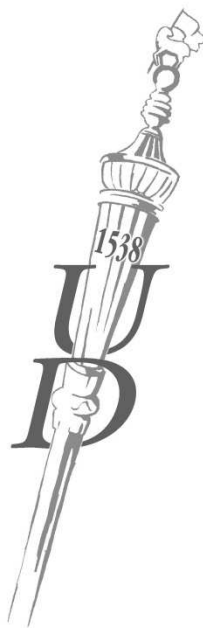


EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Farkas Szabolcs

Témavezető: Dr. Csiba László



**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2014

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG – 2-arachidonoilglicerol

6-OHDA – 6-hidroxidopamin

7-OH-DPAT – 7-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralin

delta(9)-THC – delta(9)-tetrahidrokannabinol

AADC - aromás l-aminosav dekarboxiláz

ACEA – arachidonil-2-kloroetilamid

AD – Alzheimer's disease

AEA - anandamide vagy N-arachidonoiletanolamid

AMPA receptor – α -amino-3-hidroxi-5-methyl-4-isoxazolpropionsav receptor

APP – amiloid prekursor protein

BDNF – agyi eredetű neurotróf faktor

BSA – marha szérumalbumin

cAMP - ciklikus adenzin-monofoszfát

CB₁R – cannabinoid 1-es típusú receptor

CB₂R – cannabinoid 2-es típusú receptor

CCK – kolecisztokinin

DAT – dopamin transzporter

DPM/mm² – bomlás per perc per négyzetmilliméter

DSE – serkentés depolarizációval kiváltott csökkentése (depolarization-induced suppression of excitation)

DSI – gátlás depolarizációval kiváltott csökkentés (depolarization-induced suppression of inhibition)

DTT – DI-ditiotreitol

eCB-LTD – endocannabinoid-mediált hosszútávú depresszió

EGTA – etilén glikol tetraecetsav

EPSP – serkentő posztzinaptikus potenciálok

ERK – extracelluláris szignál-regulált kináz

GABA – gamma-amino-vajsav

GDP – guanozin-difoszfát

GPCR – G-proteinnel kapcsolt receptor

GPe – globus pallidus externus

GPi – globus pallidus internus

GTP – guanozin-trifoszfát

GTP γ S – guanozin 5'-O-[gamma-tio]trifoszfát

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

I-LTD – gátlást gátló hosszú távú depresszió (inhibitory long-term depression)

KIR – központi idegrendszer

KRH – Krebs-Ringer-HEPES

L-DOPA – levodopa

LTD – serkentés hosszútávú depressziója (long-term depression)

LTP – hosszútávú potenciáció (long-term potentiation)

MAPK – mitogén-aktivált protein-kináz

mGluR – metabotróp glutamát receptor

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

MR – mágneses rezonancia

mRNS – hírvivő ribonukleinsav

NMDA receptor – N-metil-D-aszpartát receptor

NPI – Neuropszichiátriai Kérdőív (Neuropsychiatric Inventory)

PD – Parkinson's disease

PET – pozitron emissziós tomográfia

PK – Parkinson-kór

PKA – protein-kináz A

PSM – periszinaptikus szignalizációs rendszer

sAPP α – szolubilis amiloid prekursor protein alfa

SCH23390 – 7-kloro-3-metil-1-fenil-1,2,4,5-tetrahidro-3-benzazepin-8-ol

SNC – substantia nigra pars compacta

SNr – substantia nigra pars reticulata

SPECT - egyfoton-kibocsátásos számítógépes metszefelvétel

THC – tetrahidrocannabinol

TRIS – Trisz(hidroximetil)-aminometán

VTA – ventralis tegmentalis area

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
TARTALOMJEGYZÉK	5
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	15
2.1. Dopamin D ₂ receptorsűrűség és jelátvitel Parkinson-kórban	15
2.1.1. Parkinson-kór	15
2.1.2. Parkinson-kór és a D ₂ -es dopamin receptor kapcsolata	16
2.2. Cannabinoid 1-es típusú receptor és dopamin D ₂ receptor Parkinson-kórban	19
2.2.1. A cannabinoid 1-es típusú receptor	19
2.2.2. Dopamin és cannabinoid rendszer közötti kölcsönhatások	22
2.2.2.1. Indirekt kapcsolat a basalis ganglionok szintjén	25
2.2.2.2. Direkt intraszinaptikus kapcsolat a striatumban	27
2.2.2.3. Direkt intraszinaptikus kapcsolat a frontális cortexben	28
2.2.2.4. Lehetséges intracelluláris kapcsolat: receptor heteromerizáció	29
2.2.3. Cannabinoid 1-es típusú receptor Parkinson-kórban: korábbi vizsgálatok	31
2.3. A cannabinoid 1-es típusú receptor a prefrontális cortexben Alzheimer kórban	32
2.3.1. Alzheimer-kór	32

2.3.2. Cannabinoid 1-es típusú receptor a prefrontalis cortexben	34
2.3.3. Cannabinoid 1-es típusú receptor és Alzheimer-kór kapcsolata	35
2.3.3.1. CB ₁ R és a glutamaterg mechanizmusok kapcsolata	35
2.3.3.2. CB ₁ R és a cholinerg rendszer kapcsolata	38
2.3.3.3. Cannabinoid neuroprotekción	39
2.3.3.4. CB ₁ R Alzheimer-kórban: korábbi vizsgálatok	40
3. CÉLKITŰZÉSEK	42
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	45
4.1. Agyminták	45
4.2. Dopamin D ₂ /D ₃ receptor autoradiográfia	48
4.3. Dopamin által stimulált receptor–[³⁵ S]GTPγS kötődési autoradiográfia	49
4.4. CB ₁ R autoradiográfia	50
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. Dopamin D ₂ /D ₃ receptor sűrűség és dopamin által stimulált receptor–[³⁵ S]GTPγS kötődés	53
5.1.1. Dopamin D ₂ /D ₃ receptorsűrűség Parkinson-kórban	53
5.1.2. Dopamin által stimulált receptor–[³⁵ S]GTPγS kötődés Parkinson-kórban	55
5.1.3. Dopamin D ₂ /D ₃ receptorsűrűség és dopamin által stimulált receptor–[³⁵ S]GTPγS kötődés összevetése	59

5.2. Dopamin D ₂ /D ₃ receptor és CB ₁ R denzitás Parkinson-kórban	60
5.3. CB ₁ R denzitás Alzheimer-kórban	67
6. MEGBESZÉLÉS	71
6.1. A dopamin D ₂ /D ₃ receptor–G-protein jelátvitel vizsgálata előrehaladott Parkinson-kórban	71
6.1.1. A dopamin D ₂ /D ₃ receptor–G-protein jelátvitel a nucleus caudatusban	72
6.1.2. A dopamin D ₂ /D ₃ receptor–G-protein jelátvitel a frontalis cortexben	73
6.1.3. A dopamin D ₂ /D ₃ receptor–G-protein jelátvitel a gyrus cinguliban	74
6.2. Cannabinoid 1-es típusú receptordenzitás vizsgálata Parkinson-kórban	75
6.2.1. CB ₁ R és D ₂ /D ₃ dopamin receptordenzitás a striatumban	76
6.2.2. CB ₁ R és D ₂ /D ₃ dopamin receptordenzitás a frontalis cortexben	79
6.3. Cannabinoid 1-es típusú receptordenzitás vizsgálata Alzheimer-kóros humán prefrontalis cortex mintákon	79
6.3.1. A CB ₁ R up-reguláció lehetséges mechanizmusai korai Alzheimer-kórban	80
6.3.2. A CB ₁ R denzitás változása és ennek klinikai jelentősége progrediáló Alzheimer-kórban	84
6.3.3. Új irány az Alzheimer-kór Braak I-II-es stádiumának vizsgálatában	86
7. ÖSSZEFOGLALÁS	88
8. SUMMARY	89

9. HIVATKOZÁSOK	90
10. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	129
11. TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	130
12. TÁRGYSZAVAK	131
13. SAJÁT MUNKA	132
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	132
15. FÜGGELÉK	134

1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszer morfológiai és funkcionális feltérképezésében kulcsszerepet játszik az információátvitelben résztvevő receptorok azonosítása, az egyes típusok eloszlásának kvalitatív és kvantitatív jellemzése. A receptor vizsgálatok eredményei mind az agykutatás, mind a klinikai orvostudomány számára igen fontosak.

A neuroreceptorok vizsgálhatóak *in vivo* és *in vitro* módszerekkel. Az *in vivo* technikák, mint a PET (pozitron emissziós tomográfia), SPECT (egyfoton-kibocsátásos számítógépes metszetfelvétel) forradalmi változásokat hoztak a diagnosztika, a gyógyszerfejlesztés és a farmakológia területein (Gulyás, 1997). Mindazonáltal a receptor-eloszlás megállapítására leggyakrabban alkalmazott *in vitro* módszerek (autoradiográfia, *in situ* hibridizáció, immunhisztokémia) nagyobb felbontással és adott esetben finomabb kvantitatív érzékenységgel rendelkeznek *in vivo* társaiknál.

Az kutatásaink során alkalmazott vizsgálati módszer az autoradiográfia volt, melynek alapja, az *in vivo* (PET, SPECT) képalkotáshoz hasonlóan a különböző ligandok radioizotópokkal történő jelölése. Ez a technika a szilárd targethez kötődött radioaktívan jelölt molekulák filmmel vagy fotoemulzióval történő detektálását jelenti. Egyik formája az idegtudományokban széleskörben használt receptor vagy radioligand autoradiográfia, mellyel a radioaktívan jelölt receptor ligandok kötődési helye tüntethető fel állati vagy emberi agymintákon. *In vitro* módszerként előnyei a nagy felbontás, kvalitatív és kvantitatív analízis, könnyű farmakológiai elemzés lehetősége, jó receptor diszkrimináció. A receptor autoradiográfia segítségével specifikusan, igen nagy pontossággal leírható és mérhető a receptorok denzitása különböző agyi régiókban (Björklund és Lindvall, 1984). Továbbá alkalmas a gyógyszerjelöltek korai szűrésére, elemezhető egészséges és kóros körülmények között új radioligandok viselkedése is, mely alapvető információkat szolgáltat a radioligand

validálásához, későbbi *in vivo* felhasználásához. Másik formája a funkcionális autoradiográfia, vagy pontosabb kifejezéssel élve a [³⁵S]GTPγS kötődési autoradiográfia, melynek segítségével a G-proteinhez kapcsolt receptorok jeleníthetők meg. A hagyományos autoradiográfiával szemben utóbbi módszerrel csak a ténylegesen G-proteinnel kölcsönható, tehát funkcióképes receptorokat lehet detektálni. A módszer alapja, hogy a receptorokhoz kötődő agonisták hatására a G-proteinek guanin-nukleotid cseréje felgyorsul, a receptor aktiváció konformáció változást indukál a G-proteinben, melynek hatására a G-proteinről az addig hozzákapcsolt GDP disszociál és helyette GTP kötődik. A [³⁵S]GTPγS kötődési autoradiográfia esetében a GTP [³⁵S]GTPγS-sel van helyettesítve, mely nem hidrolizálható, így stabilan kötődik a G-proteinhez (Sóvágó és mtsai, 2001). Vizsgálataink során hagyományos receptor autoradiográfiát alkalmaztunk a dopamin D₂/D₃ receptorok és a CB₁R denzitás vizsgálatára, illetve [³⁵S]GTPγS funkcionális autoradiográfiát a dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein közötti jelátvitel vizsgálatára.

A dopamin receptorrendszer szerepet játszik a mozgás-koordinációban, a motoros funkciók kivitelezésében és egyre több eredmény bizonyítja szerepét bizonyos magasabb rendű agyi funkciók szabályozásában (procedurális tanulás, munkamemória, célorientált cselekvésszervezés, exekutív funkciók) (Grahn és mtsai, 2008). A dopaminerg neurotranszmisszió megváltozása jelentős szerepet játszik a Parkinson-kór patogenezisében. Klinikai jelentősége miatt a dopaminerg rendszer az idegtudományi kutatás központi témája, számos kérdés azonban jelenleg is megválaszolatlan. Nem tisztázott például, hogy Parkinson-kórban a dopamin receptorsűrűség csökkenése (Alexander és mtsai, 1993; Antonini és mtsai, 1994, 1997; Blanchet és mtsai, 1995; Elsworth és mtsai, 1998; Guttman, 1992; Kaasinen és mtsai 2000; Kassiou és mtsai, 2009; Lee és mtsai, 1978; Linazasoro és mtsai, 1999; Reches és mtsai, 1984; Rinne és mtsai, 1983, 1995; Scherfler és mtsai, 2006; Wenning és mtsai, 1998) tényleges szignálátvitel módosulással jár-e, illetve, hogy receptorszám-csökkenés esetén a

megmaradó receptorok funkcionális szempontból kompenzálnak-e. Elfogadott, hogy a striatalis struktúrák közül a putamen corticalis kapcsolataival együtt a motoros szabályozásért (végrehajtásért) felelős, míg a nucleus caudatus jelentős frontális összeköttetései révén elsősorban kognitív, exekutív funkciókban vesz részt, valamint koaktivációt mutat cingularis területekkel is (Grahn és mtsai, 2008). 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 betegeknél.

A cannabinoid rendszer pontos megismerése a humán idegrendszeri kutatások egyik aktuális kérdése. A cannabinoidok elsődleges szerepe a központi idegrendszerben a CB₁R-on keresztüli retrográd neuromoduláció, mely által különböző neurotranszmitterek felszabadulását szabályozzák (Freund és mtsai, 2003). Elfogadott, hogy az endocannabinoidok az inhibitoros és excitatórikus szinapszisokban retrográd jelátvivő molekulaként funkcionálnak a különböző agyterületekben (pl. neocortex, prefrontalis és limbikus kéreg, hippocampus, középgagy és striatum). Ez a CB₁R-közvetített endocannabinoid hatás lehet átmeneti vagy hosszantartó. Ennek megfelelően az okozott hatás lehet a serkentés depolarizációval kiváltott csökkentése (DSE), a depolarizáció-indukált gátlás csökkentése (DSI), illetve a serkentés hosszú távú depressziója (LTD) vagy a gátlást gátló hosszú távú depresszió (I-LTD). Az endocannabinoidok elsősorban a jelátvitel retrográd gátlásában (LTD) játszanak szerepet, de indirekt módon a serkentő idegsejteken végződő inhibitoros terminálisokon okozott DSI vagy I-LTD révén elősegítik a glutamaterg hosszútávú potenciációt (LTP) is (Chevalleyre és Castillo, 2004; Lin és mtsai, 2011; Tseng és O'Donnell, 2004; Zhu és Lovinger, 2007).

Számos kutatás igazolta a dopamin és cannabinoid rendszer közötti funkcionális kapcsolat létezését (Chen és mtsai, 1990; French és mtsai, 1997; Gessa és mtsai, 1998a;

Guiffrida és mtsai, 1999; Kőfalvi és mtsai, 2005; Kreitzer és Malenka, 2007; Julian és mtsai, 2003; Meschler és Howlett, 2001; Ong és Mackie, 1999; Sanudo-Pena és mtsai, 1998; Szabo és mtsai, 1999; Valjent és mtsai, 2001). A corticostriatalis neuroplaszticitás legjelentősebb formája a striatumban a közepes tüskés neuronokon végződő glutamaterg és GABAerg jelátvitel endocannabinoid-mediált hosszútávú depressziója (eCB-LTD). A folyamathoz szükséges a különböző glutamát receptorok stimulációja (Adermark és Lovinger, 2007; Adermark és mtsai, 2009; Gerdeman és mtsai, 2002) és a posztszinaptikus D₂ dopamin receptorok aktiválódása (Kreitzer és Malenka 2005, 2007; Lopez de Maturana és Sanchez-Pernate, 2010; Tang és mtsai, 2001) által kiváltott posztszinaptikus endocannabinoid felszabadulás. *In vivo* Parkinson-kóros állatmodelleken végzett kísérleteik során Kreitzer és Malenka (2007) azt találták, hogy az indirekt striatalis útvonalon dopamin deplécióban az endocannabinoid-mediált hosszú távú depresszió (eCB-LTD) nem következett be, azonban dopamin D₂ receptor agonisták és endocannabinoid degradációgátlók együttes adása mellett kiváltható maradt az eCB-LTD és csökkent a Parkinson-kóros motoros deficit. Az indirekt striatalis útvonalon a CB₁R – D₂ dopamin receptor együttműködésével létrejövő eCB-LTD fontos szerepet játszhat az extrapyramidalis mozgásszervezésben, illetve a Parkinson-kór komplex patofiziológiájában. A prefrontalis GABAerg interneuron terminálisokon a CB₁R-ral koexpresszált D₂-es dopamin receptornak szintén jelentős szerepe van az I-LTD kiváltásában. Chiu és mtsai (2010) kimutatták, hogy mind a két receptor típust külön-külön stimulálva kissé csökken a GABA felszabadulás a cortex V. rétegében. Ugyanakkor a két receptor együttes ingerlése elősegíti az eCB-LTD-t. Arra következtettek, hogy a prefrontalis cortexben a D₂ dopamin receptor mintegy megkönnyíti az eCB-LTD létrejöttét, vagyis a D₂-CB₁R közötti direkt interakció a corticalis inhibitoros tónust szabályozza. Ennek fényében a dopamin-modulált neuronális aktivitás a prefrontalis kéreg által vezérelt *in vivo* működések egyik lényeges mechanizmusa lehet (Chiu és mtsai, 2010).

A két receptorrendszer humán Parkinson-kórban bekövetkező egyidejű elváltozásainak tanulmányozása jelenleg is kutatás tárgyát képezi. A folyamat megismerésében alapvető jelentőségű a D₂ dopamin receptor és CB₁R sűrűség egyidejű vizsgálata, vagyis annak kiderítése, hogy a Parkinson-kórban bekövetkező dopamin D₂ receptorsűrűség-csökkenés társul-e CB₁R denzitásváltozással.

Különböző szerzők igazolták a kognitív paraméterek javulását Alzheimer-kóros állatmodelleknél cannabinoid agonisták, illetve antagonisták adásakor (Terranova és mtsai, 1996; Walther és mtsai, 2006; Aso és mtsai, 2012; Martin-Moreno és mtsai, 2012). A tanuláshoz és memória folyamatokhoz nélkülözhetetlen a cholinerg és glutamaterg jelátvitel zavartalan működése a hippocampusban és a prefrontalis cortexben (Bossers és mtsai, 2010; Kamenetz és mtsai, 2003; Li és mtsai, 2009; Shankar és mtsai, 2008; Walsh és mtsai, 2002). Ezen agyterületekben 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 szinaptikus plaszticitás modulációjában (Abraham és mtsai, 2007; Katona és Freund, 2008, 2012; Lafourcade és mtsai, 2007; Mayadevi és mtsai, 2012; Ondrejcek és mtsai, 2010; Puzzo és mtsai, 2008). Alzheimer-kórban a szinaptikus plaszticitás már a β -amiloid depozitumok megjelenése előtt károsodik, mely tovább súlyosbodik a neuropatológiai eltérések progressziójával párhuzamosan (Bossers és mtsai, 2010; Carter és Lippa 2001; Cavallucci és mtsai, 2012; Iuvone és mtsai, 2004; Li és mtsai, 2009). Emellett az endocannabinoidok neuroprotektív hatását is több szerző leírta már (Aso és mtsai, 2012; Galve-Roperth és mtsai, 2002; Karanian és mtsai, 2005; Marsicano és mtsai, 2003; Massi és mtsai, 2000; Noonan és mtsai, 2010; Zhuang és mtsai, 2005). A fentiek alapján feltételezhető, hogy az endocannabinoid rendszer reagál a szinaptikus plaszticitásban bekövetkező változásokra, illetve a neurodegeneratív folyamatokra, mely a CB₁R denzitás módosulásaiban is megnyilvánulhat. Az endocannabinoid rendszer feltárása az Alzheimer-kór

különböző stádiumaiban fontos idegtudományi kérdés, melynek része a CB₁R denzitás vizsgálata is. A használatba kerülő új, nagyobb specificitású CB₁R ligandumok kitűnő lehetőséget biztosítanak a betegség korai stádiumaiban bekövetkező receptordenzitás-eltérések detektálására. A CB₁R populáció reaktív eltéréseinek kimutatása azért fontos, mert nem ismert, hogy az Alzheimer-kór korai szakaszában a szinaptikus plaszticitás károsodása együtt jár-e a CB₁R sűrűség változásával, illetve a betegség progressziója hogyan érinti a CB₁R expressziót. Ezen kérdések tanulmányozása csak olyan agyi régió vizsgálatával lehetséges, amely a betegség korai stádiumában neuropatológiailag még érintetlen (pl. prefrontalis cortex) (Braak és Braak, 1991; Nelson és mtsai, 2009). A specifikus CB₁R denzitáseltérések azonosítása segíthet a betegség képzőképző 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Dopamin D₂ receptorsűrűség és jelátvitel Parkinson-kórban

2.1.1. Parkinson-kór

A Parkinson-kór primer vagy idiopathiás kórkép, a második leggyakoribb neurodegeneratív megbetegedés. Prevalenciája 65 éves korban 1%, 85 éves korra eléri a 4-5%-ot. Napjainkban Magyarországon körülbelül 20 000 ilyen beteg van. A kórfolyamat döntően sporadikus, pontos kóroka nem ismert, genetikai faktorok hatása mellett a környezeti tényezők szerepe is valószínűsíthető (Davie, 2008).

A Parkinson-kór, illetve Parkinson-szindróma jellegzetes tüneteit az extrapyramidalis mozgatórendszer károsodása okozza. Az extrapyramidalis mozgatórendszer mindazon központokat és pályákat foglalja magába, amelyeknek a pyramispálya mellett szerepük van a mozgások szervezésében. Részei: kérgi központok, basalis ganglionok és agytörzsi központok (nucleus ruber, substantia nigra, formatio reticularis) (Hidasi, 2010).

A klasszikus értelmezés szerint a Parkinson-kór neuropatológiai hátterét a substantia nigra és a striatum degenerációja, valamint ezek kóros működése jelenti, melynek eredményeként megjelennek a betegség jellegzetes tünetei: rigor, tremor, hypo-, illetve bradykinesis és a posturalis instabilitás (Michell, 2004; Braak, 2002; Hidasi, 2010). A bazális ganglionok fő feladata a motoros működések szabályozása, illetve szervezése. Ebben alapvető szerepet játszik a direkt, striato-pallidalis és az indirekt, striato-subthalamico-pallidalis pálya. Ismert, hogy a dopamin a direkt pályán a D₁-es receptorokon át ingerlő hatást, az indirekt pályán a D₂-es receptorokon keresztül gátló hatást fejt ki (Blandini és mtsai, 2000). A Parkinson-kórban a substantia nigra pars compactaban fellépő dopaminerg neurodegeneráció striatalis dopaminhiányt okoz, mely a globus pallidus internus és a nucleus subthalamicus

neuronjainak fokozott aktivitásához vezet (Bergman és Deuschl, 2002; Wichmann és DeLong, 2003).

A Parkinson-kór modern, Braak-féle neuropatológiai értelmezésének alapja az, hogy a központi idegrendszer egyre kiterjedtebb működészavara felelős a betegség tüneteier. A sejtekben Lewy-testek, azaz eozinofilen festődő citoplazmatikus fehérje aggregátumok jelennek meg, ami kóros működést eredményez (Braak és mtsai, 2002). A törzsdúcok bonyolult kapcsolatrendszeren keresztül vannak összeköttetésben egymással, illetve az agykéreggel. A frontalis cortex, thalamus és basalis ganglionok közötti kapcsolatot létesítő idegpályákban (fronto-striatalis kör) jelentkező dopaminhiány szerepet játszik az exekutív funkciók romlásában Parkinson-kóros betegeknél (Guttman, 1992; Kövari és mtsai, 2009; Owen 2004).

2.1.2. Parkinson-kór és a D₂-es dopamin receptor kapcsolata

A dopamin a különböző dopamin receptorokhoz kapcsolódva fejti ki hatását, melyből két fő típust különböztetünk meg (Hyman, 1992), a D₁-es típusúakat (D₁ és D₅) és a D₂-es típusúakat (D₂, D₃ és D₄). A dopamin receptorok hét transzmembrán-doménnel rendelkező sejtmembránba integrálódott fehérjék, melyek second messengerként G-proteineket használva fejtik ki hatásukat (Birnbauer és Birnbauer, 1995). Az egyik legfőbb szerepük, hogy a cAMP aktivitását szabályozzák, ezenkívül a foszfolipáz C, illetve a proteinkináz C működésére is hatnak. A D₁ és D₅ receptorok emelik a cAMP szintjét Gs-proteineken át hatva, míg a D₂, D₃ és a D₄ receptorok csökkentik azt, Gi/o proteint használva second messengerként (Gingrich és Caron, 1993; Neve és Neve, 1997).

A Parkinson-kór tünetei akkor jelentkeznek, amikor a striatalis dopamin 70%-a, illetve a substantia nigra dopaminerg neuronjainak megközelítőleg 50%-a elpusztul. Mindez

kompenzatórikus mechanizmusok jelenlétéről árulkodik (Hornykiewicz, 1993; Dunnett és Bjorklund, 1999). Preszinaptikusan megjelennek új idegsejtnyúlványok, tirozin-hidroxiláz immunreaktív hipertrófiás rostok, melyek a striatumba hatolva új szinapszisokat képeznek. Továbbá csökken a dopamin transzporter (DAT) szintje és valószínűsíthető egyéb receptorokat (például CB₁R) érintő reaktív elváltozások jelentkezése is (Batchelor és mtsai, 1999; Blanchard és mtsai, 1995; Cheng és mtsai, 1998; Hornykiewicz, 1993; Kassiou és mtsai, 2009; Lastres-Becker és mtsai, 2001; Lee és mtsai, 2008; Sossi és mtsai, 2009; Troiano és mtsai, 2009).

In vivo (PET és SPECT) vizsgálatok, valamint *in vitro* kísérletek igazolták, hogy levodopa (L-DOPA) kezelés elkezdése előtt a dopamin D₁ és D₂/D₃ receptorok up-regulálódnak Parkinson-kóros betegek, illetve állatmodellek esetében (Alexander és mtsai, 1993; Antonini és mtsai, 1994, 1997; Blanchet és mtsai, 1995; Elsworth és mtsai, 1998; Guttman, 1992; Kaasinen és mtsai, 2000; Kassiou és mtsai, 2009; Lee és mtsai, 1978; Linazasoro és mtsai, 1999; Reches és mtsai, 1984; Rinne és mtsai, 1983, 1995; Scherfler és mtsai, 2006; Wenning és mtsai, 1998). A striatalis dopaminerg denervációra bekövetkező posztzinaptikus D₂ receptor up-reguláció, a szinaptikus dopaminhiányra adott kompenzációs reakció. Igazolták azonban, hogy Parkinson-kóros betegek dopamin szubsztitúciós kezelése normalizálja/csökkenti a striatalis D₂ dopamin receptordenzitást (Alexander és mtsai, 1993; Linazasoro és mtsai, 1999; Thanvi és Lo, 2004; Thobois és mtsai, 2004; Scherfler és mtsai, 2006). Fontos kiemelni, hogy a D₁ dopamin receptort érintő elváltozások ellentmondásosak (Alexander és mtsai, 1993; Graham és mtsai, 1990; 1993), valamint a D₃ receptor specifikus [³H]7-OH-DPAT ligandum B_{max} értékei mindössze enyhe csökkenést mutattak a krónikus L-DOPA kezelés mellett (Hurley és mtsai, 1996). Ezek alapján valószínű, hogy a dopamin D₂ receptor sokkal érzékenyebben reagál a dopamin deficitre, illetve szubsztitúcióra (Alexander és mtsai, 1993; Graham és mtsai, 1990; 1993; Hurley és mtsai, 1996).

Parkinson-kóros állatmodelleken különböző módszerekkel tanulmányozták a dopamin receptorok szenzitivitásának (receptor–G-protein jelátvitel) változásait. Az állatok különböző dózisú dopamin agonistára adott motoros válaszait, a dopamin agonisták által kiváltott Fos protein immunreaktivitást és a receptor–G-protein kapcsolódást vizsgálták. A dopaminerg neuronokat tirozin-hidroxilázzal jelölték. Labandeira-Garcia és mtsai (1996) 6-hidroxidopamin modellen apomorphin (D_1 és D_2 receptor agonista) beadását követően immunhisztokémiai módszerrel tanulmányozták a striatalis neuronokban bekövetkező Fos proteinszint változásokat. A dopaminerg terminálisok megfogyatkozása mellett kevesebb agonistára volt szükség a kontrollszintű Fos immunreaktivitás kiváltásához. Ebből a dopamin receptorok fokozott szenzitivitására következtettek. A degeneráció előrehaladtával a Fos immunreaktivitás csökkent. Lopez és mtsai (2001) Parkinson-kóros állatmodellen serotoninerg denervációt végeztek, majd a motoros választ és a fenti immunhisztokémiai reakciót vizsgálták exogén L-DOPA adására. Kimutatták, hogy 30 mg/kg L-DOPA adása hatástalan, azonban 100 mg/kg L-DOPA striatalis Fos expressziót és megfelelő motoros választ eredményez. Arra következtettek, hogy teljes dopaminerg striatalis denerváció esetén, a serotoninerg neuronokon kívül is léteznek aromás l-aminosav dekarboxilázt (AADC) tartalmazó struktúrák, melyek elvégzik az exogén L-DOPA konverzióját és az így keletkező kis mennyiségű dopamin elegendő a hiperszenzitív posztzinaptikus dopamin receptorok ingerléséhez (Lopez és mtsai, 2001). LaHoste és Marshall (1992) haloperidol adagolással, rezerpin injekciókkal, illetve 6-hidroxidopamin által előidézett striatonigralis degenerációval különböző stádiumú parkinsonizmust idéztek elő patkányoknál. Ezt követően kontrollálták a D_1 és D_2 receptordenzitásokat, majd quinpirole-t (D_2 agonista) adtak és az állatok motoros válaszait rögzítették. Megfigyeltek egy erős korai dopamin receptor hiperszenzitivitást, mely megelőzte a receptordenzítás-eltéréseket, ugyanakkor leírtak egy késői gyengébb szenzitivitás fokozódást, mely a D_2 receptorok up-regulációja mellett alakult ki. Cai és mtsai (2002)

patkány modellen kimutatták, hogy a posztzinaptikus dopamin D₂ receptorsűrűség növekedése és a receptor–G α i-protein kapcsolódás fokozódása párhuzamosan történik, ugyanakkor változatlan denzitás mellett fokozódik a dopamin D₁ receptorok aktivitása is. Azt a következtetést vonták le, hogy a D₂ receptor hiperszenzitivitás az up-regulálódott posztzinaptikus D₂ receptor populáció és a fokozott D₂ receptor–G-protein kötődés együttes eredménye.

2.2. Cannabinoid 1-es típusú receptor és dopamin D₂ receptor Parkinson-kórban

2.2.1. A cannabinoid 1-es típusú receptor

Az endocannabinoid rendszer felépítése: (1) CB₁ és CB₂ receptorok, (2) endogén ligandok, ezek az endocannabinoidok (anandamide vagy N-arachidonoiletanolamid, AEA és 2-arachidonoilglicerol, 2-AG), (3) specifikus uptake mechanizmusok, (4) inaktivációs enzimek.

A CB₁R hét transzmembrán-doménnel rendelkező, a sejtmembránba integrálódott fehérje (Matsuda és mtsai, 1990; Piomelli, 2003; Freund és mtsai, 2003). Először 1990-ben azonosították patkány agyban (Matsuda és mtsai, 1990). A CB₁R elsősorban a Gi/o-fehérjéhez kapcsolódik és intracellulárisan gátolja az adenilát-cikláz enzimet, így a sejtben mérsékli a foszforilációs folyamatokat (Huang és mtsai, 2001; Wilson és mtsai, 2001). Bizonyos esetekben a CB₁R Gs-proteinekkal is kapcsolódhat (Glass és Felder 1997; Mackie, 2005; Hudson és mtsai, 2010), továbbá szabályozza különböző plazmamembrán proteinek, ioncsatornák működését (Cannich és mtsai, 2004; Eljaschewitsch és mtsai, 2006; Huang és mtsai, 2001; Micale és mtsai, 2007).

A CB₁R endogén ligandumai az endocannabinoidok. A rendszer elsődleges funkciója a különböző preszinaptikus sejtekből történő neurotranszmitter felszabadulás szabályozása azáltal, hogy az endocannabinoidok retrográd módon a szinaptikus résbe diffundálnak, majd kapcsolódnak a preszinaptikus membránon lévő CB₁R-hoz (Auclair és mtsai, 2000; Wilson és Nicoll, 2002; Hashimoto és mtsai, 2007). A központi idegrendszerben a GABAerg gátló neuronok expresszálják a legtöbb CB₁R-t, ugyanakkor a glutamaterg CB₁R expresszió is jelentős. Bizonyos adatok szerint a GABAerg CB₁R expresszió a glutamaterg expresszió 3-10-szerese (Kawamura és mtsai, 2006; Uchigashima és mtsai, 2007). Ennek ellenére a GABAerg CB₁R inaktiváció nem befolyásolta, míg a glutamaterg CB₁R inaktiváció növelte az epilepsziás roham jelentkezését egerekben, bizonyítva a glutamaterg CB₁R populáció fontosságát (Monory és mtsai, 2006). Az endocannabinoidok a GABAerg és a glutamaterg neurotranszmisszió szabályozását a retrográd neurotranszmitter felszabadulás modulációja révén valósítják meg. Előbbi esetében depolarizáció-indukált gátláscsökkenésről (DSI - depolarization-induced suppression of inhibition) (Ohno-Shosaku és mtsai, 2001; Wilson és Nicoll 2001), míg utóbbinál a serkentés depolarizációval kiváltott csökkenéséről (DSE – depolarization-induced suppression of excitation) beszélünk (Auclair és mtsai, 2000; Kreitzer és Regehr 2001). A szinaptikus plaszticitás előbbi rövid időtartamú formái mellett a CB₁R fontos szerepet játszik a gátlást, illetve a serkentést gátló hosszú távú depresszióban is (I-LTD, illetve LTD). Ennek jellegzetes formája a neurotranszmisszió endocannabinoid-mediált hosszú távú depressziójaként ismert (eCB-LTD) (Auclair és mtsai, 2000; Gerdeman és mtsai, 2002; Katona és Freund, 2008, 2012; Lafourcade és mtsai, 2007; Marsicano és mtsai 2002; Robbe és mtsai, 2002). Az eCB-LTD létezését glutamaterg és GABAerg szinapszisokban egyértelműen igazolták. A folyamatban nélkülözhetetlen a fokozott glutamaterg stimuláció mely, az intraszinaptikusan, illetve a periszinaptikus szignalizációs rendszerben (PSM) helyet foglaló mGluR-okon és/vagy ionotrópikus NMDA receptorokon hatva vált ki

endocannabinoid felszabadulást (Abraham és mtsai, 2007; Izumi és Zorumski 2012; Jew és mtsai, 2013; Katona és Freund, 2008, 2012; Lafourcade és mtsai, 2007; Li és mtsai, 2009; Mayadevi és mtsai, 2012; Ohno-Shosaku és mtsai, 2007; Ondrejcek és mtsai 2010; Palop és Mucke 2010; Robbe és mtsai, 2002). Az eCB-LTD-t már számos központi idegrendszeri struktúrában megfigyelték, beleértve az általunk is vizsgált agyi régiókat, a striatumot és a prefrontalis cortexet is (Jew és mtsai, 2013; Katona és Freund, 2008; Kreitzer és Malenka 2007; Lafourcade és mtsai, 2007; Uchigashima és mtsai, 2007).

Állatmodelleken és humán eseteken végzett megfigyelések alapján az endocannabinoidok biológiai hatását az alábbi tetrádban foglalhatjuk össze: rigid immobilitás (katalepszia), csökkent motoros tevékenység, analgetikus és hipotermiás hatás. Az előbbiekhöz ötödikként hozzásorolták a cannabinoidok kognitív funkciókra (rövidtávú memória, figyelem) gyakorolt hatását is (Compton és mtsai, 1993; Hampson és Deadwyler 1998). A CB₁R a felnőtt emlősök központi idegrendszerének legelterjedtebb G-proteinnel kapcsolt receptora, sűrűsége vetekszik a neocortex GABA és glutamát receptorok sűrűségével (Herkenham és mtsai, 1990; Nyíri és mtsai, 2005; Piomelli 2003). A CB₁R sűrűséget illetően patkány agymintákon különösen magas CB₁R denzitásról számoltak be a basalis ganglionokban, elsősorban a substantia nigra pars reticulatában (SNr) és a globus pallidus internában (Herkenham és mtsai, 1991a,b; Mailleux és Vanderhaeghen, 1992; Tsou és mtsai, 1998). Majom agyakban immunhisztokémiai, elektronmikroszkópos, illetve PET módszerrel vizsgálták a CB₁R eloszlást. Nagy sűrűséget találtak a frontális, temporalis, parietalis és occipitalis cortexben, hippocampusban, amygdalában, substantia nigrában, cerebellumban, illetve striatumban (Burns és mtsai, 2007; Hamill és mtsai, 2009; Ong és Mackie 1999). Humán PET kísérletek magas CB₁R denzitást mutattak a frontális és cingularis cortex, striatum, illetve kissé alacsonyabbat a cerebellum szintjén (Burns és mtsai, 2007). A cannabinoidok motoros tevékenységet befolyásoló képességét a basalis ganglionokban és

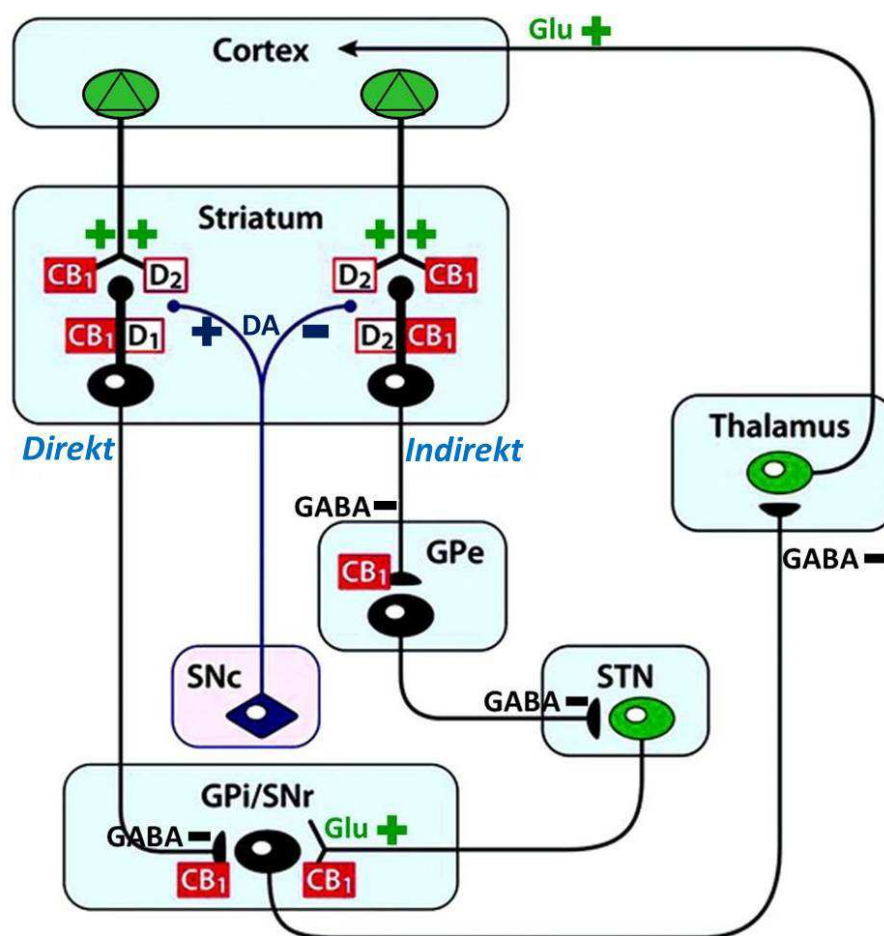
cerebellumban levő jelentős CB₁R populáció magyarázza, míg a neocorticalis CB₁R populáció a kognitív funkciók befolyásolásáért felelős.

2.2.2. Dopamin és cannabinoid rendszer közötti kölcsönhatások

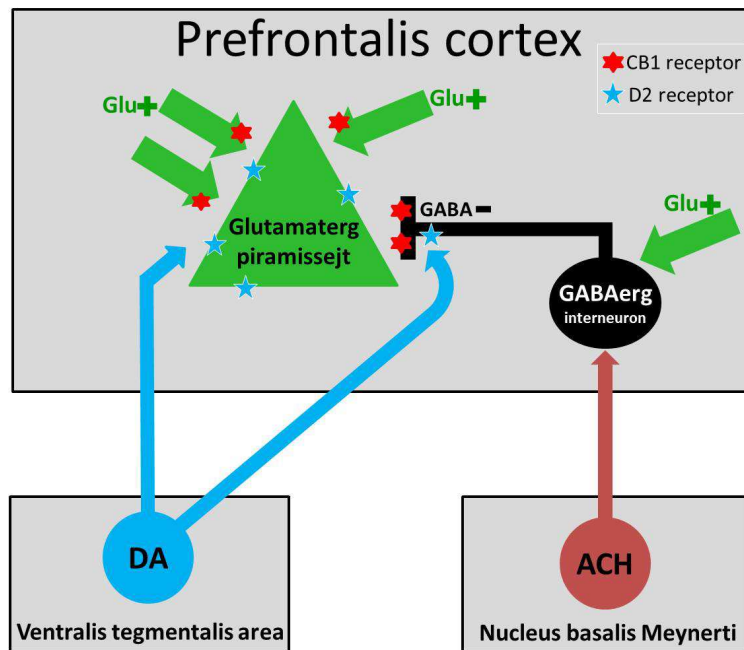
A központi idegrendszer dopaminerg sejtjeinek nagy része a substantia nigra-ban és a ventralis tegmentalis areában (VTA) foglal helyet. Projekcióik által biztosítják többek között a nigrostriatalis (caudatum–putamen), illetve mesocorticolimbicus (nucleus accumbens/prefrontalis cortex) útvonalak dopaminerg innervációját. A CB₁R és D₂ dopamin receptor expressziót, illetve koexpressziót a basalis ganglionok szintjén az 1. ábra (Benarroch 2007), a prefrontalis cortex szintjén a 2. ábra foglalja össze (Fitzgerald és mtsai; 2012; Trettel és mtsai, 2003, 2004; Tseng 2007). Látható, hogy a dopaminerg neuronok célstruktúráiban (pl. striatum vagy prefrontalis cortex) pre- és posztszinaptikus CB₁R-k is expresszálódnak, azonban maguk a dopaminerg sejtek nem tartalmazznak CB₁R mRNS-t és nem expresszálják CB₁R-t (Julian és mtsai, 2003; Matyas és mtsai, 2006; El Khoury és mtsai, 2012; Fitzgerald és mtsai 2012).

Mindemellett számos kutatás kimutatta a dopamin és endocannabinoid rendszer közötti funkcionális kapcsolat létezését. CB₁R agonisták adása növelte a dopamin turnover-t és felszabadulást a nucleus accumbensben (Chen és mtsai, 1990; Gessa és mtsai, 1998a), illetve stimulálta a ventralis tegmentalis area és substantia nigra dopaminerg neuronjait (French és mtsai, 1997). Cannabinoid agonisták kifejezetten csökkentették a D₁ agonisták által kiváltott rotációs mozgásokat patkánynál, ezzel ellentétben a D₂ receptor agonizmust kevésbé befolyásolták (Anderson és mtsai, 1995). Maneuf és mtsai (1997) CB₁R agonistával rontották a D₂, illetve D₁/D₂ receptorok együttes stimulálásának akinesisre kifejtett jótékony hatását, mely azonban nem befolyásolta a D₁ receptor által közvetített mozgásjavulást. Ugyanakkor a

dopamin receptor stimuláció hiányában mind a CB₁R agonista, mind az antagonistá hatástalan volt a mozgásteljesítményre. Eredményeik háttérében a striatumot a basalis ganglionok kimeneti struktúráival összekötő indirekt útvonal cannabinoidok általi modulációját feltételezték. Sanudo-Pena és mtsai (1998) Parkinson-kóros patkányok striatumába, pallidumába, valamint substantia nigrájába juttattak cannabinoidokat. A substantia nigra pars reticulata esetében a beteg állatok motoros reakciója lényegesen erősebbnek bizonyult egészséges társaikénál. Ezt a hatást az indirekt pálya subthalamonigralis rostjaiból érkező glutamaterg stimuláció cannabinoid általi gátlásának tulajdonították. Más szerzők is megerősítették, hogy a CB₁R agonisták szignifikáns glutamát és GABA szint csökkenést okozhatnak, azonban a cannabinoidok direkt retrográd módon nem befolyásolják a dopamin felszabadulást (Kőfalvi és mtsai, 2005; Szabo és mtsai, 1999).



1. ábra. A CB₁ és dopamin receptor (D₁ és D₂) expresszió a basalis ganglionokban a direkt és indirekt striatalis útvonalon Benarroch (2007) ábrája alapján. A striatumban pre- és posztszinaptikus dopamin és CB₁ receptorok vannak. A globus pallidus internusban (GPi) és externusban (GPe), valamint a substantia nigra pars reticulataban (SNr) preszinaptikus CB₁R-ok figyelhetők meg. A substantia nigra pars compacta (SNc) dopaminerg sejtjei nem expresszálnak CB₁ receptorokat. STN: nucleus subthalamicus.



2. ábra. A CB₁ és D₂ dopamin (DA) receptor expresszió a prefrontalis cortex szintjén (Fitzgerald és mtsai; 2012; Tseng 2007). A dopamin receptorok a piramissejtek somján és dendritjein expresszállódnak. A piramissejteken végződő glutamaterg (Glu+) terminálisokon preszinaptikus CB₁R-ok találhatók. A piramissejteket gátló GABAerg interneuronok axonteminálisain CB₁R és dopamin receptor koexpresszió van. A dopaminerg terminálisokon nincsenek CB₁R-ok. Trettel és mtsai (2003, 2004) igazolták a cholinerg és CB1 receptorok közötti kapcsolat létezését, melynek központi szereplője a GABAerg interneuron. ACH: acetilkolin.

2.2.2.1. Indirekt kapcsolat a basalis ganglionok szintjén

A basalis ganglionok szintjén CB₁R mRNS elsősorban a striatalis GABAerg közepes tüskés neuronokban és a nucleus subthalamicus glutamaterg idegsejtjeiben található (Mailleux és Vanderhaeghen, 1992; Matsuda és mtsai, 1993; Monory és mtsai, 2007; Tsou és

mtsai,1998). A basalis ganglionok két kimeneti struktúrájában (GPi, SNr) a CB₁R mRNS expresszió kifejezetten alacsony (Mailleux és Vanderhaeghen, 1992; Westlake és mtsai, 1994). Ezekben a struktúrákban azonban jelentős CB₁R populáció található, mely bizonyítja, hogy a CB₁R expresszió a striatopallidalis, striatonigralis (SNr), subthalamonigralis és subthalamopallidalis terminálisokon történik (Herkenham és mtsai,1991a,b; Mailleux és Vanderhaeghen,1992; Tsou és mtsai,1998). Julian és mtsai (2003) kimutatták, hogy a striatumban szintetizált CB₁R protein az efferens GABAerg rostokban tirozin-hidroxiláz pozitív dopaminerg rostok mentén haladva a substantia nigraba szállítódik. Továbbá, lokálisan adott cannabinoid agonista fokozta a SNr neuronok spontán aktivitását, feltehetően a GABAerg gátlás alól történő felszabadítás révén, mely funkcionális szempontból támasztja alá a striatonigralis terminálisokon expresszált CB₁R fontosságát (Miller és Walker 1995; Tersigni és Rosenberg 1996). A substantia nigrában levő dopaminerg neuronok aktivitásának szabályozásában tehát fontos szerepet játszanak a GABAerg és glutamaterg terminálisokon expresszált preszinaptikus CB₁R-ok (Fernández-Ruiz és mtsai, 2010; Gerdeman és Fernández-Ruiz, 2008; Gerdeman és Lovinger, 2001; Morera-Herreras és mtsai, 2008; Szabo és mtsai, 2000; Wallmichrath és Szabo, 2002). Mindez ugyanakkor az efferens dopaminerg innerváció révén hatással van a striatalis neuronok működésére. Kőfalvi és mtsai (2005) kísérleteik során azt találták, hogy a lokális striatalis CB₁R aktiváció nem befolyásolja a dopamin felszabadulást. A fentiek alapján tehát egyrészt megállapíthatjuk, hogy a dopamin-cannabinoid rendszer között indirekt, glutamát- és GABA-közvetített funkcionális kapcsolat létezik.

2.2.2.2. Direkt intraszinaptikus kapcsolat a striatumban

A nigralis és pallidalis output célterületek mellett a CB₁R denzitás a striatumban is jelentős, habár nem éri el SNr-ban vagy a GPi-ban expresszált szintet (Herkenham és mtsai, 1990). Elektronmikroszkópos és immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták, hogy a striatalis CB₁R-kat preszinaptikusan a corticostriatalis glutamaterg terminálisok (Fitzgerald és mtsai, 2012; Gerdeman és Lovinger, 2001; Kőfalvi és mtsai, 2005; Szabo és mtsai, 2000; Uchigashima és mtsai, 2007), a helyi GABAerg terminálisok és cholinerg interneuronok (Kőfalvi és mtsai, 2005; Ong és Mackie, 1999), míg posztszinaptikusan a GABAerg közepes tüskés neuronok expresszálják (Fitzgerald és mtsai, 2012; Pickel és mtsai, 2006; Rodriguez és mtsai, 2001). A striatalis dopaminerg terminálisokon viszont nincsenek CB₁R-ok (Julian és mtsai, 2003; Matyas és mtsai, 2006; El Khoury és mtsai, 2012; Fitzgerald és mtsai 2012). Fontos kiemelni azonban, hogy a közepes tüskés idegsejteken (posztszinaptikus) és a corticostriatalis glutamaterg terminálisokon (preszinaptikus) dopamin receptor és CB₁R koexpresszió van (Fitzgerald és mtsai, 2012; Glass és Felder, 1997; Kearn és mtsai, 2005; Matyas és mtsai, 2006; Rodriguez és mtsai, 2001; Uchigashima és mtsai, 2007; Wang és Pickel, 2002).

A dopamin és cannabinoid jelátviteli útvonal sejtszinten történő közvetlen konvergálását bizonyítja, hogy a dopamin D₂ agonisták striatumba juttatása endocannabinoid felszabadulást idéz elő (Centonze és mtsai, 2004; Guiffida és mtsai, 1999; Yin és Lovinger, 2006). Ez a dopaminerg hatás indirekt módon – a közepes tüskés neuronok D₂ dopamin receptorainak aktiválása által – posztszinaptikus endocannabinoid felszabadulást okoz, mely a corticostriatalis glutamaterg terminálisokat célozza (André és mtsai, 2010; Bamford és mtsai, 2004; Grueter és mtsai, 2010; Shen és mtsai, 2008; Wong 2013).

Kreitzer és Malenka (2005, 2007) kísérleteik során a direkt és indirekt striatalis jelátviteli útvonalon vizsgálták az eCB-LTD-t. A direkt (D_1 receptor) és indirekt (D_2 receptor) striatalis útvonal és a corticostriatalis rostok találkozásánál helyet foglaló közepes tüskés neuronokban enyhe membrán depolarizációt hoztak létre. Kimutatták, hogy ebben az elektrofiziológiai állapotban a mGluR I receptor agonista adása csak az indirekt útvonal sejtjeiben eredményez masszív eCB-LTD-t, míg a direkt útvonalon csak minimális, reverzibilis depresszió volt. Megfigyelték azt is, hogy mGluR I receptor agonista adása önmagában nem indukál eCB-LTD-t, azonban együtt adva quinpirole-lal (D_2 dopamin receptor agonista) striatalis eCB-LTD következik be. Megállapították, hogy az eCB-LTD kiváltásához nélkülözhetetlen a D_2 dopaminerg stimuláció, melyet további vizsgálatokkal is igazoltak. Azt találták, hogy az eCB-LTD gátolható CB_1R , illetve dopamin D_2 receptor antagonistával és dopamin depléción esetében az eCB-LTD nem váltható ki. Ugyanakkor dopaminhiány esetén D_2 receptor agonista és endocannabinoid degradációgátlók együttes adásával az eCB-LTD kiváltható maradt, klinikailag pedig csökkent a Parkinson-kóros motoros deficit. A fentiek alapján, valamint annak ismeretében, hogy a striatumban a D_2 dopamin receptor stimuláció endocannabinoid felszabadulást okoz (Centonze és mtsai, 2004; Guiffida és mtsai, 1999; Yin és Lovinger, 2006) arra következtettek, hogy a corticostriatalis glutamaterg eCB-LTD-t szelektíven és nagy érzékenységgel az indirekt útvonal D_2 dopamin receptort tartalmazó közepes tüskés neuronjai indukálják (Kreitzer és Malenka 2005, 2007). Mindezzel összhangban vannak azon korábbi megfigyelések is, melyek szerint dopamin D_2 receptor, illetve CB_1R knockout egerekben nincsen striatalis LTD (Calabresi és mtsai, 1997; Gerdeman és mtsai, 2002; Tang és mtsai, 2001).

A striatalis endocannabinoid-mediált szinaptikus depresszió megfelelő kiváltásához tehát a glutamát és dopamin D_2 receptorok szinergikus aktivitása szükséges (Kreitzer és Malenka 2007, Yin és mtsai, 2006). Összességében mindez azt sugallja, hogy az indirekt

striatalis útvonalon kiváltható eCB-LTD kiemelt szerepet játszik a mozgásszervezésben, vagyis a basalis ganglionok normális működésében. Az indirekt striatalis útvonalon az eCB-LTD kiesése fontos szereplője lehet a Parkinson-kór komplex patomechanizmusának.

2.2.2.3. Direkt intraszinaptikus kapcsolat a frontális cortexben

Dopaminerg terminálisok a prefrontális cortexben levő glutamaterg sejtekhez is projektálnak (Carr és mtsai, 1999). Az V. corticalis rétegben a glutamaterg neuronok dendritjein, valamint az ezekkel szinapszist képző GABAerg interneuronok axonterminálisain a CB₁R mellett D₂ dopamin receptorok is expresszálódnak (Chiu és mtsai, 2010). Chiu és mtsai (2010) igazolták a CB₁R-D₂ receptor által mediált I-LTD létezését egér és patkány prefrontális cortexében. Ugyanakkor a dopamin D₂ receptor a striatumhoz hasonlóan (André és mtsai, 2010; Bamford és mtsai, 2004; Centonze és mtsai, 2004; Shen és mtsai, 2008; Kreitzer és Malenka 2005, 2007; Wong 2013) fontos szerepet játszhat az eCB-LTD kiváltásában a corticalis glutamaterg terminálisokon is. Nem ismert azonban, hogy a frontális cortexben helyet foglaló CB₁, illetve D₂ dopamin receptorok sűrűsége változik-e humán Parkinson-kórban.

A CB₁R és D₂ dopamin receptor expressziót, illetve koexpressziót a prefrontális cortexben a 2. ábra foglalja össze (lásd 24. oldal).

2.2.2.4. Lehetséges intracelluláris kapcsolat: receptor heteromerizáció

Számos kutatás igazolta, hogy a striatalis közepes tüskés idegsejteken (posztzinaptikus) és a corticostriatalis glutamaterg terminálisokon (preszinaptikus) dopamin receptor és CB₁R koexpresszió van (Fitzgerald és mtsai, 2012; Glass és Felder, 1997; Kearns és mtsai, 2005; Matyas és mtsai, 2006; Rodriguez és mtsai, 2001; Uchigashima és mtsai,

2007; Wang és Pickel, 2002). A CB₁R-nak a dopamin D₁ és D₂ receptorokkal való direkt interakciójáról többen beszámoltak (Martín és mtsai, 2008; Meschler és Howlett, 2001; Valjent és mtsai, 2001; Wong 2013). Glass és Felder (1997) külön-külön stimulálva a CB₁, illetve dopamin D₂ receptorokat meggátolták a cAMP felszaporodását, míg a két receptor típus együttes aktiválása cAMP felszaporodást eredményezett. Jarrahian és mtsai (2004) ugyanakkor kimutatták, hogy függetlenül a D₂-es dopamin receptor aktivitási állapotától, dopamin D₂ és CB₁R koexpresszió esetén cannabinoid agonista hatásra a CB₁R–Gs-protein kapcsolódás jön létre, míg koexpresszió hiányában a Go-protein kapcsolódik a receptorral. Valjent és mtsai (2001) dopamin D₁ receptor, valamint kisebb mértékben D₂ receptor antagonistával meggátolták a cannabinoid által indukált striatalis mitogén-aktivált protein-kináz, valamint az extracelluláris szignál-regulált kináz (MAPK/ERK) aktivitását (Valjent és mtsai, 2001). Wong (2013) kimutatta, hogy a posztzinaptikus mellett a preszinaptikus D₂ dopamin receptor is fontos szerepet játszik az indirekt striatalis útvonal glutamaterg jelátvitelének modulálásában.

Az ugyanazon neuronon expresszált G-proteinnel kapcsolt receptorok (GPCR) esetében a receptorok közötti direkt interakciók egyik legvalószínűbb mechanizmusa a receptor komplexek képződése. Ezen receptor komplexek képzésében részt vehetnek azonos típusú receptorok (homodimér), és két vagy több különböző típusú receptor (heterodimér, illetve oligomér). A dimér, oligomér állapot szabályozhatja a receptor(ok) internalizációját (So és mtsai, 2005), befolyásolhatja az alkotó monoméreken ható agonista vagy antagonist hatás erősségét, továbbá a heteromér stimulálása az alkotó receptorok monomériként történő stimulálásához képest eltérő G-protein aktiválást is eredményezhet. A CB₁R (Navarro és mtsai, 2008; Rozenfeld és mtsai, 2011, 2012), illetve a különböző dopamin receptorok (Albizu és mtsai, 2010; Canals és mtsai, 2003; Kearn és mtsai, 2005; Marcellino és mtsai, 2008; Maggio és mtsai, 2003; Soriano és mtsai, 2008) heteromerizációs képessége

bizonyított. Ráadásul a heteromerizációt már a dopamin D₂ és CB₁R között is igazolták (Hudson és mtsai, 2010; Navarro és mtsai, 2008).

2.2.3. Cannabinoid 1-es típusú receptor Parkinson-kórban: korábbi vizsgálatok

A cannabinoid rendszert széles körben tanulmányozták Parkinson-kóros állatmodelleken, valamint Parkinson-kóros emberi agymintákon is. Parkinson-kóros patkány modellek striatumában (rezerpin vagy 6-OHDA modellek) (Di Marzo és mtsai, 2000; Ferrer és mtsai, 2003; Gubellini és mtsai, 2002; Maccarrone és mtsai, 2003), illetve 16 kezeletlen Parkinson-kóros beteg agygerincvelői folyadékában (Pisani és mtsai, 2005) emelkedett endocannabinoid szinteket találtak.

A CB₁R populáció érintettsége Parkinson-kórban ellentmondásos. Különböző szerzők a CB₁R mRNS szignifikáns változásait közölték Parkinson-kóros állati és emberi agyminták esetében (Hurley és mtsai, 2003; Romero és mtsai, 2000; Silverdale és mtsai, 2001). Parkinson-kóros állatmodellen striatum, globus pallidus és substantia nigra mintákban nem találtak érdemi eltérést a CB₁R denzitást, receptor–G-protein jelátvitelt, valamint CB₁R mRNS szintet illetően (Romero és mtsai, 2000; Zeng és mtsai, 1999). Hetek elteltével azonban Romero és mtsai (2000) a striatalis CB₁R mRNS szint átmeneti szignifikáns növekedését észlelték, receptordenzitás vagy jelátvitel változás nélkül, míg Zeng és mtsai (1999) L-DOPA kezelés mellett figyelték meg a CB₁R mRNS szint emelkedését. Utóbbiak arra következtettek, hogy a dopaminerg stimuláció befolyásolja a CB₁R gén expresszióját. Más szerzők rezerpin-kezelt Parkinson-kóros állatmodell striatumában *in situ* hibridizációval CB₁R mRNS csökkenést találtak (Silverdale és mtsai, 2001). García-Arencibia és mtsai (2009) Parkinson-kóros egér mutáns modelleken a 12 hónaposnál fiatalabb állatok striatumában szintén CB₁R mRNS csökkenést figyeltek meg, emellett a substantia nigrában és

a globus pallidusban is CB₁R denzitáscsökkenést írtak le. 12 hónaposnál idősebb egereknél viszont a vizsgált paraméterek up-regulációját észlelték. Arra következtettek, hogy Parkinson-kórban a CB₁R-t érintő változások két szakaszban játszódnak le.

Postmortem humán Parkinson-kóros agymintákon Hurley és mtsai (2003) csökkent CB₁R mRNS mennyiséget igazoltak a striatumban, illetve laterális globus pallidusban, viszont a nucleus accumbensben és a substantia nigrában nem volt változás. Lastres-Becker és mtsai (2001) postmortem humán Parkinson-kóros agymintákon funkcionális autoradiográfiával CB₁R–G-protein kötődés fokozódását észlelték a striatumban, laterális globus pallidusban és a substantia nigrában, azonban CB₁R up-regulációval ez csak a striatumban társult. Figyelembe véve, hogy a humán minták krónikusan kezelt betegektől származtak, a fenti paramétereket megvizsgálták MPTP-kezelt (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) állatmodelleken is krónikus L-DOPA kezelés mellett, valamint ennek hiányában. Eredményeikben arról számoltak be, hogy a kezelést megelőzően emelkedett striatalis CB₁R denzitás és transzcelluláris jelátvitel, a L-DOPA kezelés hatására lecsökkent. A humán és állatmodellek közötti diszkrepancia hátterében azt feltételezték, hogy emberben elsősorban a neurodegeneráció hatása érvényesült és nem az alkalmazott L-DOPA kezelésé. Valószínű, hogy nagyobb dózisú L-DOPA kezelés mellett a CB₁R sűrűség hasonló csökkenését észlelnénk a humán Parkinson-kóros mintákon is.

Összefoglalva, az eddigi vizsgálatok egyik része arra utal, hogy Parkinson-kórban a striatumban a CB₁R denzitás nem változik (Romero és mtsai, 2000), másik része viszont a CB₁R-ok up-regulációját írta le, mely L-DOPA kezelés hatására csökkent (Lastres-Becker és mtsai, 2001). Az eddigi eredményekből egyértelmű következtetések tehát nem vonhatók le. Megállapítható viszont, hogy a dopaminerg hatás jelenléte vagy hiánya befolyásolja a CB₁R expressziót és denzitást, mely alátámasztja a CB₁R populáció érintettségét Parkinson-kórban a basalis ganglionok szintjén.

2.3. A cannabinoid 1-es típusú receptor a prefrontalis cortexben Alzheimer kórban

2.3.1. Alzheimer-kór

A demencia a 65 év feletti lakosság 5%-át, a 80 év felettieknek 20%-át érinti, prevalenciája az átlagéletkorral együtt emelkedik. Az Alzheimer-kór a neurodegeneratív kórfolyamatok csoportjába tartozó, progresszív szellemi leépüléssel járó betegség, mely az összes demenciák kétharmadát okozza (Szirmai, 2006; Zádori és mtsai, 2007). Megkülönböztetjük sporadikus és lényegesen ritkább familiáris formáját. A demencia első jelei hosszú tünetmentes szakasz után alakulnak ki. A betegség korai szakaszának tünetei a zavartság, a rövidtávú memória, a figyelem és a térbeli orientáció zavara, hangulatváltozások és nyelvi nehézségek. A betegség progressziójával a tünetek egyre súlyosbodnak, a demencia egyre kifejezettebb lesz, végül a betegek járásképtelenné válnak, egyedül nem táplálkoznak, nem képesek a vizelet- és székletürítés szabályozására. A betegség pontos etiológiája ma sem ismert; szerepet tulajdonítanak genetikai, virális, illetve környezeti faktoroknak is. A patogenézist illetően is különböző hipotézisek léteznek: amiloid precursor protein (APP) – β -amiloid hipotézis, tau-hipotézis, sejtosztódási ciklus hipotézis, vascularis háttér vagy a microglia és gyulladásos folyamatok aktiválódásának lehetősége.

Neuropatológiailag az extracellulárisan elhelyezkedő amiloid (szenilis vagy neurit) plakkok, illetve az intracellulárisan elhelyezkedő neurofibrilláris kötegek jelentik a legjelentősebb diagnosztikus markereket. A szövettani elváltozások azonban több évtizeddel a klinikai tünetek megjelenése előtt elkezdődnek. A neurofibrilláris kötegek az agy különböző régióiban meghatározott sorrendben alakulnak ki, és ezek képezik az alapját a Braak-féle neuropatológiai stádiumbeosztásnak (Braak és Braak, 1991; Nelson és mtsai, 2009). A Braak I-es stádiumban a transentorhinalis régió érintett, melyet az entorhinalis cortex követ a Braak II-es stádiumban. Ebben a szakaszban csak legritkább esetben észlelhetők a kognitív

hanyatlás tünetei. A Braak III és IV stádiumban a neurofibrilláris kötegek megjelennek a hippocampusban is, de a folyamat nem haladja meg a limbikus rendszert. Klinikailag az enyhe kognitív hanyatlás és személyiségváltozás felhívhatja már a figyelmet az Alzheimer-kór kezdetére. A Braak V stádium egybeesik az Alzheimer-kór klinikai diagnózisával (Newell és mtsai, 1999). A végstádiumokban (V-VI), kiterjedt neocorticalis neuropatológiai érintettséggel a kifejezett kognitív zavar uralja a klinikai képet (Nelson és mtsai, 2009).

2.3.2. Cannabinoid 1-es típusú receptor a prefrontalis cortexben

In situ hibridizációs és immuncitokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a nucleus olfactorius anteriorban, hippocampusban, neocortexben, amygdalában kifejezetten magas CB₁R denzitás található (Hájos és mtsai, 2000; Katona és mtsai, 1999, 2000, 2001; Mailleux és Vanderhaeghen, 1992; Marsicano és Lutz 1999; Tsou és mtsai, 1998). Humán funkcionális mágneses rezonanciás (MR) és PET vizsgálatok kimutatták, hogy a marijuana és a THC (tetrahydrocannabinol) befolyásolja a prefrontalis cortex, valamint a dopaminerg subcorticalis régiók aktivitását (Martín-Santos és mtsai, 2010).

Corticalisan a CB₁R-kat elsősorban a colecisztokinin (CCK) pozitív gátló GABAerg interneuronok expresszálják, emellett kisebb sűrűségben a serkentő glutamaterg piramis sejteken is található CB₁R (Bodor és mtsai, 2005; Hill és mtsai, 2007; Lafourcade és mtsai, 2007; Marsicano és Lutz 1999). Ismert, hogy a GABAerg interneuronok gátló szinapszist képeznek a serkentő glutamaterg piramis sejtekkel. Azonban a GABAerg interneuronokon levő CB₁R-ok stimulációjával ez a gátló hatás felfüggeszthető, mely a glutamaterg aktivitás fokozódását eredményezi (Hill és mtsai, 2011; Lin és mtsai, 2011). A piramis sejteken expresszált CB₁R-ok stimulációja viszont a glutamaterg aktivitás csökkenését okozza (Fortin és Levine, 2007) (2. ábra, 24. oldal). Összességében elfogadott, hogy a

serkentő és gátló idegi impulzusok dinamikus egyensúlya formálja és optimalizálja a KIR-i exekutív működéseket (Ali, 2009). Az endocannabinoidok elsősorban a LTD kiváltásában játszanak szerepet, de indirekt módon a serkentő idegsejteken végződő inhibitoros terminálisokon okozott DSI vagy I-LTD révén elősegítik a glutamaterg hosszútávú potenciációt (LTP) is (Chevalleyre és Castillo, 2004; Tseng és O'Donnell, 2004; Zhu és Lovinger, 2007). Korábban Ferraro és mtsai (2001a,b) mikrodialízises kísérletek során azt figyelték meg, hogy alacsony dózisban adagolt CB₁R agonistával fokozódik a prefrontalis glutamaterg efflux míg a dózis emelésével az előbbi növekedés elmarad. Ennek magyarázata egyrészt a corticalis GABAerg interneuronokon található nagyobb CB₁R expresszió, másrészt ezen receptor populációnak a glutamaterg sejteken található CB₁R-kal szembeni funkcionális dominanciája (pl. nagyobb szenzitivitás) lehet (Fortin és Levine, 2007; Hill és mtsai, 2011). A corticalis GABAerg interneuronok egy része tehát az általuk expresszált CB₁R-ok által dominánsan modulálja és formálja a glutamaterg plaszticitást, és ezáltal a corticalis működéseket (Ali, 2009). A szinaptikus plaszticitás (LTP, LTD) normális modulációja nélkülözhetetlen a memória és tanulási folyamatokhoz (Cyril és Garcia 2002, Laroche és mtsai, 2000). Ezen kognitív folyamatok károsodása képezi az Alzheimer-kór klinikumának az alapját.

2.3.3. Cannabinoid 1-es típusú receptor és Alzheimer-kór kapcsolata

2.3.3.1. CB₁R és a glutamaterg mechanizmusok kapcsolata

A LTP és LTD normális működése, vagyis a szinaptikus plaszticitás épsége nélkülözhetetlen a tanulás és memória folyamatában, valamint a megfelelő kognitív működésekhez (Brigman és mtsai, 2010; Collingridge és mtsai, 2010; Mayadevi és mtsai, 2012). Különböző szerzők igazolták a hippocampalis és corticalis glutamaterg LTP károsodását és az LTD fokozódását Alzheimer kórban (Izumi és Zorumski 2012; Li és mtsai,

2009; Ohno-Shosaku és mtsai, 2007; Ondrejcek és mtsai 2010; Palop és Mucke 2010). Ráadásul a hippocampalis és prefrontalis szinaptikus plaszticitás károsodása már a β -amiloid depozitumok megjelenése előtt bekövetkezik (Bossers és mtsai, 2010; Li és mtsai, 2009; Shankar és Walsh 2009), melyet a β -amiloid plakkok jelenléte egyértelműen tovább súlyosbít.

Alzheimer-kórban a β -amiloid proteinek megjelenése cholinerg deficit mellett glutamaterg túlsúlyt eredményez (Bales és mtsai, 2006; Pomara és mtsai, 1992; Schliebs és Arendt 2011). A LTP kiváltásában kulcsszerepet játszik az ionotrópikus (AMPA, NMDA) és metabotrópikus glutamát receptorok (mGluR) megfelelő szintű glutamaterg stimulációja (Collingridge és mtsai, 2010; Mayadevi és mtsai, 2012). Ugyanakkor egy fokozottabb glutamaterg stimuláció LTD-t idézhet elő (Izumi és Zorumski 2012; Katona és Freund, 2008, 2012; Ondrejcek és mtsai 2010). A humán β -amiloid protein kísérleti állatok hippocampusában gátolta az LTP kiváltását viszont fokozott LTD-t eredményezett (Kamenetz és mtsai, 2003; Li és mtsai, 2009; Shankar és mtsai, 2008; Walsh és mtsai, 2002). Ennek hátterében valószínűnek tartják, hogy Alzheimer-kórban a fokozódó glutamaterg jelátvitel (Mayadevi és mtsai, 2012; Ondrejcek és mtsai, 2010; Puzzo és mtsai, 2008) intraszinaptikusan glutamát receptor deszenzitizációt, míg periszinaptikusan hiperstimulációt okoz. Míg előbbi megakadályozza az LTP-t, addig utóbbi az LTD fokozódását válthatja ki (Izumi és Zorumski 2012; Katona és Freund, 2008, 2012; Li és mtsai, 2009; Ohno-Shosaku és mtsai, 2007; Ondrejcek és mtsai 2010; Palop és Mucke 2010). Tehát az excitatórikus túlsúly a betegség korai szakaszában a szinaptikus plaszticitás zavarát eredményezi, míg később a glutamaterg excitotoxicitást okozza (Mayadevi és mtsai, 2012; Ondrejcek és mtsai, 2010).

A glutamaterg jelátvitel modulálásának fontos eszközei a posztzinaptikusan felszabaduló endocannabinoidok, melyek a preszinaptikus CB₁R-kon át fejtik ki hatásukat. Eddigi ismereteink szerint az NMDA és a mGlu receptorok fokozott stimulációja

endocannabinoid felszabadulást vált ki, mely eCB-LTD-t eredményezve gátolja a további preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulást. Így az eCB-LTD fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás szabályozásában (Izumi és Zorumski 2012; Katona és Freund, 2008, 2012; Li és mtsai, 2009; Ohno-Shosaku és mtsai, 2007; Ondrejcek és mtsai 2010; Palop és Mucke 2010). A fentiek ismeretében valószínű, hogy Alzheimer-kórban a glutamaterg jelátvitel zavara, illetve a szinaptikus plaszticitás károsodása együtt jár az endocannabinoid rendszer működésének változásával, mely a CB₁R sűrűséget is érintheti.

Másrészről a túlzott glutamát felszabadulás hiperexcitabilitást és végül a neuronok pusztulását okozza, ez a glutamaterg excitotoxicitás (Dong és mtsai, 2009; Williams és Dexter 2013; Mehta és mtsai, 2013). Ezt a jelenséget Alzheimer-kórban is leírták (Dong és mtsai, 2009; Esposito és mtsai, 2013; Mehta és mtsai, 2013; Pomara és mtsai, 1992). A glutamaterg hiperexcitabilitás következtében felborul az intracelluláris Ca²⁺ homeosztázis, felszaporodnak a lizoszomális és mitokondriális enzimek, reaktív szabadgyökök keletkeznek, mely végső soron neurodegenerációhoz és apoptózishoz vezet (Dong és mtsai, 2009, Fogarty és mtsai, 2010; Mehta és mtsai, 2013; Mirnikjoo és mtsai, 2009; Yang és mtsai, 1998). A jelenlegi álláspont szerint, e folyamat központi szereplője az intracelluláris Ca²⁺ túlzott felszaporodása az intra- és extracelluláris raktárakból a fokozott glutamaterg stimuláció hatására, mely elsősorban NMDA receptor által közvetített. Az NMDA receptor antagonistá memantin az Alzheimer-kór kezelésének egyik alappillére, mely szintén alátámasztja a glutamaterg túlsúly kóroki szerepét (Anand és mtsai, 2014; Esposito és mtsai, 2013). Ismert, hogy az endocannabinoidok a CB₁R-on hatva preszinaptikusan gátolják a glutamát felszabadulást (Marsicano és mtsai, 2003; Liu és mtsai 2009; Zhuang és mtsai, 2005). Elképzelhető tehát, hogy a corticalis (prefrontalis) glutamaterg neuronokon végződő excitatoros terminálisokon expresszált CB₁R-okrévén (Ferraro és mtsai, 2001b; Ferreira és mtsai, 2012; Fitzgerald és mtsai, 2012; Lafourcade és mtsai, 2007) az endocannabinoidok részt vesznek a glutamaterg

excitotoxicitás elleni védekezésben. Ugyanakkor Noonan és mtsai (2010) kísérleteikben, corticalis neuron kultúrán bebizonyították, hogy CB₁R agonistával stabilizálható a lizoszomális membrán permeabilitása, ezáltal megelőzhető a lizoszomális Ca²⁺ citoszolba jutása, valamint az idegsejt pusztulása. Ez alapján felvetődik a CB₁R agonisták poszt-szinaptikus neuroprotektív hatása is.

2.3.3.2. CB₁R és a cholinerg rendszer kapcsolata

CB₁R agonisták és antagonisták adásával modulálható a hippocampalis és corticalis cholinerg neurotranszmisszió (Kathmann és mtsai, 2001). Acquas és mtsai (2000, 2001) kísérleti állatokon azt találták, hogy cannabinoid agonista szisztémás adása az acetilkolin szint emelkedését eredményezi a hippocampusban és a prefrontalis cortexben. Korábban Gessa és mtsai (1998b) hasonló kísérleti körülmények között, ugyanezen régiókban cannabinoid agonistával ezzel ellentétes hatást figyeltek meg, míg a cannabinoid antagonisták adása megemelte az acetilkolin szintet. Humán és egér neocorticalis szövet preparátumokon Steffens és mtsai (2003) is utóbbiakkal megegyező következtetésekre jutottak. Tzavara és mtsai (2003a) cannabinoid antagonistá adása után szintén acetilkolinszint növekedést találtak patkány prefrontalis cortexben. Degroot és mtsai (2006) szisztémásan és lokálisan adagolt CB₁R antagonistá hatásait tanulmányozták egerek és patkányok hippocampusában. Megfigyeléseik szerint mind a szisztémásan, mind a lokálisan adott CB₁R antagonistá az acetilkolin szint emelkedését okozta. Ugyanakkor CB₁R knockout állatokon az acetilkolin szint emelkedése elmaradt, mely annak bizonyítéka, hogy a hatás CB₁R által közvetített (Degroot és mtsai, 2006). Ezek az eredmények a cholinerg-cannabinoid direkt kapcsolatra utalnak, ahol az acetilkolin szint modulálásának mechanizmusa a cholinerg terminálisokon expresszált CB₁R-ok direkt stimulációja vagy gátlása lehet. Ráadásul a cholinerg hatás közvetlenül befolyásolja a glutamaterg piramissejteken történő excitatórikus jelátvitelt,

szabályozva a szinaptikus plaszticitást (Amici és Boxer 2007; Ge és Dani 2005). Fontos azonban kiemelni, hogy eddig egyértelmű CB₁R expressziót frontális cholinerg terminálison még nem mutattak ki.

A cholinerg és cannabinoid rendszer kapcsolatát Trettel és mtsai (2003, 2004) is mélyrehatóan tanulmányozták. Kimutatták, hogy egerek szenzoros cortexében a piramissejtek endocannabinoidok segítségével retrográd úton gátolják az inhibitoros GABAerg interneuron terminálisokat (Trettel és Levine 2003). Ezt követően első lépésként igazolták Kawaguchi (1997) megfigyeléseit, miszerint a frontális cortexben a muscarin típusú acetilkolin receptorok stimulálása a CCK pozitív GABAerg interneuronokat depolarizálja, mely a piramissejtek gátlását eredményezi. Ismert, hogy corticalisan elsősorban a CCK pozitív GABAerg neuronok expresszálnak CB₁R-t (Bodor és mtsai, 2005; Marsicano és Lutz 1999). Ezekre alapozva Trettel és mtsai (2004) kimutatták, hogy a CCK pozitív GABAerg neuronok cholinerg stimulációja által kiváltott inhibitoros hatás csökkenthető, ha ezeket a neuronokat egyidejűleg CB₁R agonistával inkubálják. Kísérleteikkel bizonyították a cholinerg-cannabinoid neurotranszmisszió indirekt corticalis találkozását melynek összehatása a glutamaterg piramissejtken érvényesül (Trettel és Levine 2003; Trettel és mtsai, 2004) (2. ábra, 25. oldal).

2.3.3.3. Cannabinoid neuroprotekción

Alzheimer-kórban a cholinerg, illetve glutamaterg jelátvitel modulációján kívül egyéb cannabinoid-mediált mechanizmusok jelenléte is felmerült. Ilyen például a neuroprotekción, mely lehet CB₁ és/vagy CB₂ receptor által közvetített antiinflammatórikus hatás. A cannabinoid receptorokat többek között a patogenézisben résztvevő neuronok, mikroglia sejtek, makrofágok és leukociták is expresszálnak (Bouaboula és mtsai, 1995; Galiègue és mtsai, 1995; Hegyi és mtsai, 2009, 2012; Molina-Holgado és mtsai, 2002; Sánchez és mtsai,

1998; Waksman és mtsai, 1999; Walter és mtsai, 2003). Az eddigi kutatások arra utalnak, hogy Alzheimer-kórban a cannabinoid immunmoduláció elsősorban – de nem kizárólagosan – a CB₂R-on keresztül történik (Galiègue és mtsai, 1995; Coopman és mtsai, 2007; Ramirez és mtsai, 2012). Ramirez és mtsai (2005) igazolták, hogy Alzheimer-kóros minták szenilis plakkjai főként CB₂R-kat tartalmaznak csökkent CB₁R mennyiség mellett, azonban nem szelektív, illetve CB₁R- és CB₂R-szelektív cannabinoidokkal is neuroprotektív hatást értek el. Más szerzők is igazoltak CB₁R-közvetített immunsejt regulációt (Massi és mtsai 2000). Emellett, ACEA (arachidonil-2-kloroetilamid – CB₁R agonista) adásával Aso és mtsai (2012) a reaktív asztrociták számát csökkentették sikeresen Alzheimer-kóros egér modellen. Eredményeiket a foszforilált glikogén szintáz kináz-3 β inaktivitásával hozták kapcsolatba. A fentiekén kívül Marsicano és mtsai (2003) kimutatták, hogy a neuronok szómáján levő CB₁R-ok stimulációja fokozza az ERK (extracelluláris szignál-regulált kináz) aktivitást, ezáltal BDNF (agyi eredetű neurotróf faktor) expressziót indukál, mely a cannabinoid idegsejtvédelem másik fontos mechanizmusa lehet.

2.3.3.4. CB₁R Alzheimer-kórban: korábbi vizsgálatok

Az Alzheimer-kórban történő CB₁R elváltozásokról az eddigi adatok ellentmondásosak. Westlake és mtsai (1994) végstádiumú Alzheimer-kóros betegektől származó agymintákon csökkent CB₁R sűrűséget találtak az entorhinalis cortexben, hippocampusban, nucleus caudatusban, mediális globus pallidusban és SNc-ban, míg az insularis és temporalis cortexben nem volt eltérés. Ugyanakkor nem igazolódott összefüggés a CB₁R denzitás és az Alzheimer-kórban jellegzetes neuropatológiai eltérések eloszlása között, ezért arra következtettek, hogy a CB₁R csökkenés a normális öregedés következménye lehet, mely kiterjedt neuron pusztulással, illetve szinapszisok csökkenésével jár. Ramirez és mtsai

(2005) immunhisztokémiai módszerrel igazoltak jelentős CB₁R protein expresszió csökkenést Alzheimer-kóros betegek frontális cortexében. Más szerzők nem találtak CB₁R sűrűségváltozást Alzheimer-kóros agymintákban, beleértve az entorhinalis cortexet (Benito és mtsai, 2003), elülső cingularis cortexet, hippocampust és a nucleus caudatust is (Lee és mtsai, 2010a). Utóbbi tanulmányban 17 Alzheimer-kóros beteg agyát dolgozták fel, ezek közül 15 esetet a Braak V és VI, míg két mintát a Braak III-as neuropatológiai stádiumba soroltak. Fontos kiemelni, hogy Braak I és II stádiumú betegek mintáit eddig még nem vizsgálták.

3.CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során hagyományos receptor autoradiográfiát alkalmaztunk a dopamin D_2/D_3 receptorok és a CB_1R denzitás vizsgálatára, illetve [^{35}S]GTP γ S funkcionális autoradiográfiát a dopamin D_2/D_3 receptor–G-protein közötti jelátvitel vizsgálatára.

3.1. 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. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a krónikus dopaminerg terápia dopamin receptor down-regulációt idéz elő (Alexander és mtsai, 1993; Linazasoro és mtsai, 1999; Thanvi és Lo, 2004; Thobois és mtsai, 2004). Azonban humán Parkinson-kóros agymintákon még sosem vizsgálták az agonista által stimulált dopamin D_2/D_3 receptor–G-protein kapcsolódást a betegség késői szakaszában. Az állatmodelleken végzett kutatások előre megtervezett körülmények között történnek, és nem tükrözik tökéletesen a Parkinson-kóros betegek hosszútávú dopaminerg kezelésének receptordenzitásra és aktivitásra kifejtett hatásait. A jelen tanulmányban feldolgozott Parkinson-kóros agyminták olyan betegektől származtak, akik hosszas betegségük alatt rendszeres gyógyszeres antiparkinson terápiában részesültek, így a dopamin D_2/D_3 receptordenzitást és jelátvitelt közvetlenül szöveti szinten vizsgálhattuk krónikus dopaminerg kezelést követően. **Célunk a striatalis és corticalis D_2/D_3 dopamin receptor–G-protein jelátvitel tanulmányozása volt a D_2/D_3 receptordenzitásváltozás függvényében azzal a központi kérdéssel, hogy hosszasan kezelt humán Parkinson-kórban fennállhat-e a dopaminhiányt kompenzáló intracelluláris jelátviteli mechanizmus.**

3.2. Ismert, hogy Parkinson-kórban nemcsak a dopamin, hanem egyéb neurotranszmitter rendszerek (cholinerg, glutamaterg, serotoninerger, adrenerger, opiat és GABAerg) működése is károsodik, beleértve a cannabinoid rendszert is (Freund és mtsai, 2003; Lambert és Fowler 2005). A dopamin és cannabinoid rendszer közötti kapcsolatot számos Parkinson-kóros állatmodellen, illetve néhány Parkinson-kóros betegről származó postmortem agymintán végzett kísérlet is igazolta. A striatumban a CB₁R-kat preszinaptikusan a corticostriatalis glutamaterg terminálisok, helyi GABAerg és cholinerg végződések, míg posztoszínaptikusan a GABAerg közepes tüskés neuronok expresszálják. Dopamin és CB₁ receptor koexpresszió pedig a corticostriatalis glutamaterg terminálisokon (preszinaptikus) és nagy valószínűséggel a striatalis közepes tüskés idegsejteken (posztoszínaptikus) található. A prefrontális cortexben a glutamaterg piramissejtekkel szinapszt képező GABAerg interneuronok és glutamaterg neuronok axonterminálisai expresszálják a két receptortípust. Funkcionális szempontból Kreitzer és Malenka (2005, 2007) azt találták, hogy a dopamin D₂ receptor fontos szerepet játszik az eCB-LTD kiváltásában (részletes áttekintés a 2.2.2.2. fejezetben).

Mindazonáltal korábban sosem vizsgálták a D₂/D₃ és a CB₁ receptorsűrűséget krónikusan dopamin szubsztituált Parkinson-kóros betegről származó postmortem agymintán. Vizsgálatainkat a két receptor típus között fennálló egyértelmű funkcionális kapcsolatra, valamint a glutamaterg és GABAerg neuronokon jelen levő CB₁ és D₂ receptor koexpresszióra alapoztuk. **Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a Parkinson-kórban jól ismert striatalis dopamin D₂ receptordenzitás-csökkenés humán agymintákon együtt jár-e a CB₁ receptorsűrűség változásával.**

3.3. Számos kutatásban igazolták már az Alzheimer-kór és CB₁R populáció között fennálló kapcsolatot. Alzheimer-kórban a kognitív folyamatokért felelős agyterületeken előbb a tanulásért és memóriáért felelős szinaptikus plaszticitás károsodik, majd megjelennek a

neuropatológiai elváltozások is. Neurokémiai szempontból a cholinerg és glutamaterg jelátvitel zavara alakul ki, melyek modulációjában fontos szerepet játszik a preszinaptikus CB₁R. Ráadásul cannabinoidok által közvetített antiinflammatórikus, illetve neuroprotektív hatásokat is megfigyeltek neurodegeneráció során (részletes áttekintés a 2.3.3. fejezetben). Jelen tanulmányban, elsősorban a glutamaterg szinaptikus plaszticitás CB₁R-közvetített modulációjára alapozva kívántuk vizsgálni 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 prefrontális cortexre esett, melyen CB₁R autoradiográfiát végeztünk. **Vizsgálatainkkal két kérdésre kerestünk választ. Egyik, hogy a betegség korai szakaszában a neuropatológiai érintettség megjelenése előtt észlelhető-e a szinaptikus plaszticitás károsodásával egyidejű CB₁R denzitás eltérés. Másik, hogy az Alzheimer-kór különböző neuropatológiailag elkülöníthető stádiumaiban van-e a CB₁R sűrűséget érintő jellegzetes elváltozás.** Az endocannabinoid rendszernek a glutamaterg, cholinerg, GABAerg kapcsolatai, szinaptikus plaszticitásban betöltött és neuroprotekcióban felmerülő szerepe révén a CB₁R sűrűségváltozása várható lenne.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

A [^{35}S]GTP γ S ([^{35}S]guanozin 5'- γ -tiotrifoszfát, specifikus radioaktivitás 1250 Ci/mmol = 46250 GBq/mmol), valamint a [^3H]raclopride ligandumokat (specifikus radioaktivitás 87 Ci/mmol = 3219 GBq/mmol), a PerkinElmer Life Sciences Inc. forgalmazótól (Boston, USA) vásároltuk.

A CB₁R autoradiográfia során a nemrégiben kifejlesztett [^{125}I]SD7015 nevű (Donohue, 2008; Donohue és mtsai, 2009) (specifikus radioaktivitása 2175 Ci/mmol = 80475 GBq/mmol) CB₁R agonista ligandumot használtuk, melyet a Karolinska Intézettől (Stockholm, Svédország) kaptunk társszerzőnk donációjaként.

A guanozin 5'-difoszfát (GDP), pargyline hidroklorid (szelektív MAO-B inhibitor), EGTA, Dl-ditiotreitol (DTT), HEPES vegyszereket, GBX filmfixáló és előhívó csomagot a Sigma-Aldrich forgalmazótól (Budapest, Magyarország), a CB₁R receptor antagonistá rimonabant-ot a Cayman Chemicals-tól (Michigan, USA) vásároltuk. Kísérleteinket analitikai tisztaságú vegyszerekkel végeztük, melyeket kereskedelmi forrásokból szereztünk be.

4.1. Agyminták

Kísérleteinket fagyasztott agymintákon végeztük. A feldolgozott nucleus caudatus, cingularis és frontalis cortex mintákat az Amszterdami Agybanktól (Netherlands Brain Bank Netherlands Institute for Neuroscience Amsterdam, project number: 2009/578) míg az Alzheimer-kóros betegektől, illetve kontrollszemélyektől származó prefrontalis cortex mintákat a Budapesti Semmelweis Egyetem, Anatómiai Tanszékének Agybankjától kaptuk szerzőtársunk közreműködése által. Az agybankok rendelkezésünkre bocsátották a klinikai és neuropatológiai adatokat is. A betegek írásos beleegyezésüket adták, hogy haláluk után agykoponyájuk boncolása elvégezhető, és agymintáik, klinikai adataikkal együtt

felhasználhatóak kutatási céllal. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Etikai Tanácsa jóváhagyta (protokoll szám: DEOEC RKEB/IKEB M2547a-2006).

Kutatásunk **első részében** hat Parkinson-kóros betegtől és hat neurológiai és pszichiátriai betegségben nem szenvedett kontrollszemélytől származó nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintáin vizsgáltuk a dopamin D₂/D₃ receptorsűrűséget, illetve receptor–G-protein jelátvitelt. A **második részben** a dopamin D₂/D₃ receptor és a CB₁R denzitását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze három Parkinson-kóros betegtől, valamint három kontrollszemélytől származó nucleus caudatus és frontalis cortex mintán. A betegek antiparkinson kezelésre vonatkozó adatait megkaptuk. A hat Parkinson-kóros betegből öt dopamin (L-DOPA) szubsztitúciós kezelésben részesült átlagban 7,25±2,21 éven át (átlag ±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-szinuklein V. vagy VI. stádiumnak felelt meg.

1. táblázat. Parkinson-kóros betegektől és kontrollszemélyektől származó minták adatai

	Kontroll n=6	Parkinson-kór n=6
Életkor (év)	84,16 ± 1,40	75,33 ± 2,66
Betegség időtartama (év)	-	14,66 ± 2,76
Nem (férfi:nő)	6 : 0	5 : 1
L-DOPA kezelés időtartama (év)		7,25 ± 2,21
Postmortem idő (óra) a minta fagyasztásáig	< 10	< 10
Tárolási idő (év)	3,00 ± 0,44	5,33 ± 0,42

Értékek: átlag ± SEM, n: kontroll, illetve Alzheimer-kóros személyek száma, akiktől a minták származtak.

Kutatásunk **harmadik részében** a CB₁R denzitást vizsgáltuk tizenegy Alzheimer-kóros betegtől és öt kontrollszemélytől származó prefrontalis cortex (Brodmann area 10) mintán. Az Alzheimer-kóros minták neuropatológiai adatait és Braak-féle kritériumoknak megfelelő besorolásukat (Braak és Braak, 1991) az agybank bocsátotta rendelkezésünkre. A kontroll prefrontalis cortexek neurológiai, illetve pszichiátriai betegségben nem szenvedett személyektől származtak és nem mutatták neurodegeneráció jeleit a kórszövettani vizsgálaton. A 11 Alzheimer-kóros mintát a Braak-féle neuropatológiai stádium beosztásnak megfelelően három csoportba osztottuk. Így a Braak I-II csoport (korai, tünetmentes, stádiumok – neuropatológiailag ép prefrontalis cortex) három mintát, a Braak III-IV csoport (enyhe kognitív hanyatlás – kezdődő prefrontalis érintettség) négy mintát és a Braak V-VI csoport (végstádium, demencia – súlyos prefrontalis érintettség) szintén négy mintát tartalmazott.

2.táblázat. Alzheimer-kóros betegektől és kontrollszemélyektől származó minták adatai

	Kontroll n=6	Alzheimer-kór		
		Braak I-II stádium n=3	Braak III-IV stádium n=4	Braak V-VI stádium n=4
Életkor (év)	45,5 ± 15,4	77,8 ± 11,3	74,8 ± 9,2	87 ± 5,4
Postmortem idő (óra) a minta fagyasztásáig	5,8 ± 2,8	4,5 ± 2,7	4,0 ± 2,1	5,3 ± 1,0

Érték: átlag ± SEM, n: kontroll, illetve Alzheimer-kóros személyek száma, akiktől a minták származtak.

A fagyasztott mintákat cryomicrotom segítségével -20 °C-on 20 µm vastagságúra metszettük és zselatinnal fedett tárgylemezekre vittük fel, levegőn szárítottuk és -20 °C-on tároltuk a későbbi felhasználásig. Technikai okok miatt a dopamin D₂/D₃ receptor

autoradiográfia során, valamint gyrus frontalis medialis esetében a dopamin-stimulált [^{35}S]GTP γ S kötődési autoradiográfia során is csak öt kontroll és öt Parkinson-kóros mintát vizsgálhattunk.

4.2. Dopamin D₂/D₃ receptor autoradiográfia

A [^3H]raclopride-dal végzett dopamin D₂/D₃ receptor autoradiográfiát a Hall és mtsai (1998,2000) által leírtaknak megfelelően végeztük. A metszeteket 30 percig szobahőmérsékleten preinkubáltuk TRIS puffer oldatban mely 20 mM HEPES-t, 118 mM NaCl-t, 4,8 mM KCl-t, 2,5 mM CaCl₂-t, 1,2 mM MgSO₄-ot és 10 mM NaOH-ot tartalmazott, pH-ja 7,4 volt. Ezután a metszetek inkubációja következett 15 percen át KRH (Krebs-Ringer-HEPES) puffer oldatban, melyhez 0,05 mg/mL szarvasmarha szérumalbumint és 1 nM [^3H]raclopride-t adtunk. A nem specifikus receptor kötődést 10 μM „hideg” (izotóppal nem jelölt) raclopride jelenlétében határoztuk meg. Ezt követően a radioizotóppal jelölt metszeteket 20 percen át jéghideg (4 C°) TRIS pufferrel mostuk, majd rövid ideig jéghideg desztillált vízbe mosattuk a sók eltávolítása végett. Végül a metszeteket megszárítottuk hideg levegővel.

A radioizotóppal jelölt mintákat tríciumszenzitív phosphorimager plate-re (Fujifilm Plate BAS-TR2025) exponáltuk 90 percig, melyek beolvasása Fujifilm BAS-500 phosphorimager-rel (Fujifilm, Tokyo) történt. Majd kvantitatív denzitometriás méréseket végeztünk Multi Gauge 3.2 phosphorimager szoftverrel (Fujifilm, Tokyo). A jelölt metszetekkel együtt autoradiográfiás célra kifejlesztett ^3H -mikroskálákat is (RPA510, Batch 18, Amersham) helyeztünk a platekre a radioaktivitás mértékének kvantifikálása céljából. A skála egységein mért optikai denzitásértékeket megfeleltettük az egységek ismert radioaktív koncentrációinak (nCi/mg standard), majd ezt átalakítottuk [^3H] nCi/mg szövétté (Geary és

mtsai, 1985) és végül [^3H] fmol/gramm szövet koncentrációvá. A skálák optikai denzitás és a megfelelő fmol/gramm szövet értékeinek felhasználásával megalkottuk a kvantifikáláshoz szükséges grafikont, illetve átalakítási képletet.

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 átlagértékeit számoltuk ki és ezek alapján elemeztük eredményeinket.

Néhány minta esetében a specifikus kötődést az Adobe Photoshop CS2 program RGB módját használva is szemléltetjük. Az ugyanazon mintából származó metszeteknek a totális és nem-specifikus kötődést ábrázoló képét egymásra illesztve a nem-specifikus kötődést „kivontuk” a totálisból, majd a kapott képet vörössel is súlyoztuk (10. ábra).

4.3. Dopamin által stimulált receptor- ^{35}S]GTP γ S kötődési autoradiográfia

A bazális és dopamin által stimulált [^{35}S]GTP γ S kötődési autoradiográfiát a Sóvágó és mtsai (2005) által leírt módszer minimális átalakításával végeztük. Az optimális kísérleti körülmények az alábbiak voltak: a metszeteket 50 mM-os HEPES puffer oldatba pre-inkubáltuk (150 mM NaCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT és 2 mM GDP) 30 percig 37 C°-on. Ezt követően a mintákat ugyanebbe az oldatba inkubáltuk 90 percig 37 C°-on 50 pM [^{35}S]GTP γ S hozzáadásával (dopamin nélkül), hogy megfigyeljük a ligandum bazális kötődését. A dopamin által stimulált [^{35}S]GTP γ S kötődés vizsgálatához a fent említett oldathoz dopamint (1 mM) és pargyline-t (100 μM) adtunk. Inkubáció után a metszeteket hideg HEPES pufferben mosattuk kétszer 10 percig, melyet egy rövid hidegvizes fürdő követett. Ezután a metszeteket melegítő tálcán megszáritottuk és β -sugárzás detektálására

alkalmas speciális filmekre (Kodak BiomaxMR, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) exponáltuk négy napon át. Az exponálás [^{14}C] kalibrációs mikroskálákkal együtt történt a későbbi kvantifikálás érdekében (American Radiolabelled Chemicals Inc, St Louis, MO, USA). A filmek előhívása után az autoradiogramok digitalizálása következett, melyet nagyfelbontású szkennelrel (Epson Perfection V750 Pro) végeztünk, továbbá a denzitometriás mérések az Adobe Photoshop CS2 nevű számítógépes programmal történtek.

A [^{35}S]GTP γ S kötődés kvantifikálásához előbb a ^{14}C -mikroskálák egységein mért optikai denzitásértékeket megfeleltettük az egységek gyártó által megadott radioaktivitásainak, nCi/mg-ban kifejezve. Ezt követően, figyelembe véve a [^{35}S]GTP γ S specifikus aktivitását a ^{14}C -mikroskála nCi/mg értékeit átalakítottuk [^{35}S] nCi/mg szövet koncentrációvá (Miller 1991). Végül skálánk egységeit [^{35}S] fmol/gramm szövet mennyiségben fejeztük ki, melyeket a megfelelő optikai denzitásokkal együtt grafikonon ábrázolva, megkaptuk az agymintákon mért optikai denzitások fmol/gramm szövetre alakításához szükséges képletet.

Mintánként két párhuzamos mérést végeztünk. Az ugyanazon mintán végzett párhuzamos méréseket átlagoltuk, majd a különböző betegek, illetve kontrollszemélyek megegyező agyi régióiból származó méréseket is átlagolva értékeltük eredményeinket.

4.4. CB₁R autoradiográfia

A CB₁ receptorokat a nemrégiben kifejlesztett CB₁R specifikus [^{125}I]SD7015 nevű agonista ligandummal jelöltük. A ligandum CB₁R inhibitoros konstans (K_i) értéke (3,4 nM) közelít a jól ismert CB₁R antagonistá rimonabant K_i értékéhez (1,38 nM), mely a [^{125}I]SD7015 ligandum CB₁R iránti magas affinitását bizonyítja. Kimutatták, hogy a SD7015 CB₁R szelektivitása jelentősen felülmúlja a rimonabant-ét. Majom agyakon végzett

autoradiográfiás kísérleteken szemléltették, hogy a [125 I]SD7015 jelentős kötődést mutatott a nagyobb CB₁R denzitású agyi régiókban, mely „hideg” (radioaktívan nem jelölt) rimonabanttal meggátolható volt (Donohue, 2008; Donohue és mtsai, 2009). Máthé és mtsai (2013) a CB₁R knockout egereken végzett SPECT és autoradiográfiás vizsgálataik során nem találtak corticalis [125 I]SD7015 bekötődést, míg a CB₁R-ral rendelkező kontroll állatok agymintáin jól láthatóvá vált a nagyobb receptorsűrűséggel rendelkező szürkeállomány. Mindez egyértelműen igazolja, hogy a [125 I]SD7015 alkalmas a CB₁R-ok jelölésére autoradiográfiás, illetve SPECT vizsgálatok esetében, azonban a ligandumot korábban még sosem használtak emberi Parkinson-kóros vagy Alzheimer-kóros postmortem agymintán autoradiográfiás kísérletekben.

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 metszeteken. Kísérleteinket a Donohue és mtsai (2009) által kifejlesztett módszer alapján végeztük kevés változtatással. A metszeteket 40 pM [125 I]SD7015 koncentrációjú 50 mM-os TRIS puffer oldatba inkubáltuk (pH 7,4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, aszkorbin sav 0,1% w/v, pargyline 10 μ M, marha szérumalbumin (BSA 0,1%)) 60 percen át. A nem-specifikus kötődést 10 μ M rimonabant adásával határoztuk meg. Ezt követően a metszeteket ugyanebben az oldatban mosattuk háromszor 30 percig, melyet minden alkalommal egy rövid jéghideg desztillált vizes mosás követett. A radioliganddal jelölt metszeteket [14 C] kalibrációs skálákkal (American Radiolabelled Chemicals Inc, St Louis, MO, USA) együtt exponáltuk β -sugárzás detektálására alkalmas speciális filmekre 24 órán át (Kodak BiomaxMR, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A filmek előhívása után az autoradiogramok digitalizálása következett, melyet nagyfelbontású szkennelrel (Epson Perfection V750 Pro) végeztünk,

továbbá a denzitometriás mérések az Adobe Photoshop CS2 nevű számítógépes programmal történtek.

A CB₁R denzitás kvantifikálására Baskin és Wimpy (1989) által leírt módszert alkalmaztuk. Ennek alapján a ¹⁴C-mikroskálák egységeinek gyártó által megadott standard radioaktivitását átalakítottuk ekvivalens szöveti [¹²⁵I] koncentrációkká, melyet a [¹²⁵I] egységnyi szöveti területen, egységnyi idő (1 perc) alatt bekövetkező hasadásainak mennyiségével (DPM/mm² – disintegrations per minute per mm²) fejeztünk ki. Az átalakítás az alábbi képlet szerint történt:

$Y([^{125}\text{I}] \text{ DPM/mm}^2) = -26,798 + 104,261X - 1,295X^2$, ahol „X” a [¹⁴C] radioaktivitása $\mu\text{Ci/grammban}$. Így megkaptuk a [¹⁴C] kalibrációs skálának megfelelő [¹²⁵I]DPM/mm² skálát, mely alapján kvantifikálhattuk a szövetekben mért optikai denzitásértékeket.

Az azonos betegtől származó párhuzamos 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 elemeztük eredményeinket.

Néhány minta esetében a specifikus kötődést az Adobe Photoshop CS2 program RGB módját használva is szemléltetjük. Az ugyanazon mintából származó metszetek totális és nem-specifikus kötődésének szkennelt képét egymásra illesztve a nem-specifikus kötődést „kivontuk” a totálisból, majd a kapott képet vörössel is súlyoztuk (11. és 13. ábra).

5. EREDMÉNYEK

Kutatásaink exploratív jellegűek voltak. A különböző mintacsoportokban vizsgált viszonylag alacsony darabszámok miatt eredményeink alapján definitív következtetések nem vonhatók le. Ezekre való tekintettel adataink statisztikai elemzésétől eltekintettünk. Mindazonáltal a D₂/D₃ receptorsűrűség és jelátvitel, valamint a CB₁R sűrűség állapotára vonatkozó megfigyeléseink reményeink szerint irányt mutatnak, alapot adnak a Parkinson- és Alzheimer-kór további kutatásaiban. Ez végsősoron elvezethet a fenti betegségek patomechanizmusának pontos megismeréséhez, esetleg új terápiák, diagnosztikus eljárások kifejlesztéséhez.

5.1. Dopamin D₂/D₃ receptor sűrűség és dopamin által stimulált receptor-[³⁵S]GTPγS kötődés

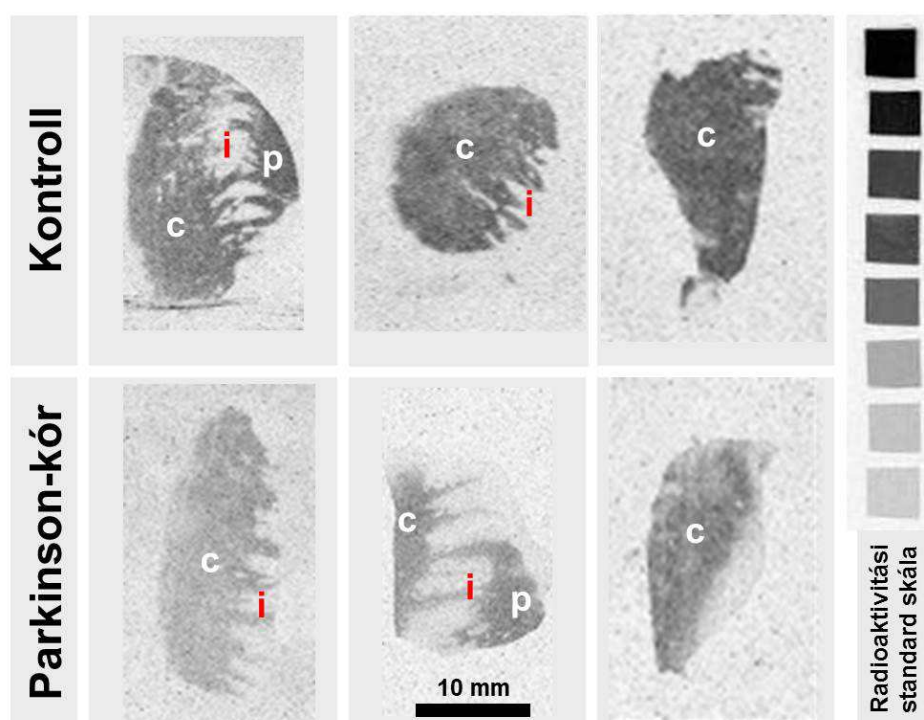
5.1.1. Dopamin D₂/D₃ receptorsűrűség Parkinson-kórban

A D₂/D₃ receptorsűrűséget a D₂/D₃ receptor antagonistá, tríciummal jelölt raclopride ligandummal vizsgáltuk nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintákban. A kontroll nucleus caudatus mintákban a D₂/D₃ dopamin receptorsűrűség jelentősen nagyobb volt, mint ugyanezen agyi régió Parkinson-kóros betegektől származó mintacsoportjában ($24,08 \pm 2,06$ fmol/g szövet és $18,43 \pm 2,82$ fmol/g szövet (átlag $\pm$ SEM)) (3. ábra). A dopamin D₂/D₃ receptordenzitás sem a gyrus frontalis medialis, sem a gyrus cinguli esetében nem mutatott érdemi különbséget a kontroll, valamint a Parkinson-kóros csoport között. Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. Dopamin D₂/D₃ receptor kötődés fmol/gramm szövetben kifejezve emberi nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintákon.

	Kontroll (fmol/gramm szövet)	n	Parkinson-kór (fmol/gramm szövet)	n
Nucleus caudatus	24,08 ± 2,06	5	18,43 ± 2,82	5
Gyrus frontalis medialis	4,01 ± 0,39	5	3,36 ± 0,26	5
Gyrus cinguli	4,32 ± 0,19	5	4,19 ± 0,19	5

Értékek: átlag ± SEM. n: kontroll, illetve Parkinson-kóros személyek száma, akiktől a minták származtak.



3. ábra. [³H]raclopride dopamin D₂/D₃ receptor autoradiográfia [³H] radioaktivitási standard skálával, kontrollszemélyek (felső sor) és Parkinson-kóros betegek (alsó sor) nucleus caudatus (c) mintáin. p: putamen; i: capsula interna. Mértékkála 10 mm-nek felel meg.

5.1.2. Dopamin által stimulált receptor– $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés Parkinson-kórban

A kontrollcsoporton belül a vizsgált agyi régiókban a dopamin által stimulált $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés a legnagyobb aktivitást a nucleus caudatusban mutatta (6. ábra), melyet a frontális régió követett. A stimuláció a cingularis cortexben volt a legalacsonyabb. A Parkinson-kóros minták esetében a stimulált $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés az alábbi tendenciát mutatta: gyrus frontalis medialis >nucleus caudatus>gyrus cinguli (5. ábra; 4.táblázat).

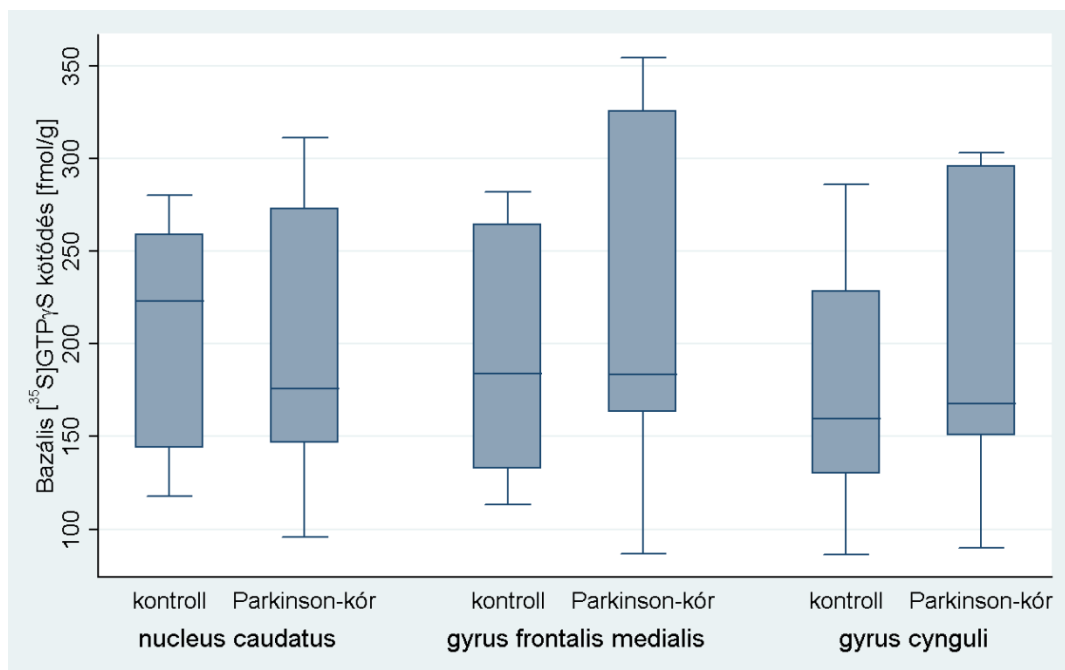
Összehasonlítottuk a kontroll és Parkinson-kóros csoportok ugyanazon agyi régióiban kapott eredményeket is. A bazális (stimuláció hiányában történő) $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődést illetően a kontroll és Parkinson-kóros nucleus caudatus minták közel azonos szintű (199 ± 17 fmol/g és 198 ± 21 fmol/g), míg a frontális és cingularis régióknál a Parkinson-kóros minták átlagértékei megközelítőleg 15%-kal magasabb bekötődést mutattak. A dopamin által stimulált $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ bekötődés átlagolt értéke valamennyi vizsgált agyterület esetén enyhe növekedést mutatott Parkinson-kórban a kontroll csoporthoz képest.

Összességében tehát a nucleus caudatusban kapott egyenlő bazális $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ bekötődésen kívül, a Parkinson-kóros mintákon mind a bazális, mind a stimulált kötődés kissé emelkedett. Fontos kiemelni, hogy ezek a növekedések nem jelentős mértékűek, kivéve a Parkinson-kóros nucleus caudatusban. Utóbbi régióban a növekedés jelentősnek számít, ugyanis kifejezett D_2/D_3 dopamin receptordenzitás-csökkenés mellett figyelhető meg. Az eredmények összefoglalása a 4. táblázatban, az 4. és 5. ábrán látható.

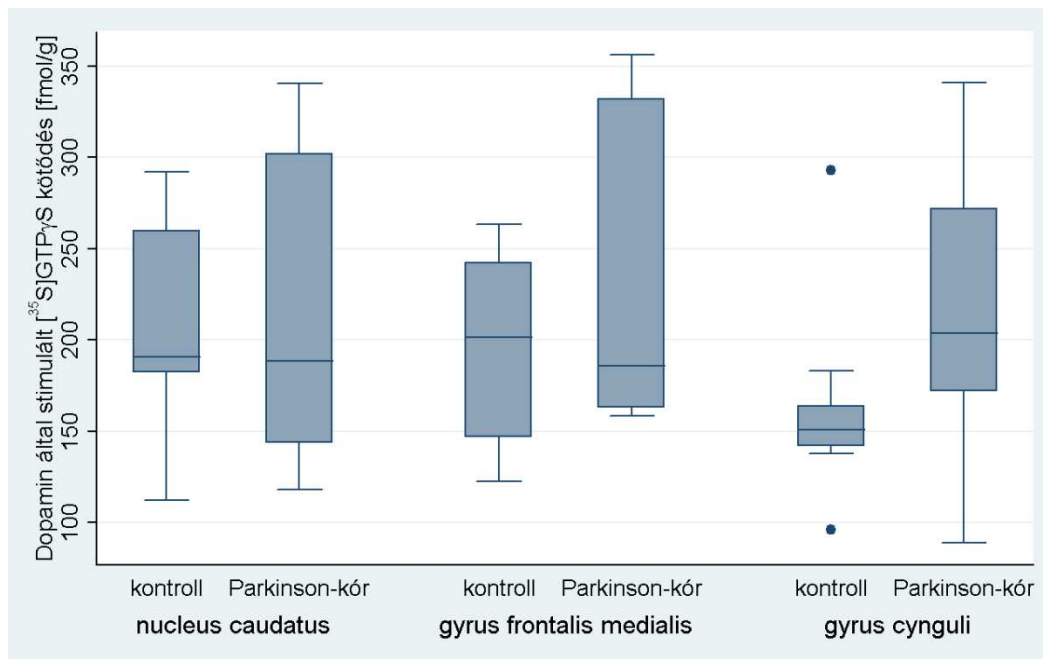
4. táblázat. Dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés humán nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintákban. A dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés enyhén emelkedett volt minden Parkinson-kóros minta esetében, de a nucleus caudatusban jelentős D_2/D_3 dopamin receptordenzitás-csökkenés mellett figyelhető meg.

Dopamin által stimulált $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés						
	Bazális kötődés (fmol/g)			Stimulált kötődés (fmol/g)		
	Kontroll	Parkinson-kór	n	Kontroll	Parkinson-kór	n
Nucleus caudatus	199±17	198±21	6	210±15	215±25	6
Gyrus frontalis medialis	194±21	223±29	5	198±16	235±28	5
Gyrus cinguli	177±16	201±21	6	181±15	211±27	6

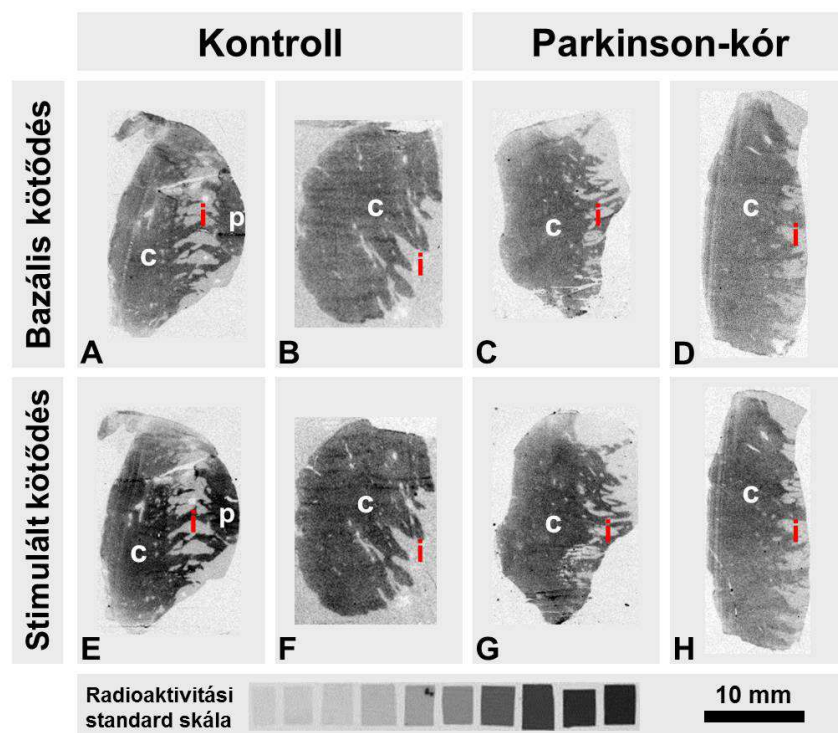
Értékek: átlag ± SEM. n: kontroll, illetve Parkinson-kóros személyek száma, akiktől a minták származtak.



4. ábra. A nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintákon létrejött bazális (dopamine stimuláció nélküli) [^{35}S]GTP γ S kötődés [fmol/g] összehasonlítása kontroll és Parkinson-kóros mintacsoportok esetében. A D_2/D_3 receptor–G-protein kapcsolódás minimális növekedést mutat a Parkinson-kóros mintacsoportokban, de lényegi különbség a kontrollokhoz képest nem látható. Az egyes dobozdiagramokban (box-plot) a dobozban levő vízszintes vonal a mintacsoporton belüli medián értéket jelöli. A doboz az alsó és a felső kvartilis érték által határolt tartományt szemlélteti.



5. ábra. A nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis és gyrus cinguli mintákon létrejött dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés [fmol/g] összehasonlítása kontroll és Parkinson-kóros mintacsoportok esetében. A D_2/D_3 receptor-G-protein kapcsolódás minimális növekedést mutat a Parkinson-kóros mintacsoportokban, de lényegi különbség a kontrollokhoz képest nem látható. Fontos kiemelni azonban, hogy a nucleus caudatusban a D_2/D_3 dopamin receptordenzitás-csökkenés jelentős volt. Az egyes dobozdiagramok (box-plot) a mintacsoporton belüli alsó és felső szélsőséges értékeket (pontok), illetve a medián értéket (dobozban levő vízszintes vonal) mutatják. A doboz az alsó és a felső kvartilis érték által határolt tartományt szemlélteti.



6. ábra. Dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődési autoradiográfia emberi nucleus caudatus (c) mintákon, $[^{14}\text{C}]$ radioaktivitási standard skálával. A-D: bazális (dopamin stimuláció nélküli) kötődés; E-H: stimulált (dopamin stimuláció melletti) kötődés. i: capsula interna, ahol nincs radioligand kötődés; p: putamen. Mértékkála 10 mm-nek felel meg.

5.1.3. Dopamin D_2/D_3 receptorsűrűség és dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés összevetése

A Parkinson-kóros betegektől származó nucleus caudatus mintákban lényegesen csökkent a D_2/D_3 receptorok sűrűsége a kontrollokhoz képest (3. ábra; 3. táblázat), ugyanakkor a dopamin által stimulált receptor- $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötődés hasonló szinten volt a kontroll és Parkinson-kóros csoportokban (5. és 6. ábra; 4. táblázat). Ez arra utal, hogy Parkinson-kórban a nucleus caudatusban a csökkent D_2/D_3 receptor populáció esetében a

receptor–G-protein jelátvitel fokozódik, mely végső soron azt sugallja, hogy a csökkent receptorsűrűség mellett a jelátvitel kontroll szinten marad.

A gyrus frontalis medialisban és gyrus cinguliban mért D₂/D₃ dopamin receptordenzitást és jelátvitelt illetően a Parkinson-kóros mintacsoportok kissé magasabb átlagértékei nem tekinthetők jelentős különbségnek, részben az alacsony mintaszám, részben az adatok nagy szórása miatt (4. és 5. ábra; 4. táblázat).

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

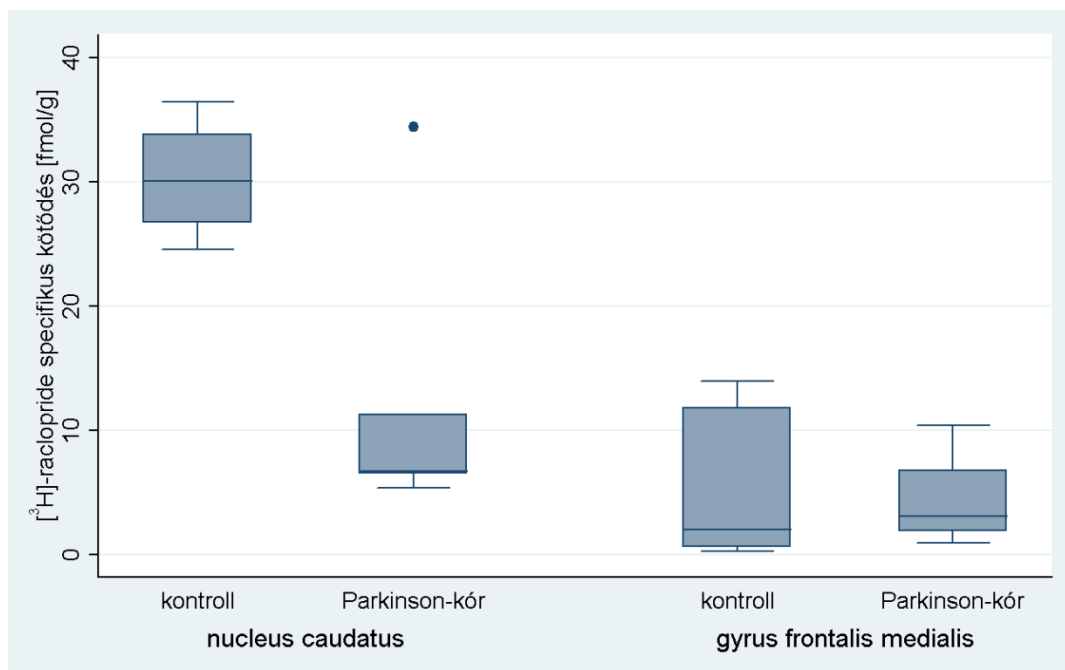
A CB₁R sűrűséget három kontroll és három Parkinson-kóros személytől származó nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis mintában tanulmányoztuk az [¹²⁵I]SD7015, CB₁R specifikus ligandummal.

A tanulmányozott régiókban összehasonlítottuk az ugyanazon mintákon mért dopamin D₂/D₃ receptor- és CB₁R sűrűséget a kontroll és Parkinson-kóros csoportok esetében. Amíg a Parkinson-kóros nucleus caudatusban a dopamin D₂/D₃ receptordenzitás lényeges csökkenését észleltük a kontrollhoz képest ($12,84 \pm 5,49$ fmol/g, illetve $30,26 \pm 2,48$ fmol/g, átlag $\pm$ SEM) (7. és 10. ábra), addig a CB₁R sűrűség változatlanak bizonyult ($16,66 \pm 2,69$ DPM/mm², illetve $18,30 \pm 3,60$ DPM/mm²) (8. és 11. ábra). Eredményeink azt sugallják, hogy előrehaladott, krónikusan kezelt Parkinson-kórban a dopamin D₂/D₃ receptor populáció down-regulációja mellett a CB₁R sűrűség kontroll szinten marad. A kontroll és Parkinson-kóros gyrus frontalis medialis minták esetében a vizsgált receptorok denzitása közel azonos szintet mutatott (6, 7, 8 és 11. ábra). Eredményeinket az 5. táblázat és a 9. ábra foglalja össze.

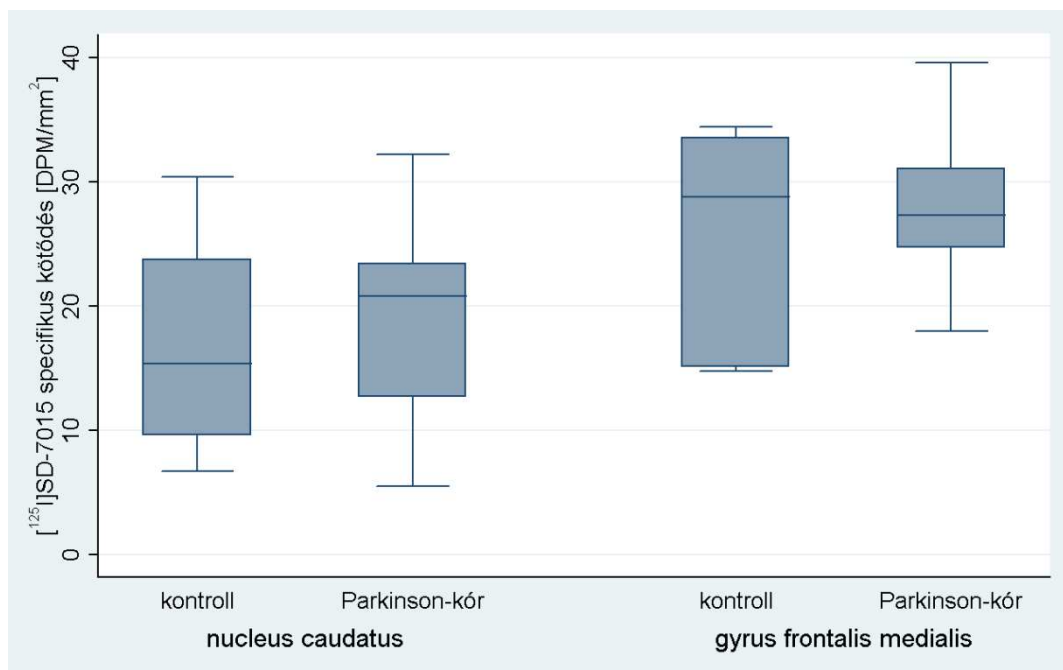
5. táblázat. Humán nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis minták CB₁R denzitása a [¹²⁵I]SD7015 ligandum specifikus kötődésével kifejezve, valamint D₂/D₃ dopamin receptordenzitása a [³H]raclopride specifikus kötődésével kifejezve.

	Kontroll			Parkinson-kór		
	[¹²⁵I]SD7015 specifikus kötődés (DPM/mm²)	[³H]raclopride specifikus kötődés (fmol/gramm)	n	[¹²⁵I]SD7015 specifikus kötődés (DPM/mm²)	[³H]raclopride specifikus kötődés (fmol/gramm)	n
Nucleus caudatus	16,66 ± 2,69	30,26 ± 2,48	3	18,30 ± 3,60	12,84 ± 5,49	3
Gyrus frontalis medialis	25,74 ± 7,02	3,29±2,50 ns	3	27,97 ± 4,37	4,33±1,45	3

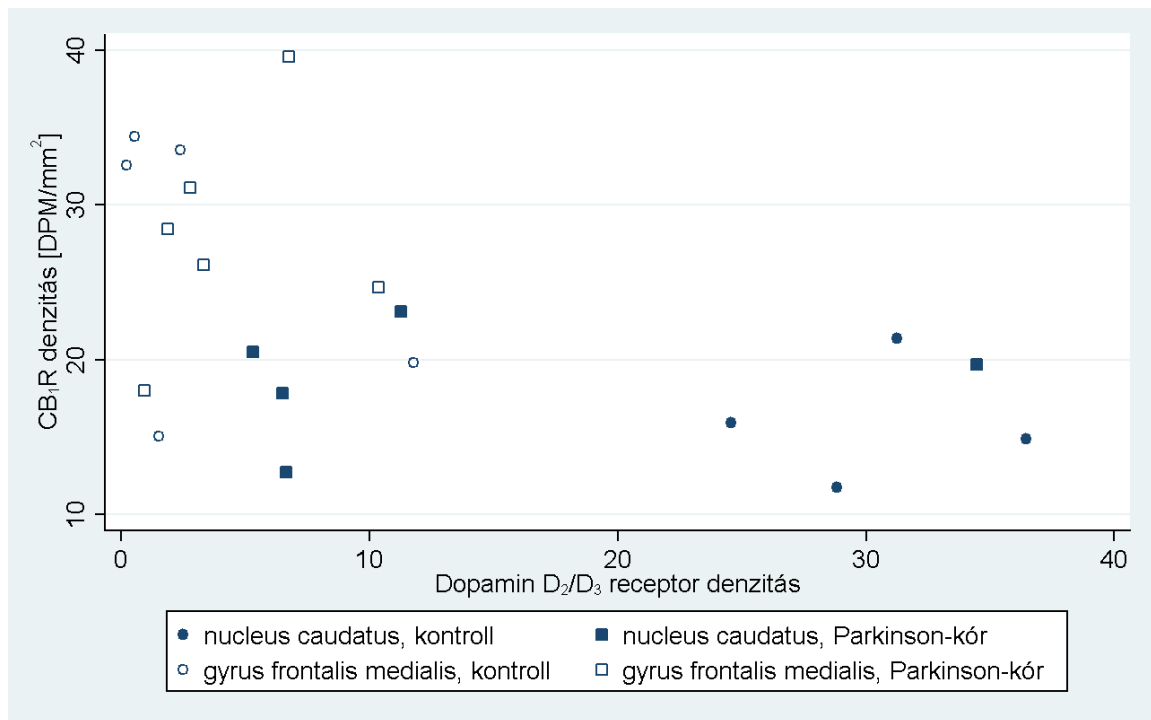
Értékek: átlag ± SEM. n: kontroll, illetve Parkinson-kóros személyek száma, akiktől a minták származnak.



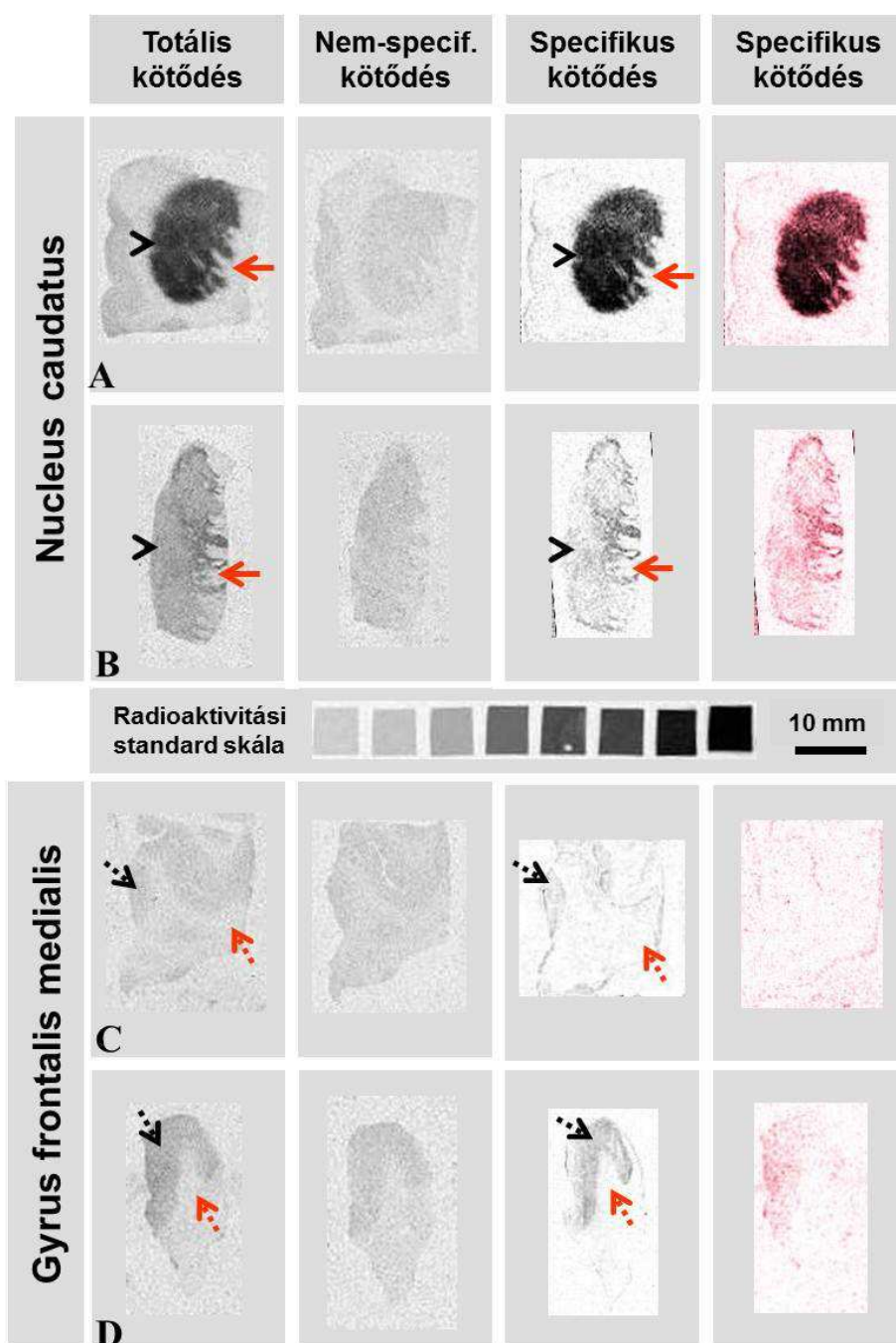
7. ábra. A nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis mintákon létrejött [³H]raclopride specifikus kötődés [fmol/g] összehasonlítása kontroll és Parkinson-kóros mintacsoportok esetében. A nucleus caudatusban a Parkinson-kóros mintákon kapott D₂/D₃ receptorsűrűség lényegesen alacsonyabb volt, mint a kontrollok esetében. Gyrus frontalis medialis esetében érdemi különbség nem látható a receptorsűrűséget illetően. Az egyes dobozdiagramok (box-plot) a mintacsoporton belüli alsó és felső szélsőséges értékeket (pontok), illetve medián értéket (dobozban levő vízszintes vonal) mutatják. A doboz az alsó és a felső kvartilis érték által határolt tartományt szemlélteti.



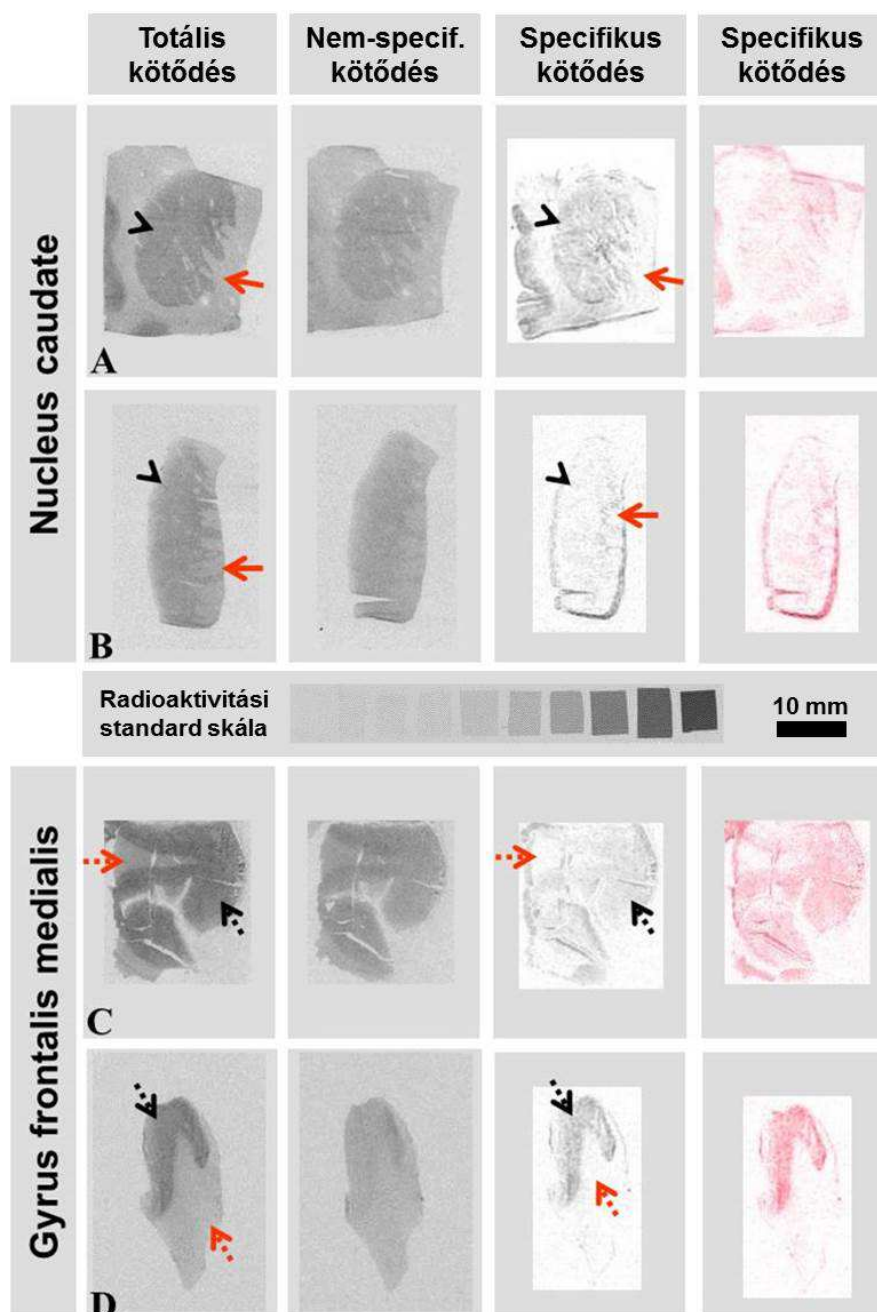
8. ábra. A nucleus caudatus és gyrus frontalis medialis mintákon létrejött $[^{125}\text{I}]\text{SD7015}$ specifikus kötődés $[\text{DPM/mm}^2]$ összehasonlítása kontroll és Parkinson-kóros mintacsoportok esetében. Érdemi különbség nem látható az összehasonlított csoportok CB_1R denzitása között. Az egyes dobozdiagramok (box-plot) a mintacsoporton belüli alsó és felső szélsőséges értékeket (pontok), illetve median értéket (dobozban levő vízszintes vonal) mutatják. A doboz az alsó és a felső kvartilis érték által határolt tartományt szemlélteti.



9. ábra. Azonos mintákon kapott CB₁R [DPM/mm²] és D₂/D₃ [fmol/g szövet] receptor denzitás értékekből képezett aránypárok ábrázolása. A kontroll és a Parkinson-kóros nucleus caudatus esetében jól látszik, hogy a CB₁R sűrűség értékei közel azonos szinten vannak, míg a dopamin D₂/D₃ receptordenzitás értékek Parkinson-kórban lényegesen alacsonyabbak. A gyrus frontalis medialis esetében a kontroll és Parkinson-kóros mintákon mért denzitások hasonló eloszlást mutatnak a két receptortípust illetően.



10. ábra. Dopamin D₂/D₃ receptor autoradiográfia kontroll (A,C) és Parkinson-kóros (B,D) nucleus caudatus (fekete nyílhegy) és gyrus frontalis medialis (pontosított fekete nyíl) mintákon, [³H] radioaktivitási standard skálával. Vörös nyíl: capsula interna; pontosított vörös nyíl: fehérállomány. A specifikus kötődés a totális kötődés és nem-specifikus kötődés közötti különbséget jelöli, eredeti (3. oszlop) és vörösen súlyozott (4. oszlop) képeken. Mértékskála 10 mm-nek felel meg.



11. ábra. CB₁R autoradiográfia kontroll (A,C) és Parkinson-kóros (B,D) nucleus caudatus (fekete nyílhegy) és gyrus frontalis medialis (pontozott fekete nyíl) mintákon, [¹⁴C] radioaktivitási standard skálával. Vörös nyíl: capsula interna; pontozott vörös nyíl: fehérállomány. A specifikus kötődés a totális kötődés és nem-specifikus kötődés közötti különbséget jelöli, eredeti (3. oszlop) és vörösen súlyozott (4. oszlop) képeken. Mértékskala 10 mm-nek felel meg.

5.3. CB₁R denzitás Alzheimer-kórban

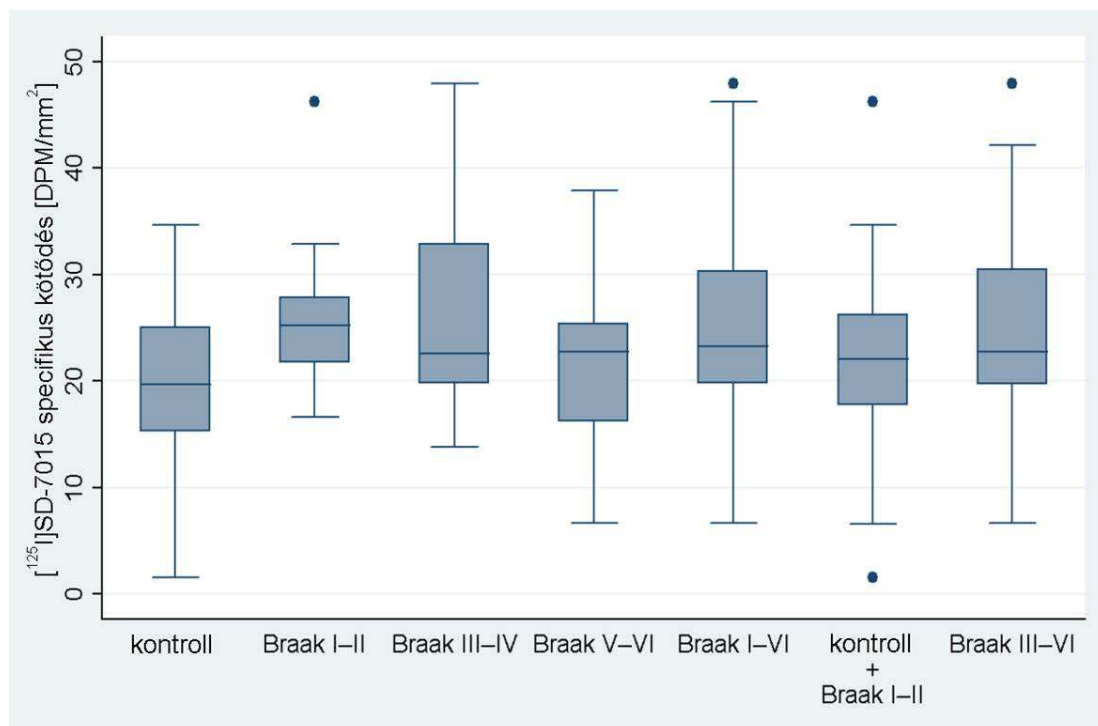
Az Alzheimer-kóros betegektől, illetve kontroll személyektől származó prefrontalis cortex mintákban a CB₁R-ok jelölésére szintén a [¹²⁵I]SD7015 ligandumot használtuk (13. ábra). Az azonos személytől származó párhuzamos méréseket átlagoltuk. Az agymintákat kontroll, valamint Alzheimer-kór Braak I-II, III-IV és V-VI csoportokba osztottuk. A különböző mintacsoportokban kapott CB₁R specifikus kötődéseket összehasonlítottuk, eredményeinket diagramon is ábrázoltuk (6. táblázat és 12. ábra). Megfigyelhető, hogy a CB₁R denzitás átlagértéke az Alzheimer-kór Braak I-II csoportban magasabb, majd a betegség progressziója során a CB₁R sűrűség lassú, folyamatos csökkenése látható, azonban a CB₁R denzitás a betegség végstádiumaiban (Braak V-VI) sem került kontroll szint alá. Eredményeink egyrészt azt sugallják, hogy az Alzheimer-kór teljes progressziója alatt a prefrontalis CB₁R denzitás legalább kontroll szinten marad. Másrészt fontos kiemelni, hogy a Braak I-II csoportban találtuk a legmagasabb CB₁R sűrűséget. Ez különösen érdekes annak fényében, hogy ezekben a stádiumokban a prefrontalis cortex neuropatológiai szempontból még érintetlen.

Korábbi kutatásokban az Alzheimer-kóros Braak I-II stádiumú agyakból származó, neuropatológiailag még érintetlen mintákat a kontrollcsoportba sorolták, ezért mi is egyesítettük az Alzheimer-kór Braak I-II csoportot a kontrollokkal és összehasonlításokat végeztünk. Az így kapott CB₁R denzitás átlagérték közelített a Braak III-IV, V-VI és az összesített Braak III-VI csoport értékeihez. Ez azt mutatja, hogy a Braak I-II minták kontrollcsoportba sorolása elfedhet lényeges különbségeket a tényleges kontroll és Alzheimer-kóros minták között. Másrészt a korai szakaszban bekövetkező elváltozások rejtettek maradhatnak. Eredményeink arra utalnak, hogy a Braak I-II-es Alzheimer-kóros agyakból származó mintákat a kontrollcsoporttól külön kell vizsgálni a későbbi kutatások során. Adatainkat a 6. táblázatban foglaltuk össze.

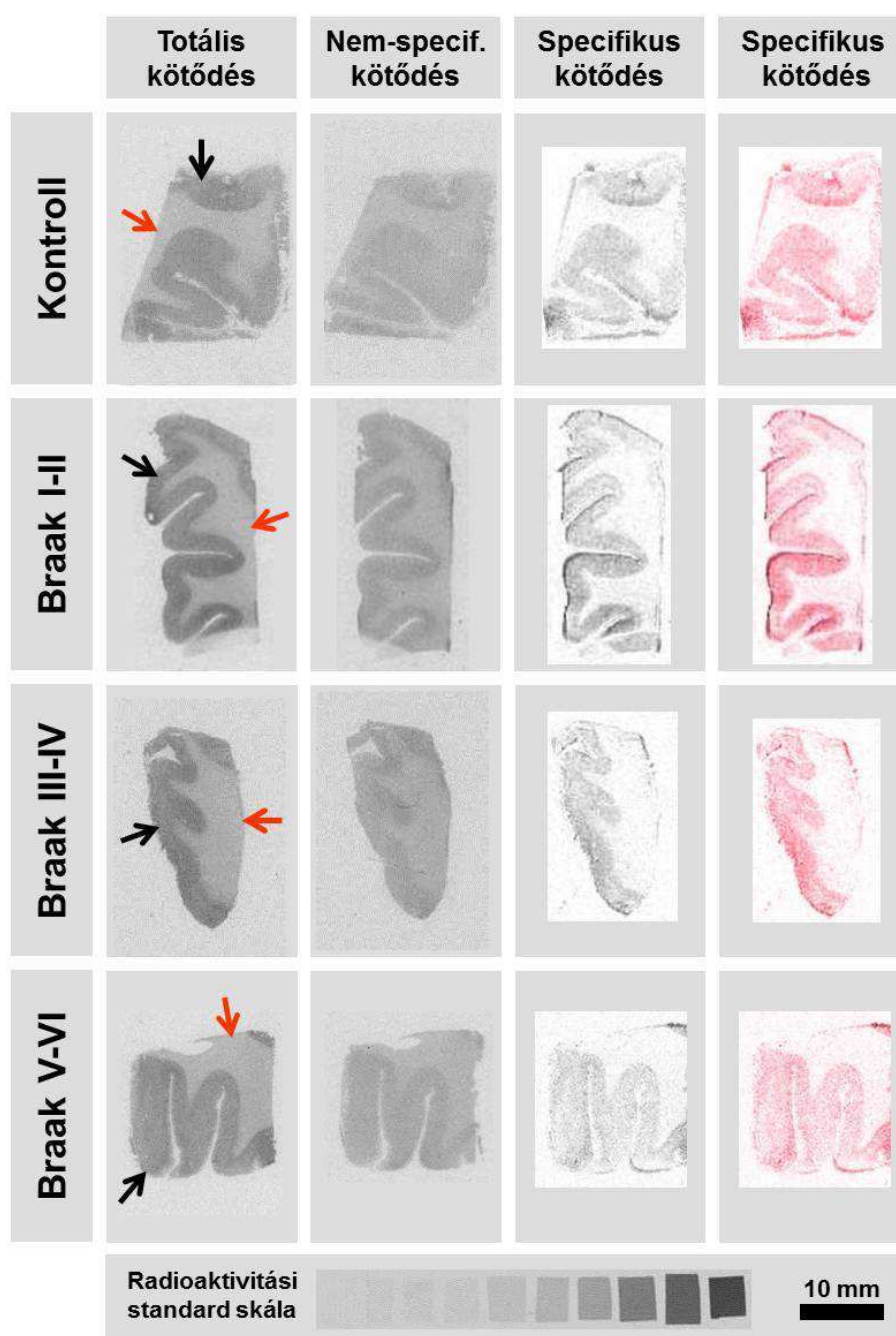
6. táblázat. [¹²⁵I]SD7015 ligandum CB₁ receptorokhoz való specifikus kötődésének átlagértékei humán Alzheimer-kóros prefrontális cortex mintákon. A CB₁R denzitás átlagértékei a következő csökkenő tendenciát mutatták Braak I-II > BraakIII-IV > Braak V-VI > kontroll, a legnagyobb különbség a Braak I-IIes csoport és a kontrollcsoport között volt.

	Kontroll	Alz.k. Braak I-II	Alz.k. Braak III-IV	Alz.k. Braak V-VI	Alz.k. Braak I-VI	Ktrl. + Alz.k. Braak I-II	Alz.k. Braak III-VI
[¹²⁵I]SD7015 Specif. kötődés (DPM/mm²) ± SEM	19,70 ± 3,48	26,04 ± 5,28	24,78 ± 8,35	22,25 ± 7,62	24,36 ± 6,83	22,87 ± 4,96	23,51 ± 7,52
n	6	3	4	4	11	9	8

A [¹²⁵I]SD7015 ligandum CB₁R-hoz való specifikus kötődését DPM/mm²-ben fejeztük ki “átlag± SEM” formában. n: kontroll, illetve Alzheimer-kóros személyek száma, akiktől a minták származnak.



12. ábra. A prefrontalis cortex mintákon létrejött [^{125}I]SD7015 specifikus kötődés [DPM/mm^2] összehasonlítása a kontrollcsoport és a különböző Braak stádiumú Alzheimer-kóros kombinált mintacsoportok esetében. Ha a korábbi gyakorlatnak megfelelően ugyanazon csoportba soroljuk a kontroll és Braak I-II-es minták adatait (6. dobozdiagram), ez éppen a két legeltérőbb csoport egyesítését jelenti, mely a valódi eltérések elfedését eredményezi. Az egyes dobozdiagramok (box-plot) a mintacsoporton belüli alsó és felső szélsőséges értékeket (pontok), illetve median értéket (dobozban levő vízszintes vonal) mutatják. A doboz az alsó és a felső kvartilis érték által határolt tartományt szemlélti.



13. Ábra. [^{125}I]SD7015 CB_1R autoradiográfia prefrontalis cortex mintákon, [^{14}C] radioaktivitási standard skálával. A specifikus kötődés a totális és nem-specifikus kötődés közötti különbséget jelöli, eredeti (3. oszlop) és vörösen súlyozott (4. oszlop) képeken. Fekete nyíl: frontalis cortex; vörös nyíl: fehérállomány. Mértékskala 10 mm-nek felel meg.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein jelátvitel vizsgálata előrehaladott Parkinson-kórban

Sóvágó és mtsai (2005) igazolták, hogy a raclopride, mint D₂/D₃ receptor antagonistá meggátolta, ugyanakkor az SCH23390 ligandum – D₁ dopamin receptor antagonistá – nem befolyásolta az agonista által stimulált [³⁵S]GTPγS kötődését humán agymintákon. Ezáltal bizonyították, hogy az agonista által stimulált [³⁵S]GTPγS kötődési autoradiográfia postmortem emberi agymintákon is alkalmas módszer a dopamin D₂/D₃ receptor–Gi/Go protein kapcsolódás vizsgálatára. Mindazonáltal ezzel a módszerrel a receptor–Gs protein közötti funkcionális kapcsolat nem tanulmányozható. Irodalmi adatok szerint az általunk vizsgált agyi régiókban a D₃-as típusú dopamin receptor igen kismértékben expresszált, ugyanakkor a D₃ receptor által közvetített second messenger effektus közismerten gyenge, különösképpen a dopamin D₂ receptoréhoz képest (Hall és mtsai, 1996; Landwehrmeyer és mtsai, 1993; Murray és mtsai, 1994; Piggott és mtsai, 1999; Robinson és Caron, 1997). Megállapíthatjuk tehát, hogy vizsgálatainkban a D₂/D₃ dopamin receptor tekintetében nem szelektív [³H]raclopride-del kapott receptor denzitás elsősorban a dopamin D₂ receptor sűrűséget mutatja, ugyanakkor funkcionális autoradiográfiás eredményeink is főként a D₂ receptor–G-protein közötti kapcsolódást tükrözik.

Ismereteink szerint jelen tanulmány vizsgálta elsőként postmortem human Parkinson-kóros nucleus caudatus, gyrus frontalis medialis, és gyrus cinguli mintákon a dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein kapcsolódást a betegség késői szakaszában.

6.1.1. A dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein jelátvitel a nucleus caudatusban

A Parkinson-kóros állatmodelleken és *in vitro* postmortem humán agymintákon végzett korábbi kísérletek, valamint *in vivo* PET és SPECT kutatások igazolták, hogy a dopaminerg denerváció a striatalis posztszinaptikus D₂ receptorok up-regulációjához vezet, mely nagy valószínűséggel a dopaminerg jelátviteli deficitre adott kompenzatórikus reakció (Alexander és mtsai, 1993; Antonini és mtsai, 1997; Elsworth és mtsai, 1998; Linazasoro és mtsai, 1999; Reches és mtsai, 1984; Scherfler és mtsai, 2006). Másrésről MPTP-kezelt non-humán emlősökön végzett kísérletek felvetették a dopamin receptor affinitás változásának lehetőségét Parkinson-kórban, vagyis a dopamin–D₂ receptor kötődés fokozott affinitása szintén ellensúlyozhatja a neurotranszmitter hiányt (Minuzzi és Cumming, 2010; Seeman és mtsai, 2005). Azonban a krónikusan emelkedett dopamin szint receptor deszenzitizációhoz vezet, ezáltal alacsony affinitású állapot, végsősoron a receptor sejtbe történő internalizációja következik be (Barbier és mtsai, 1997; Borbely és mtsai, 1999; Seneca és mtsai, 2006). Kimutatták, hogy Parkinson-kóros betegeknél a dopaminerg gyógyszeres kezelés normalizálta, illetve csökkentette a striatalis dopamin D₂ receptor sűrűséget (Alexander és mtsai, 1993; Linazasoro és mtsai, 1999; Thanvi és Lo 2004; Thobois és mtsai, 2004; Scherfler és mtsai, 2006). Eredményeink a korábbi vizsgálatoknak megfelelően azt mutatják, hogy Parkinson-kórban a hosszas dopaminerg kezelés mellett a dopamin D₂/D₃ receptordenzitás jelentősen csökken. A folyamat hátterében a tartós L-DOPA kezelés okozta receptor deszenzitizáció és internalizáció állhat.

Az általunk vizsgált agyminták olyan betegektől származtak, akik hosszas Parkinson betegségük alatt rendszeres antiparkinsonos gyógyszeres kezelésben részesültek, tehát eredményeink a krónikus dopaminerg kezelés utáni állapotot tükrözik Parkinson-kór késői stádiumában. Emberi Parkinson-kóros agymintákon elsőként írtuk le, hogy a nucleus caudatusban a csökkent dopamin D₂/D₃ receptor populáció kontroll szinten tartja a D₂/D₃

receptor–G-protein jelátvitelt. Eredményeink a megmaradt D₂/D₃ receptorok fokozott szenzitivitására és a Parkinson-kór teljes lefolyása alatt fennálló funkcionális kompenzáció jelenlétére utalnak. A dopamin D₂ receptorok posztzinaptikus hiperszenzitivitása állatmodelleken már a Parkinson-kór korai stádiumában megjelenik (LaHoste és mtsai, 1992, Cai és mtsai, 2000; Lopez és mtsai, 2001). A korai dopamin receptor up-reguláció és fokozott jelátvitel egyrészt magyarázhatja a L-DOPA kezelés kifejezett hatékonyságát a Parkinson-kór kezdeti szakaszában. Másrészt azonban a megtartott D₂/D₃ receptor szenzitivitás (vagyis a maradék D₂/D₃ receptorok hiperszenzitivitása) felelős lehet a krónikus kezelés során fellépő mellékhatások, a diszkinéziák megjelenéséért. Ennek magyarázata a dopamin szint normális szinaptikus szabályozásának kiesése lehet, melynek egyik oka a fogyatkozó dopaminerg terminálisokkal együtt csökkenő dopamin transzporter (DAT) mennyiségben keresendő. Ugyanakkor beindul a nem-dopaminerg idegvégződéseken történő irreguláris dopamin szintézis és/vagy L-DOPA konverzió is, mely társulva a DAT csökkenéssel tovább fokozza a szinaptikus dopamin szint kontrollálatlan oszcillációját és a szabálytalan dopaminhatást (Carta és mtsai, 2007; de laFuente-Fernandez és mtsai, 2004; Grondin és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 2008; Lopez és mtsai, 2001; Sossi és mtsai, 2009; Troiano és mtsai, 2009).

6.1.2. A dopamin D₂/D₃ receptor–G-protein jelátvitel a frontális cortexben

A nigrostriatalis dopaminerg denerváció a frontális cortex, basalis ganglionok, valamint thalamus közötti kapcsolatok diszfunkciójához vezet (Alexander és Crutcher, 1990; Féger, 1997). Igazolták, hogy Parkinson-kórban a kognitív hanyatlás (folyékony beszéd, munkamemória, figyelem, exekutív és vizuospatialis diszfunkciók) csökkent [¹⁸F]fluorodopa felvétellel jár a nucleus caudatus és a frontális cortex szintjén, a területek dopaminerg működészavarára utalva (Kassiou és mtsai, 2009; Kövari és mtsai, 2009; Thanvi és mtsai,

2003). Kaasinen és mtsai (2000) a dorsolateralis prefrontalis cortex D_2/D_3 dopamin receptorsűrűségének csökkenését találták Parkinson-kórban, más szerzők szerint a frontalis cortexben a dopaminkötődés nem változik meg a betegségben (Agid és mtsai, 1987; Reisine és mtsai, 1977). Kutatásunk során nem találtunk érdemi különbséget a dopamin D_2/D_3 receptordenzitásban a Parkinson-kóros és kontroll gyrus frontalis medialis csoportok között.

Playford és Brooks (1992) felvetették, hogy a dopamin receptorsűrűség aktivációfüggő, tehát az aktív neurotranszmisszió során dopamin által elfoglalt receptorok mennyiségének a függvénye, vagyis a dopamin receptorsűrűséget nem passzívan az alapállapotban jelenlevő szinaptikus dopamin szint szabályozza. Ugyanakkor a Parkinson-kór progressziójával a különböző agyterületeken egyre fogyatkozó dopaminerg idegvégződés mellett más neuronok is bekapcsolódnak az exogén L-DOPA dekarboxilációjába, melyek azonban nem képesek az ideális (szükség szerinti) dopamin szint biztosítására (Barbier és mtsai, 1997). Az így létrejövő nem optimális dopaminerg stimulus ugyan elegendő lehet a dopamin D_2/D_3 receptorsűrűség szinten tartásához, mivel azonban nem biztosít megfelelő szintű jelátvitelt enyhe hiperszenzitivitáshoz vezethet. Ez magyarázhatja a Parkinson-kóros gyrus frontalis medialis mintáinkban talált kontroll szintű dopamin D_2/D_3 receptor sűrűség és kissé fokozott receptor–G-protein jelátvitel közötti enyhe diszkrepanciát.

6.1.3. A dopamin D_2/D_3 receptor–G-protein jelátvitel a gyrus cinguliban

Parkinson-kór esetében a gyrus cinguli dopamin D_2/D_3 receptor denzitásáról kevés és ellentmondásos adat áll rendelkezésre. Kaasinen és mtsai (2000) előrehaladott Parkinson-kórban a dopamin D_2/D_3 receptordenzitás csökkenését találták az anterior gyrus cinguliban. Ezt a Parkinson-kórban fellépő kognitív és emocionális deficittel hozták kapcsolatba. Nakajima és mtsai (2003) szerint viszont nem volt különbség a kontroll és Parkinson-kóros

csoport anterior cingularis cortexének D₂ receptor sűrűségében. Saját eredményeink az utóbbi véleményt támasztják alá. Ugyanakkor ebben az agyi régióban a D₂/D₃ receptor–G protein jelátvitelt korábban sosem vizsgálták. Eredményeink minimálisan emelkedett D₂/D₃ receptor–G-protein aktivitásra utalnak, melynek hátterében a frontalis cortexnél részletezett elégtelen aktív dopaminerg jelátvitel állhat. Elsőként írtuk le, hogy kezelt Parkinson-kór késői stádiumában a gyrus cinguliban a dopamin D₂/D₃ receptordenzitás mellett a receptor–G-protein jelátvitel is megőrzött.

6.2. Cannabinoid 1-es típusú receptordenzitás vizsgálata Parkinson-kórban

A cannabinoid rendszert Parkinson-kóros állatmodelleken és humán vizsgálatok során széles körben tanulmányozták. Az állatkísérletek eredményei a Parkinson-kórban bekövetkező CB₁R denzitás és szenzitivitás változásait, valamint a cannabinoid és dopamin rendszer közötti kapcsolatokat illetően inkongruensek. Állati és emberi agymintákban leírták a CB₁R mRNS szint különböző irányú elváltozásait (Hurley és mtsai, 2003; Romero és mtsai, 2000; Silverdale és mtsai, 2001; Zeng és mtsai, 1999). Egyesek a striatalis CB₁R denzitás egyértelmű csökkenését állapították meg Parkinson-kóros állatmodellen (Julian és mtsai, 2003; Walsh és mtsai, 2010; Silverdale és mtsai, 2001), mások viszont postmortem humán agymintákon és különböző állatmodelleken a CB₁R-ok up-regulációját figyelték meg (García-Arencibia és mtsai, 2009; Lastres-Becker és mtsai, 2001; Orgado és mtsai, 2009). Ismét mások nem találtak eltérést Parkinson-kóros és kontroll agyminták CB₁R sűrűsége között (Herkenham és mtsai, 1991a; Maccarrone és mtsai 2003; Romero és mtsai, 2000; Zeng és mtsai, 1999). A CB₁R–G-protein kötődést illetően Romero és mtsai (2000) striatalis, globus pallidus és substantia nigra mintákon nem találtak érdemi eltérést, míg Lastres-Becker és

mtsai (2001) a basalis ganglionok szintjén a CB₁R–G-protein jelátvitel érintettségét figyelték meg postmortem humán Parkinson-kóros és MPTP-kezelt emlős agyminták esetében. Számos kutatásban kimutatták a cannabinoid agonisták, illetve antagonisták motoros aktivitásra gyakorolt hatásait is (Anderson és mtsai, 1995; Maneuf és mtsai, 1997; Sanudo-Pena és mtsai, 1998; Kelsey és mtsai, 2009).

Kutatásaink második felében Parkinson-kóros betegektől és egészséges kontrollszemélyektől származó nuclues caudatus és gyrus frontalis medialis mintákon a CB₁R és D₂/D₃ dopamin receptorsűrűséget hasonlítottuk össze.

6.2.1. CB₁R és D₂/D₃ dopamin receptordenzitás a striatumban

André és mtsai (2010) egér striatum metszeteken, illetve izolált GABAerg közepes tüskés neuronokon vizsgálták a D₁ és D₂ dopamin receptor izolált stimulációjának a hatását a glutamaterg jelátvitelre. Kísérleteiket arra alapozták, hogy a D₁ receptort expresszáló közepes tüskés neuronok elsősorban a direkt, míg a D₂ receptort expresszálók főként az indirekt striatalis útvonal részét képezik. Megállapították, hogy a D₁ receptor stimuláció fokozza a striatalis közepes tüskés neuronokon a serkentő posztszinaptikus potenciálokat (EPSP), vagyis a glutamaterg stimulációt, míg a D₂ receptor stimuláció csökkenti azt. Eredményeik háttérében az endocannabinoid-dopaminerg kapcsolat szerepét feltételezték ezért megvizsgálták cannabinoid agonista és antagonistá adása mellett is az EPSP változásait. Azt találták, hogy a direkt útvonalon a D₁ receptor stimulációja által elősegített glutamaterg serkentő potenciálok frekvencia növekedését a CB₁R agonista adása gátolta. A D₁-mediált EPSP frekvencia növekedés az endocannabinoid reuptake inhibitor adása esetén is elmaradt. Ugyanakkor az indirekt útvonalon a CB₁R antagonistá adása mérsékelte a D₂ receptor stimuláció által kiváltott glutamaterg EPSP frekvencia csökkenést. Ezek alapján felvetették,

hogy a striatalis cannabionoid rendszer tónusosan aktív lehet és végül arra a következtetésre jutottak, hogy a dopamin D₁ receptor stimulációja gátolja az endocannabinoid felszabadulást, mely a glutamaterg excitatórikus jelátvitel fokozódását eredményezi a direkt striatalis útvonalon. Az indirekt útvonalon viszont a D₂ dopamin receptor stimulációja az excitatórikus jelátvitel csökkenéséhez vezetett nagy valószínűséggel a posztszinaptikusan felszabaduló és retrográd módon a preszinaptikus corticostriatalis glutamaterg terminálisok CB₁ receptorain ható endocannabinoidok révén. Mindezt alátámasztják más kutatók megfigyelései is (Centonze és mtsai, 2004; Guiffrida és mtsai, 1999; Yin és Lovinger, 2006; Bamford és mtsai, 2004; Kreitzer és Malenka 2005, 2007; Shen és mtsai, 2008; Wong 2013). Kreitzer és Malenka (2007) egyértelműen igazolták, hogy a corticostriatalis excitatórikus terminálisokon eCB-LTD csak az indirekt striatalis körben váltható ki melyhez szükséges a D₂-es dopamin receptor aktivációja is. Megállapíthatjuk tehát, hogy az indirekt és direkt striatalis útvonal zavartalan működéséhez szükséges mind a dopaminerg, mind a cannabinoid rendszer épsége.

Ismert, hogy a CB₁R elsősorban Go-proteinnel kapcsolt és CB₁R-D₂ dopamin receptor koaktiváció esetén a Gs-protein aktiválódik (Glass és mtsai, 1997; Mackie, 2005; Hudson és mtsai, 2010; Wilson és mtsai, 2001). Hosszas D₂ agonizmus esetén viszont cannabinoid hatásra a CB₁R előbb a Gs-, majd a Go-proteinnel kapcsolódik (Jarrahian és mtsai, 2004), feltehetően a folyamatos dopamin D₂ receptor stimuláció mellett bekövetkező receptor internalizációnak köszönhetően (megszűnik a D₂-CB₁R koexpresszió). Ezen folyamatok elképzelhetők az általunk vizsgált agymintákon is, mivel ezek krónikusan dopaminerg kezelt betegektől származtak. Vizsgálataink során tehát a Parkinson-kóros nucleus caudatusban a D₂/D₃ receptorsűrűség jelentős csökkenését észleltük, viszont a CB₁R denzitást illetően nem találtunk érdemi változást. A striatalis dopaminerg-cannabinoid egyensúly felborulása és a szinaptikus plaszticitás (pl. eCB-LTD) megfelelő szabályozásának megszűnése a Parkinson-kór patofiziológiájának fontos összetevője lehet.

Eredményeink arra utalnak, hogy a krónikus L-DOPA kezelés és hosszú kórlefolyás ellenére is a CB₁R populáció érintetlen marad, melynek többféle magyarázata lehet. Egyrészt ismert, hogy a CB₁R a központi idegrendszer egyik legelterjedtebb receptora, azonban a nagy receptor populációnak csak kis százaléka van aktív állapotban (Herkenham és mtsai, 1990; Sim és mtsai, 1996; Lutz, 2002). Ha valamilyen oknál fogva (például sejtpusztulás miatt) a CB₁R-ok mennyisége csökkenni kezd, nagy valószínűséggel az inaktív („tartalék”) CB₁R-ok affinitásában és szenzitivitásában bekövetkező átalakulások elfedik az esetleges receptorsűrűség-csökkenést, fenntartva a normális működést. 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. Továbbá gyanítható, hogy exogén dopaminerg terápiával nem biztosítható a normális működéshez optimális D₂ receptor stimuláció, illetve az excitatórikus jelátvitel dopamin-cannabinoid „szinergizmus” általi megfelelő modulációja sem. Végül soron tehát eredményeink összefoglalásaként az körvonalazódik, hogy Parkinson-kórban a down-regulálódott hiperszenzitív dopamin D₂/(D₃) receptor populáció exogén stimulálása feltehetően nem elégséges vagy nem alkalmas az eCB-LTD optimális kiváltásához a corticostriatalis terminálisokon. Ugyanakkor a dopaminerg kezelés által biztosított dopamin szint a retrográd moduláció bizonyos fokú funkcionalitásához, s ezáltal a CB₁R populáció szinten tartásához elegendő lehet. További kutatások szükségesek ezen felvetések igazolására, de elképzelhető egyéb, mindeddig ismeretlen mechanizmusok jelenléte is. A cannabinoid rendszernek a Parkinson-kór patomechanizmusában betöltött pontos szerepének megismerése, valamint a cannabinoid rendszert involváló új terápiás lehetőségek feltárása a további kutatások fontos irányvonalát képezi.

6.2.2. CB₁R és D₂/D₃ dopamin receptordenzitás a frontális cortexben

Chiu és mtsai (2010) egér és patkány prefrontális cortexén végzett immunelektronmikroszkópos és elektrofiziológiai kísérletekkel kimutatták, hogy az V. corticalis réteg piramissejtjeit gátló GABAerg interneuronok axonterminálisain CB₁-D₂ receptor koexpresszió van. Továbbá bizonyították, hogy mind a CB₁R, mind a D₂ dopamin receptor stimulációja egyenként csökkenti a GABAerg jelátvitelt, együttes stimulációjuk pedig I-LTD-t eredményez. Emellett a prefrontális glutamaterg neuronok posztszinaptikusan is expresszálnak CB₁ és dopamin D₂ receptort. Elképzelhető, hogy a posztszinaptikusan expresszált D₂ dopamin receptorok stimulációja a striatumhoz hasonlóan corticalisan is endocannabinoid felszabadulást vált ki, és ezáltal retrográd módon modulálja a glutamaterg jelátvitelt. Eredményeink nem mutattak érdemi különbséget a kontroll és Parkinson-kóros személyektől származó frontális cortex minták között egyik vizsgált receptor esetében sem. Azt feltételezzük, hogy Parkinson-kórban a kisebb mértékben károsodott mesocorticalis dopaminerg rendszer (Agid és mtsai, 1987; Reisine és mtsai, 1977) és/vagy az exogén dopamin szubsztitúció mellett a frontális CB₁ és D₂ receptor denzitás normális szinten marad.

6.3. Cannabinoid 1-es típusú receptordenzitás vizsgálata Alzheimer-kóros humán prefrontális cortex mintákon

A CB₁R sűrűsége vonatkozó korábbi ellentmondásos eredmények (részletes áttekintést lásd az „Irodalmi áttekintés” „2.3.3.4. Cannabinoid 1-es típusú receptor és Alzheimer-kór kapcsolata” című alfejezetben) egyik magyarázata az lehet, hogy eddig nem létezett megfelelően specifikus ligandum a CB₁R jelölésére. Kutatásaink harmadik részében kontroll és Braak I-VI stádiumú Alzheimer-kóros agymintákon tanulmányoztuk a CB₁R

sűrűségét. A receptor jelölésére szintén a [¹²⁵I]SD7015 ligandumot használtuk. Az Alzheimer-kóros betegektől származó mintákat a tau patológiának megfelelően három csoportba osztottuk: Braak I-II, Braak III-IV és Braak V-VI csoportokba. A CB₁ receptorsűrűségek átlagértékei minden Alzheimer-kóros mintacsoportban a kontrollcsoport értékeihez képest növekedést mutattak. A legjelentősebb különbség a Braak I-II és kontrollcsoport, valamint az összevont Braak I-VI és kontrollcsoport között volt. Összességében eredményeink CB₁R up-regulációra utalnak az Alzheimer-kór korai stádiumaiban, melyet folyamatos receptorsűrűség-csökkenés követ a betegség progressziója során. A receptordenzitás-csökkenés hátterében a CB₁R-kat expresszáló idegsejteket érintő kifejezett degeneratív, illetve gyulladásos folyamatok állhatnak. Mindemellett a CB₁R populáció még végstádiumban sem csökkent kontroll szint alá.

6.3.1. A CB₁R up-reguláció lehetséges mechanizmusai korai Alzheimer-kórban

Az Alzheimer-kór Braak I-II stádiumban a prefrontalis cortex neuropatológiailag még érintetlen (Braak és Braak, 1991; Nelson és mtsai, 2009). Ugyanakkor, ha elfogadjuk, hogy már a betegség korai szakaszában glutamaterg túlsúly van, akkor azt várnánk, hogy a stimuláció hatására megemelkedett endocannabinoid szint mellett CB₁R down-reguláció következzen be. Eredményeink a fentiek ismeretében meglepőek, ugyanis CB₁R up-regulációra utalnak. A folyamat hátterében többféle mechanizmus felmerülhet, mint például a glutamaterg, cholinerg, GABAerg jelátvitel zavara, receptor heteromerizációs vagy neuroprotektív folyamatok.

A tanulás és memória mechanizmusában kiemelkedő fontosságú a hippocampalis és corticalis (pl. prefrontalis) LTP és LTD zavartalan működése (Bossers és mtsai, 2010; Kamenetz és mtsai, 2003; Li és mtsai, 2009; Shankar és mtsai, 2008; Walsh és mtsai, 2002).

Alzheimer-kórban a hippocampalis és prefrontalis szinaptikus plaszticitás érintettsége már a neuropatológiai elváltozások előtt megjelenik (Bossers és mtsai, 2010; Li és mtsai, 2009), a hippocampalis és corticalis glutamaterg LTP károsodást és fokozott LTD-t már többen kimutatták (Izumi és Zorumski 2012; Li és mtsai, 2009; Ohno-Shosaku és mtsai, 2007; Ondrejcek és mtsai 2010; Palop és Mucke 2010). Korábban Bell és mtsai (2006, 2007) részletes elemzések és vizsgálatok után megállapították, hogy az Alzheimer-kór kezdetén mind a cholinerg, mind a glutamaterg jelátvitel fokozódik, gyarapszik a szinapszisok száma. Ennek hátterében a szinaptogenezis fokozódását feltételezték, melyet az amiloid prekursor protein (APP) metabolizmusának zavara miatt megemelkedő szolubilis APP α (sAPP α) felszaporodás okozhat (Bell és mtsai, 2006). Később Bossers és mtsai (2010) a szinaptikus aktivitásért és plaszticitásért felelős gének fokozott expresszióját találták neuropatológiailag még érintetlen prefrontalis mintákon, melynek okaként a szolubilis β -amiloid protein szint korai megemelkedését valószínűsítették (Bossers és mtsai, 2010; Li és mtsai, 2009). Valószínű, hogy Alzheimer-kórban az ismert glutamaterg túlsúly melletti túlzott excitáció fokozott endocannabinoid felszabadulást és végső soron eCB-LTD-t eredményez a glutamaterg terminálisokon (Katona és Freund, 2008, 2012; Lafourcade és mtsai, 2007; Mayadevi és mtsai, 2012; Ondrejcek és mtsai, 2010; Puzzo és mtsai, 2008). Fontos kiemelni, hogy demencia egér modellén megfigyelt LTP károsodás esetén szintén leírták a CB₁R up-regulációját (Duarte és mtsai, 2007). Lehetséges tehát, hogy az újabb serkentő szinaptikus kapcsolatok keletkezésével párhuzamosan növekszik a preszinaptikus glutamaterg terminálisokon expresszált CB₁R-ok száma, mely szükséges lehet a fokozott excitatórikus jelátvitel hatékonyabb modulálásához, csökkentéséhez. Mindez a Braak I-II stádiumú prefrontalis cortexben általunk megfigyelt emelkedett CB₁R denzitásnak egyik valószínű magyarázata lehet.

Újabb vizsgálatok során Alzheimer-kórban kimutatták a GABAerg rendszer érintettségét és a hippocampalis GABAerg receptorok szenzitivitásának csökkenését (Krantic és mtsai, 2012; Limon és mtsai, 2012; Rissman és Mobley 2011). Fokozott glutamaterg jelátvitel esetén, epilepsziás patkány modellben igazolták, hogy a GABAerg terminálisokon expresszált CB₁R mennyiség felszaporodik (Maglóczy és mtsai, 2010). Ennek pontos szerepe jelenleg nem tisztázott, de hasonló mechanizmus elképzelhető Alzheimer-kórban is a fokozott glutamaterg stimuláció hatására. A GABAerg neuronok endocannabinoidok általi retrográd modulációja bizonyított (Lee és mtsai, 2010; Losonczy és mtsai, 2004; Hentges és mtsai, 2005). Emellett ismert, hogy a retrográd endocannabinoid moduláció lehet homo- és heteroszinaptikus (Abraham és mtsai, 2007; Mayadevi és mtsai, 2012), vagyis a glutamát stimuláció hatására felszabaduló endocannabinoidok a piramissejteken (excitatoros) végződő GABAerg gátló terminálisokon expresszált CB₁R-kon is kifejtik hatásukat. Elképzelhető hogy a fokozott endocannabinoid felszabadulás LTD-t eredményez a GABAerg sejteken, vagyis a glutamaterg sejtek fő gátlóin (Busche és mtsai, 2008). Hosszas hiperexcitáció esetén a felszabaduló nagy mennyiségű endocannabinoid teljesen blokkolhatja a gátlást és megszűnik a glutamaterg jelátvitel GABAerg kontrollja. A GABAerg működések fenntartása érdekében CB₁R up-reguláció következhet be, melynek célja a preszinaptikus CB₁R populáció telítettségének csökkentése lenne, mely maga után vonná a GABAerg neuronok LTD-ának megakadályozását. Az általunk észlelt prefrontális CB₁ receptorsűrűség-emelkedést az Alzheimer-kór Braak I-II stádiumban ezen GABAerg sejteket érintő szinaptikus plaszticitásbeli változások is magyarázhatnák. A folyamat tisztázására további kutatások szükségesek.

Egy harmadik lehetőség szerint a CB₁R denzitás a cholinerg idegvégződéseken is up-regulálódhatott, de erre vonatkozó egyértelmű irodalmi adat jelenleg nincs. Mindazonáltal a betegség korai szakaszában a cholinerg aktivitás kompenzatórikus fokozódásáról és a

cholinerg szinaptikus kapcsolatok gyarapodásáról számoltak be (Bell és mtsai, 2006, 2007), mely a preszinaptikus CB₁R szám növekedését is maga után vonhatja. Másrésről elképzelhető a GABAerg rendszer esetében részletezett mechanizmus is. Eszerint a fokozott glutamaterg jelátvitel hatására növekszik a szinaptikus endocannabinoid szint, mely heteroszinaptikusan (Abraham és mtsai, 2007; Mayadevi és mtsai, 2012), retrográd módon gátolná az acetilkolin felszabadulást. A cholinerg terminálisokon létrejövő esetleges CB₁R up-reguláció által azonban csökkenhetne a CB₁R populáció telítettsége, ezáltal a retrográd moduláció hatékonysága, és így a cholinerg jelátvitel valamelyest javulna. Ezen lehetőség tisztázása is további vizsgálatokat igényel.

Az általunk észlelt CB₁R up-reguláció hátterében a fentiekben részletezett lehetséges mechanizmusok mellett a CB₁R, valamint acetilkolin és/vagy metabotróp glutamát receptorok közötti heteromerizáció is elképzelhető. Kimutatták, hogy mind az acetilkolin, mind a metabotróp glutamát receptorok képesek homodimerizációra (Alvarez-Curto és mtsai, 2010; Ilien és mtsai, 2009; Kammermeier és Yun, 2005) és heteromerizációra is (Albizu és mtsai, 2010; Ferré és mtsai, 2007). Elméletileg lehetséges, hogy felborult acetilkolin/glutamát egyensúly esetén egy CB₁-acetilkolin heterodiméren ható endocannabinoid „kiszoríthatja” a károsodott cholinerg jelátvitelt, vagy egy CB₁-glutamát heterodiméren történő endocannabinoid kapcsolódás „csillapíthatja” a túlzott glutamát hatást, toxicitást. Azonban a posztzinaptikus CB₁R – acetilkolin/glutamát receptor heteromérek kimutatása még várat magára (Birdsall 2011; Hudson és mtsai, 2010).

Számos vizsgálat igazolta az endocannabinoid rendszer excitotoxicitással (Marsicano és mtsai, 2003), oxidatív stresszel (Iuvone és mtsai, 2004) és gyulladásos folyamatokkal (Galiègue és mtsai, 1995, Massi és mtsai, 2000; Aso és mtsai, 2012; Coopman és mtsai, 2007; Ramirez és mtsai, 2012) szembeni neuroprotektív szerepét. Azonban a neuroprotekciónak mechanizmusának megismerése jelenleg is kutatás tárgyát képezi. Az endocannabinoidok β -

amiloid toxicitással szembeni direkt protektív szerepének (Iuvone és mtsai, 2004; Milton, 2002; Van der Stelt és mtsai, 2006; Noonan és mtsai, 2010) egyik valószínű mechanizmusa a cannabinoidok általi lizoszomális membrán stabilizáció lehet. Utóbbi révén gátlódik a β -amiloid indukált membrán destabilizáció és a citoszolba kerülő Ca^{2+} ionok apoptozist indukáló hatása. Mindemellett a neuroprotekciónak háttérében a különböző kinázok működését befolyásoló cannabinoid hatások sem zárhatók ki (Marsicano és mtsai, 2003; Galve-Roperth és mtsai, 2002; Karanian és mtsai, 2005). Ebből a szempontból a CB_1R populáció növekedését eddig nem tisztázott mechanizmusú CB_1R -t is involváló reaktív neuroprotektív folyamatok is okozhatják.

Összességében megállapíthatjuk, hogy az eredményeink által valószínűsíthető CB_1R up-reguláció oka többféle mechanizmus lehet. Felmerül a glutamaterg, cholinerg, GABAerg szinaptikus plaszticitás zavara, továbbá receptor heteromerizációs vagy neuroprotektív folyamatok. Kutatásaink exploratív jellegének értelmében nem a pontos mechanizmus megállapítása volt a célunk, hanem, hogy rámutassunk a CB_1R populáció igen valószínű érintettségére Alzheimer-kórban. Eredményeink reményünk szerint utat mutatnak és katalizálhatnak további kutatásokat.

6.3.2. A CB_1R denzitás változása és ennek klinikai jelentősége progrediáló Alzheimer-kórban

Prefrontális cortexben az Alzheimer-kór Braak III stádium esik egybe a neuropatológiai érintettséggel, a β -amiloid depozitumok megjelenésével, míg az V-VI stádium a súlyos degeneratív elváltozások, a tulajdonképpeni klinikai demencia időszakát jelentik (Braak és Braak, 1991; Nelson és mtsai, 2009). Az Alzheimer-kóros Braak III-IV és V-VI stádiumú prefrontális cortex mintacsoportokban eredményeink a CB_1R denzitás

fokozatos csökkenési tendenciáját mutatják. Valószínűnek tűnik, hogy egy kezdeti növekedést követően a CB₁R populáció fogyatkozni kezd. A folyamat magyarázata a neurodegeneratív elváltozások súlyosbodásában keresendő, mely az idegsejtek és szinapszisok számának csökkenését eredményezi (Bossers és mtsai, 2010; Carter és Lippa 2001; Cavallucci és mtsai, 2012; Iuvone és mtsai, 2004). Ez pedig szükségszerűen a CB₁R mennyiség vesztéséhez vezet. A központi idegrendszeri támasztósejtek, valamint a neurodegeneráció során megjelenő gyulladásos sejtek is expresszálnak kisebb mennyiségű CB₁R-t (Aso és mtsai, 2012; Bouaboula és mtsai, 1995; Galiègue és mtsai, 1995; Hegyi és mtsai, 2009; Massi és mtsai 2000; Molina-Holgado és mtsai, 2002; Sánchez és mtsai, 1998; Waksman és mtsai, 1999; Walter és mtsai, 2003). Feltételezhető, hogy a neurodegenerációban résztvevő immun- és támasztósejtek a neuronok pusztulásával csökkenő CB₁R populáció bizonyos fokú „utánpótlását” biztosítják. Részben ennek is lehet köszönhető, hogy a CB₁R sűrűség az Alzheimer-kór végstádiumaiban sem csökken kontroll szint alá.

CB₁R antagonisták adásakor Alzheimer-kóros állatmodelleken a memória teljesítmény javulását figyelték meg. Ennek háttérében az acetilkolin felszabadulás cannabinoid mediált szabályozását feltételezték (Terranova és mtsai, 1996). Wise és mtsai (2009) rimonabant hippocampusba juttatásával védték ki a delta(9)-THC memóriakárosító hatásait. Ugyanakkor CB₁R agonistát adva Alzheimer-kóros egér modelleknek a kognitív zavar csökkenését észlelték, melynek háttérében cannabinoid-mediált neuroinflammáció csökkenést vélelmeztek (Aso és mtsai, 2012; Martín-Moreno és mtsai, 2012). Az eddigi kutatások tehát azt mutatják, hogy mind a cannabinoid agonisták, mind az antagonisták javítottak az Alzheimer-kóros állatmodellek kognitív paraméterein (Terranova és mtsai, 1996; Walther és mtsai, 2006; Aso és mtsai, 2012; Martín-Moreno és mtsai, 2012). Ennek háttérében egyrésről a cannabinoid rendszer neuroprotektív hatásai, másrésről szinaptikus plaszticitást (glutamaterg, GABAerg és cholinerg) moduláló hatásai állhatnak. Humán vizsgálatokban

előrehaladott demenciában a dronabinol (cannabinoid agonista) napi adagolása javított az össz NPI (Neuropszichiátriai Kérdőív – Neuropsychiatric Inventory) pontszámon, a nyugtalanság és rendellenes motoros tevékenység részpontjain (Walther és mtsai, 2006), továbbá csökkentette a zavartságot és az anorexia tüneteit (Volicer és mtsai, 1997). Ugyanakkor pozitív kognitív hatásról nem számoltak be. A fentiek ismeretében megállapíthatjuk, hogy eredményeink alátámasztják azon felvetéseket, melyek szerint Alzheimer-kórban a megmaradó neuronokon és más sejteken expresszált CB₁R-ok a későbbiekben lehetséges terápiás célpontot jelenthetnek (Cavallucci és mtsai, 2012).

6.3.3. Új irány az Alzheimer-kór Braak I-II-es stádiumának vizsgálatában

Az Alzheimer-kóros Braak I-II, illetve Braak III-IV stádiumú prefrontalis cortexben talált eredményeink nem vethetők össze közvetlenül a korábbi kutatásokban leírtakkal. Egyrészt azért, mert a szerzők más agyterületeket tanulmányoztak (Benito és mtsai, 2003), másrészt pedig Braak I-II stádiumú Alzheimer-kóros mintákat eddig külön még egyetlen kutatásban sem vizsgáltak (Lee és mtsai, 2010; Ramirez és mtsai, 2005; Westlake és mtsai, 1994). Ennek magyarázata, hogy a betegség korai Braak stádiumaiba (I és II) sorolt Alzheimer-kóros agyak neuropatológiailag érintetlen régióit korábban a kontrollcsoportba sorolták – részben azért is, mert ezek az agyak klinikailag még tünetmentes személyektől származtak. A Braak I-II stádiumban még csak az entorhinális cortex és a hippocampus tartalmaz neurofibrilláris kötegeket, mely az Alzheimer-kór preklinikai állapotának felel meg (Braak és Braak, 1991; Nelson és mtsai, 2009). Az általunk vizsgált prefrontalis cortexet Braak I-II stádiumban a degeneráció még nem érinti. Ennek ellenére az Alzheimer-kóros Braak I-II csoport eredményei CB₁R up-regulációra utalnak, mely nagy valószínűséggel a neurodegeneráció során fellépő szignálátviteli zavarokra (elsősorban cholinerg, glutamaterg) adott funkcionális válasz része. Mindez nyomatékossítja, hogy a későbbi kutatások folyamán a

korai 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

1. 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.

2. 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.

3. 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 neuropatológailag érintetlen területei a korábbi tanulmányokkal ellentétben, a kontrollcsoporttól külön vizsgálandók.** A prefrontalis CB₁R sűrűség az Alzheimer-kór végstádiumaiban sem került kontroll szint alá. Az épnek látszó CB₁R populáció a széleskörű központi idegrendszeri és immunológiai összeköttetései révén a jövőben a betegség kezelésének egyik célmolekulája lehet.

8. SUMMARY

1. We report for the first time, that in PD caudate nucleus signal transduction activity is not altered by long-term L-DOPA substitution therapy unlike dopamine D₂/D₃ receptor density. Our results show a possible mild increase of signal transduction of dopamine D₂/D₃ receptors in medial frontal and cingulate gyrus together with unaltered D₂/D₃ receptor densities in advanced PD. These support, that dopaminergic neurotransmission of distinct PD brain regions is affected in different extent. Finally, our results may provide us with additional details about the mechanisms of long-term complications (e.g. dyskinesia) caused by antiparkinsonian therapy.

2. To our knowledge, our study is the first to present on postmortem brain samples of long-term L-DOPA treated PD patients, that CB₁R densities in caudate nucleus and medial frontal gyrus remain unchanged. At the same time in PD patients caudate nucleus dopamine D₂/D₃ receptor density was clearly decreased. Our data suggest that in the caudate nucleus, during the progression of PD, the eCB-mediated synaptic plasticity, which is based on dopaminergic-eCB functional balance, could be altered by dopaminergic degeneration. It seems, however, that no reactive CB₁R density changes takes place. .

3. This is the first study, to describe that the upregulation of CB₁R population precedes the appearance of neuropathological modifications in the prefrontal cortex of AD Braak stage I–II brains. The explanation could be the alteration of neurotransmission, as the earliest event in the pathophysiology of AD. **Our results also support the idea that neuropathologically intact brain areas of AD Braak stage I–II brains should be studied separately from controls, in contrast to previous studies.** Finally, CB₁R density even in end-stages of the disease was not below control level. In the future a preserved CB₁R population could serve as a target molecule for treatment during the whole progression of AD, due to CB₁R system's wide connections in the central nervous system and immune system.

9. HIVATKOZÁSOK

Abraham W C, Logan B, Wolf A, Benuskova L . “Heterosynaptic” LTD in the Dentate Gyrus of Anesthetized Rat Requires Homosynaptic Activity. *J Neurophysiol* 2007;98:1048-1051.

Acquas E, Pisanu A, Marrocu P, Di Chiara G. Cannabinoid CB(1) receptor agonists increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol* 2000;401(2):179-185.

Acquas E, Pisanu A, Marrocu P, Goldberg S R, Di Chiara G. Delta9-tetrahydrocannabinol enhances cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 2001;419(2-3):155-161.

Adermark L, Lovinger D M. Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:20564-20569.

Adermark L, Talani G, Lovinger D M. Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *European Journal of Neuroscience* 2009;29:32-41.

Agid Y, Javoy-Agid F, Ruberg M. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In: Marsden C D, Fahn S (Eds.), *Movement disorders*. Butterworth, UK, 1987;166-230.

Albizu L, Moreno JL, González-Maeso J, Sealfon SC. Heteromerization of Gprotein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010;9(5):636-650.

Alexander G E, Crutcher M D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990;13:266-271.

Alexander G M, Schwartzman R J, Grothusen J R, Brainard L, Gordon S W. Change in brain dopamine receptor in MPTP parkinsonian monkeys following L-DOPA treatment. *Brain Res* 1993;625:276-282.

Ali A B. Presynaptic cell dependent modulation of inhibition in cortical regions. *Curr Neuropharmacol* 2009;7(2):125-131.

Alvarez-Curto E, Ward RJ, Padiani JD, Milligan G. Ligand regulation of the quaternary organization of cell surface M3 muscarinic acetylcholine receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging and homogeneous time-resolved FRET. *J Biol Chem* 2010;285(30):23318-23330.

Amici S, Boxer A L. Oiling the gears of the mind, Roles for acetylcholine in the modulation of attention In: *The Human Frontal Lobes: Functions and Disorders*, eds. Miller B L, Cummings J L. The Guilford Press, A Division of Guilford Publication, Inc, New York, 2007,10:135-144.

Anand R, Gill K D, Mahdi A A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014;76(Pt A):27-50.

Anderson L A, Anderson J J, Chase T N, Walters J R. The cannabinoid agonists WIN 55,212-2 and CP 55,940 attenuate rotational behavior induced by a dopamine D1 but not a D2 agonist in rats with unilateral lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 1995;691:106-114.

André V M, Cepeda C, Cummings D M, Jocoy E L, Fisher Y E, William Yang X, Levine M S. Dopamine modulation of excitatory currents in the striatum is dictated by the expression of D1 or D2 receptors and modified by endocannabinoids. *Eur J Neurosci* 2010;31(1):14-28.

Antonini A, Schwarz J, Oertel W H, Beer H F, Madeja U D, Leenders K L. [¹¹C]raclopride and positron emission tomography in previously untreated patients with Parkinson's disease:

influence of L-DOPA and lisuride therapy on striatal dopamine D2-receptors. *Neurology* 1994;44:1325-1329.

Antonini A, Schwarz J, Oertel W H, Pogarell O, Leenders K L. 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.

Aso E, Palomer E, Juvés S, Maldonado R, Muñoz F J, Ferrer I. CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of A β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 2012;30(2):439-459.

Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000;83(6):3287-3293.

Bales K R, Tzavara E T, Wu S, Wade M R, Bymaster F P, Paul S M, Nomikos G G. Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *J Clin Invest* 2006;116(3):825-832.

Bamford N S, Zhang H, Schmitz Y, Wu N P, Cepeda C, Levine M S, Schmauss C, Zakharenko S S, Zablow L, Sulzer D. Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 2004;42:653-663.

Barbier P, Colelli A, Maggio R, Bravi D, Corsini G U. Pergolide binds tightly to dopamine D2 short receptors and induces receptor sequestration. *J Neural Transm* 1997;104:867-874.

Baskin D G, Wimpy H. Calibration of [¹⁴C] plastic standards for quantitative autoradiography of [¹²⁵I] labeled ligands with Amersham Hyperfilm b-max. *Neurosci Lett* 1989;104:171-177.

Batchelor P E, Liberatore G T, Wong J Y, Porritt M J, Frerichs F, Donnan G A, Howells D W. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999;19: 1708-1716.

Bell K F, Bennett D A, Cuello A C. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. *J Neurosci* 2007;27:10810-10817.

Bell K F, Claudio Cuello A. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2006;545(1):11-21.

Benito C, Núñez E, Tolón R M, Carrier E J, Rábano A, Hillard C J, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 2003;23:11136-11141.

Benarroch E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. *Neurology* 2007;69(3):306-309.

Bergman H, Deuschl G. Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov Disord* 2002;17(Suppl 3):S28-40.

Birdsall NJ. Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31(11):499-508.

Birnbaumer L, Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *J Rec Sign Transd Res* 1995;15:213-252.

Björklund A, Lindvall O. Dopamine Containing in the CNS. In A. Björklund and T. Hökfelt (eds.), *Handbook of Clinical Neuroanatomy*, 1984;2:55-122.

Blanchard V, Chritin M, Vyas S, Savasta M, Feuerstein C, Agid Y, Javoy-Agid F, Raisman-Vozari R. Long-term induction of tyrosine hydroxylase expression: compensatory response to partial degeneration of the dopaminergic nigrostriatal system in the rat brain. *J Neurochem* 1995;64:1669-1679.

Blanchet P J, Calon F, Martel J C, Bddard P J, Di Paolo T, Waiters R R, Piercey M F. Continuous administration decreases and pulsatile administration increases behavioral sensitivity to a novel dopamine D2 agonist (U-91356A) in MPTP-exposed monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272: 854-859.

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000;62(1):63-88.

Bodor A L, Katona I, Nyíri G, Mackie K, Ledent C, Hájos N, Freund T F. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci* 2005;25(29):6845-6856.

Borbely K, Brooks R A, Wong D F, Burns R S, Cumming P, Gjedde A, NMSP binding to dopamine and serotonin receptors in MPTP-induced parkinsonism: relation to dopa therapy. *Acta Neurol Scand* 1999;100:42-52.

Bossers K, Wirz K T, Meerhoff G F, Essing A H, van Dongen J W, Houba P, Kruse C G, Verhaagen J, Swaab D F. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2010;133(Pt 12):3699-3723.

Bouaboula M, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 1995;270(23):13973-13980.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-259.

Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 2002;249(Suppl3):III/1-III/5.

Brigman J L, Wright T, Talani G, Prasad-Mulcare S, Jinde S, Seabold G K, Mathur P, Davis M I, Bock R, Gustin R M, Colbran R J, Alvarez V A, Nakazawa K, Delpire E, Lovinger D M, Holmes A. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 2010;30(13):4590-4600.

Burns H D, Van Laere K, Sanabria-Bohórquez S, Hamill T G, Bormans G, Eng W S, Gibson R, Ryan C, Connolly B, Patel S, Krause S, Vanko A, Van Hecken A, Dupont P, De Lepeleire I, Rothenberg P, Stoch S A, Cote J, Hagmann W K, Jewell J P, Lin L S, Liu P, Goulet M T, Gottesdiener K, Wagner J A, de Hoon J, Mortelmans L, Fong T M, Hargreaves R J. [18F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for invivo human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(23):9800-9805.

Busche M A, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold K H, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 2008;321(5896):1686-1689.

Cai G, Wang H Y, Friedman E. Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1105-1112.

Cai G, Zhen X, Uryu K, Friedman E. Activation of extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to D2 dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 2000;20:1849-1857.

Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik J H, Centonze D, Mercuri N B, Bernardi G, Borrelli E. Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci* 1997;17(12):4536-4544.

Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg S R, Neve K, Fuxe K, Agnati L F, Woods A S, Ferré S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 2003;278(47):46741-46749.

Cannich A, Wotjak C T, Kamprath K, Hermann H, Lutz B, Marsicano G. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 2004;11:625-632.

Carr D, O'Donnell P, Card J, Sesack S. Dopamine terminals in the rat prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* 1999;24:11049-11060.

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.

Carter J, Lippa C F. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 2001;1(6):733-737.

Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. A β toxicity in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2012;45(2):366-378.

Centonze D, Battista N, Rossi S, Mercuri N B, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Calabresi P, Maccarrone M. A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal gabaergic transmission. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1488-1497.

Chen J P, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J, Gardner E L. Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;102(2):156-162.

Cheng H W, Tong J, McNeill T H. Lesion-induced axon sprouting in the deafferented striatum of adult rat. *Neurosci Lett* 1998;242:69-72.

Chevalleyre V, Castillo P E. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 2004;43:871-881.

Chiu C Q, Puente N, Grandes P, Castillo P E. Dopaminergic modulation of endocannabinoid-mediated plasticity at GABAergic synapses in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 2010;30(21):7236-7248.

Collingridge G L, Peineau S, Howland J G, Wang Y T. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(7):459-473.

Compton D R, Rice K C, De Costa B R, Razdan R K, Melvin L S, Johnson M R, Martin B R. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265(1):218-226.

Coopman K, Smith L D, Wright K L, Ward S G. Temporal variation in CB2R levels following T lymphocyte activation: evidence that cannabinoids modulate CXCL12-induced chemotaxis. *Int Immunopharmacol* 2007;7(3):360-371.

Cyril H, Garcia G. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *The Journal of Neuroscience* 2002;22(2):577-583.

Davie C A. A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin* 2008;86(1):109-127.

de la Fuente-Fernandez R, Schulzer M, Mak E, Calne D B, Stoessl A J. Presynaptic mechanisms of motor fluctuations in Parkinson's disease: a probabilistic model. *Brain* 2004;127:888-899.

Degroot A, Köfalvi A, Wade M R, Davis R J, Rodrigues R J, Rebola N, Cunha R A, Nomikos G G. CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol Pharmacol* 2006;70(4):1236-1245.

Di Marzo V, Breivogel C S, Tao Q, Bridgen D T, Razdan R K, Zimmer A M, Zimmer A, Martin B R. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 2000;75:2434-2444.

Dong X X, Wang Y, Qin Z H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(4):379-387.

Donohue S R, Varnäs K, Jia Z, Gulyás B, Pike V W, 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.

Donohue S R. Development of Cannabinoid Subtype-1 (CB1) Receptor Ligands for PET. Karolinska Institutet. PhD Thesis (2008).

Duarte J M, Nogueira C, Mackie K, Oliveira C R, Cunha R A, Köfalvi A. Increase of cannabinoid CB1 receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Neurol* 2007;204(1):479-484.

Dunnett S B, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999;399:A32-A39.

El Khoury M A, Gorgievski V, Moutsimilli L, Giros B, Tzavara E T. Interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems: evidence from animal studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;38(1):36-50.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt P M, Wolf S, Hoertnagl H, Raine C S, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 2006;49:67-79.

Elsworth J D, Brittan M S, Taylor J R. Upregulation of striatal D2 receptors in the MPTP-treated vervet monkey is reversed by grafts of fetal mesencephalon: an autoradiographic study. *Brain Res* 1998;795:55-62.

Esposito Z, Belli L, Toniolo S, Sancesario G, Bianconi C, Martorana A. Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *CNS Neurosci Ther* 2013;19(8):549-555.

Féger J. Updating the functional model of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1997;20:152-153.

Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos J A. Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 2010;16(3):e72-91.

Ferraro L, Tomasini M C, Cassano T, Bebe B W, Siniscalchi A, O'Connor W T, Magee P, Tanganelli S, Cuomo V, Antonelli T. Cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 inhibits rat cortical dialysate gamma-aminobutyric acid levels. *J Neurosci Res* 2001a;66(2):298-302.

Ferraro L, Tomasini M C, Gessa G L, Bebe B W, Tanganelli S, Antonelli T. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 regulates glutamate transmission in rat cerebral cortex: an in vivo and in vitro study. *Cereb Cortex* 2001b;11(8):728-733.

Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, Fuxe K, Franco R. Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res Rev* 2007;55(1):55-67.

Ferreira S G, Teixeira F M, Garção P, Agostinho P, Ledent C, Cortes L, Mackie K, Köfalvi A. Presynaptic CB(1) cannabinoid receptors control frontocortical serotonin and glutamate release--species differences. *Neurochem Int* 2012;61(2):219-226.

Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 2003;18(6):1607-1614.

Fitzgerald M L, Shobin E, Pickel V M. Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;38(1):21-29.

Fogarty M P, McCormack R M, Noonan J, Murphy D, Gowran A, Campbell V A. A role for p53 in the beta-amyloid-mediated regulation of the lysosomal system. *Neurobiol Aging* 2010;31(10):1774-1786.

Fortin D A, Levine E S. Differential effects of endocannabinoids on glutamatergic and GABAergic inputs to layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 2007;17(1):163-174.

French E D, Dillon K, Wu X. Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 1997;8(3):649-652.

Freund T F, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003;83:1017-1066.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995;232:54-61.

Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2002;62(6):1385-1592.

García-Arencibia M, García C, Kurz A, Rodríguez-Navarro J A, Gispert-Sánchez S, Mena M A, Auburger G, de Yébenes J G, 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* 2009;Suppl. 73:269-275.

Ge S, Dani J A. Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J Neurosci* 2005;25(26):6084-6091.

Geary WA 2nd, Toga AW, Wooten GF. Quantitative film autoradiography for tritium: methodological considerations. *Brain Res* 1985;337(1):99-108.

Gerdeman G L, Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system in the physiology and pathology in the basal ganglia. In: *Cannabinoids and the brain*, ed. Kofalvi A. Springer Verlag, 2008.

Gerdeman G, Lovinger D M. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 2001;85:468-471.9-97.

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger D M. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 2002;5(5):446-451.

Gessa G L, Casu M A, Carta G, Mascia M S. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 1998b;355(2-3):119-124.

Gessa G L, Melis M, Muntoni A L, Diana M. Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1998a;341(1):39-44.

Gingrich J A, Caron M G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:299-321.

Giuffrida A, Parsons L H, Kerr T M, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 1999;2(4):358-363.

Glass M, Dragunow M, Faull R L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997;77:299-318.

Glass M, Felder C C. 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.

Graham W C, Clarke C E, Boyce S, Sambrook M A, Crossman A R, Woodruff G N. Autoradiographic studies in animal models of hemi-parkinsonism reveal dopamine D2 but not

D1 receptor super sensitivity. II. Unilateral intra-carotid infusion of MPTP in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Brain Res* 1990;514:103-110.

Graham W C, Sambrook M A, Crossman A R. 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.

Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM. The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog Neurobiol* 2008;86(3):141-155.

Grondin R, Goulet M, Di Paolo T, Bedard P J. Cabergoline, a long-acting dopamine D2-like receptor agonist, produces a sustained antiparkinsonian effect with transient dyskinesias in parkinsonian drug-naïve primates. *Brain Res* 1996;735:298-306.

Grueter B A, Brasnjo G, Malenka R C. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 2010;13:1519-1525.

Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 2002;22(16):6900-6907.

Giuffrida A, Parsons L H, Kerr T M, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 1999;2(4):358-363.

Gulyás B. A pozitron emissziós tomográfia alkalmazása a klinikai farmakológiában. In: Vizi, E. S. (szerk.) *Klinikai Farmakológia*. Budapest, 1997;1297-1306.

Guttman M. Dopamine receptors in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1992;31:184-192.

Hájos N, Katona I, Naiem S S, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund T F. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 2000;12(9):3239-3249.

Hall H, Farde L, Halldin C, Lundkvist C, Sedvall G. Autoradiographic localization of 5-HT(2A) receptors in the human brain using [(3)H]M100907 and [(11)C]M100907. *Synapse* 2000;38:421-431.

Hall H, Halldin C, Dijkstra D, Wikström H, Wise L D, Pugsley T A, Sokoloff P, Pauli S, Farde L, Sedvall G. Autoradiographic localisation of D3-dopamine receptors in the human brain using the selective D3-dopamine receptor agonist (+)-[3H]PD. *Psychopharmacology* 1996;128:240-247.

Hall H, Halldin C, Farde L, Sedvall G. Whole hemisphere autoradiography of the postmortem human brain. *Nucl Med Biol* 1998;25:715-719.

Hamill TG, Lin LS, Hagmann W, Liu P, Jewell J, Sanabria S, Eng W, Ryan C, Fong TM, Connolly B, Vanko A, Hargreaves R, Goulet MT, Burns HD. PET imaging studies in rhesus monkey with the cannabinoid-1 (CB1) receptor ligand [11C]CB-119. *Mol Imaging Biol* 2009;11(4):246-252.

Hampson R E, Deadwyler S A. Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis* 1998;5(6 Pt B):474-482.

Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* 2007;13:127-137.

Hegyi Z, Holló K, Kis G, Mackie K, Antal M. Differential distribution of diacylglycerol lipase- α and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* 2012;60(9):1316-1329.

Hegyi Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M. Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci* 2009;30(2):251-262.

Hentges ST, Low MJ, Williams JT. Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J Neurosci* 2005;25(42):9746-9751.

Herkenham M, Lynn A B, de Costa B R, Richfield E K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 1991a;547:267-274.

Herkenham M, Lynn A B, Johnson M R, Melvin L S, De Costa B R, Rice K C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991b;11: 563-583.

Herkenham M, Lynn A B, Little M D, Johnson M R, Melvin L S, de Costa B R, Rice K C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(5):1932-1936.

Hidasi E. A Parkinson-kór modern szemlélete. *LAM* 2010;20(12):825-829.

Hill E L, Gallopin T, Férézou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, Lambolez B. Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol* 2007;97(4):2580-2589.

Hill M N, McLaughlin R J, Pan B, Fitzgerald M L, Roberts C J, Lee T T, Karatsoreos I N, Mackie K, Viau V, Pickel V M, McEwen B S, Liu Q S, Gorzalka B B, Hillard C J. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci* 2011;31(29):10506-10515.

Hornykiewicz O. Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol* 1993;60:140-147.

Huang C C, Lo S W, Hsu K S. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 2001;532(Pt 3):731-748.

Hudson B D, Hébert T E, Kelly M E. Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2010;77:1-9.

Hurley M J, Jolkkonen J, Stubbs C M, Jenner P, Marsden C D. Dopamine D3 receptors in the basal ganglia of the common marmoset and following MPTP and L-DOPA treatment. *Brain Res* 1996;709: 259-264.

Hurley M J, Mash D C, Jenner P. Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. *J Neural Transm* 2003;110:1279-1288.

Hyman B N, Hubert H M Van Tol. Dopamine Receptor Genes: New Tools for Molecular Psychiatry. *Journal Psychiatry Neuroscience* 1992;17(4):158-180.

Ilien B, Glasser N, Clamme JP, Didier P, Piemont E, Chinnappan R, Daval SB, Galzi JL, Mely Y. Pirenzepine promotes the dimerization of muscarinic M1 receptors through a three-step binding process. *J Biol Chem* 2009;284(29):19533-19543.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo A A. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 2004;89(1):134-141.

Izumi Y, Zorumski C F. NMDA receptors, mGluR5, and endocannabinoids are involved in a cascade leading to hippocampal long-term depression. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(3):609-617.

Jarrahian A, Watts VJ, Barker EL. D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308(3):880-886.

Jew C P, Wu C S, Sun H, Zhu J, Huang J Y, Yu D, Justice N J, Lu H C. mGluR5 ablation in cortical glutamatergic neurons increases novelty-induced locomotion. *PLoS One* 2013;8(8):e70415.

Julian M D, Martin A B, Cuellar B, De Fonseca F R, Navarro M, Moratalla R, Garcia-Segura L M. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 2003;119:309-318.

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.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malenka R. APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003;37(6):925-937.

Kammermeier PJ, Yun J. Activation of metabotropic glutamate receptor 1 dimers requires glutamate binding in both subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(2):502-508.

Karanian D A, Brown Q B, Makriyannis A, Bahr B A. Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2005;508(1-3):47-56.

Kassioti M, Banati R, Holsinger R M, Meikle S. Challenges in molecular imaging of Parkinson's disease: a brief overview. *Brain Res Bull* 2009;78:105-108.

Kathmann M, Weber B, Schlicker E. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2001;363(1):50-56.

Katona I, Freund T F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 2008;14(9):923-930.

Katona I, Freund T F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2012;35:529-558.

Katona I, Rancz E A, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund T F. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*. 2001;21(23):9506-9518.

Katona I, Sperl gh B, Magl czky Z, S ntha E, K falvi A, Czirj k S, Mackie K, Vizi E S, Freund T F. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 2000;100(4):797-804.

Katona I, Sperl gh B, S k A, K falvi A, Vizi E S, Mackie K, Freund T F. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 1999;19(11):4544-4558.

Kawaguchi Y. Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol* 1997;78(3):1743-1747.

Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 2006;26(11):2991-3001.

Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 2005;67(5):1697-1704.

Kelsey J E, 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.

Köfalvi A, Rodrigues R J, Ledent C, Mackie K, Vizi E S, Cunha R A, Sperlág B. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 2005;25(11):2874-2884.

Kövari E, Horvath J, Bouras C. Neuropathology of Lewy body disorders. *Brain Res Bull* 2009;80:203-210.

Krantic S, Isorce N, Mechawar N, Davoli M A, Vignault E, Albuquerque M, Chabot J G, Moyse E, Chauvin J P, Aubert I, McLaurin J, Quirion R. Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid- β toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model. *J Alzheimers Dis* 2012;29(2):293-308.

Kreitzer A C, Malenka R C. Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci* 2005;25:10537-10545.

Kreitzer A C, Malenka R C. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models, *Nature* 2007;445:643-647.

Kreitzer A C, Regehr W G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 2001;29(3):717-727.

Labandeira-Garcia J L, Rozas G, Lopez-Martin E, Liste I, Guerra M J. Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. *Exp Brain Res* 1996;108(1):69-84.

Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni O J. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One* 2007;2(8):e709.

LaHoste G J, Marshall J F. Dopamine supersensitivity and D1/D2 synergism are unrelated to changes in striatal receptor density. *Synapse* 1992;12(1):14-26.

Lambert D M, Fowler C J. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem* 2005;48(16):5059-5087.

Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios J M. Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol* 1993;18:187-192.

Laroche S, Davis S, Jay T M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 2000;10(4):438-446.

Lastres-Becker I, Cebeira M; de Ceballos M, Zeng B-Y, Jenner P, Ramos J A, Fernández-Ruiz J J. 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.

Lee J H, Agacinski G, Williams J H, Wilcock G K, Esiri M M, Francis P T, Wong P T, Chen C P, Lai M K. Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex. *Neurochem Int* 2010a;57:985-989.

Lee J, Zhu W M, Stanic D. Sprouting of dopamine terminals and altered dopamine release and uptake in Parkinsonian dyskinesia. *Brain* 2008;131:1574-1587.

Lee SH, Földy C, Soltesz I. Distinct endocannabinoid control of GABA release at perisomatic and dendritic synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 2010;30(23):7993-8000.

Lee T, Seeman P, Rajput A, Farley I J, Hornykiewicz O. Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature* 1978;273:59-61.

Li S, Hong S, Shepardson N E, Walsh D M, Shankar G M, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 2009;62(6):788-801.

Limon A, Reyes-Ruiz J M, Miledi R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(25):10071-10076.

Lin Q S, Yang Q, Liu D D, Sun Z, Dang H, Liang J, Wang Y X, Chen J, Li S T. Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of longterm potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain Res Bull* 2011;86:139-145.

Linazasoro G, Obeso J A, Gómez J C, Martínez M, Antonini A, Leenders K L. Modification of dopamine D2 receptor activity by pergolide in Parkinson's disease: an in vivo study by PET. *Clin Neuropharmacol* 1999.;22:277-280.

Liu Q, Bhat M, Bowen W D, Cheng J. Signaling pathways from cannabinoid receptor-1 activation to inhibition of N-methyl-D-aspartic acid mediated calcium influx and neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331(3):1062-1070.

Lopez A, Muñoz A, Guerra M J, Labandeira-Garcia J L. Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience* 2001;103(3):639-651.

Lopez de Maturana R, Sanchez-Pernaute R. Regulation of corticostriatal synaptic plasticity by G protein-coupled receptors. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 2010;9:601-615.

Losonczy A, Biró AA, Nusser Z. Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(5):1362-1367.

Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66(2-3):123-142.

Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Calabresi P. Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem* 2003;85(4):1018-1025.

Mackie K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization, *Life Sci* 2005;77:1667-1673.

Maggio R, Scarselli M, Novi F, Millan MJ, Corsini GU. Potent activation of dopamine D3/D2heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. *J Neurochem* 2003; 87:631-641.

Maglóczy Z, Tóth K, Karlócai R, Nagy S, Eross L, Czirják S, Vajda J, Rásonyi G, Kelemen A, Juhos V, Halász P, Mackie K, Freund T F. Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia* 2010;51(Suppl.3):115-120.

Mailleux P, Vanderhaeghen J J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992;48:655-668.

Maneuf Y P, Crossman A R, Brotchie J M. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the rezerpin-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997;148:265-270.

Marcellino D, Carriba P, Filip M, Borgkvist A, Frankowska M, Bellido I, Tanganelli S, Müller C E, Fisone G, Lluis C, Agnati L F, Franco R, Fuxe K. Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 2008;54(5):815-823.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad S C, Cascio M G, Gutiérrez S O, van der Stelt M, López-Rodríguez M L, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 2003;302(5642):84-88.

Marsicano G, Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 1999;11(12):4213-4225.

Marsicano G, Wotjak C T, Azad S C, Bisogno T, Rammes G, Cascio M G, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 2002;418(6897):530-534.

Martín AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Moratalla R. Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopaminergic receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(7):1667-1679.

Martín-Moreno A M, Brera B, Spuch C, Carro E, García-García L, Delgado M, Pozo M A, Innamurato N G, Cuadrado A, de Ceballos M L. Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J Neuroinflammation* 2012;9:8.

Martín-Santos R, Fagundo AB, Crippa J A, Atakan Z, Bhattacharyya S, Allen P, Fusar-Poli P, Borgwardt S, Seal M, Busatto GF, McGuire P. Neuroimaging in cannabis use: a systematic review of the literature. *Psychol Med* 2010;40(3):383-398.

Massi P, Fuzio D, Vigano D, Sacerdote P, Parolaro D. Relative involvement of cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors in the Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. *Eur J Pharmacol* 2000;387:343-347.

Máthé D, Horváth I, Szigeti K, Donohue SR, Pike VW, Jia Z, Ledent C, Palkovits M, Freund TF, Halldin C, Gulyás B. In vivo SPECT and ex vivo autoradiographic brain imaging of the novel selective CB1 receptor antagonist radioligand [125I]SD7015 in CB1 knock-out and wildtype mouse. *Brain Res Bull* 2013;91:46-51.

Matsuda L A, Bonner T I, Lolait S J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 1993;327(4):535-550.

Matsuda L A, Lolait S J, Brownstein M J, Young A C Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-564.

Matyas F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund T. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 2006;137:337-361.

Mayadevi M, Archana G M, Prabhu R R, Omkumar R V. Molecular Mechanisms in Synaptic Plasticity. In: *Neuroscience - Dealing With Frontiers*, ed. Carlos M. Contreras. InTech, 2012;13:295-330. ISBN 978-953-51-0207-6.

Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma P L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013;698(1-3):6-18.

Meschler J P, Howlett A C. Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* 2001;40:918-926.

Micale V, Mazzola C, Drago F. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 2007;56:382-392.

Michell A W, Lewis S J G, Foltynie T, Barker R A. Biomarkers and Parkinson's disease. *Brain* 2004;127(8):1693-1705.

Miller A S, Walker J M. Effects of a cannabinoid on spontaneous and evoked neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata. *Eur J Pharmacol* 1995;279(2-3):179-185.

Miller JA. The calibration of ³⁵S or ³²P with ¹⁴C-labeled brain paste or ¹⁴C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm. *Neurosci Lett* 1991;121(1-2):211-214.

Milton NG. Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett* 2002;332(2):127-130.

Minuzzi L, Cumming P. Agonist binding fraction of dopamine D2/3 receptors in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Neurochem Int* 2010;56:747-752.

Mirnikjoo B, Balasubramanian K, Schroit A J. Mobilization of lysosomal calcium regulates the externalization of phosphatidylserine during apoptosis. *J Biol Chem* 2009;284(11):6918-6923.

Molina-Holgado E, Vela J M, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 2002;22(22):9742-9753.

Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schütz G, Wotjak C T, Lutz B, Marsicano G. Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 2007;5(10):e269.

Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein J L, Goebbels S, Nave K A, During M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt H U, Zieglgänsberger W, Wotjak C T, Mackie K, Elphick M R, Marsicano G, Lutz B. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 2006;51(4):455-466.

Morera-Herreras T, Ruiz-Ortega J A, Gómez-Urquijo S, Ugedo L. Involvement of subthalamic nucleus in the stimulatory effect of Delta(9)-tetrahydrocannabinol on dopaminergic neurons. *Neuroscience* 2008;151(3):817-823.

Murray A M, Ryoo H L, Gurevich E, Joyce J N. Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 11271-11275.

Nakajima T, Nimura T, Yamaguchi K, Ando T, Itoh M, Yoshimoto T, Shirane R. The impact of stereotactic pallidal surgery on the dopamine D2 receptor in Parkinson disease: a positron emission tomography study. *J Neurosurg* 2003;98(1):57-63.

Navarro G, Carriba P, Gandía J, Ciruela F, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* 2008;8:1088-1097.

Nelson P T, Braak H, Markesbery W R. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1-14.

Neve K A, Neve R L. Molecular biology of dopamine receptors. In: *The Dopamine Receptors*, eds K. A. Neve and R. L. Neve. Humana Press, NJ, 1997;27-76.

Newell K L, Hyman B T, Growdon J H. Application of the National Institute on Aging (NIA)–Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:1147-1155.

Noonan J, Tanveer R, Klompas A, Gowran A, McKiernan J, Campbell V A. Endocannabinoids prevent β -amiloid-mediated lysosomal destabilization in cultured neurons. *J Biol Chem* 2010;285(49):38543-38554.

Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 2005;136(3):811-822.

Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Ano M, Takeda S, Tsubokawa H, Kano M. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. *J Physiol* 2007;584(Pt 2):407-418.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 2001;29(3):729-738.

Ondrejcek T, Klyubin I, Hu N W, Barry A E, Cullen W K, Rowan M J. Alzheimer's disease amiloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med* 2010;12(1):13-26.

Ong W Y, Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience*. 1999;92(4):1177-1191.

Orgado J M, Fernández-Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatry*. 2009;21(2):172-180.

Owen A M. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist* 2004;10:525-537.

Palop J J, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010;13(7):812-818.

Pickel V M, Chan J, Kearn C S, Mackie K. Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 2006;495(3):299-313.

Piggott M A, Marshall E F, Thomas N, Lloyd S, Court J A, Jaros E, Costa D, Perry R H, Perry E K. Dopaminergic activities in the human striatum: rostrocaudal gradients of uptake sites and of D1 and D2 but not of D3 receptor binding or dopamine. *Neuroscience* 1999;90:433-445.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nature Reviews/Neuroscience* 2003;4: 873-884.

Pisani A, Fezza F, Galati S, Battista N, Napolitano S, Finazzi-Agrò A, Bernardi G, Brusa L, Pierantozzi M, Stanzione P, Maccarrone M. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann Neurol* 2005;57(5):777-779.

Playford E D, Brooks D J. In vivo and in vitro studies of the dopaminergic system in movement disorders. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev* 1992;4:144-171.

Pomara N, Singh R, Deptula D, Chou J C, Schwartz M B, LeWitt P A. Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 1992;149(2):251-254.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amiloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 2008;28(53):14537-14545.

Ramirez B G, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos M L. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 2005;25:1904-1913.

Ramirez S H, Haskó J, Skuba A, Fan S, Dykstra H, McCormick R, Reichenbach N, Krizbai I, Mahadevan A, Zhang M, Tuma R, Son Y J, Persidsky Y. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci* 2012;32(12):4004-4016.

Reches A, Wagner H R, 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.

Reisine T D, Fields J Z, Yamamura H I. Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci* 1977;21:335-343.

Rinne J O, Laihinén A, Ruottinen H, Ruotsalainen U, Nagren K, Lehtikainen P. Increased density of dopamine D2 receptors in the putamen, but not in the caudate nucleus in early Parkinson's disease: a PET study with [¹¹C] raclopride. *J Neurol Sci* 1995;132:156-161.

Rinne U, Rinne J O, Rinne J K. Brain receptor changes in Parkinson's disease in relation to the disease process and treatment. *J Neural Transm* 1983;Suppl.18:279-286.

Rissman R A, Mobley W C. Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011;117(4):613-622.

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni O J. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):8384-8388.

Robinson S W, Caron M G. Selective inhibition of adenylyl cyclase type V by the dopamine D3 receptor. *Mol Pharmacol* 1997;52:508-514.

Rodriguez J J, Mackie K, Pickel V M. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 2001;21(3):823-833.

Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernandez-Ruiz J J, de Yébenes J G, Ramos J A. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 2000;66:485-494.

Rozenfeld R, Bushlin I, Gomes I, Tzavaras N, Gupta A, Neves S, Battini L, Gusella GL, Lachmann A, Ma'ayan A, Blitzer RD, Devi LA. Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One*.2012;7(1):e29239.

Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim M P, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N, Devi L A. AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J* 2011;30(12):2350-2363.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 1998;436(1):6-10.

Sanudo-Pena M C, Patrick S L, Khen S, Patrick R L, Tsou K, Walker J M. Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1998;248:171-174.

Scherfler C, Khan NL, Pavese N, Lees AJ, Quinn NP, Brooks DJ, Piccini PP. Upregulation of dopamine D2 receptors in dopaminergic drug-naïve patients with Parkin gene mutations. *Mov Disord* 2006;21(6):783-788.

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 2011;221(2):555-563.

Seeman P, Weinshenker D, Quirion R, Srivastava L K, Bhardwaj S K, Grandy D K. Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3513-3518.

Seneca N, Finnema S J, Farde L, Gulyás B, Wikström H V, Halldin C, Innis R B. Effect of amphetamine on dopamine D2 receptor binding in nonhuman primate brain: a comparison of the agonist radioligand [¹¹C]MNPA and antagonist [¹¹C]raclopride. *Synapse* 2006;59:260-269.

Shankar G M, Li S, Mehta T H, Garcia-Munoz A, Shepardson N E, Smith I, Brett F M, Farrell M A, Rowan M J, Lemere C A, Regan C M, Walsh D M, Sabatini B L, Selkoe D J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14(8):837-842.

Shankar G M, Walsh D M. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Aβ. *Mol Neurodegener* 2009;4:48.

Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier D J. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 2008;321:848-851.

Silverdale M A, McGuire S, McInnes A, Crossman A R, Brotchie J M. Striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression is decreased in the rezerpin-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2001;169:400-406.

Sim L J, Selley D E, Xiao R, Childers S R. Differences in G-protein activation by m- and d-opioid, and cannabinoid receptors in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1996;307:97-105.

So CH, Varghese G, Curley KJ, Kong MM, Alijaniam M, Ji X, Nguyen T, O'Dowd BF, George SR. D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol* 2005; 68:568-578.

Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluís C, Fuxe K, Franco R. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 2008;283:26016-26025.

Sossi V, Dinelle K, Topping G J, Holden J E, Doudet D, Schulzer M, Ruth T J, Stoessl A J, de la Fuente-Fernandez R. Dopamine transporter relation to levodopa-derived synaptic dopamine in a rat model of Parkinson's: an in vivo imaging study. *J Neurochem* 2009;109:85-92.

Sóvágó J, Dupuis D S, Gulyás B, Hall H. An Overview on Functional Receptor Autoradiography Using [35S]GTP γ S. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;38:149-164.

Sóvágó J, Makkai B, Gulyás B, Hall H. Autoradiographic mapping of dopamine-D2/D3 receptor stimulated [35S]GTP γ S binding in the human brain. *Eur J Neurosci* 2005;22(1):65-71.

Steffens M, Szabo B, Klar M, Rominger A, Zentner J, Feuerstein T J. Modulation of electrically evoked acetylcholine release through cannabinoid CB1 receptors: evidence for an endocannabinoid tone in the human neocortex. *Neuroscience* 2003;120(2):455-465.

Szabo B, Müller T, Koch H. Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 1999;73(3):1084-1089.

Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C. Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 2000;97:8.

Szirmai Imre: Neurológia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2006.

Tang K, Low M J, Grandy D K, Lovinger D M. Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1255-1260.

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.

Tersigni T J, Rosenberg H C. Local pressure application of cannabinoid agonists increases spontaneous activity of rat substantia nigra pars reticulata neurons without affecting response to iontophoretically-applied GABA. *Brain Res* 1996;733(2):184-192.

Thanvi B R, Lo T C N. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad Med J* 2004;80:452-458.

Thanvi B R, Munshi S K, Vijaykumar N, Lo T C. Neuropsychiatric non-motor aspects of Parkinson's disease. *Postgrad Med J* 2003;79(936):561-565.

Thobois S, Vingerhoets F, Fraix V, Xie-Brustolin J, Mollion H, Costes N, Mertens P, Benabid A L, 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.

Trettel J, Fortin D A, Levine E S. Endocannabinoid signalling selectively targets perisomatic inhibitory inputs to pyramidal neurones in juvenile mouse neocortex. *J Physiol* 2004;556(Pt 1):95-107.

Trettel J, Levine E S. Endocannabinoids mediate rapid retrograde signaling at interneuron right-arrow pyramidal neuron synapses of the neocortex. *J Neurophysiol* 2003;89(4):2334-2338.

Troiano A, de la Fuente-Fernandez R, Sossi V, Schulzer M, Ruth T J, Stoessl A J. Positron emission tomography demonstrates reduced dopamine transporter expression in PD patients with diszkinéziás. *Neurology* 2009;72:1211-1216.

Tseng K.Y. Acquiring the excitatory and the inhibitory action of dopamine in the prefrontal cortex during postnatal development. In: Tseng K Y, Atzori M (Eds.), “Monoaminergic modulation of cortical excitability”. Section II. Chapter 11, Springer, NY, USA, (2007); 175-188.

Agid Y, Javoy-Agid F, Ruberg M. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In: Marsden C D, Fahn S (Eds.), *Movement disorders*. Butterworth, UK, 1987;166-230.

Tseng K Y, O'Donnell P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci* 2004;24(22):5131-5139.

Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena M C, Mackie K, Walker J M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998;83:393-411.

Tzavara E T, Davis R J, Perry K W, Li X, Salhoff C, Bymaster F P, Witkin J M, Nomikos G G. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic

neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* 2003a;138:544-553.

Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 2007;27(14):3663-3676.

Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson M J, 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.

van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V. Endocannabinoids and beta-amiloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(12):1410-1424.

Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer B J. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 1997;12(9):913-919.

Waksman Y, Olson J M, Carlisle S J, Cabral G A. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288(3):1357-1366.

Wallmichrath I, Szabo B. Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience* 2002;113:671-682.

Walsh D M, Klyubin I, Fadeeva J V, Cullen W K, Anwyl R, Wolfe M S, Rowan M J, Selkoe D J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002;416(6880):535-539.

Walsh S, Mnich K, Mackie K, Gorman A M, Finn D P, Dowd E. Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain Res Bull* 2010;81(6):543-548.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 2003;23(4):1398-1405.

Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D. D-9-Tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology* 2006;185:524-528.

Wang H, Pickel V M. Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol* 2002;442(4):392-404.

Wenning G K, Donnemiller E, Granata R, Riccabona G, Poewe W. 123I-beta-CIT and 123I-IBZM-SPECT scanning in levodopa-naïve Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;13:435-443.

Westlake T M, Howlett A C, Bonner T I, Matsuda L A, 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.

Wichmann T, DeLong M R. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 2003;91:9-18.

- Williams C J, Dexter D T. Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease. *J Neurochem* 2013. doi: 10.1111/jnc.12608. [Epub ahead of print]
- Wilson R I, Kunos G, Nicoll R A. Presynaptic specificity of endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Neuron* 2001;31:1-20.
- Wilson R I, Nicoll R A. Endocannabinoid signaling in the brain, *Science* 2002;296:678-682.
- Wilson R I, Nicoll R A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 2001;410(6828):588-592.
- Wise L E, Thorpe A J, Lichtman A H. Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(9):2072-2080.
- Wong M. Dopamine Modulates Corticostriatal Inputs During Motor Command Signaling 2013. (Dissertations) [<http://hdl.handle.net/10022/AC:P:19317>].
- Yang A J, Chandswangbhuvana D, Margol L, Glabe C G. Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis. *J Neurosci Res* 1998;52(6):691-698.
- Yin H H, Lovinger D M. Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:8251-8256.
- Zádori D, Datki Z, Penke B. The role of chronic brain hypoperfusion in the pathogenesis of Alzheimer's disease--facts and hypotheses. *Ideggyogy Sz* 2007;60(11-12):428-437.

Zeng B Y, Dass B, Owen A, Rose S, Cannizzaro C, Tel B C, Jenner P. Chronic L-DOPA treatment increases striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett* 1999;276:71-74.

Zhu P J, Lovinger D M. Persistent synaptic activity produces long-lasting enhancement of endocannabinoid modulation and alters long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 2007;97:4386-4389.

Zhuang S Y, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson R E, Deadwyler S A. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology* 2005;48(8):1086-1096.

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

Jelölt: Farkas Szabolcs

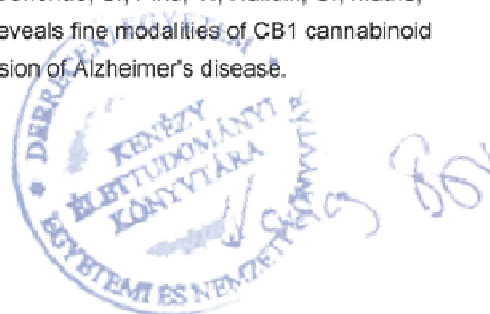
Neptun kód: ODKCU3

Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

Mint 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

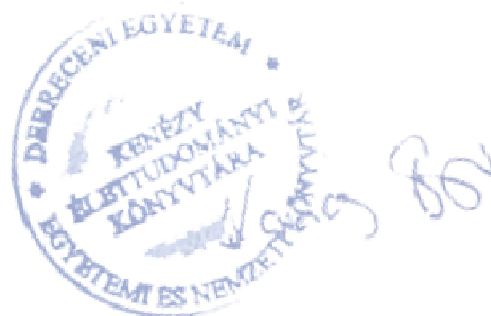
4. **Farkas, S.**, Molnár, S., Nagy, K., Hortobágyi, T., Csiba, L.: Comparative in vivo and in vitro postmortem ultrasound assessment of intima-media thickness with additional histological analysis in human carotid arteries.
In: *Perspectives in Medicine : New Trends in Neurosonology and Cerebral Hemodynamics - an Update Vol.1.* Ed.: Eva Bartels, Susanne Bartels, Holger Poppert, Elsevier, Amsterdam, 170-176, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.permed.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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.10



12. TÁRGYSZAVAK – KEY WORDS

Dopamin D₂/D₃ receptor, [³⁵S]GTPγS, [¹²⁵I]SD7015, autoradiográfia, CB₁R, nucleus caudatus, Parkinson-kór, Alzheimer-kór, Braak osztályozás.

Dopamine D₂/D₃ receptor, [³⁵S]GTPγS, [¹²⁵I]SD7015, autoradiography, CB₁R, nucleus caudate, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Braak classification.

13. SAJÁT MUNKA

A doktorjelölt kutatómunkája során egy kutatócsoport tagjaként az alábbi részfeladatokat végezte: tudományos irodalom áttekintése, agyminták gyűjtése, azok előkészítése metszéshez, a minták egy részének metszése, a kísérletek megtervezése, a CB₁R autoradiográfia és a dopamin által stimulált receptor-[³⁵S]GTPγS kötődési autoradiográfia kísérleti protokolljának optimalizálása, a kísérletek felügyelete és egy részének végzése, a vegyszerek, hiányzó eszközök beszerzése, autoradiogramok készítése, optikai denzitásmérések végzése, az eredmények értékelése, elemzése és összevetése irodalmi adatokkal, az eredmények bemutatása tudományos konferenciákon, az eredményeket összefoglaló tudományos közlemények megírása.

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat Csiba László Professzor Úrnak a Ph.D. munkám során nyújtott sokrétű segítségéért, bölcs útmutatásaiért, szakmai tanácsaiért, támogatásáért. Köszönöm Neki a vizsgálatokhoz szükséges megfelelő munkakörülmények biztosítását.

Őszintén köszönöm Gulyás Balázs Professzor Úr szakmai tanácsait, hozzáértő, nélkülözhetetlen iránymutatásait, a ligandumok egy részének donációját, és hogy helyet, eszközt és segítséget biztosított a kísérletek bizonyos szakaszainak elvégzéséhez.

Köszönöm Palkovits Miklós Professzor Úr értékes tanácsait, valamint közreműködését a feldolgozott agyminták bizonyos részének a beszerzésében.

Köszönet illeti Dr. Kardos László-t a diagramok elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti Siv Erikson-t, aki a [³H]raclopride receptor autoradiográfiás kísérleteket végezte Gulyás Balázs Professzor Úr irányítása alatt a Karolinska Intézetben, Stockholmban.

Őszinte hálám Nagy Katalinnak értékes, hozzáértő, lelkiismeretes munkájáért, segítségéért, illetve azért, hogy bevezetett a laboratóriumi munka világába és nem utolsósorban baráti támogatásáért.

Szívből köszönöm Feleségemnek, Szüleimnek és Családom minden tagjának a feltétlen támogatást, bizalmat és szeretetet, melyek nélkül ezt az utat nem járhattam volna végig.

A disszertációban szereplő vizsgálatok az OTKA/ K 68864/ 2006 kutatási pályázat támogatásával készültek.