

Raspodjela i izraženost dopaminskih D2 receptora u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša

Mladinov, Mihovil

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:416670>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-10**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mihovil Mladinov

**Raspodjela i izraženost dopaminskih D2
receptora u prefrontalnoj moždanoj kori
čovjeka i miša**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mihovil Mladinov

**Raspodjela i izraženost dopaminskih
D2 receptora u prefrontalnoj moždanoj
kori čovjeka i miša**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada su prof. dr. sc. Goran Šimić i izv. prof. dr. sc. Nataša Jovanov Milošević

Zahvala

Zahvaljujem se profesoru Goranu Šimiću, mentoru i učitelju, na prenesenom znanju, vođenju i strpljenju tijekom zajedničkog rada. Posebno cijenim nesebičnu potporu i razumijevanje koje mi je pružao u razvoju vlastitog znanstvenog interesa u području temeljne i kliničke neuroznanosti.

Također se zahvaljujem mentorici profesorici Nataši Jovanov Milošević, koja je svojim znanjem obogatila ovaj znanstveni rad. Bez njezine ljudskosti, neposrednog pristupa i iznimnih motivacijskih sposobnosti ovaj bi rad ostao nedovršen.

Zahvaljujem se kolegi i prijatelju Domagoju Džaji, izvoru neiscrpne podrške i pomoći tijekom doktorskog studija, a napose tijekom izrade doktorskog rada. On je uz Marka Čuljata, također kolege i prijatelja, sudjelovao u produktivnim raspravama o znanstvenim i neznanstvenim temama.

Nadalje se zahvaljujem direktoru Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, akademiku Ivici Kostoviću, koji je omogućio izradu ovog doktorskog rada, a čiji su entuzijazam i pristup znanosti dojmljivi. Zahvaljujem se i suradnicima Instituta na savjetima i pomoći u savladavanju metodologije znanstvenog rada.

Zahvaljujem se doktoru Andrei Diani sa Sveučilišta u Cagliariju na Sardiniji i profesoru Josefu Prilleru sa Medicinskog fakulteta Charité u Berlinu te suradnicima na mogućnosti stjecanja znanja i neprocjenjivog iskustva u navedenim institucijama, kao i na pomoći pri provođenju pokusa koji su dio ovog doktorskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i braći na razumijevanju i podršci, ne samo tijekom doktorskog studija, nego i cijelog školovanja.

SADRŽAJ

1. Uvod i svrha rada	1
1.1. Otkriće dopamina i dopaminskog sustava	1
1.2. Sinteza, metabolizam i prijenos dopamina do sinapse	1
1.3. Dopaminergičke jezgre i njihove projekcije u mozgu čovjeka	3
1.4. Dopaminski receptori	4
1.4.1. Podjela i skupine dopaminskih receptora	5
1.4.2. Dopaminski receptori skupine D2	5
1.4.2.1. Struktura, geni i varijante D2 receptora	5
1.4.2.2. Unutarstanična signalizacija putem DR2	7
1.4.2.3. Unutarstanična lokalizacija D2 receptora	8
1.4.2.4. Dosadašnje spoznaje o staničnoj i slojevnoj raspodjeli DR2	9
1.4.2.5. Značenje sinaptičke i presinaptičke lokalizacije DR2	9
1.5. Prefrontalna moždana kora	10
1.5.1. Morfologija i citoarhitektonika prefrontalne moždane kore čovjeka	10
1.5.2. Morfologija i citoarhitektonika prefrontalne moždane kore miša	14
1.6. Kliničko značenje dopaminskog sustava u funkciji prefrontalnog korteksa	16
1.6.1. Učenje i pamćenje	16
1.6.2. Poremećaj pažnje / hiperaktivni poremećaj	17
1.6.3. Shizofrenija i psihotični poremećaji	17
1.6.4. Bolesti ovisnosti	18
1.7. Svrha rada	18
2. Hipoteza	21
3. Ciljevi rada	22
3.1. Opći cilj	22
3.2. Specifični ciljevi	22
4. Materijali i metode	24
4.1. Uzorci prefrontalnog korteksa čovjeka	24
4.1.1. Priprema moždanog tkiva	24
4.1.2. Imunohistokemija	25
4.1.2.1. Fluorescentna imunohistokemija	25
4.1.2.2. Imunohistokemija pomoću kita Vectastain ABC	26
4.1.3. Analiza izražaja gena D2L i D2S metodom mikropostroja (microarray)	26

4.1.3.1.	Izolacija RNA iz tkiva pomoću kita RNeasy Plus Mini	27
4.2.	Uzorci mozga miša	28
4.2.1.	Imunohistokemija i imunofluorescencija	28
4.2.2.	Analiza izražaja gena D2L i D2S metodom qRT-PCR	28
4.2.2.1.	Izolacija RNA pomoću fenolnog postupka	29
4.2.2.2.	Sinteza cDNA	29
4.2.2.3.	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	31
4.3.	Stanične kulture	33
4.3.1.	Primarne kulture kortikalnih neurona miša	33
4.3.2.	Primarne kulture astrocita miša	34
4.3.3.	Primarne kulture mikroglije miša	35
4.3.4.	Izolacija RNA iz staničnih kultura	36
4.3.5.	Transfekcija	36
5.	Statistička obrada podataka	38
6.	Rezultati	39
6.1.	Raspodjela DR2, DR3 i DR4 u prefrontalnom korteksu čovjeka	39
6.2.	Izražaj gena D2L i D2S u prefrontalnom korteksu čovjeka	45
6.3.	Izražaj DR2 u mozgu miša	46
6.4.	Izražaj DR2 u staničnim kulturama i unutarstanična lokalizacija	50
7.	Rasprava	55
7.1.	Laminarna raspodjela DR2 u prefrontalnom korteksu	55
7.2.	Odnos izražaja mRNA i proteina za DR2	56
7.3.	DR2 na glija stanicama	56
7.4.	Stanična lokalizacija DR2	57
7.5.	Razlike u izražaju D2L i D2S	58
7.6.	Razlike u izražaju DR2 u prefrontalnom korteksu čovjeka i miša	58
8.	Zaključci	60
9.	Sažetak na hrvatskom jeziku	61
10.	Sažetak na engleskom jeziku	63
11.	Literatura	65
12.	Životopis	76

POPIS OZNAKA I KRATICA

AADC	amino acid decarboxylase
AC	adenilat ciklaza
ADHD	poremećaj pažnje i hiperaktivnosti, engl. <i>attention deficit hyperactivity disorder</i>
BPA	engl. <i>biotin protection degradation assay</i>
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
COMT	katekol-O-metiltransferaza
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT	dopaminski transporter
DBH	dopamin beta hidroksilaza
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
DR	dopaminski receptor
D2L	dugi izo-oblik receptora DR2
D2S	kratki izo-oblik receptora DR2
FITC	fluorescein isothiocyanate
GABA	gama amino-butiratna kiselina, engl. <i>gamma aminobutyric acid</i>
Gas, Gai, Gαq, i Gα12	četiri skupine G proteina
GPCR	receptori spregnuti s G proteinima, engl. <i>G protein-coupled receptors</i>
GPCRK	G protein-coupled receptor kinase
L-DOPA	L-dihidroksifenilalanin
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAO	monoaminoooksidaza
NET	noradrenalinski transporter
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
qRT- PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
SŽS	središnji živčani sustav
SY5Y	stanične kulture neuroblastoma
TH	tirozin hidroksilaza
VMAT2	vezikularni monoaminski transportera 2

1. UVOD I SVRHA RADA

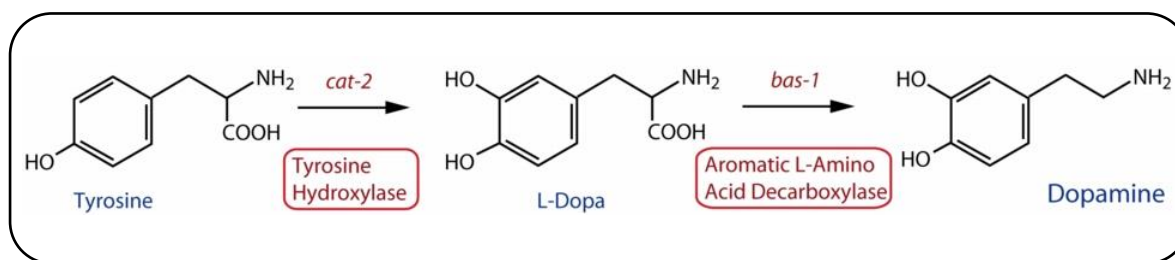
Poznavanje dopaminskog sustava je preduvjet za razumijevanje normalnog ljudskog ponašanja te psihijatrijskih i neuroloških bolesti kao što su shizofrenija (1-4), Parkinsonova bolest, različite ovisnosti (5-7), autizam (8-10), depresija (11-14) ili ADHD (poremećaj pažnje s hiperaktivnošću, od engl. *attention deficit with hyperactivity disorder*) (15-17). Istraživanje anatomije dopaminskog sustava, tj. topografskog smještaja staničnih skupina dopaminergičnih neurona, njihovih projekcija i ciljnih populacija neurona u moždanoj kori ključan je za razumijevanje funkcije tog sustava, njegove uloge u živčanom sustavu čovjeka i životinja, kao i za razumijevanje njegove uloge i djelovanja u navedenim poremećajima.

1.1. Otkriće dopamina i dopaminskog sustava

Dopamin je kao neurotransmiter otkrio Arvid Carlsson sa suradnicima 1957. godine (18,19) kada je opisao da se akinetički učinak rezerpina u štakora može ponovno uspostaviti injekcijom dopaminskog prekursora 3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA). Idućih godina nalaz je proširen otkrićem da se dopamin u mozgu pretežito nalazi u strijatumu (20), što je dodatno potvrdilo hipotezu da je dopamin od ključne važnosti za motorički sustav (21). Navedena su istraživanja ubrzo dovela do otkrića uloge dopamina u patofiziologiji Parkinsonove bolesti (22) te nešto kasnije prve uspješne nadomjesne terapije za navedenu bolest pomoću DOPA. U idućim desetljećima je istraživanje dopaminskog sustava postalo vrlo dinamično i bitno doprinijelo razumijevanju djelovanja mozga, kao i mnogih neuroloških i psihičkih bolesti. Tako je modulacija dopaminskog sustava utjecajem na dopaminske receptore postala temelj suvremene terapije shizofrenije i ADHD (23-25).

1.2. Sinteza, metabolizam i prijenos dopamina do sinapse

Dopamin spada u skupinu katekolaminskih neurotransmitera, u koju se još ubrajaju adrenalin i noradrenalin. Navedeni neurotransmiteri i DOPA nastaju iz esencijalne aminokiseline tirozina. Oksidacijom tirozina putem enzima tirozin-hidroksilaze nastaje L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). U sljedećem koraku dekarboksilacijom pomoću enzima DOPA dekarboksilaze (ili AADC, od engl. *amino acid decarboxylase*) nastaje dopamin. Za brzinu sinteze dopamina odlučujući je enzim tirozin-hidroksilaza (engl. *rate-limiting enzyme*).



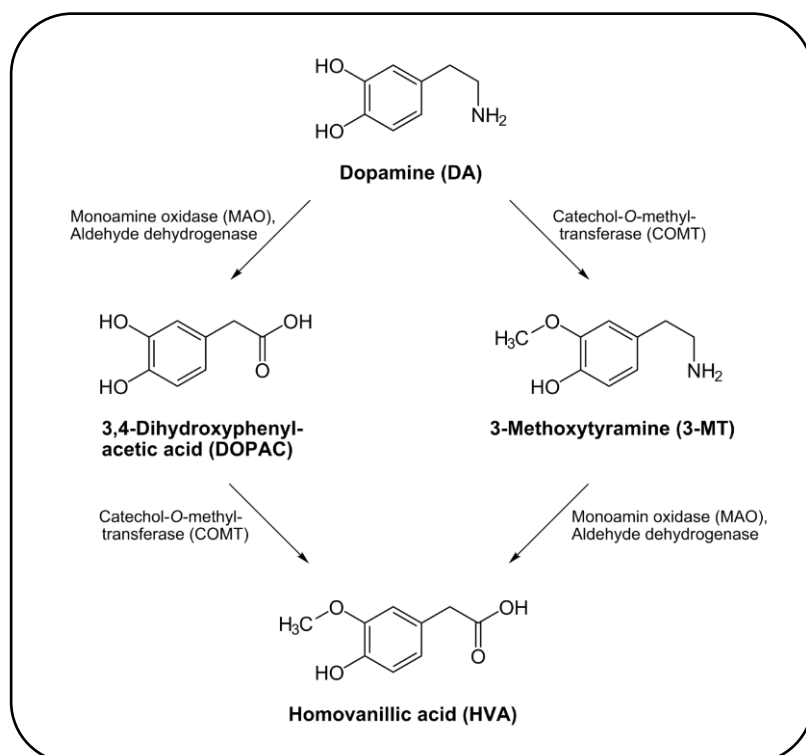
Slika 1. Prekursori dopamina i enzimi uključeni u sintezu dopamina.

U razgradnji dopamina sudjeluje nekoliko enzima. Razgradnjom dopamina putem enzima dopamin β -hidroksilaze nastaje aktivni metabolit noradrenalin. Taj se proces odvija pomoću kofaktora molekule kisika (O_2) i L-askorbinske kiseline. S druge strane, dopamin se putem enzima monoaminooksidaze (MAO) i katekol-O-metiltransferaze (COMT) razgrađuje u homovaniličnu kiselinu, koja nema poznatu biološku funkciju.

Dopamin ne može prijeći krvno-moždanu barijeru te u središnjem živčanom sustavu (SŽS) potječe isključivo iz dopaminergičkih neurona. Dopaminergički neuroni unose aminokiselinu tirozin iz izvanstaničnog matriksa i krvotoka putem tirozinske pumpe (transportera). Gore navedeni enzimi za sintezu dopamina (kao i ostalih aaminskih neurotransmitora) nalaze se u aksonskim završecima neurona, gdje se njegova sinteza odvija lokalno. Nakon sinteze u citosolu aksonskog nastavka, dopamin biva pohranjen u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog monoaminskog transportera 2 (VMAT2), koji se nalazi na membrani vezikula. Nadalje, dopaminergički neuroni imaju i presinaptički dopaminski transporter (DAT), koji ponovno unosi dopamin iz sinaptičke pukotine u presinaptički završetak. Tu se dopamin ponovno pohranjuje u sinaptičke vezikule. DAT nije podjednako izražen u svim dijelovima mozga. Tako je on relativno rijedak u prefrontalnom korteksu, gdje su razina i aktivnost dopamina regulirani drugim mehanizmima. U prefrontalnom korteksu dopamin koji nije pohranjen u vezikulama razgrađuje se enzimima monoaminooksidazom (MAO) A ili MAO-B, koji se nalaze u presinaptičkom završetku, te COMT, koji se nalazi u presinaptičkoj pukotini ili izvanstaničnom matriksu. Manjim dijelom se dopamin u presinaptičku pukotinu prenosi i nespecifično putem noradrenalinskog transportera (NET).

Većina podataka o strukturi monoaminskih aksonskih završetaka je dobivena imunocitokemijom sa specifičnim protutijelima za enzime uključene u sintezu monoaminskih neurotransmitera, na primjer tirozin hidroksilaza (TH) i dopamin beta hidroksilaza (DBH). Istraživanja su pokazala da je dopaminska inervacija pretežito, ali ne isključivo sinaptička. Tako mnogi dopaminski aksoni stvaraju varikozitete koji po svojoj morfologiji nemaju obilježja sinaptičkih završetaka. Ciljne stanice dopaminskih varikoziteta u korteksu štakora su

piramidni neuroni i GABAergički interneuroni (26). Taj je nalaz potvrđen i u prefrontalnom, motornom i entorinalnom korteksu rebus majmuna (27-30). Ovdje je potrebno spomenuti i nepodudarnost lokalizacije receptora i odgovarajuće neurotransmitterske inervacije (32,33), kao i mogućnost lokalizacije receptora izvan postsinaptičkog završetka (34-37). Ti podatci idu u prilog konceptu volumne transmisije, koji je nastao sedamdesetih godina prošlog stoljeća (38-40) i koji, čini se, najbolje objašnjava način djelovanja modulacijskih neurotransmitera poput serotonina i dopamina (41,42).

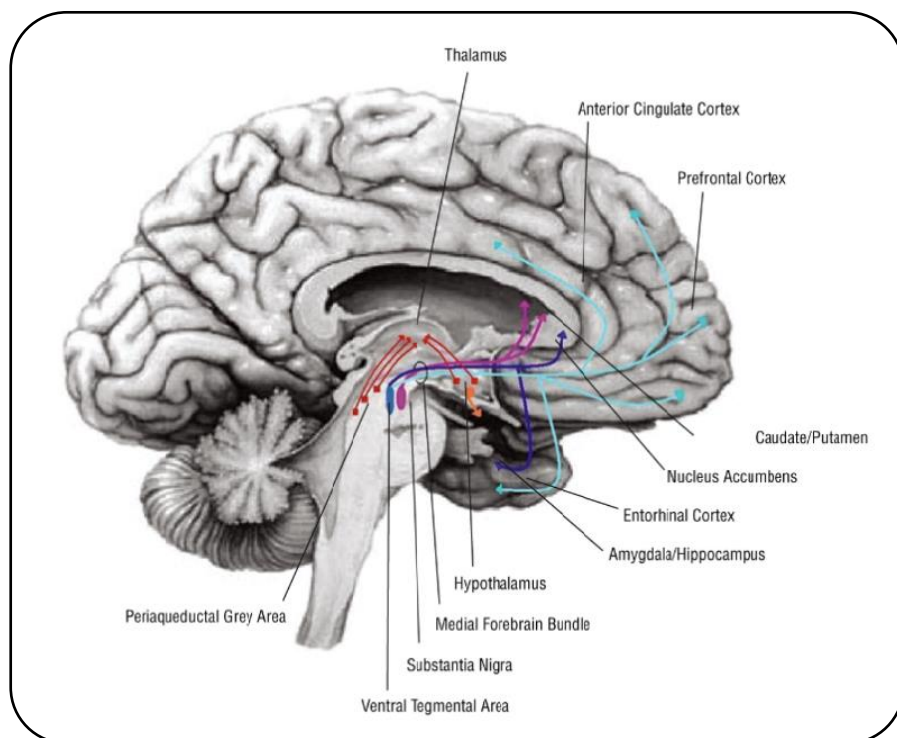


Slika 2. Metabolizam dopamina i enzimi uključeni u razgradnju dopamina.

1.3. Dopaminergičke jezgre i njihove projekcije u mozgu čovjeka

Dopaminergički neuroni su u mozgu čovjeka organizirani u devet jezgara smještenih u moždanom deblu. Najveće skupine dopaminskih neurona nalaze se u crnoj jezgri (*nucleus niger*, još se označava i kao A9) i ventralnom tegmentalnom području (VTA, od engl. „ventral tegmental area“, još se označava i kao A10), te u hipotalamusu (skupine dopaminskih neurona A11-A15). Manje skupine dopaminskih neurona nalaze se još dorzolateralno od crne jezgre (skupina A8), te u njušnoj lukovici (skupina A16). Projekcije dopaminergičkih neurona iz navedenih područja tvore pet velikih zasebnih sustava: nigrostrijatalni (projekcije iz substantia nigra u striatum i bazalne ganglije), mezokortikalni (projekcije iz VTA u

neokorteks), mezolimbički (projekcije iz VTA u limbički sustav i nucleus accumbens), tubero-infundibularni (projekcije iz hipotalamusa u prednji režanj hipofize) i projekcije iz perikaveduktalne sive tvari, ventralnog mezencefalona, hipotalamusa i lateralne parabrahijalne jezgre u talamus (**Slika 3**).



Slika 3. Dopaminergičke jezgre i njihove projekcije u mozgu čovjeka. (Preuzeto iz Dunlop BW, Nemeroff CB. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:327-37.)

1.4. Dopaminski receptori

Prvi dokazi o postojanju dopaminskih receptora u SŽS potječu iz sedamdesetih godina, kada je dokazano da ti receptori stimuliraju adenilat ciklazu (AC) (43,44). Kasnije je na temelju nalaza da djelovanje dopamina može biti i nevezano uz adenilat ciklazu i ciklički adenozin-monofosfat (cAMP, 45) postavljena hipoteza o postojanju različitih dopaminskih receptora. Tako su 1979 Kebabian i Calne receptore koji stimuliraju AC nazvali D1, a one čije je djelovanje neovisno o AC nazvali su D2 (44). Nakon razvoja metode kloniranja gena opisana su još tri dopaminska receptora: DR3 (46), DR4 (47) i D5 (48, 49).

1.4.1. Podjela i skupine dopaminskih receptora

Svi dopaminski receptori imaju visok stupanj sličnosti primarnog slijeda aminokiselina, jednaku transmembransku strukturu od sedam transmembranskih domena i u stanju su aktivirati G-proteine. Dopaminski receptori dakle pripadaju skupini receptora spregnutih s G proteinom (GPCR, engl. *G protein-coupled receptors*) (50-53). Skupina receptora D1 (koja obuhvaća dopaminske receptore DR1 i DR5) aktivira obitelj G-proteina Gas/olf što potiče aktivnost adenilat ciklaze i stvaranje cAMP. Skupina receptora D2 (koja obuhvaća receptore DR2, DR3 i DR4) povezana je sa skupinom G-proteina Gai/o koji inhibiraju adenilat ciklazu. Stoga se podjela dopaminskih receptora u dvije skupine – D1 i D2, temelji ne samo na stupnju homologije njihovih transmembranskih domena, nego i njihovoj funkciji i farmakološkim obilježjima (**Tablica 1**).

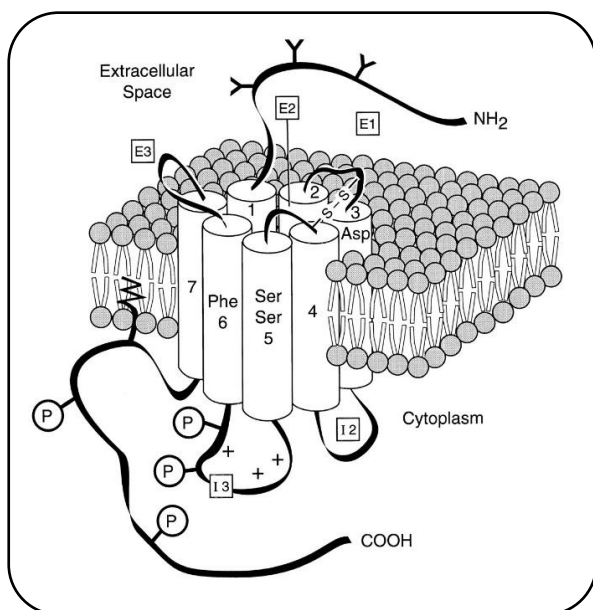
1.4.2. Dopaminski receptori skupine D2

1.4.2.1. Struktura, geni i varijante D2 receptora

Struktura dopaminskog D2 receptora prikazana je na **Slici 5**. DR2 ima 7 transmembranskih domena (TM), tri izvanstanične (E1-3) i dvije unutarstanične petlje (I1-2). Dopamin (i njegovi agonisti) se vežu na hidrofobne transmembranske domene. Moguća mjesta fosforilacije nalaze se na trećoj unutarstaničnoj petlji i C-terminalnom kraju. Četiri moguća mjesta glikozilacije nalaze se na N-terminalnom kraju proteina (54). Gen za DR2 nalazi se na kromosomu 11q22-q23, a ima osam egzona (55, 56) iz kojih različitim izrezivanjem (engl. *alternative splicing*) nastaju dvije inačice receptora – dugi izo-oblik D2L (od engl. *D2-long*) i kratki izo-oblik D2S (od engl. *D2-short*) (57). Gen za DR2 najbliži je DR3 genu zbog 75% homologije dijela koji kodira transmembranske domene (46). Gen za DR2 sadrži šest introna, dok gen za DR3 sadrži pet, a onaj za DR4 tri introna (51). Suprotno tome, kodirajuće regije gena za D1 skupinu receptora ne sadrže introne. Pregled osnovnih genskih, strukturnih i farmakoloških obilježja dopaminskih receptora prikazan je u **Tablici 1**.

Tablica 1. Osnovna genska, strukturna i farmakološka obilježja dopaminskih receptora.

	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5
Genski lokus	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
Broj introna	0	6	5	3	0
Alternativno izrezivanje	ne	da	da	da	ne
Broj aminokiselina	446	414, 443	400	387	477
Molekularna težina	49,300	47,347 50,619	44,225	41,487	52,951
Vezanje za GPCR	G α_s , G α_{olf}	G α_i , G α_o	G α_i , G α_o	G α_i , G α_o	G α_s , G α_q
Agonisti	fenoldopamin	bromokriptin ropinirol	pramipeksol 7-OH-DPAT		
Antagonisti		haloperidol rakloprid spiperon	nafadotrid		

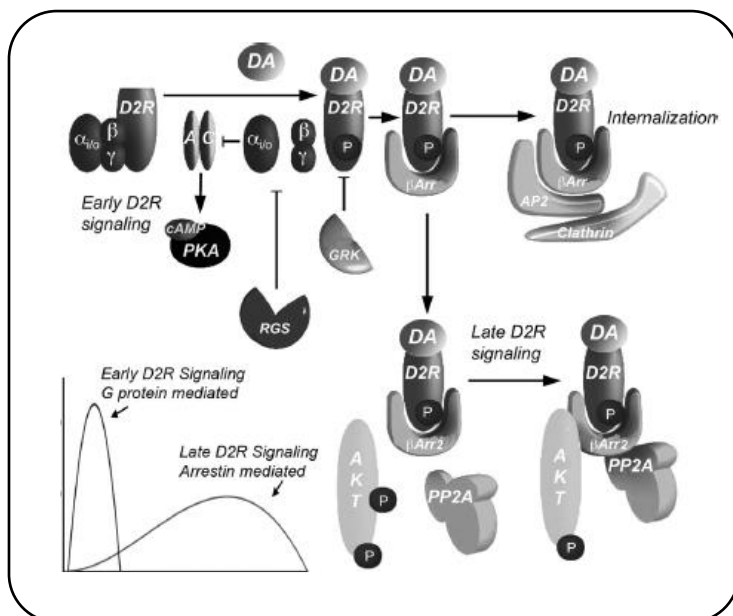


Slika 4. Struktura dopaminskog D2 receptora. DR2 ima 7 transmembranskih domena (TM), tri izvanstanične (E1-3) i dvije unutarstanične petlje (I1-2). Dopamin (i njegovi agonisti) se vežu na hidrofobne transmembranske domene. Moguća mjesta fosforilacije nalaze se na trećoj unutarstaničnoj petlji i C-terminalnom završetku. Četiri moguća mjesta glikozilacije nalaze se na N-terminalnom kraju proteina (54). Preuzeto iz *Missale C, Nash SR, Robinson SW i sur. Dopamine receptors: from structure to function. Physiol Rev 1998; 78:189–225*)

1.4.2.2. Unutarstanična signalizacija putem DR2

Djelovanje receptora spregnutih s G-proteinom (GPCR) posredovano je sa jednim od 16 podtipova G-proteina, koji se funkcionalno mogu podijeliti u četiri skupine: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, i $G_{\alpha 12}$. G-proteini se sastoje od α , β i γ podjedinica. Kada na α -podjedinicu nije vezan dopamin ili agonist, ona je vezana za GDP i $\beta\gamma$ -kompleks, tvoreći inaktivni kompleks. Nakon vezanja dopamina ili agonista za DR2, GDP se otpušta, a GTP se veže za α -podjedinicu i odvaja od $\beta\gamma$ -kompleksa. Nakon toga i α -podjedinica i $\beta\gamma$ -kompleks mogu dalje sudjelovati u prenosu signala te tako aktivirati relativno mali broj nizvodnih efektorskih sustava. Nakon hidrolize GTP, za GDP vezana α -podjedinica ponovno se udružuje s $\beta\gamma$ -kompleksom tvoreći inaktivni G-proteinski kompleks (58).

Osjetljivost GPCR ovisi o intenzitetu signala. Nakon intenzivnog izlaganja agonistu, dolazi do desenzitizacije i obrnuto; nakon što se za receptor određeno vrijeme nije vezao ligand, dolazi do ponovne senzitivacije receptora. Nakon aktivacije receptora agonistom, GPCRK (engl. G protein-coupled receptor kinase) fosforilira receptor na specifičnim mjestima unutarstaničnih petlji i C-krajeva. Na fosforilirane receptore vežu se arestini i tako sprječavaju daljnju aktivaciju G proteina unatoč trajnoj aktivaciji receptora agonistom (59-62). Nadalje, arestin potiče internalizaciju receptora iz stanične membrane vezanjem na klatrin i na s klatrinom povezani adaptorski protein β -adaptin (63). Time se pokreće endocitoza receptora posredovana klatrinom i recikliranje receptora na površinu stanice, ili njihova degradacija endosomsko-lizosomskim sustavom (64-67). Istraživanjem na prefrontalnom korteksu primata potvrđena je ovisnost internalizacije DR2 o klatrinu (68). Dodatni mehanizam desenzitizacije DR2 obuhvaća regulaciju neovisnu o njegovoj aktivaciji. Taj se proces naziva heterologna desenzitizacija, pri čemu u istoj stanici aktivacija jedne vrste GPCR dovodi do desenzitizacije druge vrste GPCR. Heterologna desenzitizacija se odvija u neuronima koji su istovremeno izloženi većem broju neurotransmitera ili hormona. Za receptore vezane za $G_{\alpha s}$ /olf tu regulaciju mogu izvršavati različite kinaze (PKA, PKC, MAPK) (69). Za DR2 je dokazano da PKC može posredovati fosforilaciju, desenzitizaciju i internalizaciju receptora (70). Nadalje, pokazalo se da su D2S i D2L različito osjetljivi na desenzitizaciju putem PKC ovisno o mjestu fosforilacije (72, 73). Shema unutarstanične signalizacija putem dopaminskog D2 receptora prikazana je na **Slici 5**.



Slika 5. Unutarstanična signalizacija putem dopaminskog D2 receptora.

1.4.2.3. Untarstanična lokalizacija D2 receptora

Eksperimenti na HEK stanicama sa stabilnom ekspresijom DR2 pokazali su imunocitokemijom i metodom BPA (engl. *biotin protection degradation assay*) pretežito membransku lokalizaciju tih receptora (73). Nakon izlaganja dopaminu ili dopaminskom agonistu dolazi do internalizacije DR2. Istovremenim izlaganjem stanica dopaminskom antagonistu internalizacija je spriječena, ali se već internalizirani receptori ne vraćaju na staničnu membranu, nego se transportiraju u lizosome gdje dolazi do njihove degradacije (73). Daljnja istraživanja na transficiranim HEK stanicama i mišjem modelu pokazala su da internalizaciju i degradaciju DR2 regulira molekula NCAM (engl. neural cell adhesion molecule) (74). Nadalje, u staničnim kulturama neuroblastoma SY5Y, pokazano je da smanjenje aktivnosti disbindina sprječava internalizaciju DR2 potaknutu dopaminskim agonistima i dovodi do pojačane ekspresije DR2 na staničnoj površini (75).

Pokusi na staničnim kulturama ukazuju da se endocitoza, tj. internalizacija DR2 odvija konstitutivno – i bez prisutnosti dopamina ili njegovih agonista. Internalizacija DR2 je brzi proces, pri čemu $t_{1/2}$ iznosi nekoliko minuta. Oko 25% DR2 koji se nalaze na staničnoj površini internalizira se bez prisutnosti agonista, dok se dodavanjem dopamina u stanični medij internalizacija povećava 2-3 puta. Daljnja istraživanja su pokazala da se veliki dio internaliziranih DR2 vraća na staničnu membranu te da se DR2 značajno brže reciklira ($t_{1/2} \leq 30$ min) nego li biva razgrađen ($t_{1/2} > 7$ h) (76).

1.4.2.4. Dosadašnje spoznaje o staničnoj i slojevnoj raspodjeli DR2

Kahn i suradnici (77) proizveli su protutijela na dopaminske receptore skupine D2 te pokazali da se DR2 i DR3 nalaze pretežito na interneuronima, a DR4 na piramidnim neuronima i interneuronima u korteksu štakora. U mozgu štakora najjači izražaj DR4 nađen je u korteksu, hipokampusu, kaudatusu / putamenu i donjim kolikulima, dok su DR3 i DR2 pretežno izraženi u subkortikalnim područjima. Izraženost DR4 u korteksu pokazuje bilaminarni obrazac, pri čemu je posebna imunoreaktivnost vidljiva u slojevima II-III i nešto slabije u slojevima IV-V. Imunoreaktivnost pokazuju piramidni i nepiramidni neuroni, ali i neuropil. Za razliku od toga, imunoreaktivnost na DR3 i DR2 svodila se uglavnom na neuropil, te samo poneke neurone sloja IV-V. Na staničnoj su razini receptori bili raspoređeni na somi i proksimalnim dijelovima dendrita. U navedenom istraživanju (77) djelomično je istražen i izražaj dopaminskih D2 receptora u korteksu čovjeka. Pokazalo se da su DR2, DR3 i DR4 izraženi u motoričkom (area 4), vidnom (area 17) i slabije u prefrontalnom (area 46) korteksu čovjeka. U navedenim područjima DR2-, DR3- i DR4-pozitivni neuroni bili su lokalizirani u svim slojevima, a najviše u sloju IV-V. I ovdje su se protutijela vezala na somu neurona i početne dijelove dendrita. DR4 je izražen na piramidnim i nepiramidnim, dok je DR3 izražen na interneuronima. Istraživanje pomoću *in situ* hibridizacije u prefrontalnom korteksu čovjeka pokazalo je najveću izraženost mRNA za dopaminske receptore DR1 i DR4, dok je mRNA za DR2 i DR5 bila značajno slabije, a za DR3 izrazito rijetko izražena (78). Lokalizacija mRNA receptora DR1 i DR4 i ovdje je pokazala bilaminaran obrazac i nalazila se u II-III i nešto intenzivnije u V-VI kortikalnim slojevima prefrontalne regije BA9. U značajno manjoj količini mRNA za DR2 se hibridizirala prema istom obrascu.

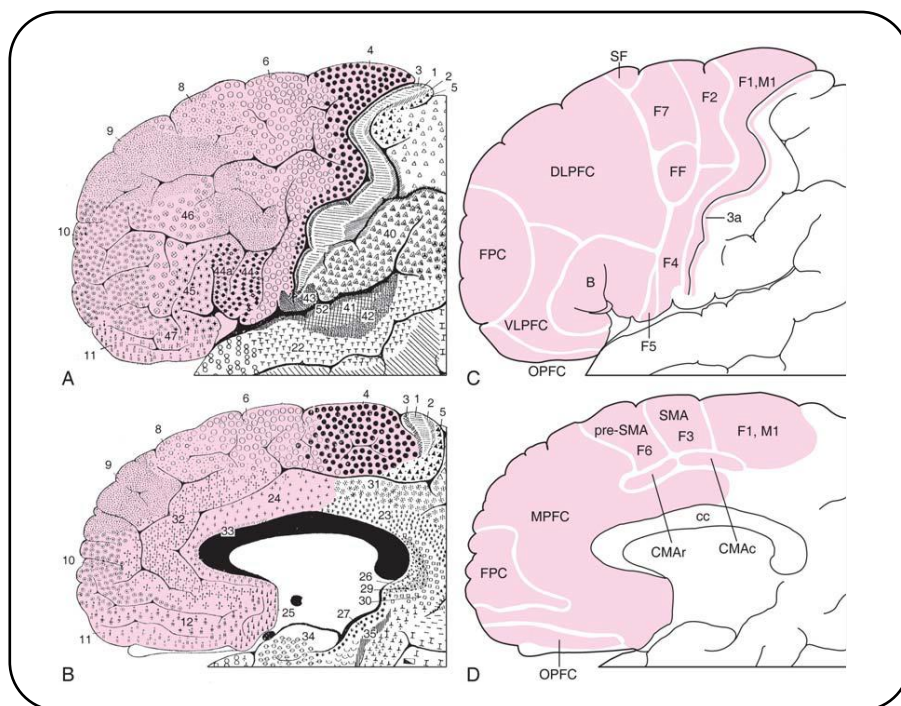
1.4.2.5. Značenje sinaptičke i presinaptičke lokalizacije DR2

Duga i kratka varijanta DR2 imaju različitu sinaptičku lokalizaciju. D2L se nalaze pretežno postsinaptički, a D2S presinaptički kao autoreceptori (79, 80). Presinaptička lokalizacija osigurava mehanizam povratne sprege ovisno o koncentraciji neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini. Time se ugađa brzina izbijanja neurona (engl. *neuronal firing rate*), sinteza i otpuštanje neurotransmitora (52, 81, 82). Treba reći da se autoreceptori aktiviraju već pri nižim koncentracijama dopamina (ili njegovih agonista). To znači da isti dopaminski agonist može ovisno o koncentraciji imati bifazični učinak – pri nižoj koncentraciji suprimirati, a pri višoj koncentraciji stimulirati određenu funkciju. Nadalje, farmakološka i genetska istraživanja ukazuju i da DR3 mogu djelovati kao autoreceptori i uz D2S sudjelovati u regulaciji toničkog otpuštanja dopamina (83-85).

1.5. Prefrontalna moždana kora

1.5.1. Morfologija i citoarhitektonika prefrontalne moždane kore čovjeka

Prefrontala moždana kora (PFC) dio je moždane kore čeonog režnja koja predstavlja otprilike trećinu površine moždane hemisfere. Na lateralnoj (konveksnoj) površini mozga, korteks frontalnog režnja se proteže rostralno od frontalnog pola do *sulcus centralis*. Ventralno (bazalna površina mozga) i lateralno, frontalni režanj je omeđen od temporalnog sa *sulcus lateralis*. Na medijalnoj površini hemisfere, frontalni režanj je odvojen od limbičkog režnja sa *sulcus cinguli*, a od parijetalnog režnja zamišljenom linijom koja okomito spaja dorzalni vrh *sulcus centralisa* i *sulcus cinguli*.



Slika 6. Shematski prikaz frontalnog režnja mozga čovjeka. A i C pogled s lateralne strane, B i D pogled s medijalne strane. Čeonni režanj je označen crvenom bojom. Brojevi označavaju odgovarajuća Brodmannova polja. B-Brocino područje, CC-corpus callosum, CMAr/c – rostralno/kaudalno cingularno motorno područje, DLFC dorzolateralni prefrontalni korteks, F1-F7 podregije motornog korteksa, FF frontal eye field, FPC frontopolarni korteks, M1 primarni motorički korteks, MPFC medijalni prefrontalni korteks, OPFC orbitalni prefrontalni korteks, pre-SMA pre-supplementary motor cortex, SF supplementary eye field, SMA supplementary motor area, VLPFC ventrolateralni prefrontalni korteks. (Preuzeto iz Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. *Structure of Spinal Cord and Brain Parts, U: The Human Central Nervous System*, 4. izd. Berlin: Springer, 2008.)

Citoarhitektonska podjela frontalne moždane kore prema Brodmannu prikazana je na Slici 6. Navedenih 14 Brodmannovih polja (Brodmannove areje, BA) u frontalnom korteksu mogu se podijeliti na agranularna (BA 4, 6, 24, 25 i 32), disgranularna (BA 8, 44, 45) i granularna (BA 9, 10, 11, 12, 46, 47). Prema von Economovoj podjeli citoarhitektonskih polja (86), BA 4, 6, 24 i 25 su heterotipna polja i pripadaju tipu 1 moždane kore, dok su ostala polja čeonog režnja homotipna. Brodmannova area 46 i djelomično BA10 pripadaju tipu 3, orbitofrontalna polja BA 11, 12 i 47 pripadaju tipu 4, dok ostala polja pripadaju tipu 2.

Prema funkciji, frontalni korteks se dijeli na asocijacijski prefrontalni korteks koji se proteže ispred motoričkih područja i centralnog sulkusa i precentralnog motoričkog korteksa (područja F1-F7 ispred sulcusa centralisa, Slika 6).

Brojna citoarhitektonska polja PFC su snažno međusobno povezana (87,88). Važan eferentni put iz PFC čine kratka asocijacijska vlakna koja preko premotoričkog korteksa dolaze u primarni motorički korteks (89, 90).

Različita asocijacijska polja PFC primaju kolinergičke i GABAergičke projekcije iz nucleus basalis Meynerti; histaminergičke i oreksinergičke projekcije iz hipotalamusa; serotonergičke projekcije iz nuclei raphe; noradrenergičke projekcije iz locus coeruleus; kao i već spomenute dopaminergičke projekcije iz ventralne tegmentalne areje. Nadalje, PFC je recipročno povezan s mnogim područjima limbičkog režnja, amigdalom i hipotalamusom.

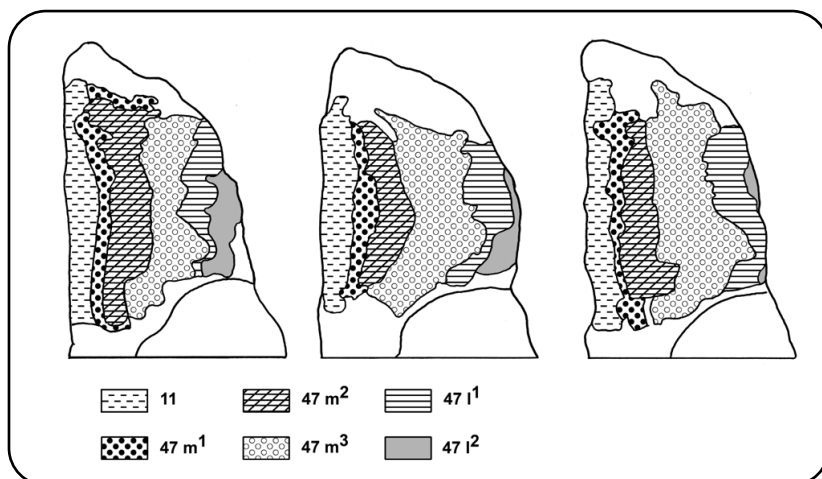
Prefrontalni korteks se može podijeliti na tri velike regije: lateralni, medijalni i orbitalni PFC. Laterani prefrontalni korteks (obuhvaća Brodmannove areje 8, 9, 46, 10 i 47) sudjeluje u brojnim višim spoznajnim funkcijama mozga poput integracije osjetnih informacija s motoričkim aktivnostima, selektivnoj pažnji, radnom pamćenju, planiranju i donošenju odluka.

Mnogobrojne prefrontalne areje su međusobno snažno i recipročno povezane. LPFC predstavlja najviši stupanj senzorimotorne integracije. On prima informacije različitih osjetnih modaliteta iz unimodalnih i polimodalnih osjetnih asocijacijskih polja. LPFC je organiziran u dvije domene – dorzalnu kognitivnu domenu za prostorne informacije i ventralnu kognitivnu domenu za objekte i obrasce. Tako pretežno vidne i slušne projekcije uključene u obradu prostornih informacija pritječu u dorzalni LPFC, dok vidne i slušne projekcije uključene u raspoznavanje obrazaca pritječu uglavnom u ventralni dio LPFC. Svi navedeni putovi imaju i recipročne projekcije. Time se osigurava mehanizam povratne sprege, što vjerojatno predstavlja morfološki supstrat pažnje koji omogućava usmjereno i voljno procesiranje dostupnih informacija u svrhu ostvarenja planiranog cilja ili radnje. Organizacija mentalnih procesa, poput planiranja redoslijeda složenog ponašanja (engl. *complex goal-directed*

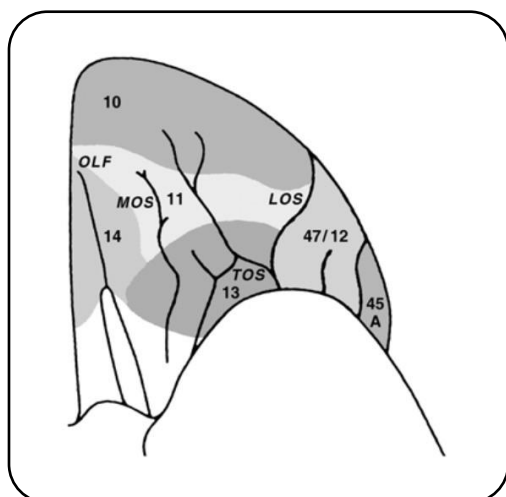
behavior), ovisi i o sposobnosti da se određena količina informacija privremeno zadrži i bude na raspolaganju tijekom razmišljanja ili k cilju usmjerenog ponašanja. Taj proces se naziva radno pamćenje (engl. *working memory*). LPFC ima dakle ključnu ulogu u radnom pamćenju. Osim što prima projekcije iz različitih osjetnih asocijacijskih polja, LPFC prima aferentna vlakna iz limbičkog režnja i različitih jezgara talamusa. Poznato je da se cingularni korteks, kao dio limbičkog režnja, aktivira podražajima koji imaju emocionalnu vrijednost (npr. sreća, tuga, ljutnja ili strah) i da je funkcija cinguloprefrontalnih projekcija da osjetnoj informaciji (npr. vidnoj) pridoda emocionalnu vrijednost. Nadalje, s obzirom na intenzivnu povezanost hipokampusa i susjednih medijalnih struktura sljepoočnog režnja s drugim strukturama limbičkog režnja, vrlo je vjerojatno da su limbičko-prefrontalni putevi uključeni u procese nastanka dugotrajnog pamćenja (long-term memory), kao i korištenja (prizivanja, ekforiranja) informacija pohranjenih u dugoročnom pamćenju.. Nadalje, LPFC je recipročno povezan s mediodorzalnim talamusom, što je bitno za kortiko-kortikalnu komunikaciju. Projekcije iz talamičkih jezgara VA (ventral anterior) i VL_a (anterior ventral lateral) u LPFC predstavljaju dio asocijacijske ili kognitivne petlje i čine dio direktnog strijatalnog kruga. Istraživanja su pokazala da je strijatum uključen u proceduralno učenje i pamćenje (91). PFC i kontralateralni korteks malog mozga su povezani složenim kortikocerebelarnim krugom, koji predstavlja morfološki supstrat kojim mali mozak sudjeluje u kognitivnim funkcijama, posebno provođenju rutinskih kognitivnih zadataka (92).

Kaudalna premotorička polja LPFC (kao i primarni motorički korteks) šalju direktne projekcije u leđnu moždinu te su uključena u provođenje pokreta. Rostralna premotorička polja sudjeluju u kognitivnim aspektima kontrole pokreta, poput određivanja slijeda pokreta i motoričkog učenja.

Orbitalni prefrontalni korteks (OPFC) se prema Brodmannu može podijeliti na areju 11 i 47. Uylings i suradnici (93) su OPFC na temelju iscrpne citoarhitektonske analize (Brodmannovo polje 47) dodatno podijelili na tri medijalna i dva lateralna polja (**Slika 7**). Podjela prema Petridesu i Pandyji (88,94), koja se najčešće koristi, shematski je prikazana na **Slici 8**. Prema toj podjeli OPFC ima četiri polja: BWA 11, 13, 14 i 47/12.



Slika 7. Individualne arealne razlike orbitofrontanog korteksa triju mozgova čovjeka, prema Uylingsu i suradnicima. (Preuzeto iz: Uylings HBM, Sanz-Arigita EJ, de Vos K i sur. 3-D cytoarchitectonic parcellation of human orbitofrontal cortex. Correlation with postmortem MRI. *Psychiatry Res* 2010;183:1-20.)



Slika 8. Arealna podjela orbitofrontanog korteksa mozga čovjeka prema Petridesu i Pandyji. (Preuzeto iz Petrides M, Pandya DN. Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *Eur J Neurosci* 2002;16:291–310.)

Medijalni prefrontalni korteks (MPFC) uključuje BA 9 i 10, BWA 14 te limbičko polje BA 24, prelimbičko polje 32 i infralimbičko polje 25. S obzirom da su OPFC i MPFC anatomske i funkcionalno usko povezani, često se spominju kao cjelina: orbito-medijalni prefrontalni korteks (OMPFC).

OPFC prima osjetna aferentna vlakna iz njušnih, okusnih, vidnih, osjetnih i autonomnih područja odgovarajućih primarnih i asocijacijskih kortikalnih regija, kao i talamičkih jezgara. Rezultati istraživanja dobiveni slikovnim prikazom aktivnosti mozga su pokazala da je orbitalni korteks uključen u analizu i integraciju osjetnih informacija, kao i kontrolu ponašanja povezanih s navedenim podražajima (npr. s unosom hrane ili tekućine). Treba reći da analiza osjetnih informacija u OPFC obuhvaća i integraciju emocionalnog značenja osjetnih podražaja (95).

OMPFC šalje gusta projekcijska vlakna u hipotalamus i mezencefaličnu periakveduktalnu areju (PAG), kao i u mnoge jezgre moždanog debla uključujući VTA, rafe jezgre, locus coeruleus, pedunkulopontine i parabrahijalne jezgre. Vjeruje se da putem navedenih projekcija OMPFC sudjeluje u sprezi ponašanja i nesvjesne „reakcije“ (odgovora) autonomnog živčanog sustava koji „prati“ navedeno ponašanje. Stoga se projekcije OMPFC u hipotalamus i PAG ponekad nazivaju i limbički ili emocionalni motorni sustav. OMPFC je povezan aferentnim i eferentnim vlaknima i s ostalim područjima limbičkog režnja – amigdalom, hipokampusom, entorinalnim i peririnalnim korteksom.

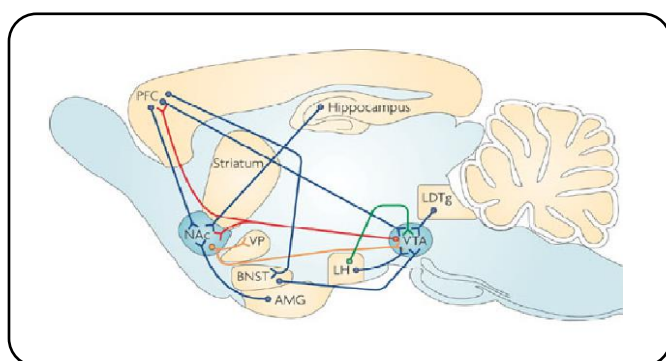
Dopaminergički neuroni iz VTA i *substantia nigra* se projiciraju u OMPFC i ventralni strijatum. Ventralni strijatum se projicira natrag u VTA. Brojna neurofiziološka istraživanja, kao i rezultati istraživanja dobiveni slikovnim prikazom mozga ukazuju da su limbički sustav i s njim usko povezani OPFC uključeni u očekivanje i evaluaciju nagrađujućih ili ugodnih podražaja, kao i u ponašanju usmjerenom prema postizanju istih (engl. reward-oriented behavior). Poremećaj regulacije neuronskih mreža koje uključuju OPFC, ventralni strijatum i dopaminergičke jezgre povezan je s bolestima poput depresije, ovisnosti i shizofrenije. Lezije orbitofrontalnog korteksa dovode do promjene osobina ličnosti poput prevelike impulzivnosti, dezinhibiranog ponašanja, nepoštivanja moralnih i socijalnih načela, ali i poteškoća u razumijevanju određenih situacija i donošenju odluka. Oštećenja medijalnog prefrontalnog korteksa nerijetko dovode do apatije, smanjenja motivacije i interesa za svakodnevne aktivnosti, kao i afektivne aplanacije i u najtežim slučajevima do potpunog akinetičkog mutizma.

1.5.2. Morfologija i citoarhitektonika prefrontalne moždane kore miša

Frontalna moždana kora miša se razlikuje od frontalne moždane kore primata i čovjeka po anatomskom položaju, morfologiji, citoarhitektonici i kompleksnosti neuronskih veza. Frontalnu moždanu koru miša, kao i čovjeka i primata, određuju recipročni obrasci veza sa dorzomedijalnom talamičkom jezgrom, intralaminarnim talamičkim jezgrama, neokorteksom,

bazalnim ganglijima, hipotalamusom i moždanim deblom s jedne strane, te histokemijska obilježja s druge strane. Shematki prikaz veza PFC miša i dopaminergičkog sustava prikazan je na **Slici 9**, a podjela PFC miša u areje prikazana je na Slici 10 (Van de Werd et al. 2010). Prefrontalnim korteksom miša (kao i u štakora) se smatra agranularni dio frontalnog korteksa.

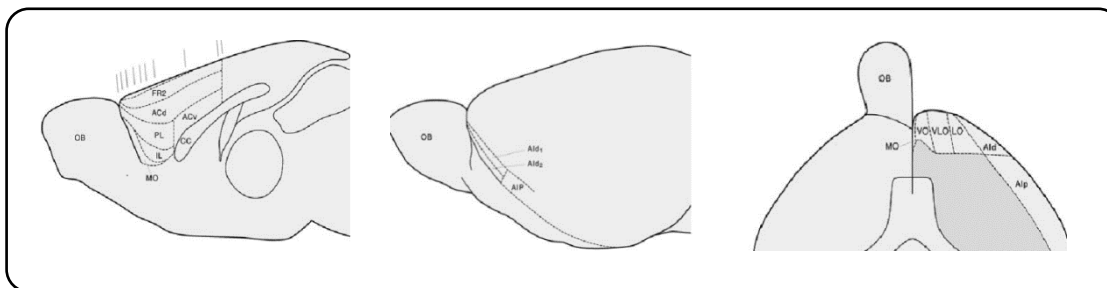
Iako filogenetski udaljen 80 milijuna godina (96), mnoga neuroanatomska, histokemijska, citoarhitektonska i funkcionalna obilježja PFC čovjeka nalazimo i u korteksu miša (97, 98). To omogućava smislenu komparativnu analizu između vrsta, relevantnu za proučavanje i razumijevanje neurobioloških i neurokognitivnih mehanizama, a koji su podloga izvršnih funkcija dopaminskog sustava.



Slika 9. Shematski prikaz glavnih dopaminergičkih, glutamatergičkih i GABAergičkih projekcija iz ventralne tegmentalne areje (VTA) i NAc (nucleus accumbens) u PFC glodavaca.

(Preuzeto iz: Russo SJ, Nestler EJ: *The brain reward circuitry in mood disorders*. *Nature Reviews Neuroscience* 2014;14:609–25.)

Prema citoarhitektonskim i histokemijskim obilježjima (i DA inervaciji), PFC miša obuhvaća agranularnu cingularnu dorzalnu i ventralnu areju (ACd i ACv), frontalnu regiju 2 (FR2), lateralnu orbitalnu areju (LO), agranularnu dorzalnu insularnu areju AId), većinu ventrolateralne orbitalne areje (VLO), i prelimbičku areju (PL, Slika 10, Van de Verd i sur. 2010). Medijalni dio PFC miša (koji uključuje anteriorni cingularni, prelimbički i infralimbički cortex) dijeli jake anatomske sličnosti sa dorzalnim PFC primata (uključujući i BA46). Kao dlPFC primata, mPFC glodavaca prima aferentne projekcije iz mdTN i medijalnog dijela talamusa kao i od limbičkih struktura (peririnalnog i entorinalnog korteksa, hipokampusa, amigdale i bazalnih ganglija), a šalje eferentna vlakna prema *n. caudatus*, *putamenu* i *nucleus accumbens*. Te regije isto primaju komparabilnu monoaminergičku inervaciju iz *locus coeruleus*, *ventralne tegmentalne areje*, i *raphe jezgara* (97).



Slika 10. Shematski prikaz prefrontalnog korteksa miša. Pogled s medijalne, lateralne i orbitalne strane. ACD-dorzalna agranularna cingularna areja, ACv-ventralna agranularna cingularna areja, Aid-dorsalna agranularna insularna areja, AIP-posteriorna agranularna insularna areja, cc-corpus callosum, FR2-frontalna areja 2, IL-infralimbička areja, LO-lateralna orbitalna areja, MO-medialna orbitalna areja, OB-bulbus olfactorius, VO-ventralna orbitalna areja. (Preuzeto iz: Van De Werd HJJM, Rajkowska G, Evers P, Uylings HBM. *Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. Brain Struct Funct* 2010;214:339–53.)

1.6. Kliničko značenje dopaminskog sustava u funkciji prefrontalnog korteksa

1.6.1. Učenje i pamćenje

Učinak dopamina na radno pamćenje je temeljito istražen. Iz pokusa na štakorima i rezus majmunima poznato je da preniska, ali i previsoka koncentracija dopamina u PFC negativno utječu na radnu memoriju (99, 100). Na radnu memoriju dopamin pretežito utječe aktivacijom DR1. Poznati učinci dopaminergičkih agonista na kogniciju čovjeka u skladu su s rezultatima istraživanja u životinja. Prema Yerkes-Dodsonovom modelu, razina dopaminske aktivacije prefrontalnog korteksa koja utječe na kognitivnu učinkovitost ima oblik zvonolike krivulje. To znači da je kognitivna učinkovitost slabija kod niskog i visokog stupnja aktivacije DR1, a optimalna kod srednjih vrijednosti (101).

Razina dopamina u PFC određena je ponajprije aktivnošću COMT, zbog relativno slabe ekspresije dopaminskog transportera u toj regiji mozga. Stoga polimorfizmi *COMT* gena imaju posebnu važnost za razinu dopamina i njegovu funkciju u PFC (102). Polimorfizam u kojem je valin zamijenjen metioninom u *COMT* genu dovodi do smanjene aktivnosti tog enzima i posljedično više koncentracije dopamina u PFC. Pojedinci s val/val genotipom profitiraju od stimulacije dopaminskog sustava (npr. amfetaminom) u smislu poboljšanja koncentracije i radnog pamćenja, dok kod pojedinaca s met/met genotipom dolazi do pogoršavanja kognitivnih sposobnosti zbog pretjerane aktivacije dopaminskog sustava (103).

Tim se mehanizmom može i djelomično objasniti klinički nalaz da neki oboljeli od ADHD bolje, a neki lošije odgovaraju na liječenje metamfetaminom ili amfetaminom.

1.6.2. Poremećaj pažnje i hiperaktivni poremećaj

Deficit pažnje i hiperaktivni poremećaj ili ADHD je jedan od najčešćih psihičkih poremećaja u dječjoj i adolescentnoj dobi, a obilježavaju ga poremećaji pažnje i koncentracije, hiperaktivnost i impulzivnost. Neurobiološka podloga ovog poremećaja nije u potpunosti razjašnjena. Istraživanja pomoću jednofotonske emisijske komjutorizirane tomografije (SPECT) pokazala su povećanu koncentraciju dopaminskog transportera u strijatumu i posljedično smanjenu koncentraciju dopamina u sinaptičkoj pukotini (104). I novija teorija o etiopatogenezi ADHD kao poremećaju energetskog metabolizma uključuje dopaminski sustav (105). Prema toj teoriji početni poremećaji pažnje kompenzira se pojačanim oslobađanjem dopamina u PFC, što posljedično dovodi do regionalnog suviška dopamina i time do hiperaktivnosti i impulzivnosti. Metilfenidat, kao blokator dopaminskog transportera, povišuje koncentraciju dopamina (i u značajno manjoj mjeri noradrenalina i serotoninu) u sinapsi. Istraživanja su pokazala da se metilfenidatom može poboljšati izvođenje zadataka prostornog radnog pamćenja kod zdravih ljudi, pri čemu se smanjuje protok krvi u frontoparijetalnim krugovima. Učinak metilfenidata ovisan je o polaznoj razini radnog pamćenja, a najviše koristi su imali probandi s niskom razinom radnog pamćenja (106).

1.6.3. Shizofrenija i psihotični poremećaji

Činjenica da praktički svi učinkoviti antipsihotici blokiraju DR2 ukazuje na ključnu ulogu dopaminskog sustava i dopaminskih receptora u patofiziologiji psihotičnih poremećaja, uključujući shizofreniju (107-109). Već su istraživanja 70-ih godina pokazala da klinička učinkovitost klasičnih antipsihotika odgovara jačini inhibicije adenilat ciklaze, tj. afinitetu lijeka za DR2 (110). Povećana razina mRNA za DR2 je pronađena u postmortalnim uzorcima PFC oboljelih od shizofrenije (111). Istraživanja provedena na bolesnicima koji su bili akutno psihotični pokazala su da je aktivnost, tj. presinaptička sinteza dopamina u strijatumu povećana (112-114). Što se tiče dopaminskih D2 receptora istraživanja pomoću SPECT pokazala su povećanu zauzetost DR2 kod bolesnika sa shizofrenijom (115). Meta-analize su pokazale povećanje gustoće DR2 u strijatumu, ali ne i ostalim područjima mozga bolesnika sa shizofrenijom (116,117).

1.6.4. Bolesti ovisnosti

Uloga dopamina u razvoju bolesti ovisnosti otkrivena je 70-ih godina kada se pokazalo da se štakori opetovano samostalno stimuliraju (operantno kondicioniranje) električnim impulsima u područja mozga u kojima se nalaze dopaminergičke jezgre ili koje su dio dopaminskog sustava (118,119) te da razna sredstva ovisnosti izazivaju porast koncentracije dopamina u sinapsama n. accumbens, koji se nalazi u ventralnom strijatumu (120). Kasnija istraživanja pomoću SPECT i posebice pozitronske emisijske tomografije (PET), kojom se može prikazati vezanje radioaktivnog liganda na D2/3 receptore, pokazala su da jačina otpuštanja dopamina u ventralnom strijatumu odgovara jačini osjećaja ugone izazvanog sredstvom ovisnosti. (121-123). Nadalje, utjecaj sredstava ovisnosti, tj. razvoj ovisnosti ne ovisi samo o količini, nego i brzini porasta dopamina u strijatumu. Nasuprot tome, čini se da je kronično korištenje sredstava ovisnosti povezano sa smanjenjem aktivnosti dopaminskog sustava – smanjenim izražajem DR2 i smanjenim otpuštanjem dopamina u strijatumu. Smanjenje izražaja DR2 u strijatumu dovodi do smanjenja aktivnosti orbitofrontalnog korteksa i girusa cinguli (7).

1.7. Svrha rada

Pokazalo se da, od svih dijelova središnjeg živčanog sustava primata, čeonu režanj prima najopsežniju dopaminergičku inervaciju, kao i da postoje značajne razlike u slojevnoj raspodjeli dopaminergičnih aksona (28-33). Zato je i ovaj rad usmjeren na proučavanje tog dijela središnjeg živčanog sustava u čovjeka, ali i miša, kao najčešćeg animalnog modela u istraživanjima *in vivo* i *in vitro* na primarnim staničnim kulturama porijeklom iz čeonu moždane kore miša.

Najrelevantnije dosadašnje spoznaje o dopaminergičkoj inervaciji i funkcijama dopamina u PFC potječu od istraživanja u primata, kao filogenetski najbližih „modela“ mozga čovjeka (30-33). Na ciljane stanice dopamin djeluje putem metabotropnih receptora koji su spregnuti s G-proteinima. Do sada se u većini istraživanja lokalizacije dopaminskih receptora u mozgu čovjeka koristio izražaj receptorske mRNA (124,125) ili pak vezanje radioliganda (126-130). Primarno područje interesa tih istraživanja bilo je proučavanje izražaja DR u bazalnim ganglijima, a ostala ciljna područja dopaminskih projekcija ostala su slabo istražena (131-133). Temeljitim pregledom dosadašnjih spoznaja i dostupne literature, razvidno je da unatoč tijesnoj povezanosti s ishodišnim dopaminskim skupinama neurona, anatomski, histološki i stanični raspored svih DR u PFC čovjeka do sada nije sustavno istražen, a osobito nedostaju

podatci o smještaju samog proteina D2 receptora pomoću immunohistokemijske vizualizacije. Prethodno je opisano da DR2 ima dvije inačice – dugu D2L i kratku D2S. Izražaj mRNA tih receptora i njihov međusobni odnos u prefrontalnom korteksu čovjeka ostali su nerazjašnjeni, a istraživanja mRNA dugog i kratkog izo-oblika dopaminskog DR2 receptora ukazuju na moguće razlike u njihovom anatomskom rasporedu (134,135), funkciji (136) i farmakološkim obilježjima (137). U tim istraživanjima su korištena protutijela za dopamin i tirozin-hidroksilazu u imunohistokemijskim metodama (28-31), a za dopaminske receptore autoradiografsko obilježavanje (127-130). Zbog niske rezolucije prikaza, scintigrafsko istraživanje Lidowa i suradnika (130) vezanjem specifičnog radioliganda za D2 receptore pokazalo je reaktivnost samo u V. sloju moždane kore čeonog režnja primata. Prema dosadašnjim istraživanjima, monoaminska inervacija se u potpunosti ne podudara s lokalizacijom receptora (35,37). U jednom od rijetkih istraživanja u kojem su korištena protutijela na dopaminske receptore (134), prikazana je izraženost dopaminskih receptora skupine D2 u PFC čovjeka (BA46), ali nije pridavana pozornost izražaju DR2 u glija stanicama. Ista je skupina autora 1998. godine proizvela protutijela za dugu i kratku inačicu DR2 prikazavši izražaj tih receptora u strijatumu i korteksu (BA6) rezus majmuna (135). Navedena protutijela od tada nisu korištena u radovima te ili neke druge skupine autora na uzorcima PFC ljudskog mozga, a nisu ni komercijalno dostupna. Također je potrebno spomenuti opisanu nepodudarnost lokalizacije receptora i odgovarajuće transmitsorske inervacije (40,42), kao i mogućnost lokalizacije receptora izvan postsinaptičkog kompleksa (39-42).

S obzirom da o tome nema dovoljno podataka, a dosadašnje spoznaje uglavnom potječu od istraživanja mozгова primata protutijelima na dopamin i tirozin-hidroksilazu te autoradiografskim obilježavanjem dopaminskih receptora, svrha ovog doktorskog rada je bila odrediti slojevenu i staničnu raspodjelu dopaminskih receptora D2 u dorzolateralnoj, orbitomedijalnoj i medijalnoj prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka. Također, jedan od glavnih ciljeva rada je bio i razjasniti mogući izražaj DR2 u glija stanicama, s obzirom da su dosadašnji nalazi o tome bili oprečni.

Više je razloga zbog kojih smatramo da je točno određivanje ciljnih stanica dopaminskih projekcija, odnosno dopaminskih receptora, značajan doprinos istraživanju toga sustava. Ponajprije, točnim određivanjem ciljnih stanica dopaminskih projekcija korištenjem monoklonskih protutijela na dopaminske receptore postiže se puno bolja razlučivost u odnosu na scintigrafiju. Iako su pojedina protutijela na dopaminske receptore postala dostupna već posljednjih 20-ak godina, još uvijek ne postoji sustavni prikaz raspodjele podtipova

dopaminskih receptora, posebice skupine D2 u prefrontalnoj kori mozga čovjeka (čemu dodatnu težinu daje činjenica da se većina suvremenih neuroleptika temelji na blokiranju D2R).

Treba imati na umu da dopamin u korteksu djeluje kao modulacijski neurotransmitor, te da mnogi dopaminergični aksoni stvaraju varikozitete koji po svojoj morfologiji nemaju obilježja sinaptičkih završetaka. Stoga je daljnji cilj bio odrediti izražaj mRNA dugog i kratkog izo-oblika DR2 u dorzolateralnoj i orbitomedijalnoj prefrontalnoj kori čovjeka. Još jedan od specifičnih ciljeva je bio istražiti izražaj navedenih izo-oblika DR2 u ostalim dijelovima mozga (strijatumu, talamusu, hipokampusu i moždanom deblu) u mišjem mozgu kao najeksplozivnijem *in vivo* animalnom modelu u istraživanima dopaminergičkog sustava.

Naposljetku, ovim je radom pokušano razjasniti unutarstaničnu lokalizaciju i unutarstanično kretanje dopaminskih D2 receptora. Izraženost, te stanična i subcelularna lokalizacija dugog i kratkog izo-oblika DR2 u moždanom tkivu čovjeka i miša, te u staničnim modelima do sada su samo djelomično istražene. Uvriježeno mišljenje da se DR nalaze isključivo na membrani živčanih stanica nedavno je dovedeno u pitanje (138), a mogućnost da oni u značajnoj mjeri mogu biti pohranjeni u endosomima u citoplazmi stanica uopće nije eksperimentalno potvrđena. S obzirom na metodološka ograničenja analize postmortalnih uzoraka ljudskog moždanog tkiva, za tu svrhu rada istražena je stanična i unutarstanična raspodjela D2 receptora u primarnim staničnim kulturama neurona, astrocita i mikroglije porijeklom iz prefrontalnog korteksa miša, a unutarstanično kretanje DR2 u transfeciranim primarnim kulturama neurona.

Očekujemo da će rezultati dobiveni ovim radom doprinijeti boljem razumijevanju djelovanja dopaminskih agonista i antagonista, a zatim i otkrivanju boljih i učinkovitijih pristupa liječenju bolesti u kojima je poremećena funkcija dopaminskog sustava.

2. HIPOTEZA

Dopaminski receptori D2 u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša nisu izraženi samo u piramidnim neuronima V. sloja, već i u piramidnim neuronima III. sloja, kao i u drugim tipovima neurona i drugim slojevima moždane kore, te možda u glija stanicama, a taj izražaj podložan je cikličkim promjenama internalizacije i pohranjivanja u citoplazmi živčanih stanica.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Utvrđivanje slojevne i stanične raspodjele, te unutarstanične lokalizacije izraženosti dopaminskih receptora skupine D2 u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša.

3.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi slojevni izražaj i raspodjelu proteina D2 dopaminergičkih receptora (DR2, DR3, DR4) dorzolateralne (BA 9 i 46), orbitomedijalne (BA 11 i 12) i medijalne (BA 9) prefrontalne moždane kore čovjeka.
2. Utvrditi distribuciju D2 dopaminergičkih receptora (DR2) po tipovima neurona i glija stanica u dorzolateralnoj (BA 9 i 46), orbitomedijalnoj (BA 11 i 12) i medijalnoj (BA 9) areji prefrontalne moždane kore čovjeka.
3. Utvrditi unutarstaničnu lokalizaciju D2 dopaminergičkih receptora u dorzolateralnoj (BA 9 i 46), orbitomedijalnoj (BA 11 i 12) i medijalnoj (BA 9) areji prefrontalne moždane kore čovjeka.
4. Utvrditi izražaj mRNA dopaminskih receptora DR2, duge (D2L) i kratke (D2S) inačice u dorzolateralnoj (BA 9 i 46), orbitomedijalnoj (BA 11 i 12) areji prefrontalne kore čovjeka.
5. Utvrđivanje izražaja i distribucije proteina receptora skupine D2 u različitim tipovima stanica (neuroni, astroglija i mikroglia) u prefrontalnoj moždanoj kori odraslih C57Bl/6J miševa i u transgeničnim miševima *Drd2-EGFP*.
6. Određivanje izražaja i distribucije proteina receptora skupine D2 u subkortikalnim strukturama: strijatumu, talamusu, hipokampusu i moždanom deblu odraslih C57Bl/6J miševa.
7. Određivanje izražaja i distribucije kratke i duge inačice (D2L i D2S) receptora D2 u korteksu (prefrontalni i hipokampus) i subkortikalnim strukturama: strijatumu, talamusu, cerebelumu i moždanom deblu odraslih C57Bl/6J miševa.
8. Određivanja izražaja DR2, DR3, DR4, te kratke i duge inačice (D2S i D2L) u primarnim staničnim kulturama neurona (7 div), astrocita (5-7 div) i mikroglie (14-21 div) iz odraslih C57Bl/6J miševa.

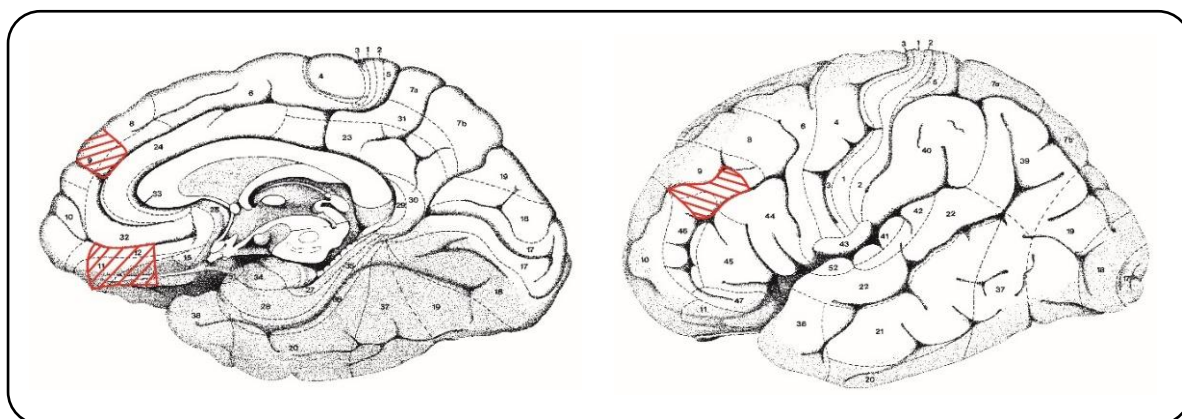
9. Određivanja subcelularne lokalizacije DR2 u primarnim staničnim kulturama neurona (7 div), astrocita (5-7 div) i mikroglije (14-21 div) C57Bl/6J miša.

U istraživanje smo krenuli s očekivanjem da ćemo dobiti nove spoznaje o histološkoj i arealnoj izraženosti dopaminskih receptora skupine D2 u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka. Na životinjskom i staničnom modelu cilj nam je bio razjasniti unutarstanično kretanje D2 receptora, s obzirom da je dosadašnje općeprihvaćeno razumijevanje bilo da se ti receptori nalaze isključivo na membrani živčanih stanica, a naši preliminarni podatci ukazivali su na moguću internalizaciju i pohranu u endosomima. Krajnji cilj je da te nove spoznaje doprinesu boljem razumijevanju djelovanja dopaminskih agonista i antagonista, čime bi poslužile za otkrivanje boljih i učinkovitijih pristupa liječenju bolesti u kojima je poremećena funkcija dopaminskog sustava.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorci prefrontalnog korteksa čovjeka

Za analizu su korišteni uzorci iz Zagrebačke zbirke mozгова (139) i to dorzolateralnog prefrontalnog korteksa (BA9/BA46), orbitomedijalnog (BA11/BA12) i prefrontalnog medijalnog (BA9) korteksa mozga 4 ispitanika nisu bolovali od psihijatrijskih ili neuroloških bolesti.



Slika 10. Područja moždane kore iz kojih su izuzeti analizirani uzorci.

Oznaka uzorka	Spol	Dob (godine)	PMV (sati)	Uzrok smrti
Kont1	M	54	< 18	Zatajenje srca
Kont2	M	48	20	Zatajenje srca
Kont4	Ž	60	6	Nagla srčana smrt
Kont6	Ž	61	24	Zatajenje srca

Tablica 2. Uzorci analizirani imunohistološkim metodama i metodom mikropostroja. PMV, postmortalno vrijeme.

4.1.1. Priprema moždanog tkiva

Nakon izuzimanja tkiva, ono je fiksirano dva tjedna u 4%-tnom paraformaldehidu s 0.1% fosfatnim puferom (PBS, od engl. phosphate buffer saline), pH 7.4. Blokovi tkiva su isprani u destiliranoj vodi (dH₂O), a zatim dehidrirani u uzlaznim koncentracijama etanola (EtOH): 50%, 70%, 95%, 100%, svaka po 30 min. Nakon ‘čišćenja’ u toluolu kroz 30 min blokovi su prebačeni 2 puta u tekući parafin (Histowax, Jung) otopljen u staklenoj bočici u termostatu na

57-58°C kroz 30 min. Uklapanje je izvršeno stavljanjem blokova tkiva u svježe otopljeni (treći) parafin, koji se naglo ohladio stavljanjem u hladnjak.

Od rostralne strane svakog bloka, mikrotomom su za svaki blok izrezani rezovi debljine 12 µm. Ti su rezovi zatim dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola: 50%, 70%, 95%, i na kraju u 2-propanol-apsolutnom alkoholu (2:1), te postavljeni na predmetna stakalca. Tako dobiveni rezovi bili su na raspolaganju za sve dolje navedene metode.

4.1.2. Imunohistokemija

Prije postupka imunohistokemije izvršena je deparafinizacija stavljanjem rezova u ksilol kroz 3 x 10 min. Nakon toga je izvršena rehidracija stavljanjem rezova u 100% EtOH kroz 2 x 5 min, zatim u 96%, 70%, 50% i 5% EtOH po 5 min. Zatim su rezovi isprani u dH₂O i za bojanje po Nisslu preneseni u 0.5% vodenu otopinu krezil-violeta. Nakon vizualne provjere da su rezovi adekvatno obojani, isprani su u dH₂O, dehidrirani u rastućim koncentracijama EtOH (50%, 70%, 96%, 100%), isprani ksilolom i uklopljeni.

Da bi se olakšalo prepoznavanje epitopa primarnim protutijelima provedeno je tzv. oslobađanje (eksponiranje) epitopa. Postupak je proveden tako da su preparati tretirani u citratom puferu 10 min pri 700 W (90°C), a nakon vrenja po potrebi je zbog isparavanja dodana dH₂O i postupak je ponovljen do 5 puta (svaki ciklus trajao je nekoliko s). Nakon toga su preparati kroz 20 min tretirani na 350 W, ohlađeni na sobnoj temperaturi kroz 30 min i na kraju isprani u PBS 3 x 10 min.

Citratni pufer (pH 6.0) volumena 1000 mL sadrži: 2.1 g limunske kiseline u 900 ml destiliranoj H₂O. Titriranje kapaljkom do ciljnog pH = 6,0 pomoću 2M NaOH (4g NaOH u 50 mL dH₂O). Priprema 10 x PBS u 1 L dH₂O: 90 g NaCl, 2 g KCl, 11.3 g bezvodnog Na₂HPO₄ (ili 21.6 g Na₂PO₄ + 7 H₂O), 2 g KH₂PO₄.

4.1.2.1. Fluorescentna imunohistokemija

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela, preparati su inkubirani u 10%-tnom NDS (engl. normal donkey serum) i 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, S.A.D.) u PBS kroz jedan sat. Zatim su preko noći na +4°C inkubirani s primarnim protutijelima za N-terminalni kraj DR2 (MANDOP 21, clone 1D7), DR3 (MANDOP31), i DR4 (MANDOP 41) u omjeru 1:4 (2% NDS, 0.5% Triton X-100 u PBS-u). Sva navedena protutijela proizvedena su, karakterizirana i validirana u Laboratoriju za biokemiju i molekularnu biologiju profesora Glenna E. Morrisa u New East Wales Institutu u Wrexhamu u Velikoj Britaniji. Specifičnost navedenih monoklonskih protutijela i njihova obilježja

opisani su u detaljno u radu Wolstencroft i suradnika (138). Nakon ispiranja 3 x 10 min u PBS primijenjeno je FITC-spregnuto sekundarno zečje protutijelo na mišji Ig imunoglobulin (Vector Labs, Burlingame, CA, S.A.D.) u omjeru 1:100 u PBS kroz dva sata. Nakon inkubacije preparati su ponovno isprani 3 x 10 min u PBS. Na preparate je zatim primijenjen DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) i te su pokriveni stakalcem i spremni za mikroskopiranje.

4.1.2.2. Imunohistokemiju pomoću kita Vectastain ABC

Deparafinizacija i otkrivanje epitopa provedeni su prema prethodno navedenom postupku. Nakon toga su preparati inkubirani u 0.3%-tnom vodikovom peroksidu kroz 30 min. Time se blokira djelovanje endogene peroksidaze i sprječava nespecifično bojanje preparata. Otopina 0.3%-tnog hidrogen peroksida dobila se miješanjem 7.5 ml metanola, 2.5 ml dH₂O i 7.5 ul 30%-tnog vodikovog peroksida do ukupnog volumena otopine od 10 ml. Nakon toga su preparati isprani 3 x 10 min u PBS. Da bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela preparati su inkubirani u blokirajućem puferu koji sadrži 5% BSA (engl. bovine serum albumine) i NGS te 0.5% Triton X-100 u PBS-u kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Zatim su primijenjena gore navedena primarna protutijela za N-terminalni kraj DR2, DR3 i DR4. Za dvostruko bojanje i obilježavanje astrocita korišteno je protutijelo anti-cow GFAP (engl. glial fibrillary acidic protein) monoclonal rabbit IgG (Dako, Kopenhagen, Danska) u razrijeđenju 1:500. Imunohistokemija za marker mikroglije CD68 provedena je pomoću protutijela rat anti-mouse CD68 antibody (Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK) u razrjeđenju 1:80. Preparati su u primarnim protutijelima inkubirani tijekom 24 sata na 4°C. Preparati su ponovno isprani 3x10 min u PBS, nakon čega su inkubirani u otopini sekundarnog protutijela (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, S.A.D.) u omjeru 1:200 u 50% blokirajućem puferu kroz 1 sat pri sobnoj temperaturi. Nakon trostrukog ispiranja u PBS preparati su inkubirani 30 min u prethodno pripremljenom ABC reagensu (kompleks streptavidin-peroksidaze) kroz 1 sat pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 3 x 10 min u PBS-u aktivnost peroksidaze vizualizirana je pomoću SIGMAFAST™ 3,3'-diaminobenzidin tableta koje sadrže Ni-3,3'-diaminobenzidina i hidrogen-peroksid ureu. Preparati su isprani s PBS, i nakon kratkog sušenja uklopljeni.

4.1.3. Analiza izražaja gena D2L i D2S metodom mikropostroja (microarray)

Za analizu su korišteni postmortalni uzorci dorzolateralnog prefrontalnog i orbitomedijalnog korteksa, veličine 0,5 cm³ koji se nalaze rostralno od uzoraka korištenih za

imunohistokemiju. Uzorci su odmah nakon izuzimanja pohranjeni u otopini *RNAlater*® (Thermo Fischer Scientific) kojom je RNA stabilizirana, te su do izolacije RNA pohranjeni u ledenici na -80°C. Izolacija RNA provedena je pomoću RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Venlo, Nizozemska).

4.1.3.1. Izolacija RNA iz tkiva pomoću kita RNeasy Plus Mini (Qiagen)

- 1) Za izolaciju RNA korišteno je 20 – 30 mg tkiva. Tkivo je homogenizirano u 600 µl puferu RLT Plus pomoću rotor-stator homogenizatora (u trajanju 20-40 s).
- 2) Lizat je centrifugiran 3 min na najvećoj brzini ($\geq 10\,000$ rpm). Pipetom je otkonjen supernatant i prenesen u kolonu gDNA Eliminator spin koja se nalazi u 2 ml tubi te ponovno centrifugiran u trajanju od 30 s pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Time je otklonjen netopljivi materijal koji bi mogao ometati odstranjenje DNA.
- 3) Dodan je jednaki volumen (350 µl ili 600 µl) 70% etanola i promiješan pipetiranjem.
- 4) 700 µl uzorka preneseno je ponovno na kolonu RNeasy spin koja se nalazi u 2 ml tubi. Ona je centrifugirana 15 sekundi pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Tekuća faza (flow-through) koja se skupila u tubici je odbačena.
- 5) Dodano je 700 µl pufera RW1 u RNeasy spin kolonu, koja secentrifugirala kroz 15 s pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) kako bi se membrana spin kolone isprala. Odbačena je tekuća faza.
- 6) Dodano je 500 µl pufera RPE u RNeasy spin kolonu, te je ona ponovnocentrifugirana kroz 15 sekundi pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) kako bi se membrana spin kolone isprala. Ponovno je odbačena tekuća faza.
- 7) Dodano je 500 µl pufera RPE u RNeasy spin kolonu, koja je centrifugirana 2 min pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) kako bi se membrana spin kolone isprala i ponovno odbačena tekuća faza. Dugo centrifugiranje suši membranu kolone, osiguravajući da se etanol ne prenosi dalje tijekom ispiranja.
- 8) Kolona RNeasy spin postavi se u novu 1,5 ml tubu. Direktno se dodalo 30–50 µl vode bez RNase na membranu kolone, koja se sad centrifugirala kroz 1 minutu pri $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm), a kako bi se RNA isprala.
- 9) Ako je dobiveno >30 µg RNA, ponavljan je prethodni korak korištenjem 30–50 µl vode bez RNase ili eluata iz prehodnog koraka (u tom slučaju će količina RNA biti 15-30% niža, ali završna koncentracija RNA viša).
- 10) RNA je pohranjena na -70 u vodi bez RNaze.

Kvaliteta i koncentracija izolirane RNA izmjerene su uređajem Bioanalyzer RNA 6000 Nano i izražena u vrijednosti RIN (eng. RNA integrity number – broj RNA integriteta). Uzorci s vrijednostima RIN-a većim od 5.5 smatrani su dovoljno kvalitetnima za nastavak analize. Za analizu izražaja D2L i D2S gena korišten je Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST mikropostroj. Dobiveni podatci obrađeni su pomoću programa Partek Genomic Suite 6.5 (Partek Incorporated, St. Louis, MO, S.A.D.) pri čemu je prije završnog očitavanja izvršen postupak tzv. RMA (robust multi-array averaging) korekcije pozadinskog šuma, kvantilna normalizacija, određivanje aritmetička sredina radi sažimanja setova proba i log₂-transformacija dobivenih intenziteta fluorescencije.

4.2. Uzorci mozga miša

4.2.1. Imunohistokemija i imunofluorescencija

Miševi soja C57Bl/6J (N = 4) anestetizirani su izofluranom i perfundirani s 0.1-molarnim puferom PBS i 4% otopinom paraformaldehida (PFA). Nakon postfiksacije u 4% PFA u trajanju od 24 sata napravljeni su vibratomom (Vibratome 1000, Leica) koronarni i sagitalni rezovi mozga debljine 30 µm te pohranjeni u PBS-u na +4°C do daljnje obrade.

Za imunohistokemiju i fluorescentnu mikroskopiju korišten je isti protokol kao i za uzorke mozga čovjeka, pri čemu su korištena protutijela za DR2, GFAP kao biljeg astrocita i Iba1 kao biljeg mikroglije.

4.2.2. Analiza izražaja gena D2L i D2S metodom qRT-PCR

Miševi soja C57Bl/6J (N = 4) anestetizirani su izofluranom. Odmah nakon izuzimanja tkiva, mozgovi su postavljeni na pothlađenu podlogu te izrezani na kriške debljine 2 cm. Zatim su pod disekcijskim mikroskopom na pothlađenoj podlozi izdvojeni moždana kora, strijatum, talamus, hipokampus i moždano deblo te pohranjeni u ledenici na -80°C do daljnje obrade. Iz navedenih dijelova mozga izolirana je RNA pomoću fenolnog postupka.

Priprema uzoraka mozga

1. Izuzeti uzorak je mehanički homogeniziran u 1 ml TRIZOL tijekom 30 s na sobnoj temperaturi.
2. Uzorak je inkubiran kroz 5 min na sobnoj temperaturi.
3. Svaki 1 ml homogenata prenesen je u 1,5 mililitarsku tubicu, nakon čega je započeta ekstrakcija kloroformom.

4.2.2.1. Izolacija RNA pomoću fenolnog postupka:

1. Tubice su centrifugirane kroz 15 min. na 12 000 g, +4°C.
2. Supernatant je prelijet u novu tubicu, dodano je 200 µl kloroforma, nakon čega je otopina promiješana i inkubirana 10min na sobnoj temperaturi.
3. Tubica je centrifugirana 15 min. na 12 000 g, +4°C.
4. Vodena faza je prenesena u novu tubicu, dodano je 500 µl izopropanola, nakon čega je otopina lagano promiješana i inkubirana 10 min. na sobnoj temperaturi.
5. Tubica je centrifugirana 10 min. na 12 000 g, +4°C.
6. Izopropanol je oprezno odliven, pazeći da se ne izgubi talog. Talog je ispran u 1 ml 75% etanola. Nakon ovog koraka RNA je do daljnje analize bila pohranjena do jednog tjedna na +4°C (ili do godine dana na -20°C).
7. Tubica je centrifugirana 5 min. na 12 000 g, +4°C. Nakon toga je etanol oprezno odliven, tubica kratko centrifugirana (engl. spin) i preostali etanol odstranjen pomoću pipete.
8. Otvorena tubica je ostavljena 5-10 min. da etanol potpuno ispari.
9. Talog je otopljen u 20 µl vode bez nukleaze (engl. nuclease free water) i otopina RNA je pohranjena na -70°C.

4.2.2.2. Sintaza cDNA (pomoću random hexamers)

Razgradnja DNA

1. Otopina za razgradnju DNaze (engl. DNase digestion reaction) priređena je u polipropilenskoj tubici kako slijedi:

	Volumen	Završna koncentracija
Nuclease-free water	5 µl	
RQ1 RNase-free DNase 10x reaction buffer	3.5 µl	1x
RNA-sin 40 U/µl ²	3.5 µl	4 U/µl
RQ1 RNase-free DNase ¹	3 µl	3 U
Otopina RNA ³	20 µl	

2. Otopina je inkubirana 20 min. na 37°C.
3. Tubica je prenesena na led.
4. Dodano je 165 µl vode bez nukleaze i 200 µl fenol/kloroform/izopropanola (u omjeru 25/24/1). Otopina je oprezno promiješana (engl. vortex).
5. Centrifugirati 5 min na 12 000 g, +4°C.
6. Pipetom je vodena faza oprezno prenesena u novu polipropilensku tubicu.

7. Dodano je 200 µl kloroform/izopropanola (24/1). Otopina je oprezno promiješana.
8. Otopina je centrifugirana 5 min. na 12 000 g, +4°C.
9. Vodena faza je prenesena u novu polipropilensku tubicu.
10. Dodano je 6 µl 10 M amonij-acetata i 550 µl 96% etanola. Otopina je oprezno promiješana.
11. RNA je precipitirana 1 sat na -70°C.
12. Nakon toga je otopina centrifugirana 30 min. na 12 000 g, +4°C.
13. Opresno je odliven etanol, a talog nakon toga ispran sa 600 µl 75% etanola.
14. Otopina je centrifugirana 30 min. na 12 000 g, +4°C.
15. Etanol je opresno odliven, tubica kratko centrifugirana (engl. spin) i ostatak etanola odstranjen pomoću pipete.
16. Otvorena tubica je ostavljena od 5-10 min. da etanol u potpunosti ispari.
17. Talog je otopnjen u 20 µl vode bez nukleaze i otopina RNA pohranjena na -70°C

Opaske:

- 1) Korišteno je 1 U RQ1RNase-free DNase (Promega) za 1 µg RNA. Za manje količine RNA, korišteno je za svaku reakciju 1 U RQ1RNase-free DNase
- 2) RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega)
- 3) RNA otopljen u vodi bez nukleaze

Sinteza cDNA (prve zavojnice)

1. Reakcija za sintezu cDNA u polipropilenskoj tubici priređena je kako slijedi:

	Volumen	Završna konc.
2 µl otopine RNA (nakon razlaganja DNA)	15 µl	
Random hexamers 100 µM	1.5 µl	6 µM
dNTP 2.5 mM each	1.5 µl	
DTT 0.1 M	0.5 µl	
RNA-Sin 40 U/µl	0.5 µl	20 U
MMLV-RT 200 U/µl	1.5 µl	300 U
5 x MMLV-buffer	5 µl	

Ukupni volumen 25.5 µl

2. Otopina je inkubirana (u thermocycler) 5 min pri 21°C, zatim 1 sat pri 37°C i 5 min pri 95°C.
3. Nakon ovog koraka cDNA je dalje analizirana ili trajno pohranjena na -20°C.

Kontrola kvalitete priređene RNA i cDNA

1% agarozni gel (100 ml) je pripremljen u 1 x TBE, nakon čega je dodano 5 µl etidijum-bromida. Uzorak je promiješan u tubici (volumena 0.5 ml) te su uzorci otopine preneseni u bunariće agaroznog gela. Uzorci su priređeni kako slijedi:

	RNA1	RNA2	cDNA1	cDNA2
RNA/cDNA	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Voda bez nukleaze	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
BromPhenolBlue/Glycerol 30%	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom analizirana je razina mRNA za gene D2L i D2S. Razine mRNA normalizirane su prema β-aktinu kao internoj kontroli.

4.2.2.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT- PCR)

Za qRT-PCR analizu korišten je uređaj LightCycler® 2.0 Instrument (Roche, Švicarska) s odgovarajućom centrifugom za 32 uzorka LightCyler 2.0 Sample Carousel te komercijalno dostupnim reagensima prema uputama proizvođača. „PCR mix“ je prethodno pripremljen u polipropilenskoj tubici od 0.5 ml. U kapilare (volumena 20 µl) za sustav LightCycler prvo je pipetirano 18 µl „PCR Mix“, a zatim 2 µl uzorka. Kapilare su postavljene u odgovarajući adapter kratko centrifugirane (spin) pomoću LightCycler Carousel Centrifuge 2.0. Nakon toga je adapter s uzorcima postavljen u uređaj LightCycler 2.0 te je proveden RT-PCR postupak. Kao interna kontrola za pripremu RNA i sintezu cDNA korišten je „housekeeping“ gen za β-aktin. Svi uzorci su kvantificirani u duplikatima.

Priprema „Master Mix“

Posudica FastStart Reaction Mix („1b“) otopljena je i kratko centrifugirana, a posudica FastStart Enzyme („1a“) je kratko centrifugirana. Iz posudice 1a pipetirano je 10 µl otopine u posudicu 1b. Otopina je oprezno promiješana pomoću pipete i do uporabe čuvana na ledu. Navedena reakcijska smjesa sadržavala je FastStart Taq DNA polimerazu, mješavinu dNTP, SYBR™ Green I dye (Molecular Probes, Eugene, OR, S.A.D.), 10 mM MgCl₂ i pufer.

Priprema „Basic Mix“ za jednu reakciju:

MgCl ₂ (25mM) ¹	2.4 µl
H ₂ O (sterile PCR grade)	11.6 µl
Master Mix	2.0 µl

Ukupni volumen	16.0 µl
----------------	---------

Priprema „PCR Mix“ za 2 reakcije:

Basic-Mix	16.0 µl
Primer Mix (za housekeeping gene ili istraživani gen) ²	2.0 µl

Ukupni volumen	18.0 µl
----------------	---------

Opaska:

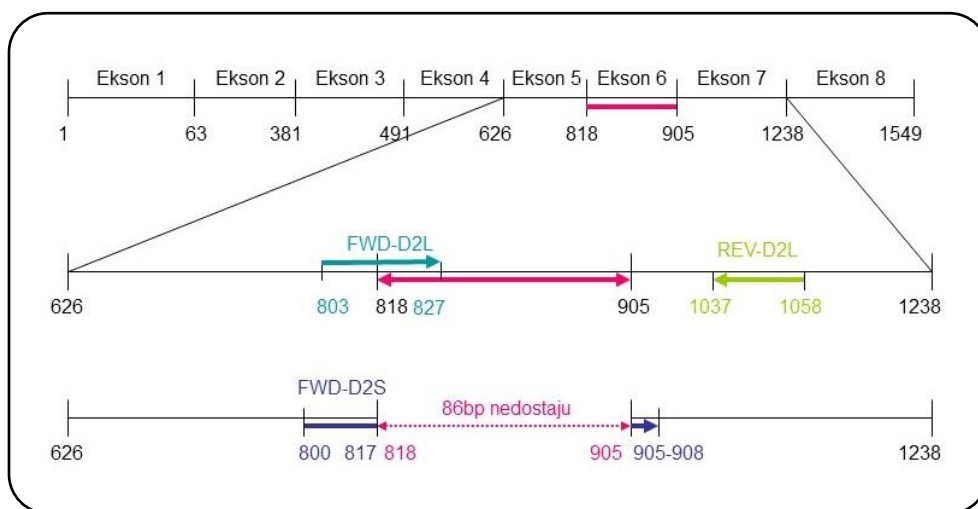
- 1) Završna koncentracija MgCl₂ iznosi 4 mM.
- 2) Završna koncentracija primera iznosi 0,5 µM za svaki primer.

Parametri reakcije qRT-PCR:

Metoda analize	Broj ciklusa	Segment	Ciljna temperat ura (C°)	Trajanje (sek)	Način prikupljanja podataka
Preinkubacija					
-	1		95	600	-
Amplifikacija					
Kvantifikacija	45	Denaturacija	95	15	-
		Vezanje primera	68 ¹	10	-
		Elongacija	72	15	jednostruki
Krivulja taljenja					
Krivulja taljenja	1	Denaturacija	95	0	-
		Vezanje početnica	70	15	-
		Taljenje	98	0	kontinuiran
Hlađenje					
-	1		40	30	

- 1) Temperatura vezanja primera iznosi 5°C ispod izračunatog T_m primera. On ovisni o sadržaju nukleotida, a izračunat je prema formuli T_m = 2°C (A+T) + 4°C (G+C).

Početnice za umnažanje uzorka dizajnirane su pomoću dostupnog programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Za umnaženje gena *Drd2* korišteni su sljedeće početnice: prednja: 5'-CACCCTCAAGGGCAACTGTAC-3' i stražnja: 5'-GACTGTCAGGGTTGCTATGTAG-3' (Eurofins MWG Operon, Njemačka).



Slika 11. Dizajn početnica korištenih za analizu genskog izražaja D2L i D2S u mozgu miša metodom qRT-PCR. PCR produkt koji nastaje pomoću početnica FWD-D2L i REV obuhvaća D2L i veličine je 255 bp. PCR produkt koji nastaje pomoću početnica FWD-D2S i REV obuhvaća samo D2S i veličine je 172 bp. Kod D2S nedostaje šesti ekson.

4.3. Stanične kulture

4.3.1. Primarne kulture kortikalnih neurona miša

Primarne kulture kortikalnih neurona dobivene su disekcijom korteksa mozgovog miša (stadij embrija od 14 dana), astrocita i mikroglije (tri dana nakon rođenja). Iz navedenih kultura stanica izolirana je RNA pomoću fenolnog postupka, a metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze određeni su izražaj gena D2L i D2S.

1. Glave mišjih embrija odvojene su 14. embrionalnog dana (E14).
2. Mozgovi su disecirani u ohlađenoj disekcijskoj otopini u Petrijevoj posudi pod disekcijskim mikroskopom.
3. Izdvojeni korteks mozga je pohranjen u disekcijskoj otopini u tubi (volumena 50ml) na ledu.

4. Korteks 4-8 embrija centrifugirani su na 80 x g tijekom 5 min., nakon čega je disekcijska tekućina odstranjena.
5. Dodano je 1.5 ml tripsin/EDTA-HBSS. Tkivo je inkubirano 30 min. na 37°C.
6. Tripsin/EDTA-HBSS je zamijenjen inhibitorom tripsina. Tkivo je inkubirano 5 min. pri sobnoj temperaturi.
7. Tkivo je centrifugirano na 80 x g tijekom 5 min, nakon čega je isprano s 3 ml svježeg staničnog medija. Ovaj korak ponovljen je 2 puta.
8. Dodano je 1.5 ml svježeg staničnog medija, nakon čega su stanice suspendirane (30 x) pomoću Pasteur pipete sve dok suspenzija nije postala homogena.
9. Dodano je 5 ml staničnog medija. Uzorak je centrifugiran pri 80 g tijekom 5 min.
10. Supernatant je odstranjen, a stanice ponovno suspendirane u staničnom mediju. Stanice su izbrojane, tj. određena je koncentracija stanica u suspenziji.
11. Za imunofluorescenciju su stanice nasađene na prethodno poli-L-ilizinom (PLL) tretirana pokrovna stakalca umetnuta u bunariće pločica za uzgoj kultura stanica. Pritom su korištene pločice s 24 bunarića. Stanice su nasađene gustoćom od 300 000 stanica po bunariću. Za izolaciju RNA, stanice su nasađene na pločice sa 6 bunarića gustoćom od 150 000 stanica po bunariću.

Stanični medij za primarne kortikalne neurone sastojao se od: Neurobasal (Invitrogen) staničnog medija sa 100 µg/ml inzulina, 100 µg/ml transferina, 5% FCS (eng. fetal calf serum), 2% B27 suplement i 2 mM GlutaMax™.

4.3.2. Primarne kulture astrocita miša

1. Glave miševa odvojene su 1.-3. postnatalnog dana.
2. Mozgovi su disecirani u ohlađenoj disekcijskoj otopini u Petrijevoj posudi pod disekcijskim mikroskopom, pri čemu su odstranjeni diencefalon, telencefalon i moždane ovojnice.
3. Korteks mozga je oprezno usitnjen sterilnim škarama u odvojenoj posudi.
4. Tkivo je preneseno u tubicu volumena 50 ml. Dodano je 5 ml 1X tripsina i 50 ul DNase te tkivno inkubirano tijekom 25 min. na 37°C. Tubica je promiješana svakih 5 min.
5. Tkivo je dva puta isprano medijem za glijalne stanice.

6. Tkivo je disocirano pomoću pipete od 5 ml, a nakon toga pomoću staklene Pasteur pipete (tri puta). Otvor Pasteur pipete je prethodno sužen na plamenu (engl. „fire-polished“).
7. Suspenzija stanica je razrijeđena u 10 ml glijalnog medija i filtrirana kroz 40 µm filter
8. Stanice su istaložene centrifugom na 1700 rpm tijekom 5 min.
9. Stanice su ponovno suspendirane u 10 ml glijalnog medija. Nakon toga su stanice izbrojane, tj. određena je njihova koncentracija u suspenziji.
10. Stanice su nasađene u staničnu posudu od 75cm², uz gustoću od 1.33×10^5 stanica/ml (ili 2.67×10^4 stanica/cm²).
11. Stanični medij je promijenjen svaka 3 dana. Nakon 6-7 dana postigao se konfluentan sloj astrocita na podlozi posude.

Medij za kulturu astrocita sadrži: 430 ml DMEM, 50ml FSB, 5 ml penicilin/streptomocina, 5 ml natrij-piruvata, 10 ml GlutaMax (Invitrogen).

4.3.3. Primarne kulture mikroglije miša

1. Primarne kulture mikroglije rastu kao miješana kultura na astrocitnoj podlozi.
2. Za razliku od protokola za kulture astrocita, prva promjena medija slijedila je nakon 5 dana inkubacije. Medij se nakon toga mijenjao svaka 3 dana.
3. Nakon što su astrociti postigli konfluentan sloj (nakon 2 tjedna), posuda sa stanicama je protresena na 100 rps tijekom 1 sata pri 37°C.
4. Stanični medij (koji sadrži stanice mikroglije) je oprezno pokupljen pipetom od 10 ml i prenesen u tubicu od 50 ml. U posudu sa staničnim kulturama astrocita stavljen je svježiji medij.
5. Tubica je centrifugirana pri 2 500 RCF tijekom 5 min pri 4°C.
6. Supernatant je odstranjen. Talog (koji sadrži stanice mikroglije) ponovno je suspendiran u 1 ml medija za mikrogliju (DMEM, 1% FES, 1% penicilin/streptomicin).
7. Stanice su izbrojane i nasađene u koncentraciji od 2×10^5 stanica / ml.

4.3.4. Izolacija RNA iz staničnih kultura

1. Stanice su mehanički ostrugane s podloge. Suspenzija stanica je prenesena u polipropilensku tubicu (volumena 1,5 ml) i 10 min. centrifugirana na 2000 rpm (450g).
2. Supernatant je odstranjen, a stanice su suspendirane u 1ml TRIZOL.
3. Suspenzija je inkubirana 10 min. na sobnoj temperaturi.
4. 1 ml staničnog lizata prenesen je u tubicu volumena 1,5 ml. Nakon toga je započeta ekstrakcija RNA fenolnim postupkom.

4.3.5. Transfekcija

Za transfekciju dopaminskog receptora u primarne kortikalne neurone klonirana je cDNA dopaminskog receptora D2 čovjeka, pri čemu su korištene početnice koje sadrže mjesto za restrikcijske enzime XhoI i KpnI. Kao vektor korišten je pCI (Promega) s CAG pokretačem (promotorom) koji se sastoji od citomegalovirusnog pojačivača (engl. CMV enhancer) i promotora koji sadrži prvi egzon i intron beta-aktinskog gena kokoši (chicken β -actin promotor) pomoću kojeg će se postići izražaj D2L i D2S, te mjesto kloniranja koje se nalazi ispred mCherry (mCherry fluorescentnog proteina). U konačnici, cjelokupni konstrukt ima slijed: pCAG – cDNA za D2L ili D2S – mCherry – vektor. Konstrukt je umnožen pomoću kompetentnih DH5 α stanica, transformiranih priređenim konstruktom. Umnoženi konstrukt je izoliran prema protokolu Zeitelhofera i suradnika (140) te je transficiran u primarne kulture neurona. Za transfekciju su kortikalni neuroni nasađeni na pločice za uzgoj kultura stanica s 12 jažica, gustoćom od 10^5 stanica po jažici te inkubirani na 37°C. Dvadesetčetiri sata nakon nasađivanja, stanice su transficirane plazmidom pomoću liposoma (Lipofectamine Transfection Reagent 2000, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, S.A.D.). Transfekcija je izvedena metodom tzv. nukleofekcije koja se temelji na elektroporaciji (141), pri čemu je korišten uređaj Amaxa Nucleofector™ II (Lonza Cologne GmbH, Njemačka).

Postupak nukleofekcije primarnih kortikalnih neurona miša proveden je kako slijedi:

1. Smjesa za nukleofekciju pripremljena je dodavanjem 0.5 ml suplementa u 2.25 ml Nucleofector® Solution.
2. Uzorak za nukleofekciju sadržavao je 10^6 primarnih kortikalnih neurona, 2 μ g DNA i 100 μ l Nucleofector Solution.
3. U pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića dodano je 1 ml staničnog medija za primarne kulture kortikalnih neurona, koji su prethodno inkubirani na 37°C / 5% CO₂.

4. Stanice u suspenziji izbrojane. Potreban broj stanica je centrifugiran i ponovno suspendiran u Nucleofector Solution u koncentraciji od 10^6 stanica / 100 μ l.
5. 100 μ l stanične suspenzije promiješano je s 2 μ g DNA i preneseno u amaxa kivetu. Kiveta je postavljena u odgovarajući držač te je pokrenut program nukleofekcije.
6. Odmah nakon završetka programa dodano je 500 μ l staničnog medija, a uzorak nakon toga prenesen u prethodno pripremljene pločice za uzgoj stanica.
7. Za svaki uzorak ponovljen je navedeni postupak.

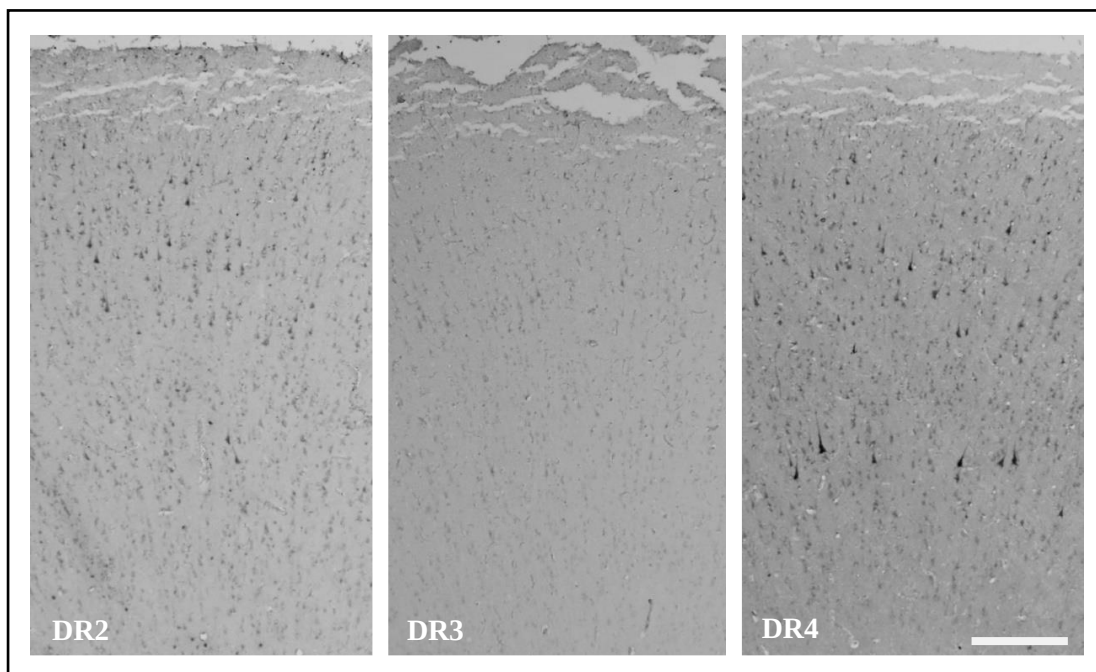
5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za usporedbu izražaja dopaminskih D2L i D2S receptora u pojedinim dijelovima mozga miša korišten je t-test. Za usporedbu izražaja pojedinog dopaminskog receptora u između različitih dijelova mozga miša ili između različitih staničnih kultura korišten je ANOVA test.

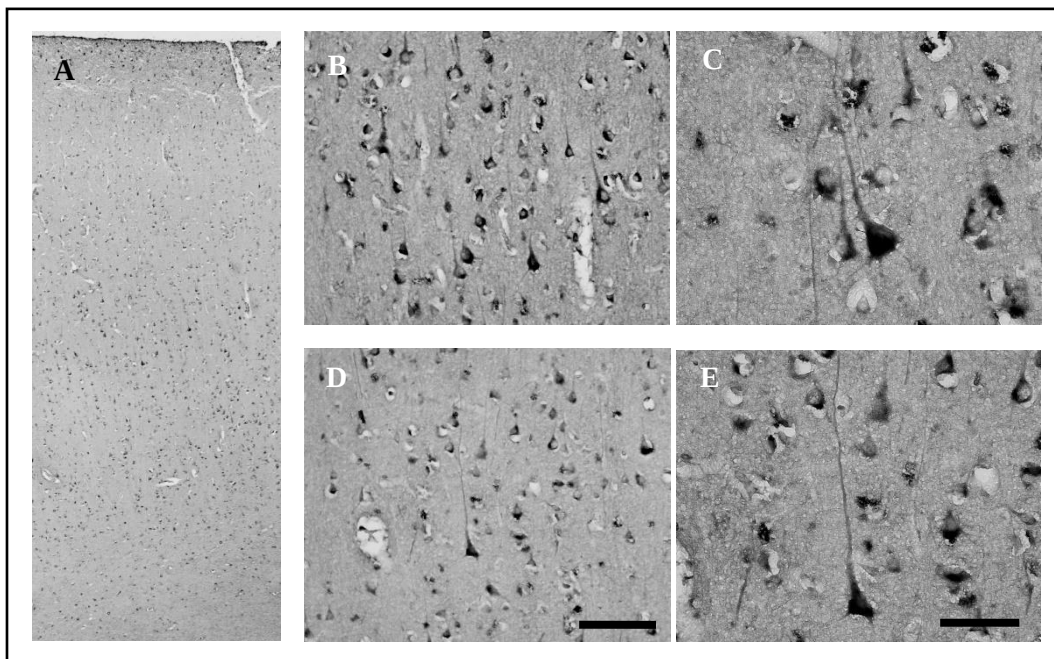
6. REZULTATI

6.1. Raspodjela DR2, DR3 i DR4 u prefrontalnom korteksu čovjeka

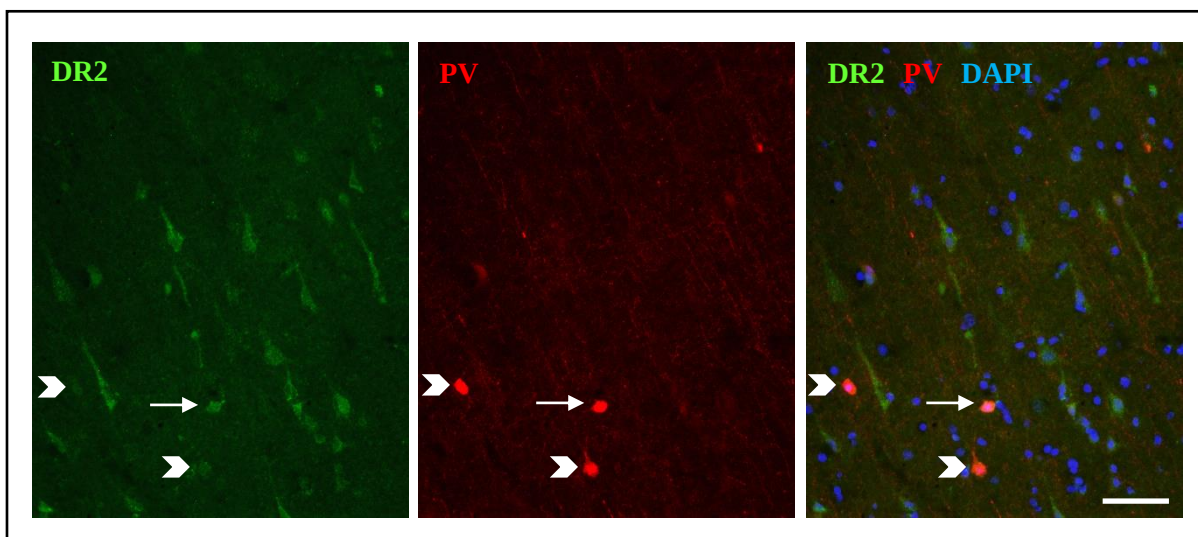
Imunohistokemijskim i imunofluorescentnim metodama pokazalo se da piramidne i nepiramidne stanice svih triju analiziranih regija – dorzolateralnog i medijalnog prefrontalnog, te orbitomedijalnog prefrontalnog korteksa izražavaju DR2. Navedeni receptori su bili posebice vidljivi u piramidnim stanicama sloja III, a nešto slabije V kortikalnog sloja (**Slika 12**). Pritom su se DR2-pozitivni piramidni neuroni mogli jasno raspoznati prema svojoj tipičnoj morfologiji. Da bi istražili moguću izraženost DR2 u nepiramidnim neuronima (interneuronima), koju je inače bez dodatnih specifičnih imunohistokemijskih biljega teže raspoznati, provedeno je dvostruko bojanje preparata na parvabumin (PV). Navedenim postupkom pokazalo se da poneki PV-pozitivni interneuroni trećeg, četvrtog i petog sloja, ali i subkortikalne bijele tvari, također izražavaju DR2 (**Slika 14**). Na staničnoj razini, u piramidnim neuronima i interneuronima, vidljiva je uglavnom citoplazmatska lokalizacija DR2 u somi neurona, dok je lokalizacija značajno slabija u dendritima. Više podataka o staničnoj lokalizaciji dopaminskih receptora dobiveno je pokusima na staničnim kulturama i transgeničnom *Drd2-EGFP* mišu, koji su opisani kasnije.



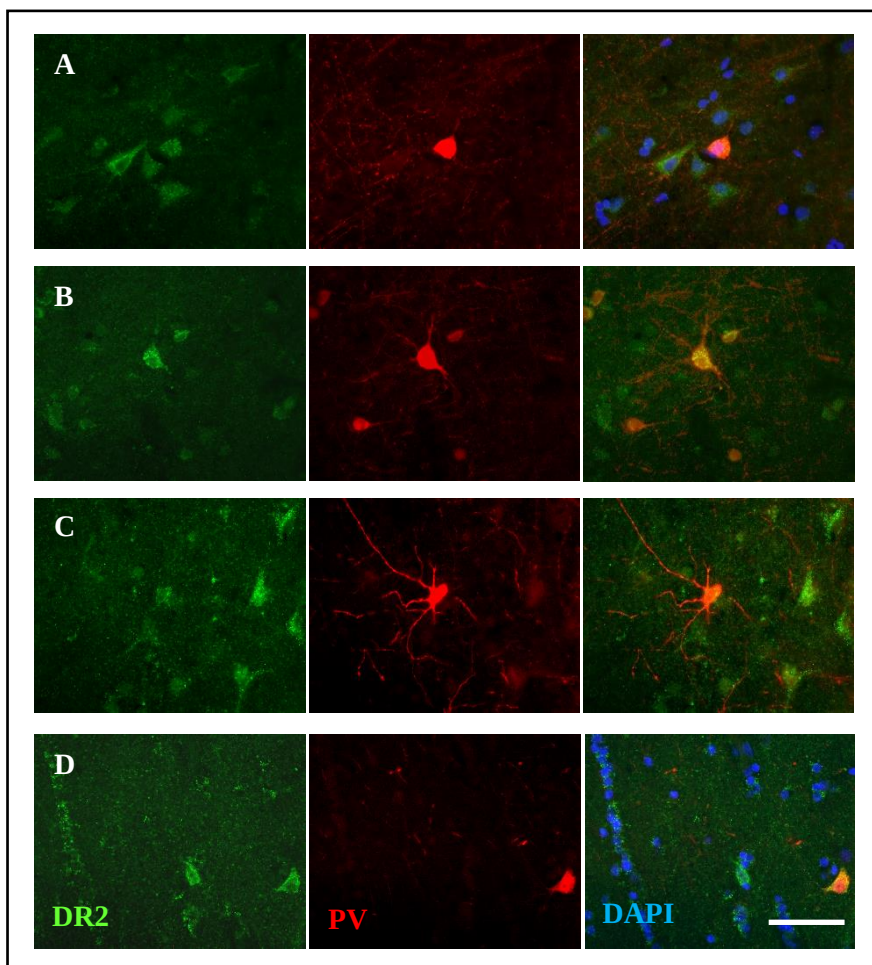
Slika 12. Usporedba izraženosti dopaminskih D2 receptora u medijalnom orbitofrontalnom korteksu (BA 11/12) mozga čovjeka. Dopaminski D2 receptori najjače su izraženi u piramidnim stanicama III sloja. Za razliku od toga, D4 receptori pokazuju jaču imunoreaktivnost u piramidnim stanicama V sloja. DR3 imaju sveukupno vrlo slabu izraženost u prefrontalnom korteksu. Dužna mjera iznosi 200 μm .



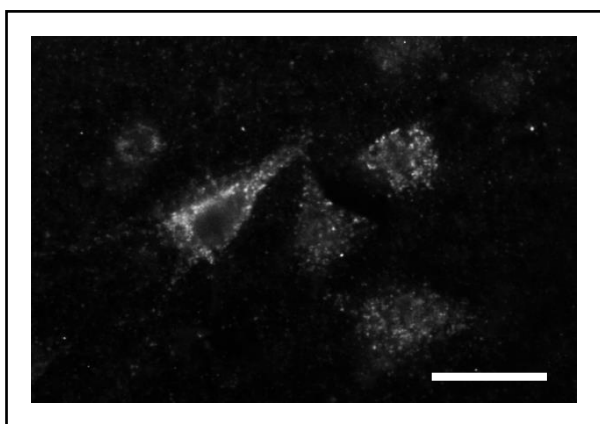
Slika 13. Imunohistokemijsko bojanje medijalnog prefrontalnog korteksa čovjeka (BA9) protutijelom na dopaminski D2 receptor. Na slici je vidljiv bilaminaran obrazac izraženosti DR2 u III i V kortikalnom sloju (A), kao imunoreaktivnost piramidnih stanica trećeg (B, C) i petog (D, E) kortikalnog sloja. Dužna mjerka na slici 50 μm . Dužna mjerka na slikama B i D 100 μm , na slikama C i E 50 μm .



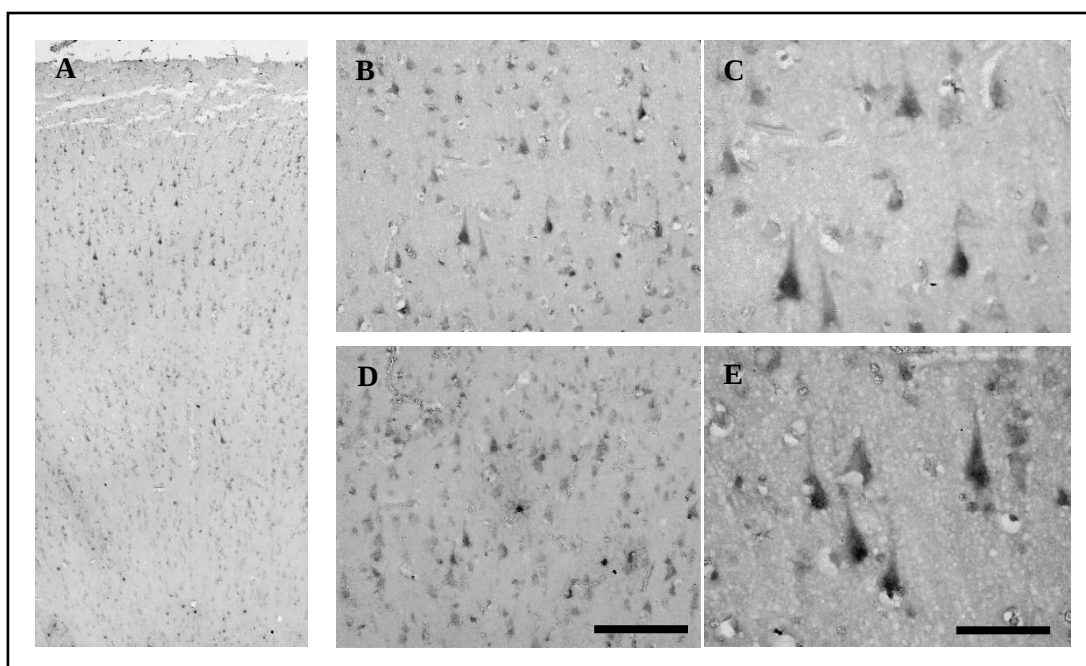
Slika 14. Piramidne i nepiramidne stanice III kortikalnog sloja medijalnog orbitofrontalnog korteksa čovjeka. Na slici se jasno vide brojne DR2-pozitivne piramidne stanice. Strelicom je označen parvalbuminski interneuron koji izražava DR2. Vrhom strelice su označeni parvalbuminski interneuroni koji ne izražavaju DR2. Plavom bojom su označene stanične jezgre obilježene 4,6-diamidino-2-fenilidolom (DAPI). Dužna mjerka 50 μm .



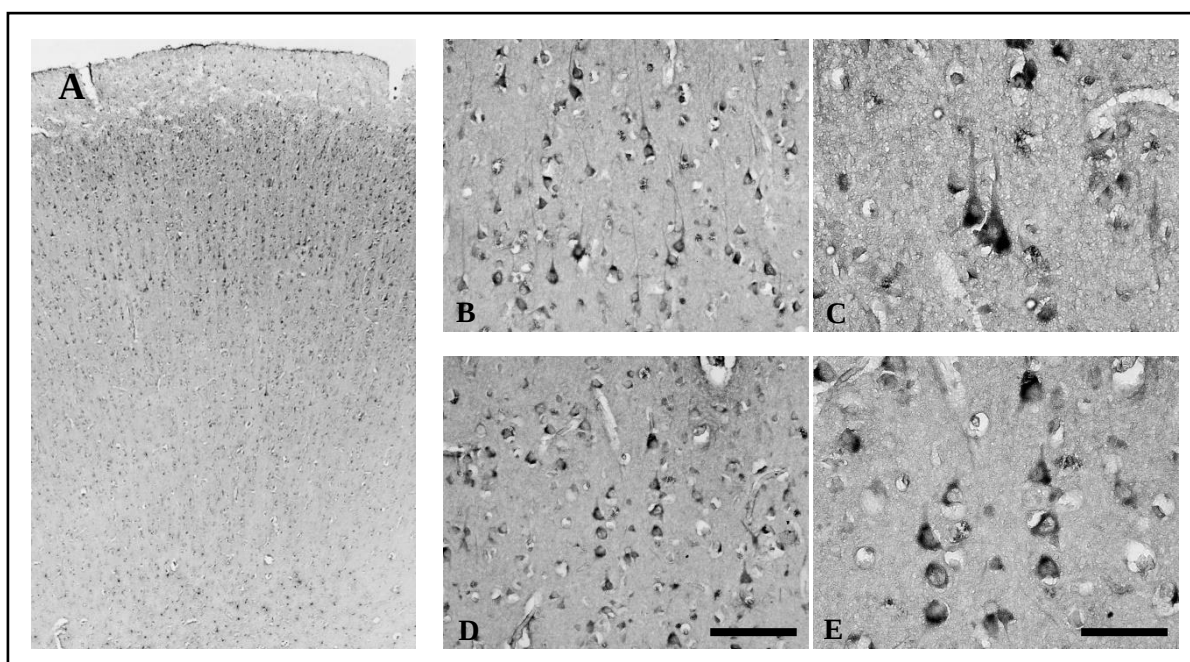
Slika 15. Imunofluorescentno bojanje medijalnog prefrontalnog korteksa čovjeka (BA9) protutijelom na dopaminski D2 receptor (zeleno) i parvalbumin (crveno). Prikazane su DR2-pozitivne piramidne stanice i DR2-pozitivni parvalbuminski interneuroni u III (A), IV (B) i V (C) kortikalnom sloju te u subkortikalnoj bijeloj tvari (D). Dužna mjerka 50 μm .



Slika 16. Dopaminski receptori pokazuju pretežno vezikularnu staničnu lokalizaciju. Na slici (isječak iz slike 4A) su prikazani piramidni i nepiramidni neuroni koji izražavaju DR2. Dužna mjerka 20 μm .

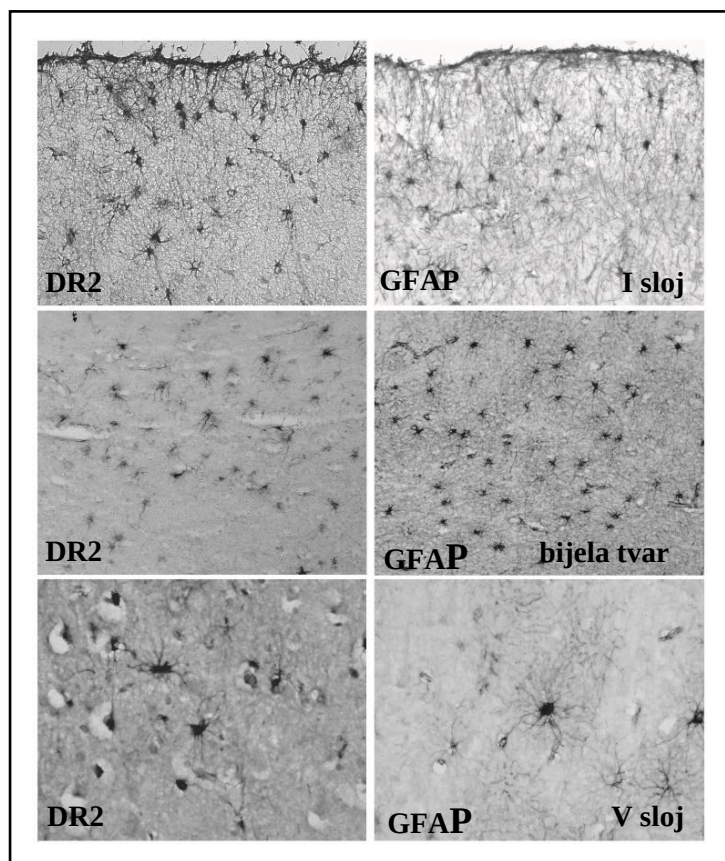


Slika 17. Imunohistokemijsko bojanje medijalnog orbitofrontalnog korteksa čovjeka (BA11/12) protutijelom na dopaminski D2 receptor. Vidljivo je da piramidne stanice III (B, C), a nešto slabije V sloja (D, E) izražavaju DR2. Ovaj nalaz se podudara s prethodno opisanim rasporedom DR2 u regiji BA9 medijalnog prefrontalnog korteksa. Dužna mjerka 50 μ m.



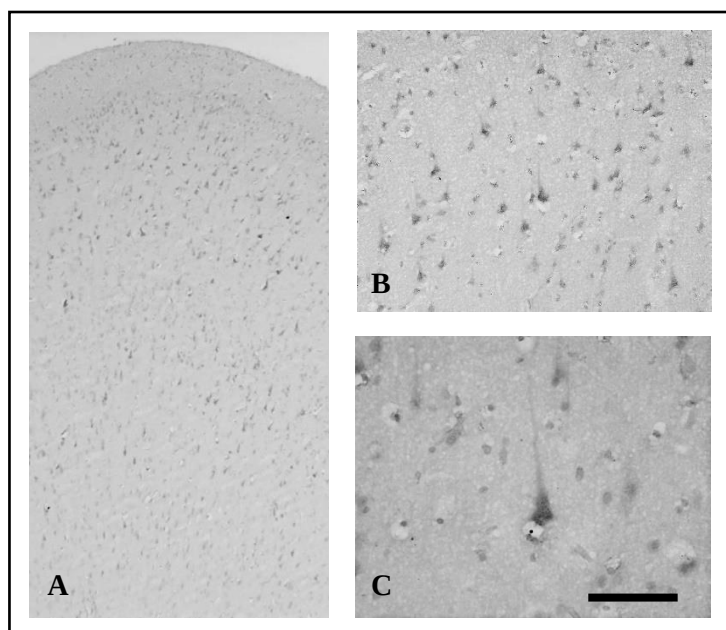
Slika 18. Raspodjela dopaminskih D2 receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu čovjeka (BA9/46). DR2 je najjače izražen u piramidnim stanicama u III i V kortikalnom sloju. Imunoreaktivnost je nešto jača u odnosu na orbitofrontalni korteks. Dužna mjerka 50 μ m.

Vrlo zanimljiv nalaz je jaka izraženost DR2 na staničnom tijelu i staničnim nastavcima fibroznih astrocita u bijeloj tvari i protoplazmatskih astrocita u prvom kortikalnom sloju (**Slika 19**). U većini rezova jasno se vidi stanična morfologija astrocita, koja je potvrđena imunohistokemijskim bojanjem protutijelima za astrocitni biljeg GFAP. DR2-pozitivni astrociti bili su posebno brojni u prvom kortikalnom sloju i subkortikalnoj bijeloj tvari. Samo poneki astrocit koji izražava DR2 se mogao pronaći u ostalim kortikalnim slojevima. Što se tiče astrocita u bijeloj tvari, s porastom udaljenosti od korteksa, gustoća DR2-pozitivnih astrocita je opadala. Za razliku od astrocita, bojanje preparata na biljeg mikroglije CD38 nije pokazalo kolokalizaciju s dopaminskim receptorima ni u kortikalnim slojevima niti u bijeloj tvari. Imunohistokemijskom metodom dopaminski receptori DR3 i DR4 nisu nađeni na glijalnim stanicama.

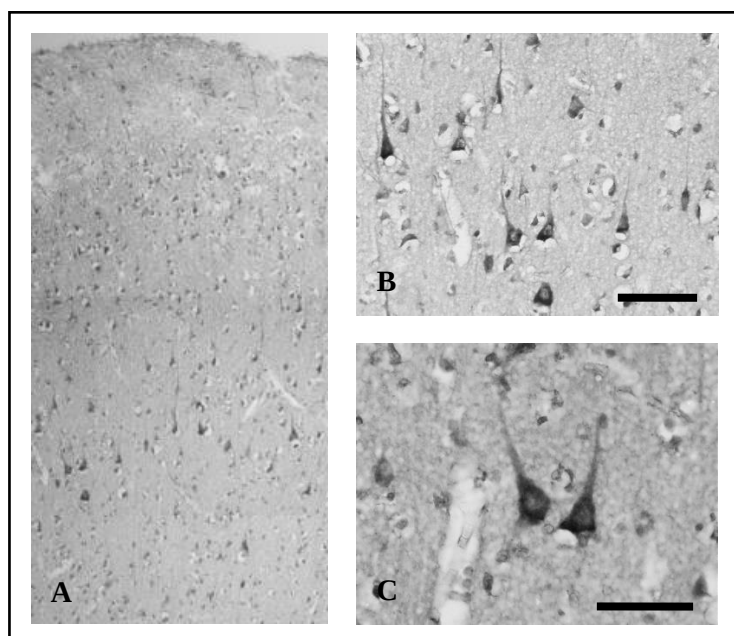


Slika 19. DR2-pozitivni astrociti u orbitomedijalnom prefrontalnom korteksu čovjeka (BA11). Protoplazmatski astrociti u prvom i petom kortikalnom sloju imaju veliki broj kratkih i debljih DR2-pozitivnih staničnih nastavaka. DR2-pozitivni fibrozni astrociti bijele tvari imaju manji broj tanjih i slabije razgranatih ogranaka.

Od dopaminskih receptora skupine D2 najslabiju izraženost u svim analiziranim regijama prefrontalnog korteksa pokazao je receptor DR3. Na **Slici 20** vidljivo je da je slaba izraženost DR3 ograničena na piramidne neurone trećeg i petog sloja.

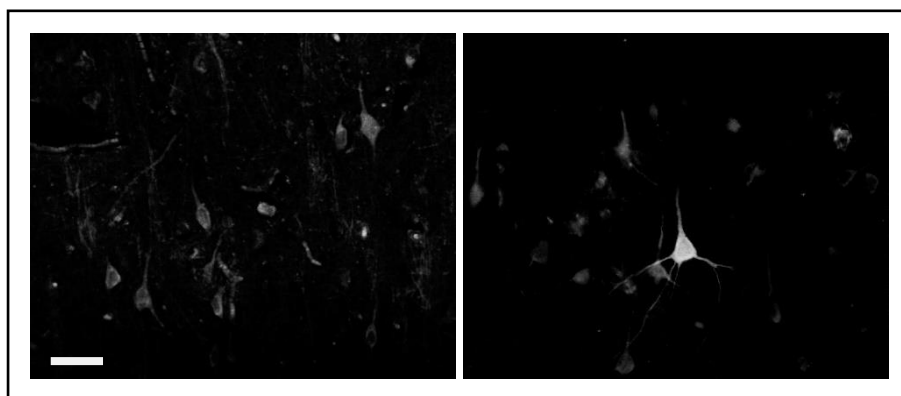


Slika 20. Izražaj dopaminskih D3 receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu čovjeka (BA 9/46). Vidljiva je relativno slaba imunoreaktivnost za DR3, ograničena uglavnom na piramidne stanice III i V sloja. Na slikama B i C prikazani su DR3-pozitivni piramidni neuroni. Dužna mjerka na slici C 50 μm



Slika 21. Izražaj dopaminskih D4 receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu čovjeka (BA 9/46). Piramidni neuroni V sloja pokazuju jaku izraženost DR4, pretežito intra-citoplazmatski u somi neurona. Na slikama B i C prikazani su DR4-pozitivni neuroni sloja V. Dužna mjerka na slici B 100 μm , na slici C 50 μm .

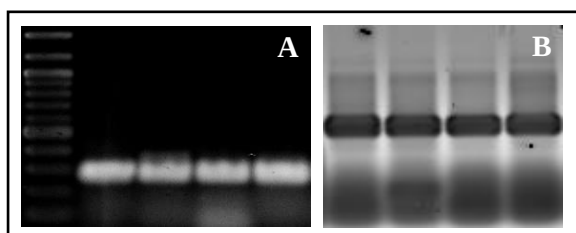
Receptori DR4 su za razliku od DR2, jače eksprimirani u piramidnim neuronima V, a slabije III sloja (**Slika 21**). U bijeloj tvari nisu nađene stanice koje izražavaju DR4. Koliko je vidljivo imunohistokemijskom metodom, stanična lokalizacija DR4 je uglavnom citoplazmatska i u somi neurona, te se time bitno ne razlikuje od one kod DR2. Imunofluorescentnom metodom se rijetko u pojedinačnim piramidnim stanicama mogla vidjeti nešto jača izraženost DR4 u apikalnim i bazalnim dendritima piramidnih stanica, što je prikazano na **Slici 22**.



Slika 22. DR4-pozitivni piramidni neuron u V sloju dorzolateralnog prefrontalnog korteksa. Dužna mjerka 50 μm .

6.2. Izražaj gena D2L i D2S u prefrontalnom korteksu čovjeka

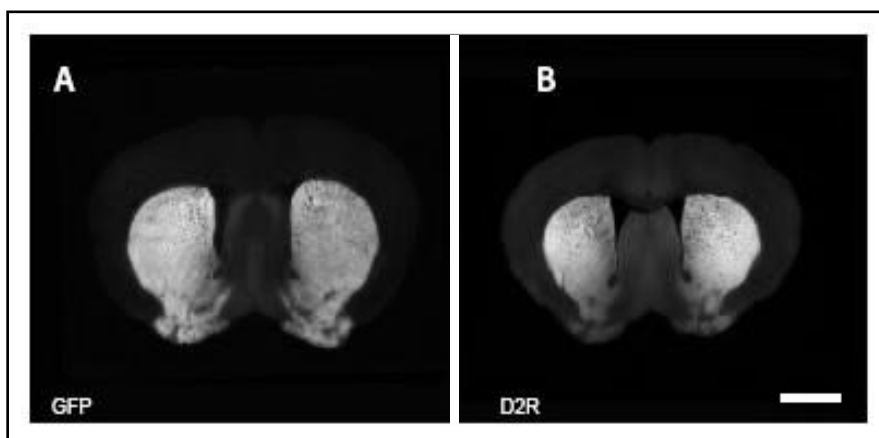
Izražaj gena D2L i D2S u dorzolateralnom i orbitomedijalnom prefrontalnom korteksu čovjeka potvrđen je metodom lančane reakcije polimeraze (engl. PCR) (**Slika 12**). Metodom mikropostroja razina mRNA nije bila mjerljiva niti u jednom analiziranom uzorku. Mogući razlog tome mogao bi biti metodološke prirode. Na primjer, mogao bi biti posljedica niske osjetljivost metode mikropostroja ili niske kvalitete uzoraka mRNA. Međutim, analiza kvalitete dobivene mRNA pokazala je zadovoljavajuće vrijednosti ($\text{RIN} > 6$). K tome, činjenica da mRNA nekih drugih neurotransmitskih receptora poput DR1, za koje je poznato da imaju jaču izraženost u odnosu na DR2 (a što je i potvrđeno u ovom radu analizom mišjeg mozga), nije bila mjerljiva upućuje da to nije metodološki problem.



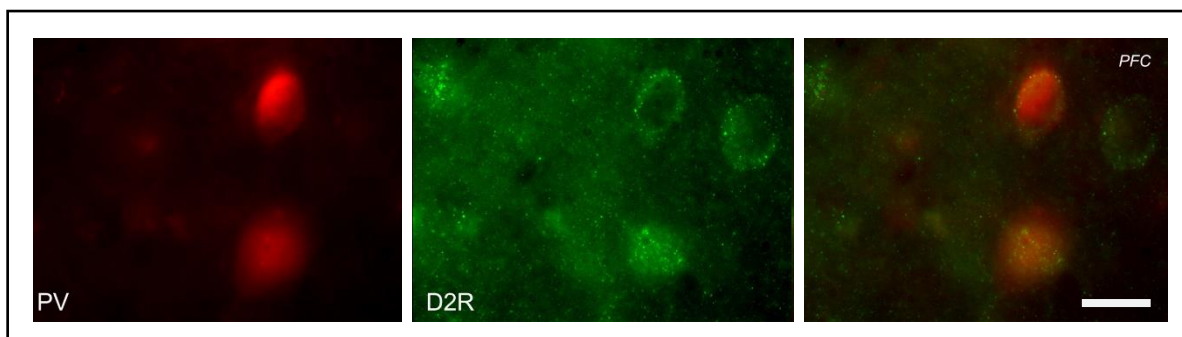
Slika 23. Analiza izražaja D2L (A) i D2S (B) u orbitomedijalnom prefrontalnom korteksu čovjeka za četiri analizirana uzorka.

6.3. Izražaj DR2 u mozgu miša

Metodom imunofluorescencije pokazalo se da je dopaminski D2 receptor vrlo slabo izražen u prefrontalnom korteksu mozga miša (**Slika 24**). Dvostrukim obilježavanjem protutijelima za DR2 i PV može se vidjeti da parvalbuminski interneuroni i ovdje izražavaju DR2. S obzirom na navedenu slabu izraženost DR2 u mišjem u odnosu na mozak čovjeka, dodatno su analizirani mozgovi transgeničnih miševa koji izražavaju GFP (engl. green fluorescent protein) pod kontrolom *Drd2* promotora. Tim komplementarnim pristupom potvrđeno je da razlog slabog prikaza DR2 u korteksu miša nije metodološki problem, nego zaista posljedica slabe izraženosti DR2 u navedenom tkivu. Prema očekivanju, najjača ekspresija GFP je zabilježena u strijatumu (**Slika 24**).

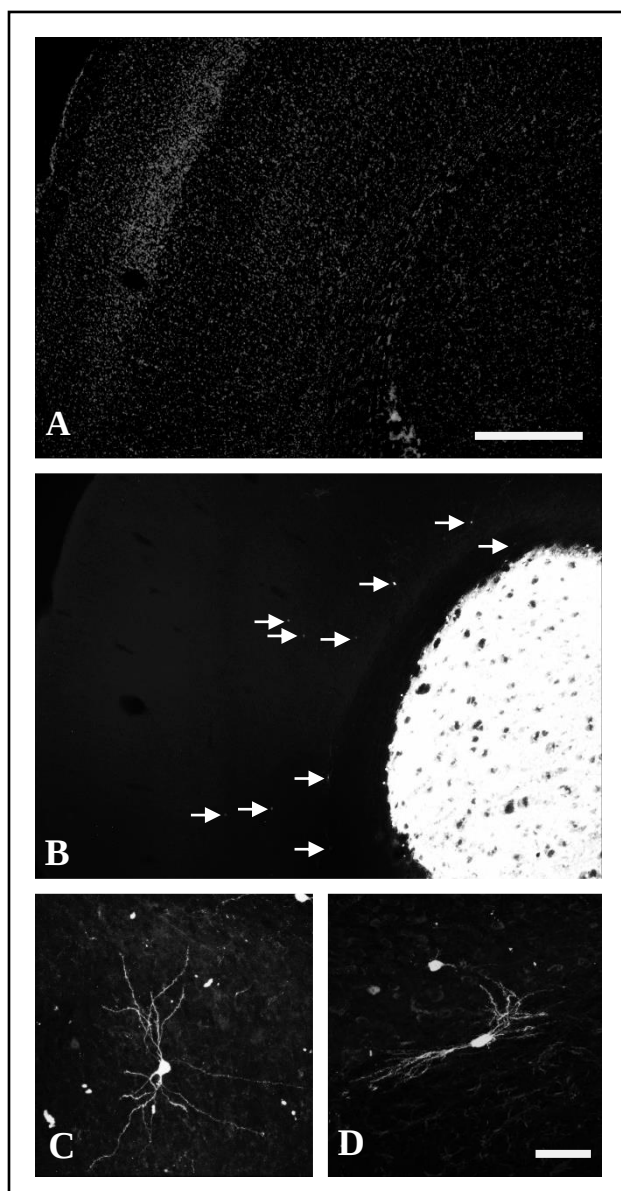


Slika 24. Prikaz rasporeda DR2 na koronalnom presjeku mozga miša. Na slici A prikazan je izražaj GFP pod kontrolom *Drd2* promotora u transgeničnom mišu. Na slici B prikazana je imunofluorescentna metoda protutijelima na DR2 u divljem tipu. U oba slučaja vidljiva je izrazito jaka ekspresija DR2 u strijatumu. Dužna mjerka 500 µm.

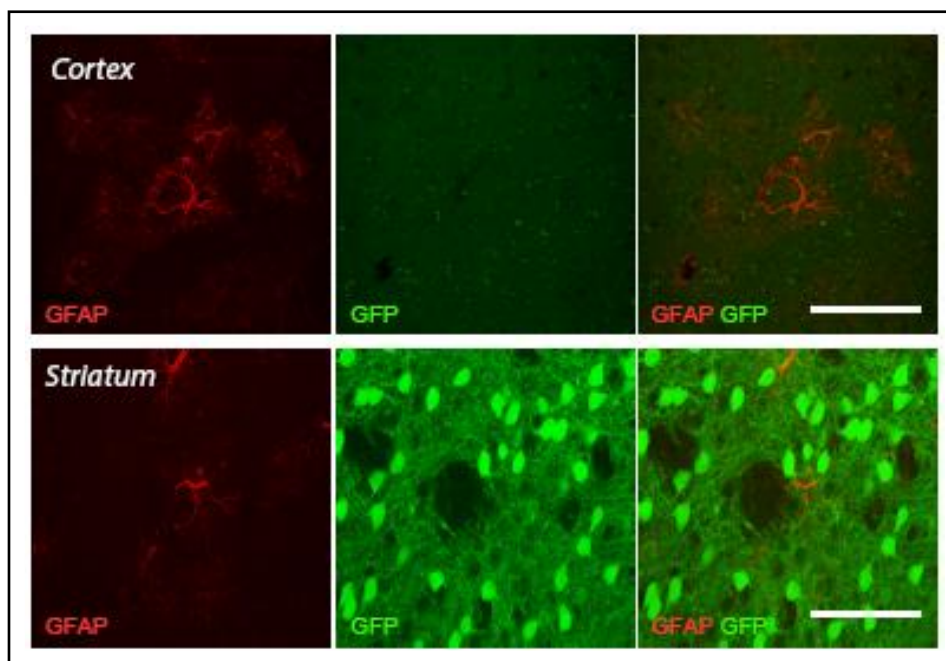


Slika 25. Izraženost dopaminskih D2 receptora u neuronima prefrontalnog korteksa miša. Vidljivo je da su među neuronima koji eksprimiraju DR2 postoje i parvalbuminski interneuroni. Dužna mjerka 25 µm.

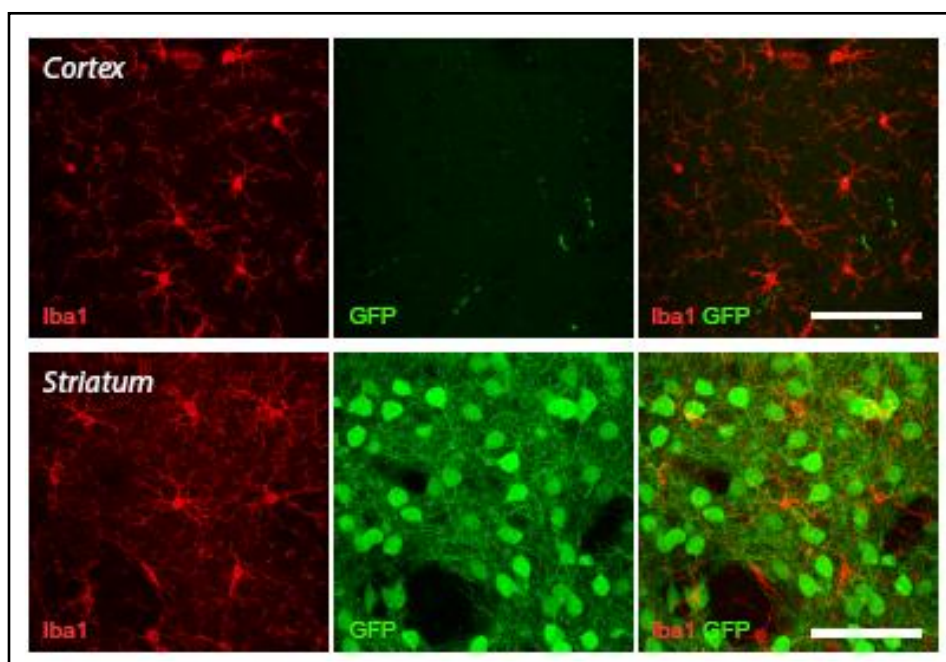
Vrlo mali broj kortikalnih interneurona je pokazao jaku izraženost GFP-a (**Slika 26**). Navedeni su interneuroni smješteni uglavnom u dubljim kortikalnim slojevima (V i VI) i rjeđe u subkortikalnoj bijeloj tvari. Iznimno su pojedinačni interneuroni bili vidljivi u površnim kortikalnim slojevima. Nadalje, dvostrukim imunofluorescentnim bojanjem protutijelima za glijalne markere Iba1 i GFAP nije potvrđena kolokalizacija navedenih glijalnih markera i GFP, što ukazuje da mikroglija i astrociti ne izražavaju DR2 u *Drd2*-EGFP transgeničnim miševima (**Slike 27 i 28**).



Slika 26. Izražaj dopaminskih D2 receptora u prefrontalnom korteksu transgeničnog *Drd2*-EGFP miša. Na slici A vidljivi su kortikalni slojevi prikazani bojanjem staničnih jezgara pomoću DAPI. Neuron koji izražavaju DR2 nalaze se pretežno u dubljim slojevima korteksa i subkortikalnoj bijeloj tvari (B). Dužna mjerka 250 μ m. Na slici C prikazan je DR2-pozitivni neuron u V sloju, a na slici D prikazan je DR2-pozitivni interneuron u subkortikalnoj bijeloj tvari. Dužna mjerka 200 μ m.

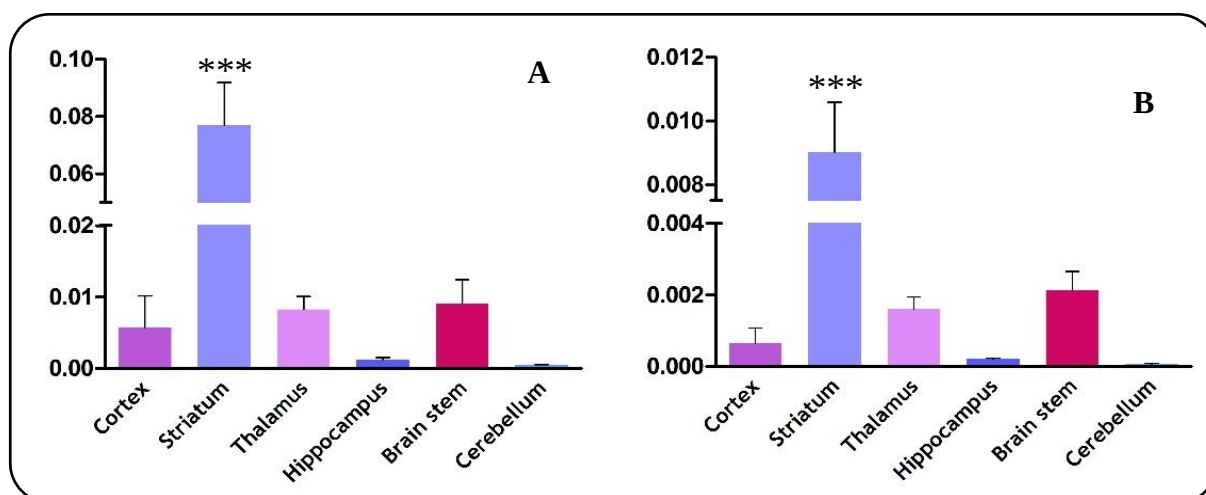


Slika 27. Astroцити ne izražavaju DR2 u mozgu transgeničnog Drd2-EGFP miša. U prefrontalnom korteksu i strijatumu vidi se na nema podudarnosti astrocitnog biljega GFAP i izraženosti DR2. Dužna mjerka 100 μ m.

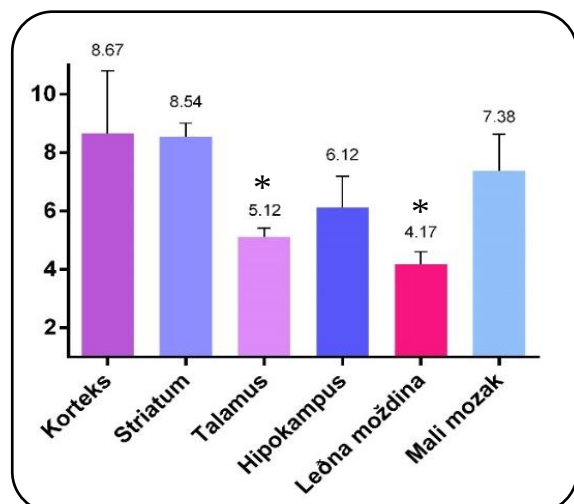


Slika 28. Stanice mikroglije ne izražavaju DR2 u mozgu transgeničnog Drd2-EGFP miša. U prefrontalnom korteksu i strijatumu vidi se na nema podudarnosti mikroglijalnog biljega Iba1 i izraženosti DR2. Dužna mjerka 100 μ m.

Anatomske podatke o raspodjeli DR2 u mozgu miša upotpunjeni su kvantitativnim podacima pomoću metode qRT-PCR. Disekcijom pod mikroskopom na pothlađenoj podlozi izolirani su korteks, strijatum, talamus, hipokampus, moždano deblo i mali mozak, nakon čega je proveden qRT-PCR za dugu (D2L) i kratku (D2S) varijantu dopaminskog D2 receptora. Prema očekivanju, obje varijante DR2 su bile statistički značajno jače izražene u strijatumu u odnosu na ostale regije mozga (**Slika 29**). D2L je u svim regijama mozga bio oko 10 puta jače izražen u odnosu na D2S. Omjer D2L i D2S bio je satistički značajno niži u leđnoj moždini i talamusu, što ukazuje na relativno jaču izraženost D2S u tim područjima u odnosu na korteks, strijatum i ostale analizirane regije (**Slika 30**).



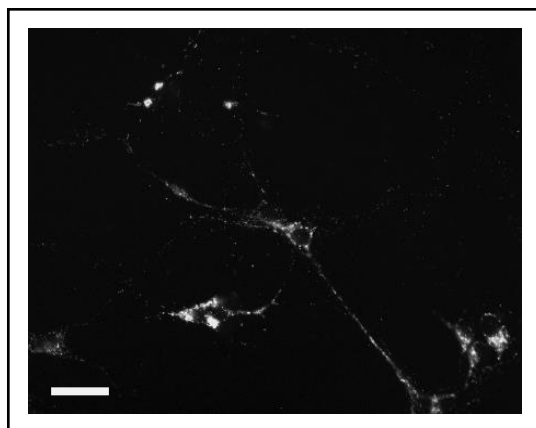
Slika 29. Izražaj D2L (A) i D2S (B) u različitim područjima mozga miša. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Za analizu je korištena jednosmjerna ANOVA i Tukeyjev test višestruke usporedbe ($p < 0.001$)



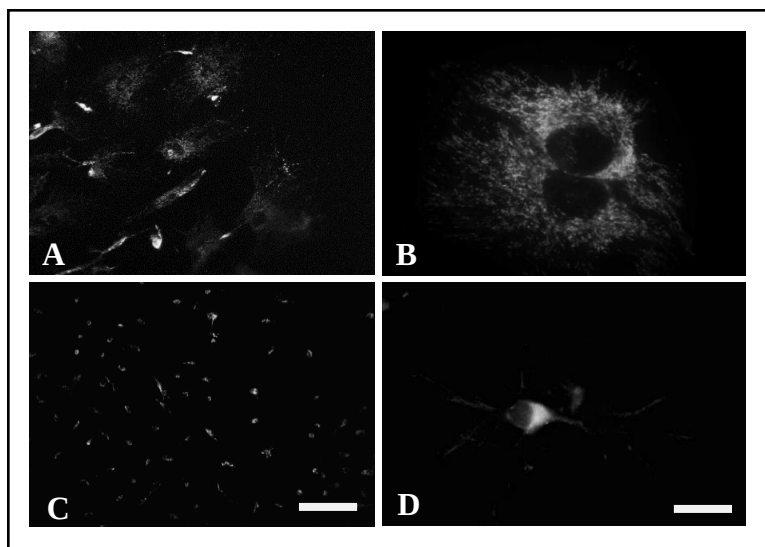
Slika 30. Omjer izražaja D2L i D2S u različitim područjima mozga miša. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Za analizu je korištena jednosmjerna ANOVA i Tukeyjev test višestruke usporedbe ($p < 0.01$)

6.4. Izražaj DR2 u staničnim kulturama i unutarstanična lokalizacija

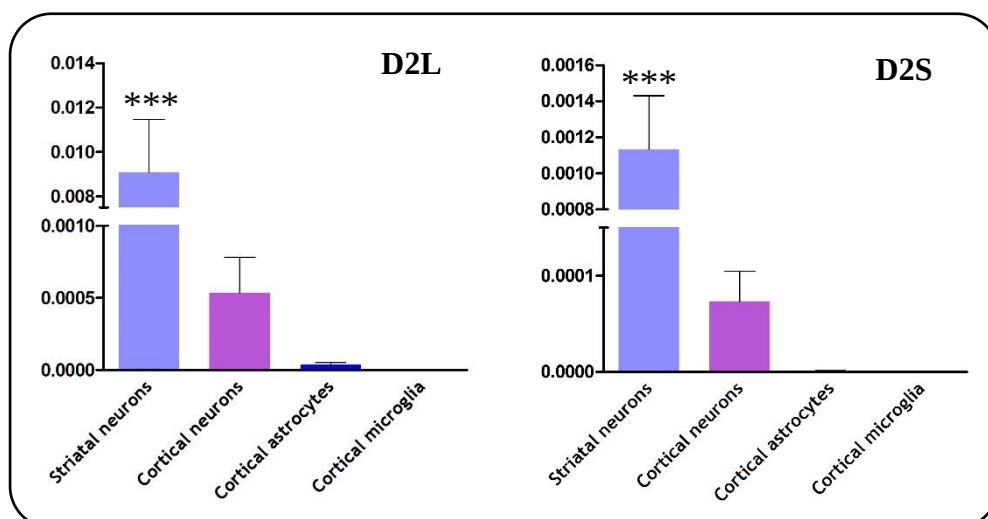
Da bi se detaljnije istražio stanični raspored dopaminskih D2 receptora, provedeni su pokusi na različitim staničnim kulturama. Imunofluorescentnim bojanjem istražena je izraženost DR2 u primarnim staničnim kulturama kortikalnih i strijatalnih neurona, astrocita i mikroglijalnih stanica mozga miša. Pretežno unutarstanična imunoreaktivnost mogla se vidjeti u sve tri vrste stanica (**Slike 31 i 32**). Nadalje, izraženost DR2 u tim stanicama je istražena i potvrđena na molekularnoj razini qRT-PCR postupkom. Prema očekivanju, pokazalo se da je mRNA za DR2 značajno jače izražena u primarnim strijatalnim u odnosu na kortikale neurone (**Slika 33**). U kulturama glijne stanice je razina mRNA za DR2 bila vrlo niska, pri čemu je u astrocitima bila viša u odnosu na mikrogliju (**Slika 34**). Taj se nalaz podudara s prethodno opisanim rezultatima dobivenim imunohistokemijom na preparatima mozga miša.



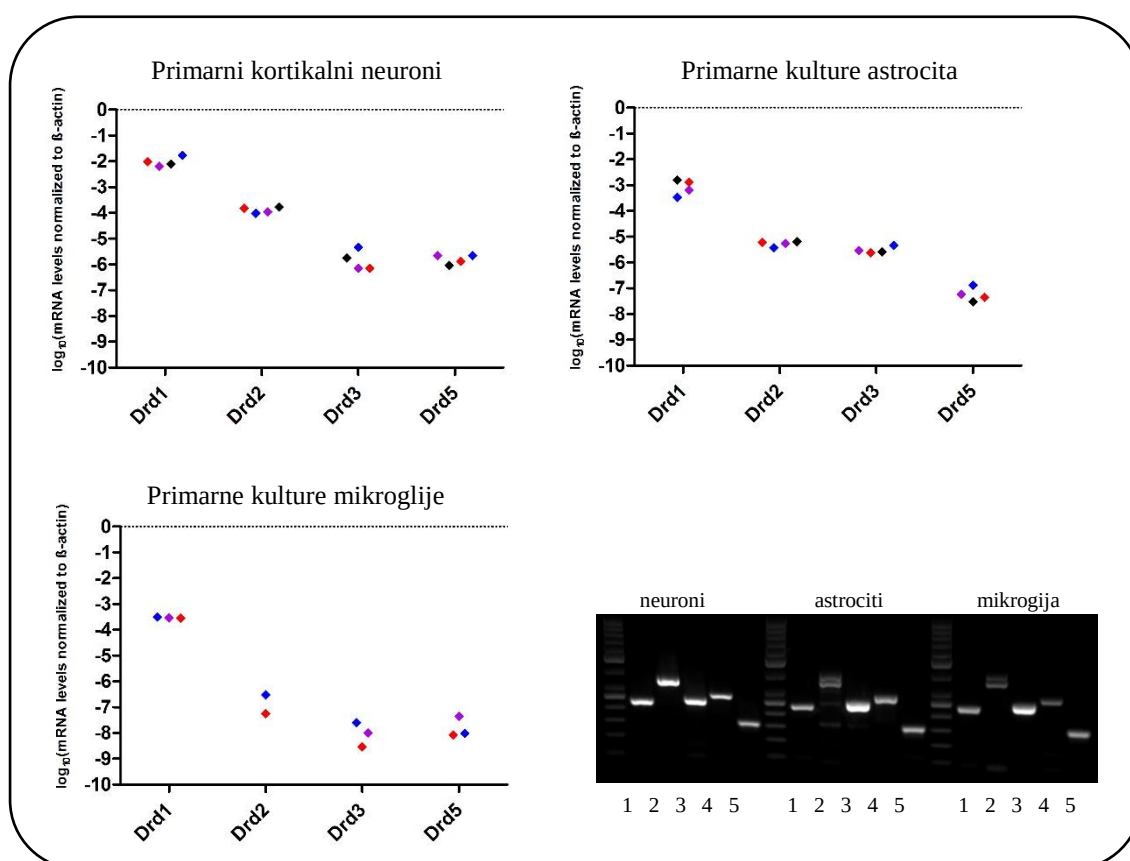
Slika 31. Izražaj DR2 u primarnim kortikalnim neuronima miša. DR2 imaju značajnu citoplazmatsku lokalizaciju u tijelu neurona i njegovim staničnim nastavcima. Dužna mjerka 20 µm.



Slika 32. Izražaj DR2 u primarnim kulturama astrocita (A i B) i stanica mikroglije (C i D). Kao i u neuronima, DR2 imaju značajni citoplazmatski raspored. Dužna mjerka na slikama A i C 40 µm, na slikama B i D 10 µm.

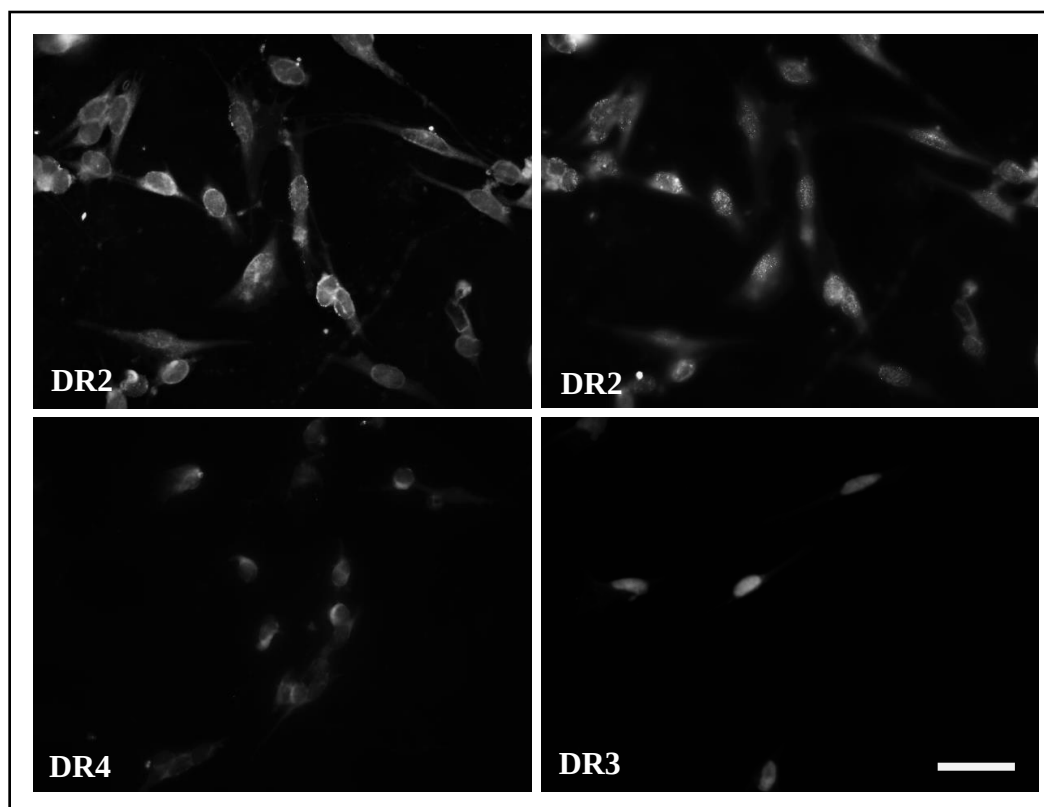


Slika 33. Izražaj D2L i D2S u primarnim kulturama strijatalnih i kortikalnih neurona, te astrocita i mikroglijalnih stanica miša. Za analizu je korištena jednosmjerna ANOVA i Tukeyjev test višestruke usporedbe ($p < 0.001$).



Slika 34. Izražaj dopaminskih DR1, DR2, DR3 i DR5 u primarnim kulturama kortikalnih neurona, astrocita i mikroglijalnih stanica miša izmjenjenih pomoću qRT-PCR. DR1 imaju značajno veću izraženost u odnosu na receptore skupine DR2. Pritom su u svim kulturama stanica DR2 jače izraženi od DR3. U desnom donjem kutu prikazan je gel odgovarajućih reakcija PCR.

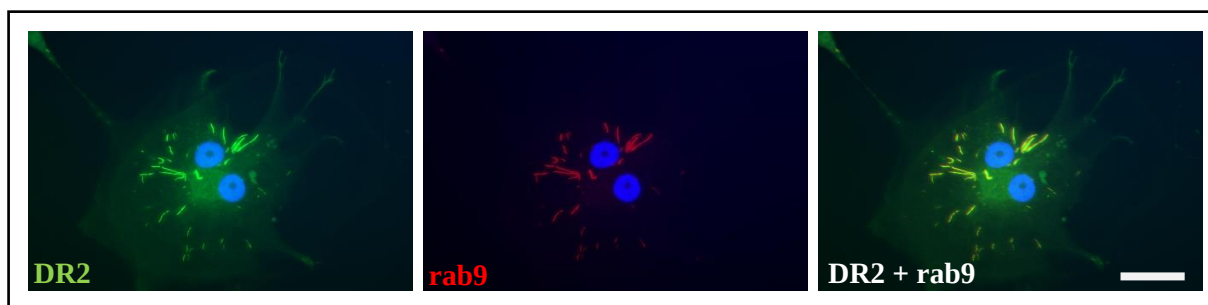
Stanične kulture neuroblastoma SY5Y obilježene su imunofluorescentnom metodom na DR2, DR3 i DR4. Receptori DR2 su pokazali značajno jaču imunoreaktivnost u odnosu na DR4, dok DR3 praktički nije pokazao reaktivnost (**Slika 35**). Receptori su bili raspoređeni na staničnoj membrani i u citoplazmatskim vezikulama. Osim toga, na staničnim kulturama NT2 provedeno je dvostruko obilježavanje na DR2 i biljeg kasnih endosoma rab9, čime je pokazano da su DR2 unutar stanice pohranjeni u kasnim endosomima (**Slika 36**). Osim u tijelu NT2 stanica, imunoreaktivnost se mogla vidjeti u obliku vezikula i u staničnim nastavcima (**Slika 37**).



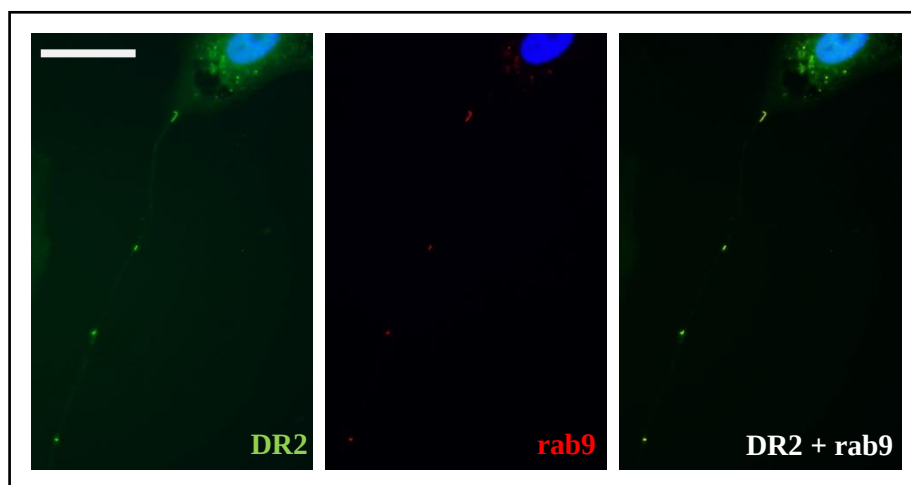
Slika 35. Imunofluorescentno bojanje staničnih kultura SY5Y protutijelima na DR2, DR2 I DR4. DR2 u pokazuju odnosu na ostale receptore najjaču izraženost. Receptori se nalaze na staničnoj membrani i u vezikulama u citoplazmi. Dužna mjerka 20 μm .

Istraživanje stanične raspodjele DR2 na staničnim kulturama izvršeno je u pokusima u kojima je konstrukt koji sadrži mRNA za fluorescentni protein vezan za D2L ili D2S, te transficiran u primarne kortikalne neurone miša. Na taj se način moglo prikupiti dodatne podatke o mogućoj razlici u staničnoj raspodjeli D2LD2L i D2S, ali i unutarstaničnoj i vezikularnoj lokalizaciji navedenih receptora. Na **Slici 25** je vidljivo da se D2L i D2S

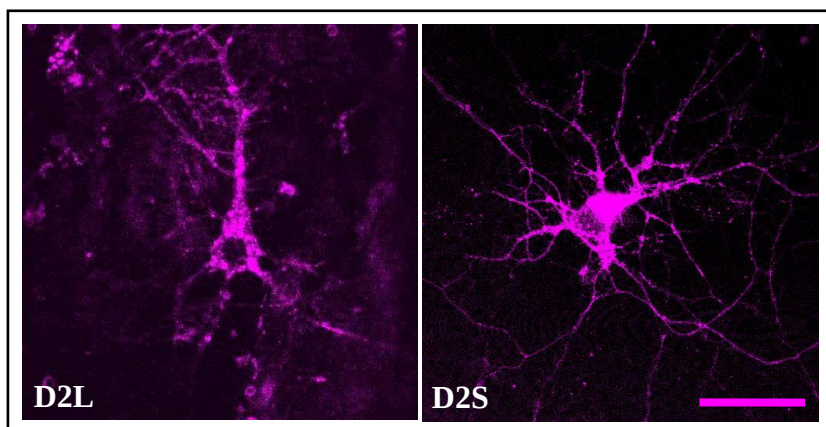
pretežno nalaze u vezikulama u tijelu neurona, a manjim dijelom na membrani stanice i staničnih nastavaka. Nadalje, metodom mikroskopije u stvarnom vremenu (eng. *real-time imaging*) pokazalo se da vezikule koje sadrže D2L i D2S vrlo dinamično putuju iz staničnog tijela distalno u stanične nastavke i obrnuto.



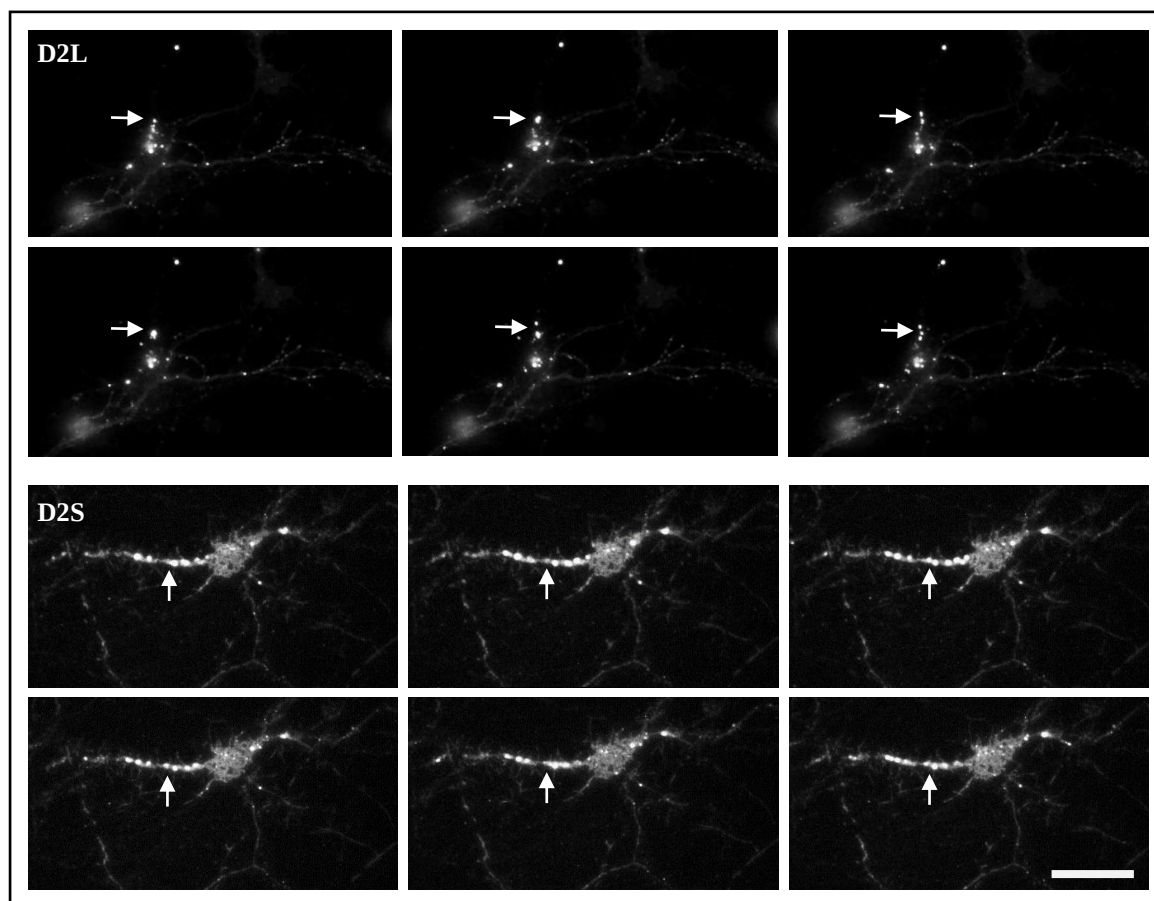
Slika 36. Imunofluorescentno bojanje staničnih kultura NT2 protutijelima na DR2 i rab9. DR2 su smješteni pretežno u kasnim endosomima u tijelu NT2 stanica. U značajno manjoj mjeri receptori su smješteni na membrani staničnih nastavaka. Dužna mjerka 20 μm .



Slika 37. Imunofluorescentno bojanje staničnih kultura NT2 protutijelima na DR2 i rab9. Na slici su prikazani DR2 koji se nalaze u staničnim nastavcima u kasnim endosomima (čiji je biljeg rab9). Dužna mjerka 20 μm



Slika 38. Ekspresija D2L i D2S u primarnim kortikalnim neuronima transficiranim konstruktom koji sadrži fluorescentni protein vezan za D2L i D2S. Tim pokusom potvrđena je pretežna lokalizacija tih receptora u citoplazmatskim vezikulama neurona. Membranska lokalizacija je značajno manje zastupljena. Dužna mjerka 20 μm .



Slika 39. Sekvence mikroskopije u stvarnom vremenu primarnih kortikalnih neurona transficiranih s D2L i D2S. Dopaminski D2 receptori se vezikulama prenose staničnim nastavcima iz tijela neurona prema periferiji, ali i u obrnutom smjeru. Strelicama su označena mjesta gdje se najbolje vidi protok vezikula s dopaminskim receptorima. Dužna mjerka 25 μm .

7. RASPRAVA

7.1. Laminarna raspodjela DR2 u prefrontalnom korteksu

Dopaminska inervacija prefrontalnog korteksa opisana je krajem 80-tih godina prošlog stoljeća pomoću imunohistokemijske metode protutijelima na enzim tirozin-hidroksilazu (TH). Premda postoji mnogo sličnosti u dopaminergičkoj inervaciji mozga miša i čovjeka, usporedba regionalne i laminarne inervacija korteksa pokazuje jasne razlike (142-145). Općenito je u odnosu na mozak glodavaca, dopaminergička opskrba korteksa primata i čovjeka gušća. U mozgu primata prvi kortikalni sloj ima mnogo izraženiju dopaminergičku inervaciju (144, 146). Nadalje, TH-imunoreaktivnost u prefrontalnom korteksu (BA9 i BA46) pokazuje bilaminarnu dopaminsku inervaciju – ona je najizraženija između prvog i površnog trećeg sloja te u petom i šestom sloju (144, 147). Veći broj dopaminergičkih završetaka u III sloju korteksa primata ukazuje da dopamin modulira kortikalno-kortikalna asocijacijska vlakana. Osim toga, inervacijom infragranularnih slojeva (V i VI), dopamin utječe i na subkortikalne projekcije prefrontalnog korteksa poput prefrontostrijatalnih i prefrontotalamičkih projekcija. Rezultati laminarne raspodjele dopaminskih receptora prikazani u ovom doktorskom radu u skladu s opisanom dopaminskom inervacijom prefrontalnog korteksa. Dopaminski D2 receptori pokazali su naime bilaminarnu raspodjelu, pri čemu je DR2 bio jače izražen u III, a DR4 u V-VI kortikalnom sloju. DR3 je bio značajno slabije izražen, što se podudara s poznatim nalazima na mozgu glodavaca. Što se tiče stanične raspodjele, treba istaknuti da su DR2 i DR4 bili pretežno izraženi na piramidnim neuronima. Izraženost DR2 na interneuronima bila je mnogo manja. S obzirom da je interneurone, za razliku od piramidnih stanica, morfološki teže raspoznati, nalaz je potvrđen dvostrukim imunofluorescentnim bojanjem na DR2 i parvalbumin (PV), biljeg najbrojnije podskupine GABAergičkih interneurona. Taj je nalaz značajan jer ukazuje da dopamin, kao modulacijski neurotransmiter, svoju modulacijsku funkciju provodi i utjecajem na interneurone, čija je uloga održavanje ravnoteže između ekscitacijskih i inhibicijskih signala koji ulaze u prefrontalni korteks. Ovdje je zanimljivo spomenuti i mogući klinički značaj navedenog nalaza. Osim dobro poznate hipoteze o ulozi dopaminskog sustava u patogenezi shizofrenije, mnogobrojna istraživanja posljednjih godina potvrdila su i poremećaj funkcije GABAergičkih interneurona u prefrontalnom korteksu bolesnika sa shizofrenijom (148-151).

7.2. Odnos izražaja mRNA i proteina za DR2

U rezultatima je vidljivo da je proteinski produkt gena *DR2* u PFC čovjeka prikazan imunohistokemijskom metodom prisutan, dok je istovremeno razina odgovarajuće mRNA izrazito niska. Osim toga, ovdje treba uzeti u obzir i vrlo značajan rezultat ovog rada – da su DR2 pretežno pohranjeni u citoplazmatskim vezikulama. Naizgled neobično niska razina mRNA može se protumačiti na sljedeći način. Reakcija ciljnih stanica na aktivaciju dopaminskog sustava je mnogo brža ako zaliha dopaminskih receptora postoji u obliku proteina u vezikulama. One se nakon početnog vezanja dopamina na postsinaptičke receptore u vrlo kratkom roku mogu stopiti sa staničnom membranom, pri čemu pohranjeni receptori bivaju eksternalizirani. U prilog navedenom objašnjenju idu i rezultati stanične mikroskopije *in vivo*, koji su pokazali vrlo dinamično kretanje vezikula s DR2 iz staničnog tijela u stanične nastavke i obrnuto.

7.3. DR2 na glija stanicama

Koristeći imunohistokemijsku metodu, u našem istraživanju smo pokazali da astrociti u prvom kortikalnom sloju mozga čovjeka, ali ne i mozga miša, izražavaju DR2. Time je pokazano da u mozgu čovjeka dopaminski sustav modulira djelovanje neuronskih mreža ne samo putem apikalnih dendrita u prvom sloju (čije se piramidne stanice nalaze u nižim kortikalnim slojevima), nego i vezanjem na receptore na astrocitima. Navedeni je nalaz značajan iz više razloga. Astrociti su važni u metabolizmu neurona i homeostazi izvanstaničnog matriksa. Osim toga, poznato je da astrociti svojim staničnim nastavcima obavijaju sinapsu i time direktno reguliraju funkciju neurona i njihovu sinaptičku aktivnost. S obzirom da astrociti imaju veliki broj staničnih nastavaka, oni utječu na veći broj sinapsi u svojoj okolini. Stoga se smatra da astrociti osim što moduliraju aktivnost pojedinih sinapsi, mogu i integrirati aktivnost susjednih sinapsi. U prilog integrativnoj funkciji astrocita govori i relativno dugotrajna aktivnost astrocita – dok se sinaptička neurotransmisija odvija brzo (na razini milisekundi), djelovanje astrocita na fiziologiju neurona traje više sekundi.

Izražaju DR2 u stanicama mikroglije do sada je pridavano malo pažnje, a dosadašnji nalazi su oprečni. Do sada je u primarnim mikroglijalnim kulturama štakora zabilježen izražaj DR1, DR2, DR4 i DR5, dok su u primarnim mikroglijalnim kulturama miša zabilježeni samo DR1 i DR5 (152). Nasuprot tome, rezultati ovog istraživanja pokazali su da i primarne kulture stanice mikroglija miša izražavaju DR2. Njihov je izražaj međutim puno slabiji u odnosu na kulture astrocita. Za razliku od primarnih kultura stanica, *in vivo* mikroglija u mozgu miša nije pokazala izraženost DR2. Navedeni nalaz potvrđen je i analizom mozga transgeničnog

Drd2-EGFP miša. Moguće objašnjenje navedenog nalaza je da se mikroglija u kulturi stanica aktivira, pri čemu aktivirana mikroglija izražava DR2. Tome u prilog govore i nedavno objavljeni rezultati (153), koji ukazuju da za razliku od mikroglije u mirovanju, ona aktivirana ishemičnom ozljedom mozga miša izražava DR2.

7.4. Stanična lokalizacija DR2

Kada se govori o funkciji i lokalizaciji neurotransmitorskih receptora, uvriježeno je mišljenje da se oni nalaze na staničnoj membrani, gdje stoje na raspolaganju za vezanje liganda i posljedično pokretanje kaskade unutarstanične signalizacije. Međutim, u ovom radu se imunohistokemijskom i imunofluorescentnom analizom prefrontalnog korteksa čovjeka pokazalo da su DR2 na staničnoj razini pretežito raspoređeni u citoplazmatskim vezikulama, a u manjoj mjeri na membrani neurona. Da bi se razjasnio taj neočekivani nalaz, provedeni su pokusi na raznim staničnim kulturama – SY5Y, NT2, primarnim kortikalnim neuronima te primarnim astrocitima i mikroglija stanicama miša. I u staničnim kulturama se pokazalo da se DR2 pretežno nalaze u citoplazmatskim vezikulama koje su lokalizirane perinuklearno, u području gdje se nalazi Golgijev retikulum i endosomski sustav. Dvostrukom imunofluorescencijom pokazalo se da navedene vezikule izražavaju protein Rab9, koji predstavlja biljeg kasnih endosoma. U staničnim kulturama NT2 kasni endosomi koji sadrže DR2 mogli su se naći i u ponekim staničnim nastavcima. Navedeni nalaz upućuje na mogućnost da se DR nakon internalizacije u značajnoj mjeri pohranjuju u kasnim endosomima. To je od posebne važnosti za dopaminske DR2 receptore, čija se internalizacija (za razliku od nekih drugih receptora) u velikoj mjeri odvija konstitutivno, tj. bez vezanja dopamina ili njegovih agonista za receptor. Osim toga, poznato je da se veliki dio internaliziranih receptora vraća na staničnu membranu. Nakon otpuštanja dopamina u sinaptičku pukotinu, pohranjeni receptori mogu prema potrebi relativno brzo doći staničnu površinu fuzijom endosoma sa staničnom membranom. Opisani nalazi o staničnoj raspodjeli DR2 su upotpunili i potvrdili rezultate rijetkih prethodnih istraživanja koja su ukazivala na moguću značajnu unutarstaničnu lokalizaciju dopaminskih receptora (76, 138).

Kretanje endosomskih vezikula je dinamičan proces koji je teško prikazati metodom imunofluorescencije. Osim toga, dopaminski receptori su u staničnim kulturama relativno slabo izraženi, što dodatno otežava njihov kvalitetan prikaz na (unutar)staničnoj razini. Iz navedenih razloga su za detaljniju analizu unutarstanične lokalizacije DR2 korišteni i primarni kortikalni neuroni miša transficirani *Drd2* genom čovjeka (vezanim za fluorescentni protein) i pojačano eksprimiranim pod utjecajem β -aktinskog promotora. Pokusima na

navedenom staničnom modelu potvrđena je pretežno citoplazmatska lokalizacija DR2. Osim toga, pokazalo se da je unutarstanično kretanje DR2 vrlo dinamičan proces. Navedeni nalaz ukazuje da ciljne stanice, koje sadrže DR2, mogu vrlo brzo reagirati na endogenu aktivaciju dopaminskog sustava dopaminom ili egzogeno pod utjecajem psihofarmaka.

7.5. Razlike u izražaju D2L i D2S

Rezultati rada su pokazali da je D2L u svim vrstama stanica (neuronima, astrocitima i mikroglija stanicama) značajno jače izražen u odnosu na D2S. Osim toga, analizom korteksa, talamusa, hipokampusa, strijatuma i moždanog debla miša pomoću RT-qPCR postupka pokazano je da D2L prevladava u svim analiziranim regijama mozga. Prema očekivanju i u skladu s podacima iz literature, u moždanom deblo je omjer ekspresije D2L / D2S bio značajno niži u odnosu na ostale dijelove mozga. To ukazuje na relativno jaču izraženost D2S i njegovu značajniju ulogu u moždanom deblo. Taj nalaz se može objasniti funkcijom D2S kao autoreceptora ili presinaptičkog receptora na dopaminergičkim stanicama moždanog debla. Zanimljivo je istaknuti da je D2S pokazao značajno jaču izraženost i u talamusu, premda ne u tolikoj mjeri kao u moždanom deblo. U prethodno opisanim pokusima transfekcije DR2 u primarne kulture kortikalnih neurona nije bilo vidljive razlike u rasporedu ili protoku D2L i D2S na staničnoj razini.

7.6. Razlike u izražaju DR2 u prefrontalnom korteksu čovjeka i miša

Za razliku od mozga čovjeka, imunohistokemija i imunofluorescencija za DR2 je u prefrontalnom korteksu miša pokazala mnogo slabiju ekspresiju, zbog čega je bilo teško prepoznati moguću specifičnu slojevenu raspodjelu DR2. Dvostrukim bojanjem na parvalbumin (PV) pokazalo se da su DR2 izraženi i u PV-pozitivnim interneuronima. Imunoreaktivnost za DR2 se nije mogla vidjeti na astrocitima i glija stanicama. Na staničnoj razini se isticala vezikularna, tj. citoplazmatska raspodjela DR2, čime su potvrđeni nalazi na mozgu čovjeka.

S obzirom na neočekivano slabu izraženost DR2 na razini proteina, istraživanje je prošireno na Drd2-EGFP transgenične miševe. Na nativnim preparatima mozga transgeničnih miševa, kao i imunofluorescencijom protutijelom na GFP (čime su obilježeni DR2) potvrđeno je da su DR2 vrlo slabo izraženi u korteksu miša. Zanimljivo je da su na tim preparatima bili vidljivi rijetki DR2-pozitivni neuroni pretežno raspoređeni u dubokim kortikalnim slojevima (V-VI) i u subkortikalnoj bijeloj tvari, a u pojedinim slučajevima u površnim kortikalnim slojevima. DR2-pozitivni neuroni su morfološki nalikovali interneuronima. I na tim

preparatima nisu bile vidljive glija stanice koje izražavaju DR2. Kao interna pozitivna kontrola, poslužila je izrazito jaka imunoreaktivnost neurona strijatuma, te relativno dobra izraženost DR2 u neuronima hilusa hipokampusa.

Kao što je prethodno spomenuto, izraženost i raspodjela DR2 u prefrontalnom korteksu čovjeka i miša se u ovom radu razlikovala. Činjenica da su DR2 značajno jače izraženi u prefrontalnom korteksu čovjeka, upućuje i na značajniju dopaminergičku inervaciju u toj regiji. Navedeni nalaz odgovara poznatoj činjenici da je dopaminergička inervacija prefrontalnog korteksa, prikazana gustoćom TH-pozitivnih vlakana, izraženija u mozgu čovjeka u odnosu na primate i ostale vrste (144, 146). Osim toga, i dopaminergički TH-pozitivni interneuroni, posebno brojniji su u prefrontalnom korteksu čovjeka (154). Zanimljivo je da se oni pretežno nalaze u V i VI kortikalnom sloju te subkortikalnoj bijeloj tvari, čime su lokalizirani upravo u slojevima korteksa gdje su vidljivi DR2-pozitivni neuroni u EGFP-Drd2 transgeničnom mišu.

Zaključno, izraženija dopaminergička inervacija i ekspresija DR2 u prefrontalnom korteksu čovjeka u odnosu na miša, ukazuje i na značajniju ulogu dopamina u modulaciji viših kortikalnih funkcija (opisanih u uvodu), čija se anatomska i biološka podloga nalaze upravo u prefrontalnom korteksu. Taj se nalaz može staviti u kontekst potrebe za preciznijom modulacijom sve složenijih neuronskih mreža o kojima ovise prethodno opisane funkcije mozga. S druge strane, cijena evolucijskog napretka (engl. *evolutionary trade-off*) kroz usložnjavanje kortikalnog procesiranja, napose prefrontalne moždane kore, jesu i psihičke i neurološke bolesti, u ovom slučaju povezane s poremećajem funkcija dopaminskog sustava.

8. ZAKLJUČCI

1. Dopaminski receptori DR2 i DR4 su jače izraženi u odnosu na DR3 u dorzolateralnoj, orbitomedijalnoj i medijalnoj prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka. Navedeni receptori imaju bilaminarnu raspodjelu i najjače su izraženi u piramidnim kortikalnim slojevima, pri čemu su DR2 posebno izraženi u III, a DR4 u V kortikalnom sloju.
2. Astrociti u prvom kortikalnom sloju i u subkortikalnoj bijeloj tvari prefrontalnog korteksa čovjeka izražavaju DR2. Za razliku od toga, mikroglija nije pokazala imunoreaktivnost na DR2.
3. Na staničnoj razini, DR2 su većim dijelom pohranjeni u kasnim endosomima, a manjim dijelom se nalaze na staničnoj membrani.
4. U prefrontalnom korteksu čovjeka DR2 je puno jače izražen u odnosu na prefrontalni korteks miša.
5. D2L prevladava u svim analiziranim regijama mozga miša - korteksu, strijatumu, hipokampusu, talamusu i moždanom deblu. D2S je relativno jače izražen u moždanom deblu, što ukazuje na njegovu presinaptičku funkciju. D2L i D2S imaju sličan obrazac unutarstanične lokalizacije.

9. SAŽETAK

Raspodjela i izraženost dopaminskih D2 receptora u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša

Mihovil Mladinov, disertacija, 2016.

Istraživanje dopaminskog sustava ključno je za razumijevanje normalnog ljudskog ponašanja, kao i mnogih psihijatrijskih i neuroloških bolesti. Međutim, podatci o raspodjeli dopaminskih D2 receptora (DR2) u neuronima prefrontalnog korteksa čovjeka su nepotpuni, a rezultati izražaja DR2 u potpornim (glija) stanicama su oprečni. Nadalje, izraženost i stanična i subcelularna lokalizacija dugog (D2L) i kratkog (D2S) izo-oblika DR2 u moždanom tkivu čovjeka i miša te u staničnim modelima do sada još nisu istražene.

U ovom doktorskom radu imunohistokemijskom i imunofluorescentnom metodom prikazana je slojevna i stanična raspodjela D2 skupine receptora u dorzolateralnoj, orbitomedijalnoj i medijalnoj prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka. Dopaminski DR2 i DR4 receptori su bili značajno jače izraženi u odnosu na DR3 u svim regijama. Što se tiče slojevine raspodjele, DR2 i DR4 su pokazali bilaminarnu raspodjelu i bili posebno izraženi u piramidnim slojevima korteksa. Pritom su DR2 bili nešto izraženiji u III, a DR4 u V-VI kortikalnom sloju. Na staničnoj razini, DR2 su bili pretežno izraženi na piramidnim neuronima, a značajno manje interneuronima. Od glija stanica, astrociti prvog sloja i subkortikalne bijele tvari su pokazali značajnu DR2-imunoreaktivnost. Nasuprot uobičajenom mišljenju da su neurotransmitorski receptori pretežno izraženi na staničnoj membrani, ovdje se pokazalo da se DR2 u velikoj mjeri nalaze u citoplazmatskim vezikulama. Navedeni je nalaz potvrđen i proširen pokusima na primarnim kulturama kortikalnih neurona miša i staničnim kulturama SY5Y i NT2. Nadalje, transfekcijom primarnih neuronskih kultura genskim konstruktom za fluorescentno obilježene D2L i D2S pokazalo se da je kretanje navedenih receptora vrlo dinamičan proces.

Osim toga, razina mRNA za D2L i D2S kvantitativno je istražena metodom mikropostroja u dorzolateralnoj i orbitomedijalnoj regiji korteksa čovjeka. Tom metodom razina mRNA za navedene receptore nije bila mjerljiva. Pokusi provedeni na uzorcima mišjeg mozga pomoću qRT-PCR pokazali su da je u svim analiziranim regijama (korteks, strijatum, talamus, hipokampus, moždano deblo) D2L jače izražen u odnosu na D2S. Međutim, D2S je u moždanom deblu i talamusu relativno jače izražen u odnosu na ostale regije, što ukazuje na njegovu presinaptičku funkciju. Zaključno, ovi rezultati ukazuju na aktivnu ulogu astrocita

koji izražavaju receptore za DR u PFC. Shodno tome, može se zaključiti da izraženost DR ne samo na neuronima, nego i na glija stanicama može imati kliničke implikacije s obzirom na djelovanje PFC i njegove poremećaje u shizofreniji, bolestima ovisnosti, depresiji i drugim psihopatološkim stanjima.

10. SUMMARY

Localization and expression of the dopamine D2 receptors in the prefrontal cortex of man and mouse

Mihovil Mladinov, Ph. D. Thesis, 2016.

The brain dopamine systems are of key importance for understanding human behavior as well as various psychiatric and neurological disorders. The existing studies showed inconclusive evidence for the expression of D2 dopaminergic receptors (DR2) using specific monoclonal antibodies in the human prefrontal cortex. Additionally, there have been contradictory reports in relation to the expression pattern of D2R in glial cells and subcellular localization of the long (D2L) and short (D2S) mRNA isoforms of *DR2* have not been elucidated in the human brain.

In this study we investigated the layer- and cell-specific localization and distribution of DR2 in the dorsolateral, orbitomedial and medial prefrontal human cortex. Dopamine DR2 and DR4 receptors had stronger expression than DR3 in all regions. DR2 and DR4 showed a bilaminar distribution pattern and were particularly expressed in the pyramidal cortical layers III and V. However, DR2 had stronger expression in layer III, whereas DR4 in layer V-VI. At the cellular level, DR2 were predominantly expressed in pyramidal neurons, although some interneurons also showed DR2-immunopositivity. Surprisingly, astrocytes localized in layer I and subcortical white matter showed significant DR2 expression. Contrary to previous findings, which localize DR2 to the cell membrane, we found a more distinct vesicular localization in the cytoplasm. This finding was repeatedly confirmed through experiments on mouse primary cortical cultures, as well as SY5Y and NT2 cell cultures. Moreover, transfection of D2L and D2S into primary neuronal cultures showed a dynamic trafficking of these receptors.

The mRNA expression of the long and short isoform of *DR2* in the human dorsolateral and orbitomedial prefrontal cortex was assessed by using microarray chips. Although the expression of mRNA for both isoforms was not detectable, we analyzed various mouse brain regions (cortex, striatum, thalamus, hippocampus, brain stem) with qRT-PCR and showed that D2L had a stronger expression than D2S in all brain regions. However, D2S had a relatively stronger expression in brain stem and thalamus, indicating its presynaptic function. In conclusion, these results suggest an active role of astrocytes expressing dopaminergic receptors in the human PFC. Consequently, alterations of not only neuronal, but also glial DR

expression may have clinical implications with respect to function of PFC and its disturbances in schizophrenia, drug abuse, depression and other psychopathological states.

.

11. LITERATURA

1. Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia. From Pathophysiology to Treatment. *Ann NY Acad Sci* 2003;1003:138-58.
2. Lang UE, Puls I, Müller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular Mechanisms of Schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:687-702.
3. Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia – a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol* 2007;21:440-52.
4. Knable MB, Weinberger DR. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. *J Psychopharmacol* 1997;11:123-31.
5. Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:243–51.
6. Self DW, Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci* 1995;18:463-95.
7. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM, Telang F. Dopamine in Drug Abuse and Addiction. *Arch Neurol* 2007;64:1575-9.
8. Goldberg TE, Maltz A, Bow JN, Karson CN, Leleszi JP. Blink rate abnormalities in autistic and mentally retarded children: relationship to dopaminergic activity. *J Am Child Adolesc Psychiatry* 1987;26:336-8.
9. Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Pascualvaca D, Cohen RM. Low medial prefrontal dopaminergic activity in autistic children. *Lancet* 1997;350:638-9.
10. Lam KSL, Aman MG, Arnold LE. Neurochemical correlates of autistic disorder: A review of the literature. *Res Dev Disabil* 2006;27:254-89.
11. Jimerson DC. Role of dopamine mechanisms in affective disorders. U: Meltzer HY, ur. *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. New York: Raven Press; 1987. str. 505-11.
12. Park SK, Nguyen MD, Fischer A i sur. Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* 2005;122(2):275-87.
13. Montgomery SA. The under-recognized role of dopamine in the treatment of major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 2008;23(2):63-9.
14. LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB i sur. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1996;1(2):21-4.
15. Smalley SL, Bailey JN, Palmer CG i sur. Evidence that the dopamine D4 receptor is a susceptibility gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1998;3(5):427-30.

16. Swanson JM, Flodman P, Kennedy J i sur. Dopamine genes and ADHD. *Neurol Biobehav Rev* 2000;24:21-5.
17. Nieoullon A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* 2002;67:53-83.
18. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 1957;180:1200
19. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 1958;127:471
20. Bertler A, Rosengren E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 1959;15:10-11
21. Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 1959;11:490-3
22. Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des Extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr* 1960;38,1236-39.
23. Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1963;20:140-4.
24. Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976;192:481-3.
25. Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 1975;188:1217-9.
26. Verney C, Alvarez C, Geffard M, Berger B. Ultrastructural double-labelling study of dopamine terminals and GABA-containing neurons in rat anteromedial cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 1990;2:960-72.
27. Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M. Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9015-9.
28. Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA. Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* 1995;363:264-80.
29. monkey cortex. *J Comp Neurol* 1995;363:264-80.
30. Sesack SR, Hawrylak VA, Melchitzky DS, Lewis DA. Dopamine innervation of a subclass of local circuit neurons in monkey prefrontal cortex: ultrastructural analysis of

- tyrosine hydroxylase and parvalbumin immunoreactive structures. *Cereb Cortex* 1998;8:614-22.
31. Erickson SL, Sesack SR, Lewis DA. The dopamine innervation of monkey entorhinal cortex: postsynaptic targets of tyrosine hydroxylase terminals. *Synapse* 2000;36:47-56.
 32. Herkenham M. Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. *Neuroscience* 1987;23:1-38.
 33. Muly EC III, Szigeti K, Goldman-Rakic PS. D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. *J Neurosci* 1998;18:10553-65.
 34. Meng SZ, Obonai T, Takashima S. A developmental study of the dopamine D2R receptors in the human basal ganglia and thalamus. *Early Hum Dev* 1998;51:23-30.
 35. Pickel VM, Sesack SR. Electron microscopy of central dopamine systems. U: Bloom FE, Kupfer DJ, ur. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press; 1995, str. 257-68.
 36. Caillé I, Dumartin B, Bloch B. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatal neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.* 1996;730:17-31.
 37. Delle Donne KT, Sesack SR, Pickel VM. Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D2 receptor within GABAergic neurons of the rat striatum. *Brain Res.* 1997;746:239-55.
 38. Descarries L, Beaudet A, Watkins KC. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 1975;100:563-88.
 39. Descarries L, Watkins KC, Lapierre Y. Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res* 1977;133:197-222.
 40. Beaudet A, Descarries L. The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 1978;3:851-60.
 41. Descarries L, Mechawar N. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 2000;125:27-47.
 42. Jansson A, Descarries L, Cornea-Hébert V i sur. Transmitter-receptor mismatches in central dopamine, serotonin and neuropeptide systems. Further evidence for volume transmission. U: Walz W, ur. *The Neuronal Environment: Brain Homeostasis in Health and Disease*. Totowa: Humana Press; 2001. str. 83-108.
 43. Keibadian JW, Greengard P. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 1971;174:1346-9.

44. Keabian JW, Calne DB. Multiple receptors for Dopamine. *Nature* 1979;277:93-6
45. Caron MG, Beaulieu M, Raymond V i sur. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J Biol Chem* 1978;253:2244-53
46. Sokoloff P, Giros B, Martres MP i sur. Molecular cloning and characterisation of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990;347:146-51.
47. Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC i sur. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 1991;350:610-4.
48. Sunahara RK1, Guan HC, O'Dowd BF i sur. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 1991;350:614-9.
49. Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C i sur. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7491-5.
50. Keabian JW. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: a receptor mechanism for dopamine. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1978;19:131-54.
51. Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:299–321.
52. Missale C, Nash SR, Robinson SW i sur. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189–225.
53. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 2004;24:165–205.
54. Neve KA, Neve RL. Molecular biology of dopamine receptors. U: Neve KA, Neve RL, ur. *The dopamine receptor*. Totowa: Humana Press; 1997, str. 27-76.
55. Bunzow JR, Van Tol JJ, Grandy DK i sur. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988;336:783-87.
56. Gandelman KY, Harmon S, Todd RD, O'Malley KL. Analysis of the structure and expression of the human dopamine D2A receptor gene. *J Neurochem* 1991;56:1024-9.
57. Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR i sur. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 1989;342:926-9.
58. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:639–50.
59. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 1990;248:1547–50.

60. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:653–92.
61. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:107–44.
62. Premont RT. Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity. *Neuromolecular Med* 2005;7:129–47.
63. Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG. Beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem* 2002;277:9247–54.
64. Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:1095–110.
65. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53:1–24.
66. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 2002;66:61–79.
67. Claing A, Laporte SA. Novel roles for arrestins in G protein-coupled receptor biology and drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005;8:585–589.
68. Paspalas CD, Rakic P, Goldman-Rakic PS. Internalization of D2 dopamine receptors is clathrin-dependent and selective to dendro-axonic appositions in primate prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 2006;24:1395–403.
69. Hamm HE, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:189–96.
70. Namkung Y, Sibley DR. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 2004;279:49533–41.
71. Liu YF, Civelli O, Grandy DK, Albert PR. Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C. *J Neurochem* 1992;59:2311–7.
72. Morris SJ, Van-Ham II, Daigle M i sur. Differential desensitization of dopamine D2 receptor isoforms by protein kinase C: the importance of receptor phosphorylation and pseudosubstrate sites. *Eur J Pharmacol* 2007;577:44–53.
73. Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW i sur. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11521–6.

74. Xiao MF, Xu JC, Tereshchenko Y i sur. Neural cell adhesion molecule modulates dopaminergic signaling and behavior by regulating dopamine D2 receptor internalization. *J Neurosci* 2009;29:14752-63.
75. Iizuka Y, Sei Y, Weinberger DR, Straub RE. Evidence that the BLOC-1 protein dysbindin modulates dopamine D2 receptor internalization and signaling but not D1 internalization. *J Neurosci* 2007;27:12390-5.
76. Vickery RG, von Zastrow M. Distinct dynamin-dependent and –independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* 1999;144:31–43.
77. Kahn ZU, Gutierrez A, Martin R i sur. Differential Regional and Cellular Distribution of Dopamine D2-Like Receptors: An Immunocytochemical Study of Subtype-Specific Antibodies in Rat and Human Brain. *J Comp Neurol* 1998;402:353-71.
78. Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Powchik P i sur. Dopamine receptor transcript expression in striatum and prefrontal and occipital cortex. Focal abnormalities in orbitofrontal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:1089-95.
79. Usiello A, Baik JH, Rouge´-Pont F i sur. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 2000;408:199–203.
80. De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:53–58.
81. Wolf ME, Roth RH. Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann NY Acad Sci* 1990;604:323–43.
82. Sibley DR. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:313–41.
83. Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Grekhova TV, Rayevsky KS. In vivo evidence for preferential role of dopamine D3 receptor in the presynaptic regulation of dopamine release but not synthesis. *Eur J Pharmacol* 1996;308:261–9.
84. Zapata A, Shippenberg TS. D(3) receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 2002;81:1035–42.
85. Joseph JD, Wang YM, Miles PR i sur. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 2002;112:39–49.
86. Von Economo C. *Zellaufbau der Grosshirnrinde des Menschen*. Berlin: Springer, 1927.

87. Carmichael ST, Price JL. Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol* 1996;371:179-207.
88. Petrides M, Pandya DN. The frontal cortex. U: Paxinos G, Mai JK, ur. The human nervous system, 2. izd. Amsterdam: Elsevier; 2004, str. 950–72.
89. Lu MT, Preston JB, Strick PL. Interconnections between the prefrontal cortex and the premotor areas in the frontal lobe. *J Comp Neurol* 1994;341:375–92.
90. Stepniewska I, Preuss TM, Kaas JH. Ipsilateral cortical connections of dorsal and ventral premotor areas in New World owl monkeys. *J Comp Neurol* 2006;495:691–708.
91. Pavlides C, Miyashita E, Asanuma H. Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. *J Neurophysiol* 1993;70:733–41.
92. Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:511–522.
93. Uylings HBM, Sanz-Arigita EJ, de Vos K i sur. 3-D cytoarchitectonic parcellation of human orbitofrontal cortex. Correlation with postmortem MRI. *Psychiatry Res* 2010;183:1-20.
94. Petrides M, Pandya DN. Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *Eur J Neurosci* 2002;16:291–310.
95. Kringelbach ML. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:691–702.
96. Gaur D, Wen-Hsiung J. Fundamentals of molecular evolution. 2 izd. Sunderland: Sinauer Associates; 1999.
97. Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 2003; 146:3-17.
98. Bizon JL, Foster TC, Alexander GE, Glisky EL. Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Front Aging Neurosci* 2012; 12:1-14
99. Williams GV, Goldman-Rakic PS. Modulation of memory fields by DA D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 1995;376:572-20.
100. Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG i sur. Supra-normal stimulation of D1 DA receptors in the rodent prefrontal cortex impairs working memory performance. *J Neurosci* 2000;20:1208-35.
101. Yerkes RM, Dodson JD. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol Psychol* 1908;18:459–82.

102. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS i sur. Effect of COMT Val108/158Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6917-22.
103. Barnett JH, Jones PB, Robbins i sur. Effect of the catechol-O-methyl transferase Val(158)Met polymorphism on executive function: a meta-analysis of the Wisconsin Card Sort Test in schizophrenia and healthy controls. *Mol Psychiatry* 2007;5:502-9.
104. Krause KH, Dresel SH, Krause J i sur. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* 2000;285:107-10.
105. Todd R, Boderon K. Is ADHS an energy defficiency syndrome? *Biol Psychiatry* 2001;50:151-7.
106. Mehta MA, Swainson R, Ogilvie AD i sur. Improved short-term memory but impaired reversal learning following the D2 agonist bromocriptine in human volunteers. *Psychopharmacology* 2001;159:12-20.
107. Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL. The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* 1970;127:199–207.
108. Snyder SH. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry*. 1976;133:197-202.
109. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:353–9.
110. Clement-Cormier YC, Keabadian JW, Petzold GL, Greengard P. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain: A possible site of action of antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:1113–17.
111. Tallerico T, Novak G, Liu ISC, Ulpian C, Seeman P. Schizophrenia: elevated mRNA for dopamine D2Longer receptors in frontal cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;87:160-5.
112. Hietala J, Syvalahti E, Vuorio K i sur. Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. *Lancet* 1995;346:1130–1.
113. McGowan S, Lawrence AD, Sales T i sur. Presynaptic dopaminergic dysfunction in schizophrenia: a positron emission tomographic [18F]fluorodopa study. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:134–42.

114. Howes OD, Montgomery AJ, Asselin MC i sur. Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:13-20.
115. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D i sur. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8104-9.
116. Laruelle M. Imaging dopamine transmission in schizophrenia. A review and meta-analysis. *Q J Nucl Med* 1998;42:211–21.
117. Zakzanis KK, Hansen KT. Dopamine D2 densities and the schizophrenic brain. *Schizophr Res* 1998;32:201–6.
118. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of the rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 1954;47:419-27.
119. Crow TJ. A map of the rat mesencephalon for electrical self-stimulation. *Brain Res* 1972;36:265-73.
120. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci* 1998;85:5274-8.
121. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS i sur. Imaging endogenous dopamine competition with (11C) raclopride in the human brain. *Synapse* 1994;16:255-62.
122. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS i sur. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:401-15.
123. Laruelle M. SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge. *J Nucl Med* 1995;36:1182-90.
124. Suzuki M, Hurd YL, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G. D3 dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain Res* 1998;779:58-74.
125. Hurd YL, Suzuki M, Sedvall G. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *J Chem Neuroanat* 2001;22:127-37.
126. Martres MP, Bouthenet ML, Sales N, Sokoloff P, Schwartz JC. Widespread distribution of brain dopamine receptors evidenced with [125I]iodosulpride, a highly selective ligand. *Science* 1985;228:752-5.
127. Camps M, Cortes R, Gueye B, Probst A, Palacios JM. Dopamine receptors in human brain: autoradiographic distribution of D2R sites. *Neuroscience* 1989;28:275-90.
128. Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Rakic P, Innis RB. Dopamine D2 receptors in the cerebral cortex: Distribution and pharmacological characterization with [3H] raclopride. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6412-6.

129. . Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW. Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* 1990;10(7):2125-38.
130. Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Gallager DW, Rakic P. Distribution of dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex: Quantitative autoradiographic analysis using [3H]raclopride, [3H]spiperone and [3H]SCH23390. *Neuroscience* 1991;40(3):657-71
131. Huntley GW, Morrison JH, Prikhovzhan A, Sealfon SC. Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNA in human and monkey motor cortex and striatum. *Mol Brain Res* 1992;15:181-8.
132. Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8861-5.
133. Murray AM, Ryoo HI, Gurevich E, Joyce JN. Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11271-5.
134. Khan ZU, Gutierrez A, Martin R i sur. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 1998;402:353–371
135. Khan ZU, Mrzljak V, Gutierrez A i sur. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:7731-6.
136. Bertolino A, Fazio L, Caforio G i sur. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia. *Brain* 2009; 132; 417–25
137. Centonze D, Usiello A, Costa C i sur. Chronic Haloperidol Promotes Corticostriatal Long-Term Potentiation by Targeting Dopamine D2L Receptors. *J Neurosci* 2004; 24:8214–22.
138. Wolstencroft EC, Simic G, thi Man N i sur. Endosomal location of dopamine receptors in neuronal cell cytoplasm. *J Mol Histol* 2007;38:333-40.
139. Judaš M, Šimić G, Petanjek Z i sur. The Zagreb Collection of human brains: a unique, versatile, but underexploited resource for the neuroscience community. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1225 Suppl 1:E105-30.
140. Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y i sur. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nature Protocols* 2007;2:1692-704.
141. Leclerc PG, Panjwani A, Docherty R i sur. Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. *J Neurosci Methods* 2005;142:137-43.

142. Berger B, Gaspar P, Verney C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodent and primate. *Trends Neurosci* 1991;14:21-7.
143. Lewis DA, Campbell MJ, Foote SL, Morrison JH. The monoaminergic innervation of primate neocortex. *Hum Neurobiol* 1986;5:181-8.
144. Lewis DA, Campbell MJ, Foote SL, Goldstein M, Morrison JH. The distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in primate neocortex is widespread but regionally specific. *J Neurosci* 1987;7:279-90.
145. Lewis DA, Foote SL, Goldstein M, Morrison JH. The dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *Brain Res* 1988;449:225-43.
146. Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallagher DW. Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* 1990;10:2125-38.
147. Raghanti MA, Stimpson CD, Marcinkiewicz JL i sur. Cortical dopaminergic innervation among humans, chimpanzees, and macaque monkeys: a comparative study. *Neuroscience* 2008;155:203-20.
148. Chung DW, Fish NK, Lewis DA. Pathological basis for deficient excitatory drive to cortical parvalbumin interneurons in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2016;22:appiajp201616010025
149. Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM i sur. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 2003;23:6315-26.
150. Hoftman GD, Volk DW, Bazmi HH, Li S, Sampson AR, Lewis DA. Altered cortical expression of GABA-related genes in schizophrenia: illness progression vs developmental disturbance. *Schizophr Bull* 2015;41:180-91.
151. Volk DW, Edelson JR, Lewis DA. Altered expression of developmental regulators of parvalbumin and somatostatin neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 2016 Mar 10. pii: S0920-9964(16)30094-9. doi: 10.1016/j.schres.2016.03.001.
152. Färber K, Pannasch U, Kettenmann H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:128–38.
153. Juck JHJ, Freyer D, Böttcher Ch i sur. De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke. *J Cereb Blood Flow Met* 2015;1-8.
154. Benavides-Piccione R, DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex. *J Anat* 2007;211:212-22

12. ŽIVOTOPIS

Mihovil Mladinov rođen je 08.11.1981. u Puli, gdje je završio osnovnu školu i opću gimnaziju s odličnim uspjehom. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2006. godine s odličnim uspjehom. Nakon jednogodišnjeg pripravničkog staža položio je 2007. stručni ispit i od Hrvatske liječničke komore dobio odobrenje za samostalan rad. Od 2007. do 2011. zaposlen je kao znanstveni novak prvo na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu na projektu prof. dr. Bože Krušlina, a zatim na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na projektu prof. dr. Gorana Šimića. Od 2007. do 2011. pohađa Doktorski poslijediplomski studij iz neuroznanosti pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga i Medicinskom fakultetu u Zagrebu, gdje radi na znanstvenim projektima iz područja neurobiologije Alzheimerove bolesti i dopaminskih receptora, a pod mentorstvom prof. dr. Gorana Šimića i prof. dr. Nataše Jovanov-Milošević. Tijekom 2007. i 2008. boravi tri mjeseca u Laboratoriju za citomorfologiju (voditelj dr. Andrea Diana) na Sveučilištu u Caglijariju u Italiji, a tijekom 2010. i 2011. boravi dvije godine u Laboratoriju za molekularnu psihijatriju (voditelj prof. dr. Josef Priller) Sveučilišne bolnice Charité u Berlinu u Njemačkoj. Od studenog 2011. nalazi se na specijalizaciji iz psihijatrije i psihoterapije na Sveučilišnoj klinici u Homburgu, a od studenog 2013. na Sveučilišnoj klinici u Tübingenu u Njemačkoj.

Tijekom diplomskog i poslijediplomskog obrazovanja dobitnik je slijedećih nagrada: stipendije grada Pule za dodiplomski studij (2001.-02.), stipendije Istarske županije za dodiplomski studij (2003.-06.), stipendije Vlade Republike Italije za doktorsko usavršavanje (2007.), Stipendije za doktorande Nacionalne zaklade za znanost (2010.) i stipendije za doktorande NeuroCure Cluster of Excellence Berlin (2011.).

Koautor je 4 originalna znanstvena rada, 2 pregledna članka te 9 sažetaka na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima.