

Digital Autoradiographic System을 이용한 선천성고혈압에서의 Muscarinic Cholinergic Receptor 분포 및 특성

서울대학교병원 핵의학과, 지방공사 강남병원*

손 인* · 이 명 철 · 고 창 순

= Abstract =

Distribution of the Muscarinic Cholinergic Receptors and Characterization in the Brain of Wistar Rats and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR Strain) by Digital Autoradiography

In Sohn, M.D.,* Myung Chul Lee, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

*Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital and
Kangnam General Hospital*, Seoul, Korea*

Using in vitro autoradiography with a digital autoradiography system and radioreceptor assay, the distribution and the binding characteristics of the muscarinic cholinergic receptors (mAChR) were studied in regions of rat brain.

Radioreceptor assay revealed that mAChR could be measured with saturation binding assay in the brain and heart homogenates. No difference in Kd or Bmax of the brain or heart was found between the normal Wistar rats and SHR rats.

Specific binding of ³H quinuclidinyl benzilate (QNB) increased and saturation was reached by 2 hours after incubation with slide-mounted brain tissue. The distribution of mAChR was heterogeneous along the fields of brain. Affinity (Kd) of mAChR was not different significantly among cortex, hippocampus and caudate-putamen. No difference was found between normal rats and SHR strain. More receptors (Bmax) were found in the cortex and hippocampus than in the caudate-putamen in normal rats. More receptors were found in the cortex and caudate-putamen in SHR rats than in normal rats.

Radioreceptor assay and digital autoradiographic analysis of affinity and number of mAChR gave the same results.

With the above findings, we concluded that we could use digital autoradiographic system with ³H-QNB in the characterization of mAChR of rats and that the cortex and caudate-putamen of SHR strain rats have more receptors than those of normal rats.

Key Words: Digital autoradiography, Muscarinic cholinergic receptor, Radioreceptor assay,
³H-quinuclidinyl bentilate

서 론

뇌내 수용체의 위치분석 및 친화도와 결합농도의 측정
은 신경전달물질 및 호르몬의 뇌작용 기전 또는 질병에
서 변동을 이해하는데 중요하다¹⁾. 방사수용체측정법과
in vitro 계수형자가방사기록법은 리간드-수용체 결합
을 조직을 으갠 균질물(homogenate) 혼탁액과 조직절
편(slice)에서 각각 측정하는 방법이다.

계수형자가방사기록법은 수용체의 분포를 나타내는
조직영상을 얻은 후 정량 소프트웨어시스템으로 분석하
여 해리상수와 최대결합농도를 정량할 수 있고 해상력이
뛰어나다. In vitro 자가방사기록법은 조직에서 방사수
용체 측정법을 시행하는 방법으로 분포에 따른 수용체의
특성을 조사하는 방법이다.

콜린성수용체에는 무스카린수용체(muscarin recep-
tor)와 니코틴수용체(nicotine receptor)가 있다. 무
스카린콜린성수용체(muscarinic cholinergic receptor:
mAChR)에는 M₁과 M₂ 수용체가 있는데 ³H로 표시된
quinuclidinyl benzilate (³H-QNB)는 양쪽 수용체에 모
두 결합한다²⁾.

우리는 이 연구에서 정상쥐 및 선천성 고혈압 쥐의 뇌
와 심장조직으로 방사수용체분석을 시행하여 mAChR
이 있음과 측정가능함을 확인하고 뇌조직동결절편을 얻
어 mAChR의 뇌내분포와 부위별 친화도 및 결합농도를
측정하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

150~200 g의 수컷 Wistar 쥐와 선천적으로 고혈압이
있는 SHR 스트레인을 실험 대상으로 삼았다. ³H-QNB
(13 Ci/mmol)은 New England Nuclear 제품, GF/B
유리 섬유여과기는 Whatman 제품, ³H에 감광가능한
Hyperfilm은 Amersham 제품을 썼다.

2. 방사성수용체측정

Snyder 등의 방법³⁾으로 시행하였다. 쥐의 뇌와 심장
을 적출하여 0.32 M 설탕용액으로 9배 희석한 후
Brinkman polytron으로 No 5로 맞추고 30초 간격으
로 15초간 3회 균질화 하였다. 희석한 균질혼탁액을

60~70 µg 단백질양이 되도록 50 mM 인산염완충액
(pH 7.4)로 최종 부피가 2ml이 되도록 ³H-QNB와 함
께 37°C에서 60분간 반응시켰다. 결합된 ³H-QNB를
GF/B 유리섬유디스크를 이용하여 결합하지 않은 리간
드로부터 분리한 후 얼음에 묻었던 완충용액으로 3ml씩
3회 세척하였다. 여과기를 톨루엔과 PPO, POPOP 및
TritonX-100을 넣은 섬광용액을 넣어 ³H의 양을 계측
하였다. 비특이결합은 1 µM 아트로핀을 함께 넣었을 때
결합한 양으로 결정하였다. 방사수용체측정법 소프트웨
어로 해리상수 Kd, 최대결합농도 Bmax를 구하고 스캐
차드(Scatchard) 작도, 힐(Hill) 작도를 하여 계수를
구하였다.

3. In Vitro 자가방사기록법

숫컷 쥐의 뇌를 적출하여 -70°C에서 냉동시킨후 냉동
절편마이크로톰(cryocut microtome)으로 -20°C에서
20 µm의 두께로 절단하였다. 젤라틴피복 유리슬라이드
에 얹어 37°C에서 10초간 가열하여 붙인 조직절편을 50
µM 인산염완충액(pH 7.4) ³H-QNB가 함유된 용액에
담가 상온에서 2시간 반응시켰다. 비특이결합은 1 µM
의 아트로핀을 함께 넣었을 때 결합한 양으로 정하였다.
반응시킨 슬라이드를 Hyperfilm에 3주간 -70°C에서
노출시켰다. 이 필름을 실온에서 Kodak 계수형 D-19로
5분간 현상하여 다음 10분간 Kodak rapid fixer로 고정
시켰다.

20 µm의 조직 절편으로 포화결합에 대한 실험을 정상
쥐와 선천성 고혈압 쥐에서 수행하였다. 뇌조직의 4부위
를 관심영역으로 놓고 0.05 nM~1.5 nM 사이의 농도
인 ³H-QNB로 시행하였다.

4. 자가방사기록 정량분석

조직검체와 동시에 노출시킨 표준마이크로스케일
(microscale)의 자가방사능기록영상을 숫자화(digit-
ize)한 다음 각 광학밀도별로 자가방사능기록 영상을 숫
자화하고 사용한 리간도의 비방사능을 입력한 후 특정부
위별 수용체농도를 구하였다. 부위결정은 Praxinos와
Watson의 해부절편지도⁴⁾를 참고하였다. 이렇게 얻은
수용체 분포 결과를 RAS 1000 프로그램과 STATA
(Loats Associates) 통계프로그램으로 분석하여 해리
상수 Kd, 최대결합농도 Bmax를 구하고 스캐차드작도,
힐작도를 하여 계수를 구하였다.

결 과

1. 방사수용체분석법

정상쥐와 선천성 고혈압 쥐의 뇌와 심장 조직 균질물

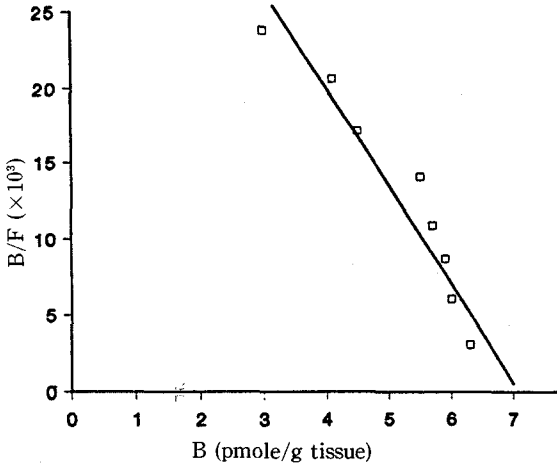


Fig. 1. Scatchard plot of the data obtained in a typical saturation curve using ³H-QNB binding to heart homogenate of normal rat.

Table 1. Binding Parameters for ³H-QNB in Heart and Brain Homogenates. Tissue Homogenates were Incubated with ³H-QNB in a Final Volume of 2ml of 50mM Phosphate Buffer (PH 7.4) for 60 min at 37°C. Bound ³H-QNB was Separated from Free Ligand by Rapid Filtration Through GF/B Glassfiber Filters, Followed by 4x3 ml Washes with Ice-Cold Buffer. The Filters were Counted for ³H in a Toluene-Based Cocktail. The Values Represent the Results (mean ± S.E) Obtained from the Tissue Homogenates of 10 Rats

| | Kd (nM) | Bmax (pmole/g protein) |
|------------------|---------------|------------------------|
| normal rat heart | 0.058 ± 0.011 | 205 ± 43 |
| normal rat brain | 0.046 ± 0.015 | 888 ± 189 |
| SHR heart | 0.055 ± 0.004 | 207 ± 20 |
| SHR brain | 0.058 ± 0.015 | 994 ± 136 |

에 대한 ³H-QNB의 방사수용체결합분석을 한 전형적인 그림이 Fig. 1 이고 이때 얻은 결과가 Table 1 이다. 심장조직은 정상쥐와 선천성고혈압쥐 사이에 ³H-QNB 결합의 해리상수와 최대결합농도에 차이가 없었다. 뇌는 선천성고혈압 쥐가 정상쥐에 비해 Kd와 Bmax가 높았다. 그러나 통계적 차이는 없었다.

2. 뇌조직 절편에 대한 ³H-QNB 결합의 반응속도

정상쥐와 선천성고혈압 쥐의 중뇌조직의 절편에 대한 ³H-QNB의 결합에 소요되는 반응시간을 정하기 위해 0.4 nM ³H-QNB를 실온에서 20분, 40분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간동안 반응시켰다. 특이결합이 서서히 증가하여 반응후 최대결합의 반이되는 시간이 43분이었고 2시간후에 최고가 되었다(Fig. 2). 정상쥐와 선천성고혈압쥐 사이에 반응시간의 차이가 없었다. 이 결과를 토대로 이 후 실험에서는 모두 2시간을 반응시간으로 정하였다.

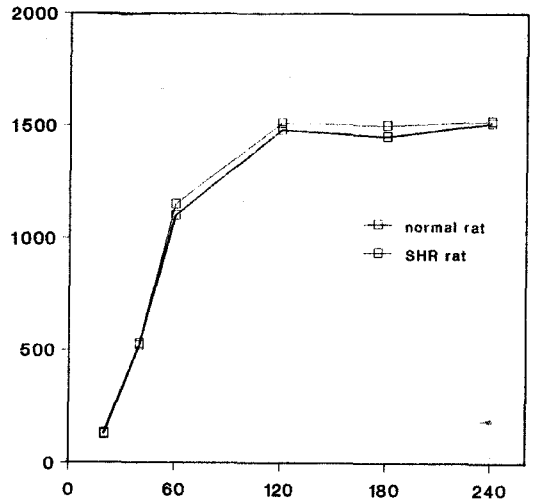


Fig. 2. The association of specific ³H-QNB binding to midbrain sections. 20 μm sections were prepared, incubated in the presence of 0.4 nM ³H-QNB of up to 4 hour at room temperature. Then the labeled tissue sections were wiped from slides with GF/B glassfiber filter discs. These discs were placed in scintillation vials and counted for ³H in a toluene-based cocktail. (x-x: normal rat, o-o: SHR rat)

Table 2. Binding Parameters for ^3H -QNB in Various Brain Regions 20 μm Tissue Sections were Prepared, Incubated with Tritium-Sensitive Film (Hyperfilm, Amersham) and Stored at 4°C for 21 days. After the Exposure the Film was Developed in Kodak D-19 at 20°C for 5 Minutes and Than Fixed for 10 Minutes. The Autoradiograms were Analyzed by Digital Autoradiography System (Amersham)

| | region | Kd (nM) | Bmax (nM) | Correlation Co. @ | Hill Co. @ |
|------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|-------------|
| normal rat | whole brain | 0.63 ± 0.23 | 0.011 ± 0.004 | -0.91 ± 0.05 | 0.99 ± 0.03 |
| | cortex | 1.00 ± 0.58 | 0.014 ± 0.004 | -0.83 ± 0.10 | 0.99 ± 0.02 |
| | hippocampus | 1.31 ± 1.28 | 0.017 ± 0.006 | -0.96 ± 0.02 | 0.96 ± 0.03 |
| | caudate putamen | 0.52 ± 0.32 | 0.005 ± 0.002 | -0.94 ± 0.05 | 1.01 ± 0.04 |
| SHR rat | whole brain | 1.78 ± 0.89 | 0.022 ± 0.005 | -0.92 ± 0.03 | 0.97 ± 0.01 |
| | cortex | 1.55 ± 0.19* | 0.027 ± 0.006# | -0.90 ± 0.04 | 0.98 ± 0.01 |
| | hippocampus | 0.75 ± 0.22** | 0.018 ± 0.005## | -0.88 ± 0.11 | 1.01 ± 0.03 |
| | caudate putamen | 1.65 ± 0.71*** | 0.018 ± 0.007### | -0.82 ± 0.09 | 0.98 ± 0.01 |

@ Co. : coefficient.

*, **, *** : statistically not significant compared with Kd of the same regions of normal rats.

: more Bmax statistically significant (p < 0.05) compared with Bmax of cortex of normal rats.

: statistically not significant compared with Bmax of hippocampus of normal rats.

: more Bmax statistically significant (p < 0.05) compared with Bmax of caudate putamen of normal rats.

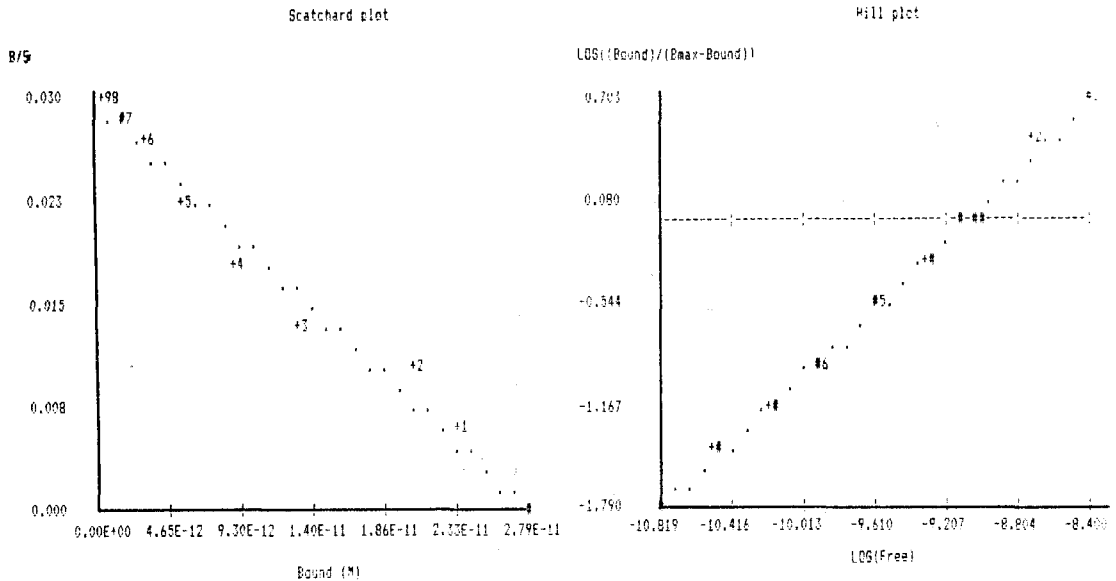


Fig. 3. Scatchard plot and Hill plot of the data obtained in a typical saturation curve using ^3H -QNB binding to hippocampus of SHR.

3. In Vitro 자가방사기록법

뇌조직의 절편의 각 부위에서 해리상수와 최대결합농도를 스캐차드분석으로 구한 값이 Table 2 이다. Fig. 3 은 전형적인 포화곡선에서 얻은 스캐차드와 힐 작도의

모양이다. 비특이결합은 전체결합에 대해 평균 4%이었고 스캐차드분석의 직선의 상관계수는 0.8 이상이었다.

고찰

계수형자가방사기록법은 해부학적 해상력이 뛰어나고

훼손되지 않은 조직의 각부위에 대한 정보를 얻을 수 있는데 자가방사기록 영상의 정량분석을 자동화하고 간결화하기 위해 개발된 시스템으로 분석이 간편하다. $^3\text{H-QNB}$ 는 여러 조직에서 무스카린콜린성수용체 연구에 이용된 길항제이다^{2,5-7}). 옥스포지 QNB($^{125}\text{I-QNB}$)의 성상도 보고되어 QNB를 ^{123}I 으로 표지하였을 경우 단일 광자방출전산화단층촬영(SPECT)에 응용할 가능성을 생각해볼 수 있다⁷⁻¹¹).

무스카린콜린성수용체는 M1과 M2 수용체로 나뉘어 각각에 대한 특이리간드가 확인되었다. M1 수용체 특이리간드는 피렌제핀(pirenzepine)^{12,13}, M2 수용체 특이리간드는 AF-DX 116 또는 AF-DX 384 이다^{14,15}). QNB는 M1과 M2 수용체에 모두 결합하는 길항제이다⁹).

M2 수용체는 시냅스전뉴런에 있는 수용체로서 여기에 콜린성 작용/길항제가 결합하면 시냅스에서 아세틸콜린의 분비가 감소되었다¹³). M2 수용체에 특이한 리간드인 AF-DX384가 알려지기 이전에는 $^3\text{H-QNB}$ 와 $^3\text{H-pirenzepine}$ 의 분포차이가 M2 수용체의 분포라고 생각하였다¹⁶). QNB는 무스카린콜린성 수용체에 M1과 M2를 막론하고 결합하므로 콜린성수용체중 니코틴콜린성수용체를 제외한 나머지 수용체의 분포를 쉽게 보여주는 리간드이다. 이 연구에서 우리는 정상쥐 및 선천성고혈압(SHR) 쥐의 뇌조직의 mAChR 분포를 보았다. 마우스, 쥐, gerbil, 고양이, 토끼, 개, 원숭이에서 $^3\text{H-QNB}$ 의 뇌내 분포가 이미 여러 문헌에 보고되었다¹⁷). $^3\text{H-QNB}$ 는 결합하는 수용체의 종류가 M1과 M2를 모두 포괄하기 때문에 $^3\text{H-QNB}$ 의 결합부위의 특성은 뇌피질의 여러부위에 널리 분포한다는 것이었다. 결국 동물종마다 각종 수용체의 뚜렷한 지도를 그릴 수 있고 이 지도에서 질병이 있을 때의 변화를 추적할 수 있다.

정상쥐의 뇌의 무스카린콜린성수용체의 Bmax는 뇌피질과 해마(hippocampus)에서 높게 나타났다. 선조체(striatum)의 일부인 미상피각(caudate putamen)은 피질과 해마에 비해 상대적으로 적은 Bmax를 보였다. 선천성고혈압(SHR) 쥐의 무스카린콜린성수용체의 Bmax는 뇌피질과 미상피각에서 보통쥐보다 높았다(Table 2). 그러나 우리가 이 연구에서 이 차이의 의의를 시사할 만한 소견을 발견하지는 못하였다. 우리가 가른 4부위보다 더 작은 부위로 관심영역을 축소하여 Bmax의 분포와 각 스트레인에서 차이를 조사하여야 할

것으로 생각한다. 이때는 특히 M1과 M2 수용체를 나누어서 분포와 차이를 찾아야 한다고 생각한다.

무스카린콜린성수용체의 국소해부학적(topographical) 분포와 질병 또는 고령화에 따른 변화의 의의가 시사된 것이 다음과 같다.

M1 수용체는 피질의 전층에 퍼져 있지만 M2 수용체는 표층과 심층에 국한되어 있다¹⁶). M1 수용체는 해마와 선조체에 주로 발견되고 M2 수용체는 소뇌와 아래쪽 뇌간에 있다^{12,14}). 나이가 들면서 해마형성(hippocampal formation)과 시상(thalamus)과 시상하부(hypothalamus)의 콜린성수용체에 차이가 나타나지는 않지만 피질과 선조체에서는 수용체가 뚜렷이 떨어졌다. 복측전뇌(ventral forebrain)의 diagonal band, 확대세포성기저핵(nucleus basalis magnocellularis), 복측담창구(ventral pallidum), 무명질(substantia innominata)의 수용체가 특히 감소하였다¹⁸). 쥐의 나이가 들면 복측전뇌(ventral forebrain)의 M2 수용체가 40% 줄어들며 대뇌피질과 선조체의 수용체가 조금이지만 뚜렷이 줄어들었다¹⁹). 본 연구와 같은 실험에서 실험대상동물의 연령을 통일하여야 하는 까닭이다.

Pirenzepine을 과량 투여하고 $^3\text{H-QNB}$ 결합부위를 찾는 방법이 처음에 M2 수용체를 영상화 또는 정량하는 방법이었다^{13,20-22}). M1 특이수용체 결합부위는 해마의 치상회(dentate gyrus)에 있는데 피렌제핀을 투여하면 뇌피질과 대상회전(cingulate gyrus)에 QNB 결합부위가 증가하였다.

사람과 비슷한 원숭이에서 알려진 콜린성수용체의 아형은 다음과 같았다²³). M1 수용체가 대뇌피질에도 많음이 확인되었고 주로 표층에 있고 변연피질(limbic cortex)과 편도체(amygdala), 해마, 안와전뇌(orbitofrontal), 측두엽(temporopolar), 해마측(parahippocampal), 대상회전, 휴염방야(parofactory) 부위에도 많았다. 한편 M2 수용체는 대뇌에 감각대뇌피질과 운동대뇌피질에 선택적으로 분포하였다. 해마형성부위에는 콜린성수용체 M1, M2, 니코틴수용체가 모두 있는데 각각 다른 세포에 있었다. M1이 치상회와 CA₄-CA₃ 부위, CA₁ 암몬영역(ammonic sector)에 있고 M2는 CA₂와 능선(subiculum), 후피질(rhinal cortex), 능선주위(parasubiculum)에, 그리고 니코틴수용체는 능선주위에 많았다.

Oxotremorine, arecoline, pilocarpin, bethanecol의

순서로 QNB 결합에 대한 무스카린 수용체를 결합억제할 수 있으므로 부위마다 수용체에 분포에 따라 ^3H -QNB의 결합을 억제하는 능력을 조사할 수 있었다¹⁴⁾. 이 방법은 약제의 수용체특이성과 성능을 알수있는 방법이기도 하고 일단 특이성이나 성능이 알려지면 다시 이 약제로 수용체의 정상분포와 질병에서 변동을 조사할수 있다. ^3H -QNB가 치상회, 상부소구(superior colliculus), 능형시상(rhomboid thalamus), 흑색질(substantia nigra)에 결합하는 것을 약제가 억제하는 양상이 M1, M2 수용체의 차이를 드러내 보였다²⁴⁾. 피렌제핀이 치상회에 AF-DX 116이 상부소구에서, 그리고 둘다 흑색질에 결합능이 높았다. 이는 ^3H -QNB의 결합을 이 두 약제가 억제하는 능력의 높낮이로 알아냈다.

뇌혈류에 미치는 콜린성 결합의 영향을 조사하였더니 연막동맥(pial artery)이나 뇌내동맥(intracerebral artery)에 무스카린콜린성수용체가 없었다는 보고가 있었다²⁵⁾. 뇌절편을 얻어 만든 자기방사기록영상이 흑시혈관에 분포한 콜린성수용체를 보여주는 것이 아닌지 또는 선천성고혈압쥐에서 나타난 무스카린콜린성수용체의 차이가 병태생리와 어떤 상관성이 있는지 추론할 때 필요한 자료이다.

^3H -QNB 결합으로 보았더니 편측성피질경색때 미상피각에 수용체 수가 매우 증가하였다는 사실로부터 선조체 내의 콜린성자극전달을 피질이 조절한다는 사실을 밝혔다²⁰⁾. 일시적허혈 후에 무스카린콜린성수용체의 변동을 보아 이 수용체를 통한 자극전달과 허혈후 뇌기능장애를 연결지으려는 노력이 있었다. Gerbil에서 허혈후에는 허혈에 약하다고 알려진 선조체의 배외측부(corsolateral part)와 해마의 CA₁에서 무스카린콜린성수용체가 아데노신수용체와 함께 감소하였으며 허혈에 저항한다고 생각되었던 치상회의 분자층(molecular layer)에서도 감소하였다 한다. 이런 보고에서 우리가 수용체변동이 뜻하는 바를 짐작할 수 없지만 허혈후에 이런 수용체변동 현상이 있음은 쉽게 알 수 있다²⁶⁾.

M2 수용체는 수용체 자가방사기록법과 영상분석처리와 아세틸콜린 분비 조절 및 여러 방법으로 시냅스전뉴런말단에 있는 자가수용체라고 알려졌다¹³⁾. 피질의 외층과 해마의 CA₁과 선조체에 있는 M2 수용체를 M2 선택적인 길항제로 차단했을 때, oxotremorine이 자가수용체인 M2 수용체를 통하여 시냅스에서 아세틸콜린이 분비되는 것을 억제하는 것을 차단한다는 것을 알았다.

스냅스전뉴런의 수용체 즉 자가수용체가 억제성 되먹이기 과정을 수행하는 경로라는 해석과 잘 맞았다.

이 연구에서 우리는 ^3H -QNB의 쥐 뇌내분포를 보고 하였으며 선천성고혈압 쥐에서 나타난 차이를 찾았지만 서로 역할이 다른 M1, M2 수용체를 동시에 보았던 것으로 병태생리 또는 콜린성수용체의 생리적 중요성을 시사하는 소견을 얻지는 못하였다. 이 연구의 결과를 바탕으로 각 부위 특히 선천성 고혈압쥐의 경우는 청색반점(locus ceruleus) 또는 Mynert 핵(nucleus of Mynert) 등의 각 수용체 변동을 조사하여야 할 것으로 생각하였다.

감사의 글

이 연구에서 방사수용체실험을 수행한 박은미 씨와 계수형 자가방사기록법 실험을 수행하고 데이터를 정리한 최석래 씨에게 감사드립니다.

REFERENCES

- 1) Gibson RE: *Quantitative changes in receptor concentration as a function of disease. In Receptor binding radiotracers, Vol II Eckelman WC ed. Boca Raton FL. CRC Press Inc. p 185 1982*
- 2) Gibson RE, Eckelman WC, Vieras F, Reba RC: *The distribution of the muscarinic acetylcholine receptor antagonists, quinuclidinyl benzilate and quinuclidinyl benzilate methiodide (both tritiated), in rat, guinea pig, and rabbit. J Nucl Med 20:865, 1979*
- 3) Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D: *Drugs, neurotransmitters and schizophrenia. Science 184:1243-1253, 1974*
- 4) Praxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates. Australia Academic Press 1986*
- 5) Gibson RE, Eckelman WC, Freneau R, Pratt R, Reba RC: *Receptor binding radiotracers in the pancreas distribution of tritium labeled QNB: Carazolol and prazosin. J Nucl Med 22:75, 1981*
- 6) Schimerlick MI, Searles RP: *Ligand interactions with membrane-bound porcine atrial muscarinic receptors. Biochem 19:3407, 1980*
- 7) Gibson RE, Jagoda E, Weckstein D. et al: *Comparison of ^3H -QNB and ^{125}I -QNB in vivo and in vitro. J Nucl Med 23:104, 1981*

- 8) Eckelman WC, Eng R, Rzeszotarski WJ, Gibson RE, Francis B, Reba RC: *Use of 3-quinuclidinyl 4-iodobenzilate as a receptor binding radiotracer. J Nucl Med* 26:637, 1985
- 9) Gibson RE, Rzeszotarski WJ, Jagoda EM, Francis BE, Reba RC, Eckelman WC: [¹²⁵I] 3-quinuclidinyl-4-iodobenzilate: *A high affinity, high specific activity radioligand for the M1 and M2 acetylcholine receptors. Life Sci* 34:2287, 1984
- 10) Blasberg R, Patlak C, Hiraga S, Pettigrew K, Francis B, Gibson R, Reba R, Larson S, Eckelman W: *Kinetic analysis of IQNB and the muscarinic cholinergic receptor system in brain. J Nucl Med* 26: 827(abs) 1985
- 11) Eckelmann WC, Reba RC, Rzeszotarski WJ, Gibson RE, Hill T, Holman BC, Budinger T, Conklin JJ, Eng R, Grissom MP: *External imaging of cerebral muscarinic acetylcholine receptors. Science* 223:291, 1984
- 12) Messer WS, Ellerbrock BR, Smith DA, Hoss W: *Regional differences in the binding of selective muscarinic receptor antagonists in rat brain: Comparison with minimum energy conformations. J Med Chem* 32:1164, 1989
- 13) Ghodsi HS, Price MA, Balan S, Mazloum Z: *Biochemical and behavioral evidence for muscarinic autoreceptors in the CNS. Brain Res* 517:195, 1990
- 14) Messer WS, Ellerbrock B, Price M, Hoss W: *Autoradiographic analyses of agonist binding to muscarinic receptor subtypes. Biochem Pharmacol* 38:837, 1989
- 15) Aubert I, Cecyre D, Gauthier S, Quirion R: *Characterization and autoradiographic distribution of [³H] AF-DX 384 binding to putative muscarinic M2 receptors in the rat brain. Eur J Pharmacol* 217:173, 1992
- 16) Miyoshi R, Kito S, Shimizu M, Matsubayashi H: *Ontogeny of muscarinic receptors in the rat brain with emphasis on the differentiation of M1 and M2 subtypes semiquantitative in vitro autoradiography. Brain Res* 420:302, 1987
- 17) Araki T, Kato H, Kogure K, Shuto K, Ishida Y: *Autoradiographic mapping of neurotransmitter system receptors in mammalian brain. Pharmacol Biochem Behav* 41:539, 1992
- 18) Biegon A, Duvdevani R, Greenberger V, Segal M: *Aging and brain cholinergic muscarinic receptors: an autoradiographic study in the rat. J Neurochem* 51:1381, 1988
- 19) Biegon A, Hanau M, Greenberger V, Segal M: *Aging and brain cholinergic muscarinic receptor subtypes: An autoradiographic study in the rat. Neurobiol Aging* 10:305, 1989
- 20) Filloux F, Liu TH, Hsu CY, Hunt MA, Wamsley JK: *Selective unilateral cortical infarction increases striatal muscarinic receptor binding: Potential evidence for cortical modulation of intrastriatal cholinergic transmission. J Chem Neuroanat* 3:125, 1990
- 21) Messer WS, Thomas GJ, Price M, Hoss W: *Selectivity of pirenzepine in the central nervous system III Differential effects of multiple pirenzepine and scopolamine administrations on muscarinic receptors as measured autoradiographically. Brain Res* 407:46, 1987
- 22) Messer WS, Hoss W: *Selectivity of pirenzepine in the central nervous system I. Direct autoradiographic comparison of the regional distribution of pirenzepine and carbamylcholine binding sites. Brain Res* 407:27, 1987
- 23) Mash DC, White WF, Mesulam MM: *Distribution of muscarinic receptor subtypes within architectonic subregions of the primate cerebral cortex. J Comp Neurol* 278:265, 1988
- 24) Hoss W, Ellerbrock BR, Goldman PS, Collins DA, Messer WS: *Identification of four brain areas enriched in a unique muscarinic receptor subtype. Life Sci* 46:1051, 1990
- 25) de Michele M, Cavallotti C, Felici L, Ricci A, Amenta F: *Are muscarinic receptors present in rat pial or intracerebral vessels? Arch Int Pharmacodyn Ther* 300:85, 1989
- 26) Araki T, Kato H, Kogure K, Saito T: *Postischemic alteration of muscarinic acetylcholine adenosine A1 and calcium antagonist binding sites in selectively vulnerable areas an autoradiographic study of gerbil brain. J Neurol Sci* 106:206, 1991