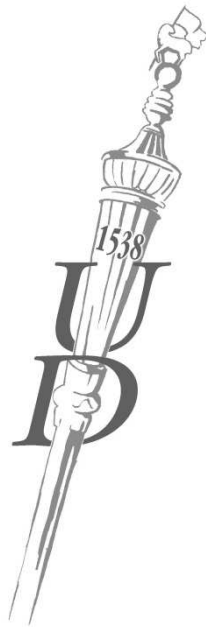


Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A DOPAMIN ÉS ENDOCANNABINOID RECEPTOR RENDSZER
VÁLTOZÁSAI NEURODEGENERATÍV
MEGBETEGEDÉSEKBEN: POSTMORTEM HUMÁN
AUTORADIOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK PARKINSON- ÉS
ALZHEIMER-KÓROS BETEGEK AGYMINTÁIN**

Dr. Farkas Szabolcs

Témavezető: Prof. Dr. Csiba László



DEBRECENI EGYETEM

Ideg tudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A DOPAMIN ÉS ENDOCANNABINOID RECEPTOR RENDSZER
VÁLTOZÁSAI NEURODEGENERATÍV
MEGBETEGEDÉSEKBEN: POSTMORTEM HUMÁN
AUTORADIOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK PARKINSON- ÉS
ALZHEIMER-KÓROS BETEGEK AGYMINTÁIN**

Dr. Farkas Szabolcs

Témavezető: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM

Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2014

**A DOPAMIN ÉS ENDOCANNABINOID RECEPTOR RENDSZER VÁLTOZÁSAI
NEURODEGENERATÍV MEGBETEGEDÉSEKBEN: POSTMORTEM HUMÁN
AUTORADIOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK PARKINSON- ÉS ALZHEIMER-KÓROS
BETEGEK AGYMINTÁIN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Farkas Szabolcs, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Kovács Tibor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. június 13. 11:00 óra, Debreceni Egyetem ÁOK,
Neurológiai Klinika, Könyvtár

Az értekezés bírálói:

Dr. Klivényi Péter, az MTA doktora
Dr. Garai Ildikó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Klivényi Péter, az MTA doktora
Dr. Garai Ildikó, PhD
Dr. Kovács Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. június 13. 13:00 óra.
Helyszín: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme.

1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszeri receptor vizsgálatok eredményei mind az agykutatás, mind a klinikai orvostudomány számára igen fontosak. A neuroreceptorok vizsgálhatóak *in vivo* (pozitron emissziós tomográfia – PET, „egyetlen foton emissziós számítógépes rétegfelvétel – SPECT”) és *in vitro* (autoradiográfia, *in situ* hibridizáció, immunhisztokémia) módszerekkel.

Vizsgálatainkat a hagyományos receptorkötődési, valamint a funkcionális autoradiográfia módszerével végeztük, melyek lényege a szilárd targethez kötődött radioaktívan jelölt molekulák filmmel vagy fotoemulzióval történő detektálása. A receptor vagy radioligand autoradiográfiával a radioaktívan jelölt receptor ligandok kötődési helye tüntethető fel, ezáltal leírható és mérhető a receptorok denzitása különböző agyi régiókban. A funkcionális autoradiográfia, vagy pontosabb kifejezéssel élve a [³⁵S]GTPγS (guanozin 5'-O-[gamma-tio]trifoszfát) kötődési autoradiográfia a G-proteinhez kapcsolt receptorok detektálására alkalmas. Kutatásaink során a dopamin D₂/D₃ receptorok és a cannabinoid 1-es típusú receptor (CB₁R) denzitását, illetve a dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein közötti jelátvitelt vizsgáltuk Parkinson-kóros betegektől származó agymintákon. Emellett különböző Braak stádiumú Alzheimer-kóros prefrontális cortex mintákon tanulmányoztuk a CB₁R sűrűséget.

A dopaminerg neurotranszmisszió megváltozása jelentős szerepet játszik a Parkinson-kór patogenezisében. Nem tisztázott azonban, hogy a dopamin receptorszám változása tényleges szignálátvitel-módosulással jár-e, vagy receptorszám csökkenés esetén a megmaradó dopamin receptorok funkcionális szempontból kompenzálnak-e. Kimutatták, hogy a striatalis struktúrák közül a nucleus caudatus jelentős frontális összeköttetései révén elsősorban kognitív, exekutív funkciókban vesz részt, valamint koaktivációt mutat cingularis területekkel is. Humán Parkinson-kórban a fenti agyterületek dopaminerg jelátvitelét illetően ismereteink hiányosak. Ennek megismerése a későbbiekben segítséget nyújthat a krónikus

dopaminerg kezelés kognícióra kifejtett hatásainak és mellékhatásainak megértésében Parkinson-kóros betegeknel.

Az endocannabinoid rendszer elsődleges szerepe a központi idegrendszerben a CB₁R-on keresztüli retrográd neuromoduláció, melynek legfontosabb formája az endocannabinoid-mediált hosszútávú depresszió (eCB-LTD). Az indirekt striatalis útvonalon a CB₁-D₂ dopamin receptorok együttműködésével létrejövő eCB-LTD fontos szerepet játszhat az extrapiramidális mozgásszervezésben, illetve a Parkinson-kór komplex patofiziológiájában. A striatalis eCB-LTD-vel analóg mechanizmust a prefrontalis cortexben is leírták. A dopamin és cannabinoid rendszer humán Parkinson-kórban bekövetkező egyidejű elváltozásainak tanulmányozása jelenleg is kutatás tárgyát képezi. A folyamat megismerésében alapvető jelentőségű a D₂ dopamin és CB₁ receptorsűrűség egyidejű vizsgálata, vagyis annak kiderítése, hogy a Parkinson-kórban bekövetkező D₂ dopamin receptorsűrűség-csökkenés társul-e CB₁R denzitás változással.

A hippocampusban és prefrontalis cortexban a preszinaptikus CB₁R-ok közreműködésével az endocannabinoid rendszer fontos szerepet tölt be a glutamaterg, GABAerg és nagy valószínűséggel a cholinerg jelátvitel szabályozásában, s ezáltal a kognitív folyamatokért felelős szinaptikus plaszticitás modulációjában. Alzheimer-kórban a szinaptikus plaszticitás már a β -amiloid depozitumok megjelenése előtt károsodik, mely tovább súlyosbodik a neuropatológiai eltérések progressziójával párhuzamosan. Feltételezhető tehát, hogy az endocannabinoid rendszer reagál a szinaptikus plaszticitásban bekövetkező változásokra, illetve a progrediáló neurodegeneratív folyamatokra, mely a CB₁R denzitás módosulásaiban is megnyilvánulhat. A betegség korai stádiumaiban, neuropatológiailag ép agyterületeken bekövetkező receptor eltérések azonosítása segíthet a betegség képalkotó módszerekkel történő mielőbbi diagnosztizálásában, feltárhatja az Alzheimer-kór patomechanizmusának eddig ismeretlen részleteit, továbbá az agykutatásban egyértelművé

teheti, hogy a Braak I-II stádiumú Alzheimer-kóros agyakból származó, neuropatológiailag még megkímélt agyterületeket minden esetben a kontrollcsoporttól külön kell-e választani.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Parkinson-kóros betegek és állatmodellek esetében igazolták, hogy a dopaminhiány a striatalis dopamin receptorok up-regulációját eredményezi, emellett a transzcelluláris szignálátvitel is megváltozik. Ismert, hogy a Parkinson-kór kezdeti stádiumában dopamin agonistákkal jelentős állapotjavulás érhető el és a dopaminerg kezelés a Parkinson-kór előrehaladtával is hatékony marad, ugyanakkor kifejezett mellékhatások is jelentkezhetnek. A jelen tanulmányban feldolgozott Parkinson-kóros agyminták olyan betegektől származtak, akik hosszas betegségük alatt rendszeres dopamin szubsztitúcióban részesültek. Korábban még sosem vizsgálták az agonista által stimulált dopamin D_2/D_3 receptor–G-protein kapcsolódást kezelt Parkinson-kór késői szakaszában humán agymintákon. **Célunk a striatalis és corticalis D_2/D_3 dopamin receptor–G-protein jelátvitel tanulmányozása volt a D_2/D_3 receptor denzitás változás függvényében azzal a központi kérdéssel, hogy hosszasan kezelt humán Parkinson-kórban fennállhat-e a dopaminhiányt kompenzáló intracelluláris jelátviteli mechanizmus.**

A dopamin és cannabinoid rendszer közötti kapcsolatot számos Parkinson-kóros állatmodellen, illetve néhány Parkinson-kóros betegről származó postmortem agymintán végzett kísérlet is igazolta. Mindazonáltal korábban sosem vizsgálták a D_2/D_3 és a CB_1 receptorsűrűséget krónikusan dopamin-szubsztituált Parkinson-kóros betegről származó postmortem agymintán. Vizsgálatainkat a két receptor típus között fennálló egyértelmű funkcionális kapcsolatra, valamint a glutamaterg és a GABAerg neuronokon jelen levő CB_1 és D_2 receptor koexpresszióra alapoztuk. **Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a striatalis**

dopamin D₂ receptordenzitás-csökkenés együttjár-e a CB₁ receptorsűrűség változásával humán Parkinson-kóros agymintákon.

Kutatásaink további részében, elsősorban a glutamaterg szinaptikus plaszticitás CB₁R-közvetített modulációjára alapozva megvizsgáltuk a CB₁R denzitás Alzheimer-kórban bekövetkező esetleges eltéréseit. Olyan agyi régiót kerestünk, amelyben a kezdeti stádiumokban (Braak I-II stádium) neuropatológiai érintettség nincs, de a szinaptikus plaszticitás már károsodott, illetve amelyben Braak III-IV stádiumban megjelennek a neurofibrilláris kötegek, amiloid plakkok és végstádiumban (Braak V-VI) pedig kifejezett degeneratív elváltozások észlelhetők. Választásunk a prefrontalis cortexre esett. **Vizsgálatainkkal választ kerestünk a kérdésekre, hogy a betegség korai szakaszában, a neuropatológiai érintettség megjelenése előtt észlelhető-e a szinaptikus plaszticitás károsodásával egyidejű CB₁R denzitás eltérés; az Alzheimer-kór különböző neuropatológiailag elkülöníthető stádiumaiban van-e a CB₁R sűrűséget érintő jellegzetes változás.**

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Agyminták

Vizsgálatainkat fagyasztott agyblokkokon végeztük. Hat Parkinson-kóros beteg és hat kontroll személy nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintáin vizsgáltuk a dopamin D₂/D₃ receptorsűrűséget, illetve receptor–G-protein jelátvitelt. A dopamin D₂/D₃ és a CB₁ receptordenzitást három Parkinson-kóros betegtől és három kontroll személytől származó nucleus caudatus és frontalis cortex mintán vizsgáltuk. A hat Parkinson-kóros betegből öt dopamin (L-DOPA) szubsztitúciós kezelésben részesült átlagban 7,25 ±

2,21 éven át (átlag $\pm$ SEM). Egy esetben az antiparkinson kezelésről nem volt információ. A Parkinson-kóros betegektől származó agyminták, a neuropatológiai vizsgálatok szerint szövettanilag diffúz Lewy-testes patológiát mutattak, súlyos neocorticalis érintettséggel, mely a Braak alfa-szinukelin V vagy VI stádiumnak felelt meg.

További kutatásaink során tizenegy Alzheimer-kóros betegről és hat kontroll személyről származó prefrontalis cortex (Brodmann area 10) mintán vizsgáltuk a CB₁R denzitást. Ezeket az agymintákat a Braak-féle neuropatológiai stádiumbeosztásnak megfelelően Braak I-II (korai, tünetmentes stádiumok – ép prefrontalis cortex; három minta), a Braak III-IV (enyhe kognitív hanyatlás – kezdődő prefrontális érintettség; négy minta) és Braak V-VI (végstádium, dementia – súlyos prefrontalis érintettség; négy minta) csoportokba soroltuk.

A kontroll agyminták neurológiai, illetve pszichiátriai betegségben nem szenvedő személyektől származtak és nem mutatták neurodegeneráció jeleit a kórszövettani vizsgálaton.

3.2. Dopamin D₂/D₃ receptor autoradiográfia

A dopamin D₂/D₃ receptorsűrűséget hagyományos autoradiográfiával vizsgáltuk, [³H]raclopride-t használva radioligandumként. A radioizotóppal jelölt mintákat trícium szenzitív phosphorimager plate-re (Fujifilm Plate BAS-TR2025) helyeztük melyek beolvasása Fujifilm BAS-500 phosphorimager-rel (Fujifilm, Tokyo) történt. Majd denzitometriás méréseket végeztünk Multi Gauge 3.2 phosphorimager szoftverrel. A radioaktivitás mértékének kvantifikálásához a jelölt metszetekkel együtt autoradiográfiás célra kifejlesztett [³H] microskalákat (RPA510, Batch 18, Amersham) helyeztünk a platekre. A skála egységein mért optikai denzitás értékeket megfeleltettük az egységek ismert radioaktív koncentrációinak (nCi/mg), majd ezt átalakítottuk [³H] pmol/gram szövet koncentrációvá. Az optikai

denzitások és a megfelelő pmol/gramm szövet értékek felhasználásával megalkottuk a kvantifikáláshoz szükséges grafikont, illetve átalakítási képletet. A nem-specifikus receptor kötődést 10 μ M izotóppal nem jelölt raclopride jelenlétében határoztuk meg. Mintánként két párhuzamos mérést végeztünk, az azonos betegtől származó totális és nem-specifikus kötődéseket átlagoltuk. A kapott értékek közötti különbséggel számszerűsítettük a ligandum specifikus kötődésének mértékét. Végül a különböző betegek, illetve kontrollszemélyek megegyező agyi régióiból származó specifikus kötődések átlagértékét számoltuk ki és ezek alapján értékeltük eredményeinket.

3.3. Dopamin receptor stimulált [35 S]GTP γ S kötődési autoradiográfia

A dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein jelátvitelt a bazális és dopamin által stimulált [35 S]GTP γ S kötődési (funkcionális) autoradiográfiával vizsgáltuk. A jelölt metszeteket β -sugárzás detektálására alkalmas speciális filmekre (Kodak BiomaxMR, Sigma-Aldrich) exponáltuk [14 C] kalibrációs microskálákkal együtt a későbbi kvantifikálás érdekében (American Radiolabelled Chemicals Inc, St Louis). A filmek előhívása után az autoradiogramok digitalizálása következett, melyet nagyfelbontású szkennelrel (Epson Perfection V750 Pro) végeztünk, majd a denzitometriás mérések következtek az Adobe Photoshop CS2 nevű számítógépes programmal. A [35 S]GTP γ S kötődés kvantifikálásához előbb a [14 C] microskálák egységein mért optikai denzitás értékeket megfeleltettük az egységek, gyártó által megadott radioaktivitásnak nCi/mg-ban kifejezve. Figyelembe véve a [35 S]GTP γ S specifikus aktivitását, a skálán mért [14 C] izotóp nCi/mg értékéket átalakítottuk a [35 S] izotóp pmol/gramm szövet mennyiségbe. Az így kapott skála pmol/gramm szövet egységeit és a megfelelő optikai denzitásokat grafikonon ábrázoltuk, ezáltal megkapva az agymintákon mért optikai denzitások pmol/gramm szövet alakításához szükséges képletet. Mintánként két párhuzamos mérést végeztünk, ezeket átlagoltuk, majd a különböző betegek,

illetve kontrollszemélyek megegyező agyi régióiból származó méréseket is átlagolva értékeltük eredményeinket.

3.4. CB₁R autoradiográfia

A CB₁R denzitást a nemrégiben kifejlesztett, CB₁R specifikus [¹²⁵I]SD7015 nevű ligandummal végeztük. A nem-specifikus kötődés mértékét 10 µM rimonabant hozzáadásával határoztuk meg. A radioliganddal jelölt metszeteket szintén [¹⁴C] kalibrációs skálákkal együtt exponáltuk a β-sugárzás detektálására alkalmas speciális filmekre 24 órán át (Kodak BiomaxMR, Sigma-Aldrich). A filmek további feldolgozása a fentiekben ismertetett módon történt. A CB₁R denzitás kvantifikálásához a gyártó által megadott [¹⁴C] skála egységeinek standard radioaktivitását átalakítottuk ekvivalens szöveti [¹²⁵I] koncentrációvá, melyet a [¹²⁵I] egységnyi szöveti területen egységnyi idő (1 perc) alatt bekövetkező hasadásainak mennyiségével (disintegrations per minute per mm² – DPM/mm²) fejeztünk ki.

A Parkinson-kóros és kontroll nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis mintákon két-két párhuzamos mérés, míg az Alzheimer-kóros és kontroll mintáknál négy-négy párhuzamos mérés történt egymást követő metszeten. A specifikus kötődés kiszámítása és az eredmények értékelése a D₂/D₃ receptorsűrűség vizsgálatánál részletezett módszer szerint történt.

4. EREDMÉNYEK

Kutatásaink exploratív jellegűek voltak. A különböző mintacsoportokban vizsgált viszonylag alacsony darabszámok miatt eredményeink alapján definitív következtetések nem vonhatók. Ezekre való tekintettel adataink statisztikai elemzésétől eltekintettünk.

4.1. Dopamin D₂/D₃ receptorsűrűség Parkinson-kórban

A kontroll nucleus caudatus mintákban jelentősen nagyobb dopamin D₂/D₃ receptorsűrűséget találtunk, mint ugyanezen régió Parkinson-kóros betegektől származó mintacsoportjában ($24,08 \pm 2,06$ fmol/g szövet, illetve $18,43 \pm 2,82$, átlag $\pm$ SEM). A dopamin D₂/D₃ receptordenzitást illetően sem a gyrus frontalis medialis, sem a gyrus cinguli nem mutatott érdemi különbséget a kontroll és Parkinson-kóros csoport között.

4.2. Dopamin által stimulált receptor – [³⁵S]GTP γ S kötődés Parkinson-kórban

A bazális (dopamin hiányában történő) [³⁵S]GTP γ S kötődést illetően a kontroll és Parkinson-kóros nucleus caudatus minták közel azonos szintű bekötődést (199 ± 17 fmol/g és 198 ± 21 fmol/g, átlag $\pm$ SEM), míg a frontalis és cingularis régióknál a Parkinson-kóros minták átlagértékei megközelítőleg 15%-kal magasabb bekötődést mutattak.

A dopamin által stimulált receptor–[³⁵S]GTP γ S kötődés átlagolt értéke a nucleus caudatusban a kontroll és Parkinson-kóros csoportok esetében közel azonos szinten volt (210 ± 15 fmol/g és 215 ± 25 fmol/g), a gyrus frontalis medialis és a gyrus cinguli esetében Parkinson-kórban enyhe növekedés mutatkozott.

4.3. Dopamin D₂/D₃ receptorsűrűség és dopamin által stimulált receptor– [³⁵S]GTP γ S kötődés összevetése

A D₂/D₃ dopamin receptorok sűrűsége a Parkinson-kóros betegektől származó nucleus caudatus mintákban lényegesen csökkent a kontrollokhoz viszonyítva ($24,08 \pm 2,06$ fmol/g szövet és $18,43 \pm 2,82$ fmol/g szövet, átlag $\pm$ SEM), ugyanakkor a dopamin által stimulált receptor–[³⁵S]GTP γ S kötődés a kontroll és Parkinson-kóros csoportok között közel azonos szinten volt (210 ± 15 fmol/g és 215 ± 25 fmol/g). Ez arra utal, hogy Parkinson-kórban a nucleus caudatusban a csökkent receptorsűrűség ellenére a jelátvitel kontroll szinten marad.

A gyrus frontalis medialisban és gyrus cinguliban mért D₂/D₃ dopamin receptor–G-protein jelátvitelt illetően a Parkinson-kóros mintacsoportok kissé magasabb átlagértékei nem tekinthetők lényeges különbségnek, részben az alacsony mintaszám, részben az adatok nagy szórása miatt.

4.4. Dopamin D₂/D₃ receptor és CB₁R denzitás Parkinson-kórban

Összehasonlítva az ugyanazon mintákon mért dopamin D₂/D₃ és CB₁ receptorsűrűségeket, a Parkinson-kóros nucleus caudatusban eredményeink a dopamin D₂/D₃ receptor denzitás jelentősen csökkenését mutatják ($30,26 \pm 2,48$ fmol/g, illetve $12,84 \pm 5,49$ fmol/g, átlag $\pm$ SEM) változatlan CB₁R denzitás mellett (kontroll: $16,66 \pm 2,69$ DPM/mm², illetve Parkinson-kór: $18,30 \pm 3,60$ DPM/mm², átlag $\pm$ SEM). A kontroll és Parkinson-kóros gyrus frontalis medialis minták esetében a vizsgált receptorok denzitása közel azonos szinten volt.

4.5. CB₁R denzitás Alzheimer-kórban

A Braak I-II csoportban találtuk a legmagasabb CB₁R sűrűséget (kontroll: $19,70 \pm 3,48$ DPM/mm², Braak I-II: $26,04 \pm 5,28$ DPM/mm², átlag $\pm$ SEM). Ez különösen érdekes annak fényében, hogy ezekben a stádiumokban a prefrontalis cortex neuropatológiai szempontból még érintetlen. Másrésről eredményeink azt sugallják, hogy az Alzheimer-kór progressziója során a prefrontalis CB₁R denzitás folyamatosan csökken, azonban a végstádiumokban (Braak V-VI) is legalább kontroll szinten marad ($22,25 \pm 7,62$ DPM/mm², átlag $\pm$ SEM).

Korábbi kutatásokban az Alzheimer-kóros Braak I-II stádiumú agyakból származó, neuropatológiailag még érintetlen mintákat a kontrollcsoportba sorolták. Ezért kiszámoltuk, hogyha a Braak I-II-es Alzheimer-kóros prefrontalis mintákat egy csoportba tesszük a kontrollokkal, ezek összevetése a többi Alzheimer-kóros mintacsoporttal elfedhet lényeges

különbségeket a tényleges kontroll és Alzheimer-kóros minták között. Ugyanakkor a korai szakaszban bekövetkező elváltozások rejtettek maradhatnak (kontroll és Braak I-II: $22,87 \pm 4,96$, DPM/mm², Braak III-VI: $23,51 \pm 7,52$ DPM/mm², átlag $\pm$ SEM). Eredményeink arra utalnak, hogy a jövőben a Braak I-II-es Alzheimer-kóros agyakból származó mintákat a kontrollcsoporttól külön kell vizsgálni.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Dopamin D₂/D₃ receptor – G-protein jelátvitel vizsgálata előrehaladott Parkinson-kórban

Eredményeink, a korábbi kutatásokkal egybehangzóan alátámasztják, hogy a krónikusan dopaminerg-szubsztituált Parkinson-kórban a striatalis dopamin D₂/D₃ receptordenzitás lecsökken. Ennek hátterében a krónikus L-DOPA kezelés által előidézett emelkedett dopamin szint állhat, mely receptor down-regulációhoz vezet.

A D₂ dopamin receptorok hiperszenzitivitását állatmodelleken már a Parkinson-kór korai stádiumában kimutatták. Ezt a jelenséget is a dopaminhiányra adott poszt-szinaptikus funkcionális kompenzatórikus mechanizmusként tartják számon. Ismereteink szerint **jelen tanulmány elsőként vizsgálta postmortem humán Parkinson-kóros nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis, és gyrus cinguli mintákon a dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein kapcsolódás és dopamin D₂/D₃ receptordenzitás viszonyát kezelt Parkinson-kór késői szakaszában.**

Emberi Parkinson-kóros agymintákon elsőként írtuk le, hogy a nucleus caudatusban a csökkent dopamin D_2/D_3 receptor populáció kontroll szinten tartja a D_2/D_3 receptor–G-protein jelátvitelt. Eredményeink a megmaradt D_2/D_3 receptorok fokozott szenzitivitására és a Parkinson-kór teljes lefolyása alatt fennálló funkcionális kompenzáció jelenlétére utalnak. A korai dopamin receptor up-reguláció és fokozott jelátvitel magyarázhatja a L-DOPA kezelés kifejezett hatékonyságát Parkinson-kór kezdeti szakaszában. Másrészt a megtartott D_2/D_3 receptor szenzitivitás (vagyis a maradék D_2/D_3 receptorok hiperszenzitivitása) felelős lehet a krónikus kezelés során fellépő mellékhatások, a diszkinéziák megjelenésében. Utóbbi magyarázata a dopaminerg terminálisok kifejezett csökkenése miatt bekövetkező normális szinaptikus dopamin szint szabályozás kiesése lehet.

A korábbi vizsgálatoknak megfelelően, a gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli minták esetében kutatásunk során nem találtunk érdemi különbséget a dopamin D_2/D_3 receptordenzitásban Parkinson-kóros és kontroll minták között. Ugyanakkor Parkinson-kórban mindkét régióban a D_2/D_3 receptor–G-protein kötődés enyhe növekedése látszott. Ennek magyarázata úgy lehetséges, hogyha elfogadjuk, hogy a dopamin receptorsűrűség az aktív receptor stimuláció függvénye, melyhez Parkinson-kórban hozzáadódik a dopaminerg terminálisok fogyatkozása miatt bekövetkező szinaptikus dopaminszint diszreguláció. Az így létrejövő nem optimális dopaminerg stimulus ugyan elegendő lehet a dopamin D_2/D_3 receptorsűrűség szintentartásához, de mivel nem biztosít megfelelő szintű jelátvitelt enyhe hiperszenzitivitáshoz vezethet.

5.2. Cannabinoid 1-es típusú receptor denzitás vizsgálata Parkinson-kórban

Korábbi kutatásokra hivatkozva megállapítható, hogy az indirekt és direkt striatalis útvonal zavartalan működéséhez szükséges mind a dopaminerg, mind a cannabinoid rendszer épsége. A striatalis dopaminerg-cannabinoid egyensúly felborulása és a szinaptikus

plaszticitás (pl. eCB-LTD) megfelelő szabályozásának megszűnése a Parkinson-kór patofiziológiájának fontos összetevője lehet. Vizsgálataink során a Parkinson-kóros nucleus caudatusban a D₂/D₃ receptorsűrűség jelentős csökkenését észleltük, viszont a CB₁R denzitást illetően nem találtunk érdemi változást. A gyrus frontalis medialis esetében nem találtunk érdemi változást a vizsgált receptor típusokat illetően Parkinson-kórban. **Elsőként írtuk le, hogy Parkinson-kórban a krónikus L-DOPA kezelés és hosszú kórlefolyás ellenére is a nucleus caudatusban és gyrus frontalis medialisban a CB₁R populáció érintetlen marad.**

Az általunk talált ép CB₁R populáció egyik lehetséges magyarázata, hogy a neurodegeneráció mellett az inaktív („tartalék”) CB₁R-ok reaktív elváltozásai következnek be, melyek elfedhetik az esetleges receptorsűrűség-csökkenést. Másrészt viszont valószínűbb, hogy Parkinson-kórban a receptort expresszáló striatalis GABAerg tüskés neuronok, illetve corticostriatalis glutamaterg terminálisok nem károsodnak számottevően, így az általuk expresszált CB₁R populáció érintetlen marad. Mindemellett gyanítható, hogy exogén dopaminerg terápiával nem biztosítható a normális működéshez optimális D₂ receptor stimuláció, illetve a dopamin-cannabinoid „szinergizmus” általi megfelelő excitatórikus jelátvitelmoduláció sem. Végösszefoglalásaként az eredményeink összefoglalásaként az körvonalazódik, hogy Parkinson-kórban a down-regulálódott hiperszenzitív dopamin D₂/(D₃) receptor populáció exogén stimulálása feltehetően nem elégséges, vagy nem alkalmas a corticostriatalis terminálisokon az eCB-LTD optimális kiváltására. Ugyanakkor a dopaminerg kezelés által biztosított dopamin szint a retrográd moduláció bizonyos fokú funkcionalitásához, s ezáltal a CB₁R populáció szintentartásához elegendő lehet. Ezen felvetések tisztázása további kutatásokat igényel.

5.3. Cannabinoid 1-es típusú receptor denzitás vizsgálata Alzheimer-kóros humán prefrontalis cortex mintákon

Eredményeink összességben a CB₁R up-regulációra utalnak az Alzheimer-kór korai stádiumaiban, melyet folyamatos receptorsűrűség csökkenés követ a betegség progressziója során. Ennek hátterében többféle mechanizmus lehet. Korábban más szerzők megállapították, hogy az Alzheimer-kór kezdetén fokozódik a szinaptogenézis, s ezáltal a glutamaterg és cholinerg jelátvitel is. Lehetséges tehát, hogy az újabb szinaptikus kapcsolatok keletkezésével párhuzamosan növekszik a preszinaptikus terminálisokon expresszált CB₁R-ok száma is. Másrészt előfordulhat, hogy hosszas hiperexcitáció esetén a felszabaduló nagy mennyiségű endocannabinoid teljesen blokkolja az inhibitoros működéseket. Ezért a preszinaptikus GABAerg CB₁R telítettség csökkentése érdekében GABAerg CB₁R up-reguláció következhet be. Utóbbi heteroszinaptikus mechanizmus elképzelhető a cholinerg terminálisokon is. További lehetőségként felvetődik a CB₁R, valamint acetilkolin és/vagy metabotróp glutamát receptorok közötti heteromerizáció is, mely által a CB₁R egy károsodott jelátvitel direkt intracelluláris javításában/szabályozásában játszhat szerepet. Végősoron felmerülhetnek eddig nem tisztázott mechanizmusú CB₁R-t is involváló reaktív neuroprotektív folyamatok is. Kutatásaink exploratív jellegének értelmében nem a pontos mechanizmus megállapítása volt a célunk, hanem, hogy rámutassunk a CB₁R populáció igen valószínű érintettségére Alzheimer-kórban, a pontos mechanizmusok tisztázása a jövőbeni kutatások feladata lesz.

Eredményeink a CB₁R populáció lassú csökkenésére utalnak az Alzheimer-kór progressziója során. Ennek hátterében a CB₁R-kat expresszáló idegsejteket érintő kifejezett degeneratív, illetve gyulladásos folyamatok állhatnak. Mindemellett a CB₁R populáció még végstádiumban sem csökkent kontroll szint alá, ezért a későbbiekben lehetséges terápiás célpontot jelenthet.

A neuropatológiailag érintetlen Braak I-II stádiumú Alzheimer-kóros prefrontális cortexben CB₁R up-regulációt valószínűsítünk, mely a neurodegeneráció során fellépő

szignálátviteli zavarokra (elsősorban cholinerg, glutamaterg) adott funkcionális válasz része lehet. Mindez nyomatékosítja, hogy a korábbi kutatásokkal ellentétben a jövőben a kezdeti Braak stádiumokba (I. és II.) sorolt Alzheimer-kóros agyak minden neuropatológiailag érintetlen régióját a kontrollcsoporttól külön kell vizsgálni. Ezáltal tanulmányozhatóak lesznek az endocannabinoid rendszer, valamint más receptor rendszerek neurodegeneratív folyamatokra adott, neurotranszmissziót, illetve neuroprotekción befolyásoló korai válaszreakciói.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Elsőként írtuk le, hogy hosszú lefolyású Parkinson-kórban, humán nucleus caudatusban a krónikus L-DOPA kezelés mellett a dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein jelátvitel kontroll szinten marad, míg a D₂/D₃ receptordenzitás jelentősen csökken. A Parkinson-kóros gyrus frontalis medialisban és gyrus cinguliban a dopamin D₂/D₃ receptoron történő jelátvitel lehetséges enyhe növekedése látszott ép D₂/D₃ receptorsűrűség mellett. Mindez arra utal, hogy Parkinson-kórban a különböző agyi régiókban a dopaminerg rendszerérintettsége eltérő súlyosságú. Vizsgálataink további részletekkel szolgálhatnak a hosszútávú antiparkinson terápia során fellépő diszkinéziák lehetséges mechanizmusáról is.

Emberi agymintákon elsőként írtuk le, hogy Parkinson-kórban hosszútávú dopaminerg kezelés mellett a CB₁R sűrűsége a nucleus caudatusban és a gyrus frontalis medialisban változatlan marad. A nucleus caudatusban ugyanakkor a dopamin D₂/D₃ receptor denzitás jelentősen lecsökkent. Eredményeink azt sugallják, hogy Parkinson-kórban a dopamin rendszer károsodása miatt a striatalis dopaminerg-eCB neurotranszmisszió egyensúlyán alapuló eCB-mediált szinaptikus plaszticitás zavart szenved. Úgy tűnik azonban, hogy ez nem társul a CB₁R sűrűséget érintő reaktív elváltozással.

Elsőként írtuk le humán Alzheimer-kóros prefrontalis cortexben, hogy már a neuropatológiai elváltozások megjelenése előtt a CB₁R populáció up-regulálódik, mely az endocannabinoid rendszer korai érintettségét jelzi. Ennek magyarázata a betegségben leghamarabb jelentkező neurotranszmissziós zavar lehet. Elsőként utalunk arra, hogy Braak I-II stádiumú Alzheimer-kóros agyak neuropatológiai érintetlen területei a korábbi tanulmányokkal ellentétben a kontrollcsoporttól külön vizsgálandók. A prefrontalis CB₁R sűrűség az Alzheimer-kór végstádiumaiban sem került kontroll szint alá. Az épek látszó CB₁R populáció a széleskörű központi idegrendszeri és immunológiai összeköttetései révén a jövőben a betegség kezelésének egyik célmolekulája lehet.

Iktatószám: DEENKÉTK/49/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Farkas Szabolcs

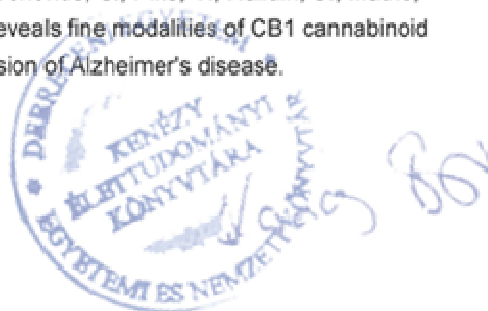
Neptun kód: ODKCU3

Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10035985

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Farkas, S.**, Nagy, K., Jia, Z., Hortobágyi, T., Varrone, A., Halldin, C., Csiba, L., Gulyás, B.: Signal transduction pathway activity compensates dopamine D2/D3 receptor density changes in Parkinson's disease: A preliminary comparative human brain receptor autoradiography study with [3H]raclopride and [35S]GTPgammaS.
Brain Res. 1453, 56-63, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.014>
IF:2.879
2. **Farkas, S.**, Nagy, K., Jia, Z., Harkány, T., Palkovits, M., Donohou, S.R., Pike, V., Halldin, C., Máthé, D., Csiba, L., Gulyás, B.: The decrease of dopamine D2/D3 receptor densities in the putamen and nucleus caudatus goes parallel with maintained levels of CB1 cannabinoid receptors in Parkinson's disease: A preliminary autoradiographic study with the selective dopamine D2/D3 antagonist [3H]raclopride and the novel CB1 inverse agonist [125I]SD7015.
Brain Res. Bull. 87 (6), 504-510, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.02.012>
IF:2.935
3. **Farkas, S.**, Nagy, K., Palkovits, M., Kovács, G.G., 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.
Neurochem. Int. 60 (3), 286-291, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2011.11.004>
IF:2.659



További Közlemények

4. **Farkas, S.**, Molnár, S., Nagy, K., Hortobágyi, T., Csiba, L.: Comparative in vivo and in vitro postmortem ultrasound assessment of intima-media thickness with additional histological analysis in human carotid arteries.
In: *Perspectives in Medicine : New Trends in Neurosonology and Cerebral Hemodynamics - an Update* Vol.1. Ed.: Eva Bartels, Susanne Bartels, Holger Poppert, Elsevier, Amsterdam, 170-176, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parmed.2012.02.050>
5. 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. 192 (1), 17-21, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.005>
IF 2.1
6. Csiba, L., **Farkas, S.**: How do stroke units enhance stroke recovery?
Exp. Rev. Neurother. 9 (4), 431-434, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/ERN.09.13>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10.573

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8.473**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.10

