

Diss. ETH No. 17227

**Adenosine A₁ Receptors
in Human Sleep Regulation Studied by
Electroencephalography (EEG)
and Positron Emission Tomography (PET)**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Eva Geissler

Eidg. Dipl. Apothekerin

born 25. 4. 1976

citizen of Richterswil ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. August Schubiger, examiner
Prof. Dr. Simon M. Ametamey, co-examiner
PD Dr. Hans-Peter Landolt, co-examiner
PD Dr. Peter Achermann, co-examiner

2007

Summary

Sleep is an essential physiological process. However, the functions of sleep and the endogenous mechanisms involved in sleep regulation are only partially understood. Convergent lines of evidence support the hypothesis that the build-up of sleep propensity during wakefulness and its decline during sleep are associated with alterations in brain adenosine levels and adenosine receptor concentrations. The non-selective A_1 and A_{2A} adenosine receptor antagonist caffeine stimulates alertness and is known to attenuate changes in the waking and sleep electroencephalogram (EEG) typically observed after prolonged waking. Several findings point to an important function of the adenosine A_1 receptor (A_1AR) in the modulation of vigilance states. The A_1AR is densely expressed in brain regions involved in sleep regulation, and pharmacological manipulations affecting the A_1AR were shown to influence sleep propensity and sleep depth. However, an involvement of the A_{2A} adenosine receptor ($A_{2A}AR$) is also assumed. The distinct functions of the A_1 and A_{2A} receptor subtypes in sleep-wake regulation and in mediating the effects of caffeine have not been identified so far. The selective adenosine A_1 receptor antagonist, 8-cyclopentyl-3-(3- ^{18}F -fluoropropyl)-1-propylxanthine (^{18}F -CPFPX), offers the opportunity to get further insights into adenosinergic mechanisms by *in vivo* imaging of the A_1AR subtype with positron emission tomography (PET).

The aim of this thesis was to elucidate the role of adenosine A_1 receptors in human sleep regulation, combining ^{18}F -CPFPX PET brain imaging and EEG recordings, the gold standard in sleep research. It was hypothesized that sleep deprivation would induce adenosine accumulation and/or changes in A_1AR density. Thus, the question was addressed whether these effects of prolonged wakefulness can be visualized by altered ^{18}F -CPFPX binding. Moreover, it was investigated whether radioligand uptake might be influenced by caffeine, since caffeine is known to bind to both the A_1 and A_{2A} adenosine receptors. A further objective was to examine a possible relationship between A_1AR binding and changes in waking and sleep EEG during prolonged wakefulness and after caffeine intake.

The radiosynthesis of ^{18}F -CPFPX, performed in analogy to a reported two-step reaction sequence, was validated according to the requirements of good manufacturing practice (GMP). ^{18}F -CPFPX was obtained in a radiochemical yield of about 6 %, and the specific activity exceeded 80 GBq/ μ mol. The final product fulfilled all the specifications concerning sterility, apyrogenicity, isotonicity and radiochemical and chemical purity, and thus could be safely applied in humans.

A study was performed in ten young healthy male volunteers. The protocol consisted of two baseline nights, followed by a 40-h sleep deprivation and a recovery night. During the nights,

sleep was recorded polysomnographically. Across the sleep deprivation period, waking EEG recordings were conducted at 3-h intervals. After 16 h of wakefulness, 300 mg slow-release caffeine or placebo were administered to the participants in a randomized, double-blind design. PET brain imaging with application of ~ 80 MBq ^{18}F -CPFPX was performed ~ 8 h before the second baseline night and the recovery night.

Generally, high ^{18}F -CPFPX accumulation was observed in brain areas with known high $A_1\text{AR}$ density, such as cerebral cortex, thalamus and basal ganglia. In contrast, low radioligand binding occurred in the cerebellum and brainstem, regions with a low $A_1\text{AR}$ concentration. The distribution volumes (DV) of the radioligand, calculated with Logan's graphical analysis (GA), did not differ significantly between the PET scans before and after sleep deprivation in both the placebo and caffeine groups. EEG spectra in the placebo group revealed the typical sleep deprivation induced increase in the markers of sleep homeostasis, namely theta (5-8 Hz) power in waking and delta (1-4 Hz) power in the nonREM sleep. These effects were not observed in the subjects who received caffeine. Correlation analysis revealed no relationship between ^{18}F -CPFPX binding and theta and delta EEG power in waking and nonREM sleep. However, significant negative associations were found between the ^{18}F -CPFPX uptake and alpha (8-12 Hz) power in both wakefulness and nonREM sleep under baseline conditions (before sleep deprivation). Moreover, in the placebo group a positive correlation was observed between the change in radioligand binding and the change in waking EEG alpha power during sleep deprivation. Such correlations were not found in the caffeine group.

Our findings confirm high $A_1\text{AR}$ concentration in brain regions involved in sleep. The results suggest that sleep deprivation and caffeine have no significant effects on $A_1\text{AR}$ occupancy, and challenge the hypothesis of a prominent involvement of the $A_1\text{AR}$ in the homeostatic regulation of sleep. However, they indicate an association between the EEG alpha power density and cerebral $A_1\text{AR}$ binding. EEG alpha activity is known to exhibit high interindividual variability, and power within the alpha frequency range in waking is modulated by the level of alertness. The correlations found for ^{18}F -CPFPX binding and alpha activity support a role of the $A_1\text{AR}$ in modulating vigilance in humans, but the $A_1\text{AR}$ does not appear to be responsible for the effects of caffeine on waking and sleep EEG. A test and retest study in a larger group of volunteers would be necessary in order to demonstrate reproducibility and also to consolidate the statistical significance of the data. Furthermore, a PET study with the selective $A_{2A}\text{AR}$ antagonist ^{11}C -TMSX could be an important step forward in specifying the functions of the $A_{2A}\text{AR}$ in the regulation of the sleep-wake cycle.

Zusammenfassung

Schlaf ist ein grundlegender physiologischer Prozess. Seine Funktion und die an der Schlafregulation beteiligten Mechanismen sind jedoch nur teilweise bekannt. Einige Befunde deuten darauf hin, dass der Aufbau des Schlafdrucks im Wachzustand und dessen Abbau während des Schlafs mit Veränderungen der Adenosin-Konzentration und der Menge von Adenosin-Rezeptoren im Gehirn zusammenhängt. Koffein wirkt als nicht-selektiver Antagonist an adenosinergen A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren. Diese Substanz ist bekannt für ihre stimulierende Wirkung. Sie reduziert die Veränderungen im Elektroencephalogramm (EEG), welche typischerweise nach Schlafentzug auftreten. Es gibt Hinweise darauf, dass der Adenosin- A_1 -Rezeptor (A_1 AR) eine wichtige Rolle bei der Modulation des Schlaf-Wach-Rhythmus spielt. Eine hohe Dichte dieser Rezeptoren findet man in Hirnarealen, welche bei der Schlafregulation mitwirken, und eine pharmakologische Beeinflussung des A_1 AR wirkt sich auf das Schlafbedürfnis und die Schlaftiefe aus. Daneben ist aber auch eine Beteiligung des Adenosin- A_{2A} -Rezeptors (A_{2A} AR) wahrscheinlich. Die genauen Funktionen der A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren in der Schlafregulation sind bisher unklar. Ebenfalls ist nicht bekannt, über welchen dieser beiden Rezeptoren die Wirkung von Koffein vermittelt wird. 8-Cyclopentyl-3-(3- 18 F-fluoropropyl)-1-propylxanthin (18 F-CPFPX) bindet als selektiver Antagonist an den A_1 AR. Dieser Ligand ermöglicht die Erforschung adenosinergischer Mechanismen mittels *in-vivo* Untersuchung des A_1 AR mit Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

Das Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, welche Rolle der Adenosin- A_1 -Rezeptor in der Schlafregulation bei Menschen spielt. Zu diesem Zweck wurden PET-Untersuchungen des Gehirns mit 18 F-CPFPX und quantitative EEG-Analysen kombiniert. Man vermutete, dass während des Schlafentzugs eine Anreicherung von Adenosin im Gehirn stattfinden würde, dass aber gleichzeitig auch die A_1 AR-Konzentration beeinflusst werden könnte. Daher untersuchten wir, ob diese Effekte mit einer Veränderung der 18 F-CPFPX-Anreicherung im Hirn sichtbar gemacht werden können. Es wurde auch geprüft, ob Koffein die Verteilung des Radioliganden beeinflusst, da Koffein an den A_1 - und A_{2A} -Rezeptor bindet. Weiter sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der A_1 -Rezeptorbelegung und den Veränderungen im Wach- und Schlaf-EEG während des Schlafentzugs und nach Einnahme von Koffein ermittelt werden.

Die 18 F-CPFPX-Synthese erfolgte analog einer bereits bekannten Reaktion, und wurde gemäss Anforderungen der guten Herstellpraxis (GMP) validiert. Wir erzielten eine radiochemische Ausbeute von 6 % und eine spezifische Aktivität von über 80 GBq/ μ mol. Das Endprodukt erfüllte alle Anforderungen betreffend Sterilität, Apyrogenität, Isotonizität und radiochemischer und chemischer Reinheit, und konnte daher gefahrlos an Menschen appliziert werden.

Wir führten eine Studie mit zehn jungen gesunden Probanden durch. Das Protokoll bestand aus zwei Kontrollnächten, gefolgt von einem 40-stündigen Schlafentzug und einer Erholungsnacht. In den Nächten wurde der Schlaf polysomnographisch aufgezeichnet, und während des Schlafentzugs wurden alle drei Stunden Wach-EEG-Messungen durchgeführt. Nach 16 Stunden des Wachseins verabreichte man den Versuchspersonen unter randomisierten, doppel-blinden Bedingungen 300 mg Koffein mit verzögerter Wirkstofffreigabe oder Placebo. PET-Untersuchungen mit ~ 80 MBq ^{18}F -CPFPX erfolgten ~ 8 h vor der zweiten Kontrollnacht und vor der Erholungsnacht.

Generell fanden wir eine hohe ^{18}F -CPFPX-Anreicherung in Hirnregionen mit hoher $A_1\text{AR}$ -Dichte, d.h. in der Hirnrinde, im Thalamus und in den Basalganglien. Dagegen wurde im Hirnstamm und im Cerebellum, wo die $A_1\text{AR}$ -Konzentration gering ist, eine tiefe Tracerbindung beobachtet. Die Verteilungsvolumina (DV) des Radioliganden, berechnet mittels graphischer Analyse nach Logan (GA), zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den PET-Scans vor und nach Schlafentzug, weder in der Placebo- noch in der Koffein-Gruppe. Die EEG-Spektren der Placebo-Gruppe wiesen einen typischen Schlafentzug-induzierten Anstieg der Marker der Schlafhomöostase auf, nämlich der Theta-Aktivität (5-8 Hz) im Wachzustand und der Delta-Aktivität (1-4 Hz) im nonREM-Schlaf. Diese Effekte wurden in der Koffein-Gruppe nicht beobachtet. Korrelationsanalysen zeigten keinen Zusammenhang zwischen ^{18}F -CPFPX-Bindung und Theta- und Delta-Aktivität im Wachzustand bzw. im nonREM-Schlaf. Signifikante negative Korrelationen wurden jedoch zwischen Traceranreicherung und EEG-Alpha-Aktivität (8-12 Hz) unter Kontrollbedingungen (vor dem Schlafentzug) gefunden, dies sowohl im Wachzustand als auch im nonREM-Schlaf. Ausserdem zeigten sich in der Placebo-Gruppe positive Korrelationen zwischen den Unterschieden in der Tracerbindung und in der Alpha-Aktivität im Wach-EEG während des Schlafentzugs. Solche Korrelationen wurden in der Koffein-Gruppe nicht beobachtet.

Unsere Befunde bestätigen eine hohe $A_1\text{AR}$ -Konzentration in Hirnarealen, welche in die Schlafregulation involviert sind. Die Resultate deuten darauf hin, dass Schlafentzug und Koffein keinen signifikanten Effekt auf die A_1 -Rezeptorbelegung haben, und dass der $A_1\text{AR}$ vermutlich an der homöostatischen Regulation des Schlafs nicht beteiligt ist. Jedoch wurden Zusammenhänge zwischen der Alpha-Aktivität im EEG und der ^{18}F -CPFPX-Anreicherung im Gehirn gezeigt. Alpha-Aktivität weist eine hohe inter-individuelle Variabilität auf, und die spektrale Leistung im Alpha-Bereich wird auch durch den Wachheitsgrad moduliert. Die beobachteten Korrelationen zwischen der Radioligandbindung und Alpha-Aktivität lassen vermuten, dass der $A_1\text{AR}$ an der Regulation der Vigilanz beim Menschen beteiligt ist. Dagegen scheint der $A_1\text{AR}$ nicht verantwortlich zu sein für die Auswirkung von Koffein auf das Wach- und Schlaf-EEG. Eine Studie mit einer grösseren Probandengruppe wäre nötig,

um die Reproduzierbarkeit und die statistische Signifikanz der Resultate zu bestätigen. Weiter könnte eine PET-Studie mit dem selektiven A_{2A}AR-Antagonisten ¹¹C-TMSX wichtige Informationen liefern, um auch die Rolle des A_{2A}AR bei der Regulation des Schlaf-Wach-Zyklus näher aufzuklären.