

# A P2X7 receptor részvétele a központi idegrendszer megbetegedéseinek állatmodelljében

Doktori értekezés

**Otrokocsi Lilla**

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kittel Ágnes, D.Sc. tudományos tanácsadó

Konzulens: Dr. Sperlách Beáta, D.Sc. tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Román Viktor, Ph.D. csoportvezető

Dr. Köles László, Ph.D. egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Hársing László, D.Sc. tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Miklya Ildikó, Ph.D. egyetemi docens

Dr. Tarnawa István, Ph.D. csoportvezető

Budapest

2018

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Bevezetés .....	10
2.1. A purinerg jelátvitel .....	10
2.1.1. A P2X7 receptor jellemzői .....	11
2.2. A major depresszió .....	13
2.2.1. A betegség háttérmechanizmusa .....	15
2.2.2. A P2X7 receptor és a depresszió kapcsolata .....	16
2.3. Az autizmus spektrumzavar (ASD) .....	18
2.3.1. Az anyai immunaktiváció szerepe az autizmus patomechanizmusában .....	19
2.3.2. A P2X7 receptor feltételezett szerepe az autizmus kialakulásában .....	20
2.4. A Parkinson-kór .....	21
3. Célkitűzések .....	24
4. Módszerek .....	26
4.1 Kísérleti állatok .....	26
4.2 Kísérleti elrendezés .....	27
4.3 A depresszió állatmodellje .....	28
4.3.1. Tanult tehetetlenség .....	28
4.3.2. Elektronmikroszópós sztereológiai analízis .....	30
4.3.3. RT-PCR .....	32
4.3.4. Western blot .....	33
4.3.5. Hippokampális szemcsesejtek vizsgálata .....	34
4.3.6. NR2B/GluN2B alegység kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata .....	34
4.4. Az autizmus állatmodellje .....	35
4.4.1. Az anyai immunrendszer aktiválása .....	35
4.4.2. Drogok és kezelések .....	36
4.4.3. Szociális preferencia .....	36
4.4.4. Repetitív tisztálkodás (self-grooming) .....	37
4.4.5. Üveggolyó ásás (marble burying) .....	37

4.4.6. Rotarod teszt.....	38
4.4.7. Exploráció nyílt térben (open field) .....	38
4.4.8. Kisagyi Purkinje sejtek kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata.....	39
4.4.9. Szinaptoszóma preparátumok .....	39
4.4.10. Magzati agykéreg fejlődési zavara .....	40
4.4.11. Citokinek multiplex bead array analízise .....	41
4.4.12. HPLC analízis .....	42
4.5. A Parkinson-kór <i>in vitro</i> modellje .....	44
4.5.1. Dopaminerg neuronok jelölése a szubsztancia nigrában.....	44
4.6. Statisztikai módszerek .....	45
5. Eredmények .....	46
5.1. A P2X7 receptor szerepe a depresszió állatmodelljében .....	46
5.1.1. A tanult tehetetlenség kialakulása .....	46
5.1.2. A tanult tehetetlenség hatása a gyrus dentatus tüskeszinapszis sűrűségére .....	49
5.1.3. A szemcsesejtek kvantitatív összehasonlítása.....	51
5.1.4. A P2rx7 expresszió mérése .....	51
5.1.5. Szinaptikus markerek Western blot analízise.....	52
5.1.6. Tanult tehetetlenség hatása az NR2B/GluN2B glutamát receptor alegységre ....	55
5.2. A P2X7 receptor közreműködése a MIA autizmus modellben .....	57
5.2.1. Viselkedésbeli változók.....	57
5.2.2. Kisagyi Purkinje sejtek.....	59
5.2.3. Szinaptoszóma preparátumok .....	60
5.2.4. Anyai és embrionális citokinek .....	61
5.2.5. Nukleotid és monoamin tartalmak vizsgálata .....	63
5.2.6. Embrionális agykéreg fejlődési zavara .....	65
5.2.7. Prenatális előkezelés P2X7 antagonistával .....	66
5.2.8. Posztnatális utódkezelés P2X7 antagonistával.....	72
5.3. SZV558 protektív hatása rotenon-indukálta <i>in vitro</i> Parkinson modellben.....	74
6. Megbeszélés .....	76
6.1. Depresszió modell.....	76

6.2. Autizmus modell.....	79
6.3. Parkinson modell .....	83
7. Következtetések.....	85
8. Összefoglalás .....	87
9. Summary.....	89
10. Irodalomjegyzék .....	91
11. Saját publikációk jegyzéke .....	110
12. Köszönetnyilvánítás .....	111
13. Függelék .....	113

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamin, szerotonin
<b>5-HTP</b>	5-hidroxitriptofán
<b>ADP</b>	adenosine diphosphate/adenozin-difoszfát
<b>AMP</b>	adenosine monophosphate/adenozin-monofoszfát
<b>ANOVA</b>	analysis of variance/varianciaanalízis
<b>ASD</b>	autism spectrum disorder/autizmus spektrumzavar
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate/adenozin-trifoszfát
<b>BBG</b>	Brilliant Blue G
<b>BCA</b>	bicinchoninic acid
<b>BDNF</b>	brain derived neurotrophic factor
<b>BrdU</b>	bromodeoxyuridine
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP
<b>CA (1, 3)</b>	cornu ammonis (1, 3)/Ammonszarv
<b>cDNS</b>	complementer/komplementer DNS
<b>COMT</b>	catechol-O-methyltransferase/katekolamin-O-metil-transzferáz
<b>CP</b>	cortical plate/kérgi lemez
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein
<b>DA</b>	dopamin
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidine
<b>DAMP</b>	danger associated molecular pattern/veszélyhez asszociált molekuláris mintázat
<b>DOPAC</b>	3,4-dihydroxyphenylacetic acid/3,4-dihidroxifenilecetsav
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DR</b>	dorzális ráfe

<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid/etilén-diamin-tetraecetsav
<b>ERK</b>	extracellular-signal-regulated kinase
<b>FST</b>	forced swim test/kényszerített úszás teszt
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminobutyric acid/ $\gamma$ -aminovajsav
<b>Gapdh</b>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GluN2B</b>	N-methyl-D-aspartic acid receptor subtype 2B/N-metil-D-aszpartát receptor altípus 2B
<b>GPCR</b>	G-protein coupled receptor/G-fehérje kapcsolt receptor
<b>HIAA</b>	hydroxyindoleacetic acid/hidroxi-indolecetsav
<b>HPLC</b>	high pressure liquid chromatography/nagynyomású folyadékkromatográfia
<b>HPR</b>	horseradish peroxidase/tormaperoxidáz
<b>HVA</b>	homovanillic acid/homovanillinsav
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	interleukin-1 $\alpha$
<b>IL-10</b>	interleukin-10
<b>IL-17<math>\alpha</math></b>	interleukin-17 $\alpha$
<b>IL-18</b>	interleukin-18
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	interferon- $\alpha$
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	interferon- $\gamma$
<b>ITI</b>	intertrial interval/próbák közötti idő, szünet
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>JNJ</b>	JNJ47965567
<b>KC</b>	keratinocyte chemoattractant
<b>kDa</b>	kilodalton

<b>KO</b>	knockout/génkiütött (-/-)
<b>LC</b>	locus coeruleus
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihydroxyphenylalanine/levodopa
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide/lipopoliszaharid
<b>MAPK</b>	mitogene activated protein kinase
<b>MIA</b>	maternal immune activation/anyai immunaktiváció
<b>MAO</b>	monoamin-oxidáz
<b>MAO-B</b>	monoamin-oxidáz B típus
<b>MPTP</b>	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
<b>mRNS</b>	messenger/hírvivő ribonukleinsav
<b>MZ</b>	marginal zone/marginális zóna
<b>NA</b>	noradrenalin
<b>NAc</b>	nucleus accumbens
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor kappa B
<b>NGS</b>	normal goat serum/normál kecskeszérum
<b>NHS</b>	normal horse serum/normál lószérum
<b>NLRP3</b>	nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartic acid/N-metil-D-aszpartát
<b>NR2B</b>	N-methyl-D-aspartic acid receptor subtype 2B/N-metil-D-aszpartát receptor 2B altípus
<b>OGR</b>	Orvosi Géntechnológiai Részleg
<b>OCT</b>	optimal cutting temperature/optimális vágási hőfok
<b>P2X</b>	ionotróp purinerg receptorcsalád
<b>P2X4</b>	ionotróp purinerg receptor 4-es altípus
<b>P2X7</b>	ionotróp purinerg receptor 7-es altípus
<b>P2Y</b>	metabotróp purinerg receptorcsalád

<b>PAMP</b>	pathogen associated molecular pattern/patogénekkal asszociált molekuláris mintázat
<b>PB</b>	phosphate buffer/foszfát puffer
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction/polimeráz láncreakció
<b>PFA</b>	paraformaldehid
<b>PFC</b>	prefrontal cortex/prefrontális agykéreg
<b>PLP-C</b>	phospholipase-C
<b>PLP-D</b>	phospholipase-D
<b>Poli(I:C)</b>	polinozin-policitidilsav, PIC
<b>PSD</b>	postsynaptic density/posztzinaptikus denzitás
<b>PSD95</b>	postsynaptic density protein 95
<b>PVDF</b>	polivinilidén difluorid
<b>RIPA</b>	radioimmunoprecipitation assay
<b>RNS</b>	ribonukleinsav
<b>ROS</b>	reactive oxygen species/reaktív oxigénformák, szabadgyökök
<b>rpm</b>	round per minute/fordulatszám percenként
<b>SAL</b>	saline/fiziológiás sóoldat
<b>SATB2</b>	special AT-rich sequence-binding protein 2
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SEM</b>	standard error of mean/középérték közepes hibája
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorphism/egyponos nukleotid polimorfizmus
<b>SP</b>	subplate/lemez alatti réteg
<b>SPE</b>	solid phase extraction/szilárd fázis extrakció
<b>SPF</b>	specific pathogen free/specifikus patogénektől mentes
<b>SPT</b>	sucrose preference/cukor előnyben részesítése
<b>SVZ</b>	subventricular zone/szubventrikuláris zóna



<b>TLR</b>	toll-like receptor
<b>TBR1</b>	T-box brain 1
<b>TBS</b>	tris-buffered saline
<b>TBST</b>	tris-buffered saline with Tween
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrozis faktor- $\alpha$
<b>TST</b>	tail suspension test/farokfelfüggesztéses teszt
<b>VEH</b>	vehicle/vivőanyag, oldószer
<b>VTA</b>	ventral tegmental area/ventrális tegmentális terület
<b>VVE</b>	Viselkedés Vizsgálati Egység
<b>VZ</b>	ventricular zone/ventrikuláris zóna
<b>WT</b>	wild-type/ vad típus (+/+)

## **2. Bevezetés**

Az emberi szervezet fiziológias működését, valamint a patológiai folyamatokban fellépő változásokat évszázadok óta állatkísérletek segítik megérteni. Betegségek modellezésével megismerhetjük a kialakulásukhoz vezető háttérmechanizmust, ezáltal új terápiás lehetőségeket azonosíthatunk. A megbetegedések egy részének már ismert hatékony kezelési módja, azonban számos idegrendszeri kórkép esetében nincsen széles körben alkalmazható, megfelelő hatású gyógyszer. Ilyen rendellenesség a major depresszió, az autizmus spektrumzavar és a Parkinson-kór is, melyekkel kutatómunkám során foglalkoztam. Depressziós betegeknél a jelenleg alkalmazott antidepresszánsok késleltetve fejtik ki hatásukat, gyakoriak a nem kívánt tünetek, illetve a páciensek jelentős hányadánál egyáltalán nem vezetnek állapot javuláshoz. Az autizmus terápiája döntően a viselkedési tünetek mérséklését jelenti, melyhez pszichoszociális fejlesztő módszereket, súlyosabb esetekben antipszichotikumokat alkalmaznak. Parkinson-kórban szenvedő páciensek gyógyszeres kezelése enyhít bizonyos tüneteket, viszont gyakran együtt jár számos mellékhatással. Mindhárom kórkép terápiájában szükség lenne valóban hatékony gyógyszerekre, új gyógyszer-célpontok azonosítására, melyhez elengedhetetlen megismerni a betegségek patofiziológiáját.

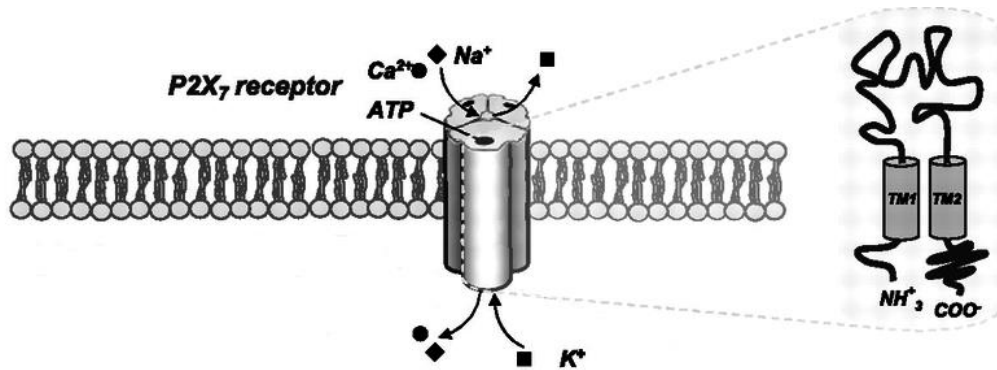
### **2.1. A purinerg jelátvitel**

A purinok jelátvivő funkcióját a hetvenes évek óta ismerik, s azóta számos kutatás segített feltárni alapvető szerepüket az idegi jelátvitelben. Ma már tudjuk, hogy az adenzin-trifoszfát (ATP) nem csak energiahordozó molekulaként, és a DNS építőelemeként fordul elő a szervezetben, hanem fontos ingerületátvivő, neuromodulátor, és trofikus szerepe is van. Felszabadulhat különböző kóros stimulusok, mechanikai sérülések hatására, de fiziológias idegi aktivitás is vezethet ATP ürüléshez. Az extracelluláris térbe jutott ATP különböző purin receptorokon fejt ki hatását, melyek közül több a bomlástermékeit, az adenzin-difoszfátot (ADP), adenzin-monofoszfátot (AMP), vagy az adenzint is megkötik. Ennek alapján két fő csoportra osztották a purinerg receptorokat: a P1 csoportban az adenzin, a P2 csoportban jellemzően az ATP, de más nukleotidok is lehetnek ligandumok. A P2-es receptorok működésük szerint további két csoportba

sorolhatók: az ionotróp receptorok a P2X, a G-fehérje kapcsolt (GPCR) metabotróp receptorok a P2Y családba tartoznak. A P2X receptor családnak 7 altípusa van, a P2Y családban 8 altípust különböztetünk meg<sup>1,2</sup>. A P2X receptorok nem-szelektív kation csatornák, nagy a  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztő-képességük, működésük a membránt depolarizálja. Az ATP gyorsan aktiválja őket, majd a jellemző kationok átáramlanak a három alegység által alkotott csatornán<sup>3</sup>. A P2Y receptorok tipikus GPCR tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például a receptor szerkezetét kialakító 7 transzmembrán régió, az intracelluláris C-terminálison található protein kináz kötőhelyek, sejten belüli másodlagos hírvivő molekulák (PLP-C, adenil-cikláz, stb.) aktivációja<sup>3</sup>. Kutatócsoportunk érdeklődésének középpontjában a purinerg receptorok P2X családjának számos egyedi tulajdonsággal bíró tagja, a P2X7 altípus áll<sup>4</sup>. A P2X7 receptor részvételét több betegség hátterében kimutatták már, emiatt potenciális farmakoterápiás célpont lehet.

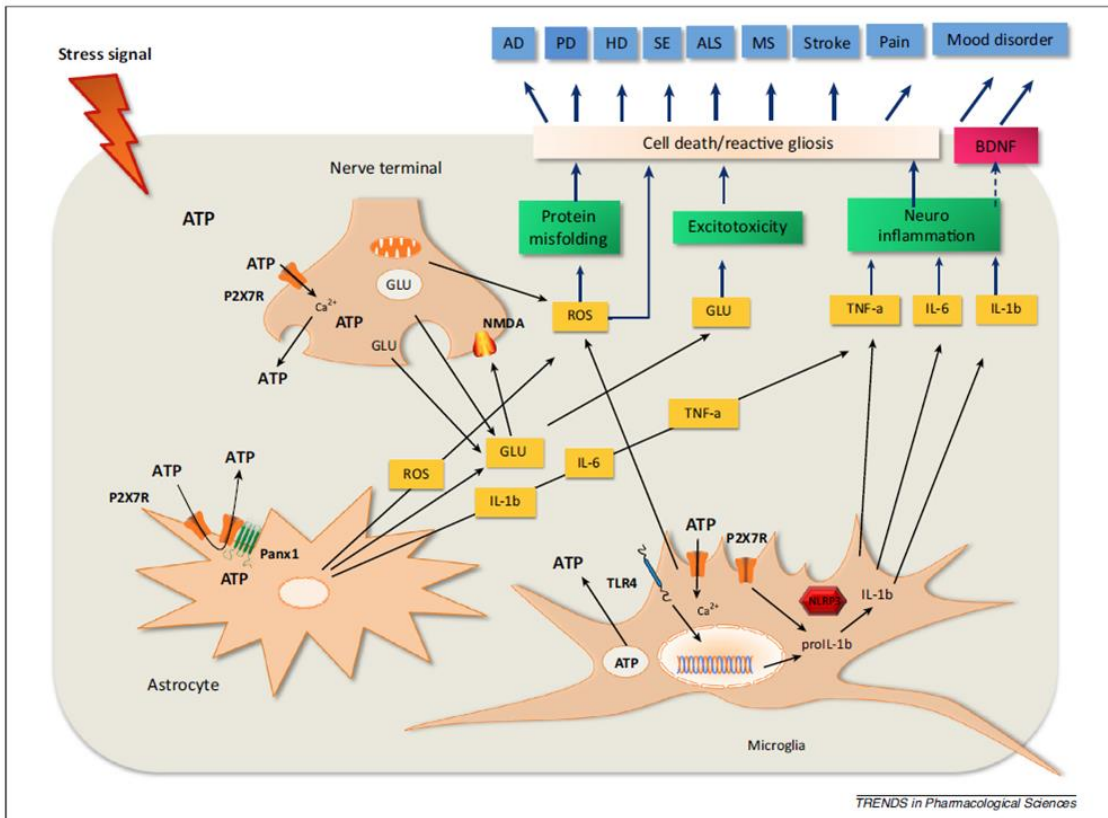
#### 2.1.1. A P2X7 receptor jellemzői

A P2X7 receptor egy nem-szelektív,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$ -ra is áteresztő kationcsatorna<sup>5-8</sup>. A P2X receptorokra jellemzően két transzmembrán régióból (1. ábra), 10 extracelluláris hurokból és intracelluláris N és C végződésekből áll, és összesen 595 aminosav építi fel<sup>9</sup>. A P2X altípusok közül egyedül a P2X7 nem alkot heterotrimereket más alegységekkel<sup>10</sup>. A többi hat altípustól eltérően csak magas (akár több száz mikromólos) ATP koncentráció aktiválja, azonban a szintetikus analóg BzATP sokkal hatásosabb agonistája<sup>11</sup>. További egyedi tulajdonsága, hogy hosszan tartó vagy ismételt aktiváció következtében kitágulhat a pórusa, átengedve akár 600 kDa méretű molekulákat is<sup>4</sup>. A póruson keresztül a sejtartalom is kiürülhet, ezért ez jelenség a P2X7 receptor citotoxikus funkciójával áll kapcsolatban.



1. ábra A P2X7 receptor szerkezeti képe<sup>12</sup>. A három egyforma alegység egyenként két transzmembrán régiót, extracelluláris hurkokat és intracelluláris amino- és karboxilterminálist tartalmaz.

A P2X7 receptor elsősorban hematopoetikus eredetű vörösvérsejteken, monocitákon, perifériás makrofágokon, dendritikus sejteken, hízósejteken, T- és B-limfocitákon, mikroglia sejteken és Schwann-sejteken található meg<sup>1</sup>, de leírták már asztrocitákon<sup>13</sup> és preszinaptikus idegvégződéseken is<sup>6,8</sup>. Fontos szerepet játszik a neurotranszmitterek felszabadulásának modulálásában<sup>14,15</sup>, ugyanis aktivációja  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást vált ki, amit glutamát, majd GABA ürülés követ<sup>5,8</sup>. Kapcsolatát igazolták a PLP-D, ERK, JNK, p38 MAPK jelátviteli folyamatokkal is<sup>16</sup>. A receptor aktiváció ko-stimulust biztosít számos citokin termelődésének indukciójához, így hatással van pl. az IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 és a TNF- $\alpha$  produkciójára<sup>16-19</sup>, ezáltal részt vesz gyulladásos folyamatok beindításában. Emellett mikroglia sejtek proliferációjának és aktivációjának szabályozásával a P2X7 receptor „vészjelzéseként” szolgálhat<sup>20</sup>, és közreműködhet neurodegeneratív és más központi idegrendszeri betegségek patofiziológiájában<sup>12,21-23</sup>. A receptor hozzájárul az Alzheimer- és Parkinson-kór<sup>24-27</sup>, az epilepszia<sup>28,29</sup>, a skizofrénia<sup>30,31</sup>, a migrén<sup>32</sup>, és keringési betegségek kialakulásához<sup>12</sup>, és számos tanulmány szerint a depresszió<sup>33-38</sup> és a bipoláris zavar<sup>39,40</sup>, hátterében is lényeges a P2X7 aktiváció (2. ábra).

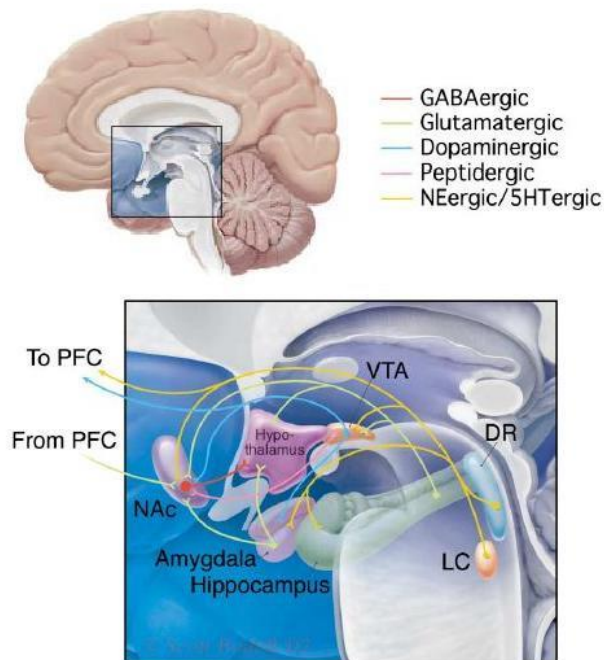


2. ábra. A P2X7 receptor aktivációja számos betegségben szerepet játszik<sup>23</sup>. Különböző stresszorok hatására upregulálódhat idegsejteken, asztrocitákon vagy mikroglia sejteken egyaránt, amivel fokozódik az ATP ürülés, majd a P2X7 aktiváció is. Ennek hatására glutamát szabadul föl az axon terminálisokból, ami excitotoxicitáshoz, majd sejtpusztuláshoz vezethet. Eközben az NLRP3 inflammaszómában indukálódik az IL-1β érése, illetve további citokinek ürülnek, beindítva a neuroinflammációt. A P2X7 aktiváció szabadgyökök (ROS) termeléssel is együtt jár, ami szintén hozzájárul a sejtek károsodásához, amely folyamat jellemzője a neurodegeneratív betegségeknek, a stroke-nak, valamint kedélybetegségeknel is előfordul.

## 2.2. A major depresszió

A major depresszió a fejlett országok lakosságának közel egyötödét érintő kedélybetegség<sup>41</sup>, ami rendkívül nagy társadalmi és gazdasági terhet jelent<sup>42,43</sup>. Sajnálatos tény, hogy a jelenleg alkalmazott antidepresszánsok sok esetben nem eredményeznek tartós javulást, viszont számos mellékhatással bírnak<sup>41,44</sup>. A depresszió patomechanizmusa igen összetett, mivel a stressz és epigenetikai tényezők mellett<sup>45</sup> a betegek közel 40%-ánál szerepet játszik a genetikai háttér is<sup>41,44,45</sup>. A depresszió általánosan elfogadott kritériumai

szerint a diagnózishoz az olyan jellemző megnyilvánulások, mint a levertség, ingerlékeny hangulat, érdeklődés hiánya, étvágytalanság, elhízás, álmatlanság, alvászavarok, fáradtság, értéktelenség érzése, koncentrációs problémák, halállal és öngyilkossággal kapcsolatos visszatérő gondolatok közül legalább ötnek napi rendszerességgel kell jelen lennie legkevesebb két héten át<sup>41,46</sup>. Jellemző, hogy a tünetek megakadályozzák az egyén normális életvitelét, gondot jelentenek szociális kapcsolataiban. Különböző agyterületek felelősek a depresszió során fellépő jellemző tünetekért (3. ábra). Míg a kognitív problémák (memóriazavar, értéktelenség érzése) a prefrontális kéreghez és a hippocampushoz köthetők, az amigdalának és a nucleus accumbens-nek az örömtelenség érzet (anhedónia) és a csökkent motiváció kialakulásában van szerepe, a hipotalamusz károsodása pedig a neurovegetatív tüneteket (alvász- és étkezési problémák) okozza<sup>46</sup>.



3. ábra. **Depresszióban érintett agyterületek és neurotranszmitter rendszerek**<sup>44</sup>. PFC: prefrontális agykéreg, NAc: nucleus accumbens, VTA: ventrális tegmentális terület DR: dorzális ráfe LC: locus coeruleus; és neurotranszmitter rendszerek: GABAerg, glutamáterg, dopaminerg, peptiderg, noradrenerg, szerotonerg.

### 2.2.1. A betegség háttérmechanizmusa

A depresszió kialakulásával kapcsolatban több elfogadott elméletet létezik, elsőként a monoaminerg teóriát fogalmazták meg<sup>47</sup>. Ez azon alapul, hogy depressziós betegekben lecsökken a noradrenalin és szerotonin mennyisége, ami a monoaminerg rendszer alulműködésére utal. Jelenleg a legelterjedtebb antidepresszánsok is ezeket a transzmitter rendszereket modulálják. Emellett leírták a dopaminerg rendszer zavarát<sup>48</sup>, és depresszióhoz vezethet a glutamáterg túlaktiváció is<sup>49-51</sup>. Az immunrendszer aktiválódása és a fokozott citokin ürülés gyakran megfigyelhető depressziós betegeknél, illetve bizonyos gyulladásos betegségeknél (pl. II-es típusú cukorbetegség, reumatoid arthritisz, érrendszeri problémák) nagyobb eséllyel alakul ki depresszió<sup>52-54</sup>. A hepatitisz C gyógyításakor alkalmazott INF- $\gamma$  szintén okozhat depressziót, illetve az INF- $\alpha$ -val kiváltott depresszió-szerű tünetek antidepresszánsokkal csillapíthatók<sup>55</sup>. Ezek a megfigyelések a depresszió gyulladás eredetű hipotézisét támasztják alá<sup>53</sup>. A depressziós állapottal rendszerint együtt járnak a stressz klinikai tünetei, pl. glukokortikoid hormonok szintje megnő<sup>56,57</sup>. Ez az emelkedett glukokortikoid mennyiség azonban károsítja a hippocampuszt, főleg a CA3 régió piramissejtjeit és a gyrus dentatus szemcsesejt alatti zónájában zajló neurogenezist<sup>44,58</sup>, a szerkezeti és funkcionális leromlás pedig hozzájárul a depressziós páciensekben fellépő kognitív problémák megjelenéséhez<sup>44</sup>. A folyamat azonban visszafordítható, antidepresszánsok hatására normalizálódik az új idegsejtek képződése<sup>59</sup>, valamint nem pusztulnak tovább a piramissejtek szinapszisai és a gyrus dentatus dendrittüskéi sem<sup>60,61</sup>. Ha a neuronok plaszticitásában, az információ feldolgozásában zavar lép fel, vagy degeneratív folyamatok következtében sejtpusztulás történik, egyes elképzelések szerint az is depressziós állapothoz vezethet<sup>62,63</sup>. Ezt támasztja alá a hippocampuszban mért alacsony BDNF szint, ami antidepresszánsok hatására visszaáll a normális értékre, illetve a BDNF injekció antidepresszáns-szerű hatása rágcsőknél<sup>64</sup>. Feltételezhetően a különböző hipotézisek nem önállóan, hanem egymással kölcsönhatásban vezetnek a depresszió kialakulásához.

### 2.2.2. A P2X7 receptor és a depresszió kapcsolata

A major depresszió összetett pszichiátriai betegség, melynek kialakulásában genetikai faktorok és környezeti hatások egyaránt fontos szerepet játszanak<sup>65</sup>. A P2rx7 esetében a különböző genetikai polimorfizmusok közül a funkcionyeréses mutációk kifejezetten a depresszió kialakulásával, illetve a depresszióra való hajlammal hozhatók összefüggésbe<sup>2,66-68</sup>. Ilyenkor a DNS szekvencia nem kódoló, intron részében egy nukleotidnyi variancia van, így a gén kettő (több) tipikus alléllal rendelkezik. Az egyik ilyen polimorfizmus a Gln460Arg, vagyis glutamin helyett arginin található a P2rx7 gén 13-as intronjában<sup>66,67,69</sup>. Cukorbetegket vizsgálva kimutatták, hogy ezt a mutációt hordozó pácienseknél sokkal nagyobb valószínűséggel alakult ki depresszió<sup>70</sup>. Egyes tanulmányok cáfolták a Gln460Arg SNP kapcsolatát a betegséggel<sup>71-73</sup>, azonban a legfrissebb meta-analízis újból megerősítette az összefüggést<sup>74</sup>. Azonosítottak hisztidinről tirozinra (His155Tyr) pontmutációt<sup>68</sup> és egy alanin-triptofán cserét (Ala348Thr) is a depresszióval kapcsolatban<sup>2</sup>, azonban előbbiről szintén leírtak ennek ellentmondó eredményt<sup>71</sup>. Ezek alapján feltételezhető, hogy a P2X7 receptor részt vesz a betegség patofiziológiájában. Számos kísérlet született a P2X7 receptor és a depresszió közötti összefüggés bizonyítására az utóbbi években kutatócsoportunk is intenzíven foglalkozik a témával. P2rx7<sup>-/-</sup> egerek viselkedését vizsgálva többen kimutatták, hogy a génkiütött állatok antidepresszáns fenotípussal rendelkeznek<sup>34-37</sup>. Basso és munkatársai leírták a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek általános viselkedési fenotípusát<sup>34</sup>. Nem találtak genotípusos különbséget a spontán lokomotoros aktivitásban és az emelt keresztpallón vizsgált szorongásos viselkedésben sem, azonban egy másik tanulmányban a génkiütés szorongás csökkentő hatását írták le<sup>35</sup>. Kutatócsoportunk három jól ismert depresszió állatmodellben [kényszerített úszás (FST), faroknál felfüggesztés (TST), és cukorítás (SPT)] vizsgálta vad típusú és a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek viselkedését<sup>36,37</sup>. P2rx7<sup>+/+</sup> egerekben megfigyelhető volt a depressziós állapotra jellemző magatartás az egyes tesztekben, pl. az úgynevezett „behavioral despair”, vagyis az állatok hamarabb feladták az úszást az FST tesztben, illetve a faroknál fellógatás ellen küzdést a TST-ben. A P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél viszont nem alakult ki depresszió-szerű állapot, vagyis a P2rx7 genetikai inhibíciója védelmet nyújthat a depresszió kialakulásával szemben. Más munkacsoportok is hasonló eredményeket kaptak ezekben a tesztekben<sup>34,35</sup>. Elvégeztük az



FST és TST vizsgálatokat a P2X7 receptor farmakológiai blokkolását követően is, és a génkiütéshez hasonló eredményeket kaptunk, így is fennállt az antidepresszáns hatás<sup>36</sup>. P2rx7 hiányos állatokban nem alakult ki az LPS injekciót követő anhedónia, melyet az SPT tesztben vizsgáltunk. Ebben a tesztben a depressziós-állapotra is jellemző örömtelenség-érzés abban nyilvánul meg, hogy az egerek nem részesítik előnyben a cukrozott vizet a cukormentes vízzel szemben. P2X7 antagonisták (BBG, AZ-10606120) adásakor szintén megjelent a cukor preferencia<sup>37</sup>. Kimutattuk, hogy P2rx7<sup>-/-</sup> egerek vérében szignifikánsan alacsonyabb volt az ACTH mennyisége restraint stresszt követően, vagyis ha korlátoztuk az állatok mozgását fél órára, tehát a génkiütés következtében a stresszre adott hormonális reakció is enyhébb<sup>36</sup>. Kísérleteink alapján feltételezzük, hogy az antidepresszáns fenotípus kialakításában az idegsejteken vagy asztrocitákon található P2X7 receptorok vesznek részt<sup>36</sup>. Ha vad típusú egerek csontvelejét besugárzással kiirtottuk és P2rx7<sup>-/-</sup> donorból származót ültettünk a helyére, a létrehozott kiméra állatokban nem jelent meg az antidepresszáns viselkedés. Az agyukból kinyert mikroglia sejteken nem volt kimutatható a P2X7 receptor, így azt feltételeztük, hogy a depressziós állapot nem a csontvelő eredetű immunsejtek vagy mikroglia sejtek által mediált jelátvitel következménye. A neuronok potenciális közreműködését alátámasztja, hogy a P2X7 receptort leírták a gyrus dentatus szemcsesejtjein és a CA1, CA3 piramissejteken egyaránt<sup>6,7,75</sup>. Továbbá szignifikánsan több BrdU jelölt szemcsesejtet találtunk a P2rx7 génhányos egerekben, tehát a P2X7 receptor aktivációja hátráltathatja a neurogenézist<sup>37</sup>. Depresszióban megfigyelhetőek a plaszticitásbeli változások, pl. az agykéreg<sup>76</sup> és a hippokampusz tüskeszínapszisainak csökkenő száma<sup>77</sup>. Hajsán és munkatársai tanult tehetetlenségi modellt használva kimutatták, hogy patkányok hippokampuszában lecsökken a tüskeszínapszisok sűrűsége, majd antidepresszáns terápiával ez az érték visszaállítható<sup>60</sup>. A tüskeszínapszisok az idegsejtek közötti kommunikáció dinamikusan változó komponensei, jellemzően a serkentő neurotransmitter rendszerek használják információ átadásra<sup>78,79</sup>. Általában sok dendrit egy-egy tüskéje alkot színapszist egyetlen axon terminálissal, így növelve a kapcsoltságot az idegsejtek között<sup>80</sup>. Minél több színapszis alakul ki két idegsejt között, annál erősebb és hatékonyabb közöttük a kapcsolat<sup>78</sup>. A dendrittüskék számát és alakját a színaptikus plaszticitás nagymértékben befolyásolja<sup>81</sup>. A tüskeszínapszisok alakjának köszönhető egy

másik fontos tulajdonságuk, a kompartmentalizáció képessége. A nagy elektromos ellenállású vékony nyaki rész miatt integrálni tudják a beérkező serkentő jeleket, szűrik és modulálják az információt, ezáltal védik a neuront a túlzott gerjesztéstől<sup>82,83</sup>, a feji részben kialakuló magas  $Ca^{2+}$ -szint pedig jelátviteli útvonalakat indíthat be<sup>84</sup>. Éppen ezért ha zavar lép fel a tüskeszinapszisok eloszlásában, az kognitív problémákhoz vezethet, mint ahogy kedélybetegségek esetén tapasztalhatjuk. Major depresszióban szenvedő pácienseknél kisebb térfogatú hippokampuszt mutattak ki képalkotó vizsgálatok során<sup>57,85,86</sup>, valamint poszt-mortem agymintákban megfigyelhető volt a lecsökkent dendrittüske arborizáció<sup>77,87</sup>. A depressziós állapot létrejötte és a tüskeszinapszisok számának csökkenése közötti kapcsolatot már többen igazolták, azonban a P2X7 receptor utóbbival való összefüggését még csak csoportunk vizsgálta<sup>88</sup>, melyet dolgozatomban is ismertetek.

### **2.3. Az autizmus spektrumzavar (ASD)**

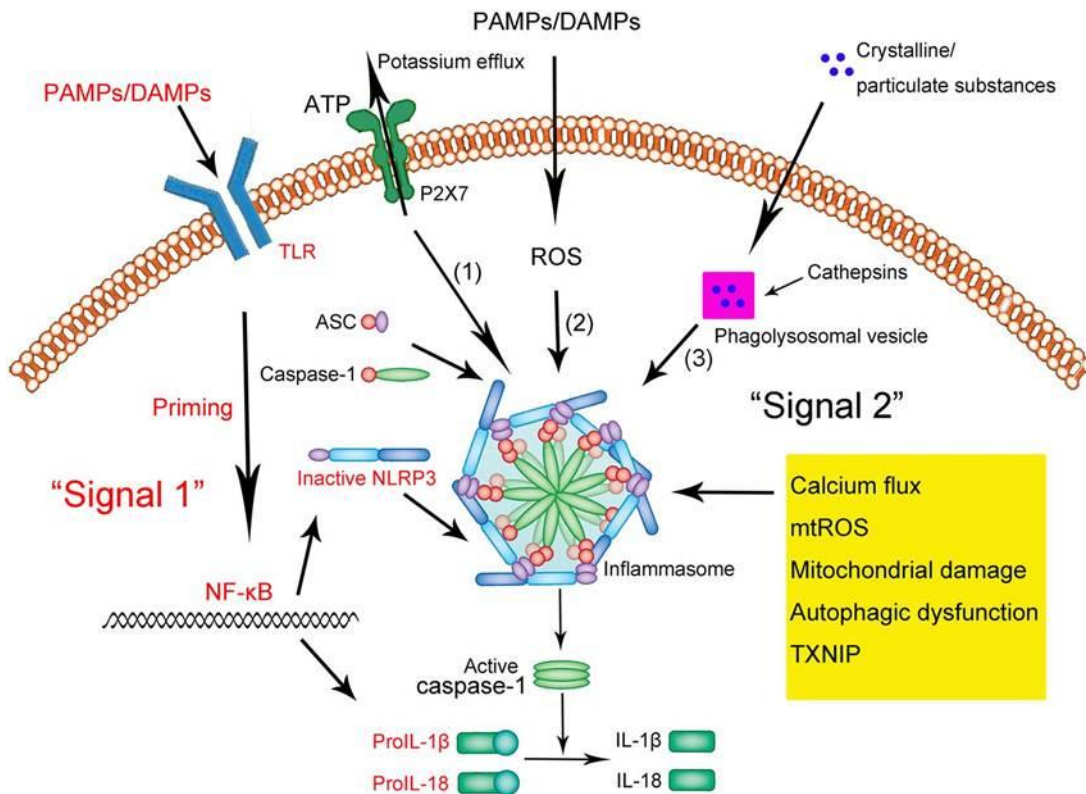
Az autizmus a magzati idegrendszer rendellenes fejlődése következtében kialakuló állapot<sup>89,90</sup>. Spektrum zavarként tekinthetünk rá, mert az enyhébb változatoktól kezdve egészen súlyos megjelenési formákban is előfordul. Az utóbbi évtizedekben rohamosan növekszik az autizmussal diagnosztizált gyermekek, fiatalok száma<sup>91</sup>, így érthető módon a betegség kialakulását és gyógyítását célzó kutatások száma is emelkedik. Érdekes tény, hogy fiúknál a rendellenesség előfordulása négyszer gyakoribb<sup>92,93</sup>, de ennek okára még nincsen magyarázat. Az ASD diagnosztizálásakor három fő tünetcsoportot azonosítanak: a szociális interakció zavart működése, kommunikációs problémák, valamint beszűkült, sztereotip, ismétlődő viselkedési elemek. Komorbiditásként az állapotot hiperaktivitás<sup>94</sup>, szorongás<sup>95</sup>, a szenzoros működések diszfunkciója<sup>96,97</sup>, és változó mértékben szellemi visszamaradottság<sup>98</sup> is kísérheti. Az ASD háttérmechanizmusáról még igen keveset tudunk, bár valószínű, hogy genetikai, epigenetikai és környezeti hatások interakciójaként alakulhat ki<sup>99</sup>. Az évek során különböző genetikai rendellenességeket, SNP mutációkat, vagy éppen szabálytalan kromoszóma szerkezeteket hoztak kapcsolatba az autizmusra való hajlammal<sup>100</sup>, melyek mellett kimutatták toxinok és gyógyszerek káros hatását és közreműködését<sup>101,102</sup>, továbbá nagy kockázatot jelentenek a perinatális fertőzések is<sup>103-107</sup>.

### 2.3.1. Az anyai immunaktiváció szerepe az autizmus patomechanizmusában

Az utóbbi években a terhesség során fellépő vírusfertőzést komoly rizikótényezőként említik az autisztikus állapot kialakulásával kapcsolatban. A fejlődési rendellenességhez vezető biokémiai változások nem a szervezetbe bekerülő fertőző ágens, hanem az anyai immunrendszer saját aktivációs folyamatai miatt indulhatnak be, mint ahogy azt immunaktivációt előidéző anyagokkal különböző állatkísérletekben modellezték is<sup>108-110</sup>. Valproátsav vagy polinozin-policitidilsav [poli(I:C)] injekció beadása után az anyai szervezetben beindult a gyulladáskeltő citokinek termelődése, melynek következtében mind az anyai vérplazmában, mind az utódok agyában emelkedett interleukin-6 (IL-6) szintet mértek. A többszörös IL-6 mennyiség a placentában is kimutatható poli(I:C) injekciót követően<sup>111</sup>, s ez a hatás könnyen áttevődik a magzatra is. Az IL-6 indukálja az interleukin-17 $\alpha$ -t (IL-17 $\alpha$ ), ami hatással lesz az idegrendszer fejlődésére, ez pedig autisztikus viselkedéshez vezethet<sup>112</sup>. Egy tanulmányban leírtak szerint azon terhes nők vérében, akiknek később autizmus spektrum zavarral vagy szellemi visszamaradottsággal diagnosztizáltak a gyermekét, az IL-6 szint magasabb volt<sup>113</sup>. Az anyai citokinek nagy mértékben befolyásolhatják a magzat agyában zajló folyamatokat, mint pl. neurogenesis, gliogenesis, neuronális migráció, szinapszisok kialakulása, és ezzel az idegrendszer kóros fejlődéshez vezetnek<sup>114,115</sup>. Azt azonban még nem tudjuk, hogy pontosan milyen szignalizációs útvonalon aktiválódik az anyai immunrendszer, és milyen változások alakítják ki az utódok autisztikus fenotípusát. Autista betegek agyában szintén megfigyelhetők a tartósan megváltozott immunstátusz jelei, mint pl. a mikroglia sejtek aktivációja<sup>116</sup> és a vérben mért emelkedett gyulladáskeltő citokin szint<sup>117-119</sup>, vagyis az immunrendszerre ható változások nem csak a születés előtt vannak jelen. Ennek alapján feltételezzük, hogy az autisztikus viselkedésformákat kialakító molekuláris útvonalakat megváltoztatva a tünetek visszafordíthatóak. Ugyanakkor nem ismert, hogy mi az a molekuláris kapcsoló szignál, amely az anyai szervezetben az egész folyamatot beindítja az immunaktiváció hatására, és amely az utódok kóros agyi fejlődését eredményezi.

### 2.3.2. A P2X7 receptor feltételezett szerepe az autizmus kialakulásában

A P2X7 receptor funkcióját még nem vizsgálták az ASD kialakulásával kapcsolatban, ezért annak közvetlen irodalmi alátámasztására nincs mód. Ennek ellenére a receptor bizonyos tulajdonságai alapján feltételezhető, hogy szerepe lehet az anyai immunaktiváció által kiváltott rendellenesség létrejöttében. Az immunrendszer sejtjei mellett az ideg- és gliasejtek is expresszálják a P2X7 receptort<sup>23</sup>, melynek aktivációja fontos lépés a gyulladáskeltő citokinek poszttranszlációs érési folyamataiban, a gyulladási reakció kialakulásában<sup>19</sup>. Az elsődleges stimulus a patogén asszociált vagy veszélyhez asszociált molekuláris mintázatok (PAMP; DAMP) kötődése a Toll-szerű receptorokhoz (TLR), melyek beindítják a citokin prekursorok átíródását. Az egyik ilyen belső vészjel az extracelluláris ATP szint emelkedése gyulladás vagy sejthalál következtében, amely a P2X7 receptor aktivációjához vezet. Ezután a következő lépés az NLRP3 receptorok oligomerizációja, vagyis az inflammaszóma kialakulása (4. ábra). Az inflammaszómák olyan intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek a prekursorból érett citokint hasítanak, ezáltal a veleszületett és szerzett immunitás különböző aspektusait szabályozzák, és az immunválaszt gyulladáshoz konvertálják<sup>120,121</sup>. Az érett inflammaszóma kialakulásához szükséges ko-stimulust a P2X7 receptor aktivációja biztosítja<sup>119</sup>. Emellett a receptor elősegíti az IL-6 ürülését<sup>122,123</sup>, az IL-1 $\beta$  érési folyamatát<sup>124</sup>, és a szabadgyökök termelődését is<sup>125</sup>. Ezt az útvonalat a depresszió gyulladás eredetű elméletével is kapcsolatba hozták<sup>126</sup>, de az autizmus patomechanizmusában szintén jelentős lehet.

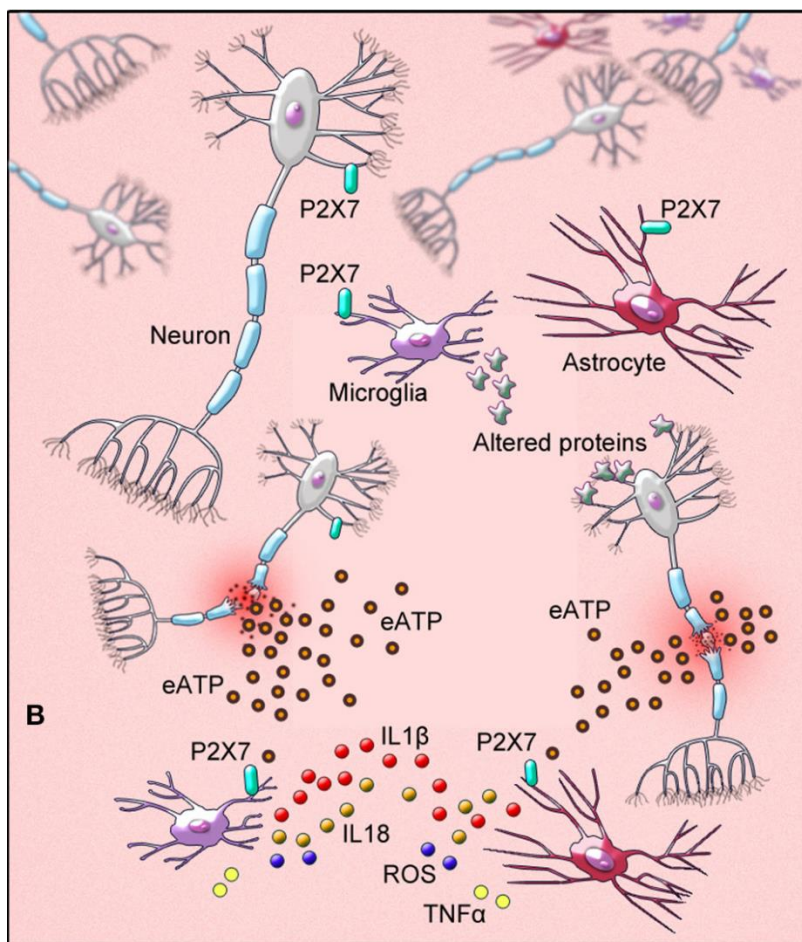


4. ábra. Az inflammaszóma kialakulásához szükséges szignalizációs útvonal<sup>127</sup>. A TLR-hez kötődő PAMP-ok vagy DAMP-ok beindítják az NF-κB szignalizációs útvonalat, amivel az NLRP3 alegység és az IL-1β átíródik a sejtmagban és inaktív formában a citoplazmába kerül. Ezt a folyamatot nevezik priming-nek. A másodlagos stimulus (P2X7 aktiváció, szabadgyök képződés, stb.) szükséges ahhoz, hogy oligomereiből összeálljon az inflammaszóma, és az éretlen alakból érett IL-1β legyen.

#### 2.4. A Parkinson-kór

A Parkinson-kór progresszív neurodegenerációval járó krónikus betegség, melynek elsődleges motoros tünetei a bradikinézia, a nyugalmi tremor és az izmok rigiditása. A betegség előrehaladtával nem motoros funkciókat is érint a degeneráció, ezzel megkezdődik a páciensek kognitív leromlása. Mivel a tünetekért a dopaminerg rendszer csökkent működése felelős, ezért a jelenlegi Parkinson gyógyszerek a hiányzó dopamint hivatottak pótolni<sup>128</sup>. Ezt két módon érik el: prekursorok adásával, pl. L-DOPA, vagy a dopamin lebontásában részt vevő enzimek pl. MAO (monoamin-oxidáz), COMT (katekolamin-O-metil-transzferáz) gátlásával<sup>129</sup>. Szelektív MAO-B inhibitorokkal megakadályozható a dopamin intracelluláris lebontása, ezzel kiegészítve a dopamin pótló

gyógyszerek hatását. Egy ilyen szelektív MAO-B gátló a rasagilin, melynek *in vitro* Parkinson-modellekben ugyan leírták már sejtpusztulástól védő hatását<sup>130,131</sup>, a klinikumban azonban nem számolhatunk be pozitív eredményről<sup>132,133</sup>. Sajnálatos módon a neurodegenerációs folyamatok megállítására még nem találtak megfelelő gyógyszermolekulát<sup>134</sup>, ezért a Parkinson-kórt modellező kísérletek továbbra is rendkívül időszerűek. Az alap kutatásban máig több modellelt alkalmaznak, rotenonnal<sup>135-137</sup>, MPTP-vel<sup>138,139</sup> vagy akár LPS-sel<sup>26</sup> váltva ki a Parkinson-kórra jellemző tüneteket. Még nem teljesen ismert, hogy milyen mechanizmusok állnak a Parkinson-kór hátterében, az viszont egyértelmű, hogy a neuroinflammáció, a túlzott mikroglia aktiváció mind hozzájárul a dopaminerg sejtek pusztulásához<sup>140</sup>. Patológias körülmények között megemelkedik az extracelluláris ATP mennyisége, ami sejtpusztulást, neurodegenerációs folyamatok beindulását vonja maga után (5. ábra). A P2X7 receptor aktivációja excitotoxicitáshoz vezethet, emellett kulcsszerepet játszik a mikroglia sejtek aktivációjában is, így közvetlenül hozzájárul a neurodegenerációhoz<sup>141</sup>. Emellett a receptor beindítja a gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-18) és reaktív oxigén származékok (ROS) termelődését, ezzel is elősegítve a degeneratív folyamatokat<sup>25,142</sup>. Szerepének fontosságát bizonyítja, hogy P2X7 receptor inhibícióval neuroprotektív hatást értek el Alzheimer-kór<sup>143</sup>, a Huntington-kór<sup>144</sup>, valamint a Parkinson-kór állatmodelljében egyaránt<sup>26,145</sup>. Korábban kutatócsoportunk is vizsgálta a P2X7 receptor szerepét a Parkinson-kór modelljében, azonban a receptor hiányában sem *in vitro*, sem állatmodellekben nem sikerült védő funkciót kimutatnunk<sup>138</sup>. A dolgozatomban bemutatott Parkinson-modellben sem szerepel a P2X7 receptor, hanem egy kollaborációs partnerünk által szintetizált MAO-B gátló vegyületet teszteltünk a rotenon által kiváltott sejtpusztulás megakadályozásával kapcsolatban. Jelenleg a klinikumban alkalmazott hatóanyagokkal nem érhető el degenerációs folyamatok leállítása, ezért kiemelten fontos ilyen hatással is rendelkező potenciális gyógyszermolekulák azonosítása.



5. ábra. **P2X7 aktiváció közreműködése a neurodegenerációs folyamatokban**<sup>27</sup>. Patológias állapotban a károsodott idegsejtek ATP-t ürítenek a sejtek között (extracelluláris) térbe, mellyel fokozódik a P2X7 aktiváció és az ATP kiáramlása, gyulladási reakciókat indítva be (kemokinek, citokinek, ROS). Ennek következtében felszaporodnak a pro-apoptotikus gének és bekövetkezik a sejtpusztulás. A haldokló sejtekből még több ATP szabadul fel, ami fenntartja és súlyosbítja a neuroinflammatorikus és degeneratív folyamatokat.

### 3. Célkitűzések

Irodalmi adatok és csoportunk eredményei alapján egyaránt ismert, hogy a P2X7 receptor számos központi idegrendszerre ható betegség patomechanizmusában közreműködik. Dolgozatomban két komplex állatmodellben végzett kísérlesort mutatok be, ahol azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a P2X7 receptor aktivációja és inhibíciója a betegségek kialakulását. Továbbá a Parkinson-kór *in vitro* modelljében végeztünk összehasonlító morfológiai elemzést egy új heteroarilalkenil-propargilamin vegyület alkalmazását követően.

#### I. A P2X7 receptor szerepének feltárása a depresszió tanult tehetetlenség modelljében tapasztalható magatartási és idegrendszeri változásokban.

Mivel saját kísérleteink és más csoportok eredményei is igazolták, hogy a P2X7 receptor genetikai és farmakológiai gátlása antidepresszáns fenotípust hoz létre, további kísérleteket végeztünk a fenotípus hátterében álló útvonal megismerésének érdekében. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja a P2X7 receptor genetikai gátlása a depresszió-jellegű magatartást a tanult tehetetlenség modellben?
- Van-e különbség a két genotípus hippocampális tüskeszinapszis plaszticitásában?
- Hogyan változnak bizonyos szinaptikus markerek (struktúrfehérjék, serkentő receptor alegység) a tanult tehetetlenség modellben?

#### II. A P2X7 receptor funkciójának vizsgálata az autizmus spektrumzavar anyai immunaktivációs modelljében megjelenő viselkedési, morfológiai és biokémiai változásokban.

Egyre elfogadottabb a terhesség alatti immunaktiváció indukálta neuronális fejlődési zavar elmélete az autizmus spektrumzavar kialakulásával kapcsolatban. Mivel a P2X7 receptor központi szerepet játszik a gyulladási folyamatok szabályozásában, feltételeztük, hogy akár az autisztikus jellemzők létrejöttében is közreműködhet. Az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

- Hogyan hat az anyai immunaktiváció az utódok viselkedésére és az idegrendszerük felépítésére P2rx7<sup>-/-</sup> egerekben?



- Milyen biokémiai változások követik az anyai immunaktivációt?
- Megelőzhető-e az immunaktiváció hatása a vemhes nőstények P2X7 szelektív antagonistákkal előkezelésével?
- Ha a felnőtt utódban gátoljuk a P2X7 receptort, elfedhető-e az autista-fenotípus?

### **III. SZV558 protektív hatása az *in vitro* rotenon-indukálta Parkinson modellben**

Dolgozatom ezen részében nem purinerg receptorral kapcsolatos eredményeket mutatok be, hanem egy új MAO-B gátló heteroarilalkenil-propargilamin vegyület, az SZV558 hatását vizsgáltuk egy *in vitro* rotenonos Parkinson modellben. Kísérletünk célja a következő volt:

- Kivédi az új vegyület a dopaminerg sejtek pusztulását a szubsztancia nigrában?  
Hatékonyabb a jelenleg klinikumban alkalmazott rasagilinnél?

## 4. Módszerek

### 4.1 Kísérleti állatok

A depresszió és autizmus kísérleteink során P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> genotípusú fiatal felnőtt hím egerekkel dolgoztunk, illetve az autizmus modellben anyai és magzati mintákat is vizsgáltunk. Az *in vitro* Parkinson modellhez 200-220 grammos hím Wistar patkányokat használtunk az MTA KOKI saját tenyészetéből. A P2rx7<sup>+/+</sup> egerek a C57Bl/6J egértörzs genetikai hátterével rendelkeznek, míg a P2rx7<sup>-/-</sup> egerekben a P2rx7-et kódoló gén egy szakaszát egy neomycin rezisztenciát kódoló génszakasszal helyettesítették, ezért nem íródik át, így a P2X7 receptor fehérje hiányzik az állatokból. Az eredeti P2rx7<sup>-/-</sup> tenyészpárok Christopher Gabel (Pfizer Inc., Groton CT, USA) jóvoltából kerültek az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegébe (OGR), ahol az egérvonalat SPF (Specific Pathogen Free) körülmények között tenyésztik tovább. Az egerekben a P2rx7 génkiütésért felelős DNS szakasz a következő: P2X7-F1 (5'-CGGCGTGCGTTTTGACATCCT-3') és P2X7-R2 (5'-AGGGCCCTGCGTTCTC-3')<sup>124</sup>. A tenyésztett utódok genotípusát PCR-rel ellenőrzik az OGR genotípezáló laborjában. Az autizmus modellezéséhez mindkét genotípusból külön tenyész triókat hoztunk létre egy hím és két, még nem szült nőstény összepárosításával. Kísérleteinkben a felhasznált egerek hasonló korúak (8-12 hét a depresszió modellben, és az autizmus modellben a hímek, 12-14 hét az autizmus modell nőstényei) és tömegűek (25-30 g) voltak. Minden állatot állandó standard körülmények között tartottunk az MTA KOKI OGR állattartó szobáiban, 23±2°C-os hőmérsékleten, 60±10%-os páratartalommal, 12-12 órás fény-sötét ciklusban, ahol megfelelő mennyiségű és minőségű táplálék és víz folyamatosan rendelkezésükre állt. A viselkedésvizsgálatokat 9-14 óra között, az MTA KOKI Viselkedésvizsgáló Egységében (VVE) végeztük, ahová az egerek a kísérletek előtt egy héttel kerültek a standard állattartó szobákba. A depresszió modellben használt egereket egyenként helyeztük el a ketrecekben. Az állatokat csak a vizsgálatok időtartamára vittük át a szomszédos kísérleti szobába. A kísérleteinket az NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals szerint, az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottságának engedélyével (PEI/001/773-6/2015, PEI/001/778-6/2015, 22.1/3671/003/2008) végeztük.

## 4.2 Kísérleti elrendezés

A tanult tehetetlenség depresszió modellben először 4-4 állaton meghatároztuk a P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> genotípusú naiv állatok tüskeszínapszis sűrűségét. Ezután beállítottuk a viselkedésteztet vad típusú egereken, majd a megfelelő protokollt követve vizsgáltuk a tanult tehetetlenség kialakulását. A magatartási változók tanulmányozását követően az egerek közül 3-3-at felhasználtunk elektronmikroszkópos sztereológiai analízishez, 4-4-et P2rx7 mRNS expresszió vizsgálatához. A következő lépésben P2rx7 génkiütött egereken is elvégeztük a viselkedésteztet, majd véletlenszerűen kiválasztott 3-3 állaton a tüskeszínapszisok kvantifikálását is. A szemcsesejtek, a szinaptikus markerek és a glutamáterg receptor alegység tanulmányozásához további egereket vontunk be a kísérletbe (3-5/genotípus), melyeken előbb teszteltük a magatartási változókat, majd felhasználtuk őket az *ex vivo* vizsgálatokhoz.

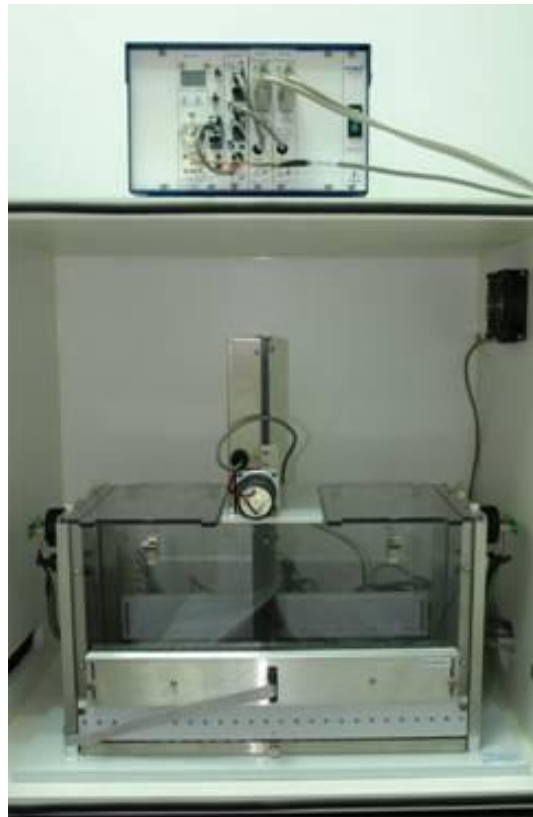
Az anyai immunaktivációs autizmus modellben három fő kísérletsorra oszthatjuk a bemutatott munkát. Elsőként azt vizsgáltuk, hogy az anyai immunaktiváció hatásában van-e különbség a P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> genotípusok között. Miután a vad típusú állatokban sikerült kiváltani a poli(I:C) injekcióval a viselkedési változások, a tesztekben résztvevő utód állatok agyi különbségeit is vizsgáltunk, véletlenszerűen kiválasztva 3-3-at a Purkinje immunfestéshez, illetve minimum 4-et felhasználtunk a szinaptoszóma preparátumokhoz. Ezt követően génkiütött egereken is elvégeztük a kísérleteket. További vemhes nőstények kezelésével tanulmányoztuk az immunaktivációt közvetlenül követő biokémiai (nukleotid és citokin tartalom), és az embrionális idegrendszer fejlődését érintő eltéréseket. A különböző kísérletes célokra külön nőstényeket (3-4/vizsgálat) és embrionális mintákat használtunk (az adott nőstények összes utódját a nukleotid méréshez, a citokinek vizsgálatához véletlenszerűen 4-5-öt, az agykéreg immunhisztokémiai vizsgálatához 3-3-at). A második kísérletsorozatban megnéztük, hogyan befolyásolja az anyai P2X7 receptorok inhibíciója az immunaktiváció hatását az első kísérletben talált autisztikus eltérésekben. Végül a felnőtt P2rx7<sup>+/+</sup> utódokat kezeltük P2X7 antagonistával, majd vizsgáltuk a magatartásbeli és morfológiai jellemzőket.

Az *in vitro* rotenonos Parkinson modellben patkány félagyakat kezeltünk a különböző csoportok szerint (4-5/csoport), mely szövetblokkokból készített metszeteken tirozin-hidroxiláz immunreakciót végeztünk a sejtpusztulás kimutatására. Egy állatból származó két félteke két külön mintának számított, és különböző kezelési csoportba kerültek.

### 4.3 A depresszió állatmodellje

#### 4.3.1. Tanult tehetetlenség

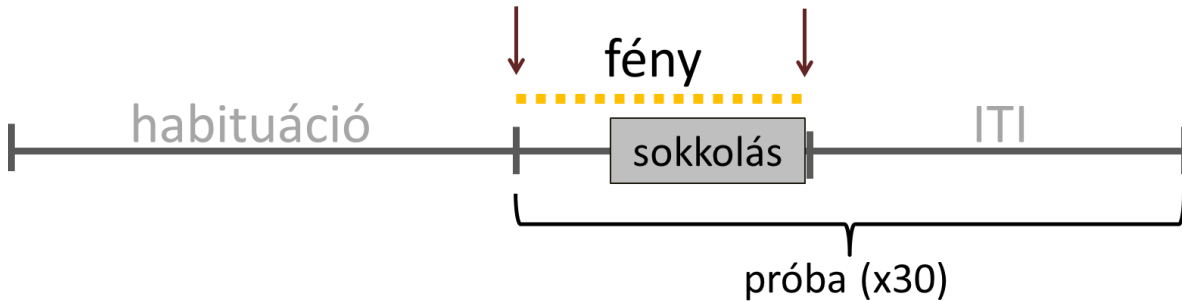
A tanult tehetetlenség, angolul learned helplessness modell a depressziós állapot egyik jellemző viselkedési elemét, a kilátástalan vagy reménytelen helyzetbe való beletörődést, a tehetetlenség elfogadását veszi alapul. Az állatkísérleteket úgynevezett “shuttle box”-ban (Med Associates, St. Albans, VT, USA) végeztük (6. ábra), ami két térfélre osztott plexi falú doboz, az elválasztó falon egy számítógép által vezérelhető ajtóval, alján fémrácsokkal, melyeken keresztül elektromos ingerlés lehetséges.



**6. ábra. Shuttle box a tanult tehetetlenség vizsgálatához.** Két zárt kompartmentből álló doboz, melyben elkerülhetetlen áramütéseket adhatunk a kísérleti állatoknak, valamint a menekülési reakciójukat mérhetjük, ha szabaddá tesszük az átjárást a térfelek között. A szerkezetet egy hangszigetelt szekrényben helyeztük el, így a kísérlet sötétben, csendben végezhető. A szekrény tetején az elektromos ingerlő látható, melyen tetszőlegesen állítható az áramütések erőssége. Hat ilyen set-up állt rendelkezésünkre a kísérletekhez, ezáltal párhuzamosan több állat viselkedését tanulmányozhattuk.

A modell két fő szakaszból áll: először egy tanulási fázist alkalmazunk, amikor a kísérleti állatot gyenge, nem fájdalmas, de kellemetlen érzetű elektromos áramütésnek tesszük ki a fém rácsozaton keresztül, amit az állat nem tud elkerülni a zárt térfélben. Ez a kondicionáló folyamat alakíthatja ki a tanult tehetetlenséget, melynek létrejötte a második szakaszban tesztelhető. A teszt során az állatnak lehetősége nyílik az averzív inger (lábsokk) elkerülésére, mivel az áramütéseket megelőzően kinyílik a két térfél közötti ajtó, át lehet menekülni a másik térfélbe. Amennyiben kialakult a tehetetlen állapot, nagyobb arányban tapasztalunk sikertelen menekülési reakciókat. A kísérlethez a MED-PC IV szoftvert (Med Associates, St. Albans, VT, USA) használtuk. A kísérleti protokollunkat Chourbaji és munkatársai által használt beállítások alapján állítottuk össze<sup>146</sup>. A tréning fázis két napig tartott, 5 perc habituáció után 2x180 alkalommal 2 másodperc időtartamú, 0,15 mA áramerősségű lábsokkot kaptak az egerek, közöttük véletlenszerűen 1-15 másodperc szünetekkel, egyik nap az egyik oldali, a következő nap az ellenoldali térfélben, hogy a sokkolás ne társuljon egyik oldali kompartmenthez sem. A sokk időtartama alatt fény volt a térfélben. A kontroll állatokat szintén behelyeztük a tréning alatt a kísérlet időtartamára valamelyik térfélbe, ekkor azonban nem alkalmaztunk lábsokkot. A harmadik napon teszteltük a kontroll és sokk kezelt egerek menekülési reakcióját, illetve a tanult tehetetlenség kialakulását. Ekkor 30 próbának tettük ki az állatokat, melynek mindegyike a térfelek közötti ajtó kinyílásával és a fény felkapcsolódásával kezdődött, majd 5 másodperccel később 10 másodpercig tartó 0,15 mA (illetve a második kísérletben 0,2 mA) áramerősségű lábsokk következett. Amennyiben az állat átszaladt a sokkmentes térfélre az idő lejártá előtt, a próba véget ért, az ajtó lezárult, a számítógép regisztrálta a menekülésig eltelt időt. Ha nem sikerült átjutni a 15 másodperc alatt, azt a próba elbukásaként könyvelte el a program, és a menekülésig eltelt idő a maximum 15 másodperc lett. A kísérlet során 30 ilyen próbát végeztünk (7. ábra), véletlenszerű időtartamú (20-40 másodperc) szünetekkel.

A tesztelés után összesítettük a menekülési időket és a sikertelen menekülések számát, megkapva a kezelési csoportok átlagát (n=23-27). A kísérlet második fázisában erősebb áramütéseket alkalmaztunk a tesztelés során (n=6-8).



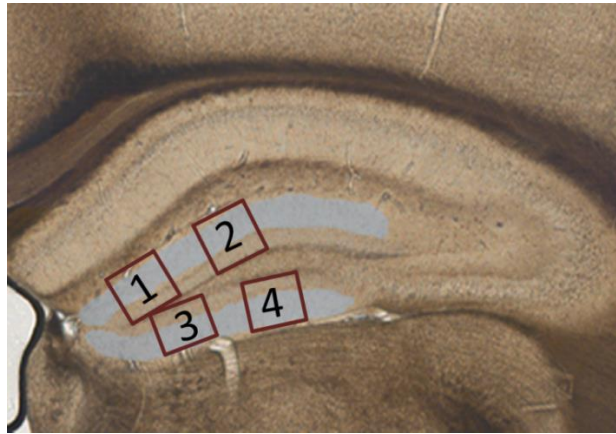
7. ábra. **Protokoll a tanult tehetetlenség teszteléséhez.** 5 perc habituáció után következnek a próbák azonos felépítéssel, 30x ismételve. Az első nyíl jelzi az ajtó nyitást, a második a záródását, ami vagy 15 másodperc után, vagy a másik térfélbe menekülés követően történik. Az ajtó nyitással egyidőben felkapcsolódik fény, majd 5 perc után kezdődnek a lábsokkok 10 másodpercig, vagy a sikeres menekülésig. Két próba között 20-40 másodpernyi pihenőidő telik el (intertrial interval, ITI). A tréning fázisban az ajtó mindvégig zárva van, a sokkolás 2 másodpercig tart, az ITI 1-15 másodperc között változik, és ez ismétlődik két egymást követő napon 180-szor.

Egyes publikációkban kritériumot állítanak a tanult tehetetlenség vizsgálatához, így csak azoknál az állatokot tekintik sikeresnek az állapot kialakulását, akiknek a próbák egy adott százalékában (50-70%) nem sikerül elmenekülni az áramütések elől<sup>146,147</sup>. Mi nem alkalmaztunk ilyen kritériumot a kísérletek során, vagyis a részt vevő összes egér eredményét összesítettük teljesítménytől függetlenül. A tanult tehetlenség kialakulását úgy értelmeztük, hogy a kontroll állatokhoz képest szignifikánsan magasabb számú elbukott próba és hosszabb elkerülési látencia értékek jellemzőek a sokkolt csoportoknál, mely értékek konzisztensek az irodalmi adatokkal<sup>60,148,149</sup>.

#### 4.3.2. Elektronmikroszópós sztereológiai analízis

A tüskeszinapszisok plaszticitását elektronmikroszópós sztereológiai analízissel hasonlítottuk össze. A tanult tehetlenség tesztelése után 24 órával csoportonként 3-3 egeret felhasználtunk elektronmikroszópós vizsgálatra. Szén-dioxidos altatást követően perfundáltuk az állatokot szíven keresztül áramoltatott 4%-os paraformaldehiddel (PFA) és 0,5%-os glutáraldehiddel, majd a kivett agyakat másnapig 4°C-on immerziósan tovább

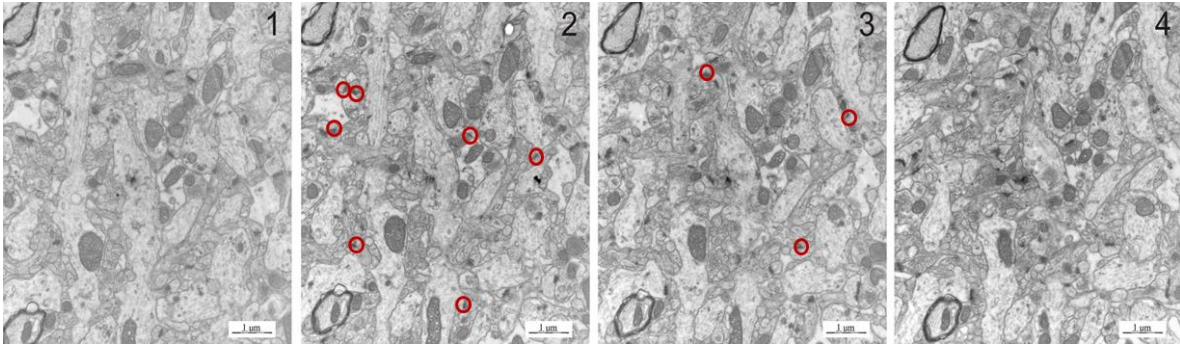
fixáltuk. Ezt követően a dorzális hippokampuszból 100 µm vastag koronális metszeteket készítettünk vibratómmal, és öt-öt metszetet beágyaztunk az elektronmikroszkópos munkához. Az ozmium-tetroxidos (0,5%, 30 percig) és uranilacetátos (1%, 30 percig) utófixálást követően felszálló alkohol sorban víztelenítettük a metszeteket, majd epoxi gyantába ágyaztuk (EMbed 812, TAAB) és 60°C-on egy éjszaka alatt polimerizáltattuk a gyantás metszeteket. A szeletekből a gyrus dentatus molekuláris régiójából vágunk ki apró szövet blokkokat (8. ábra), minden metszeten azonos területekről (kettőt a felső karéjból, kettőt az alsó karéjból), majd gyanta blokkra felragasztva ultravékony sorozatmetszeteket készítettünk a mintavételi területekről Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Németország) ultramikrotóm segítségével.



8. ábra. **Mintavételi területek a gyrus dentatusban.** Minden metszeten 2-2 blokkot vágunk ki a felső és alsó karéjból egyaránt. A molekuláris régió beazonosításában segített a szemcsesejtek pozíciója, ezért a szövetblokkot úgy alakítottuk ki, hogy mindig tartalmazzon valamennyit a sejtmagokból is.

Az alkalmazott módszer szerint egy képsorozathoz legalább 4 egymást követő metszetre volt szükség, ahol a két középsőn végeztük a számolást, az első és utolsó pedig a tüskeszínapszisok azonosítását segítette (9. ábra). Tapasztalataink alapján jellemzően olyan területeket választottunk, amit könnyen megtaláltunk az egymást követő metszeten. A felvételeket iTEM programmal, Veleta CCD kamerával (Olympus Soft Imaging Solutions, Németország) felszerelt Hitachi H-7100 (Hitachi, Japán) elektronmikroszkóppal készítettük 12000x-es nagyításon, majd kinyomtatott képeken végeztük a tüskeszínapszisok számolását. A tüskeszínapszisok azonosításában segített a PSD megléte, illetve a

mikrotubulusok, mitokondriumok és szinaptikus vezikulák hiánya. A második és harmadik képet összehasonlítva csak az újonnan megjelenő, vagyis csak az egyik felvételen szereplő tüskeszinapszisokat vettük számba, ezáltal egyik szinapszist sem számoltuk kétszer.



**9. ábra. Elektronmikroszkópos sorozatfelvételek 12000x-es nagyításon.** A 2. és 3. képen azonosítottuk a tüskeszinapszisokat, amelyek csak az egyik felvételen voltak jelen, azokat jelöltük és vontuk be a számolásba. A kérdéses esetekben az első és utolsó képet hívtuk segítségül. Ilyen képsorozatból mintegy 1000-et készítettünk és hasonlítottunk össze a tüskeszinapszis sűrűségek meghatározáshoz.

A megbízható eredmények érdekében a számolást ketten, egymástól függetlenül is elvégeztük. A kapott adatokból kiszámoltuk az átlagos tüskeszinapszis sűrűséget (szinapszis/ $\mu\text{m}^3$ ), az állatonkénti összesített tüskeszinapszis számot elosztva a mintavétel térfogatával, azaz a számoláshoz használt két kép területét ( $107,78 \mu\text{m}^2$ ) megszorozva a metszetek vastagságával (75 nm) és az egy állatból származó minták számával (50 darab).

#### 4.3.3. RT-PCR

RT-PCR technikával a hippocampális P2rx7 mRNS mennyiségét vizsgáltuk vad típusú egerekben. A viselkedésteszték után 6 és 24 órával dekapitáltunk P2rx7<sup>+/+</sup> egereket (n=4), melyek agyából mindkét oldali hippocampuszt kireparáltuk és azonnal szárazjégre tettük, majd a mintákat felhasználásig  $-80^\circ\text{C}$ -os mélyhűtőben tartottuk. A következő lépés az RNS izolálás volt, amit a gyártó utasításait követve végeztünk az RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen, CA, USA) felhasználásával. Az így kapott RNS minták koncentrációját és integritását a Lab-on-a-chip nanotechnológiai platformon alapuló Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) készülék segítségével, Agilent RNA 6000 Pico Kit-tel (Agilent Technologies, CA, USA) határoztuk meg, szintén a gyártó protokollja szerint. 1  $\mu\text{g}$



RNS-t tartalmazó mintából komplementer cDNS templátot szintetizáltunk AB GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, CA, USA) készülékkel, Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, Nagy-Britannia) segítségével, random hexamer primer felhasználásával 19 µl teljes térfogatban a gyártó utasítása szerint. A reverz transzkripció reakció paraméterei a következők voltak: 70°C-on 5 perc, majd 25°C-on újabb 5 perc inkubáció, utána 25°C-on 10 percig és 42°C-on 60 percig történik a cDNS szintézis, és végül a reakció leállítása 70°C-on 10 percig. Az átírt cDNS templát mintákat további felhasználásig –20°C-os hűtőben tároltuk. A RT-PCR reakcióhoz a cDNS minták koncentrációját Qubit ssDNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) segítségével határoztuk meg a leírás szerint, majd a megfelelő mennyiségű cDNS templátot TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase® UNG és P2rx7 TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) hozzáadásával amplifikáltuk az alábbi protokollt követve: 95°C-on, 10 percig denaturálás, majd 40 cikluson keresztül 94°C-on 15 másodpercig, 64°C-on 30 másodpercig és végső lépésként 72°C-on 10 percig tartó extenzió követ. A P2rx7 expresszióját a belső kontroll Gapdh génhez képest határoztuk meg. A felhasznált primerek azonosítója: P2rx7 Mm01199500\_m1, Gapdh Mm99999915\_g1.

#### 4.3.4. Western blot

Western blot analízissel szinaptikus fehérjék (szinaptopodin, PSD95) mennyiségi változását követtük a tanult tehetetlenség modellben, P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> egerek hippocampusában. A tesztelés után 6 vagy 24 órával kivett hippocampusokat 250 µl lízis pufferben (RIPA, 1% proteáz inhibitor) tettük el -80°C-ra további felhasználásig (n=5). A mintákat felolvasztás után késes homogenizátorral homogenizáltuk, 10000 rpm-en 4°C-on 10 percig centrifugáltuk, és a kapott felülúszókat használtuk a Western blot analízishez. A mérés előtt Pierce BCA Protein Assay kit-et (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) használva meghatároztuk az egyes minták fehérjetartalmát. Egységesen 40 g fehérjét tartalmazó mintát vittünk fel és választottunk szét SDS-PAGE módszerrel 10%-os gélben, és transzferáltuk polivinilidén difluorid (PVDF) membránra MiniProtean-3 készülék segítségével (Bio-Rad, CA, USA). Először blokkoló oldatban (1% BSA, 5% tej, TBST) inkubáltuk a blot-ot 2 órán át szobahőmérsékleten, azután következett az első antitest (aktin

1:200 kecske, synaptopodin 1:200 kecske, SantaCruz; PSD95 1:500 nyúl, Abcam) egy éjszakán át 4°C-on. 3x10 perc TBST-s mosás után HPR-konjugált második antitestekkel (nyúl X kecske 1:5000, kecske X nyúl 1:4000, Millipore) inkubáltuk a blotot 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Újból mosás következett, 3x10 perc TBST, 1x5 perc TBS, majd pedig a megfelelő immunreaktív sávok kemilumineszcencia alapú előhívása (Immobilon Western, Millipore, MA, USA) és kvantifikálása denzitometriával az ImageJ szoftver segítségével (NIH, MD, USA).

#### 4.3.5. Hippokampális szemcsesejtek vizsgálata

A gyrus dentatus szemcsesejtjeit sejtmagfestéssel jelölve kvantifikáltuk. A viselkedésteszték után 24 órával szén-dioxidos altatásban perfundáltunk P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> egereket 4%-os PFA-val, majd a kivett agyakat friss PFA-ban 4°C-on egy éjszakán át tovább fixáltuk (n=3). PB-s mosás után 40 µm vastag koronális metszeteket készítettünk a dorzális hippocampus mentén, melyeken permeabilizálást (0,1% Triton-X) követően 1:10000 koncentrációban Hoechst 33342 (Tocris Bioscience, Nagy-Britannia) segítségével sejtmagfestést végeztünk. A szemcsesejtekről 20x-os nagyítású képeket készítettünk konfokális Nikon C2 mikroszkóppal, a NIS-Elements C szoftverrel (Nikon, Japán). A szemcsesejtek sejtmagja jellegzetes egységes (kerek) alakjáról könnyen felismerhető, ezeket számoltuk az egymást követő metszeteken.

#### 4.3.6. NR2B/GluN2B alegység kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata

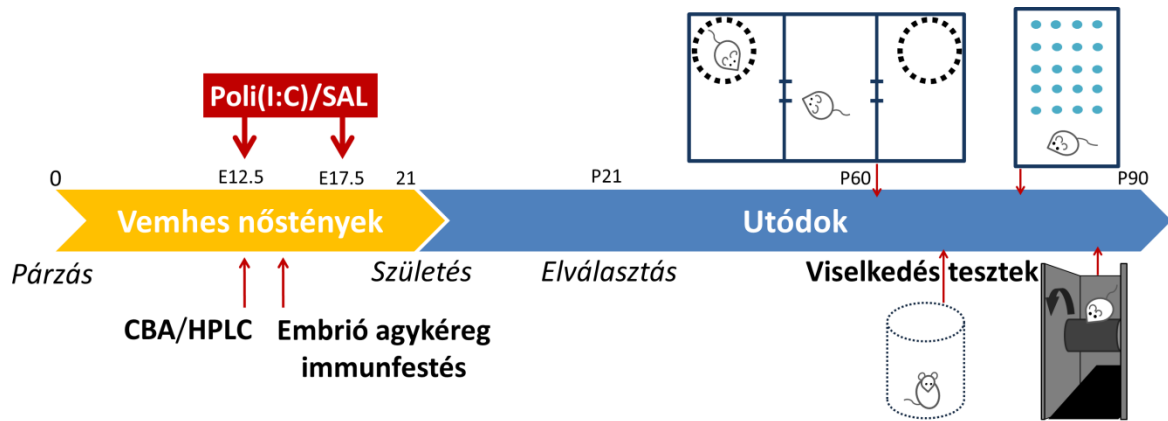
Az NR2B/GluN2B glutamát alegység érintettségét is vizsgáltuk a tanult tehetetlenség kialakulását követően. A fixált agyakból 60 µm vastag koronális szeleteket készítettünk a dorzális hippocampus mentén (n=3). Az immunreakció előtt a metszeteket először permeabilizálni kellett, hogy az NR2B/GluN2B antitest be tudjon jutni a szövetbe. Ehhez 0,2 mg/ml pepszint tartalmazó 0,2 M HCl oldattal inkubáltuk a metszeteket 37°C-on 10 percen keresztül. Háromszori PB pufferes öblítés, majd 3x10 perces 0,1 M TBS pufferes mosás után a nem-specifikus antigén kötőhelyeket 10% NHS-sel blokkoltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, majd a szeleteket az első antitestet (NR2B/GluN2B 1:1000, UC Davis/NIH NeuroMab Facility) és 2% NHS-t tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 24 órán

keresztül 4°C-on. 3x10 perc TBS-es mosást követően másodlagos fluoreszcens antitesttel inkubáltunk (Alexa 568, 1:3000, Invitrogen) 2 órán át szobahőmérsékleten. Ismét 3x10 percig mostuk TBS-ben a metszeteket, majd tárgylemezre felhúzza Vectashield Antifade (Vector Laboratories, CA, USA) médiummal fedtük le őket. Nikon C2 konfokális mikroszkóppal és NIS-Elements C szoftverrel (Nikon, Japán) készítettünk felvételeket a hippokampuszról 20x és 60x nagyítással, minden metszeten azonos paraméterekkel dolgozva. A festés intenzitását ImageJ programmal kvantifikáltuk (NIH, MD, USA).

#### **4.4. Az autizmus állatmodellje**

##### 4.4.1. Az anyai immunrendszer aktiválása

A terhesség során bekövetkező magzati idegrendszer fejlődési rendellenességét az anyai immunaktivációs modellel (maternal immune activation, MIA) hoztuk létre (10. ábra). Ezzel a terhességek alatt megfigyelt vírusfertőzést, mint az autista állapot kialakulásáért feltételezett egyik felelős eseményt képeztük le. Mivel a tenyészpárokat csak heti egy meghatározott éjszakára tettük össze, így a vemhesség napjait pontosan tudtuk követni. A magzati 12,5. és 17,5. napon a nőstény egereket egy vírus-szerű szerkezettel rendelkező dupla szálú RNS molekulával, a polinozin-policitidilsavval [poli(I:C), PIC] kezeltük (10. ábra), első alkalommal 3 mg/kg dózisban, másodjára 1,5 mg/kg dózisban, intraperitoneálisan<sup>150</sup>. A kontroll nőstények fiziológiás sóoldat injekciót kaptak. A hím utódokat 4 hetesen választottuk el az anyjuktól, a lány utódokat a továbbiakban nem használtuk. 8 hetes korban kezdtük elvégezni a viselkedésteszteket, mindig a meghatározott sorrendben (szociális preferencia, repetitív tisztálkodás, üveggolyó ásás, rotarod). A tesztek után, az állatok 80-90 napos korában felhasználtuk őket további *ex vivo* vizsgálatokra. Amikor az anyai vagy magzati mintákra volt szükségünk a vizsgálatokhoz, a vemhességet megszakítottuk a 12,5. vagy 14,5. napon a mintagyűjtéshez (10. ábra).



10. ábra. **Autizmus MIA állatmodellje.** A tenyészpárok egy éjszakát töltöttek együtt, innen számoltuk a vemhesség 12,5. és 17,5. napját, amikor poli(I:C) vagy fiziológiai sóoldatot injekciót adtunk a vemhes nőstényeknek. Ha az anyák véréből vagy a magzatok agyából végeztünk tartalmi méréseket, 2 órával a kezelést követően történt a mintavételezés. A fejlődő agykéreg embrionális markereit a 14,5. napon vizsgáltuk. A megszületett hím utódokat a 21. napon választották el az anyjuktól, majd 8 hetes koruktól végeztük el a viselkedésteszteket. Elsőként a szociális preferencia tesztet, majd a repetitív tisztálkodás és üveggolyó elásást vizsgáltuk, végül a rotarodon teszteltük az egerek mozgáskoordinációját. Ezután következtek az *ex vivo* kísérletek.

#### 4.4.2. Drogok és kezelések

A MIA beindításához poli(I:C) használtunk 3 mg/kg és 1,5 mg/kg dózisban steril fiziológiai sóoldatban oldva (P9582 Sigma-Aldrich, MO, USA). A P2X7 receptor gátlásához a szelektív antagonistát JNJ47965567-et (JNJ) használtuk 30 mg/kg dózisban (Tocris Bioscience, Nagy-Britannia) 30%-os kaptizol oldatban oldva (7β-ciklodextrin, Cydex Pharmaceuticals, KS, USA). A kísérletek kontrollja vivőanyag beadását, sóoldatot vagy 30%-os kaptizol oldatot jelentett. Az állatok kezelése intraperitoneálisan történt 4 ml/kg térfogatban. Az anyai JNJ előkezelést 2 órával a poli(I:C) vagy só injekciót megelőzően végeztük. Az utódkezelésnél az állatok egyszeri 30 mg/kg JNJ vagy 30%-os kaptizol injekciót kaptak a viselkedésteszt első napján, a szociális preferencia teszt előtt 1 órával. Az egereket véletlenszerűen osztottuk be az egyes kezelési csoportokba.

#### 4.4.3. Szociális preferencia

Az egerek szociális preferenciájának vizsgálatához a Naviaux és munkatársai által leírt metodikát alkalmaztuk<sup>150</sup>. A tesztet egy 60x40 cm alapterületű, három térfélből álló plexi

arénában végeztük el. Az egyes kamrák között zárható ajtó biztosította az átjárást. Az aréna két oldalsó ténfelében egy-egy ketrecet helyeztünk el. A kísérlet két, egyenként 10 perces fázisból állt. Az első szakasz a habituáció, ami során a teszt állat 10 percig szabadon feltérképezhette a teljes arénát. Ezt követően az egeret az aréna középső kamrájába zárjuk és az egyik szélső ténfelén elhelyezett ketrecbe egy ismeretlen fajtársat helyeztünk el, míg az ellenkező oldalon levő ketrecet üresen hagytuk. A ténfelek közötti ajtót újra kinyitva elkezdődött a második 10 perces teszt fázis. A teszt során megmértük, hogy a teszt egér mennyi időt tölt az idegen fajtárs szimatolásával, valamint az üres ketrec körül. Ehhez a Noldus Ethovision XT 10 (Noldus, VA, USA) programot használtuk, amivel előzetesen beállítottuk az arénát, kijelöltük a ketrecek körül a szimatolási zónát, majd pedig a program kiértékelte a felvételt. Így megkaptuk a kísérleti állat által az egyes zónákban eltöltött időt, amiből a szociális preferencia értéket az ismeretlen fajtárs szimatolási zónájában töltött, valamint a két szimatolási zónában összesen eltöltött idő hányadosaként adtuk meg százalékos értékben kifejezve (n=6-16).

#### 4.4.4. Repetitív tisztálkodás (self-grooming)

A repetitív viselkedések közül elsőként a tisztálkodást tanulmányoztuk. Ehhez a kísérleti körülményeket Kyzar és munkatársai módszertanából vettük át<sup>151</sup>. Az állatokat egyenként tiszta, üveg megfigyelőkamrába helyeztük és viselkedésüket videókamerával rögzítettük 10 percen keresztül. A tesztet követően manuális elemzést végeztünk a Noldus Observer XT (Noldus, VA, USA) program segítségével. A programban két, egymást kizáró kategóriát adtuk meg: amikor az állat tisztálkodik (grooming) és amikor bármi mást csinál (non-grooming). A videó felvételt lejátszva folyamatosan rögzítettük a két cselekvés időtartamát, melyet a szoftver összesített az analízis végén (n=7-16).

#### 4.4.5. Üveggolyó ásás (marble burying)

Szintén a repetitív viselkedési formákhoz tartozik az üveggolyók eltemetése, ennek vizsgálatát Malkova és munkatársai által közölt tanulmány szerint végeztük el<sup>152</sup>. Tiszta állattartó ketrecekbe legalább 4 cm vastagságban új almot tettünk egyenletesen elosztva. A ketrec területének kétharmadára elosztva 20 darab, körülbelül 1 centiméter átmérőjű kék

üveggolyót helyeztünk óvatosan az alom felszínére, egymástól egyenlő távolságra, 4x5 elrendezésben. Az egereket óvatosan a ketrec üveggolyó mentes harmadába helyeztük és a ketrecet azonnal lefedtük, hogy ne tudjon az állat kiugorni. 10 perc elteltével visszatettük a kísérleti állatot az eredeti tartóketrecbe és megszámloltuk az elásott üveggolyókat. Elásottnak azokat az üveggolyókat tekintettük, melyeknek az alom legalább 50%-át takarta. A teszt eredményét az eltemetett golyók darabszámában adtuk meg (n=8-17).

#### 4.4.6. Rotarod teszt

Az állatok mozgáskoordinációját és egyensúlyérzékelését rotaroddal, vagyis fokozatosan gyorsuló forgó rudakon teszteltük. A kísérlet során a Naviaux és mtsai. által leírt beállításokat alkalmaztuk<sup>150</sup> egy IITC rotarod készüléken (IITC Life Science, CA, USA) a 4 cm átmérőjű rudakat használva. Az első két napon az egerek feladathoz szoktatása, tanítása zajlott. Ilyenkor lassú, 4 rpm (round per minute) fordulatszámon mozgó rudakon kellett fennmaradniuk minimum 30 másodpercig. A tréninget egy nap egymás után háromszor megismételtük, amelyik állat a második nap végére sem tudta megtartani a rúdon az egyensúlyát a minimum ideig, azokat kizártuk a kísérletből. A harmadik és negyedik napon 5 perc alatt 4 rpm-ről fokozatosan 40 rpm-re gyorsult a forgó rúd. Az egerek igyekeztek minél tovább lépést tartani a forgással, de egy idő után leestek a rotarodról. Ez volt a teszt fázis, amikor a leesésig eltelt időt mértük meg, naponta négyszer ismételve a próbákat. Az egyes ismétlések között 45 perc szünetet tartunk. A leesési látencia értékeket másodpercben fejeztük ki, és összesítettük a 2 nap négy-négy ismétlését (n=5-11).

#### 4.4.7. Exploráció nyílt térben (open field)

40x40 cm-es négyzet alapú arénában 10 percig vizsgáltuk az egerek alap lokomotoros viselkedését (n=4-6). A kísérleti állatokat a tér közepére helyeztük, és habituáció nélkül felvettük a mozgásukat a Noldus Ethovision XT 10 (Noldus, VA, USA) program segítségével. 10 perc után megkaptuk az egér által bejárt út hosszát centiméterben kifejezve. Ezt az értéket hasonlítottuk össze az alap lokomócióbeli különbségek kimutatásához.

#### 4.4.8. Kisagyi Purkinje sejtek kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata

A viselkedés tesztek végeztével csoportonként 3-3 állatot véletlenszerűen kiválasztottunk az immunfestéshez. Széndioxidos altatás után 4%-os PFA-val perfúziósan fixáltuk őket, majd a kivett agyakat egy éjszakán át friss fixálóban tároltuk, amit másnap reggel lemostunk 0,1 M PB-vel. Ezt követően vibratom segítségével 50 µm vastag parasagittalis metszeteket készítettünk a kisagy vermisz területén. A metszeteket 2 órán át szobahőmérsékleten rázattuk blokkoló oldatban (0,1 M PB, 2% BSA, 1% NHS, 0,3% Triton-X) a nem specifikus kötőhelyek gátlásához. Ezután a Purkinje sejteket specifikusan jelölő calbindin elsődleges antitesttel (Swant, CB-38a, 1:12000 hígítás) kezeltük őket 4 °C-on 24 órán keresztül, majd alapos pufferes mosást követően másodlagos fluoreszcens antitesttel (Invitrogen, anti-nyúl, Alexa 488, 1:3000 hígításban) inkubáltunk szobahőmérsékleten 2 órán át. Végül a metszeteket tárgylemezre felhúztuk, lefedtük fluoreszcens festést védő folyadékkal (ProLong Gold, Life Technologies, CA, USA) és fedőlemezzel. Az összes mintán 20x nagyítással felvételt készítettünk a kisagy VII. lebenyéről Nikon C2 konfokális mikroszkóppal és NIS-Elements C szoftverrel (Nikon, Japán). A Purkinje sejtek számát sejt/mm egységben fejeztük ki, amihez a képeken fluoreszcensen jelölt Purkinje sejtek számát az ImageJ programmal (NIH, MD, USA) meghatározott hosszúság értéket (a sejttestek vonalának hossza a lebenyben) arányosítottuk.

#### 4.4.9. Szinaptoszóma preparátumok

A szinapszisok szerkezetei változásait szinaptoszóma preparátumokon vizsgáltuk elektronmikroszkóp segítségével. A viselkedés tesztek után az állatok közül 3-8-at használtunk a preparátumokhoz. Dekapitálást követően az egész agyból készítettük a szinaptoszóma frakciót<sup>153</sup>. A mintákat 4 mL szukróz oldatban (0,32 M szukróz, 0,01 M HEPES, 0,63 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,4) vettük fel, majd Potter-Elvehjem homogenizáló csőben végeztük a sejtek mechanikus feltárását. A frakciók elválasztásához 3000 G-vel végeztünk centrifugálást 5 percig 4 °C-on, majd a felülúszót tiszta centrifugacsőbe mértük és 13000 G-vel 10 perc centrifugáltuk 4 °C-on. Az így nyert P2-es pelletet 45%-os Percoll-Krebs oldatba (Krebs: 113 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5

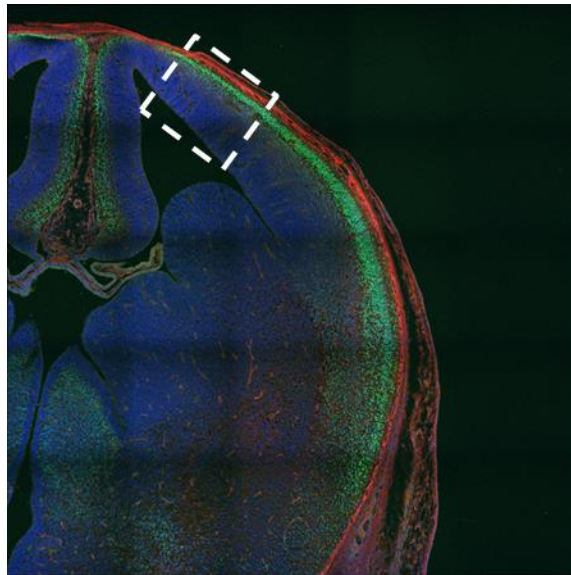
mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM glükóz, 1,5 mM HEPES, pH 7,4) vettük fel, majd ismét centrifugáltuk (13000G, 2 perc, 4<sup>0</sup>C). Ezt követően az oldat tetején képződő szinaptoszómában gazdag réteg alól egy fecskendővel kiszívtuk a Percoll oldatot, és az így nyert szinaptoszóma frakciót még kétszer Krebs oldattal átmostuk (felszuszpendáltuk és centrifugáltuk, 13000 G, 2 perc, 4<sup>0</sup>C). A pelletre fixáló oldatot mértünk (4% PFA, 0,5% glutáraldehid), majd minimum egy órás fixálás után PB pufferrel leöblítettük az üledéket, és a 4.3.2. fejezetben leírtakhoz hasonlóan beágyasztuk elektronmikroszkópos vizsgálathoz. A polimerizált gyanta blokkokból 70 nm vastagságú metszeteket készítettünk, melyekről 20000x vagy 30000x nagyításon készítettünk felvételeket. A szinaptoszómák számolását manuálisan végeztük, a kezelési csoportokat csak az összesítés után fedtük fel.

#### 4.4.10. Magzati agykéreg fejlődési zavara

Mivel a MIA modell során a magzati idegrendszer fejlődési rendellenessége felelős a későbbi autisztikus fenotípusért, fontosnak tartottuk megvizsgálni az egér embriók agykérgét a poli(I:C) injekciót követően (n=3). 48 órával az első poli(I:C) kezelést követően, vagyis az embrionális 14,5. napon kivettük az embriókat, és a fejüket 24 órára 4<sup>0</sup>C-on 4% PFA oldatba tettük. A fixált mintákat 0,1 M PB-s mosást követően krioprotektív oldatba tettük (15%-os szukróz oldatba 30 percig, 30%-os szukróz oldatba 24 órára), majd kriosztáttal (Microm HM 550, Microm International, Németország) 20 µm vastag metszeteket készítettünk. Ehhez a mintákat Tissue-Tek OCT médiumba ágyasztuk (Sakura, Japán). A metszeteket tárgylemezre vettük föl, majd a további felhasználásig -20<sup>0</sup>C-on tároltuk. Az immunfestés előtt a metszeteket 0,1 M PB oldatban rehidratáltuk 10 percig, majd feltártuk az antitest kötőhelyeket 100 mM Na-citráttal 65<sup>0</sup>C-on 30 percig. Utána blokkoló oldatot tettünk a metszetekre (1% BSA, 2% NGS, 0,2 % Triton-X 0,1 M PB-ben) 1 óráig szobahőmérsékleten, végül az elsődleges antitesteket 1:2 hígított blokkolóban 4<sup>0</sup>C-on inkubáltuk másnapig (SATB2 1:100 ab51502, TBR1 1:500 ab31940, Abcam). A SATB2 az embrionális agykéreg felső rétegének neuronjait festi, míg a TBR1 jellemzően a fejlődő kortikális lemez sejtjeiben van jelen. Az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatot 3x10 percig 0,1 M PB-ben mostuk le a tárgylemezről, mielőtt a másodlagos antitestekkel (1:400 Alexa Fluor® 594 AffiniPure anti-egér, Jackson ImmunoResearch, 1:1000 Alexa



488 anti-nyúl, Invitrogen) és a sejtmagokban található DNS-t jelölő Hoechsttel (1:10000 Hoechst33342, Tocris Bioscience) inkubáltuk volna a metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten. Ismét 3x10 perces mosást követően a metszeteket lefedtünk fényvédő médiummal és fedőlemezzel, majd 20x-os nagyításon képeket készítettünk a fejlődő agykéregről (11. ábra) Nikon C2 konfokális mikroszkóppal és NIS-Elements C szoftverrel (Nikon, Japán).



**11. ábra. Embriionális agy koronális nézete a vemhesség 14,5. napján.** Az áttekintő képet 5x5 darab 20x-os nagyítású képből készítettük. Az intenzitás méréseket a szaggatott vonallal jelölt területről, szintén 20x-os nagyításon végeztük. Ezt a területet mutatjuk be az eredményeknél a 35. és 41. ábrákon.

A TBR1 festés intenzitását a kortikális lemezben az ImageJ szoftver (NIH, MD, USA) segítségével hasonlítottuk össze az egyes kezelési csoportok között. A kapott értékeket a vad típusú, sóoldattal kezelt egerekhez viszonyítottuk és százalékos arányban adtuk meg.

#### 4.4.11. Citokinek multiplex bead array analízise

Az immunaktiváció által indukált citokinek mennyiségét multiplex bead array technikával végeztük. A vemhes nőstényeket a 12,5. napon történő poli(I:C) vagy só injekciót követően 2 órával izofuránnal bealtattuk, majd vért vettünk tőlük 50 µl Na-citrát-ot tartalmazó fecskendővel. Ezt követően az embriókat gyorsan kivettük és az agyat tartalmazó

koponyarészt eppendorf csövekben szárazjégre tettük. Az anyai vérmintákat 12000 rpm fordulatszámom, 4°C-on centrifugáltuk 4 percig, majd a felülúszó plazma mintákat eppendorfokba pipettáztuk. Mind a vérplazma mind az agymintákat felhasználásig -80° C-on tároltuk. Az embriókból származó agymintákat proteáz-inhibitor tartalmazó lízis pufferben (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% NaN<sub>2</sub>, 1% Triton X) homogenizáltuk késes homogenizátorral, majd soft üzemmódban, 14000 rpm fordulatszámom, 4°C-on centrifugáltuk 15 percen keresztül. A felülúszó mintákat használtuk a citokinek mérésére. A gyulladáshos mediátorok (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  és KC) koncentrációjának mérésé BD FACSVerse áramlásos citométerrel, Cytometric Bead Array Kit használatával (BD Biosciences, Nagy-Britannia) történt, a kapott adatokat pedig az FCAP Array v5 Software (Soft Flow, MN, USA) segítségével analizáltuk. Az egyes agyminták citokin koncentrációit a minták fehérje tartalmára vonatkoztatva adtuk meg pg/teljes fehérje tartalom egységben, melyet Perkin Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, MA, USA) segítségével, fotometriás módszerrel (abszorbancia mérés 560 nm-en) mértünk Pierce BCA Protein Assay Kit használatával (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (n=4-6). A vérminták esetében nem mértünk fehérje koncentrációt, citokintartalmukat pg/ml-ben fejeztük ki (n=3-4).

#### 4.4.12. HPLC analízis

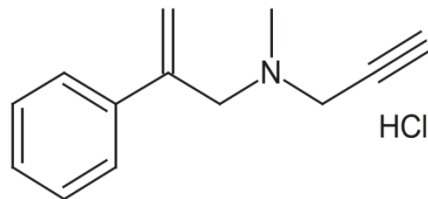
2 órával a 12,5. napon beadott poli(I:C) injekciót követően mintákat gyűjtöttünk HPLC analízishez. Izofurános altatás alatt vért vettünk a vemhes nőstények alsó üres vénájából 50  $\mu$ l K-citrát tartalmú fecskendővel, majd gyorsan kipreparáltuk az embrió agyakat. A vérmintákat 15 percig jeges vízfürdőben inkubáltuk, majd óvatosan, 2000 rpm-en, 0°C-on 10 percig centrifugáltuk. A plazmákat újból centrifugáltuk 0°C-on 5 percig 5000 rpm sebességgel, hogy a maradék sejteket és vérlemezkéket eltávolítsuk. Az így kapott plazma 200  $\mu$ l-éhez 20  $\mu$ l jéghideg, 4 M-os perklórsav oldatot adtunk, amely 100  $\mu$ M teofilint (belső standard) tartalmazott. A fehérje precipitátumot 6000 rpm sebességgel, 0°C-on 10 perc centrifugálással távolítottuk el. A felülúszó (100  $\mu$ l) semlegesítéséhez 4 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oldatot (10  $\mu$ l) használtunk, majd desztillált vízzel hígítottuk (490  $\mu$ l) és a centrifugálást megismételtük. A felülúszó minta 500  $\mu$ l-ét injektáltuk a dúsító oszlopra. Az embrióagy

mintákat folyékony nitrogénben azonnal lehűtöttük, mértük a tömegüket és jéghideg 0,1 M perklórsav oldatban ultrahanggal homogenáltuk, majd ezt követően 6000 rpm-en, 0°C-on 10 perc centrifugálással távolítottuk el a fehérjecsapadékot. A homogenáló oldat 10 µM teofilint és 0,5mM nátrium-metabiszulfidot (antioxidáns) tartalmazott (a homogenátum koncentrációja 1g/100 ml). A szöveti felülúszót 1 M KOH-val semlegesítettük (70:30 arányban), a keletkezett kálium-perklorátot ismételt centrifugálással távolítottuk el. A felülúszót -20°C-on tároltuk és 50 µl-t használtunk az elemzéshez. Az agyszöveti csapadékból fehérje tartalmat mértünk<sup>154</sup>, erre vonatkoztatva adtuk meg az analit tartalmakat pmol/mg protein mértékegységben. Shimadzu LC-20 AD szoftver (Shimadzu Corp., Japán) vezérelt kromatográfias rendszert használtunk a minták tartalmi vizsgálatához. A minták dúsítása és tisztítása Discovery HS C-18 (50 mm hosszú 2 mm belsőátmérőjű és 5 µm szemcseméretű) töltött oszlopon, online SPE (szilárd fázisú extrakció) oszlop-váltás (column-switching) technika alkalmazásával történt. A komponensek szeparálására Discovery HS C-18 (150 x 2 mm, 3 µm) analitikai oszlopot használtunk. Az adenin nukleotidok, adenzin és a teofilin belső standard mennyiségi meghatározására (Agilent 1100, Agilent, CA, USA) UV detektort használtunk, a jellemző elnyelési (253 nm) hullámhosszon. A katechol- és indolaminok mérése BAS típusú, 730 mV polarizáló feszültségen (Bioanalytical Systems, IN, USA) amperometriás detektálással történt. A mennyiségi meghatározást két pontos, belső standard módszerrel validáltuk. Az oszlopegyensúlyt az "A" eluenssel hoztuk létre, amely 0,25 mM dinátrium-EDTA 0,45 mM nátrium-oktilszulfonát tartalmú, 10 mM-os, 5,2 pH-jú kálium-foszfát puffer oldat volt. A "B" puffer 8% (3:1 arányú, V/V) acetonitril-metanol hozzáadásával készült az „A” oldatból. A 4 perc idejű 0,3 ml/perc térfogat sebességű dúsítás-tisztítás művelete után a nukleotidok elválasztása az első lépésben (10 perc) az „A” eluens alkalmazásával 0,35 ml/perc áramlási sebességgel történt. A monoaminok elválasztása a "B" oldattal, 0,45 ml/perc térfogat sebesség és 45 perc elemzési idő alkalmazásával történt. Tíz perces reequilibrium után indult a következő elemzési ciklus.

#### 4.5. A Parkinson-kór *in vitro* modellje

##### 4.5.1. Dopaminerg neuronok jelölése a szubsztancia nigrában

Immunhisztokémiai vizsgálattal követtük a rotenonos kezelést követő sejtpusztulást, illetve a MAO-B gátlás protektív hatását. Az *in vitro* modellhez a patkányokat dekapitáltuk, majd az agyakat jégen kettévágtuk és a két féltékét külön-külön csoportként használtuk fel (n=4-5). A frontális és kaudális agyrészeket eltávolítottuk, csak a szubsztancia nigrát tartalmazó szövetblokkal dolgoztunk tovább. Öt különböző kezelést alkalmaztunk: kontroll, rotenon, rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + rasagilin, SZV558 (100 nM) (12. ábra).



12. ábra. **SZV558 szerkezeti képlete.** A MAO-B gátló hatású heteroarilalkenil-propargilamin vegyület savas közegben oldódik.

A kontroll mintákat Krebs oldatban inkubáltuk 60 percig 37°C-on, majd 120 percig áramoltattuk a Krebs oldatot a szövet körül szintén 37°C-on. A következő csoportot 10 µM rotenonnal inkubáltuk a 60 perc alatt, majd tisztán Krebs oldatot áramoltattunk át 120 percig 37°C-on. A rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> csoportba tartozó agyszövetet a 60 perc rotenonos inkubálás után 70 percig Krebs-oldattal perfuzáltuk, majd 50 percig 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó Krebs oldattal folytattuk a perfúziót. A rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + rasagilin és rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + SZV558 kezelések esetén a 60 perc rotenonnal történő inkubációt követően 50 percig Krebs-oldattal mostuk a blokkokat, ezt követte 20 perc 100 nM rasagilin/SZV558 perfúzió, végül pedig 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 100 nM rasagilin/SZV558 tartalmú oldatot áramoltattunk 50 percig. Az *in vitro* kezelések után az agyakat 4%-os PFA-ban másnap reggelig immerziósan fixáltuk, majd 0,1 M PB-vel átmostuk. A szubsztancia nigrát tartalmazó közepagyti területből 40 µm vastag koronális metszeteket készítettünk, majd 10 egymást követő szeletet használtunk az immunfestéshez. Az endogén, nem specifikus peroxidáz enzimeket 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó metanol oldattal gátoltuk 20 percen át

szobahőmérsékleten. Az antitest nem specifikus kötőhelyeit 2,5%-os NHS oldattal blokkoltuk 2 órán keresztül szintén szobahőn, majd a metszeteket anti-tirozinhidroxiláz antitestben (nyúl poliklonális, Millipore) inkubáltuk egy éjszakán keresztül 1:1000 hígításban 0,1 M PB-ben 4°C-on. Óvatos 3x10 perces PB-s mosást követően az ImmPRESS univerzális másodlagos antitestjét (The ImmPRESS Universal ready-to-use Antibody Kit, anti-mouse/rabbit, Vector Laboratories, CA) és a hozzá tartozó ImmPACT DAB kromogént alkalmaztuk a felhasználói kézikönyv utasításai szerint. A tárgylemezre felhúzott metszeteket xilolos derítés után Depex-szel fedtük le (Sigma-Aldrich, MO, USA). Az immunreakció kvantifikálásához a tárgylemezeket beszkeneltük Panoramic P250 szkener segítségével (3DHISTECH, Magyarország) 0,11 µm/pixel felbontásban. Minden metszeten ugyanarról a területről készítettünk felvételt 40x-es nagyításon. A jelölt sejtesteket egymástól függetlenül ketten is megszámloltuk manuálisan, a Panoramic Viewer 1.15.4 program (3DHISTECH, Magyarország) jelölő funkcióját használva.

#### **4.6. Statisztikai módszerek**

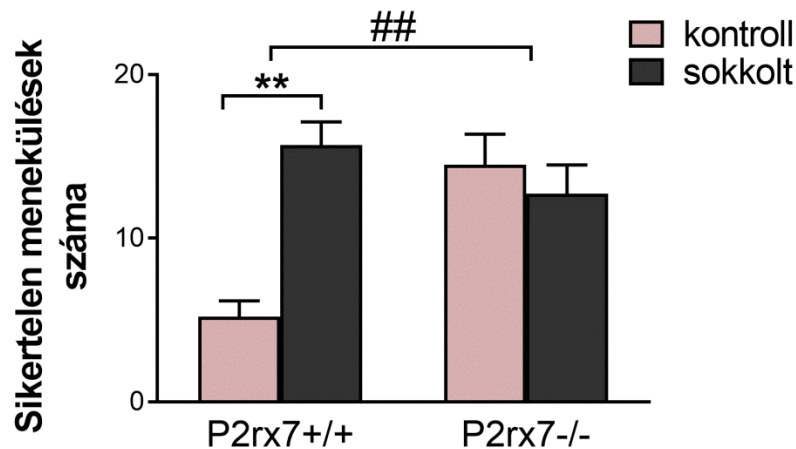
Kísérleteink során a párhuzamos mérési eredményeket használtuk föl statisztikai elemzéshez. A dolgozatban feltüntetett adatokat az  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  (standard error of mean) formában tüntettük föl. A különböző genotípusokon végzett kezelések összehasonlítását kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, az F értékhez tartozó szignifikancia szinteket #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  jelöli. Az adatok normalitását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A nem normál eloszlású adatokat logaritmikusan transzformáltuk (multiplex citokin esszé adatai) és így vetettük alá a kétszemponos ANOVA-nak. Amely adatok transzformálás után sem voltak normál eloszlásúak, a nem-parametrikus Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze őket (HPLC mérés adatai). Az mRNS expresszió adatait és a Parkinson-modell kísérleti eredményét egyszemponos ANOVA-val hasonlítottuk össze. Az egyes csoportok post hoc összehasonlításakor Fisher tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szinteket \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  jelöli. A statisztikai analízishez a Statistica 13.1 programot használtuk (Dell Software, CA, USA). Az elemszámot n jelöli, ami a mintavételhez használt állatok számát jelenti.

## 5. Eredmények

### 5.1. A P2X7 receptor szerepe a depresszió állatmodelljében

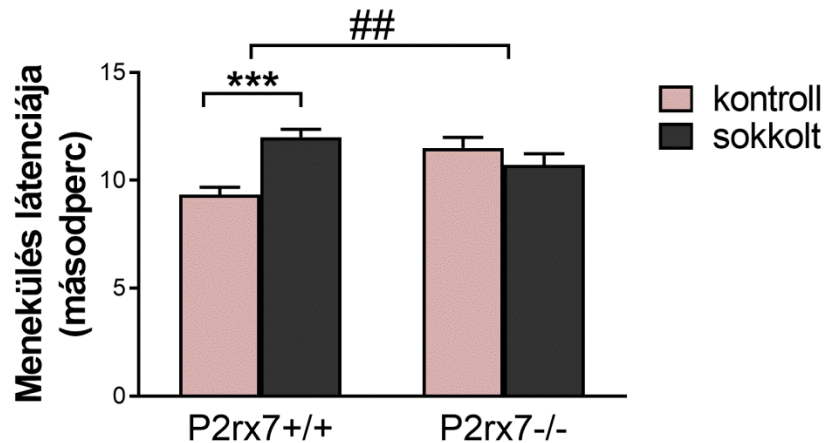
#### 5.1.1. A tanult tehetetlenség kialakulása

A depresszió-szerű állapotot a tanult tehetetlenség paradigma segítségével hoztuk létre és tanulmányoztuk vad típusú és P2rx7<sup>-/-</sup> egereken. A sikertelen menekülések számát és a menekülésig eltelt időt automatikusan rögzítette a számítógép, ezeken az adatokon végeztünk statisztikai kiértékelést. Az elkerülhetetlen áramütéseknek kitett vad típusú, P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél magasabb arányban volt megfigyelhető a menekülési próbák elbukása (13. ábra). A kialakult tehetetlen állapot következtében átlagosan a próbák felében nem jutottak át az állatok a biztonságos térfélre. A kontroll egerek az esetek több, mint 80%-ában el tudtak menekülni az áramütések elől.



13. ábra. A sikertelen meneküléssel záruló próbák száma. P2rx7<sup>+/+</sup> sokkolt csoport állatainak szignifikánsan többször nem sikerült elmenekülnie az áramütések elől, mint a korábban nem sokkolt kontroll tagjai. A génkiütött egereknél nem volt különbség a kezelés hatásában, azonban a vad típusú sokkolt csoport eredményeihez hasonlóan magas alapértékeket tapasztaltunk. A tanult tehetetlenség modell eltérően hatott a két genotípus állataira [F(1,100)=15,64, ##p<0,01]. \*\*p<0,01 n=23-27

A menekülés időtartamában is jelentős különbséget találtunk. A sokkolt csoport kísérleti állatainak sokkal több időbe telt az áramütés mentes téréfélbe átjutni, mint a kontroll egereknek (14. ábra).



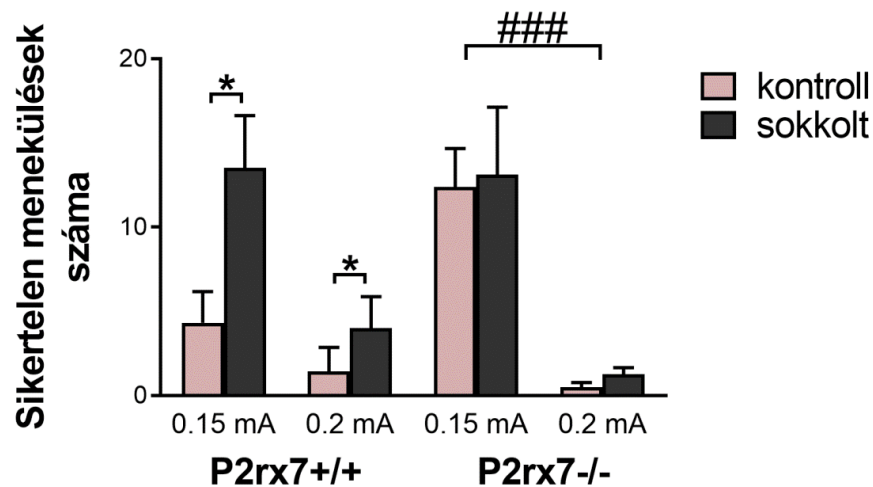
**14. ábra. A menekülésig eltelt idő.** Az ajtó kinyitásától a másik téréfélbe átérésig mért periódus hossza maximum 15 másodperc lehetett sikertelen próbák esetén. Vad típusú egereknél ebben a mért paraméterben is szignifikáns eltérés látható a sokkolás hatására. A sikertelen próbák száma szintén hozzájárul a magasabb menekülési látencia átlaghoz. P2rx7<sup>-/-</sup> csoportokban a sokkolástól független az eltelt időtartam. A genotípus és kezelés interakciója szignifikáns volt [F(1,100)=15,26, ##p<0,01]. \*\*p<0,001 n=23-27

Tehát a P2rx7<sup>+/+</sup> genotípusnál kialakult a depresszió-szerű viselkedés, a tanult tehetetlenség, az elkerülhetetlen áramütések statisztikailag szignifikánsan befolyásolták az egerek menekülési reakcióját mind a sikertelen próbák számában, mind a sikeres menekülésig eltelt időben.

P2rx7 hiányos egerekben is megvizsgáltuk a kivédhetetlen lábsokkok hatását. Érdekes módon a sikertelen próbák száma nem sokkal maradt el a vad típusú kezelt csoport átlagához képest, azonban a kontroll géniütött egereknél is hasonlóan magas értékeket kaptunk. A menekülésig eltelt időben sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ezért megállapítottuk, hogy az elkerülhetetlen áramütéseknek nincs hatása a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek viselkedésére. Mivel a tanulási fázis során alkalmazott elkerülhetetlen áramütések hatása P2rx7<sup>+/+</sup> vagy P2rx7<sup>-/-</sup> genotípusú egereknél különbözött, így

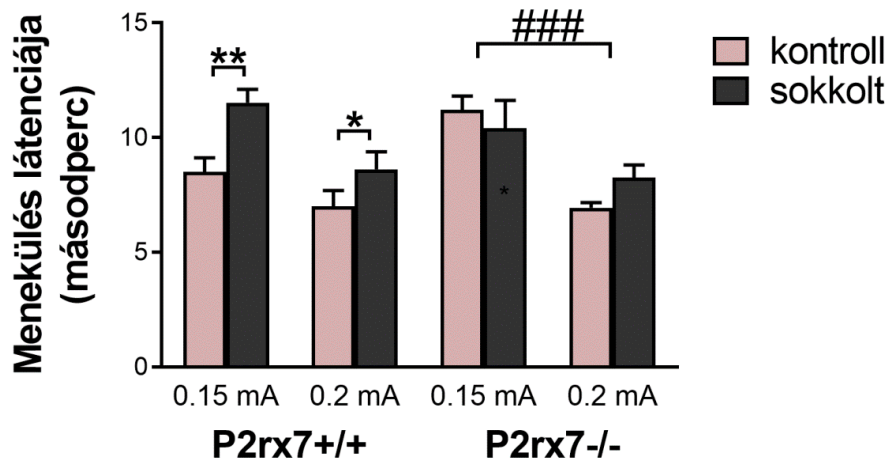
feltételezhető, hogy a P2X7 receptor hiánya ebben a depresszió modellben is rezisztenciát jelent a külső stresszre.

Mivel a génkiütött egereknél tapasztalt magas számú sikertelen próba a kontroll és a sokkolt állatoknál egyaránt megfigyelhető volt, ennél a genotípusnál nem beszélhetünk a tanult tehetetlenség, vagyis depresszió-szerű állapot kialakulásáról. A kapott eredmény akár arra is utalhatna, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek eleve szaturáltak a stresszre nézve, nem képesek reagálni a modellben alkalmazott áramütésekre. Azonban a kísérleti körülmények kis mértékű változtatásával bizonyítottuk, hogy ezek a P2rx7 hiányos egerek is el tudnak menekülni a lábsokkók elől. Az új kísérletben a tanulási fázison nem módosítottunk, viszont a tesztelés során az egerek 0,15 mA helyett 0,2 mA erősségű áramütéseket kaptak. Ezt követően a sikertelen menekülések száma jelentősen lecsökkent (15. ábra), függetlenül attól, hogy korábban sokkolva voltak-e az állatok vagy sem, valamint a menekülés látenciája is alacsonyabb lett (16. ábra).



15. ábra. Sikertelen próbák száma magasabb intenzitású áramütések esetén. Ha 30%-kal megemeltük a lábsokkók intenzitását, jelentősen lecsökkent a sikertelen menekülési reakciók száma. A P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél továbbra is látható volt egy kisebb mértékű szignifikáns különbség a sokkolt csoport javára, azonban a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek közel száz százalékban elszaladtak az erősebb áramütések elől. Tehát a génkiütött állatok rezisztensebbek a sokkolás okozta stresszre, azonban képesek elmenekülni előle, nem alakult ki náluk a tanult tehetetlenség [F(1,28) = 26,14, ###p<0,001]. \*p<0,05 n=6-8





16. ábra. Nagyobb áramerősség hatása a menekülés időtartamára. Hasonlóan a sikertelen próbák számához, a menekülési látencia értékek is jelentősen lecsökkentek. A génkiütött egerek magasabb áramerősség hatásra szignifikánsan kevesebb idő után már menekültek a sokk elől [F(1,28)=19,12, ###p<0,001]. A P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél nem beszélhetünk tehetetlen állapotról, hiszen a kontroll és sokkolt csoport között nincs eltérés. \*p<0,05 \*\*p<0,01 n=6-8

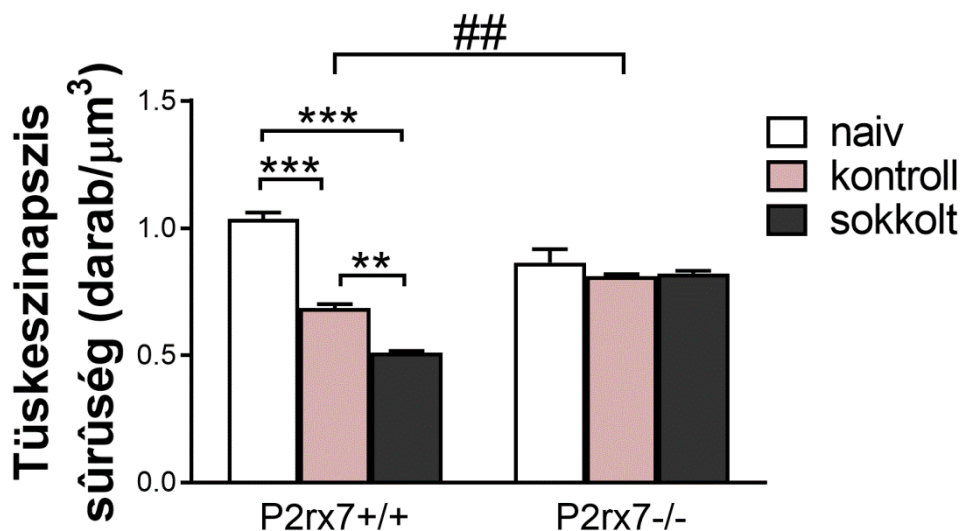
#### 5.1.2. A tanult tehetlenség hatása a gyrus dentatus tüskeszinapszis sűrűségére

A tanult tehetlenség modellt patkányokon alkalmazva már kimutatták a hippocampális tüskeszinapszisok csökkenését<sup>60</sup>, azonban egereken, különösen a P2rx7 hiányos egereken még nem ismertük a modell hatását ezeken a dinamikus struktúrákon. Első lépésként naiv vad típusú és génkiütött egerek gyrus dentatusában határoztuk meg az alap tüskeszinapszis sűrűséget, ezzel beállítva az elektronmikroszkópos sztereológiai módszert. A P2rx7<sup>+/+</sup> egerek agyában az egy  $\mu\text{m}^3$ -re eső tüskeszinapszis sűrűség magasabb volt a P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél kimutatott értékeknél, vagyis genotípustól függő szignifikáns különbséget találtunk.

Ezután vad típusú egerekre alkalmaztuk a tanult tehetlenség modellt, majd a tesztelés után 24 órával megvizsgáltuk a tüskeszinapszisok mennyiségi változását. Azt tapasztaltuk, hogy a kontroll csoportból származó mintákhoz képest jelentősen lecsökkent a tüskeszinapszis sűrűség a sokkolások hatására. Megfigyelhető a naiv mintákhoz képest is egy nagyobb

mértékű csökkenés, ami azzal magyarázható, hogy tesztelés során mindkét csoport jelentős stresszhatásnak volt kitéve.

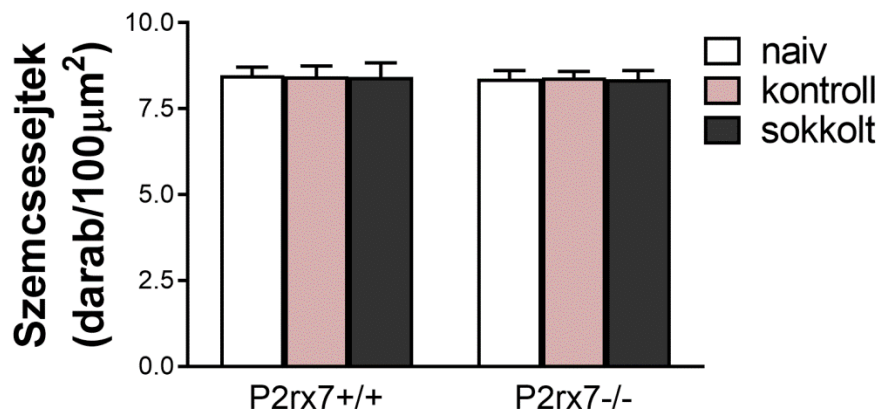
Végül a depresszió-modellben részt vevő  $P2rx7^{-/-}$  egerek tüskeszínapszis sűrűségét is meghatároztuk. A viselkedés tesztben kapott eredményekhez hasonlóan a sztereológiai összehasonlítás sem hozott különbséget az egyes csoportok között. A kontroll egerek tüskeszínapszis sűrűsége a sokkolt csoportéhoz igen hasonlóan adódott, mindkét érték közeli a naiv  $P2rx7^{-/-}$  egerekben kapott tüskeszínapszis sűrűségéhez is (17. ábra). Ezzel az eredménnyel megerősítettük a magatartás vizsgálatban tapasztaltakat, miszerint a P2X7 receptor hiányában a depresszió-szerű állapotra jellemző változások nem következnek be a kísérleti állatainkban.



**17. ábra. Hippokampális tüskeszínapszisok kvantitatív változása a tanult tehetetlenség modellben.** A két genotípus között eleve fennáll egy sűrűség-beli különbség, a naiv  $P2rx7^{-/-}$  egereknél kevesebb tüskeszínapszist számoltuk a gyrus dentatus molekuláris régiójában. A tanult tehetetlenséggel együtt jár a dendrittüskék színapszisainak megfogyatkozásával, szignifikáns csökkenést láthatunk a kontroll értékekhez képest. Azonban a kontroll csoportnál is megfigyelhető volt egy nagyobb mértékű csökkenés a naiv állapothoz képest. Ehhez képest a  $P2rx7$  génkiütött egerek tüskeszínapszis sűrűsége változatlan volt, nem alakult ki a depressziós állapotra jellemző színapszis veszteség. A tanult tehetetlenség különbözőképpen hatott a tüskeszínapszisok plaszticitására a  $P2rx7^{+/+}$  és  $P2rx7^{-/-}$  egerekben [ $F(2,14)=105.53$ ,  $##p<0.01$ ].  $**p<0,01$   $***p<0,001$   $n=3-4$

### 5.1.3. A szemcsesejtek kvantitatív összehasonlítása

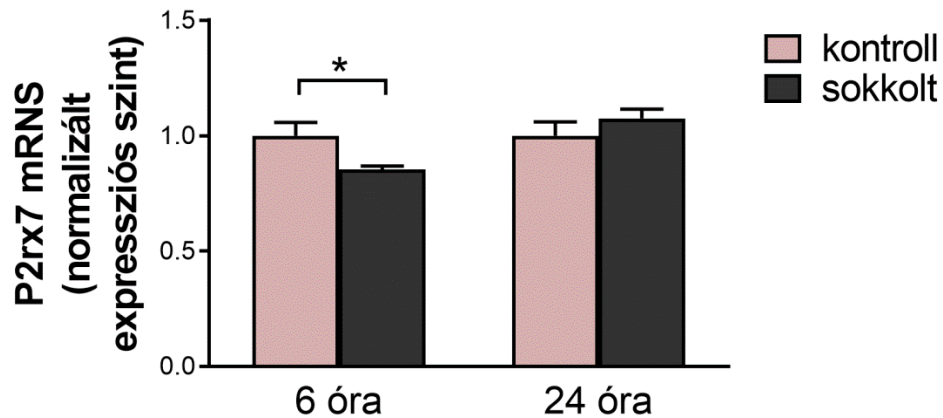
A tüskeszínapszok mennyiségi vizsgálatán kívül összevetettük a gyus dentatusban található szemcsesejtek számát is, mivel ezek a sejtek hordozzák a primer nyúlványaikon a kísérletünkben szereplő tüskeszínapsziszokat. A tanult tehetetlenség modell nem volt hatással a sejtek számára egyik genotípusnál sem (18. ábra), vagyis nem történt sejtpusztulás.



**18. ábra. A szemcsesejtek a gyrus dentatusban nem érintettek a tanult tehetetlenség modellben.** Mindkét genotípusban hasonló szemcsesejt sűrűséget találtunk, melyen nem változtatott a kezelés sem [F(2,96)=0,15012, p=0,86081]. n=3

### 5.1.4. A P2rx7 expresszió mérése

A tanult tehetetlenség tesztelését követően valós idejű PCR technikával vizsgáltuk a P2rx7 mRNS jelenlétét és időfüggő mennyiségi változását a hippocampusban. A mintavételezés a tesztet követő 6. és 24. órában történt. Az mRNS expresszióját az átírt cDNS templátból határoztuk meg kvantitatív PCR segítségével. A P2rx7 mRNS koncentrációját az endogén kontroll koncentrációkra vonatkoztattuk, így összevethetőek voltak az adatok. A kontroll csoport mRNS szintjéhez normalizáltuk a kezelt minták eredményét. Az első mért időpontban, 6 órával a teszt után a P2rx7 mRNS expressziójának csökkenését tapasztaltuk a sokkolás következtében, ami post hoc teszttel szignifikáns különbségnek bizonyult (19. ábra). 24 óra elteltével azonban már nem láttunk csoportok közti különbséget a P2rx7 mRNS expressziós szintjében.



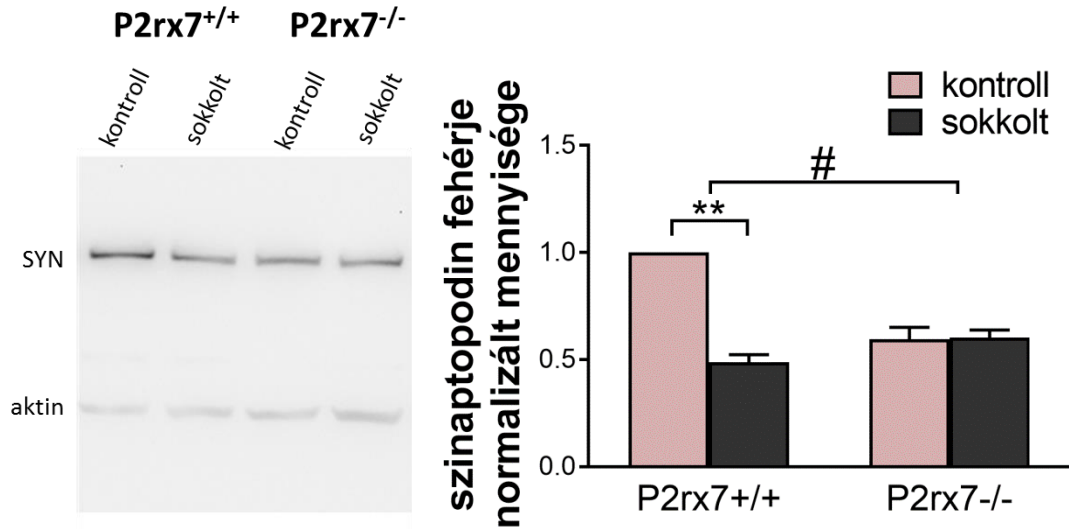
19. ábra. A hippocampális P2rx7 mRNS expressziója lecsökken a tanult tehetetlenség modellben. 6 órával a tesztelést követően kissé downregulálódik a receptor, azonban 24 óra elteltével már nem áll fenn ez a hatás. A P2rx7 mRNS expressziós változása arra utal, hogy a tanult tehetetlenség kialakulásának mechanizmusában valóban érintett a receptor. \* $p < 0,05$   $n=4$

#### 5.1.5. Szinaptikus markerek Western blot analízise

Miután az elektronmikroszkópos sztereológiai vizsgálattal kimutattuk a tüskeszinapszisok mennyiségi változását a depresszió kísérletes modelljében, eredményünket szinaptikus markerek kvantifikálásával is alátámasztottuk. A PSD95 a posztzinaptikus denzitásban (PSD) klasszikusan előforduló fehérje, általánosan használják szinapszisok jelölésére. Emellett egy tüskeszinapszisokra specifikus fehérje, a dendrittüskékben található szinaptopodin mennyiségét is vizsgáltunk. Pozitív kontrollként az aktin fehérje mennyisége szolgált, ehhez viszonyítottuk a szinaptopodin és PSD95 mennyiségi változását. Csoportonként 5-5 egér agyából származó teljes hippocampusz mintákon végeztünk időfüggő (6 és 24 órával a tanult tehetetlenség tesztelését követően) kvantifikálást. A kontroll egerek mintáiból kapott adatokra normalizáltuk a sokkolt csoportban mért fehérjeszinteket.

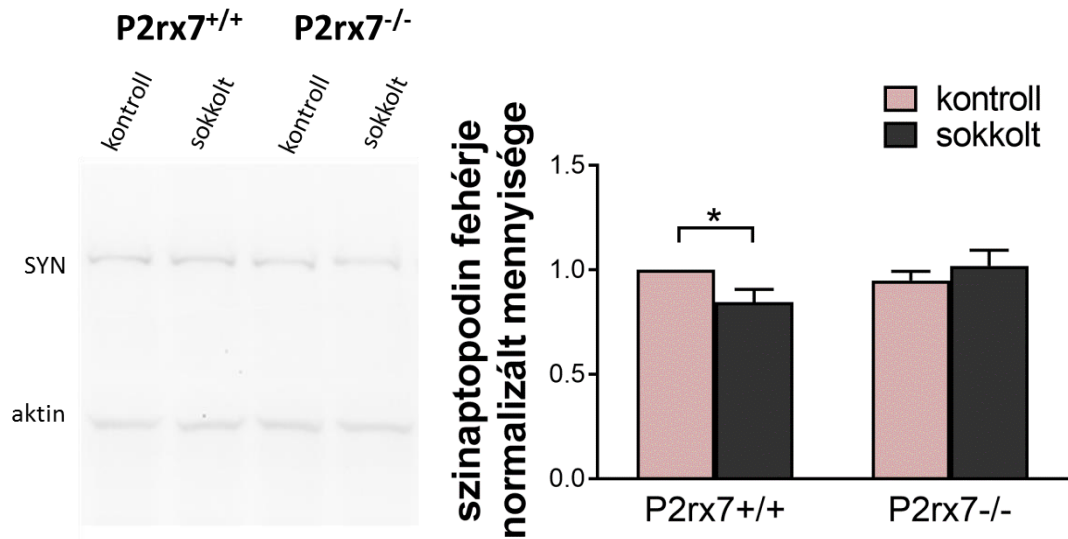
A vad típusú sokkolt egerek csoportjában a viselkedéstesztet követően 6 órával a szinaptopodin fehérje hippocampális mennyisége szignifikánsan kevesebb volt (20. ábra). Ehhez képest a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek hippocampuszában jelentősen alacsonyabb szinaptopodin

szintet mértünk a vad típusú kontrollhoz képest, azonban a kezelés nem befolyásolta a fehérje mennyiségét.



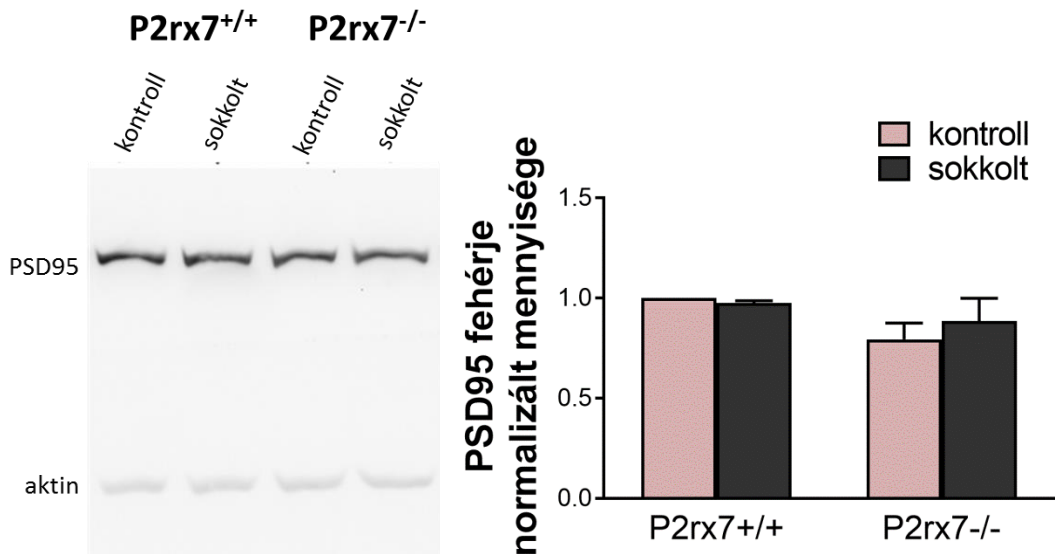
**20. ábra. Szinaptopodin fehérje mennyisége a hippocampusban 6 órával a tanult tehetetlenség tesztelése után.** Jelentős csökkenést láthatunk a vad típusú sokkolt állatok esetében, mely a modell dendrittüske specifikus hatását támasztja alá. A P2rx7<sup>-/-</sup> csoportok között nincsen különbség, de láthatóan alacsonyabb alapértékkel rendelkeznek, mint ahogy hasonló tendenciát láthatunk a tüskeszinapszisok sűrűségét illetően is. A genotípus és kezelések közötti összefüggés szignifikánsnak adódott [F(1,9)=8,0276, #p<0,05]. \*\*p<0,001 n=5

24 óra elteltével a P2rx7<sup>+/+</sup> sokkolt csoportban még mindig szignifikánsan alacsonyabb szinaptopodin szintet mértünk (21. ábra), bár kevésbé kifejezetten, mint a 6 órás minták esetében. A kezelés hatását továbbra sem tapasztaltuk a P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél, mindkét csoport a vad típusú kontrollhoz hasonló fehérje mennyiséget mutatott.

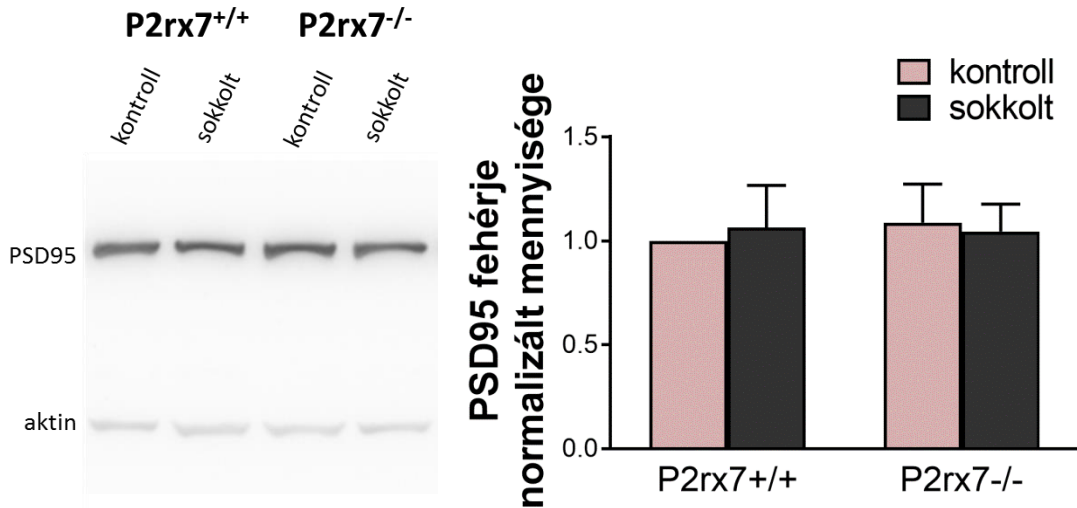


21. ábra. Szinaptopodin fehérje mennyisége a hippocampusban 24 órával a tanult tehetetlenség tesztelése után. A P2rx7<sup>+/+</sup> mintákban korábban kimutatott csökkenés még fennáll ebben az időpontban is, bár kissé mérsékelődött. A génkiütött egereknél továbbra sincsen különbség a kontroll és sokkolt csoportok között, habár az alapérték itt már összhangban van a vad típusú kontroll értékkel. A tanult tehetetlenség hatása még mindig szignifikánsan különbözik a két genotípusban [F(1,7)=7,2509, p<0,05]. \*p<0,05 n=5

Ezt követően a PSD95 fehérje mennyiségi változását analizáltuk, azonban ezt a szinaptikus markert nem befolyásolta a tanult tehetetlenség kialakulása, egyik vizsgálati időpontban esem tapasztaltunk eltérést, és a genotípusok között sem volt különbség (22-23. ábra).



22. ábra. **PSD95 posztzinaptikus marker mennyisége a hippocampusban 6 órával a tanult tehetetlenség tesztelése után.** Az elkerülhetetlen sokkolás nem befolyásolta a PSD95 fehérje mennyiségét egyik genotípusnál sem [F(1,13)=0,3285, p=0,567]. n=5

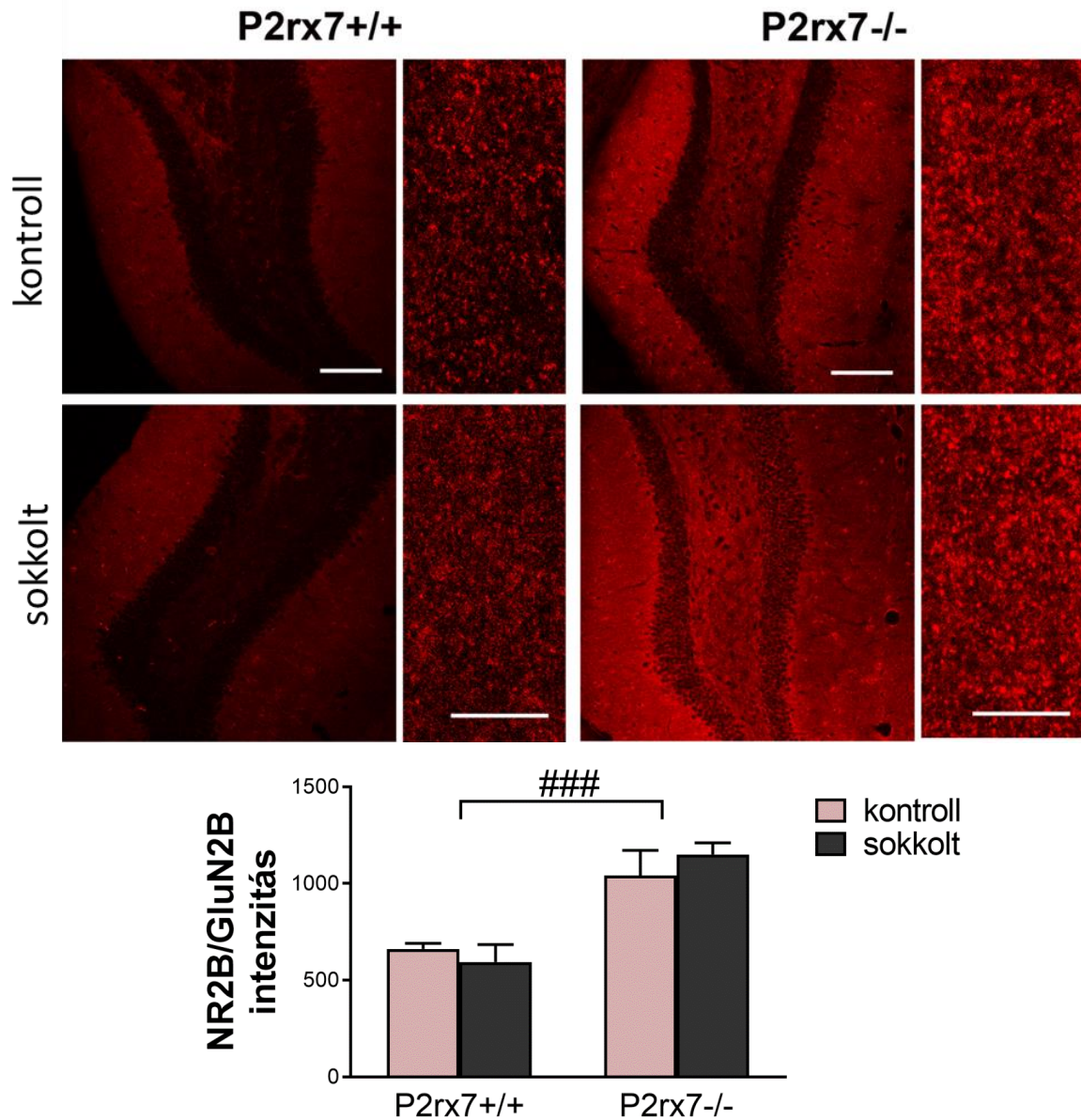


23. ábra. **PSD95 posztzinaptikus marker mennyisége a hippocampusban 24 órával a tanult tehetetlenség tesztelése után.** Későbbi időpontban sem jelentkezett változás a PSD95 fehérje hippocampális mennyiségében [F(1,4)=0,0503, p=0,833]. n=5

#### 5.1.6. Tanult tehetetlenség hatása az NR2B/GluN2B glutamát receptor alegységre

Munkacsoportunk korábbi kísérlete során genotípusos különbséget talált az NR2B/GluN2B ionotróp receptor alegység mennyiségében<sup>37</sup>. Immunhisztokémiai jelöléssel nagyobb receptor intenzitást tapasztaltunk a naiv P2rx7<sup>-/-</sup> egerek hippocampusában a P2rx7<sup>+/+</sup> naiv állatokhoz képest. Mivel a glutamáterg transzmisszió zavart szenved depresszió során, érdemesnek tartottuk a tanult tehetetlenség modellben is megvizsgálni az NR2B/GluN2B expresszióját. Eredményeink azonban arra utalnak, hogy ennek a glutamáterg receptor alegységnek nincs szerepe a tehetetlen állapot kialakulásában, mivel nem tapasztaltunk változást a festés intenzitásában a viselkedésteszteket követően (24. ábra). A P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> közötti genotípusos különbséget azonban ismét kimutattuk, megerősítve korábbi eredményeinket.





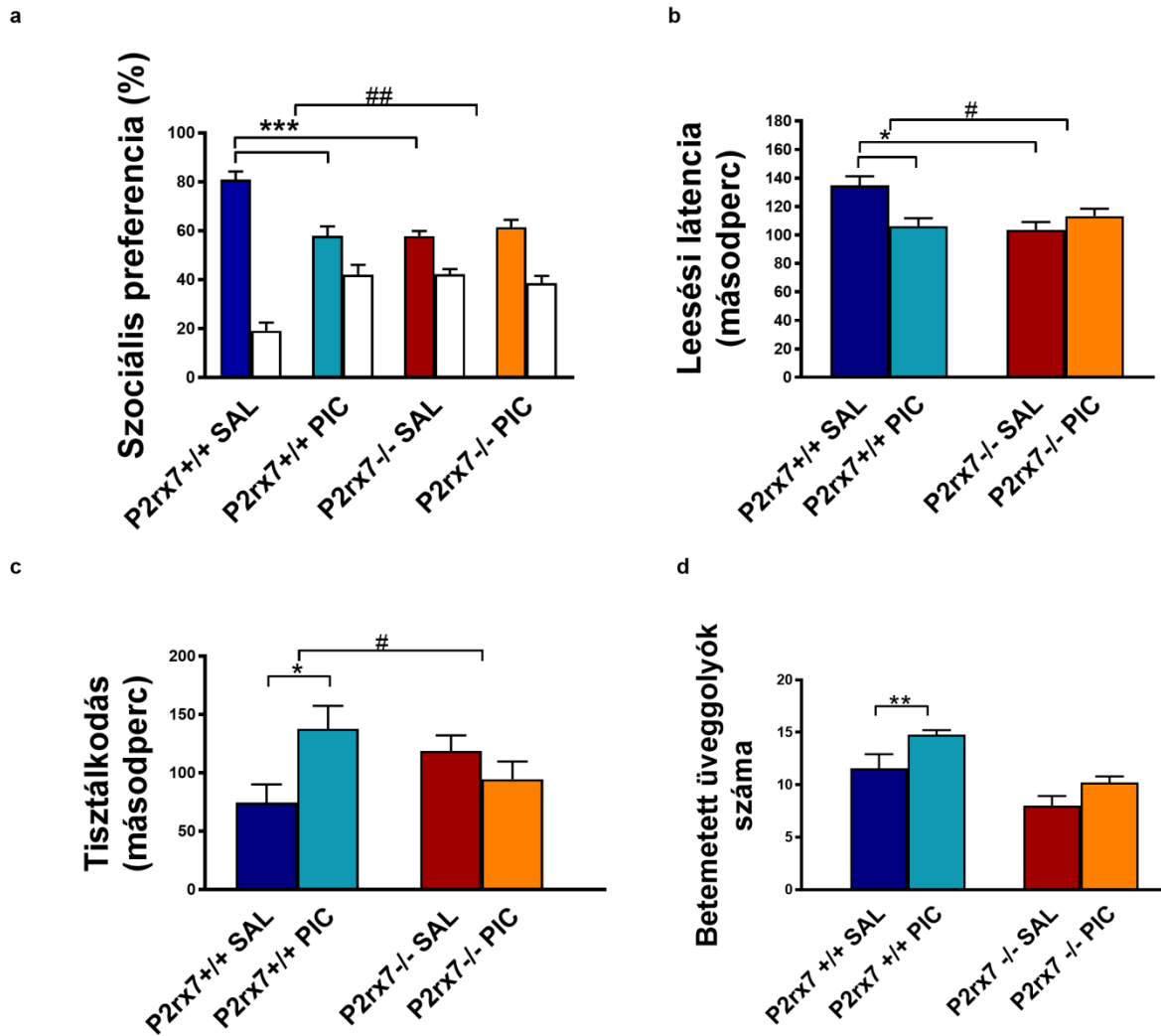
24. ábra. A tanult tehetetlenség nincsen hatással az NR2B/GluN2B NMDA receptor alegység hippocampális mennyiségére. Úgy tűnik, hogy a glutamáterg jelátvitel receptora nem vesz részt a tanult tehetetlenség fenotípus létrejöttében, mivel a kontroll értékekkel megegyezett az immunjelölés intenzitása a sokkolást követően. Azonban jól látható a genotípusok közötti különbség [ $F(1,8)=29,5615$ ,  $###p<0,001$ ], amit már korábbi munkánk során is tapasztaltunk. A nagyobb átnézeti képek 20x-es nagyításon készültek és mércé 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl, mellettük a kiemelt részletek 60x-os nagyításúak, 50  $\mu\text{m}$ -es skálával.  $n=3$



## 5.2. A P2X7 receptor közreműködése a MIA autizmus modellben

### 5.2.1. Viselkedéssbeli változók

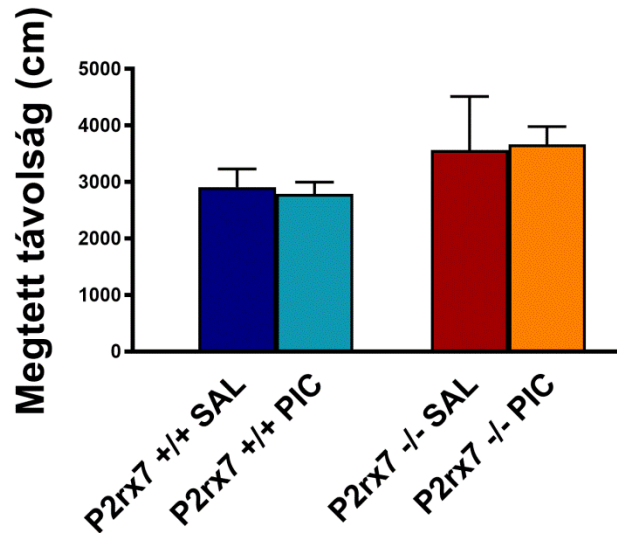
Az autizmus modellezésekor vizsgáltuk a szociális interakció zavarát, repetitív tevékenységeket és a mozgáskoordináció romlását. A vad típusú kontroll egereknél megfigyelhető volt a szociális preferencia, mivel a mért idő közel 80%-ában a fajtársat szimatolták az üres ketrec helyett (25/a. ábra). A vemhesség alatt poli(I:C)-vel kezelt  $P2rx7^{+/+}$  nőstények utódainál viszont azt tapasztaltuk, hogy ennél szignifikánsan kevesebb időt töltenek a fajtárs közelében, és sokkal többet foglalkoznak az üres ketrec feltérképezésével. A  $P2rx7^{-/-}$  egerek szociális viselkedésében nem találtunk különbséget. A második viselkedésseszt során az állatok repetitív tisztálkodását figyeltük meg (25/d. ábra). A poli(I:C) kezelés hatására a  $P2rx7^{+/+}$  egerek szignifikánsan hosszab ideig tisztálkodtak a 10 perces teszt alatt a sóoldattal kezelt csoporthoz képest. Hasonló eredményt kaptunk a másik repetitív viselkedésforma, az üveggolyó ásás vizsgálatokor is (25/c. ábra). A vad típusú állatok több üveggolyót temettek be a poli(I:C) kezelést követően, míg a  $P2rx7$  génkiütött társaiknál nem volt jelentős különbség a kezelési csoportok között. A rotarod teszttel az állatok mozgáskoordinációját mértük fel. A vemhesség során kapott poli(I:C) jelentős zavart okozott a mozgáskoordinációban a  $P2rx7^{+/+}$  egereknél, azonban a  $P2rx7^{-/-}$  genotípusra nem volt hatással ebben a tesztben sem (25/b. ábra).



25. ábra. **Viselkedési változók a MIA autizmus modellben.** A) Elsőként az egerek szociális interakcióját vizsgáltuk, a színes oszlopok a fajtárrsal töltött időt, a fehér az üres ketrecet jelöli. A poli(I:C) kezelés szociális deficitet váltott ki a P2rx7<sup>+/+</sup> állatoknál, sokkal kevesebb időt töltöttek az ismeretlen egér szimatolásával, mint a sókezelt társaik. A P2rx7 hiányos egereknél eleve alacsonyabb volt a szociális preferencia mértéke, viszont az nem változott az anyai immunaktivációt követően. B) A poli(I:C) hatással volt a vad típusú egerek mozgáskoordinációjára, azonban a génkiütött állatoknál nem jelentkezett a leromlás. Szignifikánsan megnőtt a repetitív viselkedésformák előfordulási gyakorisága is, a C) panel mutatja a tisztálkodás fokozódását, a D) pedig az elásott üveggolyók magasabb számát P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél. P2rx7<sup>-/-</sup> genotípusú állatoknál nem alakult ki egyik autisztikus magatartás sem az immunaktivációt követően. Esetenként megfigyelhető az alapértékek közötti genotípusos eltérés, mely a génkiütés következtében fellépő kompenzációs folyamatok miatt alakulhatott ki. Az adatok statisztikai összehasonlításakor szignifikáns genotípus X kezelés hatást találtunk a szociabilitás [ $F(1,39)=12,044$ ,  $##p<0,01$ ], a rotarod

[F(1,28)=5,433, #p<0,05], és a repetitív tisztálkodásos tesztben [F(1,38)=5,1135, #p<0,05].  
\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 n=5-16

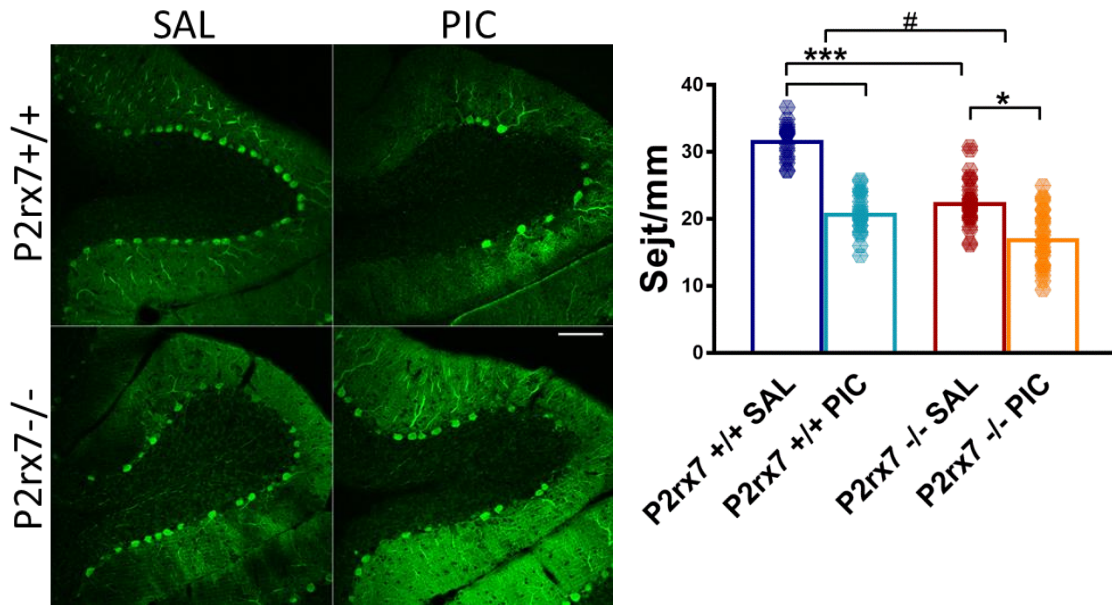
Az alap lokomóciót a várakozásoknak megfelelően nem befolyásolta a poli(I:C) kezelés, és a két genotípus között sem találtunk különbséget a nyílt tér feltérképezésében (26. ábra).



26. ábra. Nyílt térben megtett távolság összehasonlítása. A MIA modell nem volt hatással az egerek felfedező magatartására egyik genotípusban sem [F(1,16)=0,07870, p=0,78318]. n=4-6

### 5.2.2. Kisagyi Purkinje sejtek

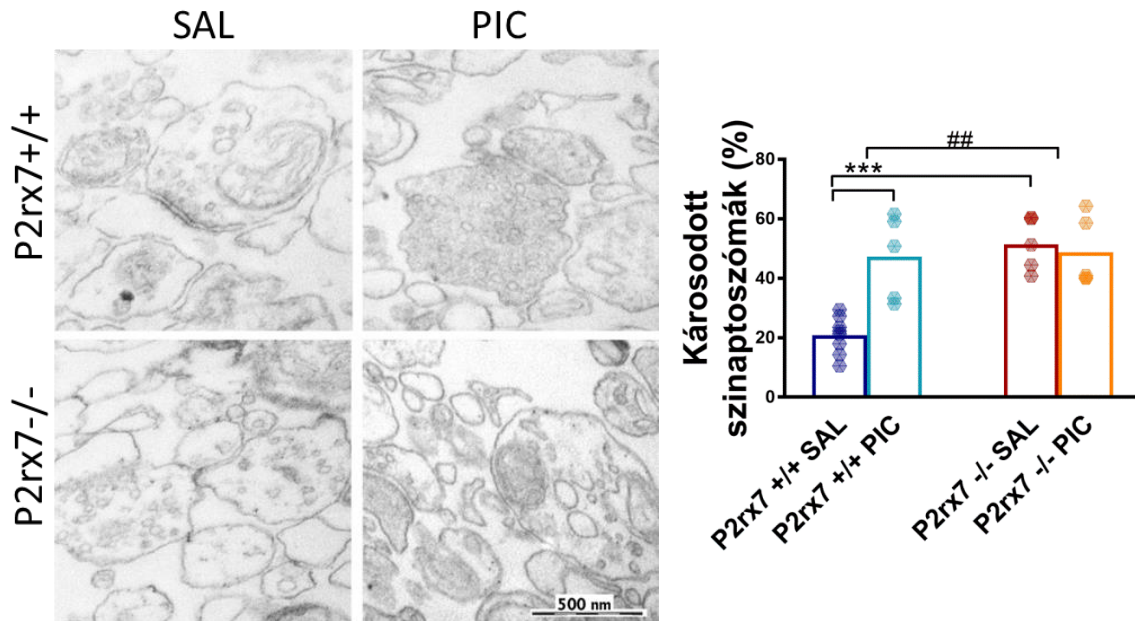
Miután elvégeztük a viselkedésteszteket, csoportonként 3-3 állatot felhasználtunk a Purkinje sejtek immunhisztokémiai elemzéséhez. A calbindinnel jelölt Purkinje sejteket megszámláltuk a VII. lebenyben, majd meghatároztuk a lebeny ív hosszát, és az eredményt sejt/mm-ként adtuk meg. A poli(I:C)vel kezelt utódoknál szignifikáns mértékű sejt kiesést tapasztaltunk a kontroll csoportban mért sejtsűrűséghez képest (27. ábra). Hasonlóképpen a P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél is megfigyeltünk a poli(I:C) kezelést követő sejtszám csökkenést, de kisebb mértékű volt a különbség, mint a P2rx7<sup>+/+</sup> genotípusnál.



27. ábra. **Purkinje sejtek kvantitatív változása.** A kisgyei Purkinje sejtek sűrűsége lecsökkent a VII-es lebenyben poli(I:C) kezelt anyák utódaiban. A vad típusú egereknél sokkal kifejezettebb volt a sejtvesztés, de a P2rx7<sup>-/-</sup> állatok Purkinje sejt számában is találtunk különbséget az immunaktivációt követően. A reprezentatív képek 20x-os nagyítással készültek, a skála 100  $\mu$ m. A genotípus X kezelés interakciója szignifikánsnak bizonyult [F(1,10)=5,162, #p<0,05]. \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 n=3-4

### 5.2.3. Szinaptoszóma preparátumok

Az agyi szinapszisok integritását szinaptoszóma preparátumokon vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópos felvételeken összesítettük az ép, normál morfológiájú szinaptoszómákat, és hozzájuk hasonlítva meghatároztuk a károsodott szinaptoszómák arányát. Ez az érték a kontroll vad típusú állatoknál közel 20% volt, míg a poli(I:C)-vel kezelt egereknél közel egyenlő arányban találtunk normál és károsodott szinaptoszómákat (28. ábra). Érdekes, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> csoportoknál hasonló mértékben voltak sérült szinaptoszómák, mint ép szerkezetűek, függetlenül az anyai kezeléstől.



28. ábra. **Károsodott szinaptoszómák aránya egész agy preparátumokból származó frakcióban.** P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél a poli(I:C) kezelés jelentősen megnövelte az abnormalis szerkezetű szinaptoszómák arányát. A P2rx7<sup>-/-</sup> egerekben eleve magasabb arányban voltak jelen károsodott szinaptoszómák, azonban az anyai immunaktiváció nem változtatott az értékeken. A poli(I:C) hatása eltért a két genotípusban [F(1,18)=8,9839, ##p<0,01]. A reprezentatív elektronmikroszkópos képek 30000x nagyításon készültek, a mérce 500 nm. \*\*\*p<0,001 n=4-8

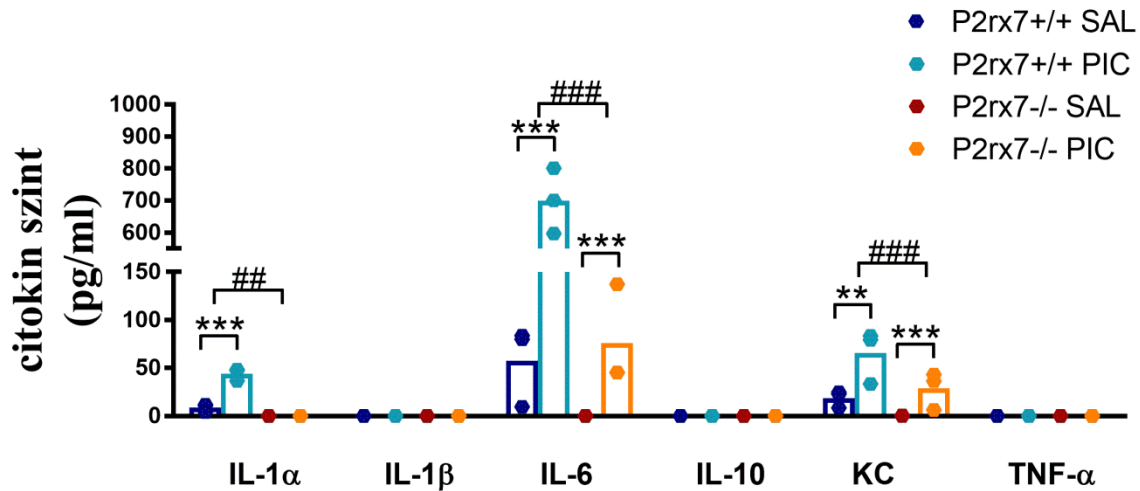
#### 5.2.4. Anyai és embrionális citokinek

A prenatális immunaktivációt követően megfigyelhetjük különböző gyulladáskeltő citokinek felszaporodását. Elvégeztünk egy multiplex citokin esszét az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, KC és TNF $\alpha$  citokinek kvantitatív elemzéséhez. Az eredeti kísérleti felállás annyiban módosult, hogy 2 órával a só vagy poli(I:C) injekciót követően termináltuk a vemhes állatokat a mintagyűjtéshez. A mérés során nem csak az anyai vérben kerestünk változást, hanem az embrionális agyszövetet is vizsgáltuk.

A vad típusú állatoknál az anyai vérplazmában (29. ábra) az IL-1 $\alpha$  szignifikánsan emelkedett a poli(I:C) kezelés hatására. Hasonlóképpen a KC szintjében is kimutattunk szignifikáns növekedést az immunaktiváció során. A poli(I:C) beadását követően az IL-6 robusztus, több százszoros indukcióját tapasztaltuk a vérplazmában. Az IL-1 $\beta$ , IL-10 és

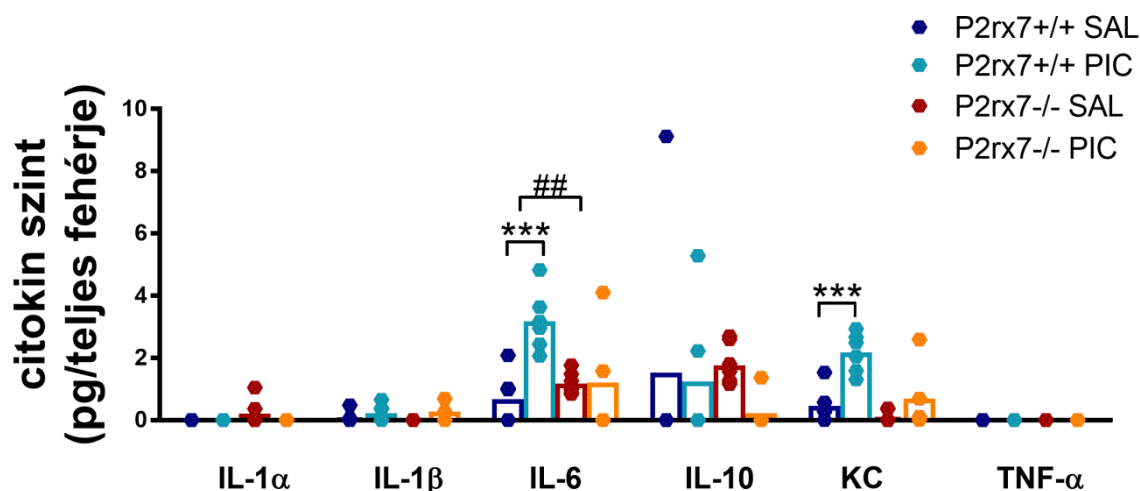
TNF $\alpha$  mennyiségében nem történt jelentős változás egyik csoportban sem, valamennyi érték a detekciós limit közelében volt.

A P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél szintén látható volt szignifikáns poli(I:C) indukálta IL-6 aktiváció, azonban a vad típusnál mért értékhez képest kisebb mértékű volt a növekedés (29. ábra). Emellett még a KC mennyiségében mutattunk ki emelkedést az immunaktivációt követően.



29. ábra. A vérplazmában indukálódott citokinek. Vad típusú állatok esetében IL-1 $\alpha$ , IL-6 és KC is emelkedett a poli(I:C) injekciót követően. Ezek közül az IL-6 szintje robusztusan megnőtt. A génkiütött egereknél is tapasztaltuk az IL-6 és a KC indukcióját, de a kapott koncentráció értékek elmaradtak a P2rx7<sup>+/+</sup> anyákban mérttől. A többi vizsgált citokint nem sikerült kimutatni a vérplazma mintákban. Az y tengely két részre osztott az adatok szemléletesebb prezentálása érdekében. A statisztikai elemzést logaritmikusan transzformált adatokon végeztük, a grafikonon az eredeti adatokat mutatjuk be. A genotípus X kezelés interakciója szignifikánsnak adódott az IL-1 $\alpha$  [F(1,8)=20,965, ##p<0,01], az IL-6 [F(1,8)=92,09, ###p<0,0001] és a KC [F(1,8)=104,9, ###p<0,001] esetében is. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 n=3

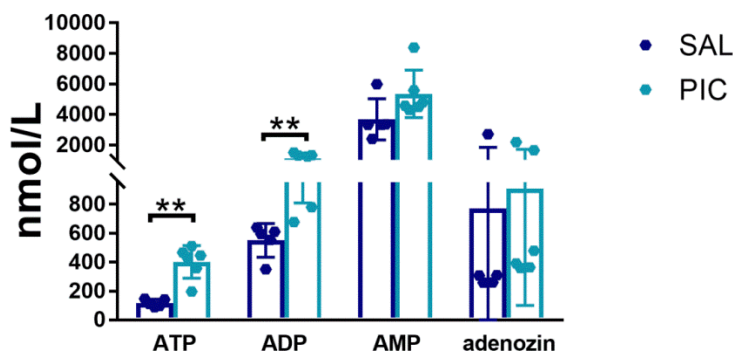
Az anyai vérplazmához hasonlóan a magzati agyban (30. ábra) is indukálódott az IL-6 és a KC a poli(I:C) injekció hatására, ezekben a mintákban azonban sokkal kisebb mértékű emelkedéseket kaptunk. A másik különbség, hogy az aktiváció kizárólag a vad típusú embriók agyában volt megfigyelhető.



30. ábra. **Citokinek mennyisége az embriók agyában.** A MIA hatása a P2rx7<sup>+/+</sup> utódok agyában is kimutatható volt, az IL-6 és a KC mennyisége is fokozódott, a vérmintákhoz képest azonban alacsonyabb értékeket mértünk. Az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  mennyisége a detekciós limit közelében mozgott, az IL-10 esetében a mért tartalmak között nem volt jelentős különbség. A statisztikai elemzést logaritmikusan transzformált adatokon végeztük, a grafikonon az eredeti adatokat mutatjuk be. Az IL-6 mennyiségi változása szignifikáns genotípus X kezelés hatást mutatott [F(1,21)=11,415, ##p<0,01]. \*\*\*p<0,001 n=6

#### 5.2.5. Nukleotid és monoamin tartalmak vizsgálata

A citokin mérésekkel egyidőben a P2rx7<sup>+/+</sup> vérminták és embrionális agyszövet nukleotid és monoamin tartalmát is meghatároztuk HPLC analízissel. A vizsgálat kimutatta, hogy poli(I:C) hatására megnő az ATP és ADP mennyisége az anyai vérplazmában (31. ábra).

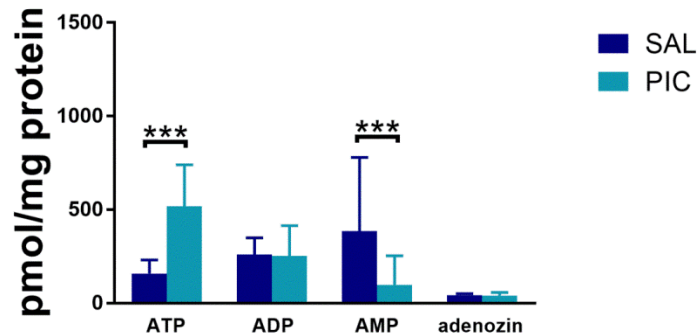


31. ábra. **Anyai vérplazma nukleotid tartalma.** Meghatároztuk a nukleotidok mennyiségét a poli(I:C) injekciót követően, és szignifikáns emelkedést mértünk az ATP és ADP koncentrációjában. Az AMP és adenosin mennyisége nem változott. Az y tengely két



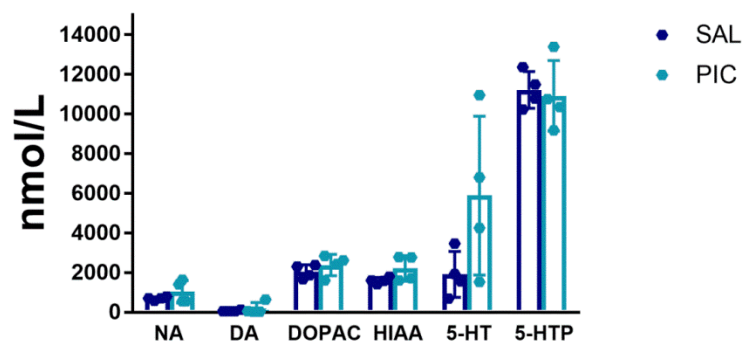
részre osztott az adatok szemléletesebb prezentálása érdekében. Az adatokon Mann-Whitney nem-parametrikus összehasonlítást végeztünk.  $^{**}p < 0,01$   $n = 5-6$

Hasonlóképpen az embrionális agymintákban is fokozta az ATP mennyiségét az anyai immunaktiváció, miközben az AMP szintjében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (32. ábra).



32. ábra. **Nukleotidok mennyisége az embriók agyában.** Az ATP és AMP koncentrációja megnőtt a poli(I:C) kezelés után az embrionális agymintákban. Az ADP és adenzin mennyiségére nem volt hatással a MIA. Az adatokon Mann-Whitney nem-parametrikus összehasonlítást végeztünk.  $^{***}p < 0,001$   $n = 21-31$

A monoaminok közül a noradrendalint, a dopamint, a szerotonint, illetve ezek metabolitjait vizsgáltuk. Eredményeink alapján a poli(I:C) injekció nem befolyásolja a monoaminok mennyiségét a vemhes nőstények vérében, nem találtunk különbséget a kontroll csoporthoz képest (33. ábra).

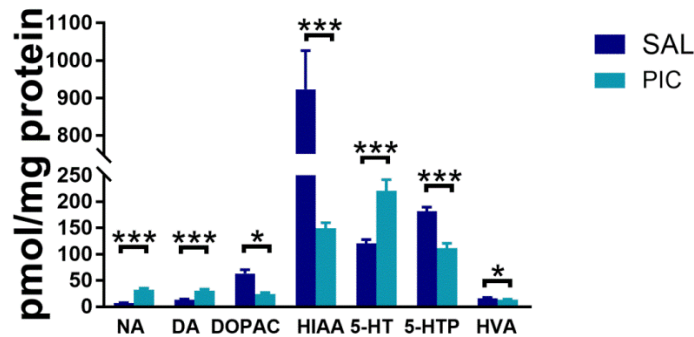


33. ábra. **Monoaminok mennyisége az anyai vérplazmában.** Egyik analit vagy metabolit koncentrációja sem változott a poli(I:C) injekció után a vemhes nőstények vérében. NA:



noradrenalin, DA: dopamin, DOPAC: dihidroxifenilecetsav, HIAA: hidroxi-indolecetsav, 5-HT: szerotonin, 5-HTP: 5-hidroxitriptofán. Az adatokon Mann-Whitney nem-parametrikus összehasonlítást végeztünk. n=5-6

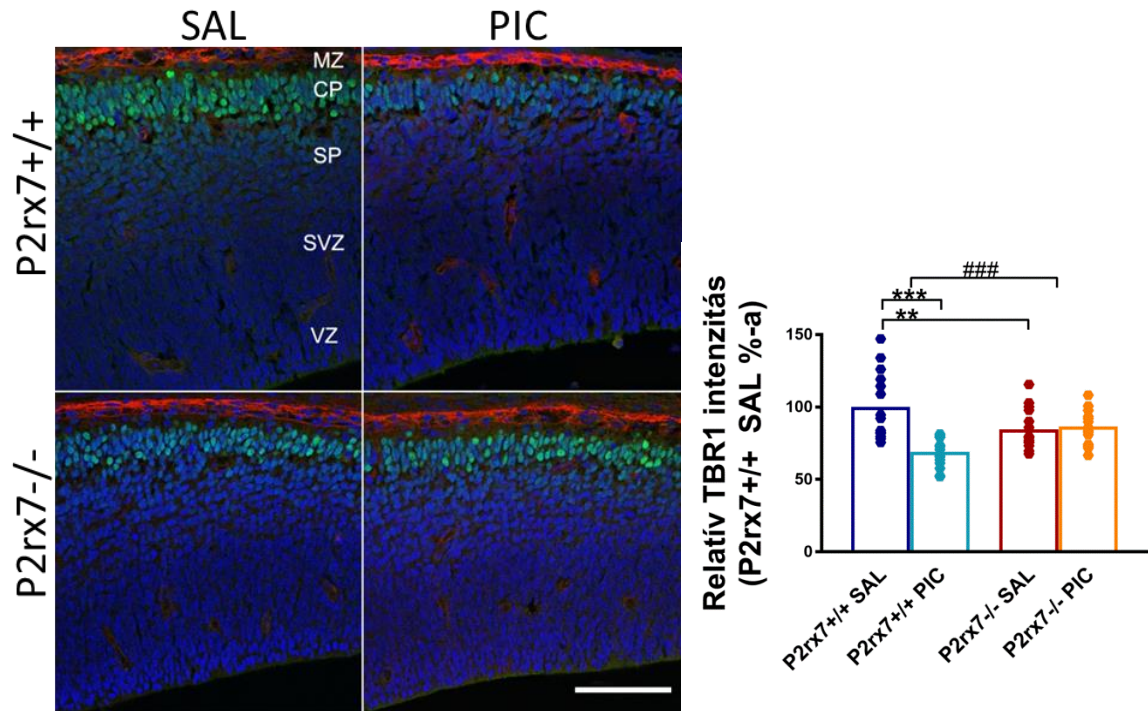
Ezzel ellentétben az embriók agyában (34. ábra) minden vizsgált monoamin és metabolit szintjében változást tapasztaltunk. A noradrenalin, dopamin és szerotonin koncentrációk mind szignifikánsan magasabbak lettek az anyai immunrendszer aktiválását követően, miközben a metabolitjaik mennyisége lecsökkent.



**34. ábra. Embrió agyak monoamin tartalma.** A noradrenalin, dopamin és szerotonin mennyisége is szignifikánsan megnőtt a poli(I:C)-t kapott anyák utódainak agyában, ezzel egy időben a metabolitok mennyisége pedig lecsökkent. Az y tengely két részre osztott az adatok szemléletesebb prezentálása érdekében. NA: noradrenalin, DA: dopamin, DOPAC: dihidroxifenilecetsav, HIAA: hidroxi-indolecetsav, 5-HT: szerotonin, 5-HTP: 5-hidroxitriptofán, HVA: homovanillinsav. Az adatokon Mann-Whitney nem-parametrikus összehasonlítást végeztünk. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  n=21-31

#### 5.2.6. Embriónális agykéreg fejlődési zavara

Az autizmus kialakulásában fontos szerepet játszik a prenatális idegrendszer fejlődésében bekövetkező zavar. 48 órával a poli(I:C) injekciót követően megvizsgáltuk az embrionális agykéreg morfológiáját. SATB2 és TBR1 markerekkel jelöltük az egyes kortikális rétegeket, és a TBR1 festés intenzitásában poli(I:C) függő különbséget találtunk (35. ábra). Míg a  $P2rx7^{+/+}$  egereknél a fejlődő kortikális lemezben a TBR1 mennyisége szignifikánsan lecsökkent, a  $P2rx7^{-/-}$  csoportoknál a kezeléstől függetlenül egyenletes intenzitást tapasztaltunk.

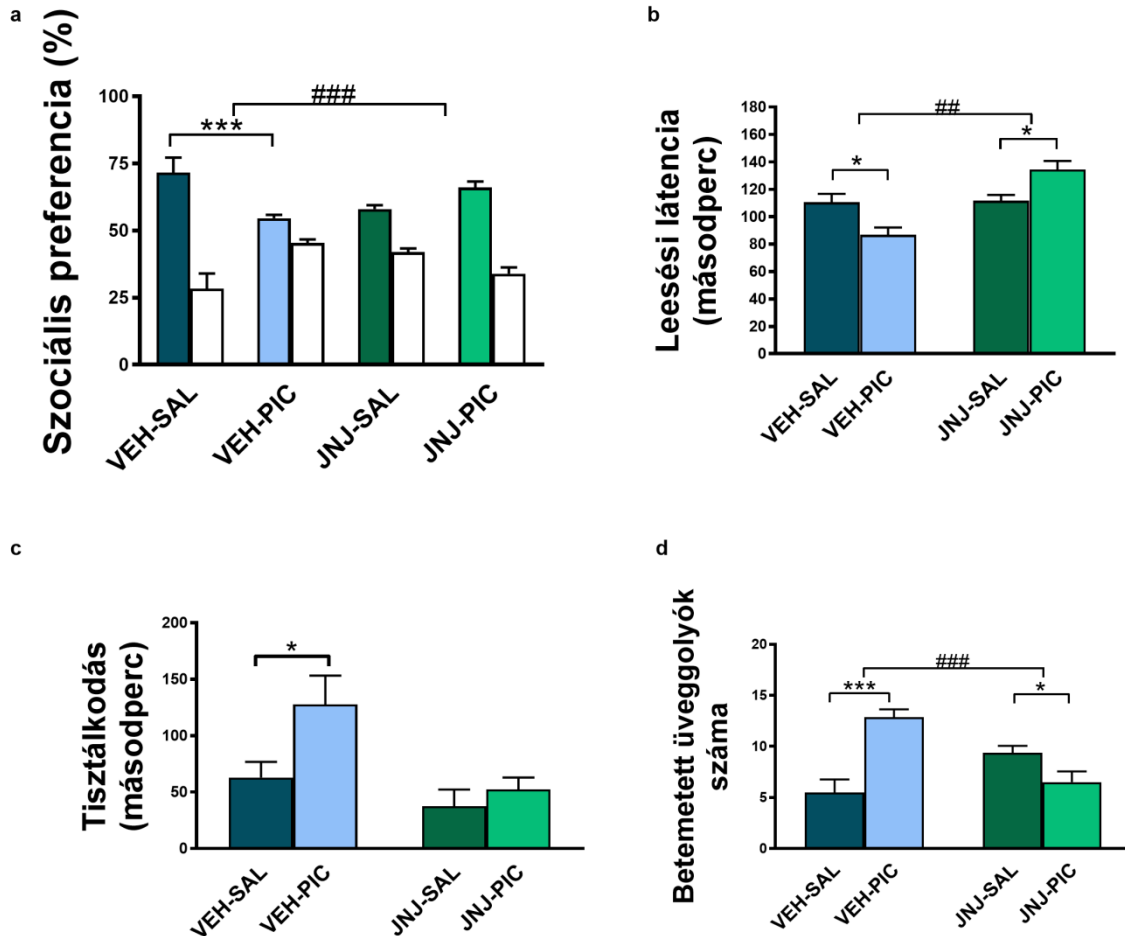


35. ábra. **Fejlődő agykéreg rétegződése.** Pirossal a SATB2 (felső sejtréteg progenitor sejtjeiben kifejeződő marker), zölddel a TBR1 (kortikális lemez projekciós neuronjaira specifikus marker), késsel a sejtmagfestés látható. MZ: marginális zóna, CP: kortikális lemez, SP: lemez alatti réteg, SVZ: szubventrikuláris zóna, VZ: ventrikuláris zóna. A felvételek 20x-os nagyításon készültek, a skála 100  $\mu$ m-t jelöl. P2rx7<sup>+/+</sup> egerek esetében a TBR1 immunfestés intenzitása szignifikánsan lecsökkent a poli(I:C) hatására, azonban a P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél nem okozott változást a kezelés [F(1,56)=16,578, ###p<0,001]. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 n=3

#### 5.2.7. Prenatális előkezelés P2X7 antagonistával

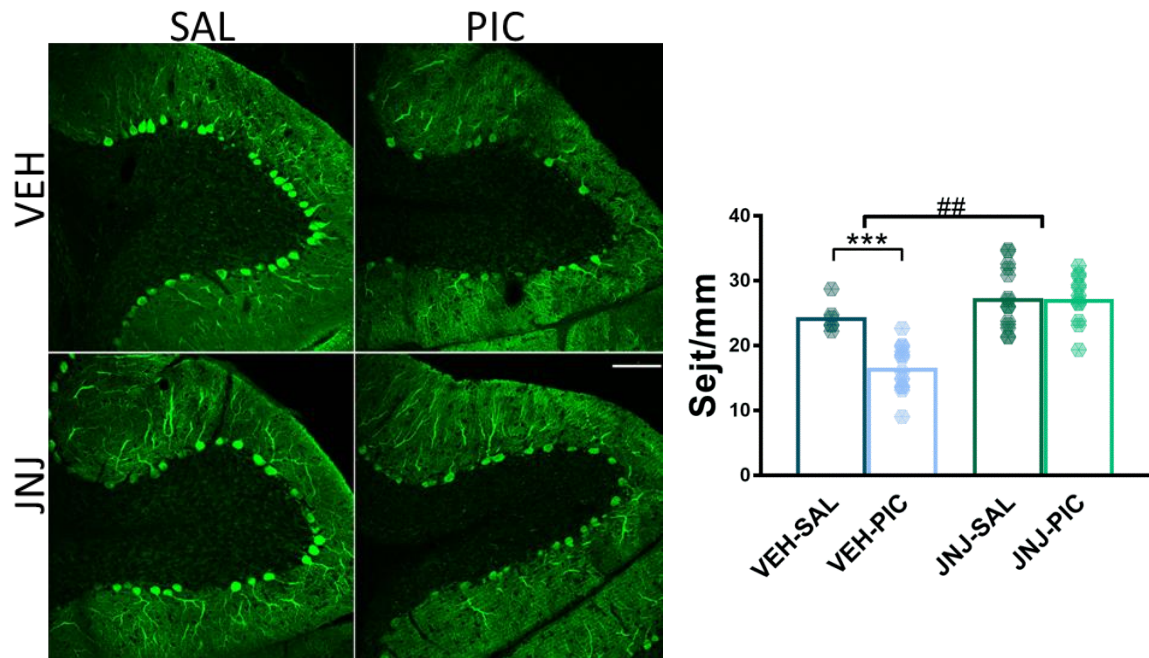
Az eddigi kísérleti felállásban bemutattuk, hogy a MIA modellben megfigyelhető viselkedésbeli és morfológiai jellemzők P2X7 receptor hiányos állatokban nem alakulnak ki. A következő kísérletsorozattal arra kerestük a választ, hogy ha az immunaktivációt megelőzően gátoljuk le a P2X7 receptor működését vad típusú állatokban, akkor az kivédi-e az autisztikus fenotípus megjelenését. A vemhes nőstényeket P2X7 szelektív JNJ47965567 (JNJ) antagonistával kezeltük, egyszeri 30 mg/kg dózisban, 2 órával a poli(I:C) injekciót megelőzően. Ez az előkezelés elegendő volt a poli(I:C) kezelés hatásának blokkolásához. A viselkedéstesztokban nem alakult ki szociális deficit (36/a.

ábra), nem tapasztaltunk fokozott repetitív viselkedést (36/c-d. ábra), és az egerek mozgáskoordinációja is zavartalan volt (36/b. ábra).



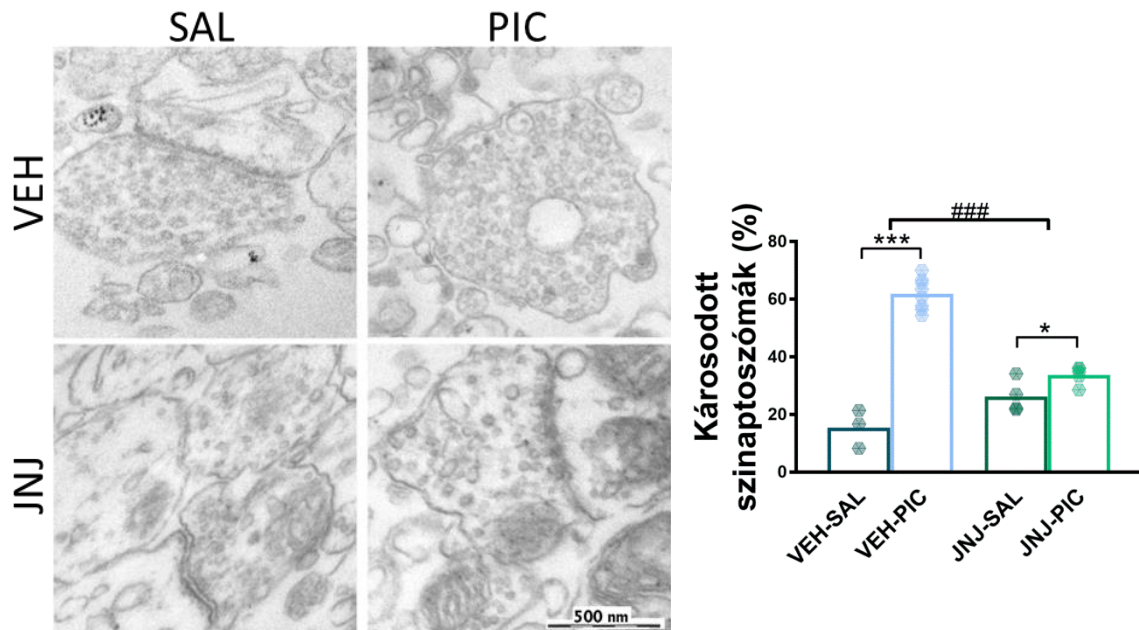
**36. ábra. JNJ előkezelés kivédi a poli(I:C) hatását a viselkedéstesztben.** A) Kimutatható volt a szociális preferencia, B) a mozgáskoordináció problémamentes volt, és C-D) a repetitív viselkedések sem voltak kifejezettek. Az előkezelés és a poli(I:C) hatás interakciója szignifikáns volt a szociabilitás [ $F(1,28)=15,4$ ,  $###p<0,001$ ], a rotarod [ $F(1,28)=10,245$ ,  $##p<0,01$ ] és az üveggolyó ásás [ $F(1,28)=27,917$ ,  $###p<0,001$ ] tesztben is. \* $p<0,05$  \*\*\* $p<0,001$   $n=8$

Ha az anyákat az immunaktiválás előtt JNJ antagonistával kezeltük, a poli(I:C) injekció nem tudta kifejteni hatását az utódok kisagyi Purkinje sejtjeire sem (37. ábra). A vivőanyaggal előkezel, majd poli(I:C)-t kapó nőstények utódainak kisagyában továbbra is megfigyelhető volt a Purkinje sejtvesztés.



37. ábra. A kisgyi Purkinje sejtek száma nem változik az anyai P2X7 receptorok blokkolásakor. JNJ előkezeléssel sikerült kivédeni a Purkinje sejtek pusztulását a vad típusú poli(I:C) kezelést kapott nőstények utódaiban. A vivőanyag nem befolyásolta a MIA hatását, visszakaptuk az alacsonyabb sejt sűrűséget. A különböző előkezelés hatással volt az immunaktiválásra [ $F(1,45)=10,538$ ,  $##p<0,01$ ]. A bemutatott képek 20x-os nagyításon készültek, a skála 100  $\mu\text{m}$ .  $***p<0,001$   $n=3$

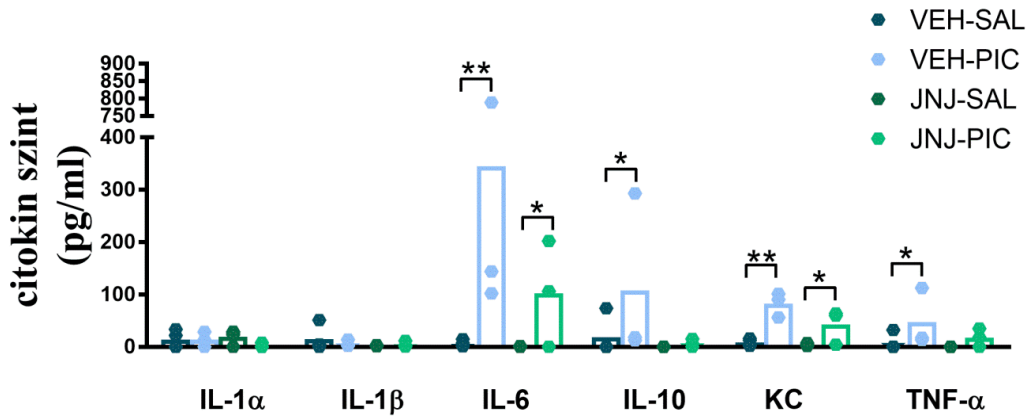
Az antagonista+poli(I:C) csoport szinaptoszóma preparátumaiban a normális szinaptoszómák aránya megmaradt a kontroll, captisol+só kezelést kapott utódok mintáiban tapasztaltaknak (38. ábra).



38. ábra. **Károsodott szinaptoszómák aránya JNJ előkezelés után.** A P2X7 receptor szelektív blokkolásakor a poli(I:C) injekciónak alig volt hatása a szinaptoszómák szerkezetére. A VEH+PIC kezelési csoportban visszakaptuk az első kísérletben kapott magas arányú károsodást, így a kezelések interakciója szignifikáns volt [F(1,16)=61,075, ###p<0,00001]. Az elektronmikroszkópos felvételek 30000x nagyításon készültek, a mércé 500 nm. \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 n=3-8

Az utódokban kapott eredmények alapján feltételeztük, hogy P2X7 antagonistával előkezeléssel megakadályozható a poli(I:C) által indukált anyai immunaktiváció, és az azt követő magzati fejlődési rendellenességek. Ezért a JNJ előkezelést követően megismételtük a multiplex citokin mérést, és az embrionális agykéreg immunhisztokémiai vizsgálatát.

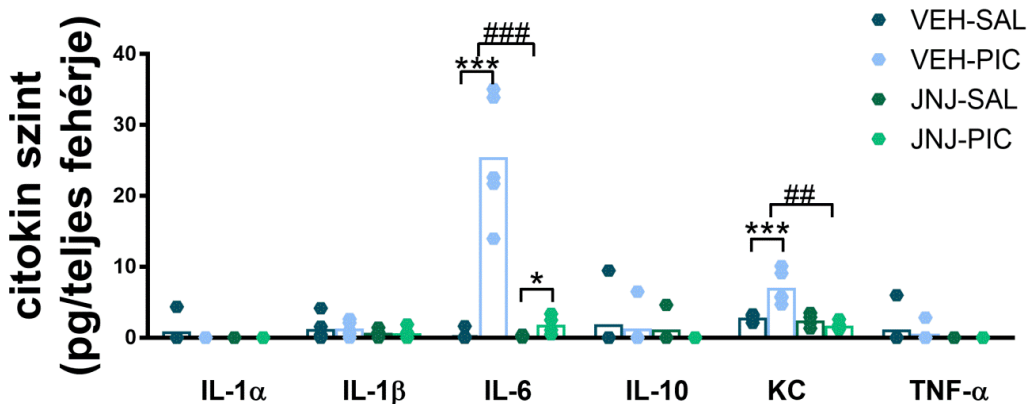
Az anyai vérplazmában (39. ábra) IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  indukciót nem tapasztaltunk, a mért értékek a detekciós limit közelében maradtak. A poli(I:C) hatására erőteljesen aktivált IL-6 sokkal alacsonyabb mértékben indukálódott, ha JNJ-vel előkezeljük a nőstényeket. Ezen kívül az IL-10 és a TNF- $\alpha$  emelkedését kivédte a megelőző antagonistával való kezelés, egyedül a KC esetében tapasztaltunk szignifikáns mennyiségbeli növekedést mind a vivőanyag+poli(I:C), mind a JNJ+poli(I:C) kezelési csoportoknál.



**39. ábra. JNJ előkezelés hatása a vérplazma citokin tartalmára vad típusú állatokban.**

A VEH-PIC kezelési csoportban jelentősen indukálódott az IL-6, IL-10, a KC és a TNF- $\alpha$  az előző kísérletben tapasztaltakhoz hasonlóan. Ha szelektíven blokkoltuk a P2X7 receptorokat, a poli(I:C) injekciónak csökkent az immunmediátorokra kifejtett hatása, kizárólag az IL-6 és a KC esetében tapasztaltunk továbbra is szignifikánsan magasabb citokin koncentrációt. Ezek az értékek hasonlóak a P2rx7 hiányos állatokban mértékekhez. Az y tengely két részre osztott az adatok szemléletesebb prezentálása érdekében. A statisztikai elemzést logaritmikusan transzformált adatokon végeztük, a grafikonon az eredeti adatokat mutatjuk be. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$   $n = 3-4$

A magzati agyban (40. ábra) az alapkísérletekhez hasonlóan a vivőanyag+poli(I:C) csoportokban indukálódott az IL-6 és a KC, azonban ezt a szignifikáns emelkedést csak a KC esetében sikerült teljes mértékben megelőzni a JNJ adásával, az IL-6 szintjében a szignifikanciát még elérő változást találtunk az előkezelést követően is.

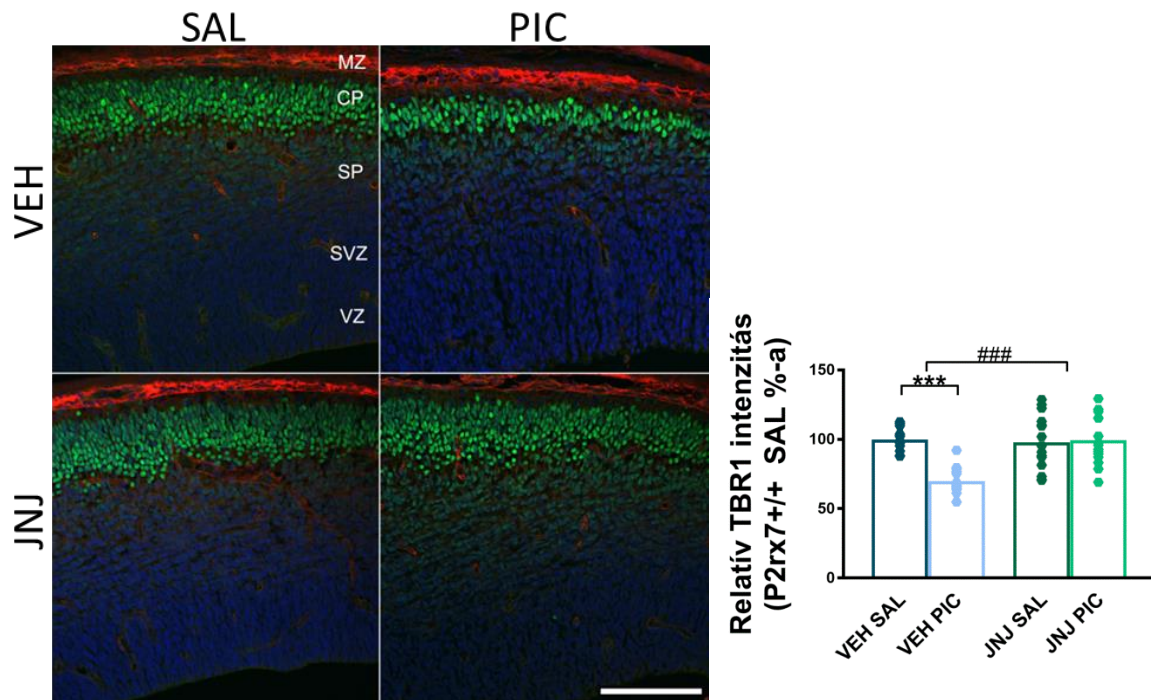


**40. ábra. Citokinek mennyisége az embrionális agyban JNJ előkezelést követően. A poli(I:C) injekció után megnövekedett az IL-6 és a KC koncentrációja az embriók agyában**



is, azonban a JNJ előkezelés, hasonlóan a genetikai blokkoláshoz, kivédte ezt a hatást [IL-6 F(1,14)=37,98, ###p<0,00001; KC F(1,14)=17,126, ##p<0,01]. A statisztikai elemzést logaritmikusan transzformált adatokon végeztük, a grafikonon az eredeti adatokat mutatjuk be. A többi vizsgált citokin mennyiségében nem tapasztaltunk változást. \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 n=4-5

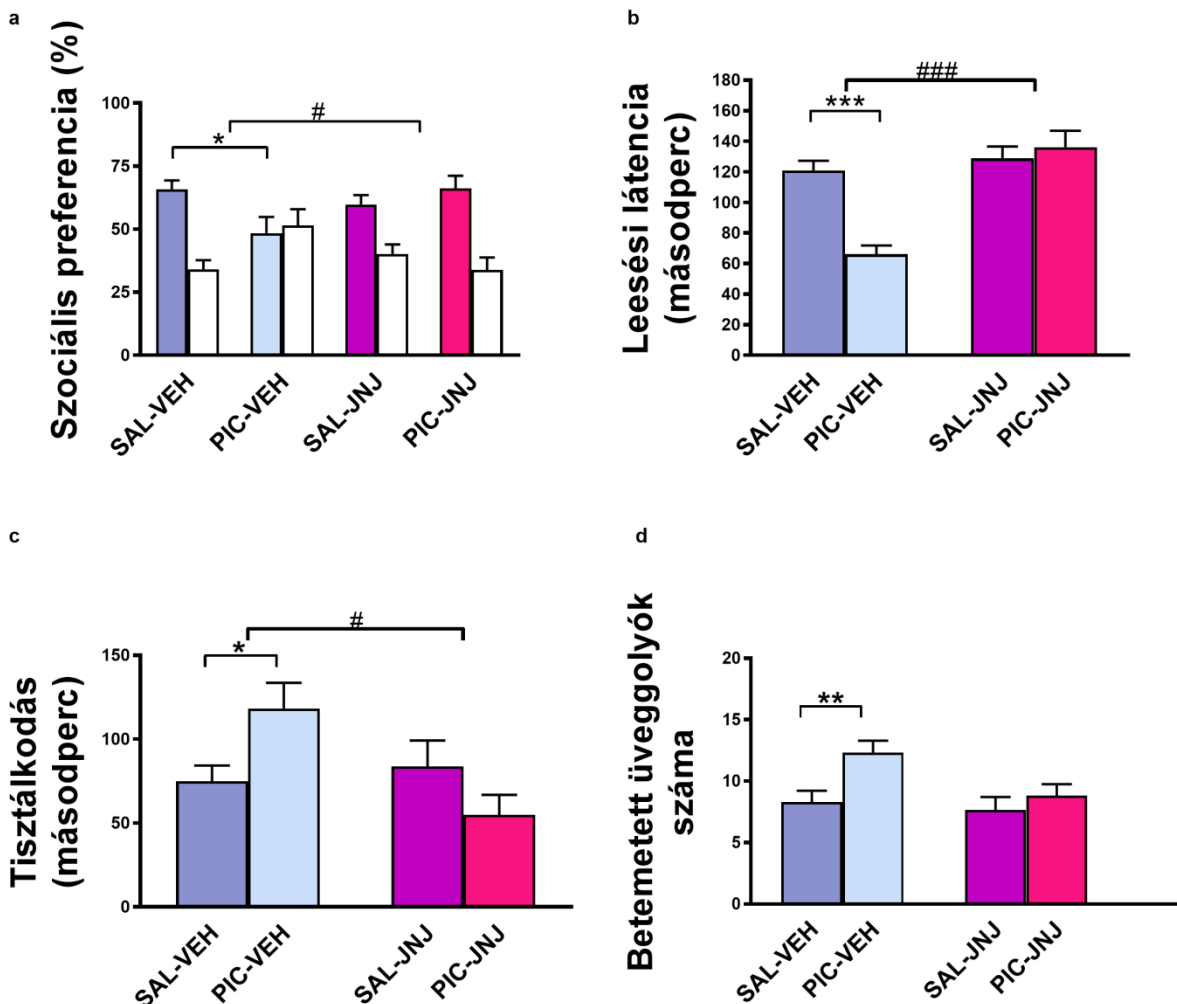
Ebben a kísérleti felállásban is megvizsgáltuk a magzati agyban a kortikális markerek kifejeződését. Az antagonista előkezelés kivédte a poli(IC) okozta fejlődési zavarokat, nem találtunk különbséget a kortikális lemez TBR1 jelölésében (41. ábra). Eközben a vivőanyaggal előkezelt állatoknál visszakaptuk a poli(I:C) hatására fellépő TBR1 csökkenést.



**41. ábra. P2X7 receptor farmakológiai blokkolása kivédi a poli(I:C) hatását fejlődő agykéregben.** A receptor genetikai gátlásakor bemutatott védő hatás szelektív antagonista kezeléssel is elérhető, nem csökkent a TBR1 jelölt progenitor sejtek mennyisége a kérgi lemezben a JNJ-PIC kezelést kapott nőtények utódaiban. Pirossal a SATB2 (felső sejtréteg progenitor sejtjeiben kifejeződő marker), zölddel a TBR1 (kortikális lemez projekciós neuronjaira specifikus marker), kézzel a sejtmagfestés látható. MZ: marginális zóna, CP: kortikális lemez, SP: lemez alatti réteg, SVZ: szubventrikuláris zóna, VZ: ventrikuláris zóna. A felvételek 20x-os nagyításon készültek, a skála 100  $\mu$ m-t jelöl. A két kezelés interakciója szignifikánsnak bizonyult [F(1,56)=17,348, ###p<0,001]. \*\*\*p<0,001 n=3

## 5.2.8. Posztnatális utódkezelés P2X7 antagonistával

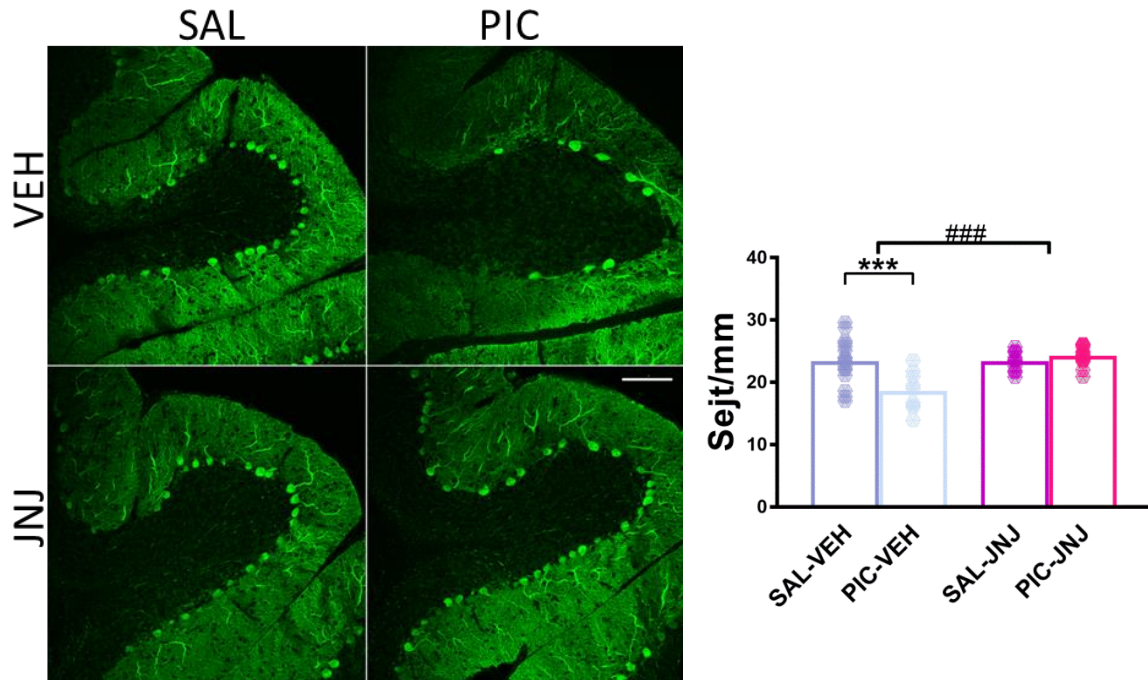
A poli(I:C) injekciót megelőző antagonistá kezeléssel a MIA modellben előidézett összes változást ki tudtuk védeni. A megelőzés azonban nem mindig lehetséges, ezért legalább olyan fontos, hogy az utódok kezelésével is megszűnjenek a rendellenességek. Kipróbáltuk a P2X7 receptor posztnatális farmakológiai gátlását az anyai immunaktivációt követően. A felnőtt egerek egyszeri JNJ47965567 injekciót kaptak a szociabilitás tesztet megelőzően, majd ezután alávetettük őket az összes vizsgálatnak. Érdekes módon az előkezelésekhez hasonló eredményeket kaptunk minden kísérletben. Megfigyelhető volt a szociális preferencia (42/a. ábra), a kontrollal megegyező ideig tisztálkodtak (42/c. ábra), ugyanannyi üveggolyót temettek be az alomba (42/d. ábra), és nem tapasztaltunk egyensúlybeli problémákat sem (42/b. ábra).





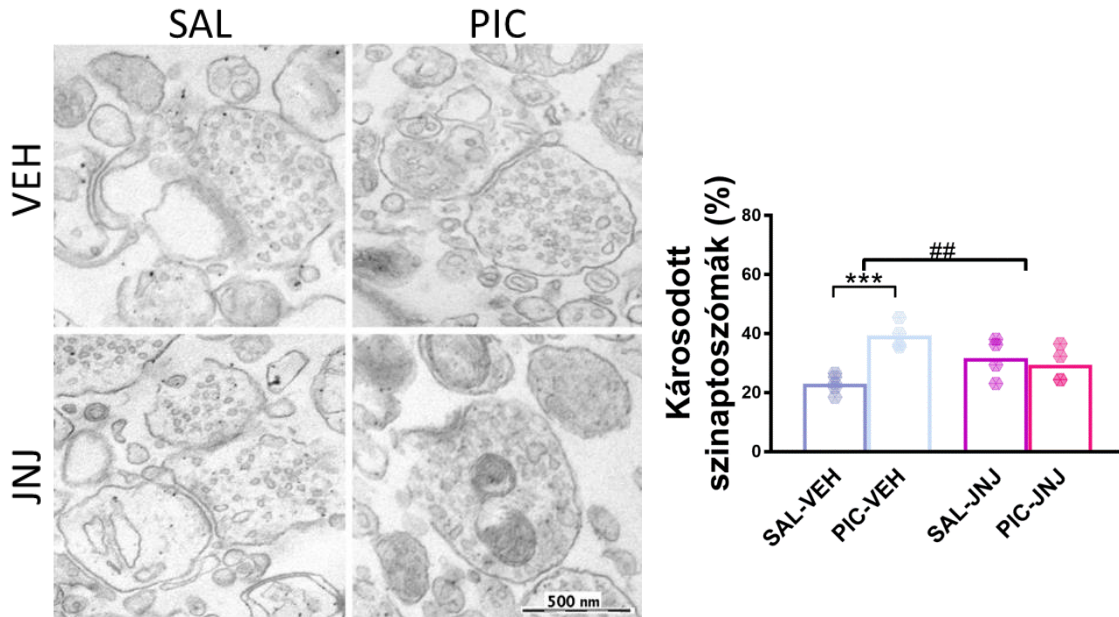
42. ábra. **Egyszeri JNJ kezelés hatása felnőtt utódok viselkedésére.** Az antagonistá adásával sikeresen visszafordíthatóak voltak a poli(I:C) kezelésből fakadó autisztikus eltérések, A) mind a szociabilitás vizsgálatokor B) mind a rotarod tesztben és C-D) a repetitív viselkedések esetében is. A kezelések interakciója szignifikáns volt a szociális preferencia [ $F(1,27)=5,4312$ ,  $\#p<0,05$ ], a rotarod [ $F(1,28)=15,517$ ,  $###p<0,001$ ], és a repetitív tisztálkodás [ $F(1,28)=7,0950$ ,  $\#p<0,05$ ] esetén. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  n=6-17

A legérdekesebb eredményt a kisgyei Purkinje sejtek vizsgálatokor kaptuk, mivel a poli(I:C) által kiváltott sejtszám csökkenés a későbbi JNJ kezelés hatására normalizálódott (43. ábra).



43. ábra. **JNJ kezelés normalizálja a kisgyei Purkinje sejtek számát felnőtt egerekben.**  $P2rx7^{+/+}$  utódokban egyszeri antagonistá blokkolással visszaáll a Purkinje sejtek mennyisége a só kontrollban mért állapotra. A reprezentatív képek 20x-os nagyításon készültek, a skála 100  $\mu$ m. Anyai és utód kezelés interakciója szignifikánsnak bizonyult [ $F(1,45)=12,710$ ,  $###p<0,001$ ]. \*\*\* $p<0,001$  n=3

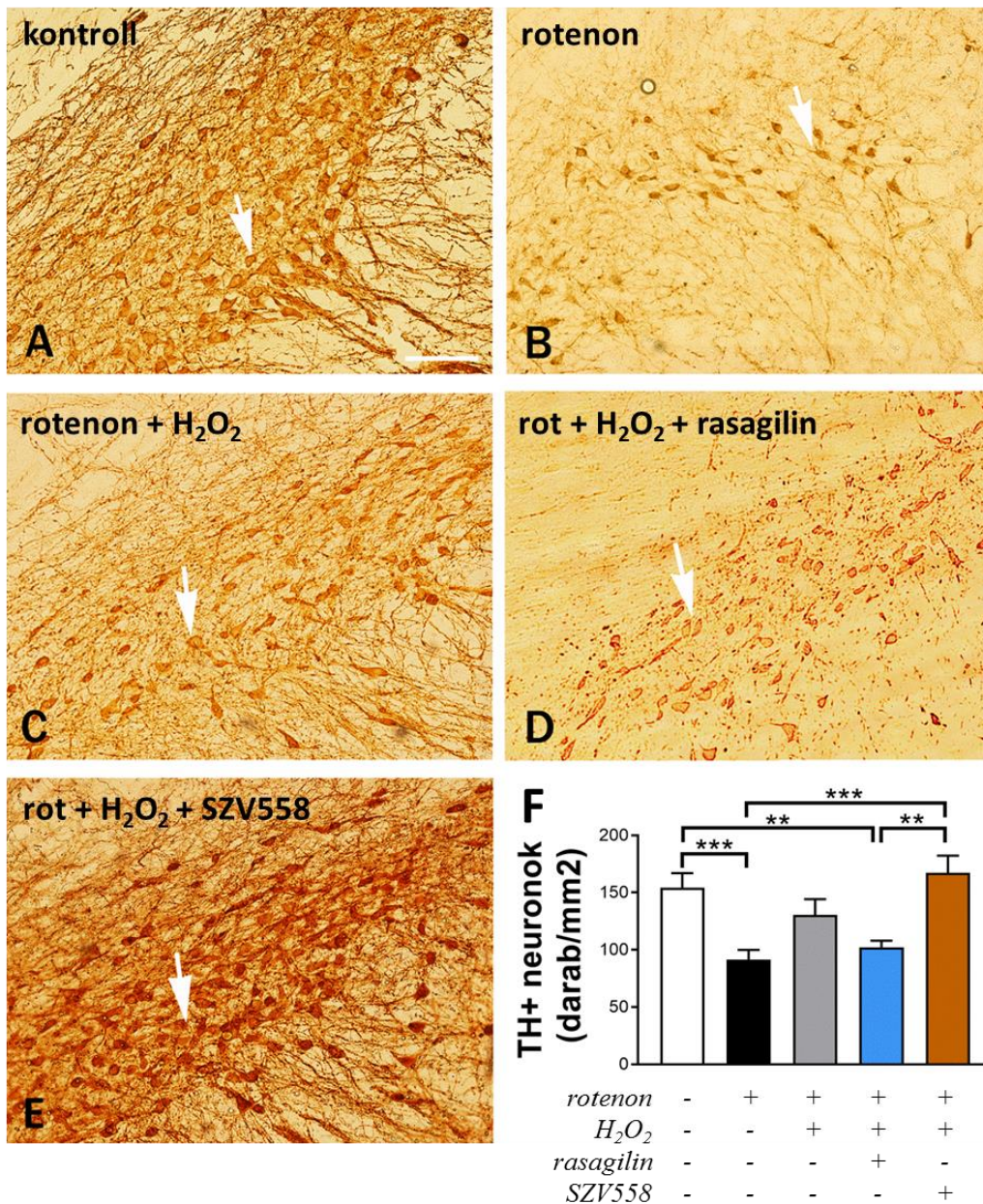
Végül szinaptoszóma preparátumokat is készítettünk, és azt tapasztaltuk, hogy az utódok JNJ kezelését követően nem emelkedett meg a poli(I:C) hatására a károsodott szinaptoszómák aránya (44. ábra).



44. ábra. **Utódok antagonista kezelésekor mért abnormális szinaptoszómák aránya.** JNJ injekció után egyforma mértékben találtunk károsodott szinaptoszómákat a só vagy poli(I:C) kezelést kapott nőstények utódaiban, vagyis egyszeri antagonista adásával elfedhető volt az immunaktiváció hatása a szinaptoszómák morfológiájára. A vivőanyag injekció után továbbra is magasabb százalékban találtunk károsodott szinaptoszómákat a PIC anyai kezelés esetében. Tehát az utódok kezelése különbözően hatott az anyai immunaktivációra [F(1,13)=13,24, ##p<0,01]. Elektronmikroszkópos képek 30000x nagyításon készültek, a mérce 500 nm. \*\*\*p<0,001 n=4-5

### 5.3. SZV558 protektív hatása rotenon-indukálta *in vitro* Parkinson modellben

Patkány szubsztancia nigra tartalmazó szöveti blokkban sejtpusztulást indukáltunk *in vitro* rotenon kezeléssel. Jól láthatóan a dopaminerg sejtek mintegy 40%-a eltűnt a rotenon hatására (45/b. ábra). A sejtpusztulás kivédéséhez rasagilinnel, illetve egy újonnan szintetizált MAO-B gátló hatású vegyülettel, az SZV558-cal kezeltük az agymintákat a rotenonos inkubálást követően. A rasagilin kezelés nem volt hatásos a kísérletben, a tirozin-hidroxiláz pozitív sejtek nagy mértékben károsodtak (45/d. ábra). Azonban az SZV558 vegyület teljesen kivédte a rotenon hatását, a kontroll csoporthoz képest egyáltalán nem alakult ki sejtpusztulás (45/e. ábra).



45. ábra. **Tirozinhidroxiláz pozitív sejtek a szubsztancia nigrában.** Reprezentatív képek az egyes kezelési csoportok szubsztancia nigrájáról, 20x-os nagyításon. A mérce 100  $\mu$ m-t jelöl. A nyilak tirozinhidroxiláz pozitív neuronokat mutatnak. A) Kontroll minták neuronjaihoz képest B) jelentős sejtpusztulás látható rotenon kezelést követően, mely hatás C) rotenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adásakor is megmaradt, bár mérséklődött. D) Jelenleg MAO-B gátlóként alkalmazott rasagilin adásával nem sikerült megelőzni a sejtvészést, azonban a szintén MAO-B gátló SZV558 vegyület E) sikeresen kivédte a rotenon toxikus hatását, a kontroll állapothoz F) hasonló mennyiségben volt jelen a tirozin-hidroxiláz antitest a dopaminerg neuronokban. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$   $n = 4-5$



## 6. Megbeszélés

Kutatócsoportunk évek óta tanulmányozza a purinerg jelátvitel, és azon belül a P2X7 receptor változatos szerepét. Legújabb eredményeinkkel összefüggést találtunk a receptor aktív működése, valamint egyes központi idegrendszert érintő betegségek kialakulása között. Elsőként a depresszió elismert állatmodelljében, a tanult tehetetlenség kiváltásával vizsgáltuk a P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> egerek viselkedési és morfológiai változásait. Következő kísérletsorozatunkban az anyai immunaktivációs modellel az autizmus spektrumzavarhoz hasonló állapotot idéztünk elő vad típusú és géniüjtött egerekben, és a P2X7 receptor antagonistá kezelést vizsgáltuk a jellemző tünetekre. Dolgozatomban harmadik részében nem purinokkal kapcsolatos kísérleteket végeztem. Immunhisztokémiai összehasonlítással igazoltuk egy új heteroarilalkenil-propargilamin vegyület protektív hatását a Parkinson-kór *in vitro* rotenonos állatmodelljében.

### 6.1. Depresszió modell

A depresszió az utóbbi évtizedek egyre jelentősebb pszichiátriai problémája, a betegséget kiváltó háttérmechanizmusokat mégsem ismerjük pontosan, és a terápiában alkalmazott gyógyszerek sem nyújtanak segítséget mindenkinek. A depresszió monoamin-elmélete régóta ismert, többnyire a jelenleg elérhető kezelések is a noradrenalin és a szerotonin rendszerek zavart működését próbálják helyreállítani. Mivel a mostani antidepresszánsok nem jelentenek tökéletes megoldást, hatékonyságuk nem kielégítő és sokszor mellékhatásuk sem elhanyagolható, számos kutatás célja új gyógyszer-célpontok megtalálása. Különböző vizsgálatok során felmerült a gyulladást keltő citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )<sup>155-157</sup> a BDNF<sup>158</sup>, a CREB és a dinorfin<sup>159,160</sup>, de még az omega-3 zsírsavak<sup>161</sup>, valamint a melatonin<sup>162,163</sup> esetleges szerepe is a betegségben, illetve major depresszióban szenvedő pácienseknél megfigyelhetők neuroplaszticitásbeli változások az agykéregben<sup>76</sup> és a hippokampuszban is<sup>77</sup>. A depresszió kialakulásának hátterében valószínűleg ezeknek a különféle útvonalak az összetett hatása állhat. Az utóbbi évtizedben a purinerg P2X7 receptort is intenzíven tanulmányozzák preklinikai depresszió modellekben<sup>34-37,88,164-166</sup>.

Dolgozatomban a P2rx7 hiányos egerek antidepresszáns-fenotípusát több módszerrel is megerősítettük. Különböző állatkísérletes modellekben bemutatták már ezt a fenotípust, illetve P2X7 antagonistá adásával is reprodukálták a receptor blokkolásának védő hatását<sup>33-37</sup>, melyet most a tanult tehetetlenség modellben is igazolni tudunk. A viselkedés mellett vizsgáltuk a modellben jelentkező hippokampális szinaptikus plaszticitás-beli változásokat. P2rx7<sup>+/+</sup> egerekben a tanult tehetetlenséget követően alacsonyabb tüskeszínapszis sűrűséget találtunk a gyrus dentatusban, megerősítve a korábbi irodalmi eredményeket<sup>60</sup>. Ebben a publikációban a hippokampusz CA1 és CA3 régiójában is leírták a szinaptikus változásokat, bár utóbbi régió kevésbé volt érzékeny a stresszre. Érdekes eredmény, hogy a naiv P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél mért tüskeszínapszishoz képest nem csak a sokkolt egerekben találtunk csökkenést, hanem kisebb mértékben a kontroll egereknél is. Ez betudható a stressznek, amit a tanult tehetetlenség tesztelése okozott, hiszen ez a kontroll állatoknál is sokkolással történt. Hajszán és munkatársai<sup>60</sup> nem írnak a naiv állatokban meglévő tüskeszínapszis állapotokról, ezért nem vethető össze az általunk kapott naiv adatok irodalmi eredményekkel. A tüskeszínapszisok mennyisége egy jól mérhető változó, amivel igazolni lehet a depressziós állapot fennállását. Az azonban egyelőre még nem eldöntött kérdés, hogy ezek az elváltozások eredményezik a dendrittüskék csökkenő számát, vagy éppen a tüskék pusztulása a kiváltó ok. Megvizsgáltuk a szemcsesejtek kvantitatív különbségeit is, mivel az általunk vizsgált dendrittüskék ezeknek a sejteknek a proximális dendritjein található. Azonban úgy tűnik, hogy a tanult tehetetlenség modell nem volt hatással a szemcsesejtekre, a tüskeszínapszisok alacsonyabb sűrűsége nem sejtpusztulás következtében jelentkezett.

PCR méréssel a P2rx7 mRNS downregulációját találtuk a tanult tehetetlenség kialakulását követően. A mi eredményeinkhez hasonlóan krónikus stressz modellben alacsony P2rx7 immunjelölést írtak le a hippokampuszban<sup>167</sup>, valamint egy másik kutatócsoport ugyanezt a modellt vizsgálva emelkedett extracelluláris ATP szintet mért *in vivo* az agyban<sup>33</sup>. Ezek alapján feltételezhető, hogy a depresszió-szerű állapot létrejöttében szerepe lehet a purinerg neurotranszmisszióknak, azon belül is a P2X7 receptornak. A mi kísérleteinkben a P2rx7<sup>-/-</sup>

egerek ellenálltak a tanult tehetetlenségnek, ami szintén arra enged következtetni, hogy a P2X7 receptor részt vesz az állapot kialakulásában.

Fontos megjegyezni, hogy sokkal magasabb volt a sikertelen próbák száma és menekülési látencia értékek a gényiütött kontroll egereknél a vad típusú társaikhoz képest. Más kísérletekben is megfigyeltük, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél az alap kontroll értékek eltérnek a P2rx7<sup>+/+</sup> kontroll csoporttól, ami nagy valószínűséggel a gényiütés következtében fellépő kompenzációs mechanizmusok miatt alakulhat ki. P2rx7<sup>-/-</sup> egereknél különböző stresszmodellekben megtalálható ez a nagyobb mértékű rezisztencia a külső stresszorokkal szemben, mint pl. restraint stressz modellben<sup>36,168</sup>, petefészkek eltávolítását követően<sup>169</sup>, vagy pszichológiai stressz során<sup>33</sup>. Ez a védő fenotípus azonban nem jelent teljes érzéketlenséget a stresszre, amit egy egyszerű kísérlettel tudtunk igazolni. A tanult tehetetlenség tesztelésekor megemeltük a sokkolás áramerősségét 0,15 mA-ról 0,2 mA-re, ami ugyan 33%-os növekedés, de még mindig nem okoz fájdalmat az állatnak. Mind a P2rx7<sup>-/-</sup> kontroll, mind a sokkolt csoportban azonnal reagáltak az áramütésekre az állatok, szinte minden próbát aktív meneküléssel zártak. A kísérlettel igazoltuk, hogy a P2rx7 hiányában nem alakul ki a tanult tehetetlenség, és az egerek képesek a stresszválásra. P2rx7<sup>+/+</sup> egereknél a tehetetlen állapot együtt járt a tüskeszinapszisok eltűnésével, közvetlenül kifejezve a depresszió-szerű állapot negatív hatását a szinaptikus plaszticitásra.

Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk szinaptikus proteinek mennyiségi változását a viselkedéstesztet követő 6. és 24. órában, melyek szintjében csak a vad típusú egereknél tapasztaltunk különbséget. A szinaptopodin fehérje jellemzően az aktívan működő principális neuronok tüskéin fordul elő, lényeges szerepe van a tüskeapparátus kialakulásában<sup>170</sup>, ezáltal a idegsejtek plasztikus átrendeződésében vesz részt<sup>171</sup>. A dendrittüskék különálló kompartmentként funkcionálnak, a beérkező serkentő információt megsűrűrik és modulálják, ezáltal védik a neuront a túlzott gerjesztéstől<sup>82,83</sup>. A tanult tehetetlenséget kiváltó sokkolás zavart okozott a szinaptikus jelátvitelben, amit az aktív neuronok dendrittüskéire jellemző szinaptopodin fehérje lecsökkent mennyisége is alátámaszt. Mivel a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek rezisztensebbek a külső stresszorokra, a sokkolás nem csak a viselkedésre nem volt hatással, hanem az agyi morfológiában sem okozott eltérést. A

poszt-szinaptikus denzitásokban található PSD95 fehérje sokkal általánosabb elterjedésű, a tanult tehetetlenség modellben nem tapasztaltuk kvantitatív változását.

A depresszió patogenezisét összefüggésbe hozták a glutamáterg neurotranszmisszió zavarával betegeknél<sup>49,172,173</sup> és preklinikai tanulmányokban egyaránt<sup>174,175</sup>. Munkacsoportunk korábbi publikációiban ismertette, hogy a P2X7 receptor aktivációja glutamát ürülést vált ki hippocampusz szeletekben, amit BDNF csökkenéshez vezet<sup>8,176</sup>, és ez a folyamat bizonyos NMDA alegységek blokkolására érzékenyen reagál. Ebből arra következtethetünk, hogy a P2X7 aktiváció az NR2B/GluN2B alegységeken keresztül szabályozza a BDNF termelődését a hippocampuszban, ami befolyásolja az idegsejtek plaszticitását, a neurogenézist<sup>37</sup> és a tüskeszínapszisok sűrűségét<sup>88</sup>. Az NR2B/GluN2B receptor alegységek részt vesznek a depressziós állapot kialakulásában, ketaminnal antidepresszáns hatást mutattak ki többen is<sup>51,177,178</sup>. Emellett ha a principális neuronokból hiányzik a NR2B/GluN2B alegység, az szintén antidepresszáns fenotípushoz vezethet<sup>177</sup>. MRNS szinten, valamint immunfestéssel is kimutattuk, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> egerekben magasabb az NR2B/GluN2B alegység expressziója<sup>37</sup>, és ezt az eredményt megerősítettük a dolgozatomban bemutatott immunreakcióval<sup>88</sup>. Valószínűleg itt is a génkiütés miatt fellépő kompenzációs mechanizmus állhat a génkiütött kontrolloknál kapott megnövekedett expresszió mögött. A tanult tehetetlenség során alkalmazott elkerülhetetlen áramütések azonban nem befolyásolták az alegység mennyiségét a hippocampuszban, így ez a modell nem adott lehetőséget a glutamáterg neurotranszmisszió depresszióban betöltött szerepének további vizsgálatára.

## 6.2. Autizmus modell

Autizmus spektrumzavarban az idegrendszer rendellenes fejlődésének következtében kialakuló állapotra jellemzőek a kommunikációs és szociális problémák, valamint repetitív viselkedéselemek<sup>179</sup>. Más betegségekhez hasonlóan genetikai és környezeti tényezők együttesen váltják ki az elváltozásokat. Ikerkísérletek alapján úgy tűnik, hogy az autizmus genetikailag igen nagy mértékben determinált neuropszichiátriai kórkép<sup>180,181</sup>, azonban megjelenését befolyásolják pre- vagy perinatális események, pl. kiemelt rizikóként említik a terhesség alatti vírusfertőzést<sup>107</sup>. Az anyai immunrendszer aktivációja beindít számos

gyulladás-keltő citokint, melyek közvetve kihatnak a magzat fejlődésére. Emellett a citokinek nem csak az immunrendszer aktiválóiaként lehetnek jelen, hanem neurotrofikus hatással is rendelkeznek<sup>182,183</sup>. Ha termelődésük túlságosan aktiválódik, az szintén károkat okozhat a fejlődő idegrendszerben<sup>184</sup>. Jelenleg kevés lehetőség ismert a spektrumzavar kezelésére, többnyire a viselkedési tüneteket próbálják enyhíteni pszichoszociális fejlesztő módszerekkel, súlyosabb esetekben antipszichotikumok adásával. A szociális viselkedésben fontos szerepe van az oxitocinnak<sup>185,186</sup> amit az autizmus terápiáját célzó kutatások is felismertek és alkalmaznak<sup>187-189</sup>, valamint egy másik lehetőség a béltraktus mikrobiomjának helyreállítása endogén baktériumok bevitelével, mellyel szintén jelentős javulás értek el egyes páciensek viselkedésében<sup>190</sup>.

A P2X7 receptort és a hozzá kapcsolódó downstream jelátviteli útvonalakat már számos pszichiátriai betegséggel kapcsolatba hozták. Dolgozatom első részében bemutattam miként függhet össze a receptor aktív működése a depresszió kialakulásával, amit nem csak csoportunk adatai, hanem más irodalmi publikációk is alátámasztanak. Szintén találhatunk eredményeket a skizofréniát<sup>30,31</sup> illetően, azonban a receptor autizmusban betöltött szerepéről még nincsenek tanulmányok. Egérkísérletekben a Suramin nevű nem-szelektív P2 receptor antagonistá pozitívan befolyásolta az utód állatok autista-szerű fenotípusát<sup>150,191</sup>, illetve ez a szer klinikai alkalmazásban is ígéretesnek tűnt<sup>192</sup>. Mivel a P2X7 receptor aktiváció autizmussal is kapcsolatba hozott citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-18) termelődését regulálja, megalapozottnak tűnt kutatásaink ilyen irányú bővítése. Mint ahogy említettem, a terhesség során fellépő vírusfertőzést is felelősnek tartják a rendellenesen fejlődő idegrendszer, majd az autisztikus állapot megjelenésében, ezért kutatásainkban az anyai immunrendszer beindításán alapuló állatmodellt alkalmaztunk. Vad típusú egerekben poli(I:C) injekcióval indukáltuk vemhes egerek immunrendszerét, melyek utódain végzett viselkedés- és morfológiai vizsgálatokkal az irodalmi adatokkal megegyezően<sup>115,150,193</sup> autisztikus magatartási változásokat és rendellenesen fejlődött idegrendszert mutattunk ki. Megjegyzendő, hogy hasonló immunnaktiváción alapuló módszereket alkalmaznak a skizofréniá modellezésében, mivel ez a pszichiátriai betegség is a fejlődő idegrendszer zavara, melyben az IL-6 indukciónak fontos szerepet tulajdonítanak<sup>194</sup>.



A kisagy érintettségét az autizmus spektrumzavarban klinikai vizsgálatokban is igazolták. Nemcsak a Purkinje sejtvesztést, hanem kisebb térfogatot és csökkent arborizációt is kimutattak a pácienseknél<sup>195-197</sup>. Eközben a kérgi területeken hiperpláziát írnak le<sup>198,199</sup>, ami maga után vonja a neuronális hálózatok zavarát, majd a rendellenes információ feldolgozást. Az immunaktivációt követő abnormális szerkezetű szinaptoszóma túlsúly demonstrálja az autizmusra jellemző felborult szinaptikus integritást<sup>200</sup>. A viselkedéstudományokban kapott eredményeket okozhatja a serkentő és gátló rendszerek közötti egyensúly eltolódása<sup>201</sup>, vagy pl. a rotarod tesztben kimutatott mozgáskoordinációs problémák, és az ezt kísérő Purkinje sejtpusztulás a kisagyi-kortikális pályák zavart működésével is kapcsolatban állhat.

P2rx7 génkiütött egereket is bevontunk a kísérletekbe, hogy bizonyítsuk a receptor részvételét az autizmus modellben. A génkiütött egerekben egyik tesztben sem kaptunk autisztikus tüneteket, ugyanakkor az alapértékek eltértek a P2rx7<sup>+/+</sup> kontrollhoz képest a szociális preferencia tesztben, a Purkinje sejtek számában, illetve a károsodott szinaptoszómák arányában. Ezt a genotípus-beli különbség a génkiütés miatt hosszú távon jelentkező fejlődési mellékhatás lehet, mivel a későbbi antagonisták kezelése során nem kaptuk ehhez hasonló alapérték különbséget. Hasonló eltérést P2rx7<sup>+/+</sup> és P2rx7<sup>-/-</sup> kontrollok közötti más modellekben is többen leírták<sup>34,36,88,120</sup>. Érdekes azonban, hogy P2X4 hiányos egerekben az autista állapothoz hasonló szociális és szenzomotoros deficitet írtak le<sup>202</sup>. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek “anti-autista” fenotípussal is rendelkeznek, vagyis a receptor aktivációja közreműködik az autisztikus állapot viselkedési és morfológiai változásainak kialakulásában.

Modellünkben az anyai immunrendszer aktiválása vezet autisztikus utódokhoz, ezért a poli(I:C) által indukált citokinek szintjét megvizsgáltuk a vemhes nőstények vérplazmájában és az embriók agyában multiplex citokin esszét alkalmazva. Erőteljes IL-6 emelkedést tapasztaltunk a vad típusú nőstények vérében, mely hatás kevésbé volt kifejezett a génkiütött állatoknál, illetve az antagonisták előkezelését követően. Az IL-6 kulcsszerepet játszhat a poli(I:C) indukálta P2X7 aktivációt követő hatások mediálásában, mivel már önmagában is képes kiváltani autista fenotípust az utódokban<sup>111,203</sup>. Nem tudjuk,

hogy közvetlenül a placentán át fejt ki hatását, vagy további citokinek bevonásával<sup>204</sup>, mint pl. az IL-17 $\alpha$ <sup>112,205</sup>. Különös, hogy a mérés során nem mutattunk ki IL-1 $\beta$  indukciót, pedig az NLRP3 inflammaszóma létrejöttéhez az IL-1 $\beta$  közvetíti a P2X7 receptor aktiváló hatását. Elképzelhető azonban, hogy a P2X7 aktiváció mégsem az IL-1 $\beta$  és NLRP3 útvonalon hozza létre az autista-szerű fenotípust. Ha csak az IL-1 $\beta$ -t gátolták egy vemhesség során kiváltott gyulladásos modellben, akkor az utódok koraszülöttek lettek károsodott idegrendszerrel, azonban a P2rx7 inhibícióval mindez elkerülhető volt<sup>206</sup>. Meg kell itt említenünk, hogy a gyulladásos citokinek szintjét 2 órával a poli(I:C) beadása után vizsgáltuk, és az IL-1 $\beta$  vagy további mediátorok aktivációja ettől eltérő időpontban bekövetkezhet.

A fejlődő idegrendszert vizsgálva további bizonyítékot kaptunk arra, hogy a P2X7 receptor közreműködik az autizmus patomechanizmusában. A rendellenességre jellemző az agykéreg fejlődésének zavara, melyet a neuronális prekursorok normálistól eltérő mennyisége okozhat<sup>207</sup>. Hasonló szerkezeti eltérést írtak le Down-kórban is<sup>208</sup>. A fejlődő idegrendszert vizsgálva kimutattuk, hogy 48 órával a poli(I:C) injekció után a kortikális lemezen lecsökkent a TBR1 sejtmarker intenzitása P2rx7<sup>+/+</sup> embriókban. A TBR1 transzkripciós faktorként segíti a glutamaterg projekciós idegsejtek vándorlását és ezáltal a neuronális hálózatok kialakulását<sup>209</sup>. TBR1<sup>+/-</sup> egereknél autizmus-szerű viselkedést írtak le<sup>210</sup>, ezért elképzelhető, hogy a modellünkben kiváltott autisztikus fenotípushoz a TBR1 lecsökkent expressziója vezetett. Génkiütött állatokban, illetve P2X7 antagonistá előkezelést követően az embriók agya normálisan fejlődött, a TBR1 jelölt progenitorok mennyisége nem változott az anyai immunaktivációt követően. A normál agyfejlődéshez szükséges SATB2 intenzitását is vizsgáltuk, azonban ez a transzkripciós faktor nem változott a MIA modellben.

Kísérleteink legérdekesebb új eredménye, hogy P2rx7<sup>+/+</sup> egerek JNJ47965567 kezelésével az autista fenotípus kivédhető, illetve visszafordítható volt, ezzel megerősítettük az antagonistá P2X7 specifikus hatását, valamint a P2X7 receptor közreműködését a viselkedési és morfológiai változásokban. Érdeemes volna további kutatásokkal feltárni ezt a

kapcsolatot, mely folyamat során akár az autizmus terápiájában alkalmazható lehetne a P2X7 inhibíció.

### 6.3. Parkinson modell

A neurodegenerációs betegségek során progresszív sejtpusztulás történik az idegrendszer bizonyos területein. Dolgozatomban a Parkinson-kór modelljével foglalkoztam, mely kórképben a közepagyti szubsztancia nigra régió dopaminerg sejtjei károsodnak és tűnnek el, ami kezdetben főleg motoros, majd a betegség előrehaladásával kognitív funkciók leromlásával jár együtt. Kialakulásának hátterében az agyban keletkező gyulladást sejtik, aminek következtében a mikroglia sejtek aktiválódnak és további mediátorokat szabadítanak fel (IL-1  $\beta$ , TNF $\alpha$ , ROS), tovább súlyosbítva a gyulladási folyamatot és neurodegenerációt. A mikroglia sejtek aktivációjában a P2X7 receptornak is fontos szerepe van, a receptor funkcióját is többen vizsgálták a Parkinson-kór kialakulásával kapcsolatban. Csoportunk P2X7 receptor hiányos egerekben tanulmányozta az MPTP által indukált neurodegenerációs folyamatokat, azonban nem sikerült bizonyítani, hogy a receptor blokkolása kivédné a sejtek pusztulását<sup>138</sup>. Frissebb publikációk ennek ellent mondanak, mivel szelektív P2X7 receptor antagonistá (BBG) kezeléssel sikerült kivédeni a motoros deficitet és memóriaproblémákat a Parkinson-kór állatmodelljeiben<sup>26,145</sup>. Negatív eredményeink miatt azonban felfüggesztettük a P2X7 receptor és a Parkinson-kór összefüggésének vizsgálatát, viszont kollaborációban folytattuk a betegség terápiáját célzó kísérleteket. A jelenleg alkalmazásban levő szerek a dopamin metabolizmust gátolják, mint pl. a MAO-B gátló selegilin vagy rasagilin. Ilyen hatással rendelkezik a dolgozatomban bemutatott heteroarilalkenil-propargilamin vegyület, az SZV558, emellett kiemelkedik neuroprotektív tulajdonsága is. Hatékonyságát egy *in vitro* rotenon-indukált Parkinson modellben teszteltük, melyben sikeresen kivédte a szubsztancia nigra dopaminerg sejtjeinek elpusztulását. Ráadásul a klinikumban használt rasagilinhez képest szignifikánsan hatásosabbnak bizonyult, hiszen a rasagilinnel kezelt mintákban sokkal kevesebb sejtet láthattunk, mint az SZV558 alkalmazásakor. Az *in vitro* neuroprotektív hatás mellett pozitívan befolyásolta a Parkinson-modellekben jellemzően vizsgált viselkedési változókat (nyílt tér feltérképezése, mozgáskoordináció) *in vivo* MPTP kísérletekben, illetve a

vegyület jelentősen megemelte a striátum dopamin tartalmát is<sup>211</sup>. Ezekkel a tesztekkel egy új, hatékonyabb terápiás lehetőségre hívtuk föl a figyelmet a Parkinson-kór kezelésében.

## 7. Következtetések

Kutatásaink során három központi idegrendszert érintő kórkép állatmodelljén dolgoztam: a depresszió tanult tehetetlenség modelljében, az autizmus MIA modelljében, és egy *in vitro* rotenonos Parkinson modellben. Vizsgálatainkkal az első két kísérletsorban a purinerg P2X7 receptor közreműködésére kerestünk bizonyítékokat, míg a Parkinson-kór modelljében egy új vegyület védő szerepére voltunk kíváncsiak. Dolgozatomban részletesen bemutattam a különböző témák eredményeit, melyeket a diszkusszió fejezetben elhelyeztem a meglévő irodalmi adatok között. A következő néhány pontban összefoglaltam kísérleteinkkel igazolt új eredményeinket és a belőlük fakadó következtetéseket:

1. Korábbi tanulmányainkkal összhangban egy komplex depresszió modellel is demonstráltuk a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek antidepresszáns fenotípusát. Vad típusú társaikkal ellentétben a receptor hiányos állatoknál nem váltottak ki tanult tehetetlenséget a kivédhetetlen áramütések. Enyhén magasabb intenzitású sokkolással a kapott magasabb alapértékek eltűntek, továbbra sem mutatva különbséget a kontroll és kezelt csoportok között, vagyis a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek valóban rezisztensebbek a stresszre, de nem alakul ki bennük a tanult tehetetlenség.
2. A tehetetlen állapot kiváltása befolyásolta a P2rx7 mRNS expresszióját. Ez a kvantitatív változás arra utal, hogy a modell és receptor aktivációja kapcsolatban áll egymással.
3. A tanult tehetetlenséget követően megfigyelhető a szinaptikus kapcsolatok pusztulása, azonban a P2rx7 génkiütött egerek ellenállóak a hippocampális tüskeszínapszisok elvesztésével szemben. Fehérje szinten sem mutattunk ki változást a szinaptikus plaszticitásban, mivel nem találtunk eltérést a tüskeszínapszisokra, dendrittüskékre specifikus szinaptodin marker mennyiségében. Ezzel tovább erősítettük a P2X7 receptor aktiváció szerepét a depressziós állapot és a jellegzetes tünetek kiváltásában, valamint alátámasztottuk a tanult tehetetlenség modell tüskeszínapszis-specifikus hatását.

4. Vizsgáltuk az egyik glutamáterg receptor alegység érintettségét is a modellben, azonban úgy tűnik, hogy a tanult tehetetlenség nincsen hatással az NR2B/GluN2B hippokampális expressziójára. A korábban kimutatott genotípusos különbséget, miszerint a P2rx7 génkiütés következtében magasabb a NR2B/GluN2B intenzitása viszont sikerült visszakapni.
5. Kísérleteinkkel bemutattuk, hogy a P2X7 receptor aktív működése szükséges az anyai immunaktivációval az utódokban kiváltott autisztikus tünetek megjelenéséhez. Akár genetikai inhibícióval, vagy antagonistá adásával gátoltuk a receptort, az utódokban nem alakultak ki az autizmusra jellemző viselkedési változók és morfológiai eltérések.
6. Poli(I:C) injekció hatására fokozódik a nukleotidok mennyisége az anyai vérben és a magzatok agyában egyaránt, mely vegyületek a purinerg neurotranszmisszió, így a P2X7 receptor aktivációjához szükséges endogén ligandok.
7. P2rx7<sup>-/-</sup> anyai vérben a vad típusú állatokban mérthez képest mérsékelt IL-6 és KC emelkedést tapasztaltunk, a magzati agyban pedig egyáltalán nem emelkedtek ezek az immunmediátorok. Hasonló eredményt kaptunk a receptor farmakológiai blokkolásakor is. P2X7 receptor működésének hiányában nem történik meg az autisztikus fenotípus létrehozásáért felelősnek tartott immunaktiváció.
8. A génkiütés és JNJ injekció is kivédi a neuronális progenitor marker TBR1 lecsökkenését a kortikális lemezen, így a magzati agykéreg fejlődése nem tér el rendellenes irányba. Ennek háttérében az előző pontban említett megfigyelés állhat, miszerint a citokinek mennyisége nem ért el patológiás mértéket, így folytathatták normál neurotrofikus hatásukat, nem befolyásolva az idegsejtek fejlődését.
9. *In vitro* modellezve a rotenon és oxidatív stressz hatását a szubsztancia nigra dopaminerg neuronjaira kimutattuk, hogy a sejtpusztulás nagy mértékben kivédhető egy új heteroarilalkenil-propargilamin vegyület, a MAO-B gátló hatású SZV558 adagolásával. A szer hatékonyabbnak bizonyult a széles körben alkalmazott rasagilinnél is, ezzel új terápiás lehetőséget teremtve a Parkinson-kór kezelésében.

## 8. Összefoglalás

A purinerg P2X7 receptor kulcsszerepet játszik különböző betegségek patofiziológiájában. Dolgozatomban alapjául szolgáló kutatásainkat három központi idegrendszert érintő rendellenesség állatmodelljében végeztük: a depresszió tanult tehetetlenség modelljében, az autizmus spektrumzavar anyai immunaktiválós modelljében, és a Parkinson-kór rotenonos *in vitro* modelljében. Utóbbi kísérletsorban nem vizsgáltuk a P2X7 funkcióját.

Major depresszióban szenvedő betegeknél komplex funkcionális és szerkezeti változások jelennek meg az agy kérgi és limbikus területein, mint pl. a szinaptikus plaszticitás zavara. Az elmúlt években számos állatkísérletes eredmény igazolta, hogy a P2X7 receptor genetikai és farmakológiai gátlásakor antidepresszáns fenotípus alakul ki, de még nem ismert a viselkedési változókhoz vezető háttérmechanizmus. Munkánk során a tanult tehetetlenség depresszió modellben vizsgáltuk a tüskeszinapszisok plaszticitását egerek gyrus dentatusában, valamint a P2rx7 génkiütés következtében kialakuló eltéréseket. Kimutattuk, hogy a P2rx7<sup>-/-</sup> egerek ellenállnak a tanult tehetetlenség kialakulásának és az azt követő szinaptikus leromlásnak.

A terhesség során fellépő immunaktivációt komoly rizikótényezőként említik az agykéreg fejlődésével, és így az autizmus spektrumzavar kialakulásával kapcsolatban. A P2X7 receptor aktivációja közreműködik gyulladási folyamatok beindításában, az immunmediátorok termelésében. A vemhesség kritikus időszakában adott poli(I:C) injekcióval kiváltottuk a rendellenességhez vezető immunstátuszt, majd vizsgáltuk a viselkedési és morfológiai változásokat az utódokban. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az anyai immunaktiváció autisztikus fenotípushoz vezet, azonban a jellemző viselkedés-beli és morfológiai eltérések kivédhetőek, továbbá visszafordíthatóak a P2rx7 gén kiütésével vagy P2X7 szelektív antagonistá adásával.

A P2X7 aktivációnak szerepe lehet neurodegenerációs kórképekben is, mivel a receptor közreműködik neuroinflammációhoz, illetve sejtpusztuláshoz vezető folyamatokban egyaránt. Azonban az irodalmi adatok ellentmondásosak a receptor funkcióját illetően. Jelenleg a Parkinson-kór terápiájában MAO-gátlókat alkalmaznak széles körben, ezért mi is egy MAO-B inhibitor hatású új heteroarilalkenil-propargilamin vegyületet vizsgáltunk *in*

*vitro* Parkinson modellben, és eredményeink alapján elmondható, hogy az SZV558 adásával teljes mértékben elkerülhető a rotenon indukálta sejtpusztulás a szubsztancia nigrában.

Kísérleteinkkel alátámasztottuk a P2X7 receptor aktivációjának jelentőségét különböző betegségek kialakulásában. A tanult tehetetlenség depresszió modellben és az anyai immunaktivációs autizmus modellben szerzett eredményeink arra utalnak, hogy a receptor potenciális gyógyszerfejlesztési célpont lehet ezekben a rendellenességekben. Ezenkívül bemutattunk egy purinoktól független új, hatékonyabb terápiás lehetőséget Parkinson-kór állatmodelljében.



## 9. Summary

Purinergic signalling, mainly P2X7 receptor activation has been connected to many CNS diseases in the last decades. We carried out animal studies of major depressive disorder, autism spectrum disorder and an *in vitro* experiment of Parkinson's disease to investigate the pathomechanism of these conditions. The function of P2X7 receptor was investigated in the first two models alone.

Major depression is a complex psychiatric illness characterized by functional and structural abnormalities of cortical and limbic brain areas, including disruption of synaptic plasticity. Recent studies highlighted that both genetic and pharmacological inhibition of the purinergic P2X7 receptor leads to antidepressant-like phenotype in animal experiments, however, the influence of P2rx7 on depression-related structural changes is unclear. We explored how genetic deletion of P2rx7 affects depressive-like behaviour and spine synapse density in the dentate gyrus using the learned helplessness mouse model of depression. We demonstrated that unlike wild-type animals, P2rx7<sup>-/-</sup> mice are resistant to helpless behaviour and consecutive synaptic disturbances (e.g. spine synapse loss, synaptopodin decrease).

Maternal immune activation is a principal environmental risk factor contributing to autism spectrum disorder, which compromises fetal brain development at critical periods of pregnancy. P2X7 receptor activation is essential in inflammatory processes. At first, we evoked autism-like phenotype in offspring of dams subjected to immune activation during pregnancy, then we investigated the function of P2X7 receptors in this model. We report that P2rx7 deficiency or antagonism alleviated and even reversed autistic behavioural and morphological alterations in poly(I:C) induced MIA model.

Via neuroinflammatory actions, P2X7 receptors may have a role in Parkinsons' disease as well, although the existing data is contradictory regarding its function. Currently MAO inhibitors are widely used in the therapy of the disease. We showed a potent protective effect of a novel heteroarylalkenyl propargylamin compound in an *in vitro* rotenon induced Parkinson model, supported by *in vivo* results as well.

In conclusion, our findings suggest the endogenous activation of P2X7 receptor is substantial in the learned helplessness model of depression and in the MIA model of autism; therefore the receptor is potential therapeutic target for the prevention and treatment of these CNS diseases. Further studies of Parkinson's disease are necessary to explore the function of P2X7 receptor in the neurodegenerative processes. Nonetheless we demonstrated a new therapeutic possibility in the treatment of disease independent of the purines.

**10. Irodalomjegyzék**

- 1 North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82: 1013-1067.
- 2 Stokes L, Fuller SJ, Sluyter R, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS. (2010) Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1beta secretion. *FASEB J*, 24: 2916-2927.
- 3 Burnstock G. (2004) Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*, 4: 793-803.
- 4 Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272: 735-738.
- 5 Alloisio S, Cervetto C, Passalacqua M, Barbieri R, Maura G, Nobile M, Marcoli M. (2008) Functional evidence for presynaptic P2X7 receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett*, 582: 3948-3953.
- 6 Armstrong JN, Brust TB, Lewis RG, MacVicar BA. (2002) Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 22: 5938-5945.
- 7 Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*, 21: 7143-7152.
- 8 Sperlagh B, Kofalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Vizi ES. (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem*, 81: 1196-1211.
- 9 Ralevic V, Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50: 413-492.
- 10 Torres GE, Egan TM, Voigt MM. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*, 274: 6653-6659.
- 11 Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, 376: 127-138.

- 12 Skaper SD, Debetto P, Giusti P. (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J*, 24: 337-345.
- 13 Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*, 23: 1320-1328.
- 14 Anderson CM, Nedergaard M. (2006) Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*, 29: 257-262.
- 15 Sperlagh B, Heinrich A, Csölle C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signal*, 3: 269-284.
- 16 Duan S, Neary JT. (2006) P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function. *Glia*, 54: 738-746.
- 17 Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*, 176: 3877-3883.
- 18 Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, Finlayson K. (2007) The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond)*, 4: 5.
- 19 Beamer E, Goloncser F, Horvath G, Beko K, Otrókocsi L, Kovanyi B, Sperlagh B. (2015) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*.
- 20 Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. (2009) The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci*, 29: 3781-3791.
- 21 Burnstock G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 575-590.
- 22 Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 78: 327-346.
- 23 Sperlagh B, Illes P. (2014) P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 537-547.
- 24 Allan SM, Rothwell NJ. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2: 734-744.
- 25 Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 278: 13309-13317.

- 26 Wang XH, Xie X, Luo XG, Shang H, He ZY. (2017) Inhibiting purinergic P2X7 receptors with the antagonist brilliant blue G is neuroprotective in an intranigral lipopolysaccharide animal model of Parkinson's disease. *Mol Med Rep*, 15: 768-776.
- 27 Savio LEB, de Andrade Mello P, da Silva CG, Coutinho-Silva R. (2018) The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Front Pharmacol*, 9: 52.
- 28 Vianna EP, Ferreira AT, Naffah-Mazzacoratti MG, Sanabria ER, Funke M, Cavalheiro EA, Fernandes MJ. (2002) Evidence that ATP participates in the pathophysiology of pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy: fluorimetric, immunohistochemical, and Western blot studies. *Epilepsia*, 43 Suppl 5: 227-229.
- 29 Beamer E, Fischer W, Engel T. (2017) The ATP-Gated P2X7 Receptor As a Target for the Treatment of Drug-Resistant Epilepsy. *Front Neurosci*, 11: 21.
- 30 Kovanyi B, Csolle C, Calovi S, Hanuska A, Kato E, Koles L, Bhattacharya A, Haller J, Sperlagh B. (2016) The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. *Sci Rep*, 6: 36680.
- 31 Hansen T, Jakobsen KD, Fenger M, Nielsen J, Krane K, Fink-Jensen A, Lublin H, Ullum H, Timm S, Wang AG, Jorgensen NR, Werge T. (2008) Variation in the purinergic P2RX(7) receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res*, 104: 146-152.
- 32 Goloncser F, Sperlagh B. (2014) Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *J Headache Pain*, 15: 24.
- 33 Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Duthel S, Banasr M, Duric V, Yamanashi T, Kaneko K, Rasmussen K, Glasebrook A, Koester A, Song D, Jones KA, Zorn S, Smagin G, Duman RS. (2015) Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. *Biol Psychiatry*.
- 34 Basso AM, Bratcher NA, Harris RR, Jarvis MF, Decker MW, Rueter LE. (2009) Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research*, 198: 83-90.
- 35 Boucher AA, Arnold JC, Hunt GE, Spiro A, Spencer J, Brown C, McGregor IS, Bennett MR, Kassiou M. (2011) Resilience and reduced

- c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience*, 189: 170-177.
- 36 Csolle C, Ando RD, Kittel A, Goloncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Nemeth T, Mocsai A, Sperlagh B. (2013) The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16: 213-233.
- 37 Csolle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Goloncser F, Illes P, Papp E, Vizi ES, Sperlagh B. (2013) Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One*, 8: e66547.
- 38 Stokes L, Spencer SJ, Jenkins TA. (2015) Understanding the role of P2X7 in affective disorders-are glial cells the major players? *Front Cell Neurosci*, 9: 258.
- 39 Backlund L, Nikamo P, Hukic DS, Ek IR, Traskman-Bendz L, Landen M, Edman G, Schalling M, Frisen L, Osby U. (2011) Cognitive manic symptoms associated with the P2RX7 gene in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 13: 500-508.
- 40 Gubert C, Fries GR, Pfaffenseller B, Ferrari P, Coutinho-Silva R, Morrone FB, Kapczinski F, Battastini AMO. (2016) Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine. *Mol Neurobiol*, 53: 611-620.
- 41 Belmaker RH, Agam G. (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358: 55-68.
- 42 Koopmans PC, Roelen CA, Groothoff JW. (2008) Sickness absence due to depressive symptoms. *Int Arch Occup Environ Health*, 81: 711-719.
- 43 Wong SY, Mercer SW, Woo J, Leung J. (2008) The influence of multimorbidity and self-reported socio-economic standing on the prevalence of depression in an elderly Hong Kong population. *BMC Public Health*, 8: 119.
- 44 Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron*, 34: 13-25.
- 45 Lee S, Jeong J, Kwak Y, Park SK. (2010) Depression research: where are we now? *Mol Brain*, 3: 8.
- 46 Berton O, Nestler EJ. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 7: 137-151.

- 47 Schildkraut JJ. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122: 509-522.
- 48 Romeo B, Blecha L, Locatelli K, Benyamina A, Martelli C. (2018) Meta-analysis and review of dopamine agonists in acute episodes of mood disorder: Efficacy and safety. *J Psychopharmacol*, 32: 385-396.
- 49 Sanacora G. (2008) New understanding of mechanisms of action of bipolar medications. *J Clin Psychiatry*, 69 Suppl 5: 22-27.
- 50 Henter ID, de Sousa RT, Zarate CA, Jr. (2018) Glutamatergic Modulators in Depression. *Harv Rev Psychiatry*.
- 51 Mathews DC, Henter ID, Zarate CA. (2012) Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs*, 72: 1313-1333.
- 52 Hayley S. (2011) Toward an anti-inflammatory strategy for depression. *Front Behav Neurosci*, 5: 19.
- 53 Loftis JM, Huckans M, Morasco BJ. (2010) Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis*, 37: 519-533.
- 54 Halaris A. (2009) Comorbidity between depression and cardiovascular disease. *Int Angiol*, 28: 92-99.
- 55 Kraus MR, Schafer A, Faller H, Csef H, Scheurlen M. (2002) Paroxetine for the treatment of interferon-alpha-induced depression in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, 16: 1091-1099.
- 56 Sapolsky RM. (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 57: 925-935.
- 57 Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, 160: 1516-1518.
- 58 McEwen BS. (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 87: 873-904.
- 59 Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20: 9104-9110.
- 60 Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranth C, Duman RS. (2009) Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol Psychiatry*, 65: 392-400.
- 61 Dranovsky A, Hen R. (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*, 59: 1136-1143.

- 62 Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 54: 597-606.
- 63 Castren E. (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, 6: 241-246.
- 64 Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, 22: 3251-3261.
- 65 Hasin DS, Goodwin RD, Stinson FS, Grant BF. (2005) Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*, 62: 1097-1106.
- 66 Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B. (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet*, 15: 2438-2445.
- 67 Soronen P, Mantere O, Melartin T, Suominen K, Vuorilehto M, Rytala H, Arvilommi P, Holma I, Holma M, Jylha P, Valtonen HM, Haukka J, Isometsa E, Paunio T. (2011) P2RX7 gene is associated consistently with mood disorders and predicts clinical outcome in three clinical cohorts. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B: 435-447.
- 68 Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA, Surprenant A, Jiang LH. (2010) Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res*, 44: 347-355.
- 69 McQuillin A, Bass NJ, Choudhury K, Puri V, Kosmin M, Lawrence J, Curtis D, Gurling HM. (2009) Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders. *Mol Psychiatry*, 14: 614-620.
- 70 Nagy G, Ronai Z, Somogyi A, Sasvari-Szekely M, Rahman OA, Mate A, Varga T, Nemoda Z. (2008) P2RX7 Gln460Arg polymorphism is associated with depression among diabetic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32: 1884-1888.
- 71 Viikki M, Kampman O, Anttila S, Illi A, Setälä-Soikkeli E, Huuhka M, Mononen N, Lehtimäki T, Leinonen E. (2011) P2RX7 polymorphisms Gln460Arg and His155Tyr are not associated with major depressive disorder or remission after SSRI or ECT. *Neurosci Lett*, 493: 127-130.



- 72 Feng WP, Zhang B, Li W, Liu J. (2014) Lack of association of P2RX7 gene rs2230912 polymorphism with mood disorders: a meta-analysis. *PLoS One*, 9: e88575.
- 73 Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2009) Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B: 295-299.
- 74 Czamara D, Muller-Myhsok B, Lucae S. (2018) The P2RX7 polymorphism rs2230912 is associated with depression: A meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 82: 272-277.
- 75 Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, Fleshner M. (2005) Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, 135: 1295-1307.
- 76 Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. (2016) Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today*, 21: 454-464.
- 77 Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznernski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M, Son H, Duman RS. (2012) Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med*, 18: 1413-1417.
- 78 Harris KM, Fiala JC, Ostroff L. (2003) Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358: 745-748.
- 79 Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 64: 313-353.
- 80 Yoshihara Y, De Roo M, Muller D. (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol*, 19: 146-153.
- 81 Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44: 749-757.
- 82 Segal M. (1995) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci*, 18: 468-471.
- 83 Segal M. (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 6: 277-284.
- 84 Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. (2001) Ca<sup>2+</sup> signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 11: 349-356.

- 85 Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*, 157: 115-118.
- 86 Huang Y, Coupland NJ, Lebel RM, Carter R, Seres P, Wilman AH, Malykhin NV. (2013) Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*, 74: 62-68.
- 87 Soetanto A, Wilson RS, Talbot K, Un A, Schneider JA, Sobiesk M, Kelly J, Leurgans S, Bennett DA, Arnold SE. (2010) Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. *Arch Gen Psychiatry*, 67: 448-457.
- 88 Otrókocsi L, Kittel A, Sperlagh B. (2017) P2X7 Receptors Drive Spine Synapse Plasticity in the Learned Helplessness Model of Depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 20: 813-822.
- 89 Estes ML, McAllister AK. (2015) Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, 16: 469-486.
- 90 Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP. (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*, 10: 643-660.
- 91 Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. (2015) The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med*, 45: 601-613.
- 92 Lintas C, Persico AM. (2009) Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet*, 46: 1-8.
- 93 Baron-Cohen S, Knickmeyer RC, Belmonte MK. (2005) Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science*, 310: 819-823.
- 94 Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. (2008) Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47: 921-929.
- 95 Johnco C, Storch EA. (2015) Anxiety in youth with autism spectrum disorders: implications for treatment. *Expert Rev Neurother*, 15: 1343-1352.

- 96 Boyd BA, Baranek GT, Sideris J, Poe MD, Watson LR, Patten E, Miller H. (2010) Sensory features and repetitive behaviors in children with autism and developmental delays. *Autism Res*, 3: 78-87.
- 97 Kwakye LD, Foss-Feig JH, Cascio CJ, Stone WL, Wallace MT. (2011) Altered auditory and multisensory temporal processing in autism spectrum disorders. *Front Integr Neurosci*, 4: 129.
- 98 Chakrabarti S, Fombonne E. (2005) Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry*, 162: 1133-1141.
- 99 Ghosh A, Michalon A, Lindemann L, Fontoura P, Santarelli L. (2013) Drug discovery for autism spectrum disorder: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 777-790.
- 100 Kumar RA, Christian SL. (2009) Genetics of autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 9: 188-197.
- 101 Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ, Dean JC. (2005) Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol*, 47: 551-555.
- 102 Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. (2013) Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry*, 70: 71-77.
- 103 Depino AM. (2018) Perinatal inflammation and adult psychopathology: From preclinical models to humans. *Semin Cell Dev Biol*, 77: 104-114.
- 104 Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. (2010) Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40: 1423-1430.
- 105 Zerbo O, Qian Y, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Croen LA. (2015) Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*, 45: 4015-4025.
- 106 Mazina V, Gerds J, Trinh S, Ankenman K, Ward T, Dennis MY, Girirajan S, Eichler EE, Bernier R. (2015) Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *J Dev Behav Pediatr*, 36: 61-67.
- 107 Jiang HY, Xu LL, Shao L, Xia RM, Yu ZH, Ling ZX, Yang F, Deng M, Ruan B. (2016) Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 58: 165-172.

- 108 Careaga M, Murai T, Bauman MD. (2017) Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol Psychiatry*, 81: 391-401.
- 109 Meyer U. (2014) Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry*, 75: 307-315.
- 110 Nicolini C, Fahnstock M. (2018) The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol*, 299: 217-227.
- 111 Hsiao EY, Patterson PH. (2011) Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. *Brain Behav Immun*, 25: 604-615.
- 112 Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffler CA, Littman DR, Huh JR. (2016) The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351: 933-939.
- 113 Jones KL, Croen LA, Yoshida CK, Heuer L, Hansen R, Zerbo O, DeLorenze GN, Kharrazi M, Yolken R, Ashwood P, Van de Water J. (2017) Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Mol Psychiatry*, 22: 273-279.
- 114 Deverman BE, Patterson PH. (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron*, 64: 61-78.
- 115 Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. (2006) The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci*, 26: 4752-4762.
- 116 Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, Yoshihara Y, Omata K, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. (2013) Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70: 49-58.
- 117 Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. (2007) Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol*, 36: 361-365.
- 118 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. (2011) Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*, 25: 40-45.

- 119 Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ. (2015) Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 20: 440-446.
- 120 Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev*, 66: 638-675.
- 121 de Torre-Minguela C, Mesa Del Castillo P, Pelegrin P. (2017) The NLRP3 and Pypin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*, 8: 43.
- 122 Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. (2014) P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-alpha in cultured mouse microglia. *Glia*, 62: 592-607.
- 123 Lu W, Albalawi F, Beckel JM, Lim JC, Laties AM, Mitchell CH. (2017) The P2X7 receptor links mechanical strain to cytokine IL-6 up-regulation and release in neurons and astrocytes. *J Neurochem*, 141: 436-448.
- 124 Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 276: 125-132.
- 125 Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, 282: 2871-2879.
- 126 Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues ALS, Peluffo H, Kaster MP. (2017) NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. *Brain Behav Immun*, 64: 367-383.
- 127 Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. (2015) NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*, 6: 262.
- 128 Poewe W, Mahlknecht P, Jankovic J. (2012) Emerging therapies for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 25: 448-459.
- 129 Youdim MB, Riederer PF. (2004) A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology*, 63: S32-35.
- 130 Bar-Am O, Amit T, Youdim MB. (2007) Aminoindan and hydroxyaminoindan, metabolites of rasagiline and ladostigil, respectively, exert neuroprotective properties in vitro. *J Neurochem*, 103: 500-508.

- 131 Zheng H, Gal S, Weiner LM, Bar-Am O, Warshawsky A, Fridkin M, Youdim MB. (2005) Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases: in vitro studies on antioxidant activity, prevention of lipid peroxide formation and monoamine oxidase inhibition. *J Neurochem*, 95: 68-78.
- 132 Ahlskog JE, Uitti RJ. (2010) Rasagiline, Parkinson neuroprotection, and delayed-start trials: still no satisfaction? *Neurology*, 74: 1143-1148.
- 133 Olanow CW, Rascol O. (2010) The delayed-start study in Parkinson disease: can't satisfy everyone. *Neurology*, 74: 1149-1150.
- 134 Seidl SE, Potashkin JA. (2011) The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Front Neurol*, 2: 68.
- 135 Milusheva E, Baranyi M, Kittel A, Sperlagh B, Vizi ES. (2005) Increased sensitivity of striatal dopamine release to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon chronic rotenone treatment. *Free Radic Biol Med*, 39: 133-142.
- 136 Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*, 179: 9-16.
- 137 Milusheva E, Baranyi M, Kormos E, Hracsko Z, Sylvester Vizi E, Sperlagh B. (2010) The effect of antiparkinsonian drugs on oxidative stress induced pathological [3H]dopamine efflux after in vitro rotenone exposure in rat striatal slices. *Neuropharmacology*, 58: 816-825.
- 138 Hracsko Z, Baranyi M, Csolle C, Goloncser F, Madarasz E, Kittel A, Sperlagh B. (2011) Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 6: 28.
- 139 Sampaio TB, Marcondes Sari MH, Pesarico AP, Mantovani AC, Zeni G, Nogueira CW. (2018) 7-Fluoro-1,3-diphenylisoquinoline reverses motor and non-motor symptoms induced by MPTP in mice: Role of striatal neuroinflammation. *Eur J Pharmacol*, 819: 129-135.
- 140 Durrenberger PF, Grunblatt E, Fernando FS, Monoranu CM, Evans J, Riederer P, Reynolds R, Dexter DT. (2012) Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study. *Parkinsons Dis*, 2012: 214714.
- 141 Schapira AH, Olanow CW. (2004) Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA*, 291: 358-364.
- 142 Greenamyre JT, Hastings TG. (2004) Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304: 1120-1122.

- 143 Ryu JK, McLarnon JG. (2008) Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 19: 1715-1719.
- 144 Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ. (2009) Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J*, 23: 1893-1906.
- 145 Ferrazoli EG, de Souza HD, Nascimento IC, Oliveira-Giacomelli A, Schwindt TT, Britto LR, Ulrich H. (2017) Brilliant Blue G, But Not Fenofibrate, Treatment Reverts Hemiparkinsonian Behavior and Restores Dopamine Levels in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant*, 26: 669-677.
- 146 Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Dormann C, Vollmayr B, Gass P. (2005) Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Res Brain Res Protoc*, 16: 70-78.
- 147 Tohda M, Mingmalairak S. (2013) Evidence of Antidepressive Effects of a Wakan-yaku, Hochuekkito, in Depression Model Mice with Learned-Helplessness Behavior. *Evid-Based Compl Alt*.
- 148 Schmidt M, Brandwein C, Luoni A, Sandrini P, Calzoni T, Deuschle M, Cirulli F, Riva MA, Gass P. (2016) *Morc1* knockout evokes a depression-like phenotype in mice. *Behavioural brain research*, 296: 7-14.
- 149 Dao DT, Mahon PB, Cai X, Kovacsics CE, Blackwell RA, Arad M, Shi J, Zandi PP, O'Donnell P, Bipolar Genome Study C, Knowles JA, Weissman MM, Coryell W, Scheftner WA, Lawson WB, Levinson DF, Thompson SM, Potash JB, Gould TD. (2010) Mood disorder susceptibility gene *CACNA1C* modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biol Psychiatry*, 68: 801-810.
- 150 Naviaux RK, Zolkipli Z, Wang L, Nakayama T, Naviaux JC, Le TP, Schuchbauer MA, Rogac M, Tang Q, Dugan LL, Powell SB. (2013) Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PLoS One*, 8: e57380.
- 151 Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Green J, Pham M, Stewart A, Liang Y, Kobla V, Kalueff AV. (2011) Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behavioural brain research*, 225: 426-431.

- 152 Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. (2012) Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*, 26: 607-616.
- 153 Kofalvi A, Vizi ES, Ledent C, Sperlagh B. (2003) Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *Eur J Neurosci*, 18: 1973-1978.
- 154 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- 155 Larson SJ, Dunn AJ. (2001) Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun*, 15: 371-387.
- 156 Owen BM, Eccleston D, Ferrier IN, Young AH. (2001) Raised levels of plasma interleukin-1beta in major and postviral depression. *Acta Psychiatr Scand*, 103: 226-228.
- 157 Pollak Y, Yirmiya R. (2002) Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5: 389-399.
- 158 Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, Meuth S, Nagy A, Greene RW, Nestler EJ. (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10827-10832.
- 159 Blendy JA. (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, 59: 1144-1150.
- 160 Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC, Jr., Jones RM, Portoghese PS, Carlezon WA, Jr. (2003) Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 305: 323-330.
- 161 Song C, Wang H. (2011) Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35: 760-768.
- 162 Barden N, Shink E, Labbe M, Vacher R, Rochford J, Mocaer E. (2005) Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 908-916.
- 163 Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C. (2002)



- Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8: 825-830.
- 164 Zhang K, Liu J, You X, Kong P, Song Y, Cao L, Yang S, Wang W, Fu Q, Ma Z. (2016) P2X7 as a new target for chrysophanol to treat lipopolysaccharide-induced depression in mice. *Neurosci Lett*, 613: 60-65.
- 165 Wilkinson SM, Gunosewoyo H, Barron ML, Boucher A, McDonnell M, Turner P, Morrison DE, Bennett MR, McGregor IS, Rendina LM, Kassiou M. (2014) The first CNS-active carborane: A novel P2X7 receptor antagonist with antidepressant activity. *ACS Chem Neurosci*, 5: 335-339.
- 166 Yue N, Huang H, Zhu X, Han Q, Wang Y, Li B, Liu Q, Wu G, Zhang Y, Yu J. (2017) Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation*, 14: 102.
- 167 Kongsui R, Beynon SB, Johnson SJ, Mayhew J, Kuter P, Nilsson M, Walker FR. (2014) Chronic stress induces prolonged suppression of the P2X7 receptor within multiple regions of the hippocampus: a cumulative threshold spectra analysis. *Brain Behav Immun*, 42: 69-80.
- 168 Li XQ, Li M, Zhou ZH, Liu BJ, Chen HS. (2016) Chronic restraint stress exacerbates nociception and inflammatory response induced by bee venom in rats: the role of the P2X7 receptors. *Neurol Res*, 38: 158-165.
- 169 Xu Y, Sheng H, Bao Q, Wang Y, Lu J, Ni X. (2016) NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. *Brain Behav Immun*.
- 170 Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, 46: 609-622.
- 171 Deller T, Bas Orth C, Del Turco D, Vlachos A, Burbach GJ, Drakew A, Chabanis S, Korte M, Schwegler H, Haas CA, Frotscher M. (2007) A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann Anat*, 189: 5-16.
- 172 Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR, Jr., Kawahara R. (2006) Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30: 1155-1158.

- 173 Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*, 62: 1310-1316.
- 174 Almeida RF, Thomazi AP, Godinho GF, Saute JA, Wofchuk ST, Souza DO, Ganzella M. (2010) Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. *Neurochem Res*, 35: 1164-1171.
- 175 Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*, 58: 465-473.
- 176 Papp L, Vizi ES, Sperlagh B. (2004) Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice. *Neuroreport*, 15: 2387-2391.
- 177 Miller OH, Yang L, Wang CC, Hargroder EA, Zhang Y, Delpire E, Hall BJ. (2014) GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *Elife*, 3: e03581.
- 178 Williams NR, Schatzberg AF. (2016) NMDA antagonist treatment of depression. *Curr Opin Neurobiol*, 36: 112-117.
- 179 Murray D, Lesser M, Lawson W. (2005) Attention, monotropism and the diagnostic criteria for autism. *Autism*, 9: 139-156.
- 180 O'Roak BJ, State MW. (2008) Autism genetics: strategies, challenges, and opportunities. *Autism Res*, 1: 4-17.
- 181 Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A. (2017) The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, 318: 1182-1184.
- 182 Marx CE, Jarskog LF, Lauder JM, Lieberman JA, Gilmore JH. (2001) Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 50: 743-749.
- 183 Gilmore JH, Fredrik Jarskog L, Vadlamudi S, Lauder JM. (2004) Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1221-1229.
- 184 McGeer PL, McGeer EG. (2002) Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol*, 8: 529-538.
- 185 Neumann ID. (2008) Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*, 20: 858-865.

- 186 Ebstein RP, Israel S, Lerer E, Uzefovsky F, Shalev I, Gritsenko I, Riebold M, Salomon S, Yirmiya N. (2009) Arginine vasopressin and oxytocin modulate human social behavior. *Ann N Y Acad Sci*, 1167: 87-102.
- 187 Hammock EA, Young LJ. (2006) Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361: 2187-2198.
- 188 Watanabe T, Otowa T, Abe O, Kuwabara H, Aoki Y, Natsubori T, Takao H, Kakiuchi C, Kondo K, Ikeda M, Iwata N, Kasai K, Sasaki T, Yamasue H. (2017) Oxytocin receptor gene variations predict neural and behavioral response to oxytocin in autism. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 12: 496-506.
- 189 Avraham Y, Berry EM, Donskoy M, Ahmad WA, Vorobiev L, Albeck A, Mankuta D. (2017) Beta-carotene as a novel therapy for the treatment of "Autistic like behavior" in animal models of Autism. *Behavioural brain research*.
- 190 Yang Y, Tian J, Yang B. (2018) Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. *Life Sci*, 194: 111-119.
- 191 Naviaux JC, Schuchbauer MA, Li K, Wang L, Risbrough VB, Powell SB, Naviaux RK. (2014) Reversal of autism-like behaviors and metabolism in adult mice with single-dose antipurinergic therapy. *Transl Psychiatry*, 4: e400.
- 192 Naviaux RK, Curtis B, Li K, Naviaux JC, Bright AT, Reiner GE, Westerfield M, Goh S, Alaynick WA, Wang L, Capparelli EV, Adams C, Sun J, Jain S, He F, Arellano DA, Mash LE, Chukoskie L, Lincoln A, Townsend J. (2017) Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. *Ann Clin Transl Neurol*, 4: 491-505.
- 193 Zuckerman L, Weiner I. (2005) Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J Psychiatr Res*, 39: 311-323.
- 194 Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 27: 10695-10702.
- 195 Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P. (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121 ( Pt 5): 889-905.

- 196 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*, 57: 67-81.
- 197 Wegiel J, Flory M, Kuchna I, Nowicki K, Ma SY, Imaki H, Wegiel J, Cohen IL, London E, Wisniewski T, Brown WT. (2014) Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol Commun*, 2: 141.
- 198 Carper RA, Courchesne E. (2005) Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. *Biol Psychiatry*, 57: 126-133.
- 199 Wang J, Fu K, Chen L, Duan X, Guo X, Chen H, Wu Q, Xia W, Wu L, Chen H. (2017) Increased Gray Matter Volume and Resting-State Functional Connectivity in Somatosensory Cortex and their Relationship with Autistic Symptoms in Young Boys with Autism Spectrum Disorder. *Front Physiol*, 8: 588.
- 200 Zatkova M, Bakos J, Hodosy J, Ostatnikova D. (2016) Synapse alterations in autism: Review of animal model findings. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160: 201-210.
- 201 Rubenstein JL, Merzenich MM. (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*, 2: 255-267.
- 202 Wyatt LR, Godar SC, Khoja S, Jakowec MW, Alkana RL, Bortolato M, Davies DL. (2013) Sociocommunicative and sensorimotor impairments in male P2X4-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*, 38: 1993-2002.
- 203 Samuelsson AM, Alexanderson C, Molne J, Haraldsson B, Hansell P, Holmang A. (2006) Prenatal exposure to interleukin-6 results in hypertension and alterations in the renin-angiotensin system of the rat. *J Physiol*, 575: 855-867.
- 204 Wu WL, Hsiao EY, Yan Z, Mazmanian SK, Patterson PH. (2017) The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain Behav Immun*, 62: 11-23.
- 205 Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, Longman RS, Honda K, Littman DR, Choi GB, Huh JR. (2017) Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*, 549: 528-532.

- 206 Tsimis ME, Lei J, Rosenzweig JM, Arif H, Shabi Y, Alshehri W, Talbot CC, Baig-Ward KM, Segars J, Graham EM, Burd I. (2017) P2X7 receptor blockade prevents preterm birth and perinatal brain injury in a mouse model of intrauterine inflammation. *Biol Reprod*, 97: 230-239.
- 207 Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. (2002) Minicolumnar pathology in autism. *Neurology*, 58: 428-432.
- 208 Buxhoeveden D, Fobbs A, Roy E, Casanova M. (2002) Quantitative comparison of radial cell columns in children with Down's syndrome and controls. *J Intellect Disabil Res*, 46: 76-81.
- 209 Hevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C. (2006) Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res*, 55: 223-233.
- 210 Huang TN, Hsueh YP. (2015) Brain-specific transcriptional regulator T-brain-1 controls brain wiring and neuronal activity in autism spectrum disorders. *Front Neurosci*, 9: 406.
- 211 Baranyi M, Porceddu PF, Goloncser F, Kulcsar S, Otrókocsi L, Kittel A, Pinna A, Frau L, Huleatt PB, Khoo ML, Chai CL, Dunkel P, Matyus P, Morelli M, Sperlagh B. (2016) Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 11: 6.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Otrokocsi L**, Kittel Á, Sperlág B.: *P2X7 Receptors Drive Spine Synapse Plasticity in the Learned Helplessness Model of Depression* (2017) Int J Neuropsychopharmacol 20(10):813-822. doi: 10.1093/ijnp/pyx046.

2. Baranyi M, Porceddu PF, Göloncsér F, Kulcsár S, **Otrokocsi L**, Kittel Á, Pinna A, Frau L, Huleatt PB, Khoo ML, Chai CL, Dunkel P, Mátyus P, Morelli M, Sperlág B.: *Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease* (2016) Mol Neurodegener 11:6. doi: 10.1186/s13024-015-0067-y

## **12. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki közreműködött abban, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kittel Ágnesnek a munkám során nyújtott szakmai és gyakorlati segítséget, a jó tanácsokat, a lelkesítést és támogatást. Köszönöm, hogy lehetővé tette számomra a részvételt a Semmelweis Egyetem Szentágotthai Doktori Iskola képzésében.

Köszönöm kutatócsoportunk vezetőjének és konzulensemnek, Dr. Sperlág Beátának, hogy diákkörösként csatlakozhattam a csoporthoz, és megismerkedhettem a purinerg jelátvitel kutatási területével. Köszönöm, hogy lehetőséget adott a doktori dolgozatom kísérletes munkájának elkészítésére és a szakmai tapasztalatszerzésre, hálás vagyok a bizalomért, a felelősségteljes feladatokért.

Köszönöm minden kollégámnak a támogatást és segítséget, amit a dolgozatom elkészítésében nyújtottak. Külön kiemelném Horváth Gergelyt az autizmus projekt beállításában végzett fáradhatatlan munkájáért, hálás vagyok az átadott tudásért, hogy együtt dolgozhattunk. Hálásan köszönöm Baranyi Máriának a HPLC méréseket, Kittel Ágnesnek az elektronmikroszkópos munkákban való részvételt, Fritz-Ruenes Pablo Antonionak a lelkes segítséget, a folyamatos érdeklődést és figyelmet. Köszönöm a citokin mérések betanításában nyújtott segítséget Bekő Katinkának, Környei Zsunak és Dénes Ádámnak. Köszönöm Aliczki Manónak, Gölöncsér Flórának és Haller Józsefnek, hogy közreműködtek a tanult tehetetlenség modell protokolljának beállításában. Köszönöm Lengyel Katinak, hogy megtanított az elektronmikroszkópos minták metszésére. Köszönöm Koványi Bencének és Szilvász-Szabó Anettnek a PCR mérés elsajátításában nyújtott segítséget, és László Zsófinak, hogy mindig fordulhatam hozzá az immunfestéssel kapcsolatos problémáimmal. Köszönöm Barna Lászlónak és Pongor Csabának, a Nikon center munkatársainak a konfokális mikroszkóp használatát illető segítséget, és Demeter Kornélnak a Viselkedés Vizsgálati Egységben végzett munkával kapcsolatos tanácsokat.

Ezen kívül köszönettel tartozom az MTA KOKI valamennyi dolgozójának, legfőképpen a Molekuláris Farmakológia kutatócsoport tagjainak, valamint az OGR állatház munkatársainak.

Nagyon hálás vagyok a családom és barátaim támogatásáért és szeretetéért, ami szintén hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat létrejöhessen. Köszönöm!



### **13. Függelék**

**Az értekezésben bemutatott eredmények egy része (autizmus modell) még nem került publikálásra, a kézirat jelenleg bíráló alatt áll. Szerzői és címe:**

Horváth G\*, **Otrokocsi L\***, Bekő K, Baranyi M, Kittel Á, Fritz-Ruenes PA, Sperlággh B.:  
Maternal and offspring P2X7 receptors drive poly(I:C) induced autism-like behavior in mice (2018)

\* Megosztott első szerzőség

Vizsgált változó	ábra	Kezelési csoport	Átlag ± SEM	n
Sikertelen menekülések száma	13.	WT CTRL	5,21±0,96	23
		WT IES	15,69±1,429	27
		KO CTRL	14,48±1,87	27
		KO IES	12,70±1,77	27
Menekülési látencia	14.	WT CTRL	12,00±0,37	23
		WT IES	9,33±0,35	27
		KO CTRL	11,51±0,48	27
		KO IES	10,72±0,50	27
Sikertelen menekülések száma (emelt áramerősség)	15.	WT CTRL 0.15	4,33±1,83	6
		WT IES 0.15	13,50±3,11	6
		WT CTRL 0.2	1,42±1,42	7
		WT IES 0.2	4,00±1,87	7
		KO CTRL 0.15	12,37±2,30	8
		KO IES 0.15	13,12±4,00	8
		KO CTRL 0.2	0,50±0,26	8
		KO IES 0.2	1,25±0,41	8
Menekülési látencia (emelt áramerősség)	16.	WT CTRL 0.15	8,51±0,60	6
		WT IES 0.15	11,52±0,58	6
		WT CTRL 0.2	7,01±0,68	7
		WT IES 0.2	8,61±0,76	7
		KO CTRL 0.15	11,21±0,59	8
		KO IES 0.15	10,41±1,20	8
		KO CTRL 0.2	6,94±0,23	8
		KO IES 0.2	8,25±0,54	8
Tüskeszínapszis sűrűség	17.	WT naiv	1,03±0,01	4
		KO naiv	0,83±0,02	4
		WT CTRL	0,68±0,01	3
		WT IES	0,50±0,00	3
		KO CTRL	0,80±0,00	3
		KO IES	0,82±0,01	3
Szemcses sejtek száma	18.	WT naiv	8,47±0,22	3
		KO naiv	8,38±0,22	3
		WT CTRL	8,44±0,29	3
		WT IES	8,43±0,4	3
		KO CTRL	8,42±0,17	3
		KO IES	8,35±0,25	3
P2rx7 mRNS	19.	WT CTRL	1	4
		WT IES	0,85±0,01	4

		WT CTRL	1	4
		WT IES	1,07±0,04	4
Szinaptopodin (6 óra)	20.	WT CTRL	1	5
		WT IES	0,48±0,06	5
		KO CTRL	0,59±0,09	5
		KO IES	0,603±0,06	5
Szinaptopodin (24 óra)	21.	WT CTRL	1	5
		WT IES	0,84±0,107	5
		KO CTRL	0,94±0,75	5
		KO IES	1,019±0,12	5
PSD95 (6 óra)	22.	WT CTRL	1	5
		WT IES	0,97±0,024	5
		KO CTRL	0,79±0,16	5
		KO IES	0,88±0,19	5
PSD95 (24 óra)	23.	WT CTRL	1	5
		WT IES	1,06±0,28	5
		KO CTRL	1,00±0,11	5
		KO IES	1,06±0,28	5
NR2B/GluN2B	24.	WT CTRL	661.94±29.21	3
		WT IES	594.16±90.73	3
		KO CTRL	1041,03±130,32	3
		KO IES	1150,96±59,65	3
Szociabilitás WT-KO	25a.	WT SAL	80,85±3,53	9
		WT PIC	57,93±3,99	16
		KO SAL	57,77±2,01	8
		KO PIC	61,47±2,97	10
Rotarod WT-KO	25b.	WT SAL	134,75±9,4	5
		WT PIC	106,23±8,93	8
		KO SAL	103,63±4,72	8
		KO PIC	113,26±8,79	10
Repetitív tisztálkodás WT-KO	25c.	WT SAL	74,4±15,71	8
		WT PIC	137,76±19,7	16
		KO SAL	118,72±13,39	8
		KO PIC	94,63±15,17	10
Üveggolyó ásás WT-KO	25d.	WT SAL	11,56±1,34	9
		WT PIC	14,75±0,45	16
		KO SAL	8,00±0,92	8
		KO PIC	10,2±0,59	10
Nyílt tér WT-KO	26.	WT SAL	2911±320	6
		WT PIC	2787±210	4
		KO SAL	3564±951	4
		KO PIC	3666±313	6
Purkinje sejtek WT-KO	27.	WT SAL	31,76±0,57	4

		WT PIC	20,89±0,55	4
		KO SAL	22,51±0,64	3
		KO PIC	17,08±0,75	3
Szinaptoszómák WT-KO	28.	WT SAL	20,81±2,24	8
		WT PIC	47,22±6,33	5
		KO SAL	51,37±3,98	4
		KO PIC	48,75±5,25	5
IL-1 $\alpha$ anyai vérben WT-KO	29.	WT SAL	8,98±2,37	3
		WT PIC	44,11±3,70	3
		KO SAL	0	3
		KO PIC	0,42±0,41	3
IL-1 $\beta$ anyai vérben WT-KO		WT SAL	0	3
		WT PIC	0	3
		KO SAL	0	3
		KO PIC	0	3
IL-6 anyai vérben WT-KO		WT SAL	57,73±24,04	3
		WT PIC	699,27±59,09	3
		KO SAL	0	3
		KO PIC	56,65±11,32	3
IL-10 anyai vérben WT-KO		WT SAL	0	3
		WT PIC	0	3
		KO SAL	0	3
		KO PIC	0	3
KC anyai vérben WT-KO		WT SAL	18,72±5,09	3
		WT PIC	65,47±16,03	3
		KO SAL	0,11±0,10	3
		KO PIC	52,13±12,52	3
TNF $\alpha$ anyai vérben WT-KO		WT SAL	0	3
		WT PIC	0	3
		KO SAL	0	3
		KO PIC	0	3
IL-1 $\alpha$ embrió agyban WT-KO	30.	WT SAL	0	6
		WT PIC	0,00±0,00	6
		KO SAL	0,20±0,14	6
		KO PIC	0	6
IL-1 $\beta$ embrió agyban WT-KO		WT SAL	0,09±0,07	6
		WT PIC	0,23±0,11	6
		KO SAL	0	6
		KO PIC	0,28±0,13	6
IL-6 embrió agyban WT-KO		WT SAL	0,68±0,34	6
		WT PIC	3,18±0,39	6
		KO SAL	1,18±0,12	6
		KO PIC	1,20±0,65	6

IL-10 embrió agyban WT-KO		WT SAL	1,52±1,51	6
		WT PIC	1,25±0,88	6
		KO SAL	1,76±0,24	6
		KO PIC	0,23±0,22	6
KC embrió agyban WT-KO		WT SAL	0,46±0,23	6
		WT PIC	2,17±0,25	6
		KO SAL	0,11±0,06	6
		KO PIC	0,69±0,40	6
TNF- $\alpha$ embrió agyban WT-KO		WT SAL	0	6
		WT PIC	0	6
		KO SAL	0	6
		KO PIC	0	6
ATP anyai vérben	31.	WT SAL	116,40±11,56	5
		WT PIC	401,84±46,00	6
ADP anyai vérben		WT SAL	549,52±52,00	5
		WT PIC	1142,15±135,79	6
AMP anyai vérben		WT SAL	3679,79±603,69	5
		WT PIC	5355,67±633,69	6
Adenozin anyai vérben		WT SAL	769,35±486,47	5
		WT PIC	907,20±329,43	6
ATP	32.	WT SAL	140,86±13,77	5
		WT PIC	523,98±52,07	6
ADP		WT SAL	276,76±21,56	5
		WT PIC	227,93±32,12	6
AMP		WT SAL	141,85±8,53	5
		WT PIC	49,77±6,03	6
Aden		WT SAL	39,48±1,66	5
		WT PIC	40,60±3,79	6
NA anyai vérben	33.	WT SAL	697,44±42,11	31
		WT PIC	1041,07±284,38	21
5HIA anyai vérben		WT SAL	1600,71±76,39	31
		WT PIC	2216,43±322,69	21
5HTP anyai vérben		WT SAL	11218±461,99	31
		WT PIC	10922±322,69	21
DOPAC anyai vérben		WT SAL	2052,66±171,10	31
		WT PIC	2378,24±269,29	21
DA anyai vérben		WT SAL	76,49±20,38	31
		WT PIC	190,14±150,16	21
5HT anyai vérben		WT SAL	1913,68±578,75	31
		WT PIC	5887,7±2003,17	21
HVA embrió agyban	34.	WT SAL	16,00±1,27	31
		WT PIC	12,07±0,85	21
NA embrió agyban		WT SAL	9,08±0,58	31

		WT PIC	32,93±2,89	21
5HIA embrió agyban		WT SAL	629,18±31,38	31
		WT PIC	152,84±10,70	21
5HTP embrió agyban		WT SAL	163,55±7,79	31
		WT PIC	103,36±8,10	21
DOPAC embrió agyban		WT SAL	87,79±3,22	31
		WT PIC	24,63±2,98	21
DA embrió agyban		WT SAL	16,88±1,59	31
		WT PIC	33,86±1,96	21
5HT embrió agyban		WT SAL	117,54±10,32	31
		WT PIC	229,99±22,86	21
TBR1 intenzitás WT-KO	35.	WT SAL	10,78±5,97	3
		WT PIC	7,45±2,63	3
		KO SAL	9,12±3,57	3
		KO PIC	9,33±3,08	3
Szociabilitás anyai JNJ	36a.	VEH SAL	71,59±5,62	8
		VEH PIC	54,61±1,28	8
		JNJ SAL	58,03±1,39	8
		JNJ PIC	66,01±2,28	8
Rotarod anyai JNJ	36b.	VEH SAL	110,47±6,25	8
		VEH PIC	86,75±5,36	8
		JNJ SAL	111,63±4,20	8
		JNJ PIC	134,40±6,27	8
Repetitív tisztálkodás anyai JNJ	36c.	VEH SAL	62,93±13,88	8
		VEH PIC	127,68±25,49	8
		JNJ SAL	37,66±14,63	8
		JNJ PIC	52,38±10,56	8
Üveggolyó ásás anyai JNJ	36d.	VEH SAL	5,5±1,26	8
		VEH PIC	12,87±0,76	8
		JNJ SAL	9,37±0,67	8
		JNJ PIC	6,50±1,05	8
Purkinje sejtek anyai JNJ	37.	VEH SAL	24,38±0,94	3
		VEH PIC	16,60±0,88	3
		JNJ SAL	27,30±1,19	3
		JNJ PIC	27,19±1,07	3
Szinaptoszómák anyai JNJ	38.	VEH SAL	15,47±3,82	3
		VEH PIC	61,88±1,93	8
		JNJ SAL	26,28±2,87	4
		JNJ PIC	33,79±1,39	5
IL-1 $\alpha$ anyai vérben anyai JNJ	39.	VEH SAL	13,81±8,32	4
		VEH PIC	13,93±8,21	3
		JNJ SAL	19,70±6,68	4
		JNJ PIC	2,68±2,68	3

IL-1 $\beta$ anyai vérben anyai JNJ		VEH SAL	14,72 $\pm$ 12,10	4
		VEH PIC	6,35 $\pm$ 3,62	3
		JNJ SAL	2,61 $\pm$ 0,51	4
		JNJ PIC	5,14 $\pm$ 3,21	3
IL-6 anyai vérben anyai JNJ		VEH SAL	6,16 $\pm$ 3,16	4
		VEH PIC	345,02 $\pm$ 222,36	3
		JNJ SAL	0,62 $\pm$ 0,36	4
		JNJ PIC	102,62 $\pm$ 58,24	3
IL-10 anyai vérben anyai JNJ		VEH SAL	18,37 $\pm$ 18,37	4
		VEH PIC	107,92 $\pm$ 92,58	3
		JNJ SAL	0	4
		JNJ PIC	7,07 $\pm$ 4,42	3
KC anyai vérben anyai JNJ		VEH SAL	8,65 $\pm$ 3,32	4
		VEH PIC	82,34 $\pm$ 13,60	3
		JNJ SAL	4,24 $\pm$ 1,20	4
		JNJ PIC	42,61 $\pm$ 19,14	3
TNF- $\alpha$ anyai vérben anyai JNJ		VEH SAL	8,01 $\pm$ 8,01	4
		VEH PIC	47,61 $\pm$ 32,30	3
		JNJ SAL	0	4
		JNJ PIC	17,75 $\pm$ 10,08	3
IL-1 $\alpha$ embrió agyban anyai JNJ	40.	VEH SAL	0,87 $\pm$ 0,97	5
		VEH PIC	0	5
		JNJ SAL	0	4
		JNJ PIC	0	4
IL-1 $\beta$ embrió agyban anyai JNJ		VEH SAL	1,23 $\pm$ 0,87	5
		VEH PIC	1,26 $\pm$ 0,53	5
		JNJ SAL	0,71 $\pm$ 0,29	4
		JNJ PIC	0,63 $\pm$ 0,43	4
IL-6 embrió agyban anyai JNJ		VEH SAL	0,35 $\pm$ 0,35	5
		VEH PIC	25,41 $\pm$ 4,45	5
		JNJ SAL	0,21 $\pm$ 0,10	4
		JNJ PIC	1,85 $\pm$ 0,65	4
IL-10 embrió agyban anyai JNJ		VEH SAL	1,88 $\pm$ 2,11	5
		VEH PIC	1,29 $\pm$ 1,44	5
		JNJ SAL	1,15 $\pm$ 1,15	4
		JNJ PIC	0	4
KC embrió agyban anyai JNJ		VEH SAL	2,83 $\pm$ 0,24	5
		VEH PIC	7,05 $\pm$ 1,18	5
		JNJ SAL	2,44 $\pm$ 0,47	4
		JNJ PIC	1,71 $\pm$ 0,30	4
TNF $\alpha$ embrió agyban anyai JNJ		VEH SAL	1,19 $\pm$ 1,33	5
		VEH PIC	0,56 $\pm$ 0,63	5
		JNJ SAL	0	4

		JNJ PIC	0	4
TBR1 intenzitás anyai JNJ	41.	VEH SAL	11,04±2,26	3
		VEH PIC	7,71±2,35	3
		JNJ SAL	10,81±5,08	3
		JNJ PIC	10,96±4,53	3
Szociabilitás utód JNJ	42a.	SAL VEH	65,85±3,55	8
		PIC VEH	48,44±6,41	6
		SAL JNJ	59,76±3,76	6
		PIC JNJ	66,20±5,02	11
Rotarod utód JNJ	42b.	SAL VEH	120,94±6,3	8
		PIC VEH	66,02±5,73	6
		SAL JNJ	128,79±7,84	6
		PIC JNJ	136,12±10,74	11
Repetitív tisztálkodás utód JNJ	42c.	SAL VEH	74,80±9,56	8
		PIC VEH	118,26±15,28	9
		SAL JNJ	83,87±15,34	8
		PIC JNJ	54,906±11,91	7
Üveggolyó ásás utód JNJ	42d.	SAL VEH	8,31±0,92	16
		PIC VEH	12,30±0,97	13
		SAL JNJ	7,64±1,06	14
		PIC JNJ	8,82±0,93	17
Purkinje sejtek utód JNJ	43.	SAL VEH	23,41±0,85	3
		PIC VEH	18,62±1,04	3
		SAL JNJ	23,00±0,69	3
		PIC JNJ	25,92±0,50	3
Szinaptoszómák utód JNJ	44.	SAL VEH	23,05±1,41	5
		PIC VEH	39,28±2,28	4
		SAL JNJ	31,73±3,44	4
		PIC JNJ	29,43±3,03	4
Tirozinhidroxiláz pozitív sejtek	45.	kontroll	154,29±12,65	5
		rotenon	91,55±8,36	5
		rot+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	130,54±13,70	4
		rasagilin	102,27±5,72	4
		SZV558	167,15±15,12	4