

Zárójelentés az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram Iroda részére

A téma címe:

Agyi receptor-rendszerek vizsgálata neurológiai kórképekben: speciális és hagyományos autoradiográfiás módszerek alkalmazása Parkinson-kórban, Alzheimer-kórban és az öregedés során.

Vezető kutató:

Dr. Csiba László
Intézetvezető egyetemi tanár.

Résztvevő kutató:

Dr. Gulyás Balázs
Psychiatry Section, Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

A protokoll azonosítója az OTKA-nál: **K68864** számú kutatási támogatás.

A vizsgálatban résztvevő senior kutatók személyében nem történt változás a kutatás teljes futamideje alatt. Változás történt a kutatásban résztvevő PhD hallgatók személyében mely szerint Makkai Boglárka munkahelyet váltva kilépett a K68864 OTKA projektből 2008 január 1.-i dátummal. 2008 szeptember 01.-től Dr. Farkas Szabolcs az OTKA K68864 projektben résztvevő PhD hallgató. Ezen változás késést eredményezett a projektben tervezett feladatok és munkálatok végrehajtásában.

Az OTKA K68864 sorszámú kutatási projekt 2007 január 01. helyett 2007 július 01.-én indult a pályázat jóváhagyásának megfelelően. A pályázat futamideje 2007 július 1. – 2011 június 30. A kutatás az agyminták gyűjtésével indult, melyek tárolása indokoltá tette -80°C –os hűtésre alkalmas mélyfagyasztó vásárlását. A pályázat későbbi kezdése miatt az OTKA iroda a 2007-re betervezett beszerzéseket szétosztotta a 2007-es és 2011-es évekre. Mindez szükségessé tette a beszerzésekre tervezett anyagi keret átcsoportosításának kérvényezését a mélyfagyasztó megvásárlásának kivitelezése végett, melyet az OTKA iroda 2007 decemberében jóváhagyott. A MDF-U73V típusú mélyfagyasztó beszerzésére 2008 február 28.-án került sor 2 977 920 Ft értékben.

2008-ban az EIK-702/1/2008.08.06. iktatószámú engedély alapján az OTKA iroda által 2008. évre tervezett 1 400 ezer Ft támogatás befektetett eszközökre költhető összegéhez a 2008. évi 2 161 ezer Ft dologi költségből 1 200 ezer Ft-ot átcsoportosítottunk. Ennek révén megtörtént egy a NIKON E80i típusú mikroszkóp beszerzése diagnosztikai célból.

Az alábbiakban az OTKA K68864 sorszámú kutatási projektben elért eredményeket foglaltuk össze. A tudományos folyóiratban közölt, közlésre elfogadott, közlésre beküldött cikkek illetve kéziratok a dokumentum végén kerültek felsorolásra. A kéziratokban az OTKA támogatást minden esetben feltüntettük.

Jelen kutatási projektben Parkinson kóros valamint Alzheimer kóros mintákon végeztünk hagyományos receptor autoradiográfiás és funkcionális autoradiográfiás vizsgálatokat. Hagományos ligandkötődési autoradiográfia során a radioliganddal közvetlenül jelöljük a célfehérjét (pl. receptorokat) vizsgálva annak eloszlását, relatív sűrűségét. Funkcionális autoradiográfiával a receptor – G protein közötti jelátvitel vizsgálható a G proteinnel kapcsolt receptorok esetében, értékes információkat szolgáltatva a receptorok működőképességéről. Ezen módszerek lehetővé teszik a dopamin valamint a cannabinoid receptor rendszerek tanulmányozását az említett neurodegeneratív kórképekben.

A kutatás első két évére (2007 július 01. – 2008 december 31.) az agyminták gyűjtését valamint az ezek tárolásához és feldolgozásához szükséges eszközök beszerzését terveztük. A kontroll és Parkinson kóros agymintákat a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Patológiai Intézetével közösen gyűjtöttük, mely sajnos a vártnál lassabb ütemben haladt a Parkinson kór viszonylag alacsony incidenciájának tulajdoníthatóan. Megalapozott tudományos következtetések azonban csak megfelelő mintaszámon elvégzett vizsgálat alapján vonhatók le. A mintagyűjtés 2009. évre való kiterjesztése késést eredményezett az autoradiográfiás kísérletek elkezdésében. Az ütemterv tartása érdekében és elegendő mintaszám hiányában 2009. év első felében mérlegelnünk kellett, hogy kísérleteinket különálló, a Parkinson- illetve Alzheimer kór szempontjából releváns agyi struktúrákat magába foglaló blokkokon végezzük a humán teljes hemispheriumok helyett. Az agyminták beszerzése érdekében az Amszterdami (Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam) valamint a Budapesti agybankokhoz (Human Brain Tissue Bank, Budapest) fordultunk; az alábbi agymintákat kaptuk:

- kontroll nucleus caudatus
- kontroll gyrus frontalis medialis
- kontroll gyrus cinguli
- kontroll putamen
- Parkinson kóros nucleus caudatus
- Parkinson kóros gyrus frontalis medialis
- Parkinson kóros gyrus cinguli
- Parkinson kóros putamen

A vegyszer-, műszerigény felméréseivel és beszerzése, a megfelelő protokollok kidolgozása valamint, a kísérleti körülmények optimalizálása után, 2009 második félévében illetve 2010-ben elvégeztük a dopamin D2/D3 receptor hagyományos receptor autoradiográfiás és [³⁵S]GTPγS kötődési funkcionális autoradiográfiás, valamint a cannabinoid 1-es típusú receptor (CB1R) tradicionális receptor autoradiográfiás vizsgálatokat.

Jelen kutatási projekt első célkitűzése korrelációkeresés az expresszált dopamin receptor sűrűség és a dopamin receptor aktivitás változása között Parkinson kórosban. Hagományos ligandkötődési receptor autoradiográfiával tanulmányoztuk a dopamin D2/D3 receptor sűrűségét illetve dopamin által stimulált [³⁵S]GTPγS kötődési funkcionális autoradiográfiát alkalmaztunk a receptor – G protein közötti jelátvitel (receptor szenzitivitás) vizsgálatára.

A pályázat kutatási célkitűzései között a perifériás benzodiazepin receptorok (PBR) (újabb névén: TSPO) humán Alzheimer kóros agyakban történő postmortem autoradiográfiás vizsgálata is szerepelt új típusú PBR ligand segítségével. Azonban az időközben megjelent tudományos közlemények [1,2] a projekt ezen részének kivitelezését indokolatlanná tették. Ugyanakkor lehetőségünk nyílt egy új típusú CB1R ligand tesztelésére s ezáltal a CB1R denzitás változás tanulmányozására, Alzheimer kóros betegektől származó agymintákon. A CB1R sűrűség

detektálását a 125I-SD7015 nevű radioliganddal végeztük receptor autoradiográfia segítségével. Az SD-7015 ligandumot a közelmúltban fejlesztették ki, mely nagy érzékenységgel jelölte a CB1R-kat normál humán agymintákon. Célunk a CB1R denzitás vizsgálata volt különböző neuropatológiai stádiumú, az Alzheimer kór (AK) teljes progresszióját felölelő agyminták illetve kontroll minták felhasználásával. A jelen vizsgálatok voltak az új radioligandummal történt első autoradiográfias vizsgálatok kóros agyszövetben.

Továbbá Parkinson kór esetében párhuzamosan tanulmányoztuk a dopamin D2/D3 receptor illetve CB1R sűrűségbeli változásait, tekintettel a két receptor rendszer közötti kölcsönhatásokra.

Végül de nem utolsósorban teljes hemispherium agymetszeteken kidolgoztunk egy szövettani módszert az ischémiás területek megbízható feltérképezésére annak érdekében, hogy a károsodott ischémiás agyterületek a neuroreceptor elváltozásokat vizsgáló autoradiográfias kísérletek során kizárhatók legyenek.

Vizsgálataink célja:

- A sztriatális, limbikus és kortikális dopamin D2/D3 receptor rendszer korrelatív vizsgálata Parkinson-kórban;
- A dopaminerg rendszer funkcionális állapotának a vizsgálata Parkinson kórban kapcsolatot keresve az expresszált, illetve funkcióképes receptorok számának változása között. Ezáltal következtethetünk a dopaminerg rendszer funkcionális állapotának változására a betegség során;
- Sztriatális és kortikális CB1R rendszer vizsgálata Parkinson kórban illetve korrelációkeresés a CB1R denzitás és dopamin D2/D3 receptor denzitás változás között;
- Új CB1R radioligandum (125I-SD7015) szenzitivitásának tesztelése Alzheimer-kóros betegektől és kontroll személyektől származó agymintákon;
- A CB1R sűrűség változás vizsgálata különböző neuropatológiai stádiumú (AK Braak I. – VI. stádium) Alzheimer kóros prefrontális cortex mintákban.

Eredményeinket négy kéziratban foglaltuk össze melyek közül egy már tudományos folyóiratban közlésre került, három pedig elbírálás alatt áll. Kísérleteink, és eredményeink részletes bemutatására az alábbiakban kerül sor.

I. Dopamin D2/D3 receptor sűrűség és receptor – G protein jelátvitel vizsgálata Parkinson kórban.

I. 1. Bevezetés

Az Amerikai Egyesült Államokban készült felmérés szerint a Parkinson kór az 50 év fölötti korosztály megközelítőleg 1%-át érinti. A betegségben szenvedők száma meghaladja az 500000-t. Epidemiológiai tanulmányok a Parkinson kór magasabb incidenciáját igazolták a fejlett országokban [3], ugyanakkor a betegség ritkább dohányzóknál [4].

A Parkinson kór hátterében a dopaminerg rendszer progresszív degenerációja áll, mely elsősorban a nigrostriatális dopaminerg pályát érinti [5]. A lecsökkent striatális dopamin szint a Parkinson kór jellegzetes motoros tüneteiben nyilvánul meg (tremor, bradikinézia, rigiditás). A

betegség későbbi szakaszában fellépő exekutív zavarok, kognitív hanyatlás a központi idegrendszer egyéb dopaminerg pályáinak károsodásával hozhatók kapcsolatba [6,7].

A dopamin receptorok a G proteinnel kapcsolt receptorok családjába tartoznak. Szerkezeti és farmakológiai tulajdonságaik alapján megkülönböztetünk D1-szerű (D1 és D5) valamint D2-szerű (D2, D3 és D4) dopamin receptorokat [8]. Bizonyítást nyert, hogy ezen receptorok különböző elváltozásokat szenvednek a Parkinson kórban fellépő dopamin depléció következtében. Elsősorban a D2 típusú dopamin receptorok up-regulációját, dopamin iránti megnövekedett affinitását igazolták Parkinson kóros humán agymintákon, illetve állatmodelleken végzett in vitro és in vivo módszerekkel [9-12]. Cai és társai fokozott D2 receptor – G protein jelátvitelt figyeltek meg parkinsonos álladmodellen végzett kísérleteik során. A fenti dopamin receptorokat érintő elváltozások azonban a l-DOPA kezeléssel visszafordíthatók, sőt, beszámoltak a receptor denzitás kontroll szint alá való csökkenéséről is [9,13-17].

Tudomásunk szerint, azonban hosszasan kezelt Parkinson kóros betegek esetében a D2/D3 receptor – G protein jelátvitel változását még nem vizsgálták. Kutatásunk célja a D2/D3 receptor denzitás és D2/D3 receptor – G protein jelátvitel közötti korreláció keresése volt humán Parkinson kóros agyminták esetében.

I. 2. Anyag és módszer

A vizsgált humán agymintákat az Amszterdami Agybank bocsátotta rendelkezésünkre. Továbbá részletes információkat szolgáltatott a kontroll és Parkinson kóros személyek klinikai adatairól, valamint az agyminták neuropatológiai jellemzését illetően (Parkinson kór Braak V-VI. stádium). Az agyminták krónikus l-DOPA kezelt Parkinson kóros betegek és neurológiai illetve pszichiátriai betegségben nem szenvedett kontroll személyek nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintái voltak.

A dopamin D2/D3 receptor denzitást hagyományos receptor autoradiográfiával vizsgáltuk [18]. Radioligandként 3H-mal jelölt raclopride-t használtunk, mely szelektív D2/D3 dopamin receptor antagonist. A D2/D3 receptor sűrűséget a raclopride fmol/gramm szövet-ben kifejezett koncentrációjában kvantifikáltuk 3H kalibrációs skála segítségével.

A dopamin D2/D3 receptor – G protein jelátvitelt dopamin által stimulált [³⁵S]GTP γ S kötődési funkcionális autoradiográfiával vizsgáltuk [19]. 14C kalibrációs skálát alkalmaztunk a bekötődés kvantifikálására, melynek segítségével az optikai denzitás értékeket nCi/mg szövet koncentrációba alakítottuk. A dopamin által stimulált [³⁵S]GTP γ S kötődésnövekedést a bazális kötődéshez viszonyítva százalékban is megadtuk.

I. 3. Eredmények

A dopamin D2/D3 receptor denzitás a Parkinson kóros nucleus caudatusban szignifikánsan alacsonyabb volt mint kontrollok esetében. Ugyanezen minták nem mutattak különbséget a dopamin által stimulált [³⁵S]GTP γ S kötődésben.

A gyrus frontalis medialis és a gyrus cinguli mintákban sem a dopamin D2/D3 receptor sűrűségben, sem a receptor szenzitivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és Parkinson kóros mintacsoportok között. Azonban a parkinsonos frontális minták dopamin D2/D3 receptor szenzitivitása csökkenő tendenciát mutatott.

I. 4. Megbeszélés és következtetések

1. A postmortem humán Parkinson kóros agymintákon valamint állatmodelleken végzett in vitro vizsgálatok és in vivo PET és SPECT vizsgálatok megállapították a sztriatális D2 dopamin receptorok up-regulációját a l-DOPA kezelés megkezdése előtt. A receptor sűrűség növekedés a dopamin szint szinaptikus csökkenésére adott kompenzatórikus mechanizmusként fogható fel [6,9-12]. L-DOPA kezelés hatására azonban jelentős csökkenés következik be a sztriatális D2 receptor sűrűségben mely kontrollszint alá süllyedhet. Megállapították, hogy a dopamin D3 receptor sűrűségben jelentős változás nem következik be a l-DOPA kezelés alatt [9,15,16]. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy rendszeresen kezelt hosszas körlefolyasú Parkinson kórosban a nucleus caudatusban a D2 dopamin receptorok down-regulálódnak, melynek oka a l-DOPA szubsztitúciós kezelés lehet.
2. Cai és társai megállapították 6-hydroxydopamin (6-OHDA) Parkinson kóros állatmodellen, hogy a dopamin D2 receptor denzitás valamint a bazális és stimulált receptor - Gi protein kötődés emelkedett. Ugyanakkor nem találtak változást a D1 dopamin receptorok illetve a G proteinek szintjében [13]. Jelen tanulmány elsőként vizsgálta a dopamin D2/D3 receptor – G protein jelátvitelt hosszasan l-DOPA kezelt Parkinson kóros betegek agymintáin. A vizsgált agyi régiókban – nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis, gyrus cinguli – nem mutatkozott jelentős változás a dopamin D2/D3 receptor szenzitivitásban. Ennek alapján arra következtettünk, hogy előrehaladott Parkinson kórosban krónikus l-DOPA kezelés mellett is a receptor – G protein jelátvitel normális szinten marad.
3. Kutatásunk lehetővé tette, hogy elsőként korelláltathassuk a D2/D3 receptor denzitást és szenzitivitást krónikusan l-DOPA kezelt humán Parkinson kóros agymintákon. Megállapítottuk, hogy a nucleus caudatusban, a kontrollokhoz képest szignifikáns D2/D3 receptor sűrűség csökkenés ellenére, a receptor – G protein jelátvitel (receptor szenzitivitás) a krónikus l-DOPA kezelés mellett is megtartott. A megmaradt dopamin D2/D3 receptorok fokozott szenzitivitása a dopamin hiány következtében fellépő funkcionális kompenzáció megnyilvánulása lehet a Parkinson kóros nucleus caudatusban.
4. A szinaptikus dopamin szint egyik legfontosabb szabályozó mechanizmusa a dopamin preszinaptikus visszavételért felelős dopamin transzporter (DAT). A dopamin hiány maga után vonja a DAT szint kompenzatórikus csökkenését [20,21]. Azonban a kevesebb DAT képtelen az endogén illetve exogén eredetű dopamin szinaptikus szintjének a szabályozására, ugyanakkor a posztzinaptikus dopamin D2/D3 receptorok szenzitivitása változatlan. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a megmaradt dopamin D2/D3 receptorok kompenzatórikusan megnövekedett szenzitivitása társulva a kritikusan lecsökkent DAT szinttel növelheti a diszkinéziák megjelenésének esélyét. Mindezt fokozhatja az exogén l-DOPA dopaminná történő átalakítása a nem dopaminerg sejtek által, melyek szintén képtelenek az aktív dopamin neurotranszmisszió optimális neurotranszmitter szintjének a biztosítására tovább növelve a szinaptikus dopamin szint regulációjának zavarát [22].

5. A gyrus frontalis medialisban és a gyrus cinguliban nem találtunk szignifikáns különbséget sem a dopamin D2/D3 receptor denzitást sem a szenzitivitást illetően. Mindazonáltal a frontális mintákban a dopamin D2/D3 receptor – G protein jelátvitel csökkenő tendenciát mutatott. Mindez alátámasztja azon feltevést, hogy Parkinson kórban a különböző agyi régiók eltérő mértékben érintettek, magyarázva a betegség progressziója során fellépő extrasztriatális tünetek fokozatos megjelenését és súlyosbodását [7,23].

II. A cannabinoid 1-es típus receptor autoradiográfiás vizsgálata 125I-SD7015 ligandummal human prefrontális cortexben az Alzheimer kór progressziója során.

II. 1. Bevezetés

A cannabinoid 1-es típusú receptor (CB1R) a központi idegrendszer legelterjedtebb G proteinnel kapcsolt receptora mely szoros kapcsolatban van a legfontosabb neurotranszmitter rendszerekkel, illetve idegpályákkal [24]. Mindez magyarázhatja az endocannabinoid rendszer tanulást, kognitív teljesítményt, memóriát befolyásoló hatásait, mely funkciók jellegzetesen károsodnak Alzheimer kórban [25-27]. Azonban az Alzheimer kór progressziója során a CB1 receptorokat érintő elváltozások ma is vita tárgyát képezik.

A CB1R in vivo detektálására számos próbálkozás történt, azonban az ideális ligandum kifejlesztése még várat magára. Az endocannabinoidok közepes CB1R affinitással és magas lipofilicitással rendelkeznek, míg utóbbi jelenti a hátrányt a növényi eredetű cannabinoidok esetében is. A pirazol származékok, aminoalkilindolok és egyéb nemrégiben kifejlesztett PET ligandumok számos előnnyel bírnak de ugyanakkor hátrányos tulajdonságaik is jelentősek [28-32]. A jelen kísérletben alkalmazott radioligandum, 125I-SD7015, egy új típusú CB1R agonista, mely kontroll agymintákon nagy érzékenységgel detektálta a CB1 receptorokat [33].

Alzheimer kór (AK) Braak III-as neuropatológiai stádiumában igazolt a prefrontális cortex hisztopatológiai érintettsége. Azonban a Braak I-II stádiumú minták lehetővé teszik az Alzheimer kór illetve dementia szempontjából fontos de hisztopatológiailag még „érintetlen” prefrontális régió vizsgálatát [34]. Ezáltal jelen tanulmányban lehetőségünk nyílt a CB1R rendszer korai, reaktív denzitás változásainak tanulmányozására; továbbá a 125I-SD7015 radioligand CB1R iránti érzékenységének tesztelésére, lehetséges sűrűségbeli különbségek feltárására a különböző Braak stádiumú Alzheimer kóros minták esetében.

A CB1R sűrűség változásait az Alzheimer kór neuropatológiai (Braak) stádiumainak megfelelően vizsgáltuk a betegség teljes progresszióját felölelve.

II. 2. Anyag és módszer

Kísérleteink során 6 idegrendszeri betegséggel nem diagnosztizált személytől valamint 11 Alzheimer kóros betegről származó prefrontális cortex mintát vizsgáltunk, melyeket a Budapesti Agybanktól kaptunk. Az Alzheimer kóros mintákat a neuropatológiai diagnózis alapján a CB1R autoradiográfiához a következőképpen csoportosítottuk: 3 db minta AK Braak I-II stádium; 4 db minta AK Braak III-IV stádium; 4 db minta AK Braak V-VI stádium.

A 20 µm vastagságú metszetek elkészítése után elvégeztük a CB1 receptor autoradiográfiát. a nemrégiben kifejlesztett SD7015 ligandummal, melynek jelölése a ¹²⁵I jódizotóppal [¹²⁵I] történt [33]. Baskin és Wimpy (1989) [35] által kidolgozott módszerrel kvantifikáltuk a receptorok denzitását: az ismert radioaktív koncentrációjú ¹⁴C kalibrációs skála értékeinek megfelelően kiszámolták a szövet egységnyi területén adott idő alatt bekövetkező [¹²⁵I] radioizotóp hasadást (DPM/mm²) az alábbi másodfokú polinom egyenlet alapján:

$$y ([^{125}\text{I}] \text{ DPM/mm}^2) = -26.798 + 104.261x - 1.295x^2$$

A ¹⁴C kalibrációs skála ¹²⁵I DPM/mm² -be átalakított értékei alapján kvantifikálhatók a mért optikai denzitásokat.

II. 3. Eredmények

Az Alzheimer kóros prefrontális minták átlagos CB1R sűrűségének változásában az alábbi tendencia rajzolódott ki: AK Braak I–II stádium > AK Braak III–IV stádium > AK Braak V–VI stádium. Szignifikáns különbség mutatkozott az AK Braak I-II stádiumú minták valamint a kontroll prefrontális minták CB1R denzitása között ($p < 0.05$). Szintén szignifikáns eltérést eredményezett amikor az összes Alzheimer kóros minta CB1R denzitás értékét hasonlítottuk a kontroll mintákon kapott adatokkal. Azonban a kontroll és AK Braak I-II stádiumú mintacsoportok egyesített eredményeinek összevetése az AK Braak III-IV stádium denzitás értékeivel nem hozott szignifikanciát.

II. 4. Megbeszélés és következtetések:

1. A közelmúltban ellentmondásos eredmények születtek az Alzheimer kórban bekövetkező CB1R denzitás változásokat illetően. Westlake és társai (1994) csökkent CB1R denzitásról számolnak be a bazális ganglionok, hippocampus, entorhinális cortex területén Alzheimer kórban melyet a normális öregedés során bekövetkező neuron vesztéssel magyaráztak, mivel a csökkent CB1R denzitás nem mutatott összefüggést az AK jellegzetes hisztopatológiai elváltozásainak előfordulásával [36]. Más szerzők csökkent illetve változatlan CB1R sűrűségről írnak Alzheimer kórban, azonban ezen tanulmányokban nem sorolták külön csoportba a kontroll illetve AK Braak I-II stádiumú mintákat [37,38]. Jelen tanulmányban a CB1R sűrűség emelkedését találtuk az Alzheimer kór korai stádiumaiban (AK Braak I-II stádium), mely a betegség progressziójával párhuzamosan csökkenni látszik de még előrehaladott (AK Braak V-VI stádium) kórállapotban sem süllyed kontroll szint alá.
2. Különböző kísérletek igazolták az endocannabinoidok neuroprotektív hatását, a β-amiloid peptid által indukált neurotoxicitás kivédése valamint a direkt és indirekt immunmoduláció révén. Megfigyelték a cannabinoid agonisták és antagonisták kognitív funkciókra kifejtett pozitív hatását is [25-27,37,39]. Az általunk kimutatott CB1R denzitás emelkedés a CB1R rendszer neurodegenerációra adott reaktív válasza lehet, mely pontos mechanizmusának feltárása további kutatások tárgyát képezi.
3. Kísérletünkkel igazoltuk, hogy humán prefrontális cortex mintákon a CB1R denzitás az Alzheimer kór teljes progressziója során kontroll szinten vagy az fölött van. A CB1R

sűrűség változás tendenciája: AK Braak I–II stádium > AK Braak III–IV stádium > AK Braak V–VI. A CB rendszer sokrétű funkciójának köszönhetően (neuromoduláció, neuroprotekció, antiinflammatorikus hatás) az Alzheimer kór kezelésének alternatív célpontja lehet.

4. Normál patkány agy bizonyos területein kimutatták a CB1R populációnak az életkor előrehaladtával történő megfogyatkozását [40-42]. Humán agymintákon a CB1R expresszió évtizedenkénti 8-10%-os csökkenését állapították meg [43]. Jelen tanulmányban a kontroll mintáknál enyhe életkor függő CB1R sűrűség csökkenést találtunk. Azonban a kontroll és AK Braak I-II stadiumú mintacsoportok egyesítésével ez a tendencia eltűnt, alátámasztva azon elképzelésünket miszerint célszerű a Braak I-II stádiumú Alzheimer kóros és kontroll mintacsoportok elkülönítése különböző vizsgálatok során. Ezzel megelőzhető az egyes agyi régiókban bekövetkező korai elváltozások rejtve maradása.
5. A 125I-SD7015 radioligand nagy szenzitivitást mutatott a CB1 receptorok iránt az Alzheimer kór különböző stádiumaiban, lehetővé téve a CB1R denzitás változások finom különbségeinek detektálását. A 125I-SD7015 radioligand nagy segítséget nyújthat az in vivo alkalmazható CB1 ligandumok kifejlesztésében, ezáltal a CB1R populációt érintő központi idegrendszeri elváltozások tanulmányozásában és diagnosztikájában, gyógyszerek optimális adagjának beállításában, kezelések hatékonyságának követésében.

III. A dopamin D2/D3 receptor és a cannabinoid 1-es típusú receptor denzitás változása Parkinson kórban

III. 1. Bevezetés

A cannabinoid 1-es típusú (CB1R) receptor a humán központi idegrendszer egyik legelterjedtebb receptora, melynek legnagyobb sűrűségét a bazális ganglionokban (globus pallidus, lateralis caudatum putamen, substantia nigra) és a kisagyban mérték, ezeket limbikus (hippocampus, amygdala, cinguláris cortex) és kortikális, elsősorban frontális, területek követik. A CB1 receptorok legfontosabb funkciója a retrográd szinaptikus neuromoduláció, mely által közreműködnek a legtöbb neurotranszmitter szinaptikus regulációjában [24,36,44]. Ismert a neuroprotekcióban betöltött szerepük is [37,39].

A dopamin és CB1 receptorok közötti kölcsönhatásokról illetve a dopamin – CB1 receptorok heterodimerizációs képességéről több közleményben beszámoltak. Mindkét receptor típus a G proteinnel kapcsolt receptorok családjába tartozik [45-51]. Számos tanulmány igazolta a CB1R expresszió zavarát az extrapiramidális rendszert érintő neurodegeneratív kórképekben, pl. Parkinson kórban, Huntington chorea-ban [48,51,52].

Jelen tanulmány a dopamin D2/D3 receptor és CB1R sűrűség viszonyát vizsgálta Parkinson kóros emberi agymintákon. Célunk a két receptor rendszer denzitásbeli elváltozásainak korreláltatása volt.

III. 2. Anyag és módszer

Vizsgálatainkat pszichiátriai és neurológiai betegségben nem szenvedett kontroll személyektől illetve Parkinson kóros betegektől származó putamen, nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis mintákon végeztük. A Parkinson kóros esetek szövetmintái előrehaladott Lewy-test patológiát mutattak súlyos neokortikális érintettséggel mely a Braak alfa-synuclein V és VI stádiumnak felelt meg. A betegek hosszú távú l-DOPA kezelésben részesültek (14 ± 6 év).

A dopamin D2/D3 receptor valamint a CB1R sűrűséget hagyományos receptor autoradiográfiával vizsgáltuk. Tríciummal jelölt raclopride-t használtunk radioligandumként a D2/D3 receptorok detektálására. A mért optikai denzitásokat 3H kalibrációs skála segítségével kvantifikáltuk és a receptor sűrűséget a raclopride fmol/gramm szövet koncentrációjában fejeztük ki.

A CB1R denzitás kvantifikálása a fentiekben már részletesen leírt, Baskin és Wimpy (1989) által kidolgozott módszer alapján történt ^{14}C kalibrációs skála segítségével. A receptor sűrűséget a szövet egységnyi területén adott idő alatt bekövetkező [^{125}I] radioizotóp hasadásában (DPM/mm²) fejeztük ki [35].

III. 3. Eredmények

Jelentős dopamin D2/D3 receptor denzitás csökkenést figyeltünk meg a Parkinson kóros betegektől származó putamen és nucleus caudatus agyminták esetében a kontroll mintákhoz képest. Gyrus frontalis medialis mintákban nem találtunk lényeges eltérést a két mintacsoport között.

A tanulmányozott agyi régiók egyikében sem találtunk szignifikáns különbséget a CB1R denzításban a kontroll és Parkinson kóros mintacsoportok között.

III. 4. Megbeszélés és következtetések

1. Parkinson kórban, krónikus l-DOPA szubsztitúciós kezelés mellett, a CB1R denzitás nem változik, melynek magyarázata az alábbiakban keresendő:

- az alkalmazott ^{125}I -SD7015 ligandum CB1R agonista; ismert, hogy az agonisták csak a nagy-affinitású receptorokhoz kötődnek [53];
- számos vizsgálat igazolta jelentős CB1R rezerv jelenlétét, azonban ezen CB1 receptor populációnak csak töredéke található működő, nagy-affinitású állapotban biztosítva a normális cannabinoid funkciót [54-56];
- ismert a receptorok interkonverziós képessége az alacsony- illetve nagy-affinitású állapotok között [57,58];

Ezek ismeretében feltételezhető, hogyha a CB1R számban változás áll be, a nagy receptor rezervnek és a receptorok alacsonyból nagy-affinitású állapotba történő konverziójának köszönhetően az agonistával detektálható nagy-affinitású receptorok sűrűsége változatlanul látszik. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a CB1R rendszer normális működőképessége a Parkinson kór teljes progressziója során megtartott.

2. Jelen tanulmány elsőként hasonlítja össze a dopamin D2/D3 és CB1 receptor sűrűség változásait humán Parkinson kóros putamen és nucleus caudatus mintákban. Mindkét vizsgált sztriatális régióban jelentősen csökkent dopamin D2/D3 receptor sűrűséget találtunk melynek hátterében a krónikus L-DOPA szubsztitúciós kezelés állhat. Ugyanakkor a CB1R denzitás nem mutatott eltérést a kontroll illetve Parkinson kóros mintacsoportok között a vizsgált agyterületekben.
 - A jelenség egyrészt magyarázható a két receptor típus közötti interakciókkal. Kimutatták, hogy egyes CB1 – dopamin receptor kölcsönhatások kizárólag dopamin jelenlétében mennek végbe [47,50]. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a Parkinson kóros nucleus caudatusban a D2/D3 receptor – G protein jelátvitel nem változik [59]. Így a L-DOPA kezelés visszafordíthatja a dopamin hiányos állapotban bekövetkezett korai CB1R denzitás változásokat, illetve kontroll szinten tarthatja a CB1R sűrűséget.
 - Másrészt, Parkinson kórban a CB1R expresszió változásával foglalkozó beszámolók ellentmondásosak [48,51,60-63]. A dopamin hiány kiválthatja a CB1R rendszer korai reaktív válaszát azonban később hatékonyabb kompenzatórikus mechanizmusok és/vagy a L-DOPA kezelés hatására a CB1 receptorokat érintő elváltozások visszatérhetnek kontroll szintre. Ez magyarázhatja a különböző szerzők által leírt ellentmondásos eredményeket illetve, esetünkben, a Parkinson kóros mintákban talált változatlan CB1R denzitást.
3. A cannabinoid agonisták fokozták a dopamin anyagcserét, csökkentették a tremort és javították a motoros teljesítményt Parkinson kóros állatmodellekben, ugyanakkor a cannabinoid antagonisták hipokinézist javító hatásáról is beszámoltak [64-66]. Továbbá a cannabinoid receptorokat célozva neuroprotektív és antiinflammatórikus hatás is elérhető [37,39]. Eredményeink igazolják egy ép CB1R populáció jelenlétét a Parkinson kór teljes progressziója során, mely alternatívát jelenthet a Parkinson kór gyógyszeres terápiájában, valamint új perspektívát nyújthat a kórkép neuroprotektív és antiinflammatórikus kezelésében.

IV. Regionális szöveti kálium disztribúció alapján történő fokális lézió feltérképezése humán teljes hemispherium metszeteken.

IV. 1. Bevezetés

Mind Parkinson kórban, mind Alzheimer kórban a kórfolyamat jellegzetes neuroanatómia eloszlást és progressziót mutat. Mint az I. - III. fejezetekben ismertett eredményeink is megerősítik, a receptor autoradiográfia a patomechanizmus megismeréséhez fontos, más módszerrel nem nyerhető eredményekkel járul hozzá. E metodika a fokális iszkémiás lézió környezetében zajló receptor-mediálta folyamatok vizsgálatában és terápiás célú befolyásolásában is hasznos lehet. A vizsgálandó agyterület pontos azonosítása azonban problematikus, mivel a lézió betegenként eltérő anatómiai eloszlású és a stroke kiterjedése – elsősorban korai, terápiásan jól befolyásolható stádiumában – rutin hisztotechnikai festési eljárásokkal bizonyossággal nem

láttatható. Ez jelentős metodikai probléma, mivel elhalt terület meghatározása az iszkémiás lézió környezetében tervezett receptor autoradiográfiai vizsgálatok előfeltétele.

Mies és munkatársai állatmodellen végzett kísérleteik során igazolták, hogy a regionális szöveti kálium koncentráció vizualizálása révén megbízhatóan feltérképezhetőek az ischaemiás agyterületek [67].

Ezen experimentális eredményekre alapozva adaptáltuk a fenti eljárást stroke-ban elhunyt betegektől származó agyminták teljes hemispherium metszeteire. Célunk egy olyan módszer kidolgozása és megbízhatóságának felmérése volt mellyel biztonsággal kizárhattuk ligandvizsgálataink során a potenciális ischaemiás területeket emberi teljes agyféltekei metszeteken. A regionális szöveti kálium disztribúció kimutatásának módszerét, az ischaemiás és „ischemia-mentes” agyterületek elkülönítésére, az alkalmazott eljárással készült teljes hemispherium metszetek kálium eloszlási „térképének” posztmortem MRI felvételekkel való összehasonlítása révén illetve a „kálium térkép” alapján végzett mintavételezés (kálium- és víztartalom meghatározására) segítségével validáltuk.

IV. 2. Anyag és módszer

A feldolgozott agyak autopsziájára 24 órás posztmortem időablakon belül került sor. A natív agyakon posztmortem MRI vizsgálatot (T1 és T2 súlyozott) végeztünk az infarktusz terület azonosítására. A 100 µm vastagságú teljes hemispherium metszeteket cryomicrotommal készítettük -20 °C-on majd elvégeztük a káliumfestést, a Mies és társai által leírt módszer alapján [67]. A festett szövettani metszetet „térképként” használva mintákat vettünk az infarktusz területekről valamint az ép agyi régiókból a kálium mennyiség (láng atomabszorpciós spektroszkópia) valamint a víztartalom meghatározására.

IV. 3. Eredmények

Az infarktusz területekről származó mintákban szignifikánsan alacsonyabb kálium szintet találtunk mint az ép agyterületek esetében. Ugyanakkor a károsodott agyterületek víztartalma jelentősen meghaladta az ép régióból származó mintákéit.

A posztmortem MRI felvételeken kirajzolódó infarktusz területek kiterjedése megegyezett az alacsonyabb kálium koncentrációt mutató, ischaemiás agyterületekkel.

IV. 4. Megbeszélés és következtetések

1. Kísérletünkkel igazoltuk, hogy a humán 100 µm vastagságú teljes hemispherium minták esetében a regionális kálium disztribúció szövettani vizualizálása megbízhatóan azonosítja az infarktusz agyterületeket. Ellentétben az in vivo képalkotó eljárásokkal az általunk alkalmazott módszerrel kapott agyféltekei metszetek az infarktust közvetlenül, anatómiai környezetben mutatják.

2. A módszer alkalmazható egyéb teljes emberi agyféltekei metszeteket feldolgozó vizsgálatok esetében az infarktusos agyterületek kizárására, ezáltal növelve a tervezett kísérlet megbízhatóságát (pl. teljes hemispherium autoradiográfia).
3. A jelen módszerrel készített teljes hemispherium metszetek megbízhatóan használhatók „térképként” célzott mintavételezés során ischaemiás agyi károsodás esetén (pl. gén expresszió, stroke területén bekövetkező molekuláris elváltozások vizsgálata stb.). Továbbá ezen metszetek összehasonlíthatók egyéb, a szomszédos metszeten végzett, vizsgálatok eredményeivel (immunhisztokémia, autoradiográfia stb.). Terveink között szerepel, hogy a közeljövőben az autoradiográfias vizsgálatainkat kiegészítjük a jelen módszerrel vizsgálat ischémiás agyszövet vizsgálatára.

Az OTKA K68864 kutatási projektben elért eredmények összefoglalása:

1. Elsőként összehasonlítva a dopamin D2/D3 receptor denzitás és szenzitivitás változásait hosszasan kezelt Parkinson kóros betegektől származó agymintákon, megállapítottuk, hogy a nucleus caudatusban a lecsökkent dopamin D2/D3 receptor sűrűség ellenére a receptor – G protein jelátvitel normális szinten marad, mely a dopamin hiány következtében kialakuló funkcionális kompenzáció megnyilvánulása lehet.
2. A krónikus l-DOPA szubsztitúciós terápia szignifikáns csökkenést eredményez a dopamin D2/D3 denzitásban, ugyanakkor a receptor – G protein jelátvitelt nem befolyásolja.
3. Eredményeink további magyarázattal szolgálnak a l-DOPA kezelés következtében fellépő diszkinéziák megjelenésére, melyet a kompenzatórikus preszinaptikus dopamin transzporter (DAT) szint és a posztszinaptikus receptorok változatlan szenzitivitásának együttes jelenléte okozhat.
4. A gyrus frontalis medialisban és a gyrus cinguliban változatlan dopamin D2/D3 receptor denzitást és szenzitivitás alátámasztja azon feltevést, hogy Parkinson kórban a különböző agyi régiók eltérő mértékben érintettek, magyarázva a betegség progressziója során fellépő extrasztriatális tünetek fokozatos megjelenését és súlyosbodását.
5. A putamenben és nucleus caudatusban Parkinson kór teljes progressziója során a CB1R denzitás nem változik, melyet magyarázhat a jelentős CB1R tartalék jelenléte valamint ezen receptoroknak az alacsonyból nagy-affinitású állapotba való konverziós képessége.
6. Mivel az alkalmazott 125I-SD7015 ligandum CB1R agonista, megállapíthatjuk, hogy a működőképes, nagy-affinitású CB1 receptorok száma a betegség teljes időtartama alatt megtartott.
7. Jelen tanulmányban elsőként korreláltattuk a dopamin D2/D3 és CB1 receptor sűrűség változásait humán Parkinson kóros putamen és nucleus caudatus mintákon. A dopamin D2/D3 receptor denzitás csökkenés összhangban volt az előző kísérletünkben találtakkal, melyet a krónikus l-DOPA kezeléssel magyaráztunk. A változatlan CB1R sűrűség oka a két receptor rendszer közötti kölcsönhatásokban keresendő: egyrészt a megtartott dopamin D2/D3 receptor szenzitivitás együtt a l-DOPA kezeléssel visszafordíthatja a korai CB1R sűrűség változást illetve fenntarthatja a CB1R denzitást; másrészt a Parkinson kórban kialakuló korai CB1R sűrűségbeli elváltozások visszaállhatnak kontroll szintre a későbbi hatékonyabb kompenzatórikus mechanizmusoknak köszönhetően.
8. Igazoltuk a normális CB1R denzitást a Parkinson kór végső stádiumaiban. Az ép CB1R populáció alternatív kezelési célpont lehet Parkinson kór esetében a neuromodulációs, neuroprotektív valamint az antiinflammatorikus hatások révén.
9. A CB1R denzitás emelkedett az Alzheimer kóros betegektől származó prefrontális cortex mintákon. A szignifikáns eltérés a kontroll és AK Braak I-II stádiumú agyak között a cannabinoid rendszer neurodegenerációra adott korai reaktív megnyilvánulása lehet, mely a neuromodulációt, neuroprotektíót célozza.
10. Prefrontális cortexben a CB1R denzitás az Alzheimer kór végső stádiumaiban is kontroll szinten marad megfelelő molekuláris célpontot biztosítva a neuromodulációs, neuroprotektív és antiinflammatorikus hatású cannabinoid kezelésnek.
11. Bizonyítást nyert, hogy a CB1R esetében az Alzheimer kór Braak I-II neuropatológiai stádium nem tekinthető kontroll csoportnak, mert rejtve maradhatnak a CB1 receptor rendszert érintő korai elváltozások.

12. A ¹²⁵I-SD7015 ígéretes CB1 receptor ligand, mely nagy érzékenységgel detektálta a CB1R receptor sűrűségbeli eltéréseket kontroll illetve különböző neuropatológiai stádiumú Alzheimer kóros prefrontális cortex mintákon.
13. A regionális szöveti kálium disztribúció vizualizálása 100 µm vastagságú humán teljes hemispherium agymintán megbízható módszer az infarktusos agyterületek közvetlen szövettani feltérképezésére.
14. A teljes hemispherium metszetek „kálium térképe összevethető, kombinálható egyéb teljes emberi agyféltekét feldolgozó módszerrel, pl. autoradiográfiával. Továbbá irányt mutathat a szomszédos agyterületekből történő mintavételezés során.

Az OTKA K68864 projektből készült publikációk listája:

1. Csiba L, Farkas S, Kollár J, Berényi E, Nagy K, Bereczki D. Visualization of the ischemic core on native human brain slices by potassium staining method. *J Neurosci Methods*. 2010;192:17-21.
2. Farkas S, Nagy K, Palkovits M, Kovács GG, Jia Z, Donohue S, Pike V, Halldin C, Máthé D, Harkány T, Gulyás B, Csiba L. [¹²⁵I]SD-7015 reveals fine modalities of CB1 cannabinoid receptor density in the prefrontal cortex during progression of Alzheimer's disease. Submitted to 'Neurochemistry International'. Ref. No.: NCI-D-11-00202.
3. Farkas S, Nagy K, Jia Z, Hortobágyi T, Varrone A, Halldin C, Gulyás B, Csiba L. Signal transduction pathway activity compensates dopamine D2/D3 receptor density changes in Parkinson's disease. Submitted to 'Neurochemistry International'. Ref. No.: NCI-D-11-00110.
4. Farkas S, Nagy K, Jia Z, Harkány T, Palkovits M, Donohue S, Pike V, Halldin C, Máthé D, Csiba L, Gulyás B. Maintained levels of striatal CB1 receptors in Parkinson's disease: an autoradiographic study with [¹²⁵I]SD-7015 and [³H]raclopride. Submitted to 'Brain Structure and Function'. Ref. No.: BSF-S-11-00090[1].

Referenciák

1. Gulyás B, Makkai B, Kása P, Gulya K, Bakota L, Várszegi S, Beliczai Z, Andersson J, Csiba L, Thiele A, Dyrks T, Suhara T, Suzuki K, Higuchi M, Halldin C. A comparative autoradiography study in post mortem whole hemisphere human brain slices taken from Alzheimer patients and age-matched controls using two radiolabelled DAA1106 analogues with high affinity to the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) system. *Neurochem Int.* 2009;54:28-36.
2. Gulyás B, Makkai B, Nagy K, Vas Á, Kása P, Andersson J, Suhara T, Suzuki K, Higuchi M, Beliczai Z, Gulya K, Csiba L, Halldin C. In Vitro Evidence for Competitive TSPO Binding of the Imaging Biomarker Candidates Vinpocetine and Two Iodinated DAA1106 Analogues in Post Mortem Autoradiography Experiments on Whole Hemisphere Human Brain Slices. *Current Radiopharmaceuticals* 2009;2:42-48.
3. Rajput AH. Environmental causation of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1993;50:651-652.
4. Benedetti MD, Bower JH, Maraganore DM, et al. Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Neurology* 2000;55:1350-1358.
5. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5: 525-535.
6. Owen AM. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist* 2004;10:525-537.
7. Guttman M. Dopamine receptors in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1992;31:184-192.
8. Strange PG. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 1993;22:223-236.
9. Alexander GM, Schwartzman RJ, Grothusen JR, Brainard L, Gordon SW. Change in brain dopamine receptor in MPTP parkinsonian monkeys following L-Dopa treatment. *Brain Res.* 1993;625:276-282.
10. Graham WC, Sambrook MA, Crossman AR. Differential effect of chronic dopaminergic treatment on dopamine D₁ and D₂ receptors in the monkey brain in MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res.* 1993;620:290-303.
11. Oiwa Y, Eberling JL, Nag, D, Pivrotto P, Emborg ME, Bankiewicz KS. Overlesioned hemiparkinsonian non-human primate model: correlation between clinical, neurochemical and histochemical changes. *Front. Biosci.* 2003;8:155-166.
12. Skirboll S, Wang J, Mefford I, Hsiao J, Bankiewicz KS. In vivo changes of catecholamines in hemiparkinsonian monkeys measured by microdialysis. *Exp. Neurol.* 1990;110:187-193.
13. Cai G, Wang HY, Friedman E. Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;302:1105-1112.
14. Antonini A, Schwarz J, Oertel WH, Pogarell O, Leenders KL. Long-term changes of striatal dopamine D₂ receptors in patients with Parkinson's disease: a study with positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Mov. Disord.* 1997;12:33-38.
15. Hurley MJ, Jolkkonen J, Stubbs CM, Jenner P, Marsden CD. Dopamine D₃ receptors in the basal ganglia of the common marmoset and following MPTP and L-DOPA treatment. *Brain Res.* 1996;709:259-264.

16. Reches A, Wagner HR, Jackson-Lewis V, Yablonskaya-Alter E, Fahn S. Chronic levodopa or pergolide administration induces down-regulation of dopamine receptors in denervated striatum. *Neurology*. 1984;34:1208-1212.
17. Thobois S, Vingerhoets F, Fraix V, Xie-Brustolin J, Mollion H, Costes N, Mertens P, Benabid AL, Pollak P, Broussolle E. Role of dopaminergic treatment in dopamine receptor down-regulation in advanced Parkinson disease: a positron emission tomographic study. *Arch. Neurol*. 2004;61:1705-1709.
18. Hall H, Halldin C, Farde L, Sedvall G. Whole hemisphere autoradiography of the postmortem human brain. *Nucl. Med. Biol*. 1998;25:715-719.
19. Sóvágó J, Makkai B, Gulyás B, Hall H. Autoradiographic mapping of dopamine-D₂/D₃ receptor stimulated [³⁵S]GTPγS binding in the human brain. *Eur. J Neurosci*. 2005;22:65-71.
20. de la Fuente-Fernandez R, Schulzer M, Mak E, Calne DB, Stoessl AJ. Presynaptic mechanisms of motor fluctuations in Parkinson's disease: a probabilistic model. *Brain* 2004;127:888–899.
21. Troiano A, de la Fuente-Fernandez R, Sossi V, Schulzer M, Ruth TJ, Stoessl AJ. Positron emission tomography demonstrates reduced dopamine transporter expression in PD patients with dyskinesias. *Neurology* 2009;72:1211-1216.
22. Carta M, Carlsson T, Kirik D, Björklund A. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 2007;130:1819–1833.
23. Kaasinen V, Nagren K, Hietala J, Oikonen V, Vilkkumäki H, Farde L. Extrastriatal dopamine D₂ and D₃ receptors in early and advanced Parkinson's disease. *Neurology* 2000;54:1482–1487.
24. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003;83:1017-1066.
25. Terranova J-P, Storme J-J, Lafor N, Perio A, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Soubrie P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716A. *Psychopharmacology* 1996;126:165–172.
26. Jung KM, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, Cotman CW, Piomelli D. An amyloid β(42)-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2011; E-published ahead of print, PMID: 21546126.
27. Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D. Δ-9-Tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology* 2006;185:524–528.
28. Gifford AN, Makriyannis A, Volkow ND, Gatley SJ. In vivo imaging of the brain cannabinoid receptor. *Chem Phys Lipids* 2002;121:65-72.
29. Horti AG, Fan H, Kuwabara H, Hilton J, Ravert HT, Holt DP, Alexander M, Kumar A, Rahmim A, Scheffel U, Wong DF, Dannals RF. 11C-JHU75528: a radiotracer for PET imaging of CB1 cannabinoid receptors. *J Nucl Med* 2006;47:1689–1696.
30. Wong DF, Kuwabara H, Horti AG, Raymond V, Brasic J, Guevara M, Ye WG, Dannals RF, Ravert HT, Nandi A, Rahmim A, Ming JE, Grachev I, Roy C, Cascella N. Quantification of cerebral cannabinoid receptors subtype 1 (CB1) in healthy subjects and schizophrenia by the novel PET radioligand [C-11]OMAR. *Neuroimage* 2010;52:1505-1513.
31. Donohue SR, Krushinski JH, Pike VW, Chernet E, Phebus L, Chesterfield AK, Felder CC, Halldin C, Schaus JM. Synthesis, ex vivo evaluation, and radiolabeling of potent 1,5-

- diphenylpyrrolidin-2-one cannabinoid subtype-1 receptor ligands as candidates for in vivo imaging. *J Med Chem* 2008;51:5833–5842.
32. Yasuno F, Brown AK, Zoghbi SS, Krushinski JH, Chernet E, Tauscher J, Schaus JM, Phebus LA, Chesterfield AK, Felder CC, Gladding RL, Hong J, Halldin C, Pike VW, Innis RB. The PET radioligand [¹¹C]MePPEP binds reversibly and with high specific signal to cannabinoid CB1 receptors in nonhuman primate brain. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:259–269.
 33. Donohue SR, Varnäs K, Jia Z, Gulyás B, Pike VW, Halldin C. Synthesis and in vitro autoradiographic evaluation of a novel high-affinity radioiodinated ligand for imaging brain cannabinoid subtype-1 receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:6209-6212.
 34. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1-14.
 35. Baskin DG, Wimpy H. Calibration of [¹⁴C] plastic standards for quantitative autoradiography of [¹²⁵I] labeled ligands with Amersham Hyperfilm β-max. *Neurosci Lett* 1989;104:171–177.
 36. Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiographic and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1994;63:637–652.
 37. Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 2005;25:1904–1913.
 38. Lee JH, Agacinski G, Williams JH, Wilcock GK, Esiri MM, Francis PT, Wong PT, Chen CP, Lai MK. Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex. *Neurochem Int* 2010;57:985-989.
 39. Porter AC, Felder CC. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacology and Therapeutics* 2001;90:45–60.
 40. Liu P, Bilkey DK, Darlington CL, Smith PF. Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat hippocampus and entorhinal, perirhinal, postrhinal and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Brain Res* 2003;979:235-239.
 41. Berrendero F, Romero J, García-Gil L, Suarez I, De la Cruz P, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Changes in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of aged rats. *Biochim Biophys Acta* 1998;1407:205-214.
 42. Romero J, Berrendero F, Garcia-Gil L, de la Cruz P, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats. *Neuroscience* 1998;84:1075-1083.
 43. Mato S, Pazos A. Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. *Neuropharmacology* 2004;46:716-726.
 44. Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90:501-511.

45. Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci.* 1999;2:358-363.
46. Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997;17:5327–5333.
47. Kreitzer AC, Malenka RC. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 2007;445:643-647.
48. Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng B-Y, Jenner P, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's disease and MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 2001;14:1827-1832.
49. Meschler JP, Howlett AC. Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* 2001;40:918–926.
50. Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J. Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci* 2001;14:342–352.
51. Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ, de Yébenes JG, Ramos JA. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 2000;66:485- 494.
52. Glass M, Dragunow M, Faull RLM. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA-A receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000;97:505–519.
53. Kent RS, De Lean A, Lefkowitz RJ. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol.* 1980;17:14-23.
54. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991;11:563–583.
55. Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:123-142.
56. Sim L J, Selley DE, Xiao R, Childers SR. Differences in G-protein activation by m- and d-opioid, and cannabinoid receptors in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1996;307:97–105.
57. Barbier P, Colelli A, Maggio R, Bravi D, Corsini GU. Pergolide binds tightly to dopamine D2 short receptors and induces receptor sequestration. *J Neural Transm.* 1997;104:867-874.
58. Seeman P, Weinshenker D, Quirion R, Srivastava LK, Bhardwaj SK, Grandy DK. Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3513–3518.
59. Farkas S, Nagy K, Jia Z, Hortobágyi T, Varrone A, Halldin C, Gulyás B, Csiba L. Signal transduction pathway activity compensates dopamine D2/D3 receptor density changes in Parkinson's disease. Submitted to *Neurochem Int.*
60. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of the neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992;48:655–688.

61. Silverdale MA, McGuire S, McInnes A, Crossman AR, Brotchie JM. Striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression is decreased in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2001;169:400–406.
62. García-Arencibia M, García C, Kurz A, Rodríguez-Navarro JA, Gispert-Sánchez S, Mena MA, Auburger G, de Yébenes JG, Fernández-Ruiz J. Cannabinoid CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. *J Neural Transm Suppl.* 2009;73:269-275.
63. Hurley MJ, Mash DC, Jenner P. Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. *J Neural Transm.* 2003;110:1279-1288.
64. Gessa GL, Melis M, Muntoni AL, Diana M. Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1998;341:39–44.
65. Sañudo-Peña MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, and Walker JM. Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1998;248:171–174.
66. Kelsey JE, Harris O, Cassin J. The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 2009;203:304–307.
67. Mies G, Kloiber, Drewes LR, Hossmann K-A. Cerebral blood flow and regional potassium distribution during focal ischemia of gerbil brain. *Ann Neurol* 1984;16:232–237.