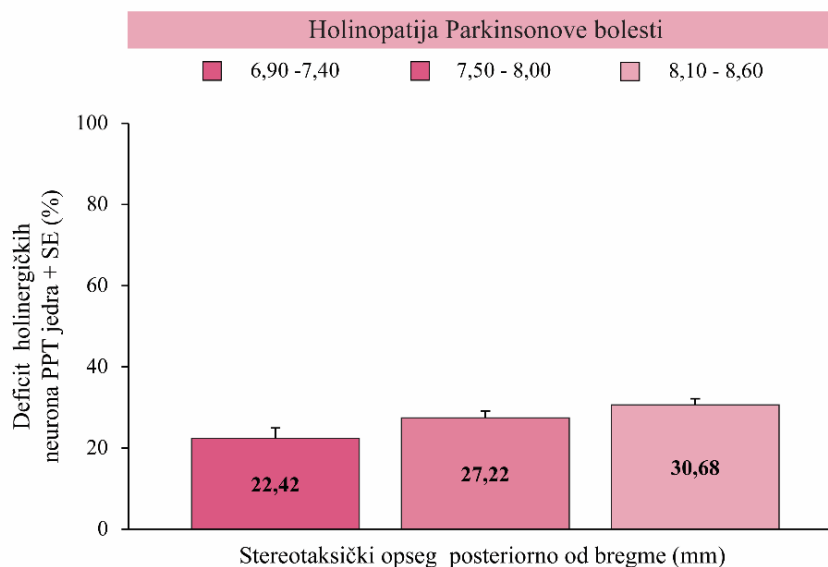
4.1 Eksperimentalni modeli Parkinsonove bolesti – histološka identifikacija i kvantifikacija lezija

Kako bi se verifikovali eksperimentalni modeli PB korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji najpre je urađena identifikacija i kvantifikacija (Poglavlje 3.7) ACh (lezija PPT jedra) i/ili DA (lezija SNpc jedra) deficita. Na osnovu potvrđenih i kvantifikovanih lezija definisane su inicijalne eksperimentalne grupe za potrebe dalje analize poremećaja spavanja i memorijskih funkcija, odnosno ćelijskih osnova ovih poremećaja. Pacovi u kojima nisu identifikovane lezije bili su isključeni iz dalje analize.

4.1.1 Holinopatija Parkinsonove bolesti

Za procenu deficita ACh neurona izazvanog bilateralnom lezijom PPT jedra (eksperimentalni model holinopatije PB) određene su vrednosti broja ACh neurona u kontrolnoj grupi životinja za sva tri definisana stereotaksička opsega koja pokrivaju celu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra. Apsolutni broj ACh neurona za kontrolnu grupu je izražen kao srednja vrednost \pm SE i smatran je kao 100% vrednosti u odnosu na koju je izračunat procenat ACh deficita. Srednje vrednosti apsolutnog broja ACh neurona za kontrolnu grupu su iznosile: $48,41 \pm 1,56$ za stereotaksički opseg 6,90 – 7,40 mm posteriorno od bregme; $79,50 \pm 1,44$ za stereotaksički opseg 7,50 – 8,00 mm posteriorno od bregme i $108,20 \pm 2,12$ za stereotaksički opseg 8,10 – 8,60 mm posteriorno od bregme.

ACh deficit u modelu holinopatije PB je iznosio: $22,42 \pm 2,54\%$ za stereotaksički opseg 6,90 – 7,40 mm posteriorno od bregme; $27,22 \pm 1,68\%$ za stereotaksički opseg 7,50 – 8,00 mm posteriorno od bregme i $30,68 \pm 1,48\%$, za stereotaksički opseg 8,10 – 8,60 mm posteriorno od bregme. Dakle, srednji deficit ACh neurona bio je veći od 22% kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra, sa maksimalnim deficitom od $30,68 \pm 1,48\%$ na posteriornoj koordinati. Na **Slici 4.1** su predstavljeni rezultati kvantifikacije ACh neurona u eksperimentalnom modelu holinopatije PB u celoj antero-posteriornoj dimenziji PPT jedra.

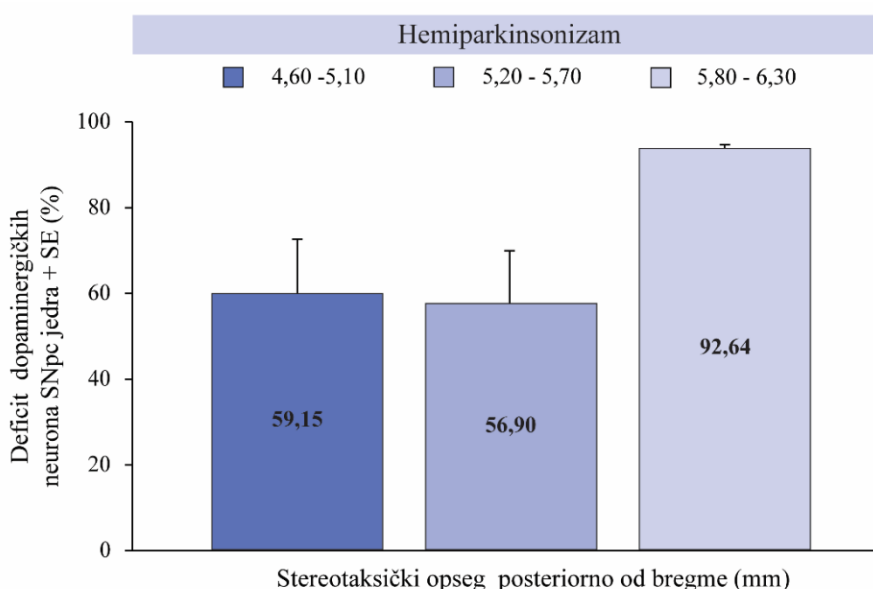


Slika 4.1. Kvantifikacija holinergetičkog deficita u eksperimentalnom modelu holinopatije PB. Prikaz holinergetičkog deficita u tri stereotaksička opsega celokupne antero-posteriorne dimezije PPT jedra (n = 8).

4.1.2 Hemiparkinsonizam

U eksperimentalnoj grupi životinja koje su imale unilateralnu leziju SNpc jedra (model hemiparkinsonizma) za procenu DA deficita kao kontrolna vrednost (100%) korišćena je srednja vrednost broja DA neurona kontralateralnog SNpc jedra koje nije ledirano. Srednje vrednosti apsolutnog broja DA neurona za kontrolnu grupu su određene u tri definisana stereotaksička opsega koji pokrivaju celu antero-posteriornu dimenziju SNpc jedra i iznosile su: $122,00 \pm 10,40$ za stereotaksički opseg 4,60 – 5,10 mm posteriorno od bregme; $140,13 \pm 6,89$ za stereotaksički opseg 5,20 – 5,70 mm posteriorno od bregme) i $90,06 \pm 5,85$ za stereotaksički opseg 5,80 – 6,30 mm posteriorno od bregme.

DA deficit u modelu hemiparkinsonizma je iznosio: $59,15 \pm 12,54\%$, za stereotaksički opseg 4,60 – 5,10 mm posteriorno od bregme; $56,90 \pm 12,50\%$ za stereotaksički opseg 5,20 – 5,70 mm posteriorno od bregme i $92,64 \pm 0,89\%$ za stereotaksički opseg 5,80 – 6,30 mm posteriorno od bregme. Dakle, srednja vrednost gubitka DA neurona u celoj antero-posteriornoj dimenziji SNpc jedra je bila veća od 56%, sa maksimalnim deficitom od $92,64 \pm 0,89\%$ na posteriornoj koordinati. Rezultati kvantifikacije DA deficita u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma su prikazani na **Slici 4.2**.

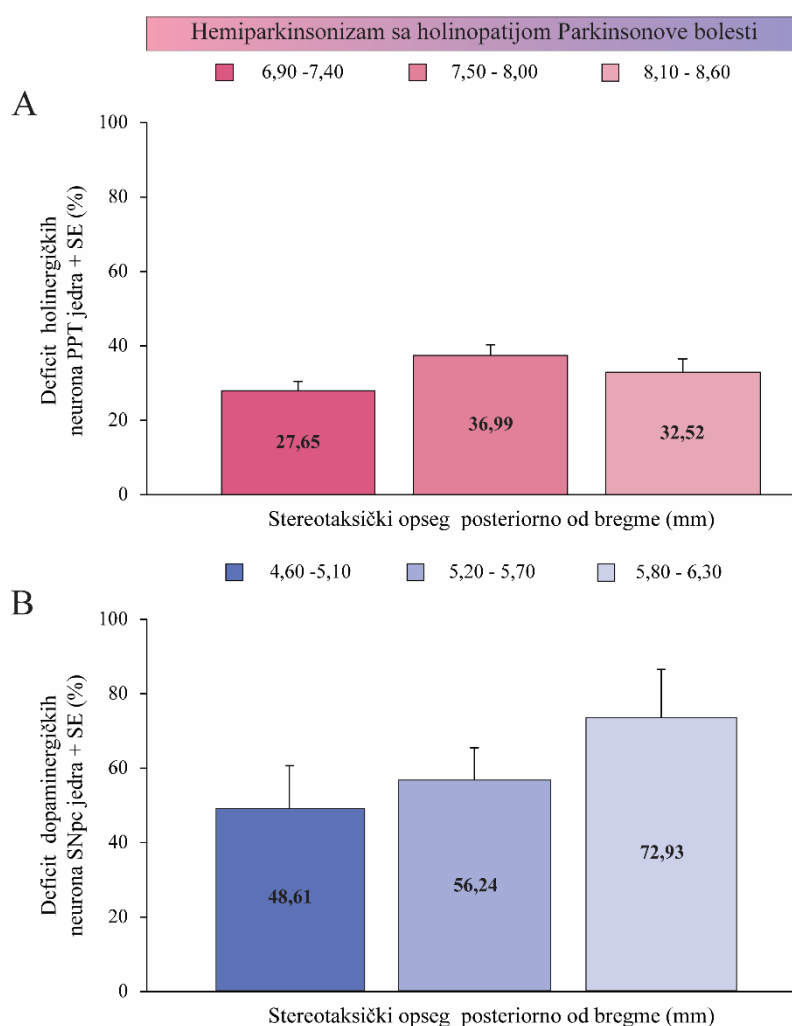


Slika 4.2. Kvantifikacija dopaminergičkog deficita u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma. Prikaz dopaminergičkog deficita u tri stereotaksička opsega celokupne antero-posteriorne dimezije SNpc jedra (n = 8).

4.1.3 Hemiparkinsonizam sa holinopatijom Parkinsonove bolesti

U eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (unilateralna lezija SNpc jedra i bilateralna lezija PPT jedra) ACh i DA deficit je određen na isti način kao i u prethodna dva modela. Rezultati kvantifikacije ACh i DA deficita u ovom eksperimentalnom modelu su prikazani na **Slici 4.3**.

Za kvantifikaciju ACh deficita korišćene su iste srednje kontrolne vrednosti apsolutnog broja ACh neurona PPT jedra kao i u modelu holinopatije PB, a u odnosu na njih je izračunat procenat ACh deficita u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB koji je iznosio: $27,65 \pm 2,49\%$ za stereotaksički opseg 6,90 – 7,40 mm posteriorno od bregme; $36,99 \pm 2,89\%$ za stereotaksički opseg 7,50 – 8,00 mm posteriorno od bregme i $32,52 \pm 3,59\%$ za stereotaksički opseg 8,10 – 8,60 mm posteriorno od bregme.

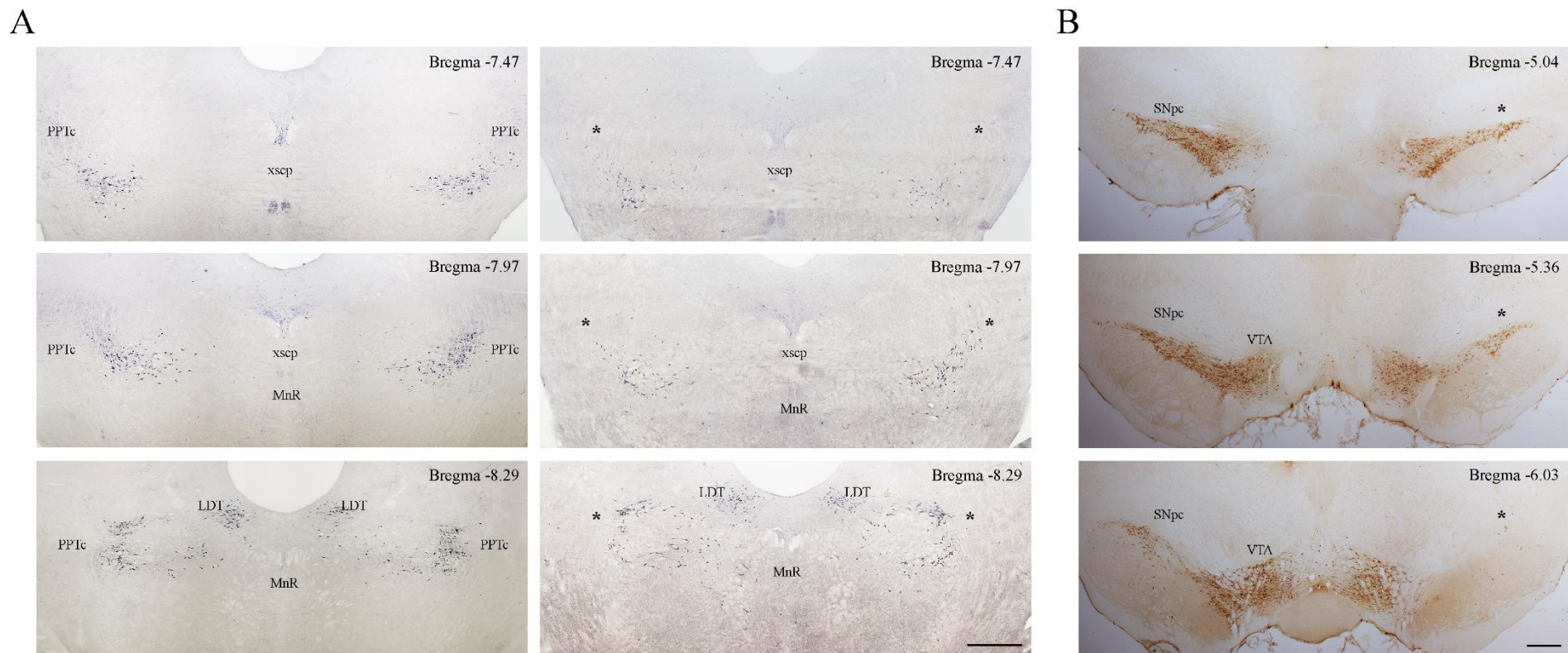


Slika 4.3. Kvantifikacija holinergičkog i dopaminergičkog deficita u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB. Prikaz holinergičkog (A) i dopaminergičkog (B) deficita u tri stereotaksička opsega celokupne antero-posteriorne dimenzije PPT i SNpc jedra (n = 8).

Za kvantifikaciju DA deficita u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB korišćene su sledeće kontrolne vrednosti apsolutnog broja DA neurona: $244,71 \pm 26,12$ za stereotaksički opseg 4,60 – 5,10 mm posteriorno od bregme; $199,71 \pm 13,50$ za stereotaksički opseg 5,20 – 5,70 mm posteriorno od bregme i $115,14 \pm 13,12$ za stereotaksički opseg 5,80 – 6,30 mm posteriorno od bregme. DA deficit u celoj antero-posteriornoj dimenziji SNpc jedra je bio: $48,61 \pm 11,44\%$ za stereotaksički opseg 4,60 – 5,10 mm posteriorno od bregme; $56,24 \pm 8,55\%$ za stereotaksički opseg 5,20 – 5,70 mm posteriorno od bregme i $72,93 \pm 12,83\%$ za stereotaksički opseg 5,80 – 6,30 mm posteriorno od bregme.

U eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB srednja vrednost gubitka ACh neurona u celoj antero-posteriornoj dimenziji PPT jedra je bila veća od 27%, sa maksimalnim deficitom od $36,99 \pm 2,85\%$ u medijalnom stereotaksičkom opsegu, dok je srednja vrednost gubitka DA neurona u celoj antero-posteriornoj dimenziji SNpc jedra bila veća od 48%, sa maksimalnim deficitom od $72,93 \pm 12,83\%$ u posteriornom stereotaksičkom opsegu. Primeri individualne histološke identifikacije ACh deficita (bilateralna lezija PPT jedra) i DA (unilateralna lezija SNpc jedra) deficita su prikazani su na **Slici 4.4A**. Na koronalnim presecima mozga kontrolnih životinja (**Slika 4.4A, levi paneli**) uočavaju se brojni ACh neuroni PPT jedra nakon bojenja NADPH-dijaforazom, na svim posmatranim stereotaksičkim opsezima. Potvrdu uspešnosti bilateralne lezije PPT jedra daje smanjenje broja ovih neurona u modelu holinopatija PB (**Slika 4.4A, desni paneli**). Na **Slici 4.4B** prikazani su reprezentativni koronalni preseki mozga pacova sa unilateralnom lezijom SNpc jedra gde se nakon TH bojenja uočava deficit DA neurona u lediranom SNpc jedru (naročito u posteriornim delovima) u odnosu na kontrolno kontralateralno jedro.

Kako se model hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB zasniva na udruženom ACh i DA deficitu, postojala je mogućnost da deficit ACh neurona doprinosi dodatnom gubitku DA neurona u SNpc jedru i obrnuto. Kako bi bila ispitana ta mogućnost, upoređen je srednji broj ACh neurona PPT jedra između modela holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB, kao i srednji broj DA neurona između modela hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB za svaki stereotaksički opseg. Ustanovljeno je da nije bilo statistički značajnih razlika u gubitku DA neurona u modelima hemiparkinsonizma (**Slika 4.2** i **Slika 4.3B**; $z \geq -0,91$; $p \geq 0,62$). Međutim, pokazano je da postoji veći ACh deficit u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB u odnosu na model holinopatije PB, ali samo za stereotaksički opseg 7,50 – 8,00 mm posteriorno od bregme (**Slika 4.1** i **Slika 4.3A**; $z = -2,52$; $p = 0,01$).



Slika 4.4 Histološka identifikacija holinergičkog i dopaminergičkog deficita. (A) Primeri histološke identifikacije holinergičkog deficita (NADPH – dijaforaza bojenje) nakon bilateralne lezije PPT jedra (desni paneli) u odnosu na kontrolno PPT jedro (levi paneli) u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB. (B) Primer histološke identifikacije dopaminergičkog deficita (TH imunohistohemijsko bojenje) nakon unilateralne lezije SNpc jedra u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB. **A:** **PPTc** – *nucleus tegmentalis pedunculopontinus pars compacta*; **xcsp** – *decussation pedunculorum cerebellarium*; **MnR** – *nucleus raphe medianus*; **LDT** – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; Ledirano PPT jedro je obeleženo *. Skala 200 μm . **B:** **SNpc** – *pars compacta substantiae nigrae*; **VTA** – *area tegmentalis ventralis*; Ledirano SNpc jedro je obeleženo *. Skala 400 μm .

4.2 Prodromalni poremećaji spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je ispitivanje poremećaja spavanja, kao prodromalnih nemotoričkih manifestacija u različitim eksperimentalnim modelima PB. Zbog toga su efekti bilateralne lezije PPT jedra i/ili unilateralne lezije SNpc jedra (koje se nalaze u osnovi eksperimentalnih modela) na arhitekturu spavanja, dinamiku epizoda spavanja, EEG mikrostrukturu i dinamiku vretena spavanja praćeni u jednom terminu, odmah nakon oporavka pacova od operativne procedure implantacije elektroda za registrovanje spavanja i odgovarajuće lezije, tj. 14 dana nakon lezija i to u sledećim eksperimentalnim grupama: fiziološka kontrola ($n = 8$), holinopatija PB ($n = 8$), hemiparkinsonizam ($n = 8$) i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB ($n = 8$).

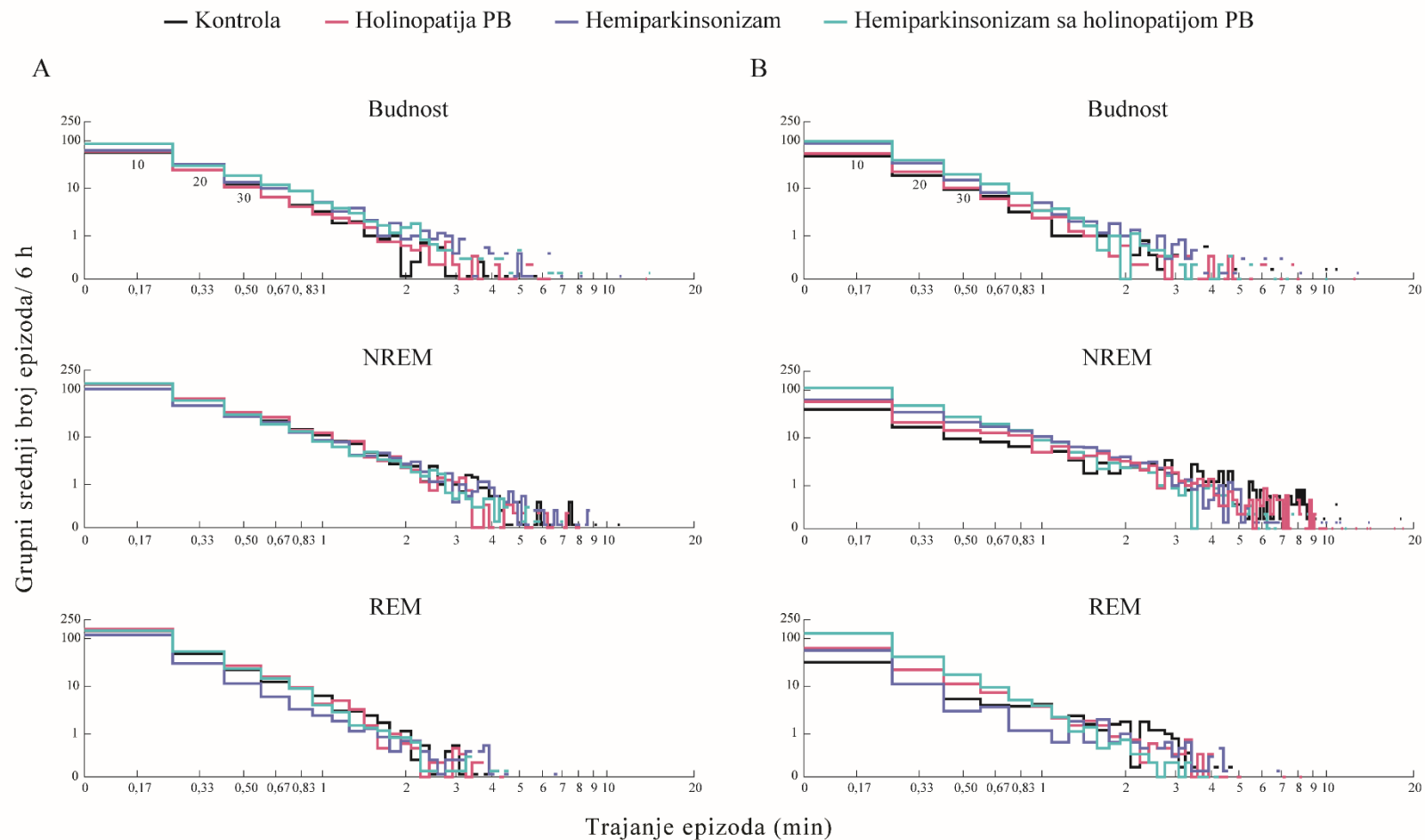
4.2.1 Lokalne izmene u arhitekturi spavanja i dinamici epizoda spavanja

Rezultati analize arhitekture spavanja kontrolne grupe i eksperimentalnih modela PB su pokazali da u grupi životinja sa holinopatijom PB nije bilo promene u dužini trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja ($z \geq -0,84$; $p \leq 0,40$; **Tabela 4.1**). Nasuprot tome, u eksperimentalnim modelima hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB dokazano je produženo trajanje budnosti, kako u motornoj kori, tako i u hipokampusu ($z \geq -3,26$; $p \leq 0,04$), ali bez promena u trajanju NREM i REM stanja ($z \geq -1,68$; $p \leq 0,09$; **Tabela 4.1**). Dalja analiza dinamike epizoda budnosti/NREM/REM faze spavanja ukazala je na postojanje izrazite fragmentacije spavanja, kako u motornoj kori, tako i u hipokampusu u oba eksperimentalna modela hemiparkinsonizma. Naime, pokazano je da je produženo trajanje budnosti uslovljeno povećanim brojem epizoda budnosti ($z \geq -2,74$; $p \leq 0,04$; **Tabela 4.1**). Sa druge strane, povećan broj hipokampalnih NREM epizoda u oba eksperimentalna modela hemiparkinsonizma ($z \geq -2,93$; $p \leq 0,01$; **Tabela 4.1**), nije uticao na ukupno trajanje NREM spavanja zbog skraćanja trajanja NREM epizoda ($z \geq -2,93$; $p \leq 0,01$). Međutim, poremećaj hipokampalnog REM spavanja, uslovljenog povećanim brojem REM epizoda kraćeg trajanja, potvrđen je samo u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($z \geq -2,93$; $p \leq 0,01$; **Tabela 4.1**).

Grupne distribucije srednjih vrednosti broja epizoda budnosti/NREM/REM spavanja u funkciji njihovog trajanja su prikazane na **Slici 4.5**. Ove distribucije su ukazale na dodatne specifične izmene u dinamici epizoda budnosti/NREM/REM spavanja u modelima hemiparkinsonizma. Naime, pokazano je da je povećanje broja epizoda budnosti obuhvatilo epizode svih trajanja, kako u motornoj kori (**Slika 4.5A**), tako i u hipokampusu (**Slika 4.5B**), što nije uticalo na srednje trajanje epizoda budnosti (**Tabela 4.1**). Nasuprot tome, u slučaju hipokampalnih NREM i REM epizoda pokazan je povećan broj kraćih i smanjen broj dužih NREM i REM epizoda (**Slika 4.5B**), što je uticalo na skraćanje NREM epizoda u oba modela hemiparkinsonizma, dok je skraćanje hipokampalnih REM epizoda ustanovljeno samo u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1. Lokalna dinamika epizoda budnosti/NREM/REM spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti. Srednje trajanje budnosti/NREM/REM spavanja tokom 6 h \pm SE (min), srednji broj i srednje trajanje epizoda budnosti/NREM/REM spavanja tokom 6 h \pm SE (min) motorne kore (MCx) i hipokampusa (Hipp). Statistički značajne vrednosti za $p \leq 0,05$ su označene podebljanim brojevima.

	Srednje trajanje/6 h \pm SE (min)			Srednji broj epizoda/6 h \pm SE			Srednje trajanje epizoda/6 h \pm SE (min)		
	Budnost	NREM	REM	Budnost	NREM	REM	Budnost	NREM	REM
<i>MCx</i>									
Kontrola	61,17 \pm 6,87	198,17 \pm 13,36	100,33 \pm 9,22	117,14 \pm 9,68	310,57 \pm 31,04	259,43 \pm 33,09	0,48 \pm 0,03	0,73 \pm 0,12	0,40 \pm 0,04
Holinopatija PB	65,38 \pm 9,36	188,90 \pm 11,20	105,40 \pm 12,44	120,63 \pm 18,61	319,13 \pm 24,27	283,75 \pm 36,86	0,55 \pm 0,06	0,64 \pm 0,09	0,38 \pm 0,02
Hemiparkinsonizam	93,17 \pm 11,03	187,73 \pm 6,93	78,77 \pm 13,12	154,57 \pm 12,35	261,14 \pm 23,84	183,57 \pm 30,50	0,67 \pm 0,07	0,77 \pm 0,08	0,39 \pm 0,03
Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB	96,79 \pm 9,66	176,04 \pm 15,45	86,83 \pm 11,71	180,50 \pm 22,14	296,33 \pm 29,34	263,33 \pm 20,98	0,58 \pm 0,06	0,59 \pm 0,10	0,36 \pm 0,03
<i>Hipp</i>									
Kontrola	53,17 \pm 3,15	233,48 \pm 12,53	73,02 \pm 12,20	97,20 \pm 4,99	146,00 \pm 2,14	78,40 \pm 5,02	0,52 \pm 0,02	1,71 \pm 0,03	0,77 \pm 0,08
Holinopatija PB	60,21 \pm 8,36	230,88 \pm 14,48	68,58 \pm 15,71	109,88 \pm 11,83	181,00 \pm 20,15	127,25 \pm 29,49	0,54 \pm 0,05	1,46 \pm 0,25	0,57 \pm 0,05
Hemiparkinsonizam	87,81 \pm 7,89	210,71 \pm 5,99	61,15 \pm 10,24	176,67 \pm 27,13	222,17 \pm 27,15	88,83 \pm 17,03	0,58 \pm 0,06	1,05 \pm 0,13	0,60 \pm 0,09
Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB	88,65 \pm 9,84	195,98 \pm 13,52	75,04 \pm 10,60	194,25 \pm 40,64	276,63 \pm 40,02	215,50 \pm 37,22	0,52 \pm 0,06	0,84 \pm 0,14	0,37 \pm 0,02



Slika 4.5. Lokalna dinamika epizoda budnosti/NREM/REM spavanja u različitim eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti. Distribucija grupnog srednjeg broja epizoda/6 h u funkciji njihovog trajanja (min) u motornoj kori (A) i hipokampusu (B). U ovim log-log distribucijama svaki „horizontalni stepenik“ postavljen je iznad svog odgovarajućeg trajanja označenog na x osi u minutima (npr. grupni srednji broj epizoda na 6 h od 10 s postavljen je iznad $10/60 = 0,17$ min i tako dalje). Na prva dva gornja panela 10, 20 i 30 označavaju prve tri grupe epizoda trajanja od 10, 20 i 30 s, dok horizontalni stepenici ispod kojih se nalaze predstavljaju grupni srednji broj epizoda budnosti tog trajanja/6 h. Delovi distribucija koji nedostaju predstavljaju srednje vrednosti broja epizoda koji su jednake nuli, a čije logaritmovane vrednosti nisu brojevi.

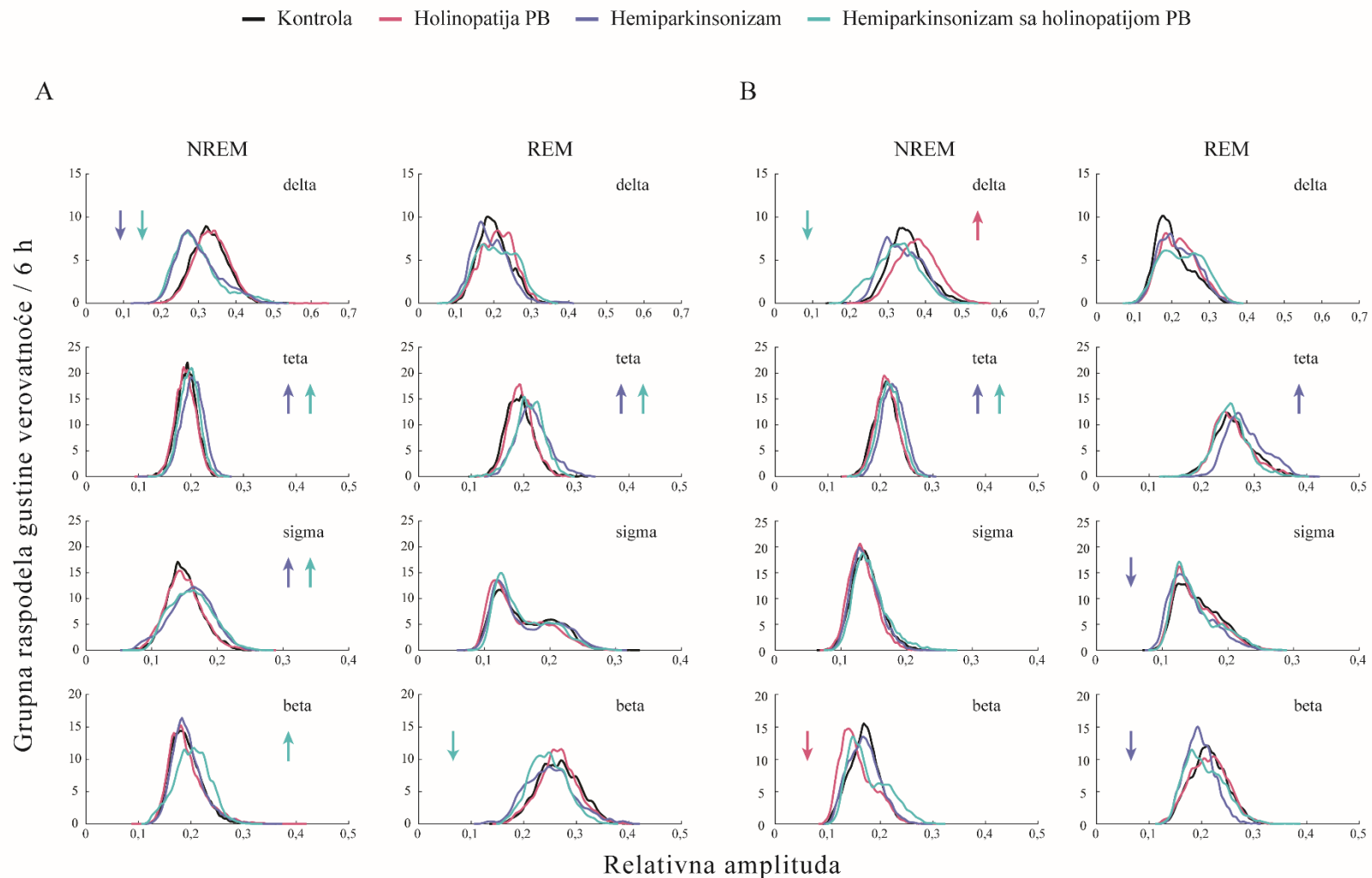
4.2.2 Lokalne izmene u EEG mikrostrukturi NREM i REM faze spavanja

U okviru analize lokalne EEG mikrostrukture praćena je izmena relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG ritmova zajedničkog (istovremenog) NREM i REM spavanja motorne kore i hipokampusa (**Slika 4.6**).

Za razliku od holinopatije PB koja je izazvala poremećaj samo hipokampalnog NREM spavanja, hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB uslovlili su daleko ozbiljnije poremećaje NREM/REM spavanja. Naime, holinopatija PB je, na samom početku neuropatologije nastale usled bilateralnog deficita ACh neurona PPT jedra, povećala delta amplitudu i smanjila beta amplitudu NREM spavanja u hipokampusu (**Slika 4.6B**; $z \geq -3,26$; $p \leq 0,02$). Nasuprot tome, obe grupe hemiparkinsonizma su izazvale povećanje NREM/REM teta amplitude u motornoj kori (**Slika 4.6A**; $z \geq -5,02$; $p \leq 10^{-4}$) i NREM teta amplitude u hipokampusu (**Slika 4.6B**; $z \geq -4,04$; $p \leq 0,04$), dok je samo hemiparkinsonizam povećao hipokampalnu REM teta amplitudu ($z = -2,73$; $p = 0,01$). Povećanje teta amplitude bilo je praćeno smanjenjem delta i povećanjem sigma amplitude tokom NREM spavanja u motornoj kori u oba modela hemiparkinsonizma (**Slika 4.6A**, NREM paneli; $z \geq -3,39$; $p \leq 0,02$). Sa druge strane, u hemiparkinsonizmu, povećanje teta amplitude za vreme REM spavanja u hipokampusu, bilo je praćeno smanjenjem sigma i beta amplituda (**Slika 4.6B**, REM paneli; $z \geq -2,72$; $p \leq 0,01$).

Takođe, pokazan je i suprotan obrazac promene NREM/REM beta amplitude u motornoj kori (povećanje NREM beta amplitude i smanjenje REM beta amplitude u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB; **Slika 4.6A**; $z \geq -2,23$; $p \leq 0,03$). Za razliku od toga hemiparkinsonizam je izazvao smanjenje sigma i beta amplitude, ali samo tokom hipokampalnog REM spavanja (**Slika 4.6B**). Ove heterogene promene u lokalnim NREM/REM EEG mikrostrukturama ukazuju na topografski i stanjem (NREM/REM) uslovljen uticaj DA denervacije na kontrolu beta i sigma amplitude. Međutim, u oba modela hemiparkinsonizma poremećaj DA kontrole tokom REM spavanja u motornoj kori i hipokampusu je doveo do smanjenja beta amplitude (**Slika 4.6A i B**, REM paneli; $z \geq -2,72$; $p \leq 0,03$).

Pored toga, rezultati su pokazali i suprotan uticaj poremećaja DA i ACh kontrole na delta i beta amplitude tokom NREM spavanja u hipokampusu, kao i u motornoj kori u odnosu na hipokampus: NREM paneli motorne kore (**Slika 4.6A**), naspram NREM panela hipokampusa (**Slika 4.6B**).



Slika 4.6. Lokalna NREM/REM EEG mikrostruktura u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti. Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih EEG delta, teta, sigma i beta amplituda/6 h u toku NREM i REM spavanja u motornoj kori (**A**) i hipokampusu (**B**). Strelice okrenute ka gore označavaju statistički značajno povećanje, a strelice okrenute ka dole označavaju statistički značajno smanjenje amplitude određenog EEG frekventnog opsega u odgovarajućoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu za vrednosti $p \leq 0,05$.

4.2.3 Dinamika vretena spavanja

Rezultati analize dinamike vretena spavanja su pokazali da se prirodna vretena spavanja (SS vretena) javljaju u kontrolnih pacova kako tokom NREM, tako i tokom REM faze spavanja, ali samo u motornoj kori (**Tabela 4.2, Tabela 4.3, Kontrola**).

Holinopatija PB je indukovala pojavu SS vretena tokom NREM spavanja u hipokampusu (**Tabela 4.2, Holinopatija PB**), kao i pojavu visokovoltaznih vretena (HVS vretena) u motornoj kori i hipokampusu tokom NREM i REM spavanja (**Tabela 4.3, Holinopatija PB**). Ova ACh deficitom indukovana HVS vretena, detektovana u motornoj kori i hipokampusu, su veće gustine i dužeg trajanja tokom REM spavanja nego tokom NREM spavanja (**Slika 4.7A; Tabela 4.3, Holinopatija PB**; $z \geq -5,99$, $p \leq 10^{-3}$ za motornu koru; $z \geq -3,69$, $p \leq 10^{-3}$ za hipokampus). Nasuprot tome, SS vretena u motornoj kori su dužeg trajanja i manje gustine u toku REM spavanja nego tokom NREM spavanja (**Tabela 4.2, Holinopatija PB**; $z \geq -2,42$, $p = 0,02$).

Hemiparkinsonizam je indukovao pojavu SS vretena u hipokampusu tokom NREM faze spavanja (**Tabela 4.2, Hemiparkinsonizam**), ali i pojavu HVS vretena tokom REM faze spavanja u obe moždane strukture (**Tabela 4.3, Hemiparkinsonizam**).

Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB je indukovao pojavu SS vretena tokom REM faze u hipokampusu (**Tabela 4.2, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**), kao i pojavu HVS vretena tokom REM spavanja u obe moždane strukture, a tokom NREM spavanja samo u motornoj kori (**Tabela 4.3, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**).

Oba tipa vretena su manje srednje unutrašnje frekvencije u hipokampusu u odnosu na motornu koru (**Tabele 4.2, 4.3**; $z \geq -3,04$, $p \leq 0,02$), osim u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (**Tabele 4.2, 4.3**; $z = -1,69$, $p = 0,09$). Naime, u ovom modelu su se interstrukturne razlike u srednjoj unutrašnjoj frekvenciji HVS vretena tokom REM spavanja izgubile usled porasta srednje unutrašnje frekvencije HVS vretena u hipokampusu (**Slika 4.7B., Tabela 4.3**; $z = 3,92$, $p = 10^{-4}$).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je REM spavanje predisponirajuće stanje za indukovanje HVS vretena u svim eksperimentalnim modelima PB, posebno u modelima hemiparkinsonizma (hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Takođe, ustanovljeno je da holinopatija PB produžava trajanje SS i HVS vretena, i povećava gustinu indukovanih HVS vretena, posebno tokom REM faze spavanja (**Tabela 4.3, Slika 4.7**).

Tabela 4.2. Dinamika prirodnih vretena spavanja (SS vretena) motorne kore i hipokampusa tokom NREM/REM faze spavanja u različitim eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti.

n – broj pacova; **nSS** – ukupan broj izdvojenih SS vretena; **gustina/h** – srednja frekvencija SS vretena po satu NREM/REM spavanja (1/min); **NREM/REM trajanje/h** – srednje trajanje NREM/REM faze (min); **SS trajanje/h** – ukupno trajanje izdvojenih SS vretena tokom 1 h NREM/REM spavanja (min); **SS trajanje** – srednje trajanje SS vretena (s); **SS frekvencija** – srednja unutrašnja frekvencija SS vretena (Hz); Podebljani brojevi označavaju statistički značajne razlike srednjih vrednosti između motorne kore (MCx) i hipokampusa (Hipp) za $p \leq 0,05$. * označavaju statistički značajne razlike srednjih vrednosti između NREM i REM spavanja za $p \leq 0,05$. \ označavaju srednje vrednosti koje nisu analizirane jer su vretena spavanja bila prisutna kod manje od 50% pacova iz grupe.

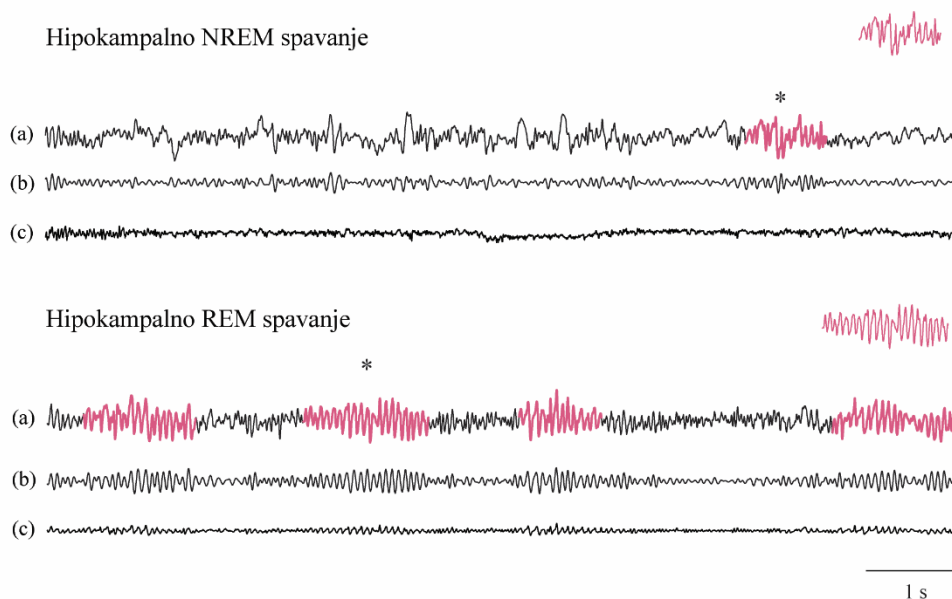
Kontrola								
		n	nSS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	SS trajanje/h (min)	SS trajanje (s)	SS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	5/8 (63%)	29	0,34±0,17	25,70±4,28	0,13±0,04	1,34±0,12	13,56 ± 0,21
	<i>REM</i>	7/8 (88%)	17	0,38±0,11	7,00±0,74	0,06±0,02	1,39±0,18	13,65 ± 0,28
Hipp	<i>NREM</i>	3/8 (38%)	12	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	3/8 (38%)	4	\	\	\	\	\
Holinopatija PB								
		n	nSS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	SS trajanje/h (min)	SS trajanje (s)	SS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	8/8 (100%)	124	0,52±0,10	31,02±2,33	0,31±0,05	1,18±0,04	13,24±0,09
	<i>REM</i>	8/8 (100%)	18	0,22±0,07 *	10,69±1,40	0,06±0,02	1,52±0,16 *	12,69 ± 0,16
Hipp	<i>NREM</i>	6/8 (75%)	31	0,17±0,08	31,81±2,91	0,10±0,04	1,21±0,06	12,70 ± 0,10
	<i>REM</i>	2/8 (25%)	6	\	\	\	\	\
Hemiparkinsonizam								
		n	nSS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	SS trajanje/h (min)	SS trajanje (s)	SS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	5/7 (71%)	132	0,91±0,21	28,30±4,10	0,54±0,16	1,23±0,05	13,31±0,08
	<i>REM</i>	5/7 (71%)	34	0,73±0,21	9,00±0,46	0,21±0,06	1,88±0,14 *	13,14±0,11
Hipp	<i>NREM</i>	5/7 (71%)	36	0,24±0,07	28,83±3,73	0,14±0,05	1,19±0,08	12,56 ± 0,11
	<i>REM</i>	3/7 (43%)	9	\	\	\	\	\
Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB								
		n	nSS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	SS trajanje/h (min)	SS trajanje (s)	SS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	8/8 (100%)	166	0,81±0,19	25,88±3,05	0,44±0,16	1,28±0,04	13,27±0,07
	<i>REM</i>	5/8 (63%)	21	0,52±0,16	8,67±1,30	0,10±0,02	1,47±0,11	13,40±0,22
Hipp	<i>NREM</i>	3/8 (38%)	19	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	5/8 (63%)	12	0,33±0,06	7,57±1,20	0,06±0,01	1,51±0,14	12,51 ± 0,38

Tabela 4.3. Dinamika visokovoltaznih vretena (HVS vretena) motorne kore i hipokampusa tokom NREM/REM faze spavanja u različitim eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti.

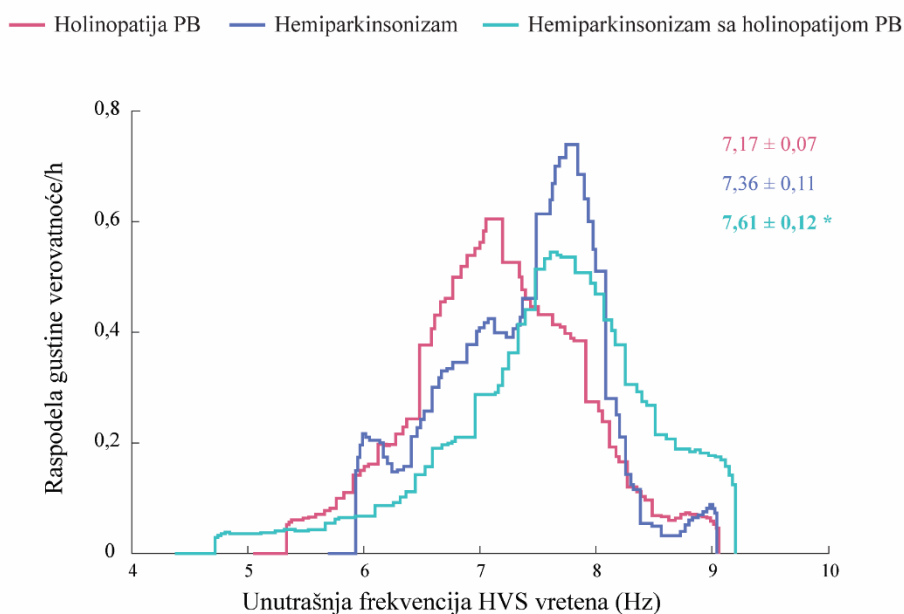
n – broj pacova; **nHVS** – ukupan broj izolovanih HVS vretena; **gustina/h** – srednja frekvencija HVS vretena po satu NREM/REM spavanja (1/min); **NREM/REM trajanje/h** – srednje trajanje NREM/REM faze (min); **HVS trajanje/h** – ukupno trajanje izolovanih HVS vretena tokom 1 h NREM/REM spavanja (min); **HVS trajanje** – srednje trajanje HVS vretena (s); **HVS frekvencija** – srednja unutrašnja frekvencija HVS vretena (Hz); Podebljani brojevi označavaju statistički značajne razlike srednjih vrednosti između motorne kore (MCx) i hipokampusa (Hipp) za $p \leq 0,05$. * označavaju statistički značajne razlike srednjih vrednosti između NREM i REM spavanja za $p \leq 0,05$. \ označavaju srednje vrednosti koje nisu analizirane jer su vretena spavanja bila prisutna kod manje od 50% pacova iz grupe.

Kontrola								
		n	nHVS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	HVS trajanje/h (min)	HVS trajanje (s)	HVS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	1/8 (13%)	2	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	3/8 (38%)	14	\	\	\	\	\
Hipp	<i>NREM</i>	1/8 (13%)	3	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	2/8 (25%)	25	\	\	\	\	\
Holinopatija PB								
		n	nHVS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	HVS trajanje/h (min)	HVS trajanje (s)	HVS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	7/8 (88 %)	33	0,16 ± 0,05	31,17 ± 2,69	0,12 ± 0,04	1,57 ± 0,08	7,67 ± 0,19
	<i>REM</i>	8/8 (100%)	79	1,15 ± 0,40 *	10,69 ± 1,40	0,46 ± 0,09	2,79 ± 0,12 *	7,53 ± 0,09
Hipp	<i>NREM</i>	7/8 (88 %)	16	0,07 ± 0,02	30,64 ± 2,66	0,07 ± 0,03	1,74 ± 0,11	7,11 ± 0,17
	<i>REM</i>	8/8 (100%)	104	1,20 ± 0,26 *	10,69 ± 1,40	0,56 ± 0,19	2,58 ± 0,09 *	7,17 ± 0,07
Hemiparkinsonizam								
		n	nHVS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	HVS trajanje/h (min)	HVS trajanje (s)	HVS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	3/7 (43%)	9	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	5/7 (71%)	69	1,56 ± 0,20	8,97 ± 0,47	0,61 ± 0,09	2,66 ± 0,14	7,68 ± 0,10
Hipp	<i>NREM</i>	1/7 (14%)	1	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	5/7 (71%)	35	0,78 ± 0,13	8,97 ± 0,47	0,30 ± 0,04	2,54 ± 0,18	7,36 ± 0,11
Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB								
		n	nHVS	Gustina/h (1/min)	NREM/REM trajanje/h (min)	HVS trajanje/h (min)	HVS trajanje (s)	HVS frekvencija (Hz)
MCx	<i>NREM</i>	7/8 (88 %)	87	0,47 ± 0,12	26,12 ± 3,51	0,33 ± 0,12	1,60 ± 0,01	7,61 ± 0,01
	<i>REM</i>	8/8 (100%)	52	0,94 ± 0,21	7,94 ± 1,18	0,26 ± 0,06	2,39 ± 0,11 *	7,93 ± 0,09 *
Hipp	<i>NREM</i>	3/8 (38%)	6	\	\	\	\	\
	<i>REM</i>	8/8 (100%)	56	0,92 ± 0,26	7,94 ± 1,18	0,28 ± 0,09	2,36 ± 0,11	7,61 ± 0,12

A



B



Slika 4.7. Dinamika hipokampalnih NREM/REM visokovoltaznih vretena (HVS vretena) u različitim eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti. (A) Primeri hipokampalnih HVS vretena tokom NREM i REM faze spavanja izdvojenih iz EEG signala pacova sa holinopatijom PB: **(a)** analogni 20-sekundni EEG signal hipokampalnog NREM i REM spavanja sa detektovanim HVS vretenima obeleženim roze bojom; **(b)** isti EEG signal filtriran odgovarajućim pojasnim filterom (4,1-10 Hz), koji je korišćen za detekciju i izdvajanje HVS vretena; **(c)** odgovarajući EMG signal. **(B)** Distribucija grupne raspodele gustine verovatnoće unutrašnje frekvencije hipokampalnih HVS vretena tokom REM spavanja u eksperimentalnim modelima PB. U grupne distribucije je uključen ansambl od 104 HVS vretena izolovanih iz 8 životinja sa holinopatijom PB, 35 HVS vretena iz 5 životinja sa hemiparkinsonizmom i 56 HVS vretena izolovanih iz 8 životinja sa hemiparkinsonizmom sa holinopatijom PB. Podebljani brojevi sa * označavaju statistički značajne razlike srednjih vrednosti unutrašnje frekvencije HVS vretena tokom REM spavanja za $p \leq 0,05$.

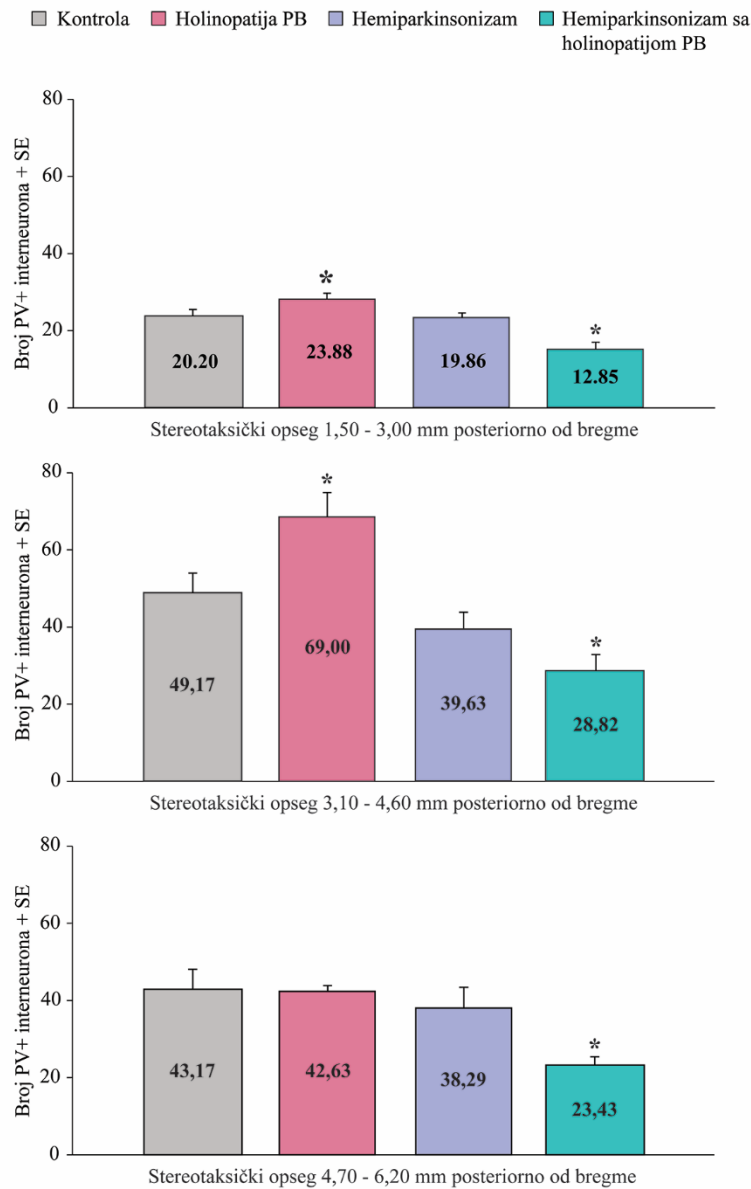
4.3 Ćelijska osnova i sinaptička reorganizacija prodromalnih poremećaja spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Kako bi ispitali ćelijsku osnovu i sinaptičku reorganizaciju koje leže u osnovi prodromalnih poremećaja spavanja u različitim eksperimentalnim modelima PB praćene su promene u broju GABA-ergičkih PV+ interneurona, kao i izmena ekspresije sinaptičkih proteina MAP2 i PSD-95 u hipokampusu i RT jedru, strukturama koje imaju važnu ulogu u regulaciji spavanja. Za analizu su korišćeni serijski preseći pacova kojima su prethodno verifikovani i kvantifikovani ACh i/ili DA deficit (vidi **Poglavlje 4.1**), a čija je starost većinom bila od 52 do 100 dana nakon specifičnih lezija.

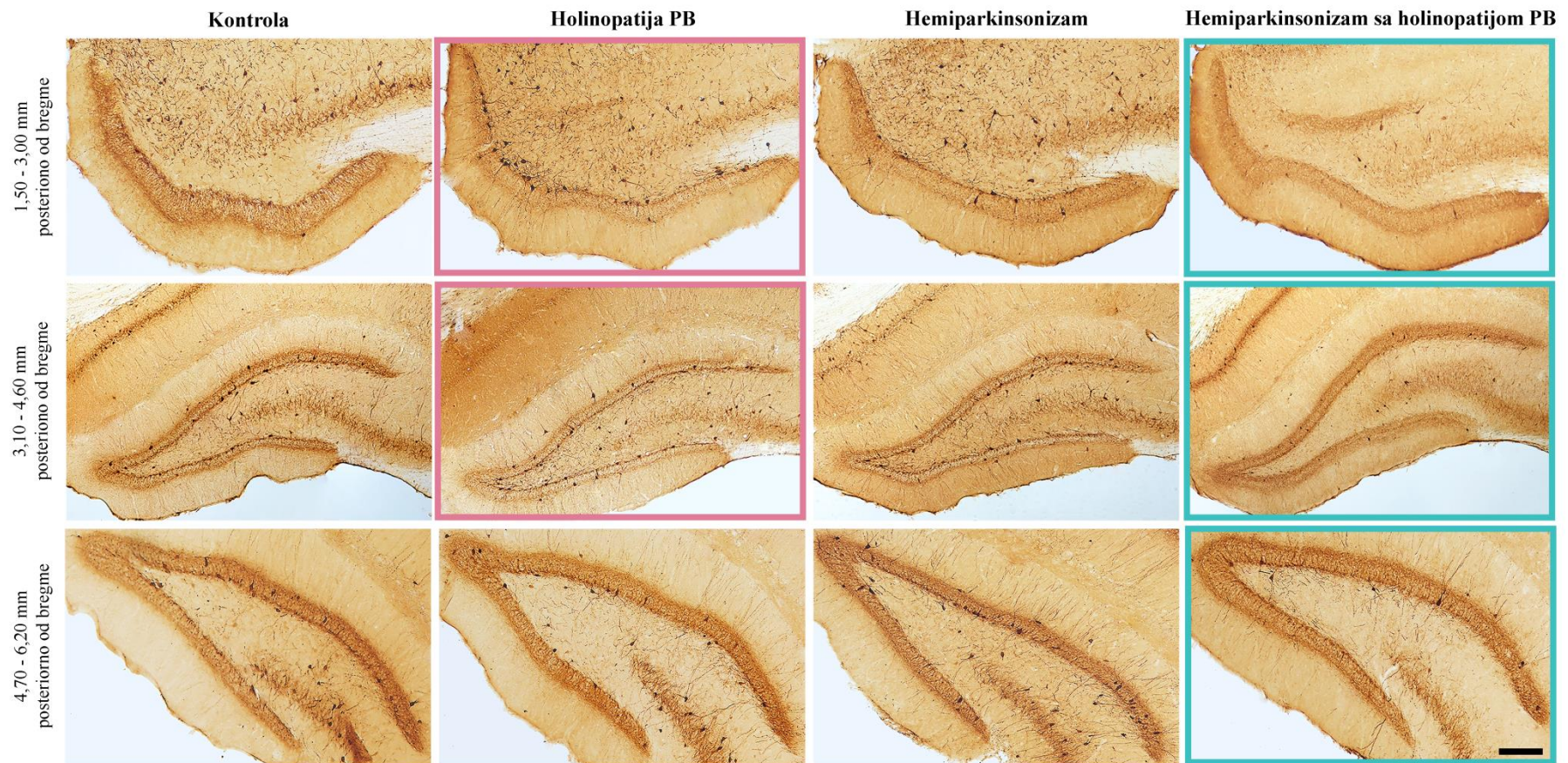
4.3.1 Značaj parvalbuminskih interneurona hipokampusa u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja

Kvantifikacija broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa je izvršena u svakoj eksperimentalnoj grupi u celoj antero-posteriornoj dimenziji hipokampusa, i po svakoj strani mozga u tri definisana stereotaksička opsega: 1,50 – 3,00 mm posteriorno od bregme; 3,10 – 4,60 mm posteriorno od bregme i 4,70 – 6,20 mm posteriorno od bregme (**Slika 4.8**, **Slika 4.9**).

Za razliku od hemiparkinsonizma gde nije bilo statistički značajne promene u broju PV+ interneurona u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 4.8**, $z \geq -1,01$, $p \geq 0,34$), u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB je dokazano statistički značajno smanjenje broja PV+ interneurona u celoj antero-posteriornoj dimenziji DG (**Slika 4.8**, $z \geq -2,71$, $p \leq 0,02$). Nasuprot tome, u modelu holinopatije PB je pokazano značajno povećanje broja PV+ interneurona u stereotaksičkom opsegu od 1,50 – 4,60 mm posteriorno od bregme (**Slika 4.8**, $z \geq -2,05$, $p = 0,04$). Individualni primeri PV imunohistohemijskog bojenja za svaku eksperimentalnu grupu i za svaki definisani stereotaksički opseg su prikazani na **Slici 4.9**.



Slika 4.8. Promena broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Srednji broj PV+ interneurona u tri stereotaksička opsega celokupne antero-posteriorne dimenzije DG-a hipokampusa kontrolnih pacova (n = 6) i u modelima holinopatije PB (n = 4), hemiparkinsonizma (n = 4) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 8). * označava statistički značajne razlike u broju PV+ interneurona u odnosu na kontrolnu grupu za $p \leq 0,05$.

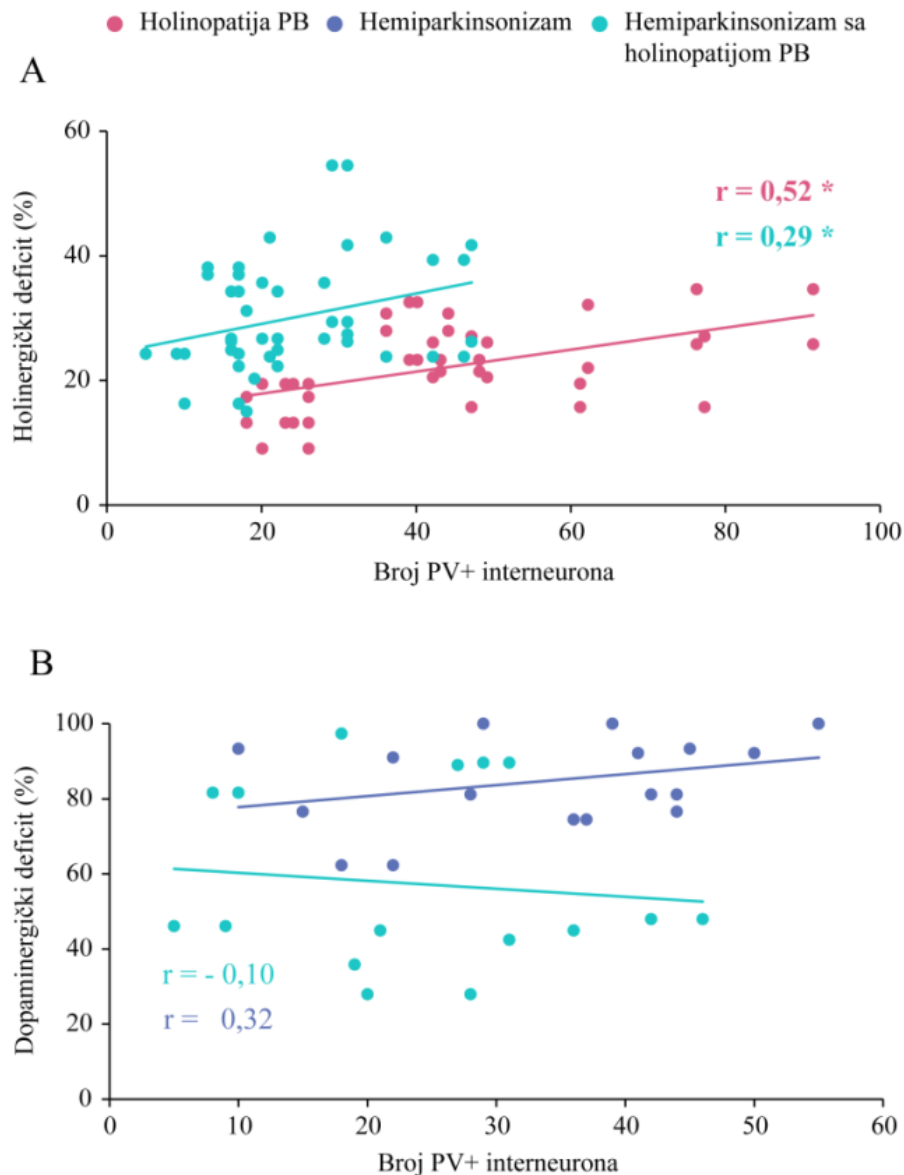


Slika 4.9. Imunohistohemijska identifikacija PV+ internerona u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Individualni primeri PV+ interneurona u različitim eksperimentalnim modelima PB koji prikazuju promene u broju PV+ interneurona u tri stereotaksička opsega celokupne antero-posteriore dimenzije DG-a (1,50 – 3,00 mm posterioro od bregme; 3,10 – 4,60 mm posterioro od bregme i 4,70 – 6,20 mm posterioro od bregme). Skala 200 μ m. Značajne promene u broju PV+ interneurona su uokvirene.

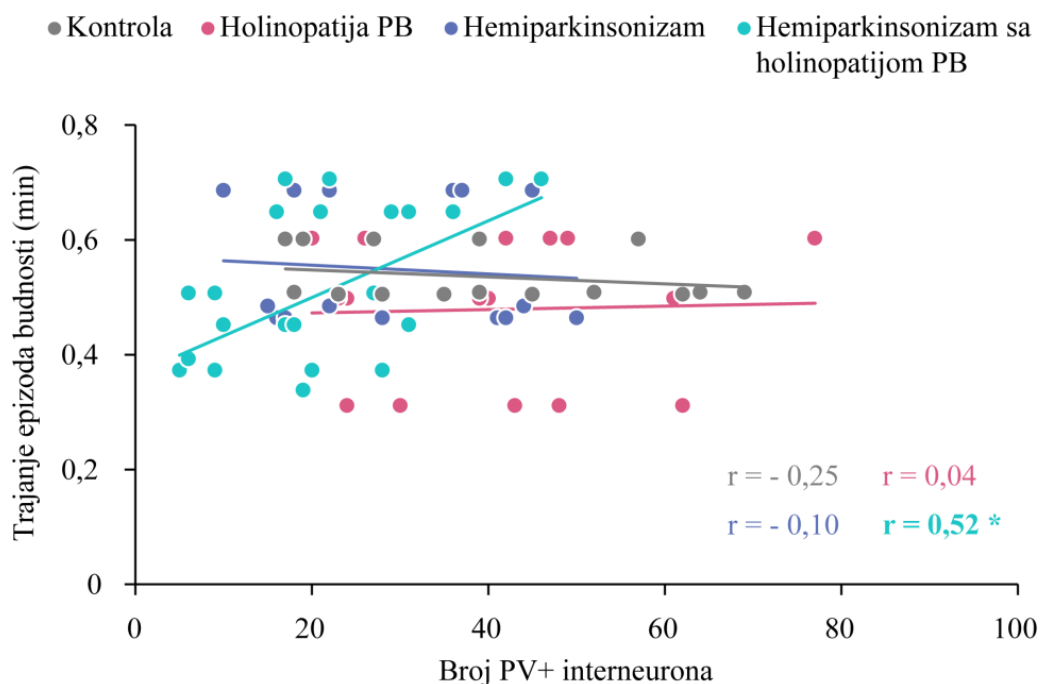
Kako bi se ispitala veza promenjenog broja PV+ interneurona u eksperimentalnim modelima PB i ACh i/ili DA deficita koji se nalazi u osnovi ovih modela izvršena je korelaciona analiza (**Slika 4.10**). Za razliku od DA deficita (eksperimentalni model hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB) u kome nije ustanovljena funkcionalna sprega između DA deficita i broja PV+ interneurona (**Slika 4.10B**; $r = 0,32$, $p = 0,20$; $r = 0,10$, $p = 0,69$), ACh deficit (eksperimentalni model holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB) je bio pozitivno korelisan sa brojem PV+ interneurona u oba eksperimentalna modela (**Slika 4.10A**; $r = 0,52$, $p = 10^{-5}$; $r = 0,29$, $p = 0,05$).

Pored toga, kroz korelacionu analizu je ispitivana i veza između promene broja PV+ interneurona i prethodno ustanovljenih poremećaja spavanja u različitim eksperimentalnim modelima PB (vidi **Poglavlje 4.2.**).

S obzirom na ustanovljenu fragmentaciju hipokampalnog spavanja u oba eksperimentalna modela hemiparkinsonizma ispitan je i korelacioni odnos između broja PV+ interneurona i parametara arhitekture spavanja i dinamike epizoda spavanja. Pokazano je da u kontroli ne postoji funkcionalna sprega između broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i trajanja budnosti/NREM/REM spavanja u hipokampusu, kao ni sa brojem/trajanjem hipokampalnih budnost/NREM/REM epizoda ($p \geq 0,32$). Nasuprot tome, ustanovljena je funkcionalna sprega između broja PV+ interneurona i trajanja epizoda budnosti u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (**Slika 4.11**, $r = 0,52$, $p = 0,01$), dok kod drugih eksperimentalnih grupa nije dokazana funkcionalna sprega (**Slika 4.11**, $r \geq -0,25$, $p \geq 0,36$). Naime, sa smanjenjem broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa trajanje hipokampalnih epizoda budnosti je kraće (**Slika 4.11**). Nakon toga, ispitan je i korelacioni odnos izmenjenih relativnih amplituda hipokampalnog NREM/REM spavanja i broja PV+ interneurona. Pokazano je da ne postoji funkcionalna veza između broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i hipokampalnih NREM/REM delta, teta, sigma, beta i gama relativnih amplituda, kako u kontrolnih pacova ($p \geq 0,60$ za NREM; $p \geq 0,33$ za REM), tako ni u modelima PB ($p \geq 0,37$ za NREM; $p \geq 0,33$ za REM).



Slika 4.10. Funkcionalna povezanost broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i holinergičkog i/ili dopaminergičkog deficita u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Korelacioni odnos (pozitivna linearna korelacija) broja PV+ interneurona i holinergičkog deficita u modelima holinopatije ($n = 4$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 6$). **(B)** Korelacioni odnos (nema linearne korelacije) broja PV+ interneurona i dopaminergičkog deficita u modelima hemiparkinsonizma ($n = 4$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 7$). Podebljani brojevi sa * označavaju statistički značajne linearne korelacije za $p \leq 0,05$.



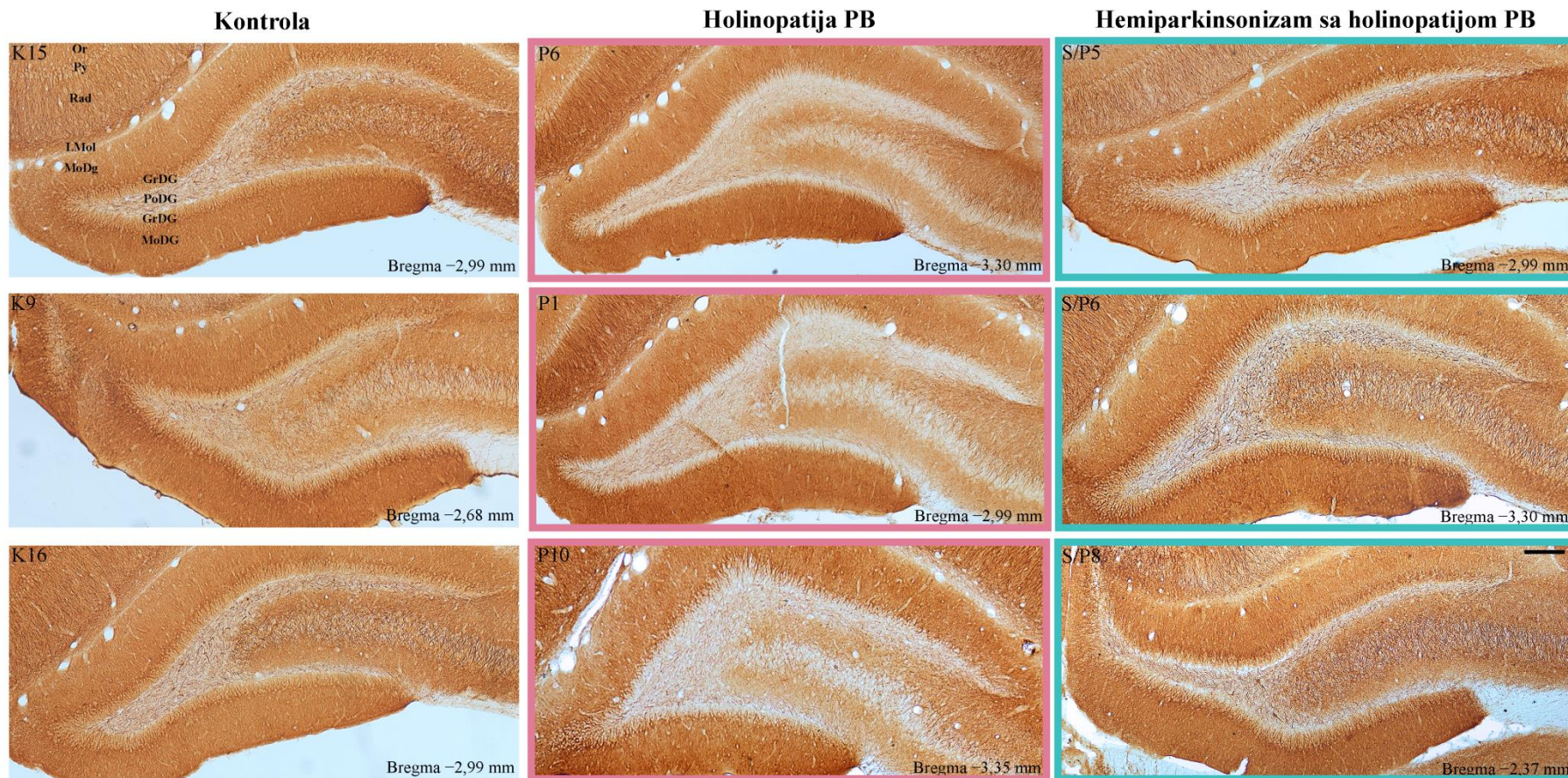
Slika 4.11. Funkcionalna povezanost broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i trajanja epizoda budnosti u različitim eksperimentalnim modelima PB. Korelacioni odnos između broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i trajanja epizoda budnosti kontrolnih pacova ($n = 3$) i u modelima holinopatije PB ($n = 3$), hemiparkinsonizma ($n = 3$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 7$). Podebljani brojevi sa * označavaju statistički značajne korelacije za $p \leq 0,05$.

4.3.2 Značaj sinaptičke reorganizacije hipokampusa u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja

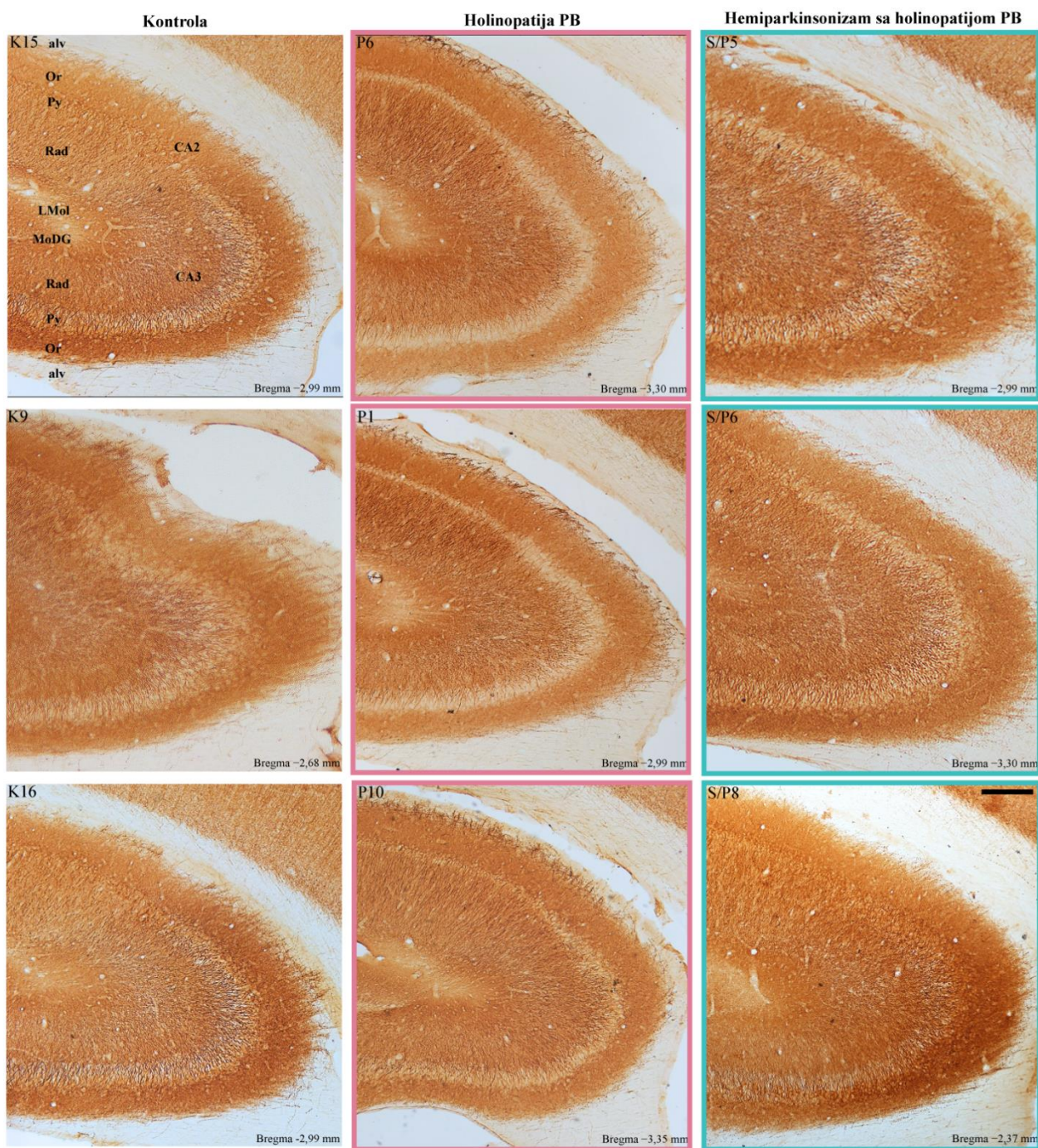
Sinaptička reorganizacija hipokampusa je praćena kroz ekspresiju postsinaptičkih proteina MAP2 i PSD-95, kako u kontrolnoj grupi životinja, tako i u eksperimentalnim modelima PB u kojima je prethodno dokazana izmena broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa.

Holinopatija PB je suprimirala ekspresiju MAP2 proteina, posebno u granularnom i polimorfnom ćelijskom sloju u DG-u (**Slika 4.12, Prilog 1, Holinopatija PB**), kao i u piramidalnem i radijalnom ćelijskom sloju CA3 regiona hipokampusa (**Slika 4.13, Prilog 1, Holinopatija PB**).

Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB je povećao ekspresiju MAP2 proteina u granularnom i polimorfnom ćelijskom sloju u DG-u hipokampusa (**Slika 4.12, Prilog 1, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**), kao i u CA3 regionu hipokampusa (**Slika 4.13, Prilog 1, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**).



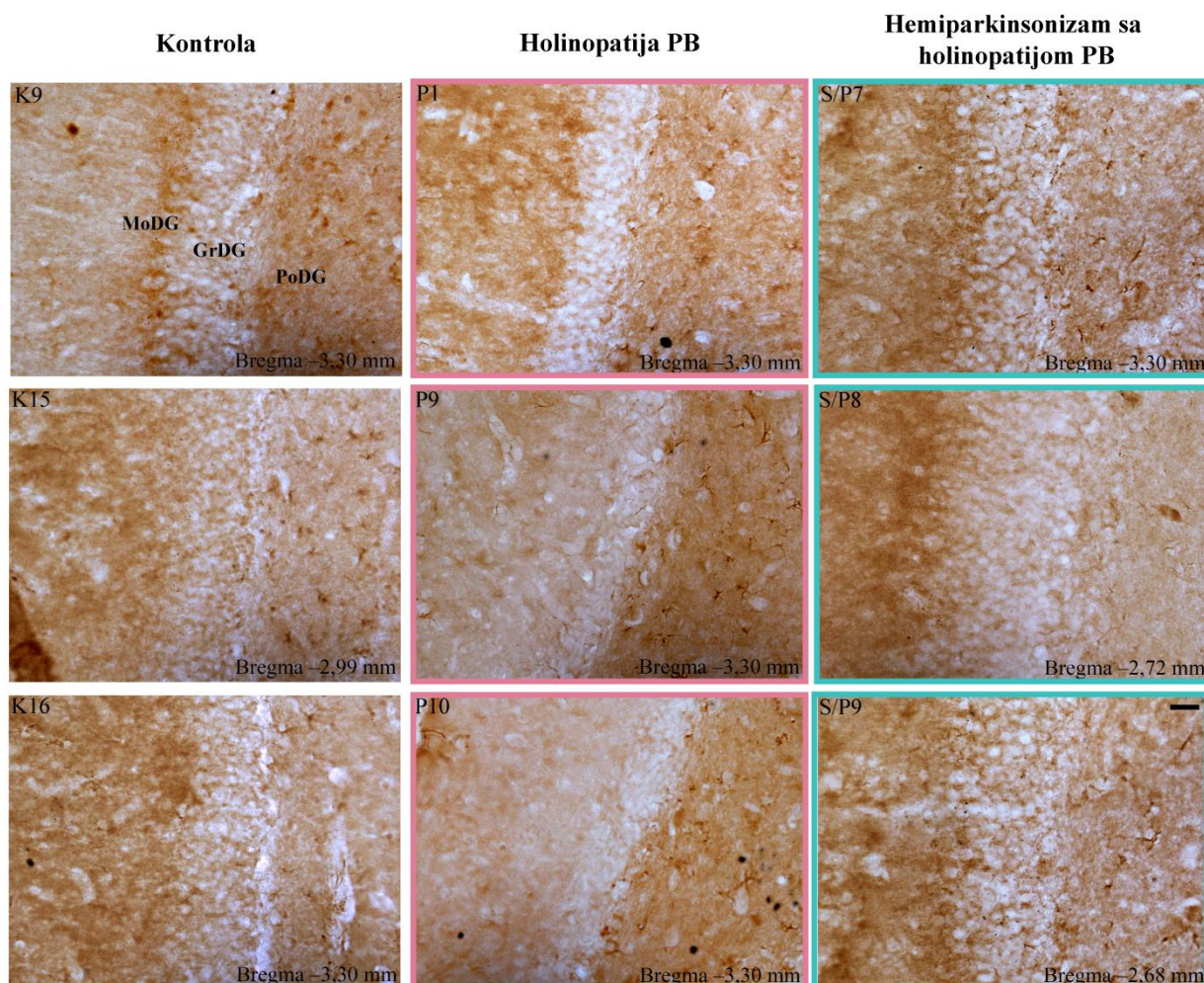
Slika 4.12. Ekspresija postsinaptičkog proteina MAP2 u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije MAP2 proteina u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (K15, K9, K16) i u modelima holinopatije PB (P6, P1, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P5, S/P6, S/P8). **Or** – *stratum oriens*; **Py** – *stratum pyramidale*; **Rad** – *stratum radiatum*; **Lmol** – *stratum lacunosum-moleculare*; **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum multiforme*. Skala 200 μ m. Značajne izmene u ekspresiji MAP2 proteina su uokvirene.



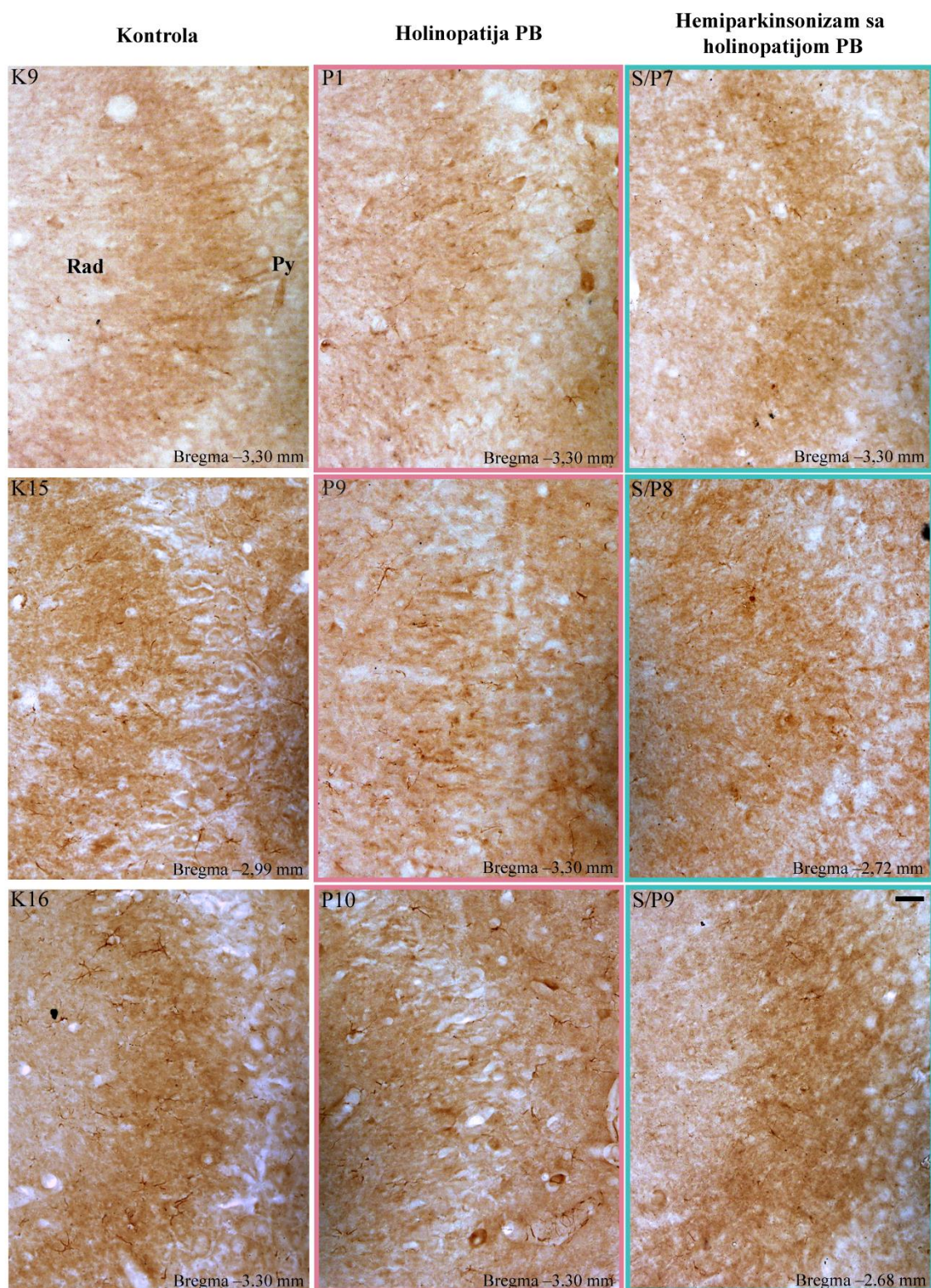
Slika 4.13. Ekspresija postsinaptičkog proteina MAP2 u CA3 regionu hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije MAP2 proteina u CA3 regionu hipokampusa kontrolnih pacova (K15, K9, K16) i u modelima holinopatije PB (P6, P1, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P5, S/P6, S/P8). *alv* – *alveus hippocampi*; *Or* – *stratum oriens*; *Py* – *stratum pyramidale*; *Rad* – *stratum radiatum*; *LMol* – *stratum lacunosum-moleculare*; *MoDG* – *stratum moleculare*; *GrDG* – *stratum granulare*; *CA* – *Cornu ammonis*. Skala 200 µm. Značajne izmene u ekspresiji MAP2 proteina su uokvirene.

Pored smanjene ekspresije MAP2 proteina i povećanja broja PV+ interneurona, holinopatija PB je smanjila ekspresiju postsinaptičkog proteina PSD-95, posebno u granularnom i molekularnom sloju DG (Slika 4.14, Prilog 2, Holinopatija PB), kao i u Rad i Py sloju CA3 regiona hipokampusa (Slika 4.15, Prilog 2, Holinopatija PB).

U modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ekspresija proteina PSD-95 je bila povećana, ali samo u GrDG i MoDG sloju DG (Slika 4.14, Prilog 2, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB), dok je ekspresija PSD-95 u ćelijskim slojevima CA3 regiona ostala ista kao u kontrolnim uslovima (Slika 4.15, Prilog 2, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB).



Slika 4.14. Ekspresija postsinaptičkog proteina PSD-95 u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije PSD-95 proteina u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (K9, K15, K16) i u modelima holinopatije PB (P1, P9, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P7, S/P8, S/P9). **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum multiforme*. Skala 50 μ m. Značajne izmene u ekspresiji PSD-95 proteina su uokvirene.



Slika 4.15. Ekspresija postsinaptičkog proteina PSD-95 u CA3 regionu hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije PSD-95 proteina u CA3 regionu hipokampusa kontrolnih pacova (K9, K15, K16) i u modelima holinopatije PB (P1, P9, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P7, S/P8, S/P9). **Py** – *stratum pyramidale*; **Rad** – *stratum radiatum*. Skala 50 μ m. Značajne izmene u ekspresiji PSD-95 proteina su uokvirene.

4.3.3 Značaj parvalbuminskih interneurona i sinaptičke reorganizacije retikulo-talamičkog jedra u lokalnim prodromalnim poremećajima spavanja

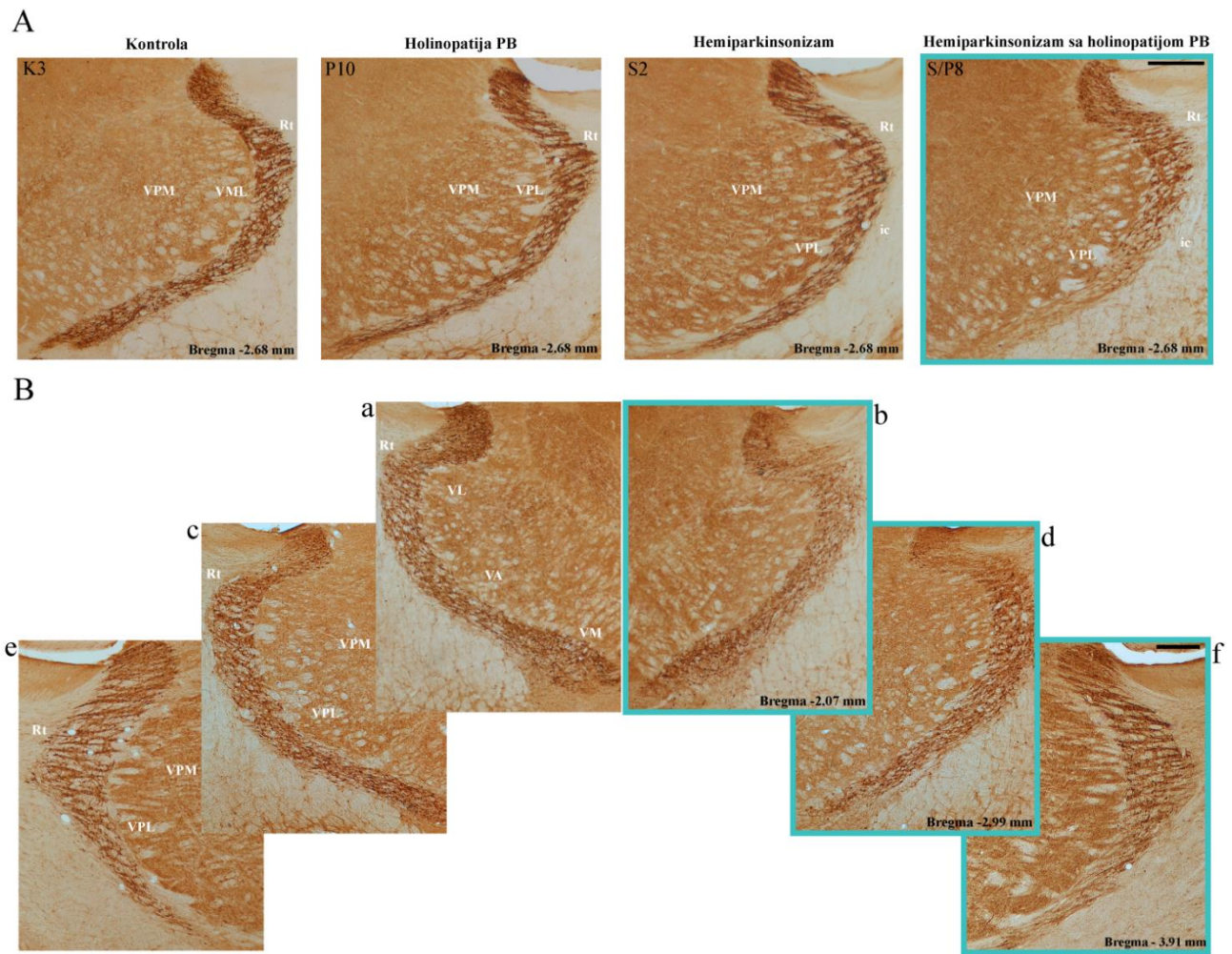
Kako bi ispitali ćelijsku osnovu indukovanih vretena spavanja, kao i njihove izmenjene dinamike (dinamika HVS vretena u REM fazi spavanja) u različitim eksperimentalnim modelima PB, pratili smo izmene PV+ interneurona i sinaptičku reorganizaciju u RT jedru, koje predstavlja važan subkortikalni generator vretena spavanja.

U modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB broj PV+ interneurona u RT-u je bio smanjen (**Prilog 3**, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Iako broj PV+ interneurona u RT-u nije kvantifikovan, smanjenje broja je kvalitativno potvrđeno kod skoro svih pacova u grupi (n = 7/8). Pored toga, uočeni su i defekti u PV ekspresiji u dorzalnog ili ventralnog delu RT, koji su bili prisutni kod 3/7 pacova sa smanjenim brojem PV+ interneurona i to sa strane kombinovanih lezija (desna strana mozga), a ukupna antero-posteriorna dimenzija tih defekata je bila od 0,64 mm do 1,84 mm. Na **Slici 4.16** su prikazani individualni primeri PV imunobojenja za svaku eksperimentalnu grupu (**Slika 4.16A**) sa tipičnim individualnim primerima dorzalnog i ventralnog defekta u celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji RT-a (**Slika 4.16B**). Defekti su detektovani sa strane kombinovanih lezija (uvek desna SNpc i PPT lezija), a dimenzija prikazanog individualnog primera defekta u njegovoj celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji je bila 1,84 mm (od -2,07 mm do -3,91 mm) (**Slika 4.16Bb, Bd, Bf**). Ovaj unilateralni defekt u PV ekspresiji je predstavljen u odnosu na RT kontralateralne strane mozga, koji je bio bez defekta (**Slika 4.16Ba, Bc, Be**).

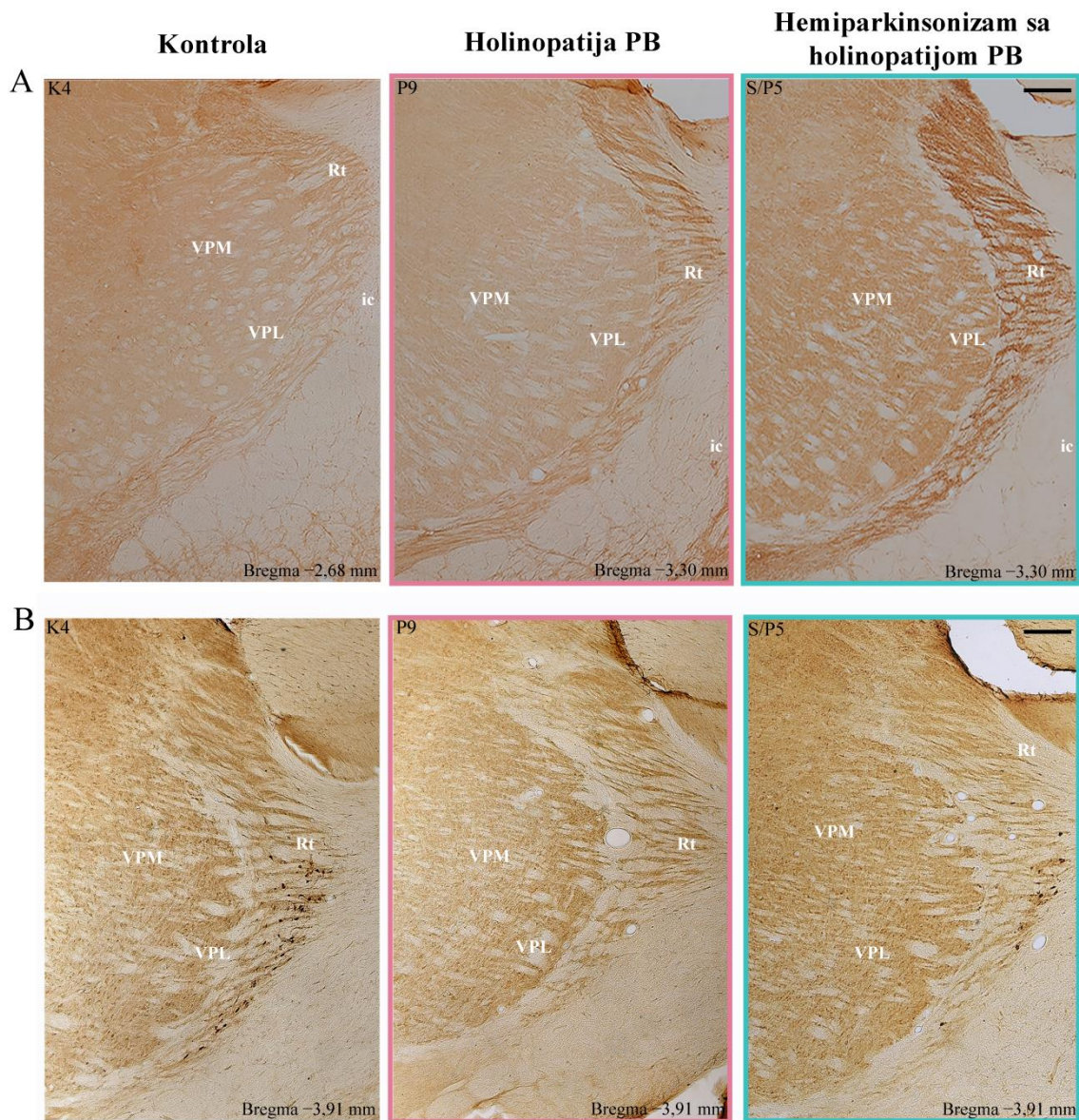
Pored izmene broja PV+ interneurona u RT-u, praćena je i izmena ekspresije postsinaptičkog proteina MAP2 i postsinaptičkog proteina PSD-95 (**Slika 4.17, Prilog 4, Prilog 5**).

U eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB redukcija PV ekspresije je bila praćena pojačanom ekspresijom MAP2 proteina u RT-u (**Slika 4.17A**, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Pojačana ekspresija MAP2 proteina bila je prisutna na desnoj strani, ipsilateralno lezijama SNpc i PPT jedra, i bila je pojačana kako u odnosu na kontralateralnu stranu (samo PPT lezija), tako i u odnosu na ekspresiju u kontrolnih pacova i u pacova sa holinopatijom PB (**Prilog 4**, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Takođe, pokazano je i parcijalno pojačanje ekspresije MAP2 proteina u dorzalnog delu RT-a u holinopatiji PB (**Prilog 4**, Holinopatija PB). Tipični primeri MAP2 ekspresije za svaku eksperimentalnu grupu su predstavljeni na **Slici 4.17A**.

Iako nije bilo promene u broju PV+ interneurona u RT jedru u holinopatiji PB je delimično pojačanje ekspresije MAP2 proteina bilo praćeno supresijom PSD-95 proteina (**Slika 4.17B, Prilog 5**, Holinopatija PB). Nasuprot tome, u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB, pokazano je smanjenje broja PV+ interneurona, dok je pojačana ekspresija MAP2 proteina bila praćena ekspresijom PSD-95 proteina na nivou sličnom onom u kontrolnim uslovima (**Slika 4.17B, Prilog 5**, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB).



Slika 4.16. Imunohistohemijska identifikacija PV+ interneurona RT jedra u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Primeri PV+ interneurona u RT jedru u kontroli (K3), holinopatiji PB (P10), hemiparkinsonizmu (S2) i hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB (S/P8). (B) Prikaz defekta u antero-posterionoj dimenziji RT jedra (od 2,07 mm do 3,91 mm posteriorno od bregme) u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P5) ipsilateralno kombinovanoj leziji (b,d,f) i u odnosu na kontralateralnu stranu (a,c,e). **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VL** – *nucleus ventralis lateralis*; **VA** – *nucleus ventralis anterior thalami*; **VM** – *nucleus ventralis medialis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*; **ic** – *capsula interna*. Skala 200 μ m. Značajne izmene u PV ekspresiji su uokvirene.



Slika 4.17. Ekspresija postsinaptičkih proteina MAP2 i PSD-95 u RT jedru u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Primeri ekspresije MAP2 proteina u RT jedru u kontroli (K4), holinopatiji PB (P9) i hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB (S/P7); Skala 200 μ m. **(B)** Primeri ekspresije PSD-95 proteina u RT jedru u kontroli (K4), holinopatiji PB (P9) i hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB (S/P5); Skala 200 μ m. **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*; **ic** – *capsula interna*. Značajne izmene u ekspresiji MAP2 i PSD-95 proteina su uokvirene.

4.4 Poremećaji memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Pored prodromalnih poremećaja spavanja u okviru ove doktorske disertacije ispitivan je i poremećaj memorijskih funkcija kao mogućih prodromalnih nemotoričkih manifestacija PB, kao i bazalna lokomotorna aktivnost u različitim eksperimentalnim modelima PB.

Bazalna lokomotorna aktivnost (OFT), prostorna habituacija (SHT) i prepoznavanje novog objekta (NORT) praćeni su u dva termina, 14 i 42 dana nakon lezija u sledećim eksperimentalnim grupama: intaktna kontrola (n = 17), holinopatija PB (n = 12), hemiparkinsonizam (n = 11) i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB (n = 13).

4.4.1 Spontana bazalna lokomotorna aktivnost

Rezultati analize bazalne motoričke aktivnosti u različitim eksperimentalnim modelima PB su prikazani na **Slici 4.18**. Ni jedna eksperimentalna grupa nije pokazala značajne promene u spontanoj lokomotornoj aktivnosti 14 i 42 dana nakon lezija (**Slika 4.18**; $\chi^2 \geq 2,01$; $p \geq 0,07$). Naime, i ukupna spontana lokomotorna aktivnost, merena tokom habituacije u otvorenoj areni u trajanju od 30 minuta, kao i 5-minutni vremenski profili pokazuju da su u svim eksperimentalnim modelima PB bile očuvane motoričke sposobnosti.

4.4.2 Poremećaj prostorne hipokampus-zavisne memorije

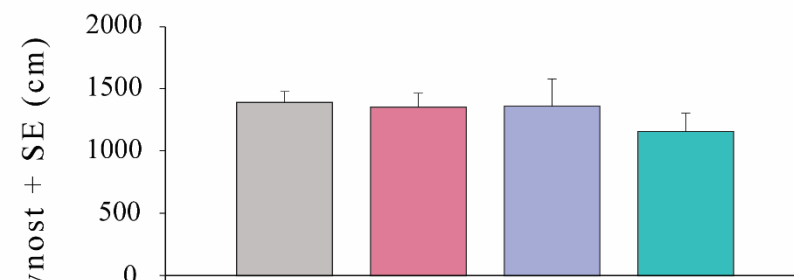
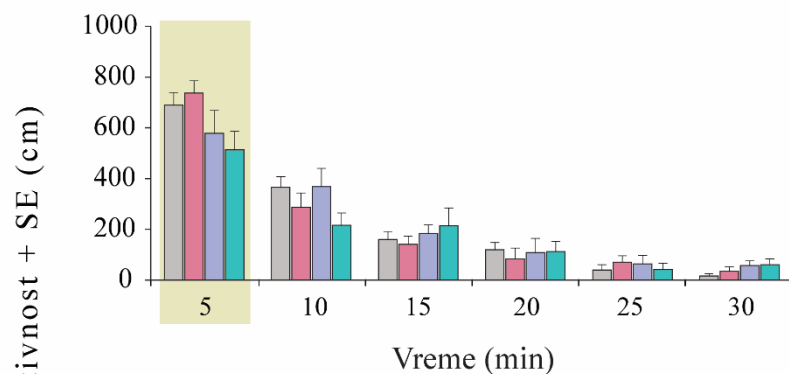
U ovoj doktorskoj disertaciji kao indirektna mera prostorne memorije je korišćen test prostorne habituacije (SHT). Rezultati testa prostorne habituacije 14 i 42 dana nakon lezija su prikazani na **Slici 4.19**. Naime, smanjenje eksploratorne aktivnosti, detektovane kao pad lokomotorne aktivnosti tokom trodnevne habituacije, predstavlja fiziološki odgovor, dok povećana ili neizmenjena eksploratorna aktivnost sugerise poremećaj prostorne memorije.

Značajan pad lokomotorne aktivnosti je pokazan u kontrolnih pacova ($\chi^2 = 24,41$, $p = 10^{-4}$) i u holinopatiji PB ($\chi^2 = 15,14$, $p = 10^{-3}$) 14 dana nakon lezije, što ukazuje na fiziološki habitualni odgovor, čime je pokazano da je u ovim eksperimentalnim grupama očuvana prostorna memorija (**Slika 4.19A, Kontrola, Holinopatija PB**). Nasuprot tome, oba modela hemiparkinsonizma (hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB) 14 dana nakon lezije nisu imala fiziološki habitualni odgovor u vidu pada lokomotorne aktivnosti, što ukazuje na oštećenje prostorne memorije (**Slika 4.19A, Hemiparkinsonizam, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**; $\chi^2 \geq 2,87$, $p \geq 0,22$).

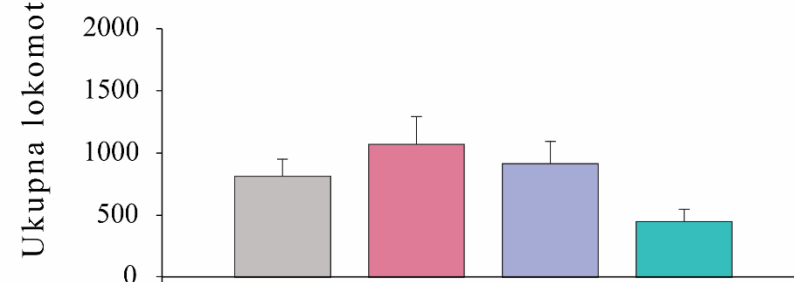
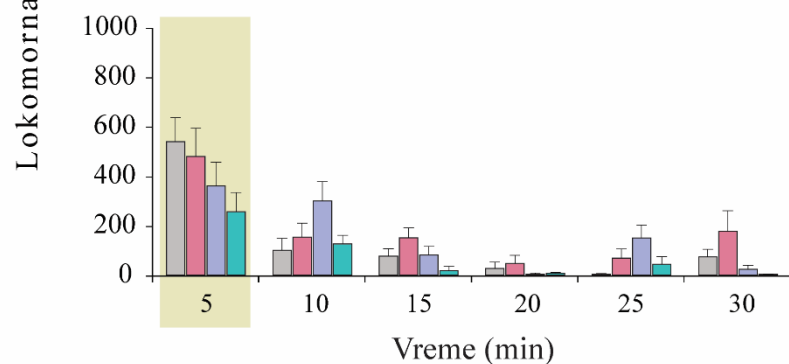
U terminu 42 dana nakon lezija je pokazano da je u svim eksperimentalnim modelima parkinsonizma (**Slika 4.19B, Holinopatija PB, Hemiparkinsonizam, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**) oštećena prostorna memorija ($\chi^2 \geq 0,38$, $p \geq 0,22$), dok je jedino kontrolna grupa u ovom terminu imala adekvatan habitualni odgovor (**Slika 4.19B, Kontrola**; $\chi^2 = 6,82$, $p = 0,03$).

Kontrola
 Holinopatija PB
 Hemiparkinsonizam
 Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB

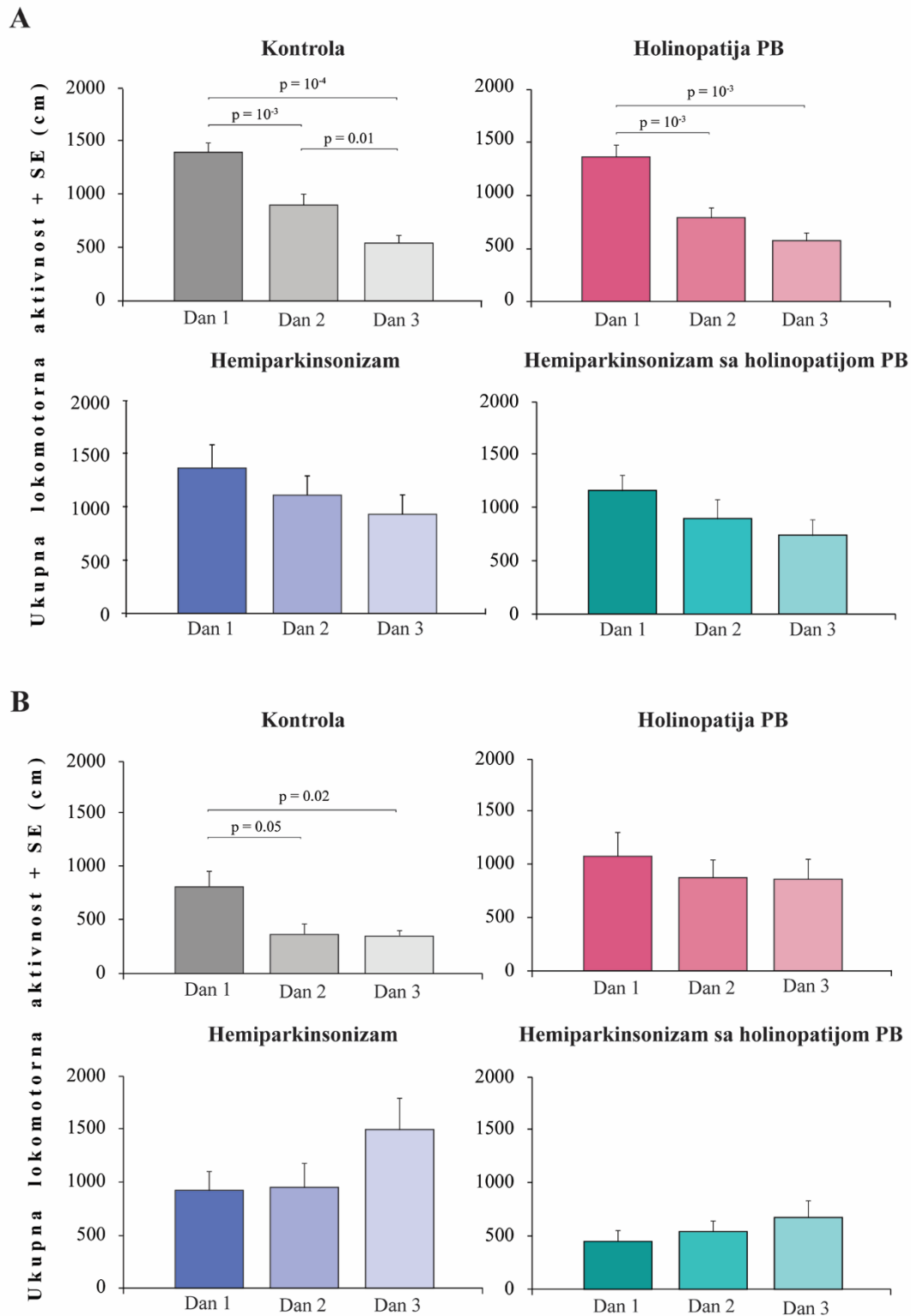
A



B



Slika 4.18. Spontana bazalna lokomotorna aktivnost u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Vremenski profil za 5-minutne intervale (levi panel) i ukupna lokomotorna aktivnost tokom 30 minuta testa otvorenog polja (desni panel) kontrolnih pacova (n = 14) i u modelima holinopatije PB (n = 10), hemiparkinsonizma (n = 7) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 6) 14 dana nakon lezija; (B) Vremenski profil za 5-minutne intervale (levi panel) i ukupna lokomotorna aktivnost tokom 30 minuta testa otvorenog polja (desni panel) kontrolnih pacova (n = 6) i u modelima holinopatije PB (n = 5), hemiparkinsonizma (n = 5) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 5) 42 dana nakon lezija.



Slika 4.19. Poremećaj prostorne memorije u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Test prostorne habituacije kontrolnih pacova ($n = 14$) i u modelima holinopatije PB ($n = 10$), hemiparkinsonizma ($n = 7$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 6$) 14 dana nakon lezija. (B) Test prostorne habituacije kontrolnih pacova ($n = 6$), i u modelima holinopatije PB ($n = 5$), hemiparkinsonizma ($n = 5$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 5$) 42 dana nakon lezija. Prikazane su statistički značajne pojedinačne p-vrednosti za Mann-Whitney U testove u spontanoj bazalnoj lokomotornoj aktivnosti.

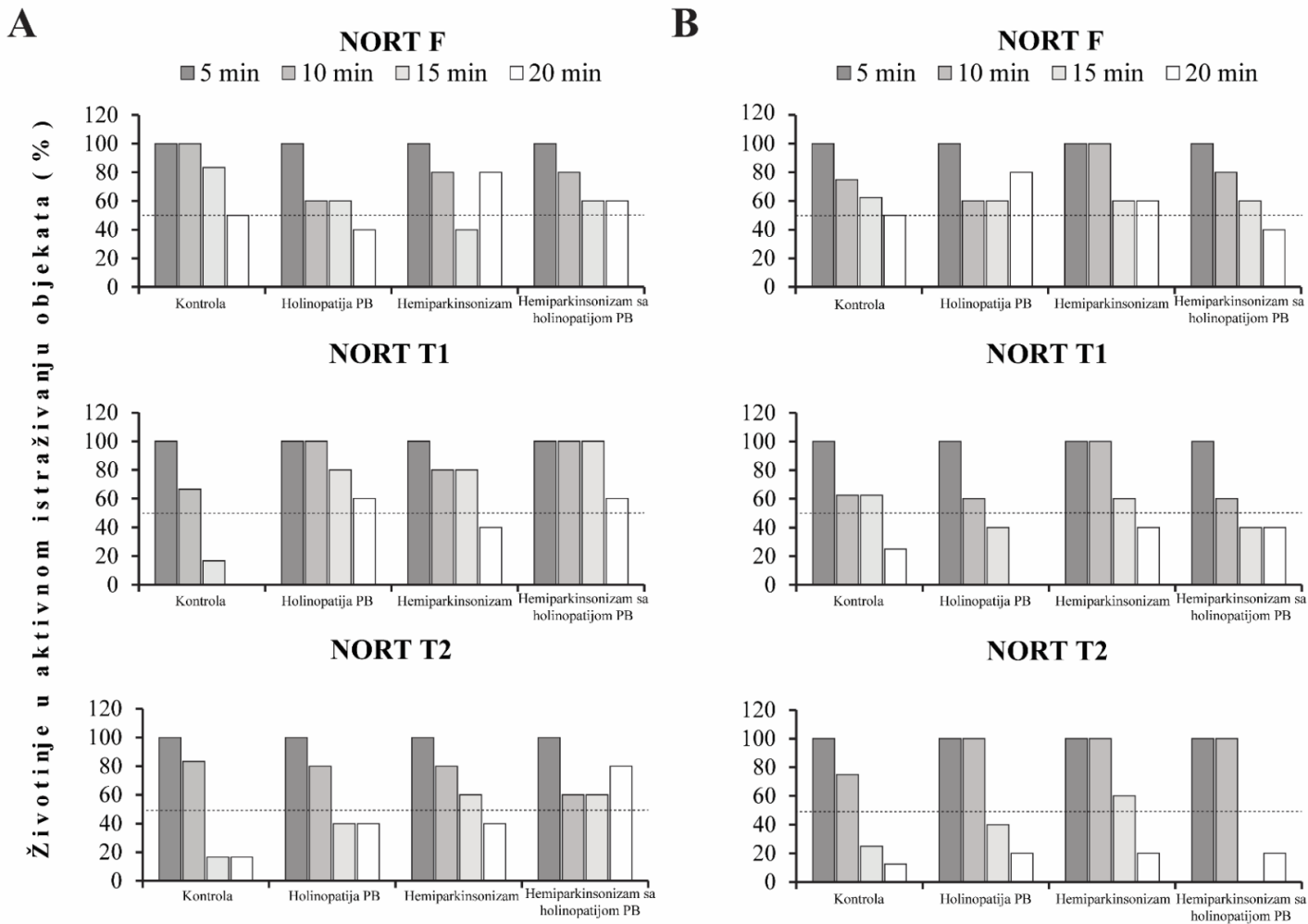
4.4.3 Poremećaj neprostorne hipokampus-zavisne memorije

U okviru ispitivanja poremećaja kratkotrajne i dugotrajne neprostorne hipokampus-zavisne memorije u eksperimentalnim modelima PB korišćen je modifikovani NORT protokol sa produženim i fiksnim trajanjem (20 minuta) svih faza testa prepoznavanja novog objekta (NORT F, NORT T1 i NORT T2). Stoga je najpre analizirano vreme provedeno u istraživanju objekata kako bi se definisala opšta eksploratorna aktivnost i vremenski profil eksploratorne aktivnosti (promene u interesovanju za objekte) tokom trajanja testa. Opšta eksploratorna aktivnost je definisana za sve tri faze testa kao procenat pacova u okviru grupe koji je bio aktivan u toku 5-minutnih intervala (**Slika 4.20**). Aktivnost grupe je procenjena na osnovu definisane granične vrednosti ($\geq 50\%$ životinja aktivno – grupa aktivna; $< 50\%$ životinja aktivno – grupa neaktivna). Vremenski profili eksploratorne aktivnosti su definisani kao procenat vremena provedenog u istraživanju objekata tokom 5-minutnih intervala u odnosu na ukupno vreme istraživanja objekata tokom 20 minuta testa, uzetih kao 100% (**Slika 4.21**).

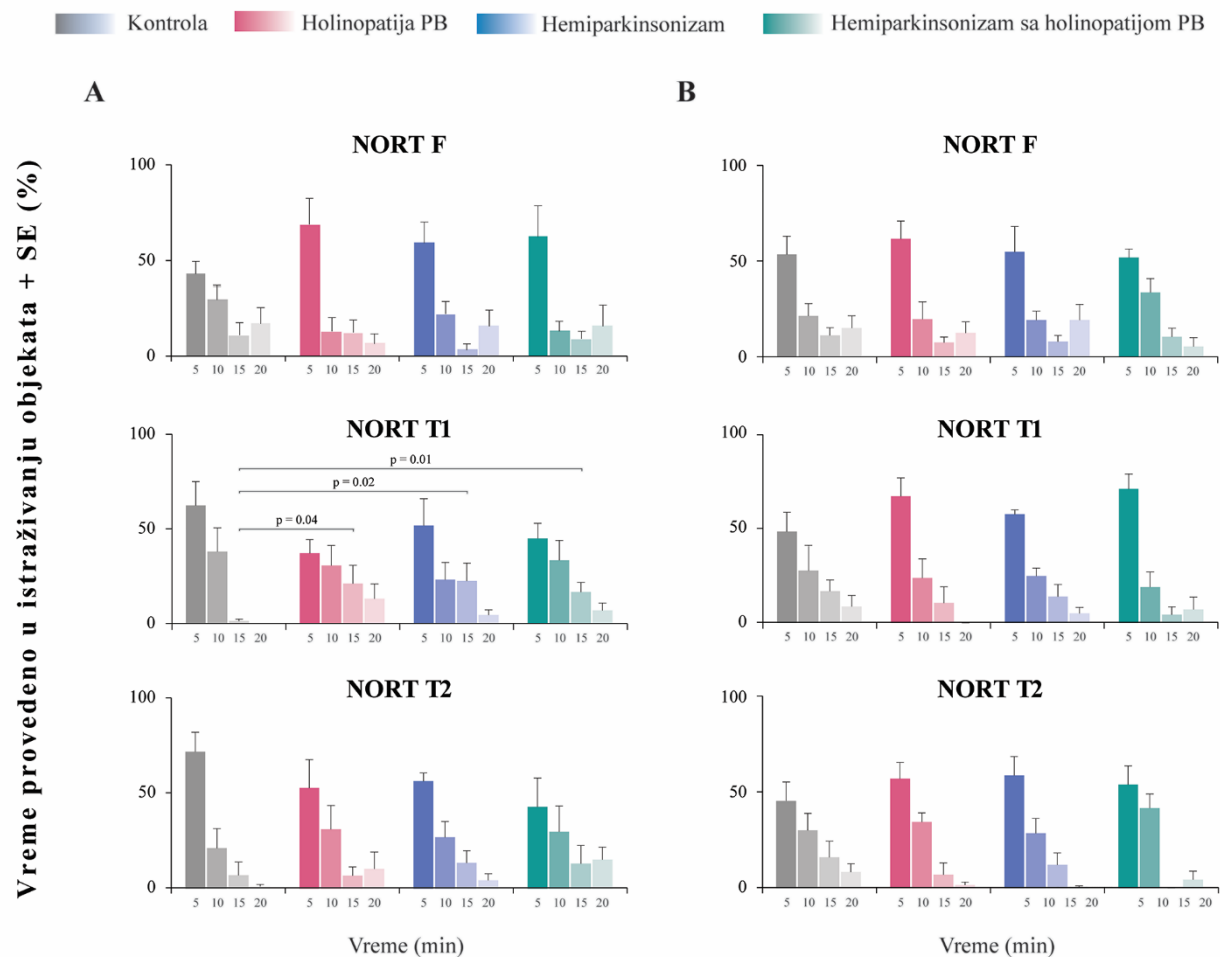
Rezultati ovih analiza su pokazali da se najintenzivnija eksploratorna aktivnost beleži tokom prvih 5 minuta testa, nevezano od ekperimentalne grupe, termina ili faze testa, kada su i svi pacovi aktivno istraživali objekte (**Slika 4.20**; **Slika 4.21**). Nakon prvih pet minuta, zainteresovanost pacova za objekte se postepeno smanjivala, što se može videti i na osnovu aktivnosti grupe, (**Slika 4.20**), a i na osnovu vremenskog profila eksploratorne aktivnosti (**Slika 4.21**). Pored toga, uočene su i neke specifičnosti u profilima među eksperimentalnim grupama.

Naime, u toku faze familijarizacije 14 dana nakon lezija pokazano je da su sve eksperimentalne grupe bile aktivne tokom prvih 15 minuta, uz izuzetak hemiparkinsonizma gde je zabeležen privremeni pad aktivnosti koja u 20. minutu ponovo raste (**Slika 4.20A NORT F**). Najintenzivnija eksploratorna aktivnost beleži se u prvih 5 minuta testa (**Slika 4.21**, **NORT F**). Međutim, tokom sledeće faze testa (NORT T1) za razliku od kontrolne grupe, koja je bila aktivna samo u prvih deset minuta, svi eksperimentalni modeli PB su imali produženo vreme eksploracije koje je trajalo svih 20 minuta u modelu holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB, odnosno 15 minuta u modelu hemiparkinsonizma (**Slika 4.20A NORT T1**; **Slika 4.21A NORT T1**). U poslednjoj fazi testa (NORT T2) pokazano je da su kontrola i holinopatija PB imali slične vremenske profile sa najintenzivnijom eksploratornom aktivnošću u prvih 10 minuta, dok su hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom zadržali obrazac produžene eksploracije iz prethodne faze testa (**Slika 4.20A NORT T2**; **Slika 4.21A NORT T2**).

U terminu 42 dana nakon lezija, u toku familijarizacije je uočeno da su sve eksperimentalne grupe bile aktivne tokom svih 20 minuta i sa najintenzivnijom eksploracijom u prvih 5 minuta testa (**Slika 4.20B NORT F**; **Slika 4.21B NORT F**). U toku sledeće faze (NORT T1) za razliku od kontrole i hemiparkinsonizma čija je intenzivna eksploratorna aktivnost bila ograničena na 15 minuta, u holinopatiji PB i hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB vreme intenzivne eksploracije bilo je skraćeno na 10 minuta (**Slika 4.20B NORT T1**; **Slika 4.21B NORT T1**). U poslednjoj fazi testa (NORT T2) eksperimentalni modeli PB zadržavaju svoje vremenske profile eksploratorne aktivnosti, dok se u kontroli vreme eksploracije dodatno skratilo na 10 minuta (**Slika 4.20B NORT T2**; **Slika 4.21B NORT T2**).



Slika 4.20. Opšta eksploratorna aktivnost tokom testa prepoznavanja novog objekta u eksperimentalnim modelima PB. (A) Grupna eksploratorna aktivnost tokom 5-minutnih intervala testa kontrolnih pacova ($n = 6$) i u modelima holinopatije PB ($n = 5$), hemiparkinsonizma ($n = 5$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 5$) 14 dana nakon lezija. (B) Grupna eksploratorna aktivnost tokom 5-minutnih intervala testa kontrolnih pacova ($n = 8$) i u modelima holinopatije PB ($n = 5$), hemiparkinsonizma ($n = 6$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 5$) 42 dana nakon lezija. **NORT F** – familijarizacija; **NORT T1** – test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije; **NORT T2** – test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije.



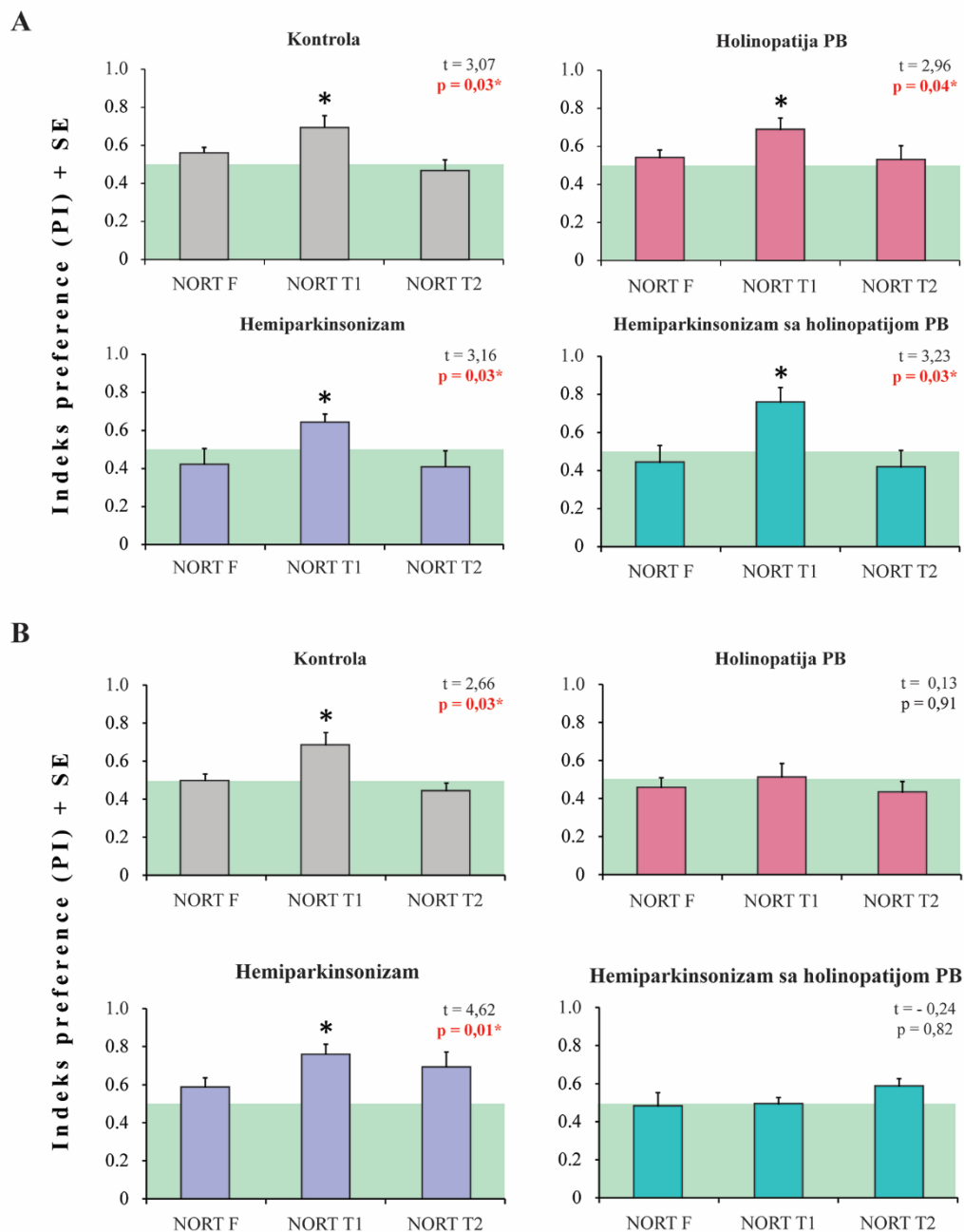
Slika 4.21. Vremenski profili eksploratorne aktivnosti tokom testa prepoznavanja novog objekta u eksperimentalnim modelima PB. (A) Vreme provedeno u istraživanju objekata (%) tokom 5-minutnih intervala kontrolnih pacova (n = 6) i u modelima holinopatije PB (n = 5), hemiparkinsonizma (n = 5) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 5) 14 dana nakon lezija. (B) Vreme provedeno u istraživanju objekata (%) tokom 5-minutnih intervala kontrolnih pacova (n = 8) i u modelima holinopatije PB (n = 5), hemiparkinsonizma (n = 6) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 5) 42 dana nakon lezija. **NORT F** – familjarizacija; **NORT T1** – test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije; **NORT T2** – test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije.

U okviru daljeg ispitivanja kratkotrajne i dugotrajne neprostorne hipokampus-zavisne memorije analizom vremena provedenog u istraživanju objekata izračunat je PI kao mera prepoznavanja novog objekta. Na osnovu prethodnih rezultata koji su ukazali da je u prvih 5 minuta testova najintenzivnija eksploracija u svim eksperimentalnim grupama, PI je računat upravo za ovaj vremenski period za sve faze testa, uključujući i familijarizaciju. Rezultati testa prepoznavanja novog objekta prikazani su na **Slici 4.22**.

Za analizu kratkotrajne (NORT T1) i dugotrajne hipokampus-zavisne memorije (NORT T2) su korišćene sve životinje u okviru svih eksperimentalnih grupa koje u toku faze familijarizacije (NORT F) nisu pokazale preferencu ka levom ili desnom objektu ($PI \approx 0,5$; **Slika 4.22, NORT F**; $t \geq -0,97$, $p \geq 0,11$). U toku NORT T1 faze ponašanje pacova odražava učenja novine (eksploracija novog objekta) tokom prisećanja (prepoznavanje objekta iz faze familijarizacije), dok NORT T2 faza odražava reakciju na prethodno upoznatu novinu.

U terminu 14 dana nakon lezija PI u toku NORT T1 faze je u svim eksperimentalnim grupama bio značajno iznad 0,5 ($t \geq 2,96$, $p \leq 0,04$), što pokazuje preferencu ka novom objektu i ukazuje na očuvanost kratkotrajne memorije (**Slika 4.22A, NORT T1**). Nasuprot tome, tokom NORT T2 faze, PI je u svim eksperimentalnim grupama bio na nivou statističke slučajnosti ($PI \approx 0,5$; $t \geq -1,11$, $p \geq 0,33$), što pokazuje nepostojanje preference ka (prethodno upoznatim) objektima i ukazuje na očuvanost dugotrajne memorije (**Slika 4.22A, NORT T2**).

U terminu 42 dana nakon lezija PI u toku NORT T1 faze je u kontroli i hemiparkinsonizmu bio značajno iznad 0,5 ($t \geq 2,66$, $p \leq 0,03$), što pokazuje preferencu ka novom objektu i ukazuje na očuvanost kratkotrajne memorije (**Slika 4.22B, NORT T1 Kontrola, Hemiparkinsonizam**). Nasuprot tome, PI u toku NORT T1 faze u holinopatiji PB i hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB je bio na nivou statističke slučajnosti ($PI \approx 0,5$; $t \geq -0,24$, $p \geq 0,82$), što pokazuje nepostojanje preference ka novom objektu i ukazuje na oštećenje kratkotrajne memorije u ovim eksperimentalnim modelima (**Slika 4.22B, NORT T1 Holinopatija PB, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**). Tokom NORT T2 faze testa PI u svim eksperimentalnim grupama je bio na nivou statističke slučajnosti ($PI \approx 0,5$; $t \geq -1,37$, $p \geq 0,08$). S obzirom na rezultate NORT T1 faze, ovaj rezultat u kontroli i hemiparkinsonizmu ukazuje na očuvanost dugotrajne memorije (**Slika 4.22B, NORT T2 Kontrola, Hemiparkinsonizam**), dok u slučaju holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ukazuje na poremećaj dugotrajne neprostorne hipokampus-zavisne memorije (**Slika 4.22B, NORT T2 Holinopatija PB, Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**).



Slika 4.22. Poremećaj kratkotrajne i dugotrajne neprostorne hipokampus-zavisne memorije u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) PI tokom testa prepoznavanja novog objekta kontrolnih pacova ($n = 6$) i u modelima holinopatije PB ($n = 5$), hemiparkinsonizma ($n = 5$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 5$) 14 dana nakon lezija. (B) PI tokom testa prepoznavanja novog objekta kontrolnih pacova ($n = 8$) i u modelima holinopatije PB ($n = 5$), hemiparkinsonizma ($n = 6$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 5$) 42 dana nakon lezija. Podebljani brojevi obeleženi crvenom bojom sa * označavaju vrednosti koje su statistički značajno različite od 0,5. **NORT F** – familjarizacija; **NORT T1** – test kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije; **NORT T2** – test dugotrajne hipokampus-zavisne memorije.

4.5 Čelijska osnova poremećaja memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Kako bi se ispitala čelijska osnova poremećaja memorijskih funkcija u različitim eksperimentalnim modelima PB, praćene su promene u broju PV+ interneurona hipokampusa u oba termina nakon testiranja memorijskih funkcija (14 i 42 dana nakon lezija), kako u kontrolnih, tako i u lediranih pacova.

4.5.1 Značaj parvalbuminskih interneurona hipokampusa u poremećajima memorijskih funkcija

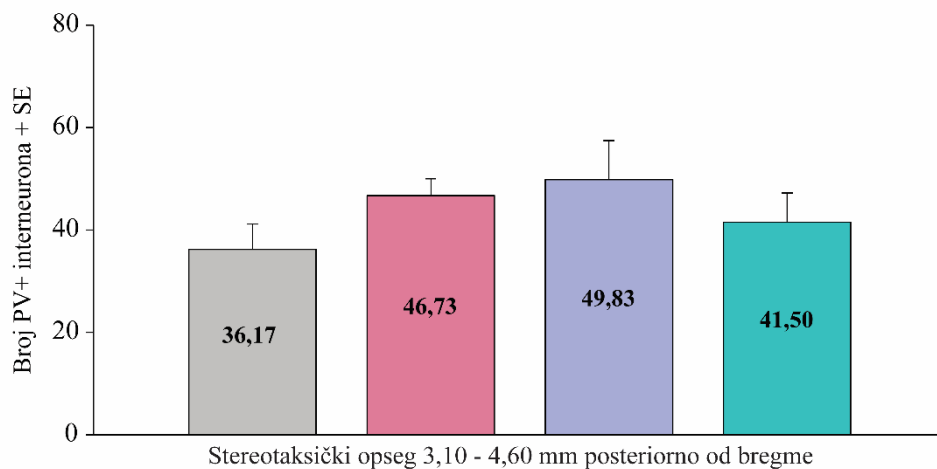
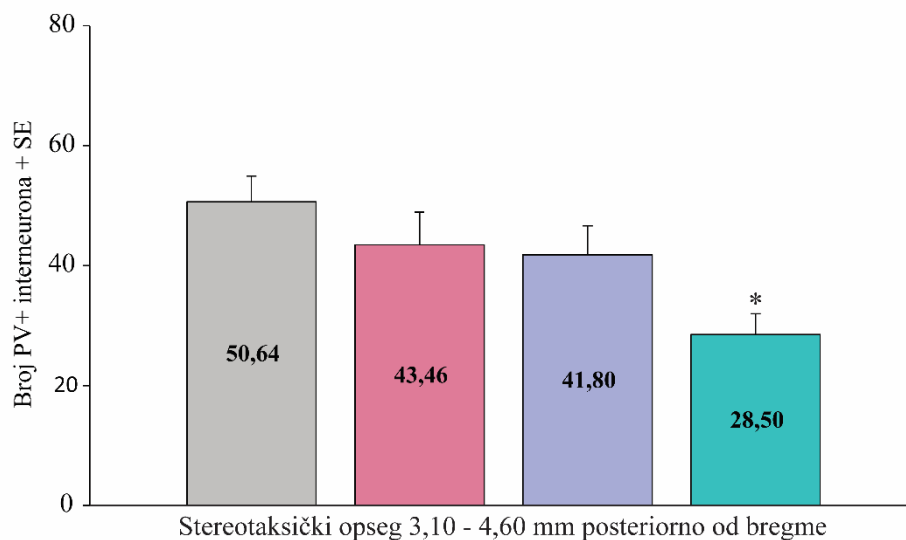
Za kvantifikaciju broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa su korišćeni preseki u stereotaksičkom opsegu 3,10 – 4,60 mm posteriorno od bregme. Kvantifikacija je urađena po svakoj strani mozga pacova, za svaku eksperimentalnu grupu i za svaki od termina u kojima su testirane memorijske funkcije (**Slika 4.23**). Individualni primeri PV imunohistohemijskog bojenja za svaku eksperimentalnu grupu i za oba termina su prikazani na **Slici 4.24**.

U eksperimentalnom modelu holinopatije PB nije bilo značajne promene u broju PV+ interneurona u odnosu na kontrolnu grupu 14 i 42 dana nakon lezije (**Slika 4.23**, **Slika 4.24**, **Holinopatija PB**; $z \geq -1,91$, $p \geq 0,06$), kao ni u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma (**Slika 4.23**, **Slika 4.24**, **Hemiparkinsonizam**; $z \geq -1,52$, $p \geq 0,13$). Nasuprot tome, hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB je uslovio smanjenje broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa, ali tek 42. dana nakon lezije (**Slika 4.23B**, **Slika 4.24B**, **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**; $z = -3,17$, $p = 10^{-3}$).

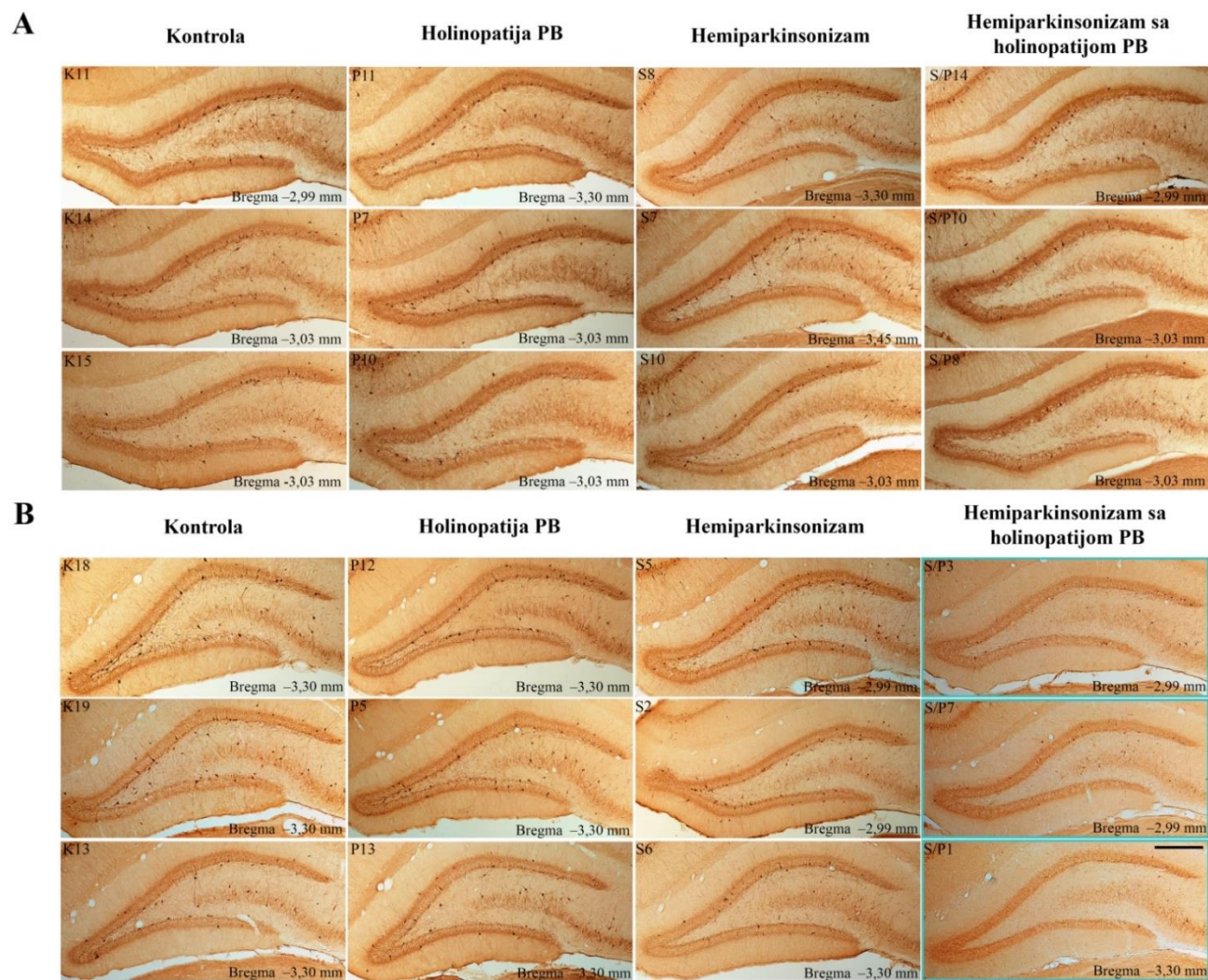
Da bi se dodatno ispitaio značaj PV+ interneurona u poremećajima memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima PB, ispitan je linearni korelacioni odnos broja PV+ interneurona i vrednosti PI, dobijenih u testu kratkotrajne i dugotrajne neprostorne hipokampus-zavisne memorije, i to u terminu 42 dana nakon lezije (kada su i uočene promene u broju PV+ interneurona). Na osnovu ispitanog korelacionog odnosa pokazano je da je smanjenje broja PV+ interneurona bilo značajno funkcionalno spregnuto (pozitivna korelacije) sa oštećenjem kratkotrajne memorije (NORT T1) u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (**Slika 4.25.**, **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB**; $r = 0,52$, $p = 0,04$). Pored toga, značajna funkcionalna sprega (negativna korelacija) između broja PV+ interneurona i oštećenja kratkotrajne memorije je pokazana i u eksperimentalnom modelu holinopatije PB (**Slika 4.25.**, **Holinopatije PB**; $r = -0,66$, $p = 0,01$). Za razliku od toga, funkcionalna sprega između broja PV+ interneurona i dugotrajne hipokampus-zavisne memorije (NORT T2) nije ustanovljena u ovim modelima PB ($r \geq -0,56$, $p \geq 0,05$).

A

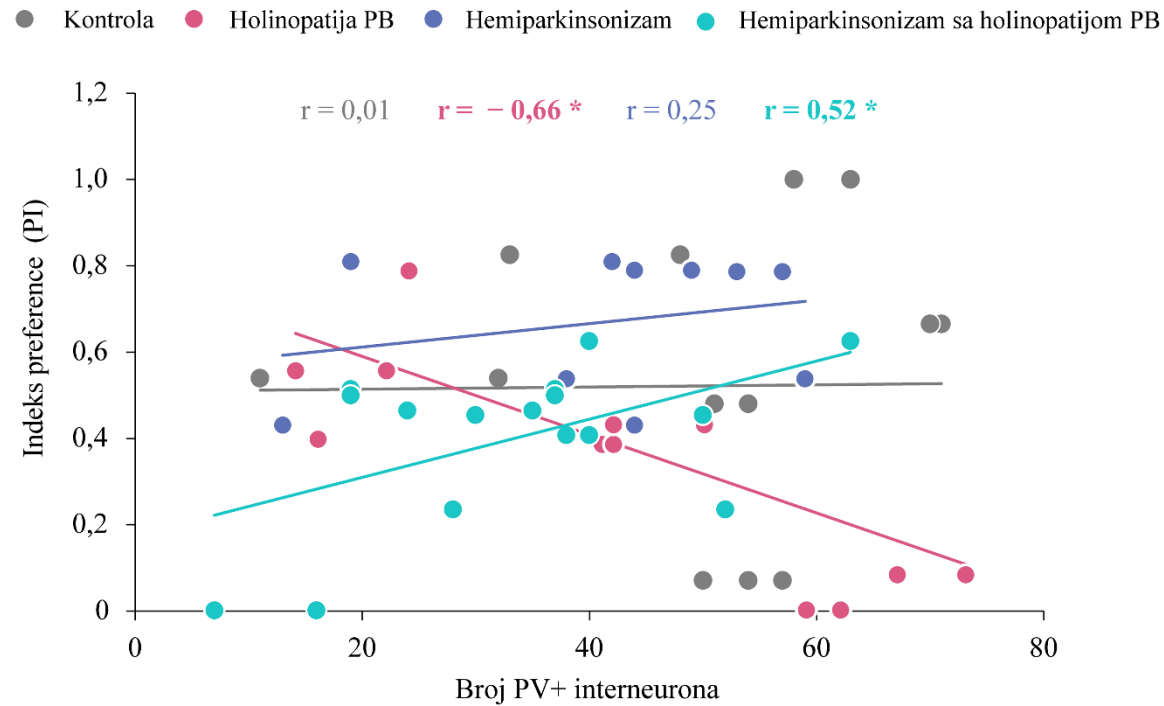
■ Kontrola ■ Holinopatija PB ■ Hemiparkinsonizam ■ Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB

**B**

Slika 4.23. Promena broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Srednji broj PV+ interneurona u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (n = 4) i u modelima holinopatije PB (n = 6), hemiparkinsonizma (n = 3) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 5) 14 dana nakon lezija. (B) Srednji broj PV+ interneurona u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (n = 7) i u modelima holinopatije PB (n = 7), hemiparkinsonizma (n = 5) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (n = 7) 42 dana nakon lezija. * označava statistički značajne razlike u broju PV+ interneurona za $p \leq 0,05$.



Slika 4.24. Imunohistohemijaska identifikacija PV+ interneurona u DG-u hipokampusa u različitim eksperimentalnim modelima PB. (A) Primeri PV+ interneurona u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (K11, K14, K15) i u modelima holinopatije PB (P11, P7, P10), hemiparkinsonizma (S8, S7, S10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P14, S/P10, S/P8) 14 dana nakon lezija. **(B)** Primeri PV+ interneurona u DG-u hipokampusa kontrolnih pacova (K18, K19, K13) i u modelima holinopatije PB (P12, P5, P13), hemiparkinsonizma (S5, S2, S6) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P3, S/P7, S/P1) 42 dana nakon lezija. Skala 200 μ m. Značajne promene u broju PV+ interneurona su uokvirene.



Slika 4.25. Funkcionalna povezanost broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i indeksa preference u različitim eksperimentalnim modelima PB. Korelacioni odnos između broja PV+ interneurona u DG-u hipokampusa i PI iz testa kratkotrajne hipokampus-zavisne memorije (NORT T1) kontrolnih pacova ($n = 8$) i u modelima holinopatije PB ($n = 7$), hemiparkinsonizma ($n = 7$) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB ($n = 8$) 42 dana nakon lezija. Podebljani brojevi sa * označavaju statistički značajne korelacije za $p \leq 0,05$.

4.6 Značaj parvalbuminske ekspresije i sinaptičke reorganizacije hipokampusa i retikulo-talamičkog jedra u progresiji neurodegeneracije

Kako bi se ustanovio značaj izmena PV ekspresije i sinaptičke reorganizacije koje su u osnovi prodromalnih poremećaja spavanja i poremećaja memorijskih funkcija, posebno je analizirana dinamika promene broja PV+ interneurona, kao i MAP2 i PSD-95 ekspresije tokom celokupnog perioda praćenja neurodegeneracije, kako u hipokampusu, tako i u RT jedru, u svakom eksperimentalnom modelu PB. Analize su sprovedene u tri vremenska okvira: u ranom periodu 14 dana nakon lezija, radi ispitivanja inicijalnih ćelijskih i sinaptičkih promena, kao i u kasnijim periodima, 42 dana i 52-100 dana nakon lezija, kako bi se procenile promene na ćelijskom i sinaptičkom nivou tokom progresije bolesti.

4.6.1 Holinopatija Parkinsonove bolesti

U modelu holinopatije PB supresija ekspresije MAP2 proteina u hipokampusu (**Slika 4.26**) i PSD-95 proteina u RT jedru (**Slika 4.27**) je ustanovljena na samom početku neurodegeneracije (14 dana nakon obostrane lezije ACh neurona PPT jedra) i bila je prisutna tokom celokupnog perioda praćenja, sve do 100. dana. Broj PV+ interneurona nije bio izmenjen od samog početka holinopatije PB, već je samo u terminu 52 – 100 dana nakon lezije; povećan broj PV+ interneurona u hipokampusu bio praćen pojačanjem ekspresije MAP2 proteina u RT jedru. Rezultati dinamike promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije u progresiji neurodegeneracije u eksperimentalnom modelu holinopatije PB su prikazani na **Slikama 4.26 i 4.27**.

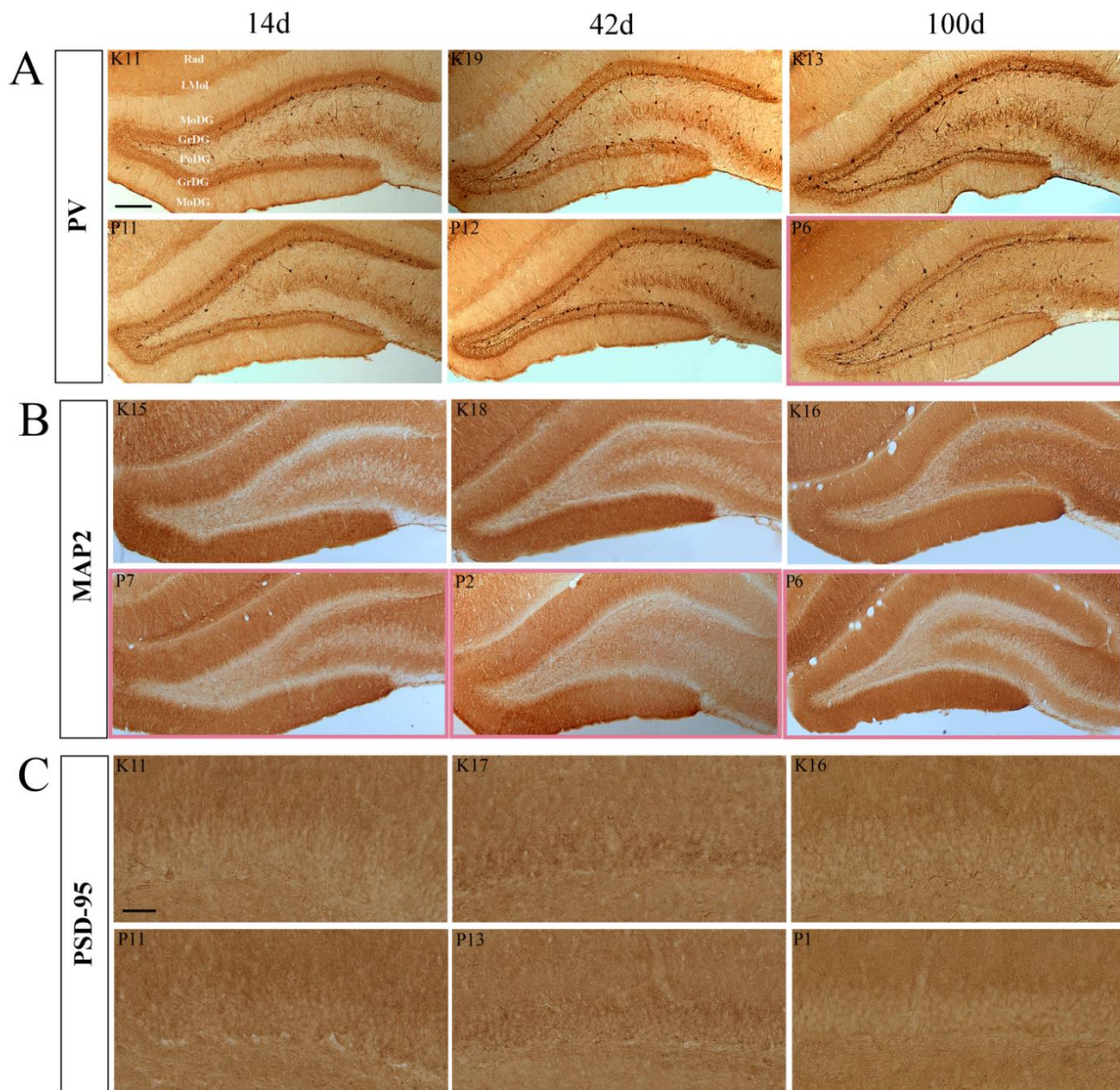
4.6.2 Hemiparkinsonizam

Tokom ukupnog perioda praćenja neurodegeneracije u modelu hemiparkinsonizma nije bilo izmena, kako u broju PV+ interneurona, tako i u ekspresiji MAP2 i PSD-95 proteina, ni u hipokampusu (**Slika 4.28**), ni RT jedru (**Slika 4.29**).

4.6.3 Hemiparkinsonizam sa holinopatijom Parkinsonove bolesti

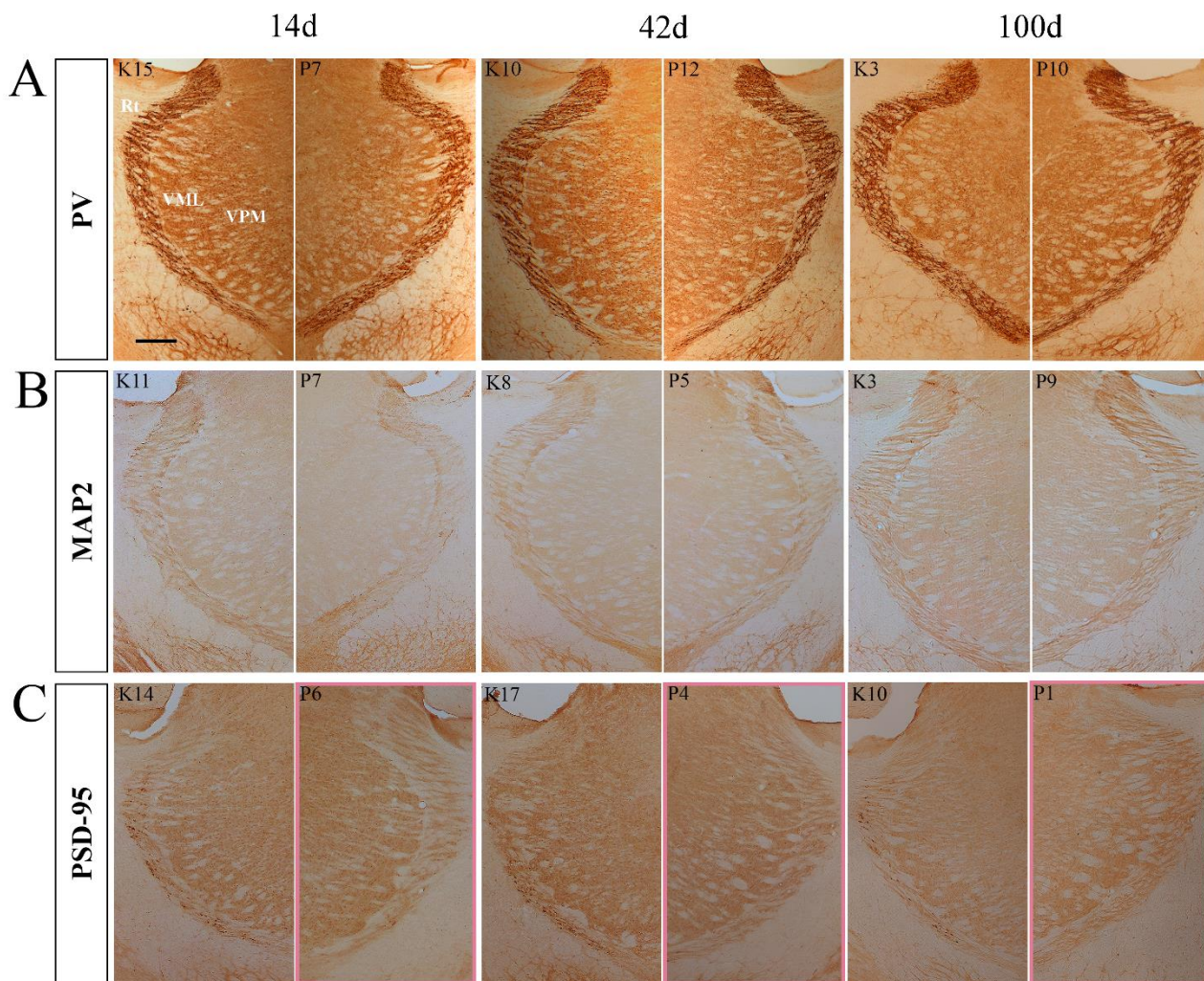
U modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB pojačanje ekspresije PSD-95 proteina, kako u hipokampusu, tako i u RT jedru je uočeno na samom početku neurodegeneracije (14 dana nakon obostrane lezije ACh neurona PPT jedra i jednostrane lezije DA neurona SNpc jedra) i trajalo je do kraja perioda praćenja. Dugotrajno pojačanje ekspresije PSD-95 proteina u hipokampusu, je od 42. dana nakon lezija bilo praćeno smanjenjem broja PV+ interneurona u ovoj strukturi kojoj se 100. dana nakon lezija pridružuje i smanjenje broja PV+ interneurona u RT jedru. Ovo smanjenje broja PV+ interneurona u obe moždane strukture koje je nastalo u 100. danu uslovalo je pojačanje ekspresije MAP2 proteina, kako u hipokampusu, tako i u RT jedru. Rezultati dinamike promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije u progresiji neurodegeneracije u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB su prikazani na **Slikama 4.30 i 4.31**.

Holinopatija Parkinsonove bolesti



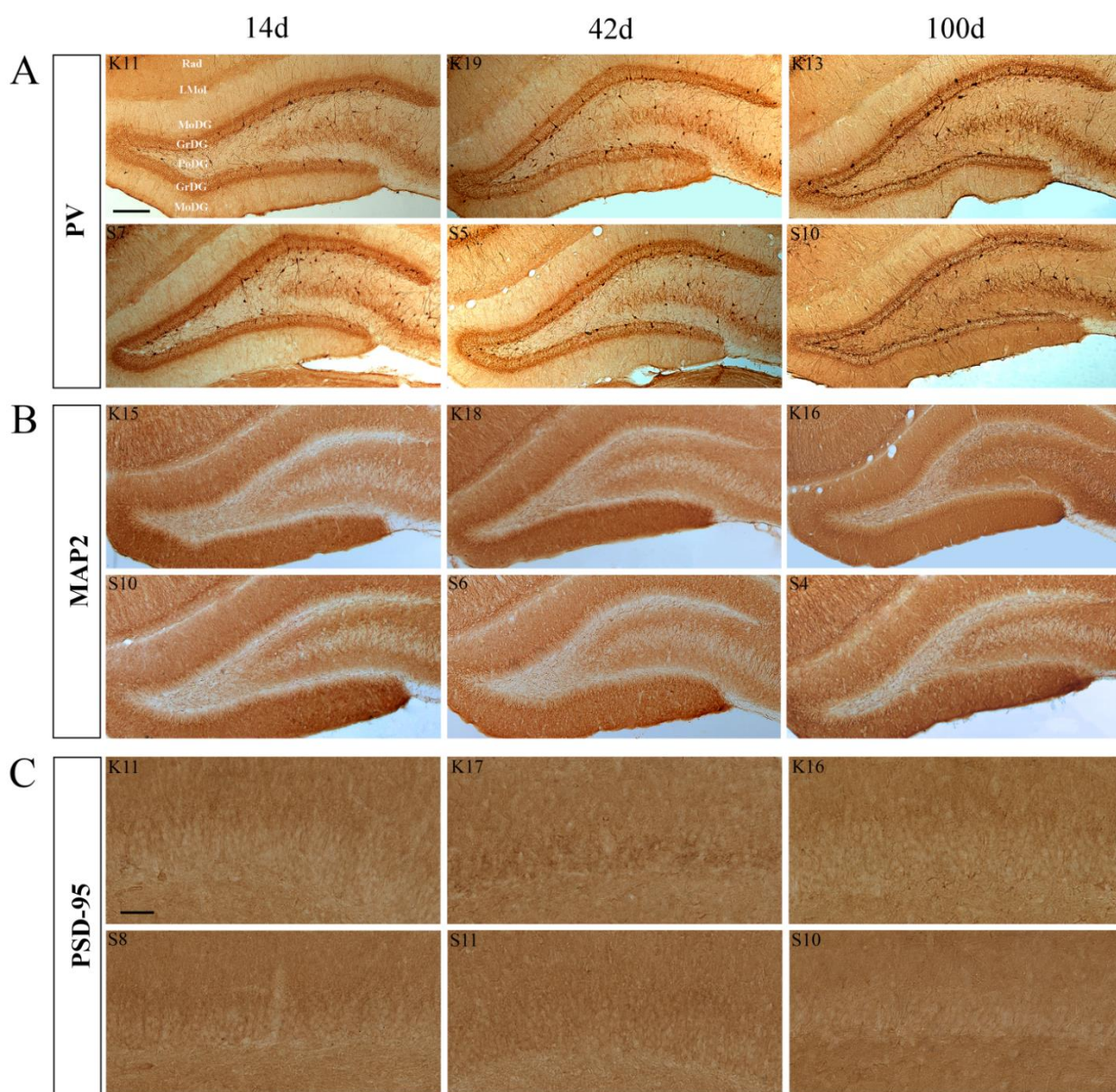
Slika 4.26. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije hipokampusa u eksperimentalnom modelu holinopatije PB u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u DG hipokampusa u modelu holinopatije PB (PV: P11, P12, P6) u odnosu na kontrole (PV: K11, K19, K13); **(B)** Ekspresija MAP2 proteina u DG hipokampusa u modelu holinopatije PB (MAP2: P7, P2, P6) u odnosu na kontrole (MAP2: K15, K18, K16); **(C)** Ekspresija PSD-95 proteina u DG hipokampusa u nivou CA1 regiona u modelu holinopatije PB (PSD-95: P11, P13, P1) u odnosu na kontrole (PSD-95: K11, K17, K16). **Rad** – *stratum radiatum*; **Lmol** – *stratum lacunosum-moleculare*; **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum multiforme*; Skala za sve slike je 200 μ m, osim za slike PSD-95 ekspresije gde je skala 50 μ m. Značajne promene u broju PV+ interneurona (A) i ekspresiji MAP2 proteina (B) su uokvirene.

Holinopatija Parkinsonove bolesti



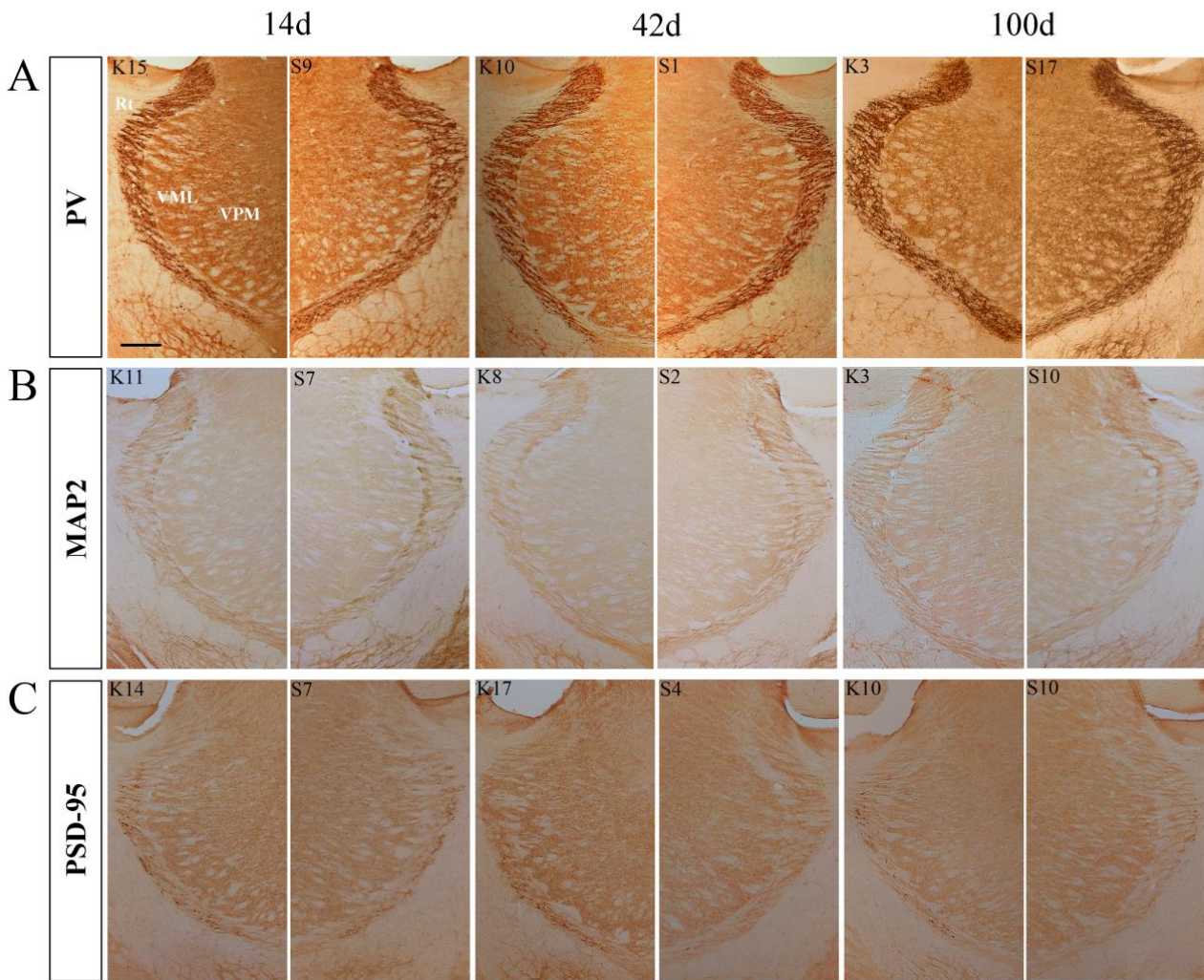
Slika 4.27. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije RT jedra u eksperimentalnom modelu holinopatije PB u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u RT jedru u modelu holinopatije PB (PV: P7, P12, P10) u odnosu na kontrole (PV: K15, K10, K3); (B) Ekspresija MAP2 proteina u RT jedru u modelu holinopatije PB (MAP2: P7, P5, P9) u odnosu na kontrole (MAP2: K11, K8, K3); (C) Ekspresija PSD-95 proteina u RT jedru u modelu holinopatije PB (PSD-95: P6, P4, P1) u odnosu na kontrole (PSD-95: K14, K17, K10). *Rt* – *nucleus reticularis thalami*; *VPM* – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; *VPL* – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*. Skala za sve slike je 200 μ m. Značajne promene u ekspresiji PSD-95 proteina (C) su uokvirene.

Hemiparkinsonizam



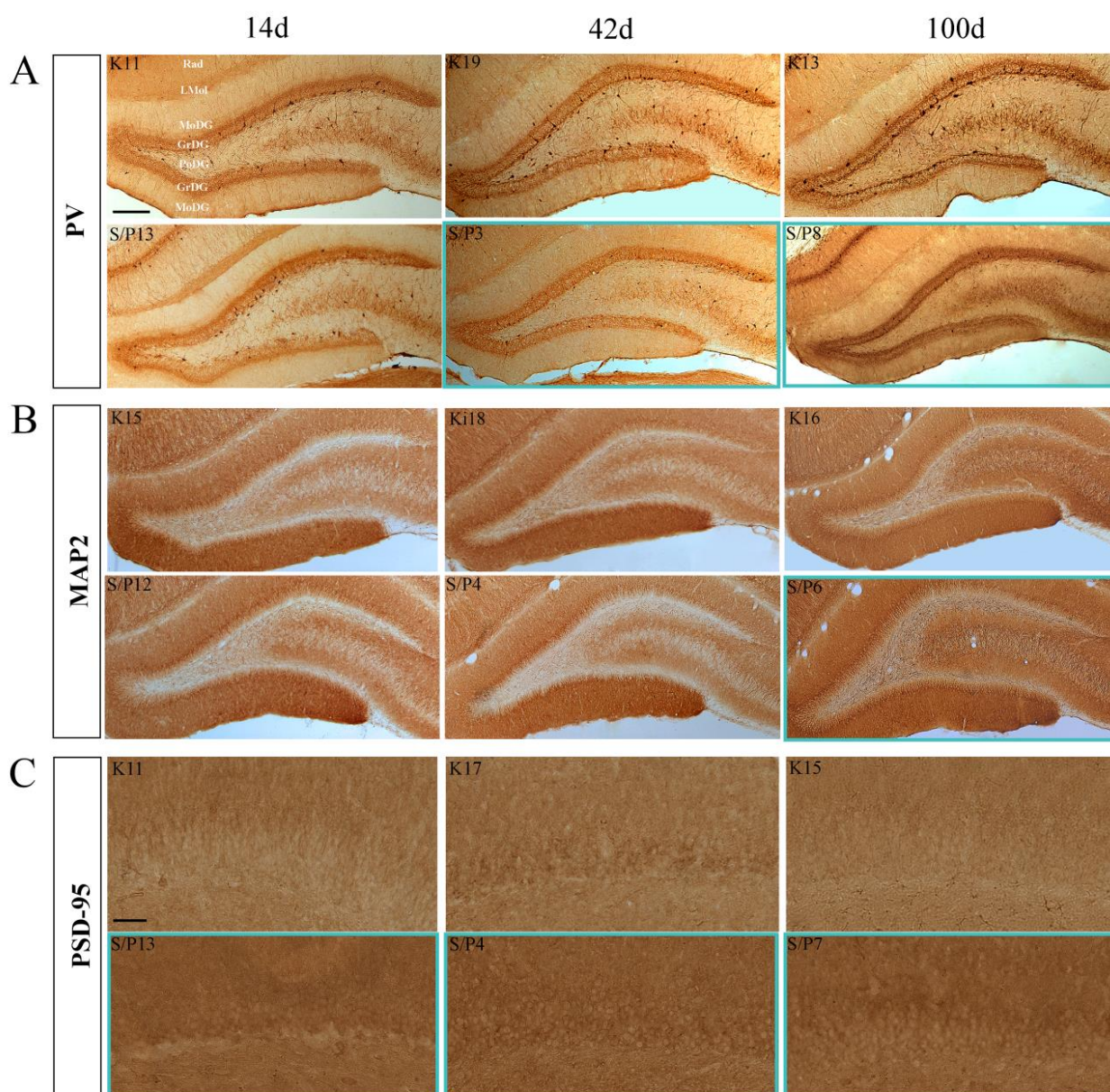
Slika 4.28. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u DG hipokampusa u modelu hemiparkinsonizma (PV: S7, S5, S10) u odnosu na kontrole (PV: K11, K19, K13); (B) Ekspresija MAP2 proteina u DG hipokampusa u modelu hemiparkinsonizma (MAP2: S10, S6, S4) u odnosu na kontrole (MAP2: K15, K18, K16); (C) Ekspresija PSD-95 proteina u DG hipokampusa u nivou CA1 regiona u modelu hemiparkinsonizma (PSD-95: S8, S11, S10) u odnosu na kontrole (K11, K18, K15). **Rad** – *stratum radiatum*; **Lmol** – *stratum lacunosum-moleculare*; **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum multiforme*. Skala za sve slike je 200 μm , osim za slike PSD-95 ekspresije gde je skala 50 μm .

Hemiparkinsonizam



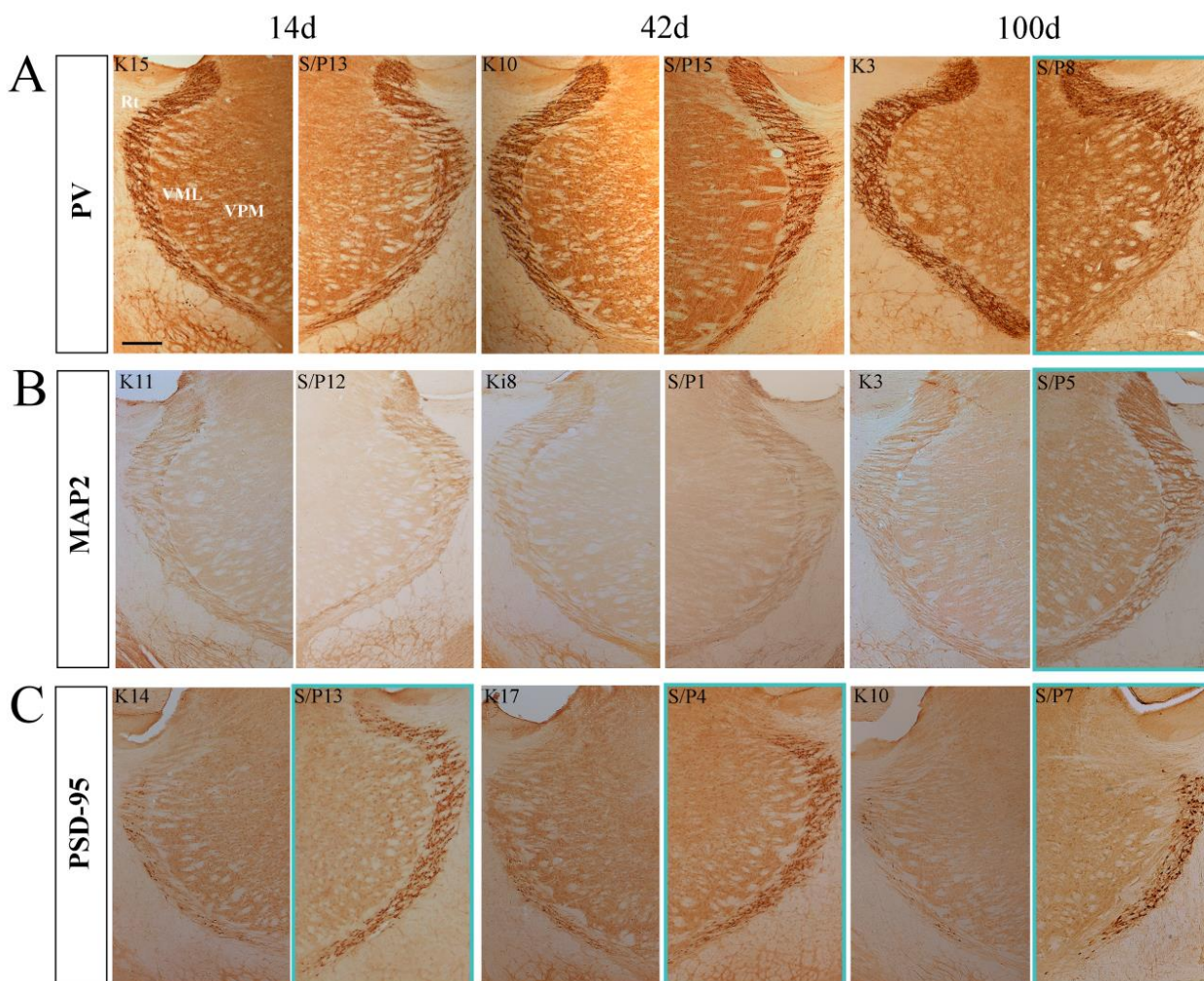
Slika 4.29. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije RT jedra u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma (PV: S9, S1, S17) u odnosu na kontrole (PV: K15, K10, K3); (B) Ekspresija MAP2 proteina u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma (MAP2: S7, S2, S10) u odnosu na kontrole (MAP2: K11, K8, K3); (C) Ekspresija PSD-95 proteina u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma (PSD-95: S7, S4, S10) u odnosu na kontrole (PSD-95: K14, K17, K10). **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*. Skala za sve slike je 200 μ m.

Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB



Slika 4.30. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u DG hipokampusa u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (PV S/P13, S/P3, S/P8) u odnosu na kontrole (PV: K11, K19, K13); (B) Ekspresija MAP2 proteina u DG hipokampusa u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (MAP2: S/P12, S/P4, S/P6) u odnosu na kontrole (MAP2: K15, Ki18, K16); (C) Ekspresija PSD-95 proteina u DG hipokampusa u nivou CA1 regiona u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (PSD-95: S/P13, S/P4, S/P7) u odnosu na kontrole (PSD-95: K11, K17, K15). **Rad** – *stratum radiatum*; **Lmol** – *stratum lacunosum-moleculare*; **MoDG** – *stratum moleculare*; **GrDG** – *stratum granulare*; **PoDG** – *stratum multiforme*. Skala za sve slike je 200 μm , osim za slike PSD-95 ekspresije gde je skala 50 μm . Značajne promene u broju PV+ interneurona (A) i ekspresiji MAP2 (B) i PSD-95 proteina (C) su uokvirene.

Hemiparkinsonizam sa holinopatijom Parkinsonove bolesti



Slika 4.31. Dinamika promene broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB u progresiji neurodegeneracije. (A) PV+ interneuroni u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (PV: S/P13, S/P15, S/P8) u odnosu na kontrole (PV: K15, K10, K3); (B) Ekspresija MAP2 proteina u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (MAP2: S/P12, S/P1, S/P5) u odnosu na kontrole (MAP2: K11, Ki8, K3); (C) Ekspresija PSD-95 proteina u RT jedru u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (PSD-95: S/P13, S/P4, S/P7) u odnosu na kontrole (PSD-95: K14, K17, K10). *Rt* – *nucleus reticularis thalami*; *VPM* – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; *VPL* – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*. Skala za sve slike je 200 μ m. Značajne promene u broju PV+ interneurona (A), ekspresiji MAP2 (B) i PSD-95 proteina (C) su uokvirene.

5 DISKUSIJA

Sa starenjem ljudske populacije neurodegenerativne bolesti kao što je PB postaju sve učestalije, a posledice ovih bolesti ostaju jedan od vodećih uzroka invaliditeta, smanjenog kvaliteta života i smrtnosti. Iako postoji značajan napredak u razumevanju patofiziologije PB, mnogi aspekti ove kompleksne neurodegenerativne bolesti i dalje nisu dovoljno razjašnjeni. U svetlu neuspeha tradicionalnih pristupa u lečenju PB, i dalje postoji značajna potreba za razvojem novih terapija koje bi ublažile i usporile simptome ili zaustavile progresiju same bolesti (Bougea, 2024). Trenutni status PB je u izvesnoj meri posledica isuviše dugog fokusa na motoričke aspekte i neurodegeneraciju DA transmitterskog sistema koji se nalazi u njihovoj osnovi. Međutim, poslednjih godina PB se prepoznaje kao ozbiljan multisistemski neurodegenerativni poremećaj, gde pored DA važnu patofiziološku ulogu imaju i drugi neurotransmitterski sistemi. Disfunkcija ovih neurotransmitterskih sistema povezana je sa čitavim spektrom nemotoričkih poremećaja, koji ne samo da prate, nego mogu i prethoditi motoričkim poremećajima (Poewe, 2008). Uprkos činjenici da se mogu javiti godinama, pa čak i decenijama pre kliničke manifestacije parkinsonizma, značaj nemotoričkih simptoma kao sastavnog dela kliničke slike PB, i dalje nije dovoljno uvažen.

U uslovima neurodegeneracije u PB, fiziološki mehanizmi sinaptičke i ćelijske homeostaze su narušeni. Iako ne predstavlja primarni uzrok neurodegeneracije, poremećaj GABA-ergičke transmisije, važne u regulaciji spavanja, dovodi do patoloških izmena na ćelijskom i sinaptičkom nivou, E/I disbalansa, metaboličkog i strukturnog stresa neurona i poremećaja homeostaze celokupnog nervnog sistema, doprinoseći opštoj kliničkoj slici i progresiji bolesti. Stoga su promene u inhibitornoj kontroli putem GABA-ergičkog sistema od posebne važnosti za razumevanje patofiziologije ranih nemotoričkih simptoma PB. Međutim, i pored intenzivnih istraživanja GABA-ergička osnova nemotoričkih simptoma, naročito promene na ćelijskom i sinaptičkom nivou, kao i njihova vremenska dinamika tokom progresije bolesti, i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Posebno ostaje otvoreno pitanje da li disfunkcija GABA-ergičkih neurona i poremećaji sinaptičke transmisije prethode kliničkoj manifestaciji nemotoričkih simptoma ili se ovi procesi razvijaju paralelno sa ranim fazama neurodegeneracije.

5.1 Prodromalni poremećaji spavanja u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da poremećaji spavanja postoje u svim eksperimentalnim modelima PB i da se javljaju u ranoj fazi patologije. Posebno su u modelima hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB prisutni izuzetno ozbiljni poremećaji u vidu fragmentacije spavanja, izmene EEG ritmova tokom NREM i REM faze, pojave patoloških HVS vretena, kao i promene u dinamici, kako SS vretena, tako i HVS vretena.

Prodromalni karakter poremećaja spavanja u navedenim eksperimentalnim modelima sistematski je potvrđen i precizno okarakterisan u ranijim studijama, gde je pokazano prisustvo specifičnih poremećaja (Ciric i sar., 2016, 2017, 2018, 2019; Petrovic i sar., 2013a, 2014). Ovi poremećaji pored fragmentacije spavanja (Ciric i sar., 2019) i izmene NREM/REM EEG mikrostrukture (Ciric i sar., 2019; Petrovic i sar., 2013a) obuhvatili su porast sigma amplitude tokom REM faze (Ciric i sar., 2016), kao i pojavu REM faze „obogaćene“ vretenima (Ciric i sar., 2017), promene u dinamici SS i HVS vretena (Ciric i sar., 2017, 2018), pojavu REM faze bez atonije nalik RBD poremećaju (Petrovic i sar., 2014), kao i narušenu motornu kontrolu tokom spavanja (Ciric i sar., 2016; Petrovic i sar., 2014). Ove studije su sugerisale da poremećaji spavanja, naročito poremećaji REM faze, mogu predstavljati potencijalne funkcionalne biomarkere PB i ranijeg početka starenja mozga u uslovima neurodegeneracije u poređenju sa fiziološkim (zdravim) starenjem.

U ovoj doktorskoj disertaciji patofiziološku osnovu eksperimentalnih modela PB u kojima su ustanovljeni prodromalni poremećaji spavanja čine lezijom izazvani DA i/ili ACh deficiti. ACh

deficit u modelu holinopatije je bio veći od 20% kroz čitavu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra (**Slika 4.1**), dok je DA deficit u modelu hemiparkinsonizma bio veći od 60% kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju SNpc jedra (**Slika 4.2**). Udruženi ACh i DA deficiti u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB su bili na nivou pojedinačnih deficita (**Slika 4.3**), bez dodatnog gubitka neurona koji bi mogao biti izazvan drugim deficitom (DA deficit u SNpc jedru ne izaziva dodatan gubitak ACh neurona PPT jedra i obrnuto). Sve lezije su bile nepotpune (parcijalne), ali selektivne, uvek u granicama ledirane strukture (**Slika 4.4**). Ovo je u skladu sa ranijim istraživanjima naše laboratorije koja su pokazala da su SNpc i/ili PPT lezije izazvane stereotaksički navođenom mikroinfuzijom odgovarajućeg neurotoksina (6-OHDA i/ili IBO), odgovarajućeg volumena i koncentracije, u ovim eksperimentalnim modelima stabilne i bez progresije deficita tokom vremena (Circic i sar., 2016, 2019; Petrovic i sar., 2013a). Iako ovakvi modeli imaju svoja eksperimentalna ograničenja i ne reprodukuju u potpunosti progresivnu i multisistemsku prirodu PB kod ljudi, lezije pojedinačnih neurotransmiterskih sistema, važnih u neuropatologiji PB, omogućile su istraživanje ćelijskih i sinaptičkih mehanizama koji su u osnovi, kako prodromalnih poremećaja spavanja, tako i progresije PB.

5.1.1 Lokalne izmene u arhitekturi spavanja i dinamici epizoda spavanja

DA deficit izazvan unilateralnom lezijom SNpc jedra u eksperimentalnim modelima hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB je produžio trajanje budnosti u motornoj kori i u hipokampusu, ali bez promene u trajanju NREM i REM faze spavanja (**Tabela 4.1**). Produženo trajanje budnosti je bilo uslovljeno povećanim brojem epizoda budnosti svih trajanja, bez promene u njihovom srednjem trajanju (**Tabela 4.1, Slika 4.5**), što sugeriše da DA denervacija dominantno utiče na mehanizme održavanja i kontinuiteta stanja, a manje na njihovu ukupnu zastupljenost. Pored toga, u ovim modelima je prisutna i fragmentacija NREM spavanja, kako u hipokampusu, tako i u motornoj kori, uslovljena povećanim brojem NREM epizoda kraćeg trajanja (**Tabela 4.1, Slika 4.5B**). Jedino je u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB potvrđena fragmentacija hipokampalnog REM spavanja, usled povećanog broja REM epizoda kraćeg trajanja (**Tabela 4.1; Slika 4.5B**).

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija gde je pokazano da oštećenja DA sistema mogu dovesti do ozbiljnih poremećaja spavanja, poput dugotrajne fragmentacije spavanja (Circic i sar., 2019; Medeiros i sar., 2023). DA deficit kod pacova, indukovanoj unilateralnom 6-OHDA lezijom SNpc jedra, dovodi do povećanja broja dužih epizoda budnosti i produženja ukupnog trajanja ove faze (Circic i sar., 2019). Sa druge strane, fragmentacija NREM spavanja pokazana je u mišjem modelu hemiparkinsonizma, gde je unilateralna 6-OHDA lezija MFB izazvala povećanje NREM epizoda kraćeg trajanja (Medeiros i sar., 2023).

Fragmentacija spavanja nastaje usled destabilizacije složenih neuronskih mreža odgovornih za regulaciju ciklusa budnost–spavanje (Lima, 2013). Njena patofiziološka osnova podrazumeva disbalans između sistema koji promovišu budnost i inhibitornog GABA-ergičkog sistema koji omogućava održavanje sna, pri čemu poremećaji u DA, ACh i drugim neuromodulatornim transmisijama dovode do povećane učestalosti mikrobuđenja i skraćanja trajanja pojedinačnih epizoda NREM i REM faze spavanja (Jones, 2020). Pokazano je da DA neuroni nigrostrijatnog puta, zajedno sa ACh sistemom PPT jedra (Datta i MacLean, 2007; Chambers i sar., 2020) učestvuju u regulaciji obrazaca spavanja, posebno u regulaciji REM faze kod pacova (Lima i sar., 2007). Na osnovu fiziološke povezanosti PPT jedra i BG u regulaciji spavanja, predložena je nova neuronska mreža za kontrolu spavanja koja uključuje PPT, SNpc i strijatum (Targa i sar., 2016). Dakle, ACh i DA sistem učestvuju u regulaciji spavanja i mogu biti ozbiljno ugroženi u patologiji PB (Perez-Lloret i Barrantes, 2016; Lima i sar., 2007; Mena-Segovia i sar., 2004).

5.1.2 Lokalne izmene u EEG mikrostrukturi NREM i REM faze spavanja

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je DA denervacija u oba modela hemiparkinsonizma (hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB) izazvala znatno ozbiljnije poremećaje kako NREM tako i REM spavanja, dok je ACh denervacija u modelu holinopatije PB izazvala samo poremećaj hipokampalnog NREM spavanja (**Slika 4.6**).

Glavna izmena EEG mikrostrukture u oba modela hemiparkinsonizma je bila povećana amplituda teta oscilacija tokom NREM i REM faze spavanja u motornoj kori i NREM faze u hipokampusu, dok je samo hemiparkinsonizam povećao hipokampalnu REM teta amplitudu. Ovaj rezultat ukazuje na opšti uticaj narušene DA kontrole na nivou motorne kore i hipokampusa koji je nezavisan od faze spavanja. Povećanu teta amplitudu pratila je povećana sigma i smanjena delta amplituda samo u motornoj kori tokom NREM spavanja u oba modela hemiparkinsonizma (**Slika 4.6A**).

Tokom hipokampalnog REM spavanja u modelu hemiparkinsonizma, povećanu teta amplitudu prati smanjenje sigma i beta amplitude (**Slika 4.6B**). Nasuprot tome, u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB pokazan je suprotan obrazac izmene beta amplitude tokom NREM i REM spavanja u motornoj kori – povećanje beta amplitude tokom NREM spavanja i smanjenje beta amplitude tokom REM spavanja (**Slika 4.6A**).

Ovi rezultati u skladu su sa ranijim istraživanjima naše laboratorije koja su pokazala ulogu DA inervacije u regulaciji teta ritma (Ciric i sar., 2019). Rezultati ove doktorske disertacije sugerisu da su heterogene promene u lokalnim NREM i REM EEG mikrostrukturama odraz topografski i stanjem uslovljenog uticaja DA denervacije na regulaciju beta i sigma amplitude, pri čemu REM spavanje ima poseban značaj kao neurohemijski regulator beta oscilacija. Poremećaj DA kontrole tokom REM spavanja manifestuje se smanjenjem beta amplitude u motornoj kori i hipokampusu. Sa druge strane DA i ACh denervacija utiču suprotno na delta i beta amplitude tokom NREM spavanja u hipokampusu i motornoj kori (NREM paneli motorne kore (**Slika 4.6A**) u poređenju sa NREM panelima hipokampusa (**Slika 4.6B**)), kao što DA denervacija ima suprotan efekat na beta amplitudu tokom NREM i REM spavanja u motornoj kori (**Slika 4.6A**).

5.1.3 Dinamika vretena spavanja

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju da je REM spavanje predisponirajuće stanje za indukovanje HVS vretena u svim eksperimentalnim modelima PB, a posebno u modelima hemiparkinsonizma (hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB). Takođe, ustanovljeno je da holinopatija PB produžava trajanje SS i HVS vretena, i povećava gustinu indukovanih HVS vretena, posebno tokom REM faze spavanja (**Tabela 4.3.**, **Slika 4.7.**). Hipokampalna SS i HVS vretena su uvek sporije oscilacije u poređenju sa motornom korom, osim u hemiparkinsonizmu sa holinopatijom PB gde se interstrukturna razlika gubi usled porasta unutrašnje frekvencije indukovanih HVS vretena tokom REM spavanja.

Spontana pojava HVS vretena zabeležena je u neostrijatumu i SNpr jedru pacova koji su u stanju mirne budnosti i slobodnog kretanja, pri čemu su ovi lokalni potencijali polja u motornoj kori, strijatumu i SNpr jedru sinhronizovani tokom epizoda HVS vretena, što ukazuje na koordinisanu neuronsku aktivnost u ovim strukturama i funkcionalnu povezanost (Dejean i sar, 2007). Smanjenje DA povećava amplitudu i koherentnost HVS vretena u GP i motornoj kori pacova, kao i učestalost i trajanje epizoda HVS vretena u obe strukture (Ge i sar, 2012).

Takođe, izmenjena dinamika SS vretena je dokumentovana u stanjima poput kome, epilepsije i moždanog udara, ali i kod različitih mentalnih oboljenja (Sullivan i sar., 2014), dok je pojava HVS

vretena povezana sa kognitivnim deficitima i progresijom disfunkcije mozga (Radek i sar., 1994; Sales-Carbonell i sar., 2013). Pokazano je da nedostatak regulacije talamo-kortikalnih kola dovodi do izmene dinamike oba tipa vretena (SS i HVS) tokom REM spavanja (Ciric i sar., 2017, 2018).

5.2 Poremećaji memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima

Parkinsonove bolesti

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivane su promene prostorne i neprostorne hipokampus-zavisne memorije (kratkotrajna i dugotrajna memorija prepoznavanja), uz evaluaciju bazalne lokomotorne aktivnosti u različitim eksperimentalnim modelima PB. Rezultati su pokazali da ovi eksperimentalni modeli nisu imali motorički deficit, ali su ispoljavali oštećenja memorijskih funkcija. U modelu holinopatije PB dokazani su poremećaji prostorne memorije, kratkotrajne i dugotrajne memorije prepoznavanja samo tokom progresije bolesti. Za razliku od PB holinopatije, u modelu hemiparkinsonizma poremećaj prostorne memorije je prodromalnog karaktera, a traje i tokom progresije, dok je memorija prepoznavanja očuvana. U modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB prodromalnom poremećaju prostorne memorije u progresiji bolesti se pridružuje i poremećaj kratkotrajne i dugotrajne memorije prepoznavanja. Ovi rezultati pokazuju da izolovani DA ili ACh deficit ne remete memorijske funkcije na isti način, dok kombinacija njihovog deficita prouzrokuje složenije i izraženije poremećaje memorije.

5.2.1 Spontana bazalna lokomotorna aktivnost

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su u svim eksperimentalnim grupama bile očuvane motoričke sposobnosti (**Slika 4.18**). Parcijalna PPT lezija sa deficitom ACh neurona većim od 22% i/ili parcijalna SNpc lezija sa deficitom DA neurona većim od 56% (**Slike 4.1 – 4.3**) nije uticala na spontanu lokomotornu aktivnost životinja 14 i 42 dana nakon lezija, budući da su sve eksperimentalne grupe pokazale isti nivo motoričke aktivnosti (**Slika 4.18**) (Radovanovic i sar., 2026). U modelima PB koji su indukovani neurotoksinima, obim lezije varira u zavisnosti od doze i volumena mikroinjekcije neurotoksina, pri čemu obimne (kompletne, ali možda i neselektivne) lezije dovode do izraženih motoričkih deficita i koriste se kao model kasnijeg stadijuma (progresije) bolesti (Duty i Jenner, 2011). U eksperimentima ove doktorske disertacije izvršene su selektivne lezije unutar granica PPT i/ili SNpc jedra i kvantifikacija lezija je potvrdila deficite u celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji svake moždane strukture. Odsustvo motoričkih poremećaja u eksperimentalnim modelima PB, korišćenim u ovim istraživanjima, pored preventivne zaštite noradrenergičkih neurona davanjem dezipramina, je indirektan dokaz o selektivnosti ovih lezija i predstavlja prednost u istraživanjima prodromalnih nemotoričkih poremećaja (poremećaji spavanja i memorijskih funkcija) bez istovremenih motoričkih poremećaja.

Treba napomenuti da se SHT i NORT testovi ponašanja zasnivaju na početnom nivou eksploratorne aktivnosti koji može varirati među eksperimentalnim modelima PB usled motoričkih deficita izazvanih lezijama. Smanjena lokomotorna aktivnost može uticati i na habituaciju i na istraživanje objekata tokom faze familiarizacije. Shodno tome, izostanak habituacije ili prepoznavanja novog objekta ne mora nužno biti posledica samog memorijskog deficita, već može biti posledica nepotpunog inicijalnog istraživanja otvorenog polja ili objekata. Međutim, kao što je prethodno navedeno, motorički odgovor u ovim istraživanjima je bio isti u svim eksperimentalnim grupama. Time se isključuje mogućnost da su deficiti u prostornoj memoriji i memoriji prepoznavanja, uočeni u ovoj doktorskoj disertaciji, posledica smanjene lokomotorne aktivnosti.

5.2.2 Poremećaj prostorne hipokampus-zavisne memorije

U istraživanjima ove doktorske disertacije SHT je korišćen za procenu sposobnosti životinja da uče i pamte prostorne informacije (prazna arena testa otvorenog polja) i služio je kao indirektna mera prostorne memorije. Sve eksperimentalne grupe su pokazale identičan obrazac kratkotrajne prostorne habituacije (intenzivna motorička aktivnost tokom prvih 5 minuta testa, praćena smanjenjem lokomotorne aktivnosti u narednom periodu testiranja) kako 14, tako i 42 dana nakon lezija (**Slika 4.18, levi paneli**). Međutim, dugotrajna prostorna habituacija je bila oštećena.

Habituacija na prostorni stimulus predstavlja jedan od najjednostavnijih oblika neasocijativnog hipokampus-zavisnog učenja kod glodara (Leussis i Bolivar, 2006). Prostorna habituacija se zasniva na prirodnoj preferenciji prema novini i meri promene u eksploratornom ponašanju kao odgovor na produženo ili ponovljeno izlaganje novom okruženju. Generalno, pri ponovljenom izlaganju istom okruženju, glodari pokazuju postepeno smanjenje aktivnosti tokom vremena (najčešće merene kao pređena distanca tokom testa otvorenog polja), kako unutar jedne sesije (kratkotrajna habituacija), tako i između sesija (dugotrajna habituacija). Smatra se da kratkotrajna habituacija odražava adaptaciju na novo okruženje, dok dugotrajna habituacija predstavlja meru dugoročne memorije prethodnog izlaganja (Bolivar, 2009).

Pored lokalnih poremećaja spavanja, u eksperimentalnim modelima hemiparkinsonizma i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB pokazan je deficit prostorne memorije na početku oštećenja DA kontrole, kao i tokom progresije patologije (**Slika 4.19**). Ovi rezultati su u skladu sa ranijom studijom (Ćirić i sar., 2019), gde je pokazano oštećenje prostorne memorije u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma izazvanog selektivnim oštećenjem SNpc jedra primenom dve mikroinfuzije 6-OHDA različitih volumena (1 μ l naspram 2 μ l) i koncentracije (12 μ g/ μ l naspram 6 μ g/ μ l). Nasuprot tome, oštećenje prostorne memorije u modelu holinopatije PB je zabeleženo tokom progresije patologije (**Slika 4.19**). Takođe je pokazano da bilateralna 6-OHDA lezija dovodi do ranih poremećaja pažnje i prostorne memorije, čak i pre pojave motoričkih oštećenja (Solaris i sar., 2013). Za razliku od naših rezultata, u mišjim modelima sa selektivnim smanjenjem ACh signalizacije PPT/LDT jedra (miševi sa delecijom gena za vezikularni transporter ACh) deficiti u Morisovom vodenom lavirintu se pripisuju izmenjenom odgovoru na stres (visok nivo kortikosterona i anksioznost) pre nego čistom oštećenju prostorne memorije (Janickova i sar., 2019).

Prostorna memorija može biti narušena u PB (García-Navarra i sar., 2025). Trenutni nalazi ukazuju na to da su deficiti prostorne memorije u PB posledica poremećaja u više neuronskih krugova koji uključuju hipokampus, BG, DA puteve i frontalne kortikalne regione (García-Navarra i sar., 2025). Hipokampus ima ključnu ulogu u prostornoj memoriji, dok su BG, a posebno strijatum, uključene u proceduralno učenje i prostornu navigaciju. Interakcije između hipokampusa i BG posredovane su dopaminom. U patologiji PB, progresivni gubitak DA neurona u SNpc i manjak DA u strijatumu narušava integritet ovih interakcija i doprinosi deficitu prostorne memorije (García-Navarra i sar., 2025). Carvalho i saradnici (2013) su pokazali da unilateralna 6-OHDA lezija MFB dovodi do izraženih poremećaja u prostornoj memoriji, pri čemu je težina poremećaja u korelaciji sa stepenom lezije. Dugotrajno oštećenje prostorne memorije u modelima hemiparkinsonizma, pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji, podržava ove nalaze i ukazuje na značajnu ulogu DA denervacije u deficitima prostorne memorije u prodromalnoj fazi PB (Radovanović i sar., 2026).

5.2.3 Poremećaj neprostorne hipokampus-zavisne kratkotrajne i dugotrajne memorije

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je memorija prepoznavanja bila očuvana u svim eksperimentalnim grupama na početku perioda praćenja (**Slika 4.22A**). Ovo ukazuje na to da je novi objekat bio procenjen, istražen i postao poznat tokom NORT T1 (kratkotrajna memorija prepoznavanja očuvana), te je stoga bio zapamćen i tretiran kao poznat tokom NORT T2 (dugotrajna memorija prepoznavanja očuvana). Analiza ukupne eksploratorne dinamike tokom prodromalne faze PB, pokazala je da su u poređenju sa kontrolnom grupom svi eksperimentalni modeli PB imali produženu eksploraciju tokom NORT T1 faze (**Slika 4.20A** i **Slika 4.21A**). Iako su u svim eksperimentalnim modelima parkinsonizma bile očuvane i kratkotrajna i dugotrajna hipokampus-zavisna memorija, produžena eksploracija objekata u ovim modelima bi mogla biti znak neuropatologije koja kompenzuje memorijski deficit. Naime, vreme provedeno u istraživanju objekta može biti direktno proporcijalno jačini i detaljnosti formirane memorije (Cohen i Stackman, 2015). Stoga je moguće da produženo istraživanje objekata tokom 20-minutnog perioda NORT T1 u svim eksperimentalnim modelima PB (u poređenju sa 10-minutnim periodom u kontrolnoj grupi) doprinosi boljem pamćenju, te na taj način kompenzuje potencijalni memorijski deficit koji bi se mogao očekivati u ovoj patologiji. Da je u ovim istraživanjima korišćen NORT protokol koji je uključivao sesije kraćeg trajanja, moguće je da bi memorijski deficit bio detektovan, ali bi u tom slučaju kompenzatorni efekat produženog istraživanja objekata ostao neprimećen. Međutim, sa progresijom PB patologije pacovi sa holinopatijom PB i hemiparkinsonizmom sa holinopatijom PB ispoljili su deficite i kratkotrajne i dugotrajne memorije prepoznavanja (**Slika 4.22B**). U ovom slučaju, produžena eksploratorna aktivnost zabeležena je samo u modelu hemiparkinsonizma koji je imao očuvanu memoriju prepoznavanja. Oštećenja kratkotrajne i dugotrajne hipokampus-zavisne memorije prepoznavanja tokom progresije neuropatologije u modelima holinopatije PB i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB sugerišu da je selektivna ACh, ali ne i DA denervacija bila dovoljna da izazove deficit memorije (Radovanovic i sar., 2026). Značajnu ulogu ACh sistema u memoriji prepoznavanja potvrđuju i istraživanja u eksperimentalnim modelima AB, čija je osnovna patološka karakteristika kontinuirano, trajno i progresivno pogoršanje kognitivnih funkcija, uključujući i memoriju prepoznavanja (Okada i sar., 2022). Takođe je pokazano da parcijalno smanjenje DA izazvano bilateralnom 6-OHDA lezijom strijatuma kod miševa dovodi do oštećenja dugotrajne, ali ne i kratkotrajne memorije prepoznavanja (Bonito-Oliva i sar., 2014).

Kod rano dijagnostifikovanih pacijenata sa PB najčešći kognitivni simptom koji se javlja jeste poremećaj epizodične memorije (Das i sar., 2019; Muslimovic i sar., 2005). Memorija prepoznavanja je neophodna za razlikovanje novih informacija od onih koje su nam već poznate (Ennaceur i Delacour, 1988) i predstavlja ključnu podkomponentu epizodične memorije (Das i sar., 2019). Pretpostavlja se da je memorija prepoznavanja novog objekta kod glodara slična epizodičnoj memoriji kod ljudi (Dere i sar., 2005). Testovi prepoznavanja, kao što je NORT, već decenijama se koriste za procenu neasocijativne memorije prepoznavanja kod glodara (Ennaceur, 2010; Ennaceur i Delacour, 1988).

Mnogi dokazi sugerišu da spavanje ima važnu i aktivnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti i konsolidaciji memorije (Dudai i sar., 2015). Za vreme spavanja memorijske funkcije, uključujući prostornu memoriju, memoriju prepoznavanja i kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju, se održavaju i jačaju (Chen i sar., 2023). Smatra se da NREM spavanje posebno doprinosi jačanju hipokampus-zavisne deklarativne memorije (Ellenbogen i sar., 2006), pri čemu specifični EEG događaji koji se javljaju tokom NREM spavanja (kortikalni spori talasi, vretena spavanja i hipokampalni riplovi – hipokampalne oscilacije visoke frekvencije; engl. *sharp-wave ripples*) olakšavaju konsolidaciju memorije (Geva-Sagiv i Nir, 2019). Nasuprot tome, REM spavanje može biti značajno za nedeklarativno, proceduralno i emocionalno pamćenje (Frazer i sar., 2021).

Pokazano je da poremećaji spavanja, kao i deprivacija sna imaju negativan uticaj na učenje i pamćenje (Dubielka i sar., 2005; Zare Khormizi i sar., 2019), dok period oporavka nakon deprivacije sna može imati povoljan efekat na kognitivne funkcije (Dubielka i sar., 2005). Poremećaji spavanja predstavljaju najčešće prodromalne nemotoričke simptome PB (Schapira i sar., 2017) koji remete arhitekturu spavanja, pogoršavaju motoričke simptome, negativno utiču na kognitivne funkcije i mogu dodatno ubrzati neurodegenerativne procese. Pored toga, poremećaji spavanja mogu oštetiti neurone hipokampusa, ugroziti konsolidaciju memorije koja se dešava tokom spavanja i dodatno narušiti hipokampus-zavisne memorijske funkcije (Chen i sar., 2023).

Kao što je prethodno istaknuto, svi eksperimentalni modeli korišćeni u ovom istraživanju pokazali su izražene poremećaje spavanja na samom početku neuropatologije. Svi ovi poremećaji ugrožavaju stabilnost i kvalitet NREM/REM spavanja, remete proces konsolidacije memorije i dodatno doprinose uočenim memorijskim deficitima. Poznato je da oscilacije u okviru hipokampalno-entorinalnog sistema imaju važnu ulogu u kognitivnim funkcijama i da su hipokampalne teta oscilacije povezane sa funkcijom prostornog pamćenja i kod ljudi i kod glodara (Buzsáki i Moser., 2013; Vivekananda i sar., 2021). Moguće je da u uslovima oslabljene DA inervacije, izmenjena hipokampalna teta oscilacija doprinosi poremećaju prostorne memorije u modelima hemiparkinsonizma.

5.3 Čelijska osnova i sinaptička reorganizacija za vreme poremećaja spavanja i memorijskih funkcija u eksperimentalnim modelima Parkinsonove bolesti

Poremećaji spavanja i memorijskih funkcija kao rani nemotorički simptomi PB ukazuju da procesi koji su u osnovi mehanizama nastanka PB zahvataju regulatorne neuronske mreže mnogo pre pojave prvih motoričkih manifestacija bolesti. Eksperimentalni modeli PB korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da nemotorički poremećaji nisu isključivo posledica gubitka DA i/ili ACh neurona, već su odraz mnogo većih promena u neuronskim mrežama, uključujući poremećaj inhibitorne kontrole i sinaptičke plastičnosti. Shodno ispitivanim nemotoričkim poremećajima, od posebne je važnosti bilo proučiti regulatorne mreže inhibitornih GABA-ergičkih interneurona, zajedno sa sinaptičkom reorganizacijom u hipokampusu koji ima značajnu ulogu u memorijskim procesima i generisanju teta ritma, kao i u RT jedru, strukturi koja ima ključnu ulogu u generisanju ritmova spavanja, a posebno vretena spavanja. Detaljno proučavanje GABA-ergičkog neurotransmiterskog sistema doprinosi razumevanju prodromalnih poremećaja spavanja i memorijskih funkcija u PB. U tom kontekstu, PV+ interneuroni, kao jedan od glavnih tipova inhibitornih neurona u hipokampusu, odnosno glavni tip neurona u RT jedru, predstavljaju kritičnu komponentu za razumevanje lokalne i udaljene inhibitorne kontrole, čija disfunkcija zajedno sa sinaptičkom reorganizacijom u ovim strukturama, može imati značajan uticaj na funkcionalnu integraciju neuronskih mreža.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da izmena broja PV+ interneurona nije primarna posledica lezijom indukovane neurodegeneracije, već se javlja tokom progresije neuropatologije, u nekim eksperimentalni modelima. Nasuprot hemiparkinsonizmu gde nije bilo izmena u broju PV+ interneurona ni u hipokampusu (**Slika 4.8; Slika 4.9; Slika 4.23; Slika 4.24; Slika 4.28**), ni u RT jedru (**Slika 4.16; Slika 4.29**), u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB odloženom smanjenju broja PV+ interneurona hipokampusa (42 dana nakon lezija) se u progresiji neuropatologije (52-100 dana nakon lezija) pridružuje i smanjenje broja PV+ interneurona u RT jedru. U modelu holinopatije PB je ustanovljeno povećanje broja PV+ interneurona u hipokampusu, ali bez promena u RT jedru.

Nasuprot tome, sinaptičke izmene na nivou hipokampusa i RT jedra bile su prisutne od samog početka indukovane neurodegeneracije, osim u modelu hemiparkinsonizma gde, kao i u slučaju broja

PV+ interneurona, nije bilo izmena na sinaptičkom nivou (**Slika 4.28; Slika 4.29**). Udruženu ACh i DA denervaciju u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB od početka prati pojačana ekscitacija (povećana ekspresija PSD-95 proteina) i u hipokampusu (**Slika 4.14; Slika 4.15; Slika 4.30**) i u RT jedru (**Slika 4.17; Slika 4.31**), kojoj se u progresiji neuropatologije (52-100 dana nakon lezija) pridružuje pojačana ekspresija MAP2 proteina (**Slika 4.12; Slika 4.13; Slika 4.30; Slika 4.17; Slika 4.31**). Sa druge strane, indukovana ACh denervacija u modelu holinopatije PB izaziva hronično smanjenje ekspresije MAP2 proteina u hipokampusu (**Slika 4.12; Slika 4.13; Slika 4.26**) paralelno sa hronično smanjenom ekscitacijom (smanjena ekspresija PSD-95 proteina) u RT jedru (**Slika 4.17; Slika 4.27**) koja tek u progresiji ove patologije dovodi do pojačane ekspresije MAP2 proteina (**Slika 4.17; Slika 4.27**). Prethodne studije potvrđuju da su u neurodegenerativnim procesima najpre pogođeni sinaptički proteini, a da se tek kasnije detektuju promene na ćelijskom nivou. Naime α -sin ne predstavlja samo „toksični protein“ već je regulator sinapsi u CNS-u, a patološke promene nastale usled deficita različitih neurotransmitera utiču na redistribuciju, akumulaciju i disfunkciju sinaptičkih proteina (Bellucci i sar., 2016). Pored toga, uočena je i kolokalizacija citoskeletnog proteina MAP2 sa α -sin u citoplazmatskim LB neurona. Promene morfologije i raspodele MAP2 proteina su povezane sa poremećajem neuronskog transporta i doprinose progresiji gubitka neurona u mozgu pacijenata sa PB (D'Andrea i sar., 2001). Pored izmena MAP2 proteina, značajnu ulogu u patofiziologiji PB ima i PSD-95 koji predstavlja ključni regulator glutamatergičke signalizacije. Naime, u 6-OHDA pacovskom modelu uočeno je smanjenje PSD-95 u strijatumu (Nash i sar., 2005). Uprkos činjenici da sinaptička disfunkcija predstavlja jedan od najranijih nalaza u PB, koja dovodi do strukturnih promena, uloga izmene sinaptičkih proteina i dalje je nedovoljno istražena, a mogla bi imati velike translacione implikacije u razumevanju i modulaciji sinaptičke funkcije.

Hipokampus ima ključnu ulogu u pamćenju i prepoznavanju objekata. Oba tipa memorije ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji (prostorna memorija i memorija prepoznavanja) su hipokampus-zavisne memorije (Cohen i Stackman, 2015; Leussis i Bolivar, 2006). Pokazano je da u hipokampusu PV+ interneuroni predstavljaju malobrojnu populaciju neurona, međutim imaju ključnu ulogu u formiranju memorije i obradi informacija (Ognjanovski i sar., 2017; Verret i sar., 2012; Yi i sar., 2014). Konsolidacija i prisećanje zavise od neuronskih mreža hipokampusa, čija je komunikacija, E/I ravnoteža i GABA-ergička inhibicija regulisana upravo PV+ interneuronima (Nahar i sar., 2021; Sohal i sar., 2009). Pokazano je da PV+ interneuroni učestvuju u određivanju aktivnosti hipokampalne oscilatorne mreže i u regulisanju plastičnosti nakon učenja (Hijazi i sar., 2020). Naime, nakon procesa učenja, hipokampalni PV+ interneuroni reaktiviraju lokalne neuronske populacije i promovišu plastičnost lokalne oscilatorne mreže za formiranje dugotrajne memorije (Ognjanovski i sar., 2017). Takođe, pokazano je da smanjenje funkcionalne aktivnosti PV+ interneurona menja obrasce inhibitorne transmisije u hipokampusu, što dovodi do dezinhibicije piramidalnih neurona i posledične hiperaktivnosti hipokampalne mreže. Ovakva disbalansirana E/I dinamika rezultira izraženim poremećajima prostorne memorije, memorije prepoznavanja i emocionalnog pamćenja (McGarrity i sar., 2017; Ognjanovski i sar., 2017). Sugerisano je takođe da rani tretmani koji utiču na smanjenje hiperaktivnosti PV+ interneurona mogu biti klinički relevantni u sprečavanju slabljenja memorije izazivanjem hiperekscitabilnosti lokalne neuronske mreže i mogu uticati na odlaganje progresije neurodegenerativnih bolesti kao što je AB (Hijazi i sar., 2020). U tom smislu rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su najizraženije promene u broju PV+ interneurona i najširi obrazac poremećaja memorijskih funkcija detektovani u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB.

Inhibitorna destabilizacija hipokampalne neuronske mreže izazvana izmenama u broju PV+ neurona predstavlja važan mehanizam koji svakako doprinosi uočenim memorijskim deficitima. Funkcionalna povezanost između PV+ interneurona i kratkotrajne-hipokampus zavisne memorije (**Slika 4.25**) potvrđuje bitnu ulogu PV+ interneurona tokom obrade novih informacija u hipokampusu. Pored toga, naši rezultati pokazuju da deficiti različitih tipova neurotransmitera u

nervnom sistemu na različit način utiču na memorijske funkcije i inhibitornu ćelijsku organizaciju u hipokampusu. Korelacija između broja PV+ interneurona i deficita memorije prepoznavanja uslovljena je progresijom patologije u modelima sa ACh denervacijom. Uočeno je da, neizmenjen broj PV+ hipokampalnih neurona nije bio udružen sa neizmenjenom memorijom prepoznavanja u modelu hemiparkinsonizma, što ukazuje na to da DA deficit veći od 56% nije bio dovoljan za uspostavljanje ove funkcionalne povezanosti. Nasuprot tome, povezanost između broja PV+ interneurona i deficita memorije prepoznavanja u modelu holinopatije sa PB, kao i u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB, javila se nakon ACh deficita većeg od 22%. Međutim, iako je ACh denervacija bila neophodna za nastanak poremećaja memorije prepoznavanja, sama po sebi nije bila dovoljna da dovede do promene u broju PV+ interneurona. U modelu holinopatije PB neizmenjen broj PV+ interneurona je bio negativno korelisan sa deficitom memorije prepoznavanja (Slika 4.25), sugerišući da u ovoj neuropatologiji PB bolju memoriju prepoznavanja imaju životinje sa manjim brojem PV+ interneurona. Dodatna DA denervacija u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB dovodi do smanjenja broja PV+ interneurona, pri čemu je stepen smanjenja broja visoko korelisan sa stepenom oštećenja kratkotrajne memorije prepoznavanja (Slika 4.25), sugerišući da bolju memoriju prepoznavanja imaju životinje sa većim brojem PV+ interneurona. Negativna korelacija u modelu holinopatije PB mogla bi biti posledica izmenjene (povećane) aktivnosti. Dakle, u situaciji kada je broj PV+ interneurona nepromenjen, memorija prepoznavanja bi mogla biti bolja ako bi bilo manje hiperaktivnih PV+ interneurona. Suprotno tome, kada je prisutno smanjenje broja PV+ interneurona, preostali (potencijalno hiperaktivni) PV+ interneuroni mogli bi doprineti očuvanju memorije prepoznavanja i kompenzovati narušenu funkciju. Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije ukazuju da sinergistička disfunkcija ACh i DA sistema, praćena sekundarnim promenama u GABA-ergičkoj transmisiji, predstavlja ključnu neuropatološku osnovu memorijskog deficita koji se javlja tokom progresije bolesti.

Promene broja PV+ interneurona hipokampusa uočene su i u drugim animalnim modelima različitih bolesti. U nekoliko mišjih modela autizma uočeno je smanjenje broja PV+ interneurona hipokampusa, pri čemu je E/I ravnoteža bila pomerena u smeru pojačane inhibicije kao rezultat smanjene ekspresije proteina parvalbumina, ali bez gubitka GABA-ergičkih neurona (Filice i sar., 2016). Pored toga, u modelu depresije kod pacova, ekspresija PV u GABA-ergičkim interneuronima je smanjena u svim regionima hipokampusa (Filipovic i sar., 2013).

U kontekstu poremećaja spavanja, a posebno poremećaja vretena spavanja i njihove dinamike, centralnu ulogu ima RT jedro. Kao glavna inhibitorna struktura talamo-kortikalne mreže RT jedro je odgovorno za generisanje i modulaciju vretena spavanja. RT jedro čine GABA-ergički neuroni koju su povezani hemijskim i električnim vezama (Landisman i sar., 2002). Ovo jedro okružuju druga talamička jedra i ima ključnu ulogu u stvaranju ritmova spavanja, posebno u generisanju vretena spavanja, ali i u stvaranju delta ritma i sporih oscilacija (Pratt i Morris, 2015; Vantomme i sar., 2019). Pored anatomskih, morfoloških i neurohemijskih heterogenosti RT jedra i njegove uloge u ritmovima spavanja, RT je uključen u regulaciju heterogenosti spavanja kroz topografski definisane recipročne talamo-kortikalne petlje (Vantomme i sar., 2019). Poremećaji spavanja ili oscilacija spavanja u različitim bolestima mogu biti povezane sa izmenjenom aktivnošću u lokalnim delovima RT jedra. Deficit u vretenima spavanja kao i izmenjene karakteristike ove oscilacije mogu nastati usled poremećaja aktivnosti RT jedra (Pratt i Morris, 2015; Vantomme i sar., 2019).

Rezultati ove doktorske disertacije posebno naglašavaju značajnu ulogu ACh aferentnog sistema PPT jedra u modulaciji talamičke inhibicije. Naime, kao glavni talamo-kortikalni izvor ACh inervacije, ACh PPT neuroni se direktno projektuju ka GABA-ergičkim (PV) neuronima RT jedra i na taj način regulišu inhibitorni izlaz RT jedra prema talamičkim jedrima. Ova interakcija ima značajnu ulogu u regulaciji talamo-kortikalnih oscilacija i generisanju oscilatornih obrazaca karakterističnih za NREM spavanje (Dringenberg i Olmstead, 2003).

Izmena GABA-ergičkih PV+ interneurona i sinaptička reorganizacija u lokalnoj mreži RT jedra bi mogli biti u osnovi mehanizma generisanja patoloških HVS vretena, posebno tokom REM spavanja, kao i uzrok različite dinamike HVS vretena u različitim neuropatologijama PB. Rezultati praćenja promena broja PV+ interneurona i sinaptičke reorganizacije su ukazali na ozbiljnu sinaptičku reorganizaciju na nivou hipokampusa i RT jedra, posebno u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB. Stoga, na nivou lokalnog potencijala polja, kao što je vreteno spavanja, povećanje srednje unutrašnje frekvence hipokampalnih HVS vretena tokom REM spavanja u ovom modelu (**Slika 4.7**) može biti posledica smanjenja broja PV+ interneurona i/ili postsinaptičke reorganizacije u RT jedru. Pored toga, uočeno smanjenje broja PV+ interneurona na hipokampalnom nivou ukazuje na mogući zaštitni mehanizam PV+ interneurona na sinaptičku reorganizaciju u lokalnoj hipokampalnoj mreži: povećan broj PV+ interneurona kao odgovor na smanjenu ekspresiju MAP2 proteina u modelu holinopatije PB u odnosu na smanjen broj PV+ interneurona u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB kao odgovor na povećanu ekspresiju MAP2 proteina.

Pored promena u populaciji PV+ interneurona, sinaptičke veze između neurona naročito su osetljive na poremećaje u neurotransmiterskoj signalizaciji. Ove promene direktno se odražavaju na sinaptičku plastičnost. Sinaptička plastičnost kao kontinuirani proces aktivnosti i adaptacije nervnog sistema na različite mrežne promene, predstavlja ključni mehanizam kompenzatornih odgovora na oštećenje i gubitak neurona kroz modulaciju aksona, dendrita i sinapsi na strukturnom i funkcionalnom nivou. Deficiti u sinaptičkoj plastičnosti i transmisiji doprinose ranoj disfunkciji neuronskih mreža u PB.

U okviru ove doktorske disertacije je pokazano da promene u ekspresiji postsinaptičkog proteina MAP2, čija je osnovna uloga stabilnost mikrotubula kao ključnih komponenti citoskeleta neurona, kao i postsinaptičkog proteina PSD95 kao markera ekscitatornih sinapsi, nastaju kao posledica inicijalnih ACh i DA deficita i da kao dugotrajna promena tokom progresije mogu značajno doprineti patologiji PB. Ove promene, zahvaljujući svojoj specifičnosti, omogućavaju diferenciranje različitih neuropatologija PB, njihovog početka i progresije.

5.4 Značaj parvalbuminske ekspresije i sinaptičke reorganizacije hipokampusa i retikulo-talamičkog jedra u progresiji neurodegeneracije

Uprkos brojnim istraživanjima i ogromnom napretku u razumevanju patogeneze PB, njena ćelijska osnova, uključujući i mehanizme sinaptičke reorganizacije, još uvek nisu u potpunosti definisani. Iako se na ćelijskom nivou, PB manifestuje kao sinukleinopatija, sinaptopatija i holinopatija, molekularni i ćelijski mehanizmi koji povezuju akumulaciju α -sin, poremećaj sinaptičke transmisije i disfunkciju različitih neurotransmiterskih sistema u jedinstven patofiziološki proces ostaju nedovoljno razjašnjeni.

Pored izmena GABA-ergičke transmisije i njene uloge u patofiziologiji nemotoričkih poremećaja, vremenska dinamika patofizioloških mehanizama bolesti još uvek nije do kraja definisana. Ostaje nejasno da li promene na ćelijskom i sinaptičkom nivou prethode pojavi nemotoričkih simptoma bolesti ili se ovi procesi odigravaju paralelno u ranoj fazi bolesti.

5.4.1 Holinopatija PB

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da poremećaji spavanja predstavljaju najraniju disfunkciju u modelu holinopatije PB, koji prethode kako oštećenjima memorije tako i ćelijskim promenama na nivou hipokampusa i RT jedra.

Ranu fazu indukovane ACh degeneracije karakterišu izmene EEG mikrostrukture i pojava HVS vretena tokom NREM i REM spavanja u motornoj kori i hipokampusu (**Tabela 4.3; Slika 4.7**), što ukazuje na disfunkciju neuronskih mreža zaduženih za regulaciju spavanja, kao i na narušen integritet neurotransmiterske modulacije (GABA, DA i ACh). Ovi rezultati su u skladu sa eksperimentalnim podacima gde je pokazano da je ACh sistem PPT jedra važan za regulaciju budnosti, REM spavanja i talamo-kortikalnih oscilacija (Chambers i sar., 2020; Perez-Lloret i Barrantes, 2016). Istovremeno, u ovom modelu, test kratkotrajne memorije obeležilo je produženo vreme eksploracije objekata (**Slika 4.20; Slika 4.21**) koje može ukazati na suptilne promene u pažnji ili brzini obrade informacija u hipokampusu, bez narušene memorijske diskriminacije. Dakle, memorijski engram u različitim tipovima memorije koje su analizirane ostaje očuvan, ali je sam proces evaluacije stimulusa/objekata produžen, što bi moglo ukazati na postojanje kompenzatornih mehanizama. Ovaj nalaz je u skladu sa istraživanjima gde je pokazano da ACh deficit ne mora odmah da dovede do gubitka memorijskog traga već može da uspori/oteža obradu novih informacija (Drever i sar., 2011). Osim toga ACh sistem je veoma važan za regulaciju hipokampalnih oscilacija važnih za memorijske procese, posebno za uspostavljanje teta ritma (Buzsáki, 2002).

Ćelijski i sinaptički nivo na početku neurodegeneracije u holinopatiji PB obeležavaju smanjenje ekspresije MAP2 proteina u hipokampusu (**Slika 4.26**) i PSD-95 proteina u RT jedru (**Slika 4.27**), bez izmene PV ekspresije. Ovakav obrazac ekspresije MAP2 proteina, kao markera dendritskog integriteta i stabilnosti citoskeleta, na samom početku ACh neurodegeneracije bi mogao predstavljati suptilni dendritski stres (DeGiosio i sar., 2022), koji se nije odražavao na inhibitornu reorganizaciju (nepromenjen broj PV+ interneurona), kao ni na izmenu ekscitatornih sinapsi (nepromenjena ekspresija PSD-95 proteina) u hipokampusu. Smanjenje ekspresije PSD-95 na nivou RT jedra, predstavlja modulaciju talamo-kortikalne regulacije koja bi mogla biti povezana sa rezultatima izmenjene dinamike vretena spavanja (evidentirano je produženo trajanje ređih SS vretena u motornoj kori, povećana učestalost HVS vretena u motornoj kori i hipokampusu u REM fazi spavanja, kao i izraženije sporije oscilacije u hipokampusu). Ove sinaptičke izmene na nivou hipokampusa i RT jedra su bile prisutne tokom čitavog perioda praćenja neuropatologije u modelu holinopatije PB.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da ACh deficit na početku neurodegeneracije (14 dana nakon lezije) najpre utiče na sinaptičku reorganizaciju u regulatornim mrežama koje su odgovorne za spavanje i kognitivne funkcije. Progresiju ACh neuropatologije (42 dana nakon lezije) je obeležila destabilizacija adekvatne sinaptičke plastičnosti hipokampusa (smanjena ekspresije MAP2 proteina i dalje prisutna) kroz oštećenje prostorne i neprostorne hipokampus-zavisne memorije (**Slika 4.19; Slika 4.22**). Pored uticaja hroničnog smanjenja MAP2 ekspresije u hipokampusu, postoji mogućnost da i rani poremećaji spavanja doprinose deficitima u formiranju i konsolidaciji memorijskog traga u modelu holinopatije PB. Rezultati drugih istraživanja takođe potvrđuju da deprivacija sna negativno utiče na formiranje i konsolidaciju memorije (Fan i sar., 2024; Zhong i sar., 2024).

Povećanje broja PV+ interneurona u hipokampusu koje je obeležilo dalju progresiju neuropatologije (52-100 dana nakon lezija) je verovatno uslovljeno hroničnim dendritskim stresom u vidu smanjenja MAP2 proteina (**Slika 4.26**). Povećanje inhibicije na nivou hipokampusa je potencijalna mrežna adaptacija na disregulaciju aktivnosti hipokampusa. Hipokampus je struktura koja je posebno osetljiva na dendritske promene, a smanjenje MAP2 ekspresije u hipokampusu uočeno je u različitim neurodegenerativnim i psihijatrijskim patologijama (DeGiosio i sar., 2022). Osim toga, kompenzatorna hiperekscitabilnost hipokampalnih PV+ interneurona stabilizuje E/I disbalans u eksperimentalnim modelima AB (Hijazi i sar., 2020). Nasuprot tome, parcijalno povećanje MAP2 ekspresije u RT jedru bi moglo predstavljati moguću dendritsku adaptaciju ili reparaciju dendritske mreže izazvanu trajnom postsinaptičkom disfunkcijom usled hroničnog smanjenja PSD-95 ekspresije.

5.4.2 Hemiparkinsonizam

U eksperimentalnom modelu DA denervacije najranije i najkonzistentnije promene bile su funkcionalnog karaktera: ozbiljni poremećaji spavanja (fragmentacija spavanja), povećanje NREM/REM relativne teta amplitude u motornoj kori i hipokampusu (**Slika 4.6**), pojava HVS vretena tokom REM spavanja u obe moždane strukture (**Tabela 4.3**; **Slika 4.7**), kao i rano oštećenje prostorne memorije, koje je prisutno i tokom progresije neurogeneracije (**Slika 4.19**). Sličan obrazac u eksperimentalnom modelu hemiparkinsonizma opisan je i u ranijim studijama (Ciric i sar., 2019; García-Navarra i sar., 2025; Medeiros i sar., 2023). Ovi prodromalni nemotorički poremećaji nisu bili praćeni promenama na ćelijskom i sinaptičkom nivou (**Slika 4.28**; **Slika 4.29**). Indukovana denervacija DA sistema, koja je osnov ovog modela, nije izazvala sinaptičku reorganizaciju, niti je uticala na broj PV+ interneurona u hipokampusu i RT jedru.

5.4.3 Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB

Ranu fazu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB karakterišu ozbiljni poremećaji spavanja: fragmentacija spavanja (**Slika 4.5**), povećanje NREM/REM teta relativne amplitude u motornoj kori i hipokampusu (**Slika 4.6**), pojava patoloških HVS vretena spavanja, kao i oštećenje prostorne memorije (**Slika 4.7**). Pored indukovane kombinovane neurodegeneracije, koja je u osnovi modela, moguće je da poremećaji hipokampalnog spavanja kao i povećanje teta relativne amplitude u hipokampusu dodatno doprinese oštećenju prostorne memorije. U osnovi ovih prodromalnih nemotoričkih poremećaja detektovana je pojačana ekscitacija kroz povećanu ekspresiju PSD-95 proteina u hipokampusu (**Slika 4.30**) i RT jedru (**Slika 4.30**). Ovakva sinaptička izmena koja je bila prisutna tokom čitavog perioda praćenja može predstavljati kompenzatorni mehanizam održavanja E/I balansa narušenog selektivnim kombinovanim gubitkom DA i ACh.

Tokom progresije ove neuropatologije (42 dana nakon lezija) oštećenju prostorne memorije se pridružuje i oštećenje neprostorne kratkotrajne i dugotrajne hipokampus-zavisne memorije (**Slika 4.22**), koje je bilo praćeno smanjenjem broja PV+ interneurona u hipokampusu (**Slika 4.24**; **Slika 4.30**). Daljom progresijom neuropatologije (52-100 dana nakon lezija) smanjenom broju PV+ interneurona u hipokampusu pridružuje se i smanjenje broja PV+ interneurona u RT jedru, praćeno povećanjem ekspresije MAP2 proteina u obe strukture (**Slika 4.30**; **Slika 4.31**). Dobijena dinamika sinaptičke reorganizacije u modelu hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB pokazuje da pojačana postsinaptička ekscitacija (povećanje ekspresije PSD-95 proteina) prethodi gubitku PV+ interneurona, a gubitak PV+ interneurona prethodi destabilizaciji i dendritskom remodelovanju (povećanje ekspresije MAP2 proteina), kako u hipokampusu tako i u RT jedru.

Eksperimentalni model hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB, koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, je od posebne važnosti za izučavanje mehanizama sinergističkog deficita DA i ACh sistema, što je komplementarno težim oblicima PB u ljudi. Različite studije su potvrdile sinergističku interakciju između ACh i DA sistema ukazujući da kombinovana disfunkcija oba neurotransmiterska sistema dovodi do kompleksnijih poremećaja na funkcionalnom i ćelijskom nivou (Krashia i sar., 2019; Melief i sar., 2015).

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji moguće je izvesti sledeće zaključke:

- ⊙ **U uslovima indukovane dopaminergičke i/ili holinergičke neurodegeneracije nije bilo motoričkog deficita ni u jednom eksperimentalnom modelu PB, ni na početku, ni tokom progresije neuropatologije.**
- ⊙ **Poremećaji spavanja kao rane nemotoričke manifestacije PB su potvrđeni u svim eksperimentalnim modelima na samom početku indukovane neurodegeneracije.**
 - ***Holinopatija PB*** – Ranu fazu indukovane holinergičke neurodegeneracije karakterišu poremećaji spavanja u vidu narušene EEG mikrostrukture (poremećena oscilatorna dinamika), bez promene u arhitekturi spavanja, ali uz pojavu patoloških HVS vretena, posebno tokom REM faze spavanja. Ova doktorska disertacija je po prvi put pokazala da je REM faza spavanja predisponirajuće stanje za pojavu hipokampalnih HVS vretena.
 - ***Hemiparkinsonizam i hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB*** – Ranu fazu indukovane dopaminergičke degeneracije, kao i udružene dopaminergičke i holinergičke degeneracije obeležili su daleko ozbiljni poremećaji spavanja u vidu fragmentacije spavanja ali bez promene u ukupnom trajanju faza spavanja, zatim generalizovani porast teta amplitude, kao i pojava NREM/REM HVS vretena.
 - Poremećaji spavanja u eksperimentalnim modelima PB ukazuju na disfunkciju neuronskih mreža zaduženih za regulaciju spavanja izazvanu slabljenjem dopaminergičke i/ili holinergičke inervacije.
 - Poremećaji dinamike vretena spavanja, a posebno pojava patoloških HVS vretena u uslovima indukovane neurodegeneracije ukazuju na oštećenja na nivou RT jedra, kao glavnog generatora ovog tipa oscilacija.
- ⊙ **Poremećaji memorijskih funkcija kao rane nemotoričke manifestacije PB su potvrđeni u eksperimentalnim modelima hemiparkinsonizma.**
 - ***Holinopatija PB*** – Oštećenja prostorne memorije i memorije prepoznavanja nisu prisutna u ranoj fazi indukovane holinergičke degeneracije, već se javljaju tokom progresije neuropatologije.
 - ***Hemiparkinsonizam*** – Memorija prepoznavanja je očuvana, za razliku od prostorne memorije koja je trajno oštećena od samog početka indukovane dopaminergičke degeneracije.
 - ***Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB*** – Prostorna memorija je trajno oštećena od samog početka indukovane udružene dopaminergičke i holinergičke degeneracije, dok se oštećenje memorije prepoznavanja javlja tokom progresije neuropatologije.
 - Dopaminergička degeneracija predstavlja značajan patofiziološki mehanizam koji primarno narušava funkcionalnost neuronskih mreža uključenih u obradu prostornih informacija što dovodi do dugotrajnog oštećenja prostorne memorije.

- Holinergička denervacija predstavlja značajan patofiziološki mehanizam koji odloženo narušava funkcionalnost neuronskih mreža zaduženih za obradu i integraciju perceptivnih, asocijativnih i kontekstualnih informacija, što dovodi do odloženog oštećenja memorije prepoznavanja u progresiji neuropatologije PB.
- ⊙ **Promena broja PV+ interneurona predstavlja sekundarnu posledicu neurodegenerativnih i funkcionalnih izmena u eksperimentalnim modelima PB koja se javlja tokom progresije neuropatologije.**
- **Holinopatija PB** – Indukovana holinergička denervacija dovodi do povećanja broja PV+ interneurona u hipokampusu tek tokom progresije neuropatologije.
 - **Hemiparkinsonizam** – Indukovana dopaminergička denervacija ne menja broj PV+ interneurona u hipokampusu i RT jedru, ni na početku neuropatologije, ni tokom njene progresije.
 - **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB** – Indukovana udružena dopaminergička i holinergička degeneracija dovodi do smanjenja broja PV+ interneurona i u hipokampusu i u RT jedru tek tokom progresije neuropatologije.
- ⊙ **Sinaptička reorganizacija predstavlja primarnu posledicu neurodegenerativnih i funkcionalnih izmena u eksperimentalnim modelima PB koja je prisutna na samom početku indukovane neurodegeneracije.**
- **Holinopatija PB** – Indukovana holinergička denervacija dovodi do rane sinaptičke reorganizacije koja se manifestuje dugotrajnom destabilizacijom sinapse (smanjena ekspresija MAP2 proteina) u hipokampusu i dugotrajno smanjenom ekscitacijom (smanjena ekspresija PSD-95 proteina) u RT jedru.
 - **Hemiparkinsonizam** – Indukovana dopaminergička denervacija ne dovodi do sinaptičke reorganizacije u hipokampusu i RT jedru, ni na početku neuropatologije, ni tokom njene progresije.
 - **Hemiparkinsonizam sa holinopatijom PB** – indukovana udružena dopaminergička i holinergička denervacija dovodi do rane sinaptičke reorganizacije koja se manifestuje dugotrajno pojačanom ekscitacijom (povećana ekspresija PSD-95 proteina) u hipokampusu i RT jedru kojoj se tokom dalje progresije neuropatologije pridružuje pojačana ekspresija MAP2 proteina u obe strukture.
 - Izolovani dopaminergički deficit nije dovoljan da izazove strukturne sinaptičke promene u hipokampusu i RT jedru.
 - Sinaptičke promene nastale na početku neuropatologije prisutne su tokom celog perioda praćenja i ukazuju na ranu reorganizaciju neuronskih mreža uključenih u regulaciju spavanja i memorijskih funkcija.
- ⊙ **Dinamika izmene ćelijske osnove i sinaptičke reorganizacije hipokampusu i RT jedra u različitim eksperimentalnim modelima PB tokom progresije neuropatologije pokazuje da sinaptičke promene predhode promenama na ćelijskom nivou.**

- Sinaptička reorganizacija predstavlja primarnu posledicu neurodegenerativnih i funkcionalnih izmena u eksperimentalnim modelima PB.
- Izmjena broja PV+ interneurona u eksperimentalnim modelima PB se javlja sekundarno, kao odgovor na sinaptičku reorganizaciju tokom dalje progresije neuropatologije.
- Početak i progresija različito indukovanih neuropatologija PB se mogu razlikovati na osnovu obrasca ćelijskih i sinaptičkih promena u hipokampusu i RT jedru.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da za razliku od sinaptičke reorganizacije koja ima značajnu patofiziološku ulogu tokom prodromalnih nemotoričkih poremećaja, GABA-ergički PV+ interneuroni imaju značajnu ulogu u progresiji bolesti u različitim eksperimentalnim modelima neuropatologije PB.

U eksperimentalnim uslovima dopaminergičke i/ili holinergičke neurodegeneracije indukovane toksinima sinaptička reorganizacija predstavlja primarnu posledicu različitih indukovanih neurodegenerativnih i posledičnih funkcionalnih izmena, dok se izmena broja PV+ interneurona javlja sekundarno tokom progresije neuropatologije, kao odgovor na ranu sinaptičku reorganizaciju neuronskih mreža uključenih u regulaciju spavanja i memorijskih funkcija.

Doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u proširivanju saznanja o izmenama GABA neurona i sinaptičke transmisije tokom prodromalnih nemotoričkih poremećaja u različitim eksperimentalnim modelima neuropatologije PB. Ova doktorska disertacija svojim multidisciplinarnim pristupom u izučavanju poremećaja spavanja i memorijskih funkcija u ranoj fazi bolesti, iako eksperimentalno indukovane naglo, što nije komplementarno nastanku bolesti u ljudi, dokazuje po prvi put značajne izmene u funkciji inhibitornih GABA-ergičkih PV+ interneurona kao i postsinaptičkih proteina, uz sagledavanje svih individualnih i udruženih doprinosa različitih neurotransmiterskih sistema važnih u patofiziologiji humane PB.

7 LITERATURA

- Aarsland, D., Batzu, L., Halliday, G.M. et al. (2021). Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 47.
- Aarsland, D., Creese, B., Politis, M. et al. (2017). Cognitive decline in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 13(4), 217–231.
- Abbott, R.D., Ross, G.W., White, L.R. et al. (2005). Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology*, 65(9) 1442–1446.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C. et al. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Science*, 113(21), 3737–3745.
- Adamczyk, M., Genzel, L., Dresler, M. et al. (2015), Automatic sleep spindle detection and genetic influence estimation using continuous wavelet transform. *Frontiers in Human Neuroscience*, 9, 624.
- Alharbi, B., Al-Kuraishy, H.M., Al-Gareeb, A.I et al. (2024) Role of GABA pathway in motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: a bidirectional circuit. *European Journal of Medical Research* 29(1), 205.
- Amaral, D.G. and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591.
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P. (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22.
- American Academy of Sleep Medicine. (2023). International classification of sleep disorders (3rd ed., text rev.; ICSD-3-TR). American Academy of Sleep Medicine.
- Anaya-Martínez, V., Martínez-Marcos, A., Martínez-Fong, D. et al. (2006). Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience*, 143(2), 477–486.
- Antunes, M. and Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Process*, 13(2), 93-110.
- Apaydin, H., Ahlskog, J.E., Parisi, J.E. et al. (2002). Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Archives of neurology*, 59(1), 102–112.
- Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E. et al. (2010). Dopaminergic reward system: A short integrative review. *International Archives of Medicine*, 3(1), 24.
- Aslan, F. S., Barut, B., Ozturk, S. et al. (2026). Neurotransmitter dysregulation in Parkinson's disease: Pathophysiological insights and therapeutic perspectives. *ACS Chemical Neuroscience*, 17(8), 1432–1461.

- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M. et al. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 103(1), 26–35.
- Austin, M., Rice, P., Mann, J. et al. (1995). Localization of corticotropin-releasing hormone in the human locus coeruleus and pedunculopontine tegmental nucleus: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience*, 64(3), 713–727.
- Avila, J., Correas, I., GarcõÂa de Ancos, J. et al. (1993). The microtubule cytoskeleton in neuronal development and degeneration. In: Cuello, A.C. (Ed.), *Neuronal Cell Death and Repair Elsevier*, 45–59.
- Ballinger, E.C., Ananth, M., Talmage, D.A. et al. (2016). Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline. *Neuron*, 91(6), 1199–1218.
- Beierlein, M. (2014). Synaptic mechanisms underlying cholinergic control of thalamic reticular nucleus neurons. *The Journal of Physiology*, 592(19), 4137–4145.
- Bellucci, A., Mercuri, N. B., Venneri, A. et al. (2016). Parkinson's disease: From synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(1), 77–94.
- Bezdicek, O., Ballarini, T., Buschke, H. et al. (2019). Memory impairment in Parkinson's disease: The retrieval versus associative deficit hypothesis revisited and reconciled. *Neuropsychology*, 33(3), 391–405.
- Björklund, A. and Dunnett, S.B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 194–202.
- Blandini, F., Armentero, M., T., Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & Related Disorders*, 14(2), 124–129.
- Blaszczyk, J.W. (2016). Parkinson's disease and neurodegeneration: GABA-collapse hypothesis. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 269.
- Blesa, J. and Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 155.
- Boeve, B.F., Silber, M.H., Saper, C.B. et al. (2007). Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain*, 130(11), 2770–2788.
- Boeve, B.F., Silber, M.H., Ferman, T.J. et al. (2013). Clinicopathologic correlations in 172 cases of rapid eye movement sleep behavior disorder with or without a coexisting neurologic disorder. *Sleep Medicine*, 14(8), 754–762.
- Bohnen, N. I. and Albin, R. L. (2011). The cholinergic system and Parkinson disease. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 564–573.

- Bohnen, N. I., Frey, K. A., Studenski, S. et al. (2013). Gait speed in Parkinson disease correlates with cholinergic degeneration. *Neurology*, 81(18), 1611–1616.
- Bohnen, N. I., Müller, M. L., Kotagal, V. et al. (2012). Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(8), 1609–1617.
- Bohnen, N.I., Yarnall, A.J., Weil, R.S. et al. (2022). Cholinergic system changes in Parkinson's disease: emerging therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*, 21(4), 381–392.
- Bolivar, V. J. (2009). Intrasession and intersession habituation in mice: From inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 206–214.
- Bonito-Oliva, A., Pignatelli, M., Spigolon, G. et al. (2014). Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. *Biological Psychiatry*, 75(9), 701–10.
- Bougea, A. (2024). Some novel therapies in Parkinson's disease: A promising path forward or not yet? A systematic review of the literature. *Biomedicines*, 12(3), 549.
- Bové, J and Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U. et al. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211.
- Brooks, P. L. and Peever, J. H. (2011). Impaired GABA and glycine transmission triggers cardinal features of rapid eye movement sleep behavior disorder in mice. *Journal of Neuroscience*, 31(19), 7111–7121.
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T. et al. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3), 1087–1187.
- Brück, A., Aalto, S., Nurmi, E. et al. (2005). Cortical 6-[18F]fluoro-L-dopa uptake and frontal cognitive functions in early Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 891–898.
- Brück, A., Kurki, T., Kaasinen, V. et al. (2004) Hippocampal and prefrontal atrophy in patients with early non-demented Parkinson's disease is related to cognitive impairment. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75(10), 1467–1469.
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325–340.
- Buzsáki, G. and Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130–138.
- Buzsáki, G., Smith, A., Berger, S. et al. (1990). Petit mal epilepsy and parkinsonian tremor: hypothesis of a common pacemaker. *Neuroscience*, 36(1), 1–14.

- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A. et al. (2014). Direct and indirect pathways of the basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030.
- Camina, E. and Güell, F. (2017). The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 438.
- Cannon, J. R. and Greenamyre, J. T. (2010). Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease: Recent advances. In J. D. Leenders (Ed.), *Progress in Brain Research*, 184, 17–33.
- Carvalho, M. M., Campos, F. L., Coimbra, B. et al. (2013). Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 14.
- Castelnovo, A., D'Agostino, A., Mayeli, A. et al. (2025). Sleep spindle abnormalities as neurophysiological biomarkers of schizophrenia spectrum disorders: From cellular mechanisms and neural circuits to clinical implications. *Biological Psychiatry*, 98(11), 809–818.
- Chambers, N.E., Lanza, K., Bishop, C. (2020). Pedunculopontine nucleus degeneration contributes to both motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1494.
- Chauhan, P, Jethwa, K, Rathawa, A. et al. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. In: Pluta R (ed.), *Cerebral Ischemia* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications, Chapter 2.
- Chen, P., Ban, W., Wang, W. et al. (2023). The Devastating Effects of Sleep Deprivation on Memory: Lessons from Rodent Models. *Clocks Sleep*, 5(2), 276-294.
- Cheng, H. C., Ulane, C. M., Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*, 67(6), 715–725.
- Chiaravalloti, N. D., Ibarretxe-Bilbao, N., DeLuca, J. et al. (2014). The source of the memory impairment in Parkinson's disease: Acquisition versus retrieval. *Movement Disorders*, 29(6), 765–771.
- Christensen, J. A. E., Nikolic, M., Warby, S. C. et al. (2015). Sleep spindle alterations in patients with Parkinson's disease. *Frontiers in Human Neuroscience*, 9, 233.
- Chung, D.W., Volk, D.W., Arion, D. et al. (2016). Dysregulated ErbB4 splicing in schizophrenia: selective effects on parvalbumin expression. *American Journal of Psychiatry*, 173(1), 60–68.
- Ciric, J., Kapor, S., Perovic, M. et al. (2019). Alterations of sleep and sleep oscillations in the hemiparkinsonian rat. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 148.
- Ciric, J., Lazic, K., Kapor, S. et al. (2018). Sleep disorder and altered locomotor activity as biomarkers of the Parkinson's disease cholinopathy in rat. *Behavioural Brain Research*, 339, 79–92.

- Ciric, J., Lazic, K., Petrovic, J. et al. (2016). Age-related disorders of sleep and motor control in the rat models of functionally distinct cholinergic neuropathology. *Behavioural Brain Research*, 301, 273–286.
- Ciric, J., Lazic, K., Petrovic, J. et al. (2017). Sleep spindles as an early biomarker of REM sleep disorder in a rat model of Parkinson's disease cholinopathy. *Translational Brain Rhythmicity*, 2, 1–11.
- Citri, A. and Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41.
- Clemente-Perez, A., Makinson, S. R., Higashikubo, B. et al. (2017). Distinct thalamic reticular cell types differentially modulate normal and pathological cortical rhythms. *Cell Reports*, 19(10), 2130–2142.
- Cohen, S. J. and Stackman, R. W. Jr. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285, 105–117.
- Coley, A.A. and Gao, W.J. (2018). PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 82, 187–194.
- Coley, A.A. and Gao, W.J. (2019). PSD-95 deficiency disrupts PFC-associated function and behavior during neurodevelopment. *Scientific Reports*, 9, 9486.
- Contreras-Murillo, G. and Magdaleno-Madrigal, V. M. (2020). The thalamic reticular nucleus: A common nucleus of neuropsychiatric diseases and deep brain stimulation. *Journal of Clinical Neuroscience*, 73, 1–7.
- Costa, A., Monaco, M., Zabberoni, S. et al. (2014). Memory in Parkinson's Disease Associated with Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS ONE*, 9, e86233.
- D'Onofrio, S., Kezunovic, N., Hyde, J.R. et al. (2015). Modulation of gamma oscillations in the pedunculopontine nucleus by neuronal calcium sensor protein-1: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of Neurophysiology*, 113(3), 709–719.
- D'Andrea, M.R., Ilyin, S., Plata-Salaman, C.R. (2001). Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. *Neuroscience Letters*, 306(3), 137–140.
- Das, T., Hwang, J.J., Poston, K.L. (2019). Episodic Recognition Memory and the Hippocampus in Parkinson's disease: A Review. *CORTEX*, 113, 191–209.
- Datta, S. and McLean, R. R. (2007). Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(6), 775–824.

- Dautan, D., Hacıoğlu Bay H., Bolam, P. et al. (2016). Extrinsic Sources of Cholinergic Innervation of the Striatal Complex: A Whole-Brain Mapping Analysis, *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 1.
- De Cock, V.C., Vidailhet, M., Leu, S. et al. (2007). Restoration of normal motor control in Parkinson's disease during REM sleep. *Brain*, 130(2), 450–456.
- De Gennaro, L. and Ferrara, M. (2003). Sleep spindles: An overview. *Sleep Medicine Reviews*, 7(5), 423–440.
- Decourt, M., Jiménez-Urbieta, H., Benoit-Marand, M. et al. (2021). Neuropsychiatric and cognitive deficits in Parkinson's disease and their modeling in rodents. *Biomedicines*, 9(6), 684.
- DeGiosio, R. A., Grubisha, M. J., MacDonald, M. L. et al. (2022). More than a marker: Potential pathogenic functions of MAP2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 974890.
- Dejean, C., Gross, C. E., Bioulac, B. et al. (2007). Synchronous highvoltage spindles in the cortex-basal ganglia network of awake and unrestrained rats. *European Journal of Neuroscience*, 25, 772–784.
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 214–221.
- Diaconu, Ș., Falup-Pecurariu, O., Țînt, D. et al. (2021). REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(2), 812.
- Dodet, P., Houot, M., Leu-Semenescu, S. et al. (2024). Sleep disorders in Parkinson's disease, an early and multiple problem. *NPJ Parkinson's Disease*, 10, 46.
- Dong-Chen, X., Yong, C., Yang, X. et al. (2023). Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 73.
- Dore, K., Carrico, Z., Alfonso, S. et al. (2021). PSD-95 protects synapses from β -amyloid. *Cell Reports*, 35(9), 109194.
- Drever, B. D., Riedel, G., Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 505–514.
- Dringenberg, H. C. and Olmstead, C. E. (2003). The cholinergic pedunclopontine tegmental nucleus: REM sleep, arousal, and sensory gating. *Sleep and Biological Rhythms*, 1(3), 193–209.
- Dubiela, F.P., Oliveira, M.G., Moreira, K.M. et al. (2005). Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [(3)H]muscimol and [(3)H]flunitrazepam binding. *Brain Research*, 1037(1), 157–163.

- Dudai, Y., Karni, A., Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20–32.
- Duty, S. and Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1357–1391.
- El-Gamal, M.I., Salama, M., Collins-Praino, L.E. et al. (2021). Neurotoxin-Induced rodent Models of Parkinson's Disease: benefits and drawbacks. *Neurotoxicity Research*, 39(3), 897–923.
- Ellenbogen, J. M., Hulbert, J. C., Stickgold, R. et al. (2006). Interfering with theories of sleep and memory: Sleep, declarative memory, and associative interference. *Current Biology*, 16(13), 1290–1294.
- Emre, M., Aarsland, D., Brown, R. et al. (2007). Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 22(12), 1689–1707.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 244–54.
- Ennaceur, A. and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- Fan, Y., Li, J. and Qiao, S. (2024). Sleep deprivation-induced memory impairment: Exploring potential interventions. *Frontiers in Psychiatry*, 15, 1470976.
- Fang, C., Lv, L., Mao, S. et al. (2020). Cognition Deficits in Parkinson's Disease: Mechanisms and Treatment. *Parkinson's Disease*, 2076942.
- Farmer, C. A., Chilakamarri, P., Thurm, A. E. et al. (2018). Spindle activity in young children with autism, developmental delay, or typical development. *Neurology*, 91(3), e112–e122.
- Fazl, A. and Fleisher, J. (2018). Anatomy, physiology, and clinical syndromes of the basal ganglia: A brief review. *Seminars in Pediatric Neurology*, 25(1), 2–9.
- Fernandez, L.M.J. and Lüthi, A. (2020). Sleep Spindles: Mechanisms and Functions. *Physiological Reviews*, 100(2), 805–868.
- Fernandez, L.M.J., Vantomme, G., Osorio-Forero, A. et al. (2018). Thalamic reticular control of local sleep in mouse sensory cortex. *eLife*, 7, e39111.
- Filice, F., Vörckel, K.J., Sungur, A.Ö. et al. (2016). Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Molecular Brain*, 10, 9.
- Filipovic, D., Zlatkovic, J., Gass, P. et al. (2013). The differential effects of acute vs. chronic stress and their combination on hippocampal parvalbumin and inducible heat shock protein 70 expression. *Neuroscience*, 236, 47–54.

- Fogel, S.M. and Smith, C.T. (2011). The function of the sleep spindle: a physiological index of intelligence and a mechanism for sleep-dependent memory consolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1154-1165.
- Frazer, M.A., Cabrera, Y., Guthrie, R.S. et al. (2021). Shining a Light on the Mechanisms of Sleep for Memory Consolidation. *Current Sleep Medicine Reports*, 7(4), 221–231.
- Galati, S., Salvade, A., Pace, M. et al. (2015). Evidence of an association between sleep and levodopa-induced dyskinesia in an animal model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1577–1589.
- García-Navarra, S., Llana, T., Méndez, M. (2025). Spatial memory deficits in Parkinson's disease: Neural mechanisms and assessment. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 14(3), 67–81.
- Ge, S., Yang, C., Li, M. et al. (2012). Dopamine depletion increases the power and coherence of high-voltage spindles in the globus pallidus and motor cortex of freely moving rats. *Brain Research*, 1465, 66–79.
- Geva-Sagiv M and Nir Y (2019) Local Sleep Oscillations: Implications for Memory Consolidation. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 813.
- Gilmour, T. P., Piallat, B., Lieu, C. et al. (2011). The effect of striatal dopaminergic grafts on the neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata and subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats. *Brain*, 134(11), 3276–3289.
- Goldman, J.G. and Litvan, I. (2011). Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Minerva Medica*, 102(6), 441–459.
- González-Redondo, R., García-García, D., Clavero, P. et al. (2014). Grey matter hypometabolism and atrophy in Parkinson's disease with cognitive impairment: A two-step process. *Brain*, 137(8), 2356–2367.
- Gottesmann C. GABA mechanisms and sleep. (2002). *Neuroscience*, 111(2), 231–239.
- Guatteo, E., Cucchiaroni, M. L., Mercuri, N. B. (2009). Substantia nigra control of basal ganglia nuclei. In G. Giovanni, V. Di Matteo, & E. Esposito (Eds.), *Birth, life and death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Springer Vienna*, (pp. 91–101).
- Gulcebi, M.I., Ketenci, S., Linke, R. et al. (2012). Topographical connections of the substantia nigra pars reticulata to higherorder thalamic nuclei in the rat. *Brain Research Bulletin*, 87(2-3), 312–318.
- Gulinello M., Mitchell H. A., Chang Q. et al. (2019). Rigor and reproducibility in rodent behavioral research. *Neurobiology of Learning and Memory*, 165, 106780.
- Gundersen, G.G. and Cook, T.A. (1999). Microtubules and signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1), 81–94.

- Hajj, R., Milet, A., Toulorge, D. et al. (2015). Combination of acamprosate and baclofen as a promising therapeutic approach for Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 5, 2015, 16084.
- Halliday, G.M., Leverenz, J.B., Schneider, J.S. et al. (2014). The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 29(5), 634–650.
- Hammond, R. S., Tull L. E., Stackman R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 36–34.
- Harding, A.J. and Halliday, G.M. (2001). Cortical Lewy body pathology in the diagnosis of dementia. *Acta Neuropathologica*, 102(4), 355–363.
- Hijazi, S., Heistek, T. S., Scheltens, P. et al. (2020). Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 25(12), 3380–3398.
- Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Duyckaerts, C. et al. (1987). Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5976–5980.
- Hodge, G.K. and Butcher, L.L. (1980). Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 313(1), 51-67.
- Högl, B., Stefani, A., Videnovic, A. (2018). Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration — an update. *Nature Reviews Neurology*, 14(1), 40–55.
- Hu, H., Gan, J., Jonas, P. (2014). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science*, 345(6197), 1255263.
- Hung, H.C. and Lee, E.H. (1998). MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1-2), 76–84.
- Inglis, W.L. and Semba, K. (1997). Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Research*, 755(1-2), 17–27.
- Iranzo, A., Molinuevo, J. L., Santamaria, J. et al. (2006). Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *The Lancet Neurology*, 5(7), 572–577.
- Janickova, H., Kljakic, O., Rosborough, K. at al. (2019). Selective decrease of cholinergic signaling from pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei has little impact on cognition but markedly increases susceptibility to stress. *The FASEB Journal*, 33(6), 7018–7036.

- Jonas, P. and Lisman, J. (2014). Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 107.
- Jones, B. E. (2020). Arousal and sleep circuits. *Neuropsychopharmacology*, 45(1), 6–20.
- Jourdain, A., Semba, K., Fibiger, H.C. (1989). Basal forebrain and mesopontine tegmental projections to the reticular thalamic nucleus: an axonal collateralization and immunohistochemical study in the rat. *Brain Research*, 505(1), 55–65.
- Ju, Y. E., Larson-Prior, L., Duntley, S. (2011). Changing demographics in REM sleep behavior disorder: possible effect of autoimmunity and antidepressants. *Sleep Medicine*, 12(3), 278–283.
- Kayahara, T. and Nakano, K. (1998). The Globus Pallidus Sends Axons to the Thalamic Reticular Nucleus Neurons Projecting to the Centromedian Nucleus of the Thalamus: A Light and Electron Microscope Study in the Cat. *Brain Research Bulletin*, 45(6), 623–630.
- Khan, M. S., Nasiripour, S., Bopassa, J. C. (2025). Parkinson disease signaling pathways, molecular mechanisms, and potential therapeutic strategies: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 6416.
- Klausberger, T. (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 30(5), 947–957.
- Klausberger, T. and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321(5885), 53–57.
- Krashia, P., Nobili, A., D'Amelio, M. (2019). Unifying hypothesis of dopamine neuron loss in neurodegenerative diseases: Focusing on Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 113.
- Kulkarni, A.S., Burns, M.R., Brundin, P. et al. (2022). Linking α -synuclein-induced synaptopathy and neural network dysfunction in early Parkinson's disease. *Brain Communications*, 4(4)fcac165.
- Kumaresan M. and Khan S. (2021). Spectrum of Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *The Cureus Journal of Medical Science*, 13(2), e13275.
- Lanciego, J. L., Luquin, N., Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621.
- Landisman C.E., Long M.A., Beierlein M. et al. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 1002–1009.
- Latreille, V., Carrier, J., Lafortune, M. et al. (2015). Sleep spindles in Parkinson's disease may predict the development of dementia. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 1083–1090.
- Lazic, K., Ciric, J., Saponjic, J. (2019). Sleep spindle dynamics during NREM and REM sleep following distinct general anaesthesia in control rats and in a rat model of Parkinson's disease cholinopathy. *Journal of Sleep Research*, 28, e12758.

- Leussis, M. P. and Bolivar, V. J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(7), 1045-64.
- Levy, A. M., Gomez-Puertas, P., Tümer, Z. (2022). Neurodevelopmental disorders associated with PSD-95 and its interaction partners. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4390.
- Lima, M. M. S. (2013). Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, 17(5), 367–375.
- Lima, M.M.S., Andersen, M.L., Reksidler, A.B. et al. (2007). The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats, *PLoS One*, 2, 6, e513.
- Litvan, I., Goldman, J.G., Tröster, A.I. et al. (2012). Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Movement Disorders*, 27(3), 349–356.
- Lozovaya, N., Eftekhari, S., Cloarec, R. et al. (2018). GABAergic inhibition in dual-transmission cholinergic and GABAergic striatal interneurons is abolished in Parkinson disease. *Nature Communications*, 9(1), 1422.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M. et al. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, 441(7093), 589–594.
- Lüthi A. (2014). Sleep Spindles: Where They Come From, What They Do. *The Neuroscientist*, 20(3), 243–256.
- Mahul-Mellier, A.L., Burtscher, J., Maharjan, N. et al. (2020). The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(9), 4971–4982.
- Maiti, P., Manna J., Dunbar G. L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational Neurodegeneration*, 6, 28.
- Mardones, M. D., Jorquera, P. V., Herrera-Soto, A. et al. (2019). PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 98, 117–123.
- Martín-Bastida, A., Delgado-Alvarado, M., Navalpotro-Gómez, I. et al. (2021). Imaging cognitive impairment and impulse control disorders in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 12, 733570.
- Martinez-Gonzalez, C., van Andel, J., Bolam, J. P. et al. (2014). Divergent motor projections from the pedunculopontine nucleus are differentially regulated in Parkinsonism. *Brain Structure and Function*, 219(4), 1415–1462.
- Mattila, P.M., Rinne, J.O., Helenius, H. et al. (2000). Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 100(3), 285–290.

- Mayeux, R. and Stern Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a006239.
- Mazher K.M. and Hassan R.M. (2020). Histological, histochemical, and immunohistochemical studies of hippocampus in male New Zealand rabbits. *The Anatomical Record*, 304(2), 393–399.
- McCarter, S.J., Tippmann-Peikert, M., Sandness, D.J. et al. (2015). Neuroimaging-evident lesional pathology associated with REM sleep behavior disorder. *Sleep Medicine*, 16(12), 1502–1510.
- McDowell, K A., Shin, D., Roos, K.P. et al. (2014). Sleep dysfunction and EEG alterations in mice overexpressing α -synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*, 4(4), 531–539.
- McDowell, K. and Chesselet, M. F. (2012). Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 46(3), 597–606.
- McGarrity, S., Mason, R., Fone, K. C. F. et al. (2017). Hippocampal neural disinhibition causes attentional and memory deficits. *Cerebral Cortex*, 27(9), 4447–4462.
- Medeiros, D.C., Lopes Aguiar, C., Moraes, M.F.D. et al. (2019). Sleep disorders in rodent models of Parkinson's Disease, *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1414.
- Medeiros, D.C., Plewnia, C., Mendes, R.V. et al. (2023). A mouse model of sleep disorders in Parkinson's disease showing distinct effects of dopamine D2-like receptor activation. *Progress in Neurobiology*, 231, 102536.
- Mehndiratta, M., Garg, R.K., Pandey, S. (2011). Nonmotor symptom complex of Parkinson's disease—an under-recognized entity. *Journal of the Association of Physicians of India*, 59, 302–308.
- Melief, E. J., Cudaback, E., Jorstad, N. L. et al. (2015). Partial depletion of striatal dopamine enhances penetrance of cognitive deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 35(33), 11911–11920.
- Melka, D., Tafesse, A., Bower, J.H. et al. (2019). Prevalence of sleep disorders in Parkinson's disease patients in two neurology referral hospitals in Ethiopia. *BMC Neurology*, 19(1), 205.
- Mena-Segovia, J. and Bolam, J.P. (2017). Rethinking the Pedunculopontine Nucleus: From Cellular Organization to Function. *Neuron*, 94(1), 7–18.
- Mena-Segovia, J., Bolam, J. P., Magill, P. J. (2004). Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends in Neurosciences*, 27(11), 585-588.
- Mena-Segovia, J., Sims, H. M., Magill, P. J. et al. (2008). Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *The Journal of Physiology*, 568(12), 2947–2960.
- Menza, M., Dobkin, R.D., Marin, H. et al. (2010). Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25, 117–122.

- Monje, M.H.G., Blesa, J., García-Cabezas, M.Á. et al. (2020). Changes in thalamic dopamine innervation in a progressive Parkinson's disease model in monkeys. *Movement Disorders*, 35(3), 419–430.
- Moore, R.Y. and Bloom, F.E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Review of Neuroscience*, 1, 129–169.
- Murueta-Goyena, A., Andikoetxea, A., Gomez-Esteban, J.C. et al. (2019). Contribution of the GABAergic system to non-motor manifestations in premotor and early stages of Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1294.
- Muslimovic, D., Post, B., Speelman, J. D. et al. (2005). Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*, 65(8), 1239–1245.
- Nahar, L., Delacroix, B.M., Nam, H.W. (2021). The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance and Neurological Disease. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 679960.
- Nash, J. E., Johnston, T. H., Collingridge et al. (2005). Subcellular redistribution of the synapse-associated proteins PSD-95 and SAP97 in animal models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *The FASEB Journal*, 19(6), 583–585.
- Neikrug, A.B., Maglione, J.E., Liu, L. et al. (2013). Effects of sleep disorders on the non-motor symptoms of Parkinson disease. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 9(11), 1119–1129.
- Nelson, L.E., Guo, T.Z., Lu, J. et al. (2002). The sedative component of anesthesia is mediated by GABA(A) receptors in an endogenous sleep pathway. *Nature Neuroscience*, 5(10), 979–984.
- Newman, E. L., Gupta, K., Climer, J. R. et al. (2012). Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 1–19.
- Nowacki, A., Galati, S., Ai-Schlaepfi, J. et al. (2019). Pedunculopontine nucleus: An integrative view with implications on Deep Brain Stimulation. *Neurobiology of Disease*, 128, 75–85.
- Nuñez, A. and Buño, W. (2021). The Theta Rhythm of the Hippocampus: From Neuronal and Circuit Mechanisms to Behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 649262.
- O’Gorman Tuura, R. L., Baumann, C. R., Baumann-Vogel, H. (2018). Beyond Dopamine: GABA, Glutamate, and the Axial Symptoms of Parkinson Disease. *Frontiers in Neurology*, 9, 806.
- Ochoa-de la Paz, L., Gullías-Cañizo, R., D’Abril Ruíz-Leyja, E. et al. (2021). *The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology. Revista Mexicana de Neurociencia*, 22(2), 67–75.
- Ognjanovski, N., Schaeffer, S., Wu, J. et al. (2017). Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation. *Nature Communications*, 8, 16120.

- Okada, K., Hashimoto, K., Kobayashi K. (2022). Cholinergic regulation of object recognition memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16:996089.
- Okano, H., Hirano, T., Balaban E. Learning and memory (2000). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12403–12404.
- Oliveira, L. M., Tuppy, M., Moreira, T. S. et al. (2017). Role of the locus coeruleus catecholaminergic neurons in the chemosensory control of breathing in a Parkinson's disease model. *Experimental Neurology*, 293, 172–180.
- Oliveira, P. de, Ramalho, S. H. R., Martins, B. et al. (2025). Is rapid eye movement sleep behavior disorder a marker of Parkinson's disease severity? *Parkinsonism & Related Disorders*, 131, 107258.
- Overdorp, E.J., Kessels, R.P., Claassen, J.A., et al. (2014). Cognitive impairments associated with medial temporal atrophy and white matter hyperintensities: an MRI study in memory clinic patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 98.
- Özbudak, P., Özaslan, A., Temel, E. Ü., et al. (2022). New electrographic marker? Evaluation of sleep spindles in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Clinical EEG and Neuroscience*. Advance online publication.
- Parkinson, J. (1817). *An essay on the sheking pulsy*. London: Whittingham and Rowland.
- Pasquini, J., Brooks, D.J., Pavese N. (2021). The cholinergic brain in Parkinson's disease. *Movement Disorders Clinical Practice*, 8(7), 1012–1026.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA; ISBN 9780080474120.
- Paxinos, G., Watson, C., Carrive, P. et al. (2009). *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain*, 2nd ed.; Academic Press: London, UK; ISBN 978-0123742377.
- Peever, J., Pierre-Herve, L., Montplaisir, J. (2014). Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder. *Trends in Neuroscience*, 37(5), 279–288.
- Pérez-Carbonell, L. and Iranzo, A. (2025). REM sleep and neurodegeneration. *Journal of Sleep Research*, 34(2), e14263.
- Perez-Lloret, S. and Barrantes, F. J. (2016). Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease, *NPJ Parkinson's Disease*, 2, 16001.
- Petrovic, J., Ciric, J., Lazic, K. et al. (2013a). Lesion of the pedunclopontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure. *Experimental Neurology*, 247, 562–571.

- Petrovic, J., Lazic, K., Ciric, J. et al. (2013b). Topography of the sleep/wake states related EEG microstructure and transitions structure differentiates the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat. *Behavioural Brain Research*, 256, 108-118.
- Petrovic, J., Lazic, K., Kalauzi, A. et al. (2014). REM sleep diversity following the pedunculopontine tegmental nucleus lesion in rat. *Behavioural Brain Research*, 271, 258-268.
- Petrovic, J., Radovanovic, L., Saponjic, J. (2021a). Diversity of simultaneous sleep in the motor cortex and hippocampus in rats. *Journal of Sleep Research*, 30, e13090.
- Petrovic, J., Radovanovic, L., Saponjic, J. (2021b). Prodromal local sleep disorders in a rat model of Parkinson's disease cholinopathy, hemiparkinsonism and hemiparkinsonism with cholinopathy. *Behavioural Brain Research*, 397, 112957.
- Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116–129.
- Pienaar, I. S. and Van de Berg, W. (2013). A non-cholinergic neuronal loss in the pedunculopontine nucleus of toxin-evoked Parkinsonian rats. *Experimental Neurology*, 248, 213–223.
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Research Reviews*, 46(1), 1–31.
- Pinault, D. and Deschênes, M. (1992). Control of 40-Hz firing of reticular thalamic cells by neurotransmitters. *Neuroscience*, 51(2), 259–268.
- Poewe, W. (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 15, 14–20
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M. et al. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013.
- Porras, G., Berthet, A., Dehay, B. et al. (2012). PSD-95 expression controls L-DOPA dyskinesia through dopamine D1 receptor trafficking. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3977–3989.
- Postuma, R.B. and Berg, D. (2019). Prodromal Parkinson's disease: The decade past, the decade to come. *Journal of Movement Disorders*, 34(5), 665–675.
- Pratt, J.A. and Morris, B.J. (2015). The thalamic reticular nucleus: A functional hub for thalamocortical network dysfunction in schizophrenia and a target for drug discovery. *Journal of Psychopharmacology*, 29(2), 127–137.
- Radek, R. J., Curzon, P., Decker, M. W. (1994). Characterization of high voltage spindles and spatial memory in young, mature and aged rats. *Brain Research Bulletin*, 33(2), 183–188.

- Radovanovic, L., Novakovic, A., Petrovic, J. et al. (2023b) Different alterations of hippocampal and reticulo-thalamic GABAergic parvalbumin-expressing interneurons underlie different states of unconsciousness. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (7), 6769.
- Radovanovic, L., Petrovic, J., Saponjic, J. (2021). Hippocampal and Reticulo-Thalamic Parvalbumin Interneurons and Synaptic ReOrganization during Sleep Disorders in the Rat Models of Parkinson's Disease Neuropathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8922.
- Radovanovic, L., Saponjic J., Petrovic J. (2023a) GABAergic parvalbumin-expressing interneurons play a role in memory impairment in rat models of Parkinson's disease [abstract]. 8th Congress of Serbian Neuroscience Society, Belgrade, Serbia, May 31-June 2, 2023. p. 49.
- Radovanovic, L., Saponjic, J., Petrovic, J. (2026). Alteration of hippocampal parvalbumin interneurons underlies memory impairment in different rat models of Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 19, 1749815.
- Rajkovic, N., Ciric, J., Milosevic, N. et al. (2019). Novel application of the gray-level.co-occurrence matrix analysis in the parvalbumin stained hippocampal gyrus dentatus in distinct rat models of Parkinson's disease. *Computers in Biology and Medicine*, 115, 103482.
- Raslau, F.D., Mark, I.T., Klein, A.P. et al. (2015). Memory part 2: the role of the medial temporal lobe. *American Journal of Neuroradiology*, 36(5), 846-849.
- Rinne, J.O., Ma, S.Y., Lee, M. S. et al. (2008). Loss of cholinergic neurons in the pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. *Parkinsonism & Related Disorders*, 14(6), 553–557.
- Rodríguez Díaz, M., Abdala, P., Barroso-Chinea, P. et al. (2001). Motor behavioural change after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 122(1), 79–92.
- Rodriguez, J. J., Montaron, M.F., Aurousseau, C. et al. (1999). Effects of amphetamine and cocaine treatment on c-Fos, Jun-B, and Krox-24 expression in rats with intrastriatal dopaminergic grafts. *Experimental Neurology*, 159(1), 139–152.
- Ruden, J.B., Dugan, L.L., Konradi, C. (2021) Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders. *Neuropsychopharmacology*, 46(2), 279–287.
- Ruiz-Herrera, N., Cellini, N., Prehn-Kristensen, A. et al. (2021). Characteristics of sleep spindles in school-aged children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Research in Developmental Disabilities*, 112, 103896.
- Rye, D. B. (1997). Contributions of the pedunclopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep*, 20(9), 757–788.
- Salamone, J.D. and Correa, M. (2012). The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*, 76(3), 470–485.

- Sales-Carbonell, C., Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gomez, E. et al. (2013). GABAergic and cortical glutamatergic neurons mediate contrasting effects of cannabionids on cortical network synchrony. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 719–724.
- Sánchez, C., Díaz-Nido, J., Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, 61(2), 133–168.
- Sanjari Moghaddam, H., Zare-Shahabadi, A., Rahmani, F. et al. (2017). Neurotransmission systems in Parkinson's disease. *Review in the Neurosciences*, 28(5), 509–536.
- Saper C.B. and Fuller P.M. (2017). Wake-sleep circuitry: an overview. *Current Opinion in Neurobiology*, 44, 186–192.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P. et al. (2010). The neuronal control of sleep and wakefulness. *Neuron*, 68(4), 1023–1042.
- Saponjic, J., Mejías, R., Nikolovski, N. et al. (2024). Experimental models to study immune dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4330.
- Saponjic, J., Petrovic, J., Ciric, J., et al. (2016). Disorders of sleep and motor control during the impaired cholinergic innervation in rat—Relevance to Parkinson's disease. In *Challenges in Parkinson's Disease*; Dorszewska, J., Kozubski, W., Eds.; InTech Rijeka: Rijeka, Croatia, pp. 135–153.
- Saponjic, J., Radulovacki, M., Carley, D.W. (2007). Monoaminergic system lesions increase post-sigh respiratory pattern disturbance during sleep in rats. *Physiology and Behavior*, 90(1), 1-10.
- Sarter, M., Parikh, V., Howe, W.M. (2009). Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 383–390.
- Schapira, A.H. (2000). Sleep attacks (sleep episodes) with pergolide. *The Lancet*, 355(9215), 1332–1333.
- Schapira, A.H.V., Chaudhuri, K.R., Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease, *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 435–450.
- Schenck, C. H. (2023). Update on Rapid-Eye-Movement Sleep Behavior Disorder (RBD): Focus on Its Strong Association with α -Synucleinopathies. *Clinical and Translational Neuroscience*, 7(3), 19.
- Schenck, C. H., Bundlie, S. R., Ettinger, M. G. et al. (1986). Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep*, 9(2), 293–308.
- Schwartz, R.K. and Huston, J.P. (1996). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in Neurobiology*, 49(3), 215-66.

- Semba, K. and Fibiger, H.C. (1989). Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 323(3), 387–410.
- Semba, K. and Fibiger, H.C. (1992). Organization of central cholinergic systems. *Progress in Brain Research*, 79, 37–63.
- Sheng, M. and Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678.
- Shin, R.W., Iwaki, T., Kitamoto, T. et al. (1991). Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Laboratory Investigation*, 64(5), 693–702.
- Siegel, J.M. (2008). Do all animals sleep? *Trends in Neuroscience*, 31(4), 208–213.
- Silva, R. H., Pedro, L. C., Manosso, L. M. et al. (2024). Pre- and post-synaptic protein in major depressive disorder: From neurobiology to therapeutic targets. *Neuroscience*, 556, 14–24.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O. et al. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698–702.
- Solari, N., Bonito-Oliva, A., Fisone G. et al. (2013). Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. *Learning & Memory*, 20(11), 592–600.
- Sonne, J., Reddy, V., Beato, M.R. (2024). Neuroanatomy, Substantia Nigra. [Updated: 2022, Oct 24]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL).
- Spann, B.M. and Grofova, I. (1989). Origin of ascending and spinal pathways from the nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 283(1), 13–27.
- Speranza, L., Miniaci, M.C., Volpicelli, F. (2025). The Role of Dopamine in Neurological, Psychiatric, and Metabolic Disorders and Cancer: A Complex Web of Interactions. *Biomedicine* 13(2), 492.
- Squire, L. R., Wixted, J. T., Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 872–883.
- Standaert, D., Saper, C., Rye, D. et al. (1986). Colocalization of atriopeptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase- and substance—P-like immunoreactivity in the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. *Neuroscience*, 382, 163–168.
- Stefani, A. and Högl, B. (2020). Sleep in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, 45(1), 121–128.
- Stefani, A. and Högl, B. (2021). Sleep Disorders in Parkinson Disease. *Sleep Medicine Clinics*, 16(2), 323–334.

- Steriade, M., McCormick, D.A., Sejnowski, T.J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, 262(5134), 679–685.
- Stokes, A.H., Hastings T.G., Vrana, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Journal of Neuroscience Research*, 55(6), 659–665.
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S. et al. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669.
- Sullivan, D., Mizuseki, K., Sorgi, A. et al. (2014). Comparison of sleep spindles and theta oscillations in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 34(2), 662–674.
- Takata, N. (2020). Thalamic reticular nucleus in the thalamocortical loop. *Neuroscience Research*, 156, 32–40.
- Tang, X., Yang, L., Sanford, L.D. (2007). Sleep and EEG spectra in rats recorded via telemetry during surgical recovery. *Sleep*, 30(8), 1057-1061.
- Targa, A.D.S., Rodrigues, L.S., Nosedá, A.C.D. (2016). Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease, *Neuropharmacology*, 108, 161–171.
- Tysnes, O.B. and Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna)* 124(8), 901–905.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(2), 107–110.
- Urakami, Y. (2012). Relationship between sleep spindles and sleep disorders. *Brain and Development*, 34(8), 639–643.
- Vantomme G., Osorio-Forero A., Lüthi A. et al. (2019). Regulation of Local Sleep by the Thalamic Reticular Nucleus. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 576.
- Vantomme, G. (2020). The thalamic reticular nucleus: A multifaceted guardian. Doctoral dissertation, Faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de Lausanne.
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B. et al. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, 149(3), 708–721.
- Vetrugno, R., Provini, F., Cortelli, P. et al. (2004). Sleep disorders in multiple system atrophy: a correlative video-polysomnographic study. *Sleep Medicine*, 5(1), 21–30.
- Vincent, S. R., Satoh, K., Armstrong, D. M. et al. (1983). NADPHdiaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neuroscience Letters*, 143 (1-2), 31-36.

- Vivekananda, U., Bush, D., Bisby, J. A. et al. (2021). Theta power and theta-gamma coupling support long-term spatial memory retrieval. *Hippocampus*, 31(2), 213–220.
- Warby, S. C., Wendt, S. L., Welinder, P. et al. (2014). Sleep-spindle detection: Crowdsourcing and evaluating performance of experts, non-experts and automated methods. *Nature Methods*, 11(4), 385–392.
- Watson, G.S. and Leverenz, J.B. (2010). Profile of Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Brain Pathology*, 20(3), 640–645.
- Weng, Y. Y., Lei, X., Yu, J. (2020). Sleep spindle abnormalities related to Alzheimer's disease: A systematic mini-review. *Sleep Medicine*, 75, 37–44.
- Wiesman, A. I., da Silva Castanheira, J., Fon, E. A. et al. PREVENT-AD Research Group, & Quebec Parkinson Network (2024). Alterations of cortical structure and neurophysiology in Parkinson's disease are aligned with neurochemical systems. *Annals of Neurology*, 95(4), 802–816.
- Witter, M. P. and Amaral, D. G. (2004). The hippocampal region. In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (3rd ed., pp. 637–703). Elsevier Academic Press.
- Wong, J.C., Li, Y., Schwarzschild, M.A. et al. (2014). Restless legs syndrome: an early clinical feature of Parkinson disease in men. *Sleep*, 37(2), 369–372.
- Xi, Z. and Luning, W. (2009). REM sleep behavior disorder in a patient with pontine stroke. *Sleep Medicine*, 10(2), 143–146.
- Yi, F., Ball, J., Stoll, K.E. et al. (2014). Direct excitation of parvalbumin-positive interneurons by M1 muscarinic acetylcholine receptors: roles in cellular excitability, inhibitory transmission and cognition. *The Journal of Physiology*, 592(16), 3463–3494.
- Zare Khormizi, H., Salehinejad, M. A., Nitsche, M. A. et al. (2019). Sleep deprivation and autobiographical memory: Evidence from sleep-deprived nurses. *Journal of Sleep Research*, 28(1), e12683.
- Zhang, J. and Dong, X.P. (2012). Dysfunction of microtubule-associated proteins of MAP2/tau family in Prion disease. *Prion Diseases*, 6(4), 334–338.
- Zhang, Q., Aldridge, G. M., Narayanan, N. S. et al. (2020). Approach to cognitive impairment in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 17(4), 1495–1510
- Zhang, W., Xiong, B.-R., Zhang, L.-Q. et al. (2021). The role of the GABAergic system in diseases of the central nervous system. *Neuroscience*, 470, 88–99.
- Zhong, R., Gan, C., Sun, H. et al. (2024). Sleep disturbances, cognitive decline, and AD biomarkers alterations in early Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1180876.

Zhou Z., Kerk, S., Meng, L.T. (2008). Endogenous dopamine (DA) renders dopaminergic cells vulnerable to challenge of proteasome inhibitor MG132. *Free Radical Research*, 42(5), 456–466.

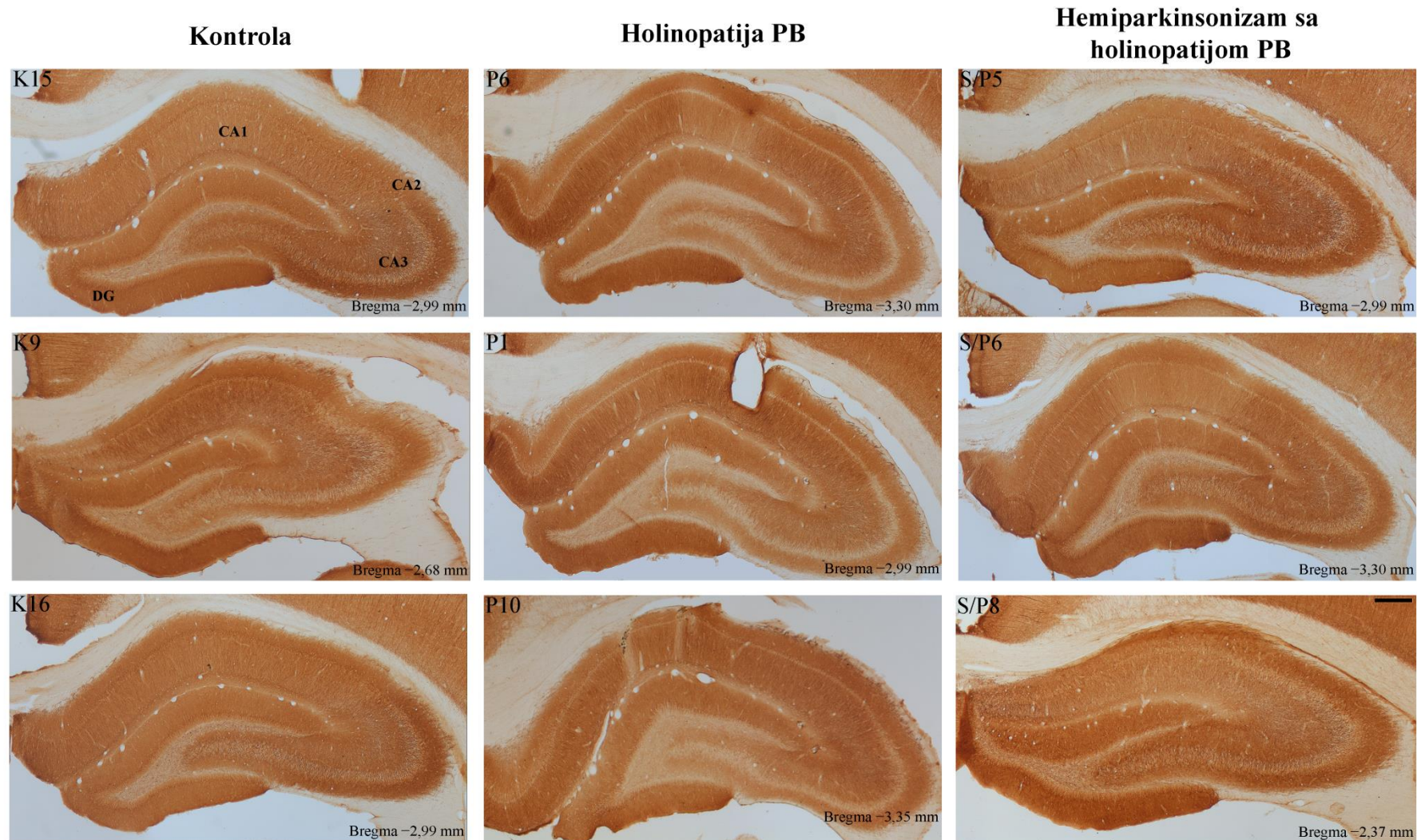
Zhou, Z.D. and Lim, T.M. (2009). Dopamine (DA) induced irreversible proteasome inhibition via DA derived quinones. *Free Radical Research*, 43(4), 417–430.

Zhou, Z.D., Yi, L.X., Wang, D.Q. et al. (2023). Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*, 12(1), 44.

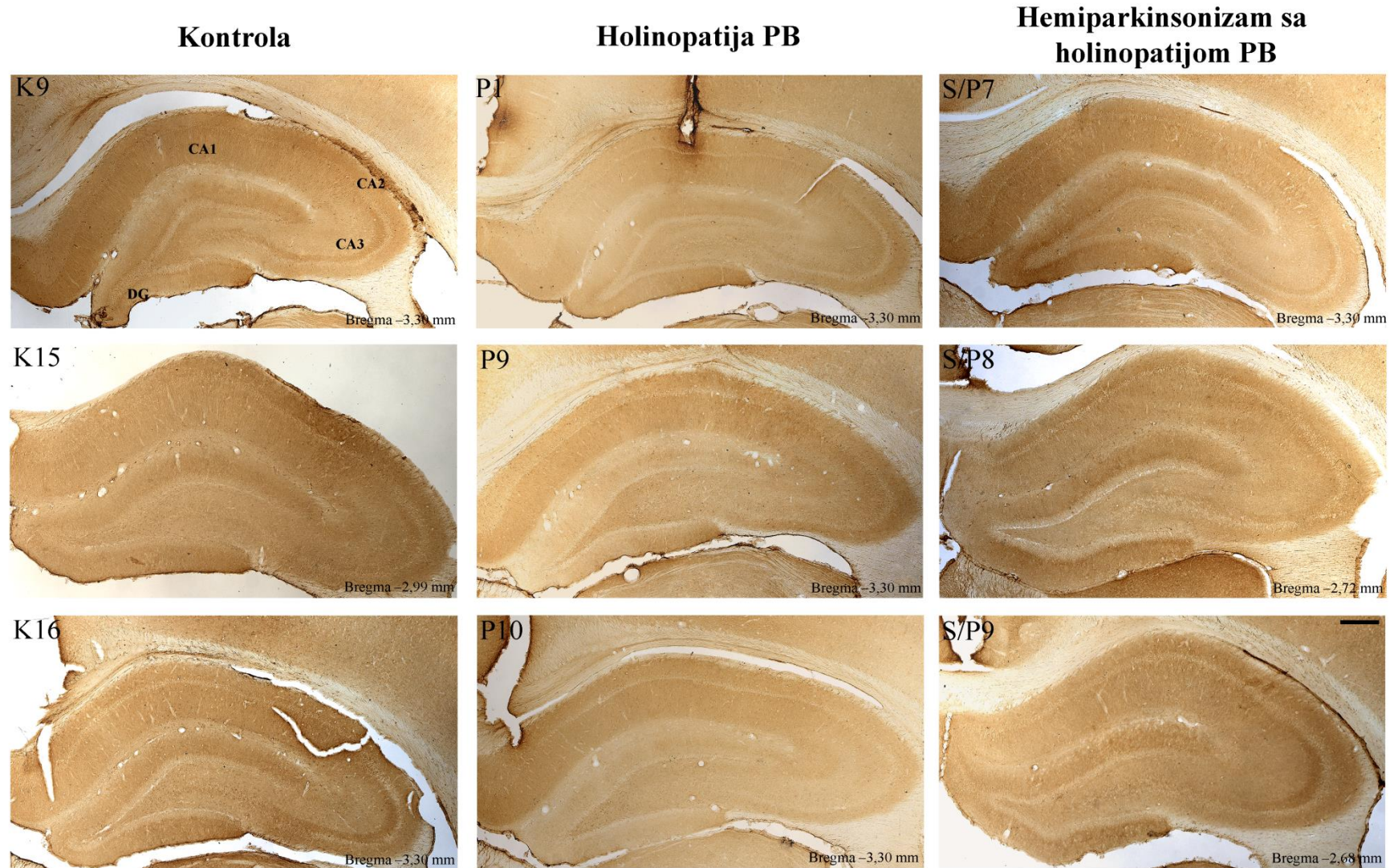
8 PRILOZI

8.1 PRILOG A

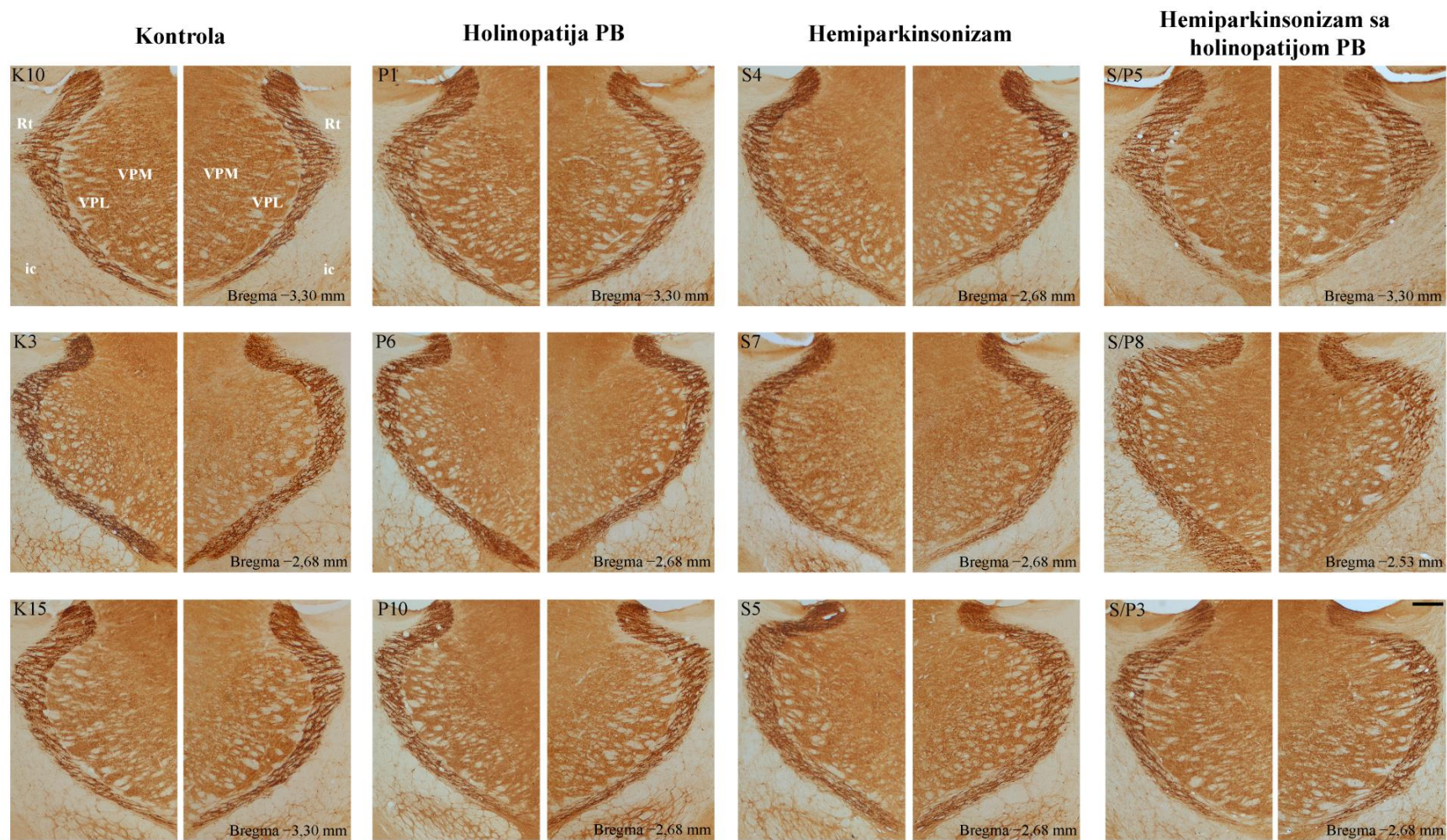
Slike koje su korišćene kao dopuna prikazu Rezultata doktorske disertacije.



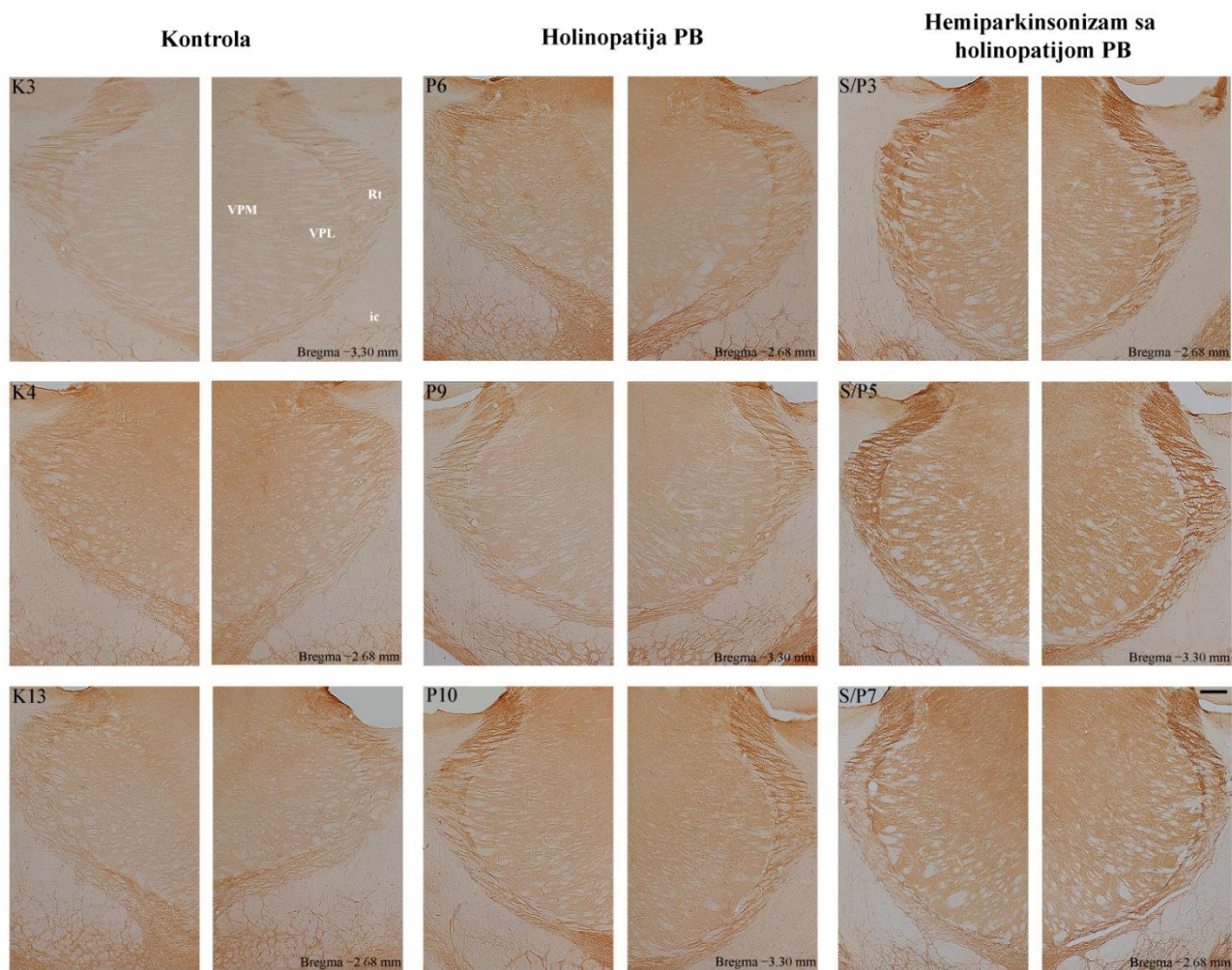
Prilog 1. Ekspresija postsinaptičkog proteina MAP2 u hipokampusu u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije MAP2 proteina u hipokampusu kontrolnih pacova (K15, K9, K16) i u modelima holinopatije PB (P6, P1, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P5, S/P6, S/P8). **DG** – *gyrus dentatus*; **CA** – *cornu Ammonis*; Skala 400 μ m.



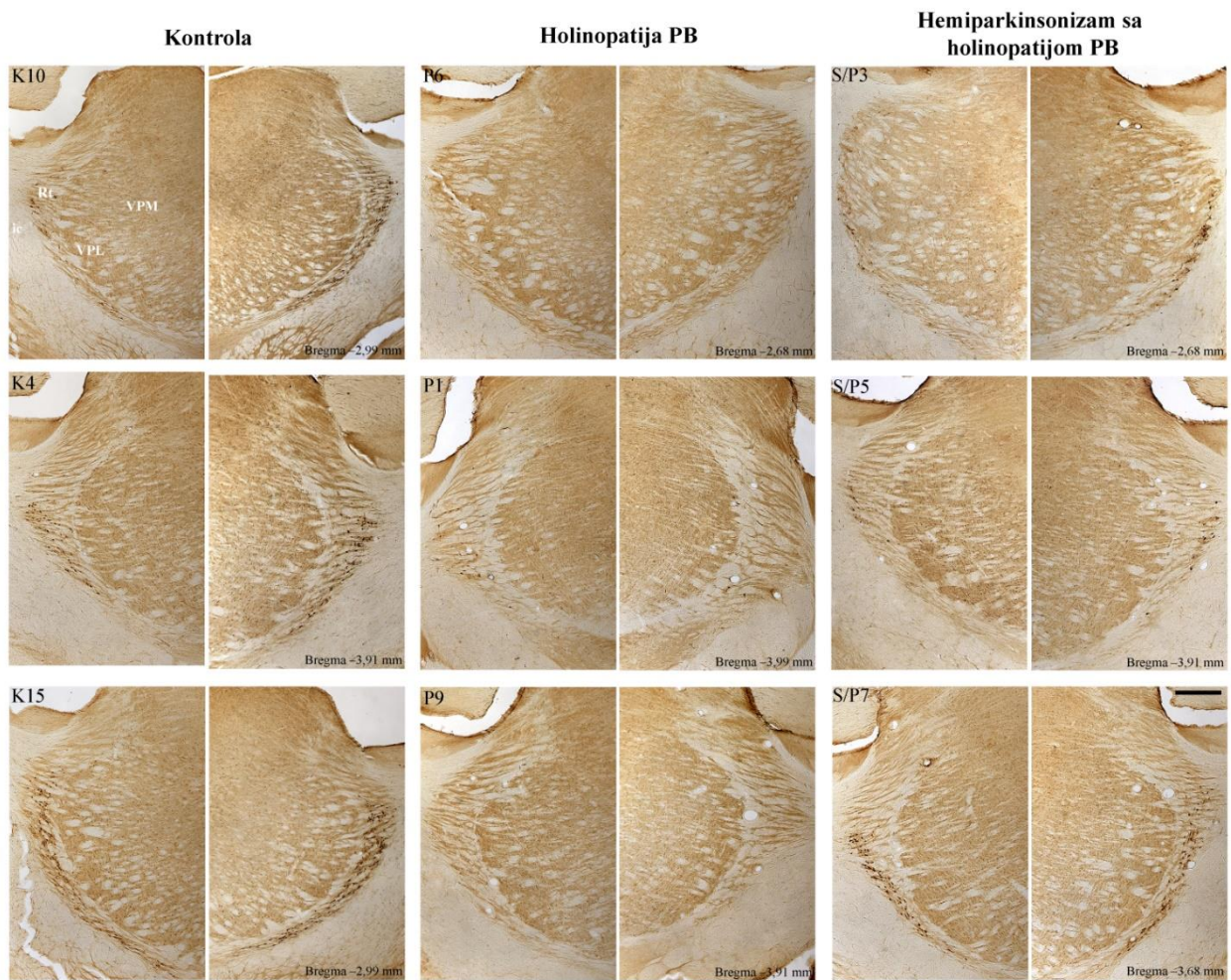
Prilog 2. Ekspresija postsinaptičkog proteina PSD-95 u hipokampusu u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije PSD-95 proteina u hipokampusu kontrolnih pacova (K9, K15, K16) i u modelima holinopatije PB (P1, P9, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P7, S/P8, S/P9). **DG** – *gyrus dentatus*; **CA** – *cornu Ammonis*; Skala 400 μ m.



Prilog 3. Imunohistohemijska identifikacija PV+ interneurona RT jedra u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri PV+ interneurona u RT jedru kontrolnih pacova (K10, K3, K15) i u modelima holinopatije PB (P1, P6, P10), hemiparkinsonizma (S4, S7, S5) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P5, S/P8, S/P3). **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*; **ic** – *capsula interna*. Skala 200 μ m.



Prilog 4. Ekspresija postsinaptičkog proteina MAP2 u RT jedru u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije MAP2 proteina u RT jedru kontrolnih pacova (K3, K4, K13) i u modelu holinopatije PB (P6, P9, P10) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P3, S/P5, S/P7). **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*; **ic** – *capsula interna*. Skala 200 μ m.



Prilog 5. Ekspresija postsinaptičkog proteina PSD-95 u RT jedru u različitim eksperimentalnim modelima PB. Primeri ekspresije PSD-95 proteina u RT jedru kontrolnih pacova (K10, K4, K15) i u modelu holinopatije PB (P6, P1, P9) i hemiparkinsonizma sa holinopatijom PB (S/P3, S/P5, S/P7). **Rt** – *nucleus reticularis thalami*; **VPM** – *nucleus ventralis posteromedialis thalami*; **VPL** – *nucleus ventralis posterolateralis thalami*; **ic** – *capsula interna*. Skala 200 μm .

8.2 PRILOG B

Dozvole izdavača za korišćenje i modifikaciju slika koje su zaštićene autorskim pravom u Uvodu doktorske disertacije.



This is a License Agreement between Ljiljana Radovanovic ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	10-Apr-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1717477-1	Publisher Portion	Nature Research Image/photo/illustration
ISSN	2056-676X		

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nature Reviews Disease Primers	Publication Type	e-Journal
Article Title	Parkinson disease.	Start Page	17013
Date	01/01/2015	Issue	1
Language	English	Volume	3
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	URL	http://www.nature.com/nrpd
Rightsholder	Springer Nature BV		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	1	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Enter Languages	serbian
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Copies for the Disabled?	No
Duration of Use	Life of current edition	Minor Editing Privileges?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Incidental Promotional Use?	No
Rights Requested	Main product	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	The role of parvalbumin-expressing interneurons and synaptic reorganization in the hippocampus and reticulo-thalamic nucleus in experimental models of Parkinson's disease	Institution Name	Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia University of Belgrade
Instructor Name	Jelena Petrovic	Expected Presentation Date	2026-09-30

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License Ljiljana Radovanovic

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Figure 5	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Parkinson disease.
Editor of Portion(s)	Poewe, Werner; Seppi, Klaus; Tanner, Caroline M.; Halliday, Glenda M.; Brundin, Patrik; Volkmann, Jens; Schrag, Anette-Eleonore; Lang, Anthony E.	Author of Portion(s)	Poewe, Werner; Seppi, Klaus; Tanner, Caroline M.; Halliday, Glenda M.; Brundin, Patrik; Volkmann, Jens; Schrag, Anette-Eleonore; Lang, Anthony E.
Volume / Edition	3	Publication Date of Portion	2017-12-21
Page or Page Range of Portion	17013		

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions (“General Terms”), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User’s use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. (“CCC”) on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC’s applicable Marketplace transactional licensing services (each, a “Service”).

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

“License” is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

“Order Confirmation” is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. “Order Confirmation Terms” are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

“Rightsholder(s)” are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

“Terms” means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

“User” or “you” is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User’s behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

“Work(s)” are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC’s Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User’s use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total

amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) **Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way

modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) **Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content**, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such "clipping" or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- o a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- o a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- o a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- o a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) ***Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery).*** The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;

iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;

iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;

v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) **Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet).** For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.

ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or "clipping" does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022



This is a License Agreement between Ljiljana Radovanovic ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	06-Apr-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1716625-1	Publisher	AMERICAN SOCIETY OF NEURORADIOLOGY
ISSN	1936-959X	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	American journal of neuroradiology : AJNR	Publication Type	e-Journal
Article Title	Memory part 2: the role of the medial temporal lobe.	Start Page	846
Author / Editor	American Society of Neuroradiology.	End Page	849
Date	01/01/1980	Issue	5
Language	English	Volume	36
Country	United States of America	URL	http://www.ajnr.org
Rightsholder	American Society of Neuroradiology		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	1	Translation	Original language plus one translation
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	The role of parvalbumin-expressing interneurons and synaptic reorganization in the hippocampus and reticulo-thalamic nucleus in experimental models of Parkinson's disease	Institution Name	Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade
Instructor Name	Ljiljana Radovanovic	Expected Presentation Date	2026-06-30

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Ljiljana Radovanovic
-------------------------------	-----	--	----------------------

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Figure 1	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Memory part 2: the role of the medial temporal lobe.
Editor of Portion(s)	Raslau, F D; Mark, I T; Klein, A P; Ulmer, J L; Mathews, V; Mark, L P	Author of Portion(s)	Raslau, F D; Mark, I T; Klein, A P; Ulmer, J L; Mathews, V; Mark, L P
Volume / Edition	36	Issue, if Republishing an Article From a Serial	5
Page or Page Range of Portion	846-849	Publication Date of Portion	2015-05-01

SPECIAL RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

You will need to acknowledge this adaptation: Adapted with permission from Purves D, Brannon E, Cabeza R, et al. Principles of Cognitive Neuroscience. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2008.

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

“User” or “you” is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User’s behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

“Work(s)” are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC’s Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User’s use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties’ rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: “Used with permission of [Rightsholder’s name], from [Work’s title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.” Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in

loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) **Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) **Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content**, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such "clipping" or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless

expressly set forth in the relevant Order Confirmation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User

shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) *Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery)*. The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

- i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;
- ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;
- iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;
- iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;
- v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) *Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet)*. For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

- i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.
- ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or "clipping" does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern

or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022



This is a License Agreement between Ljiljana Radovanovic ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	06-Apr-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1716501-1	Publisher	Elsevier Science
ISBN-13	9780120884728	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	The The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set	Country	United States of America
Author / Editor	Paxinos, George, Watson, Charles	Rightsholder	Elsevier Science & Technology Journals
Date	01/01/2005	Publication Type	Book
Language	English		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	1	Translation	Original language plus one translation
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	The role of parvalbumin-expressing interneurons and synaptic reorganization in the hippocampus and reticulo-thalamic nucleus in experimental models of Parkinson's disease	Institution Name	Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade
Instructor Name	Ljiljana Radovanovic	Expected Presentation Date	2026-06-30

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Ljiljana Radovanovic
------------------------	-----	---	----------------------

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	The rat brain in stereotaxic coordinates	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Coronal section at bregma -3.60 mm
Editor of Portion(s)	Paxinos, George; Watson, Charles	Author of Portion(s)	Paxinos, George; Watson, Charles
Volume / Edition	5	Issue, if Republishing an Article From a Serial	N/A
Page or Page Range of Portion	plate corresponding to bregma -3.60 mm	Publication Date of Portion	2005-01-01

RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals, for which an author selects a user license permitting certain types of reuse without permission. Before proceeding please check if the article is Open Access on <http://www.sciencedirect.com> and refer to the user license for the individual article. Any reuse not included in the user license terms will require permission. You must always fully and appropriately credit the author and source. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in the Elsevier publication for which you are seeking permission, with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder. Please contact permissions@elsevier.com with any queries.

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work

which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) **Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as

to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) **Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content**, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such "clipping" or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

- A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;
- B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;
- C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;
- D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;
- E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;
- F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:
 - o a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
 - o a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
 - o a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
 - o a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.
- G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) *Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery)*. The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

- i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;
- ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;
- iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;
- iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;
- v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) *Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet)*. For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

- i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.
- ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or "clipping" does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

- a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.
- b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.
- c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court

4/8/26, 10:27 AM marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/2eadac5e-a235-4f15-8cdc-44a56e00d0d9/fb883186-1829-46c1-a189-38d015998...

whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 06, 2026

This Agreement between Ljiljana Radovanovic ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	6242971501892
License date	Apr 06, 2026
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Neurobiology of Disease
Licensed Content Title	Pedunculopontine nucleus: An integrative view with implications on Deep Brain Stimulation
Licensed Content Author	Andreas Nowacki,Salvatore Galati,Janine Ai-Schlaepi,Claudio Bassetti,Alain Kaelin,Claudio Pollo
Licensed Content Date	Aug 1, 2019
Licensed Content Volume	128
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	11
Start Page	75
End Page	85

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title of new work	The role of parvalbumin-expressing interneurons and synaptic reorganization in the hippocampus and reticulo-thalamic nucleus in experimental models of Parkinson's disease
Institution name	Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade
Expected presentation date	Jun 2026
Portions	Figure 2.
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Ljiljana Radovanovic
Specific Languages	serbian
Requestor Location	Ljiljana Radovanović Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, 11108
Serbia

Order reference number 1

Publisher Tax ID GB 494 6272 12

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit

distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.11

Questions? customercare@copyright.com.

Biografija autora

Ljiljana (Obrad) Radovanović (devojačko Arsenijević) rođena je 26.11.1993. godine u Užicu. Osnovne akademske studije biologije, modul Molekularna biologija i fiziologija, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine, a diplomirala 18.09.2017. godine i stekla zvanje diplomirani biolog. Master akademske studije na istom fakultetu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, smer Neurobiologija, završila je 28.09.2018. godine i stekla zvanje master biolog, odbranivši master rad pod naslovom „*Efekat agmantina na oksido-redukциони status plazme pacova nakon moždane ishemije*“ sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija, podmodul Neurofiziologija: od ćelije do ponašanja, upisala je školske 2018/2019. godine. Od juna 2019. godine zaposlena je na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu kao istraživač pripravnik, gde je u okviru projekta osnovnih istraživanja OI173022 „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja“ (rukovodilac dr Jasna Šaponjić) započela eksperimentalni deo doktorske disertacije. U zvanje istraživač saradnik izabrana je februara 2022.

Ljiljana Radovanović je autor ili koautor 6 naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima (5 radova M21 kategorije i 1 rad M22 kategorije), kao i 8 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Član je Društva za neuronauke Srbije (DNS) i Federacije evropskih društava za neuronauke (FENS).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Љиљана О. Радовановић**

Број индекса **Б3028/2018**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Значај парвалбуминских интернеурона и синаптичке реорганизације хипокампуса и ретикуло-таламичког једра у експерименталним моделима Паркинсонове болести“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Љиљана О. Радовановић**

Број индекса: **Б3028/2018**

Студијски програм: **Биологија**

Наслов рада: **„Значај парвалбуминских интернеурона и синаптичке реорганизације хипокампуса и ретикуло-таламичког једра у експерименталним моделима Паркинсонове болести“**

Ментор: **др Јелена Петровић, др Марија Ацић-Буквић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Значај парвалбуминских интернеурона и синаптичке реорганизације хипокампуса и ретикуло-таламичког једра у експерименталним моделима Паркинсонове болести“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

③ Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.