

A P2X7 receptor részvétele a központi idegrendszer fiziológiás és kóros működésében: a migrén patofiziológiájában és a hippocampusz szerotonerg transzmissziójának szabályozásában

Doktori értekezés

Gölöncsér Flóra

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlágth Beáta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Lévay György, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Bárdos György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagok: Dr. Mike Árpád, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2018

Tartalom

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés	7
2.1	Purinerger jelátvitel az idegrendszerben	8
2.1.1	ATP, mint neurotranszmitter	8
2.1.2	P2X7 receptor.....	10
2.1.2.1	A P2X7 receptor alapvető tulajdonságai	11
2.1.2.2	Agonista és antagonisták hatása a P2X7 receptoron.....	14
2.1.2.3	P2X7 receptorok által indukált jelátviteli mechanizmus.....	16
2.1.3	A P2X7 receptor funkciói	17
2.1.3.1	Glutamát felszabadulás	18
2.1.3.2	Purin felszabadulás.....	18
2.1.3.3	Citokinek felszabadulása.....	18
2.1.3.4	MCP-1/CCL2 felszabadulás.....	19
2.1.4	A P2X7 receptor és patológiai állapotok	20
2.2	Fájdalom.....	20
2.2.1	Purinerger mechanizmusok és fájdalom.....	22
2.2.1.1	P2X7 receptor szerepe a neuropátiás és gyulladásos fájdalomban	23
2.2.2	A migrén.....	24
2.2.2.1	Az ATP, a P2 receptorok és a migrén	26
2.2.2.2	Fejfájás és migrén állatmodelljei.....	29
2.3	Szerotonerg neurotranszmisszió.....	30
2.3.1	A raphe magok eltérő szerepe a neuromodulációban.....	32
2.3.2	Szerotonerg moduláció a hippokampusban	33
2.3.3	P2 receptorok szerepe a szerotonerg neurotranszmitter rendszerben.....	36
3	Célkitűzések.....	37
4	Módszerek.....	40

4.1	Kísérleti állatok	40
4.2	NTG indukált migrén modell	41
4.2.1	Emelkedő hőmérsékletű hot plate teszt	41
4.2.2	Drogok és kezelések	42
4.2.3	TNC immunhisztokémia	43
4.3	Optogenetika	44
4.3.1	Kísérleti elrendezés	45
4.3.2	Vírus beadása és optogenetikai paraméterek.....	45
4.3.3	Vírus injektált egerek lokomotoros aktivitásának és freezing viselkedésének monitorozása optogenetikai ingerlés hatására	46
4.3.4	Túlélő agyszelet preparálása	48
4.3.5	<i>In vitro</i> [³ H]szerotonin és [³ H]glutamát felszabadulás mérése egér median raphe és hippocampusz szeletekből szövetperfúziós technika segítségével	48
4.3.6	Mikrodialízis szonda beültetése	50
4.3.7	Mikrodialízis kísérletek.....	50
4.3.8	Transzmitterek meghatározása magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)	51
4.3.9	Szövettani ellenőrzés.....	52
4.4	Statisztikai analízis.....	53
5	Eredmények.....	55
5.1	A P2X7 receptorok genetikai deléciójának és farmakológiai antagonizmusának hatása migrén állat modellben.....	55
5.1.1	A P2X7 receptor genetikai deléciójának hatása az NTG indukált termális hiperszenzitivitásra.....	55
5.1.2	A P2X7 receptor antagonista megakadályozza az NTG-indukált termális hiperszenzitivitást.....	57
5.1.3	Az NTG indukálta c-Fos expresszió a trigeminus magban és a gerincvelőben ..	60
5.2	A P2X7 receptorok részvétele a hippocampális 5-HT felszabadulás szabályozásában a median raphe terminálisainak optogenetikai stimulálását követően	63

5.2.1	A ChR2-EYFP expressziója MRR és HP egér neuronokban	63
5.2.2	Az MRR ChR2-t expresszáló neuronjainak optikai stimulálása a lokomotoros aktivitás és a freezing viselkedésforma változásait okozza.....	65
5.2.3	A MRR elektromos és optikai stimulációja [³ H]5-HT felszabadulást eredményez	67
5.2.4	A HP elektromos és optikai stimulációja [³ H]5-HT felszabadulást eredményez	74
5.2.5	A hippocampális [³ H]5-HT felszabadulás modulálása 5-HT ₁ autoreceptorokkal	77
5.2.6	A hippocampális [³ H]5-HT felszabadulás modulálása P2X7 receptorokkal	78
5.2.7	Az <i>in vivo</i> optikai és K ⁺ stimuláció hatása az 5-HT, glutamát (Glu) és GABA szintekre az MRR-ben mikrodialízis vizsgálatokban	82
6	Megbeszélés.....	86
6.1	A P2X7 receptorok genetikai deléciójának és farmakológiai antagonizmusának hatása migrén állat modellben.....	86
6.2	A P2X7 receptorok részvétele a hippocampális 5-HT felszabadulás szabályozásában a median raphe terminálisainak optogenetikai stimulálását követően	88
7	Következtetések	94
8	Összefoglalás.....	96
9	Summary	97
10	Irodalomjegyzék	98
11	Saját publikációk jegyzéke	130
12	Köszönetnyilvánítás	132
13	Függelék	133

1 Rövidítések jegyzéke

5-HT – szerotonin

AAV – adeno asszociált vírus

aCSF – cerebrospinalis folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

ADP – adenzin 5-difoszfát

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav

ATP – adenzin 5-trifoszfát

AZ – AZ 10606120, potens P2X7 receptor antagonist

BBG – Brilliant Blue G, szelektív P2X7 receptor antagonist

BSA – borjú szérum albumin (bovine serum albumin)

BUSP – buspiron

CA1 – Cornum ammonis 1, Ammonszer

CCL2 – kemokin ligand 2

CGRP – kalcitonin gén relációs peptid

ChR2 – channelrhodopsin-2

CNQX – 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion, potens AMPA/kainát antagonist

CSD – tovaterjedő kérgi gátlás (cortical spreading depression)

AP-5 – 2-amino-5-foszfopentánsav, potens és szelektív NMDA antagonist

DA – Dalton

DNS – dezoxiribonukleinsav

DR – *dorsalis raphe*

DRG – hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion)

EDTA – etiléndiamintetraecetsav

ERK – extracelluláris szignál-regulált kinázok

FHM – monogénes familiáris hemiplegikus migrén

FR% – frakcionális transzmitter felszabadulás % (fractional release)

FRS – stimuláció által kiváltott frakcionális felszabadulás

GABA – Gamma-aminovajsav

Glu – glutamát

HP – hippocampus

HPLC – magas nyomású folyadékkromatográfia (high pressure liquid chromatography)

ICE – interleukin converting enzyme / interleukin-1 β konvertáz enzim / kaszpáz-1

IL-1 β – interleukin-1 β

IL-6 – interleukin-6

i.p. – intraperitoneális

JNJ – JNJ47965567, potens és szelektív P2X7 receptor antagonist

KIR – központi idegrendszer

KO – génkiütött, -/- (knock out)

LPS – lipopoliszacharid

MAO – monoamino-oxidáz

mGLUR – metabotróp glutamát receptor

MPC-1 – monocita kemoaktrátans protein-1

MR – *medialis raphe*

mRNS – hírvivő ribonukleinsav, messenger ribonucleic acid

MRR – median raphe régió

mTOR – mammalian target of rapamycin

NGF – idegi növekedési faktor

NMDA – N-metil-D-aszpartát

NO – nitrogén-monoxid

NTG – nitroglicerín

OGR – Orvosi Géntechnológiai Részleg

P2X – purin ionotróp receptorok

P2X7 – purin ionotróp receptor altípus 7

P2Y – purin metabotróp receptorok

p38 MAPK – p38 mitogén aktivált protein kináz

PAG – periaquaeductalis szürkeállomány

Panx-1 – pannexin-1 csatorna

PBS – foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat, 0.1 M, pH 7.4

PCR – polimeráz láncreakció, polymerase chain reaction

PFA – paraformaldehid, 4%, pH 7.4

PKS – perklórsav

PPADS – piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-szulfonsav

PWT – végtagelrántási küszöbérték (paw withdrawal threshold)

SEM – átlag szórása, standard error of the mean

SNP – egy-pontos polimorfizmus, single nucleotide polymorphism

SUMA – szumatriptán

UDP – uridin 5-difoszfát

UTP – uridin 5-trifoszfát

TNC – kaudális trigeminális mag

TNF – tumor nekrozis faktor

TTX – tetrodotoxin

VVE – Viselkedés Vizsgálati Egység

WT – vad típusú, +/+ (wild type)

2 Bevezetés

Az idegrendszer működésében fontos kommunikációs forma az idegsejtekből felszabaduló neurotranszmitterek és neuromodulátorok útján megvalósuló kémiai kommunikáció. A klasszikus transzmitterek (acetilkolin, noradrenalin, dopamin, szerotonin, glutamát, GABA) mellett ma már az általánosan elfogadott jelátvivő anyagok közé tartozik az adenzin 5-trifoszfát (ATP) és az adenzin, amelyek a jelátvitel nem hagyományos típusát valósítják meg az idegrendszerben és egyéb szervekben¹. Az ATP biológiai hatásait a P2 receptorok (P2X és P2Y) családján keresztül fejtik ki, amelyek közül a P2X7 receptorra fókuszált doktori munkám.

A disszertációmban összefoglalt kutatás során a purinerg jelátvitel központi idegrendszerben való vizsgálatát tűztem ki célul, a bemutatott kísérletes munka fő célja, hogy megértsük a neuronális és gliális P2X7 receptorok szerepét különböző patofiziológiás állapotokban. A dolgozat alapját két első szerzős cikkem képezi, amelyek – bár mindkettőben a P2X7 receptorok szerepét vizsgáltuk – két különböző témával kapcsolatban elért eredményeimet mutatják be:

(1) A purinerg jelátvitel részvétele a fájdalominger feldolgozásban a központi idegrendszerben széles körben kifejeződő P1 és P2 receptorok aktivitásával valósul meg: neuronokon, és glia sejteken, valamint az érrendszerben lévő simaizmokon és endothelen keresztül. Számos P2 receptor antagonistával végeztek sikeres kísérleteket különböző fájdalom modellekben, így nem meglepő, hogy szerepük migrén patomechanizmusával kapcsolatban is felmerül, és lehetséges célpontot jelenthetnek új migrén terápiákban. Feltételeztük és igazolni szerettük volna, hogy a P2X7 receptor szerepet játszik a fejfájások kialakulásában és a migrénben. Így munkám első részében a P2X7 receptor szerepét vizsgáltuk meg a migrén patomechanizmusában, P2X7 receptor génkiütött egerek és P2X7 receptor antagonisták kezelése, valamint nitroglicerinnel (NTG) indukálta migrén egér modell segítségével.

(2) Munkám következő részében ugyancsak a P2X7 receptor szerepét vizsgáltam, de egy másik agyi folyamatban, mégpedig a szerotonin felszabadulás modulációjában. Számos közlemény számolt be a purin receptorok moduláló szerepéről a neurotranszmisszióban²⁻⁴: a központi idegrendszerben az ATP legalábbis mikromoláris koncentrációban felszabadul idegi aktivitás során az extracelluláris térbe, amely a hippokampális purin receptorok aktiválásával képes a szerotonerg transzmisszió

modulálására a hippokampusban⁵. A P2X7 receptor szerepe ismert számos neurotranszmitter felszabadulásának modulációjában, ugyanakkor a szerotoninnal kapcsolatban ez a fajta moduláció még nem tisztázott. Az agytörzsi median rapheból induló szerotonerg/glutamáterg raphe-hippokampális pálya hatékonyan képes befolyásolni a hippokampusban végbemenő kódolási folyamatokat, továbbá, a median rapheban lévő glutamáterg neuronoknak moduláló szerepük lehet a felszálló szerotonerg neuronok működésében, azonban ezzel kapcsolatban kevés funkcionális adat áll rendelkezésünkre. Ezért, hogy jobban megértsük a szerotonerg transzmisszió jellegzetességeit a median rapheban és hippokampusban, illetve azt befolyásoló glutamát és ATP szerepét, valamint azon keresztül a purin receptorok aktiválódását, vizsgálatunkban specifikus optogenetikai ingerlést használtunk. Vad és P2X7 receptor génkiütött egerekkel és P2X7 receptor antagonistákkal vizsgáltuk meg a szerotonerg transzmisszió változásait a raphe magvak hippokampális afferenseit *in vivo* és *in vitro* optogenetikai stimulációval ingerelve.

2.1 Purinerg jelátvitel az idegrendszerben

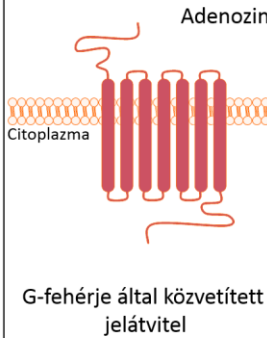
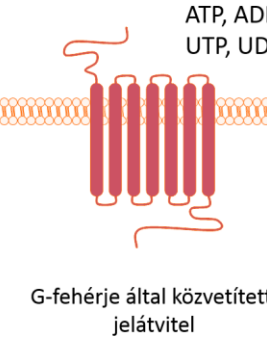
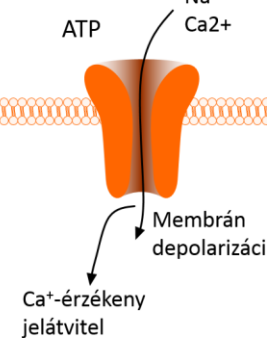
2.1.1 ATP, mint neurotranszmitter

Az ATP eredetileg a sejtek anyagcsere ellátásának fő „üzemanyagaként” vált közismertté, de később Burnstock úttörő munkásságának köszönhetően vált ismertté, mint extracelluláris jelátviteli molekula és neurotranszmitter^{6,7}. Az ATP fontos szerepet játszik a neuronális és nem-neuronális sejtek közötti jelátvitelben, így pl. a glia-neuron, valamint az immunsejtek egymás közti kommunikációjában. A sejten belül koncentrációja millimoláris tartományban mozog, míg a sejten kívüli koncentrációja függ a felszabadulási és lebomlási folyamatok egyensúlyától, így nanomoláristól mikromoláris tartományig változhat extracelluláris szintje. Mivel az ATP erősen poláris molekula, nem képes önálló membrántranszportra, így az extracelluláris térbe jutása a különböző módokon történhet: exocitózissal a szinaptikus vezikulákból⁸⁻¹¹, transzmembrán transzporttal az intakt sejtmembránon keresztül¹²⁻¹⁴, valamint citolitikusan a membránréseken keresztül a sérült sejtekből.

A purinerg receptorok felfedezésével bebizonyosodott az ATP közvetítői szerepe az autokrin és parakrin jelátvitelben, ami a plazmamembránban elhelyezkedő specifikus purin receptorokon keresztül történik¹⁵⁻¹⁷. Az ATP, mint kotranszmitter a perifériás és központi idegrendszer minden idegében megtalálható^{16,18,19}, így pre- és posztzinaptikus receptor agonistákkal történő közvetlen aktivációja is képes jelentős ATP felszabadulást előidézni. Az ATP élettideje rövid az extracelluláris térben, hamar inaktiválódik és ektoenzimek hidrolizálják AMP-vé és adenzinná.

A kezdeti kutatások óta számos figyelemreméltó előrelépés történt a purinerg jelátvitel területén, feltárva annak fontos szerepét az agy élettani működésében, fejlődésében és rendellenességeiben.

A purinreceptorok kutatása során az is nyilvánvalóvá vált, hogy az ATP és a nukleotidok, valamint az ATP hidrolizált formái különböző P1(A) adenzin és P2 nukleotid receptorokhoz kötődnek, így egymástól független rendszert alkotnak²⁰. Molekuláris klónozás és farmakológiai jellemzés segítségével a P1 receptorok A1, A2A, A2B és A3 csoportokra oszthatók, melyek G-fehérje kapcsolt receptorok és adenzin kötődésével aktiválódnak. A P2 receptorokat az ADP vagy ATP és UTP vagy UDP aktiválja²¹⁻²³ (1. ábra). A purinok és pirimidinek meghatározó szerepet játszanak a neuronális és a nem-neuronális sejtek aktivitásában^{24,25}. Molekulaszerkezet és a farmakológiai profil alapján a P2 receptorokat két nagycsaládba sorolhatjuk: ligand-függő ion-csatorna P2X és G-fehérje kapcsolt P2Y receptorokéba. A P2X receptor család hét tagból áll (P2X(1-7)), míg a P2Y receptorok nyolc tagból állnak, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, és P2Y14²⁶⁻²⁸ (1. ábra).

Purinergerceptorok			
Család	Adenozin/P1 receptorok (P1Rs)	P2 receptorok (P2Rs)	
Alcsalád	-	P2Y	P2X
Receptor altípusok	A1, A2A, A2B, A3	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14	P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7
Szerkezet	G-fehérje kapcsolt receptorok	G-fehérje kapcsolt receptorok	Ligand-függő ion-csatornák
Ligandumok	 <p>Adenozin</p> <p>G-fehérje által közvetített jelátvitel</p>	 <p>ATP, ADP UTP, UDP</p> <p>G-fehérje által közvetített jelátvitel</p>	 <p>ATP</p> <p>Na⁺ Ca²⁺</p> <p>Membrán depolarizáció</p> <p>Ca²⁺-érzékeny jelátvitel</p>

1. ábra: A purinergerceptorok családja; osztályozás, szerkezet, jelátviteli útvonal. A purinergerceptorok családjába az adenozin-aktivált P1(A) és nukleotid aktivált P2 membrán receptorok tartoznak. Farmakológiai profil és szerkezet alapján két alcsoportot azonosítottak. A P2X receptorok trimer ATP-függő plazmamembrán ioncsatornák, míg a P2Y receptorok klasszikus G-fehérje kapcsolt receptorok²⁹.

2.1.2 P2X7 receptor

Az eredetileg P2Z receptornak nevezett P2X7 receptor – amelyet először patkány agyból klónoztak 1996-ban^{30,31} – ATP-érzékeny ligand-függő kation csatorna, amely hematopoetikus és immunsejteken fejeződik ki, mint például hízósejteken, monocitákon, makrofágokon³². Emellett a központi és perifériás idegrendszer glia sejtjein is megtalálható, mint az asztrocitákon, a mikrogliaon, az oligodendrocitákon, az endimális sejteken, a Schwann sejteken, a radiális glián és szatellit sejteken. Bár a P2X7 idegi expressziója a mai napig vitatott kérdés, jelenlétét kimutatták a preszinaptikus idegvégződéseken is³³⁻³⁷, valamint szimpatikus- és enterikus idegsejteken, hátsó gyöki ganglion idegsejteken és centrális neuronokban (retina ganglion idegsejteken, kisagyi

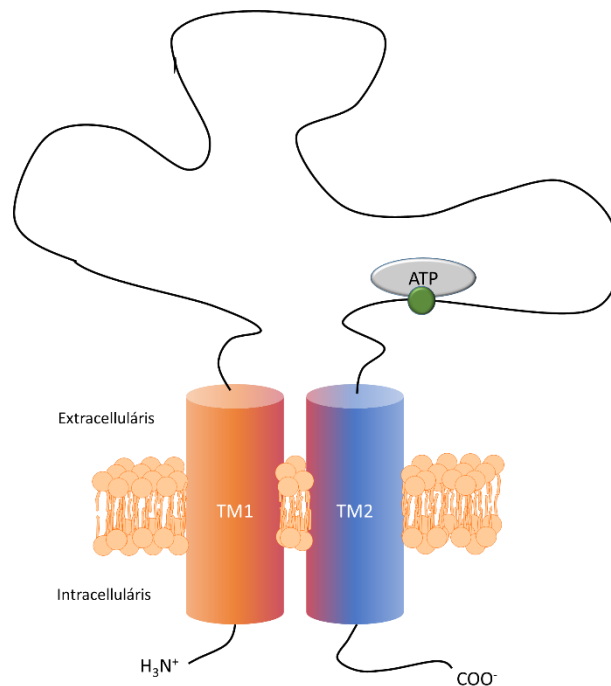
szemcsesejteken), valamint hippokampális-kortikális piramissejteken és interneuronokon³⁸⁻⁴².

Az asztrociták és idegsejtek közötti jelátvitelt többek között az ezekből a sejtekből felszabaduló ATP közvetíti. Mivel a P2X7 receptor az immun- kemoetens sejtekben is kifejeződik, ezért fontos szerepet játszik a neuroinflammációban^{43,44} és a neurodegenerációban⁴⁵, kommunikációs hidat képezve az immun- és idegrendszer között.

2.1.2.1 A P2X7 receptor alapvető tulajdonságai

A P2X7 receptor egy 595 aminosavból álló fehérje, melynek karboxil végződése hosszabb, mint a P2X receptor család többi tagjé⁴⁶ (2. ábra).

- Két TM1 és TM2 transzmembrán doménnel rendelkezik,
- amelyekhez az ATP kötőhelyet tartalmazó extracelluláris hurok, és
- intracelluláris N- és C-terminális domének kapcsolódnak.



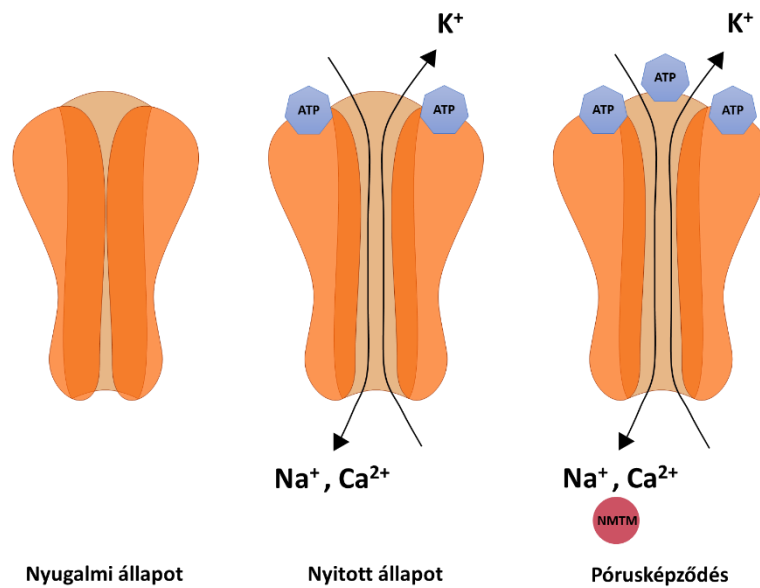
2. ábra: P2X7 receptor alegység vázlatos ábrázolása. A receptor a következőkből áll: intracelluláris N- és C-terminális valamint két transzmembrán domén, melyek az extracelluláris hurkon keresztül kapcsolódnak⁴⁷.

A P2X7 receptor számos olyan jellemzővel rendelkezik, amelyek különböznek a P2X receptor család többi tagjától, ezért különös figyelmet érdemel. Az alábbiakban a P2X7 receptor néhány szerkezeti és funkcionális tulajdonságát mutatom be.

A P2X7 receptor 3 homomer alegységből áll. Az alegységek hosszú citoplazmatikus C-terminálban végződnek, amely fehérje-fehérje interakciós kötőhelyekkel rendelkezik. Ez a hosszú C-terminális felelős a receptor pórusképző aktivitásáért és kiváltja a kaszpáz-1 aktiválódását is^{48,49}.

A P2X7 receptor aktiválásához, a P2X receptor család többi tagjától eltérően, szubmillimoláris és millimoláris ATP koncentráció szükséges, ami sokkal nagyobb, mint a többi P2X receptorhoz szükséges nanomoláris koncentráció (az ATP EC₅₀ értéke P2X7 receptor esetén 2-4 mM, egyéb P2X receptor esetében 1-10 µM)^{50,51}. Ezenkívül, a P2X7 receptor nagyobb affinitást mutat a BzATP-hez, mint az ATP-hez^{52,53}.

A P2X7 receptor nem szelektív kation csatorna. Képes különböző válaszokat mutatni agonista kötődésére, attól függően, hogy az milyen koncentrációban és milyen időintervallumban van alkalmazva. Az agonista ATP vagy a hatásosabb BzATP expozíciójára úgy nyílik a kation csatorna, hogy lehetővé teszi K⁺ kiáramlását és Ca²⁺ és Na⁺ beáramlását a sejtekbe, míg az agonista P2X7 receptoron történő tartós aktivitása hidrofíli pórus kialakulását eredményezi. Ezek a pórusok permeábilisak akár a 900 Da molekulatömegű molekulákra is, mint például lucifer sárgára (457 Da), Propidium iodidra (414 Da), Ethidium bromidra (314 Da), és metil-glükaminra (190 Da). Az ilyesfajta pórusképződés a P2X2 és P2X4 receptoroknál is megfigyelhető^{54,55} (3. ábra).



3. ábra: A P2X7 receptor nyugalmi és aktív (csatorna nyitott) állapotának vázlatos ábrázolása. (1) A receptor nyugalmi állapotban, (2) nyitott állapotban és (3) pórusképződés során. Az ATP-vel történő rövid stimulálás és annak bekötése az agonista kötőhelyre lehetővé teszi a nátrium és kalcium beáramlásához és kálium kiáramlásához vezető csatorna megnyitását. Az elhúzódó és/vagy ismétlődő ATP stimuláció pórusképződést eredményez, amely lehetővé teszi a nagyobb molekulatömegű molekulák (NMTM) vagy festékek bejutását a sejtekbe.

A P2X7 receptor aktivitását normál fiziológiás körülmények között befolyásolja a kétértékű kationok extracelluláris koncentrációja, úgy mint a Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ⁵⁶⁻⁵⁸, valamint a protonok⁵⁹ és az anionok⁶⁰, így a P2X7 receptor által közvetített funkcionális válasz nagyobb amplitúdójú, ha a Ca^{2+} és Mg^{2+} extracelluláris koncentrációja csökken^{61,62}.

A fenti receptor áramvezető tulajdonságai is eltérőek. Más P2X receptorok aktiválásukkor gyors tranziens válaszreakciót mutatnak, amely másodpercek alatt lejár szodik, míg ez a válaszreakció a P2X7 receptor esetében lassabban cseng le. Az aktiválás után folyamatos a Ca^{2+} beáramlása a sejtekbe, amely tükrözi a nem deszenzitizáló viselkedését^{49,57}.

2.1.2.2 *Agonista és antagonisták hatása a P2X7 receptoron*

A BzATP a P2X7 receptor leghatékonyabb agonistája, amely kalcium beáramlást, pórusképződést és IL-1 β felszabadulást is előidézik rágszálókban és humánban egyaránt. A BzATP-t széles körben használják kutatásokban, mint a P2X7 receptor agonistája, bár nem specifikusan kötődik a P2X7 receptorokhoz, ugyanis kisebb hatékonysággal aktiválja a P2X1 és P2X2 receptorokat is (EC_{50} =0,003 és 0,8 μ M a P2X7 receptorhoz képest). Az agonista hatás szempontjából a BzATP 10-20-szor erősebb a P2X7 receptor aktiválására való képességben (EC_{50} =9 μ M), mint az ATP (EC_{50} > 300 μ M). A 2MeATP, ATP γ S és az ADP kevésbé hatásosak, mint az ATP, továbbá az $\alpha\beta$ MeATP, $\beta\gamma$ MeATP, ADP és az UDP hatástalanok^{23,28}.

Számos P2X7 receptoron végzett kutatás azt mutatja, hogy a P2X7 receptorok válasza a különböző farmakológiai blokkolókkal szemben más és más különböző fajokban^{63,64}. A P2X7 receptor antagonisták listája és azok faj-specifikus érzékenysége az 1. táblázatban látható.

1. táblázat: A P2X7 receptor antagonistái ⁴⁷.

P2X7R antagonisták	Szelektivitás és érzékenység	Referenciák
Kétértékű kationok, kivéve a Zn ²⁺	P2rx7 alloszterikus modulátorai és csökkentik funkcionalitását	56
PPADS tetra-nátrium só	Nem-kompetitív, nem-szelektív P2X receptor antagonista alacsony határfokkal és kis altípus szelektivitással.	65
Suramin	P2rx7 nem-kompetitív, nem-szelektív antagonistája 100 µM koncentrációban.	66
oxidált ATP (oxATP)	P2rx7 irreverzibilis kevésbé potens antagonistája, hosszú előinkubációs időt (1-2 óra) igényel, hogy hatékony lehessen. Reverzibilisen blokkolja P2rx1 és P2rx2.	67, 68
KN-62	A P2rx7 nem-kompetitív és nem-szelektív blokkolója, gátolja a BzATP által kiváltott áramot humánban, de nem patkányban.	67, 69
KN-62 analógok (N-aril-piperazin és 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin származékok)	P2rx7 agonista hatékonysága alacsonyabb, mint a KN-62 esetén.	70, 71, 72
Brilliant Blue G (BBG)	Közepesen szelektív P2rx7 antagonista nanomoláris koncentrációban. Hatékonysága patkányban (10 nM), humánban (100 nM).	67, 73
A-740003	Kompetitív, specifikus és potens P2rx7 antagonista patkányban és humánban is. Befejezett preklinikai szakaszban van.	74
A-438079	Kompetitív antagonista, egyenlően potens humánban és patkányban. Befejezett preklinikai szakaszban van.	67, 75, 76
A-804598	Erősen potens és szelektív humánban, patkányban és egérben. Befejezett preklinikai szakaszban van.	77
AZ 116453743	Nagyon szelektív és potens P2rx7 antagonista nM-os koncentrációban. Hatékonyabb humánban, mint patkányban. Befejezett preklinikai szakaszban van.	67, 78
AZ 10606120	P2rx7 negatív alloszterikus modulátora. Potensebb patkányban, mint humánban. Befejezett preklinikai szakaszban van.	79
Piridoxál-5-foszfát	Potensebb humánban és patkányban, mint egérben.	80
HMA	Gátolja humánban és egérben, de nem patkányban.	80
Coomassie Brilliant Blue	Szelektív P2rx7 antagonista.	80
Adamantán-karboxamid	Hatékonyabb humánban, mint patkányban.	81
Arilhidrazid A-847227	Nagyon potens és szelektív P2rx7 antagonista humánban.	82
Ariltetrazol és ariltriazol	Potensebb humánban, mint patkányban.	82
GSK314181A	Humánban nM-os, patkányban mM-os koncentrációban gátol.	83, 84
GSK1482160	P2rx7 receptor alloszterikus modulátora. Humánban tesztelt.	85, 86
Evotec	Befejezett klinikai fázis I. szakaszban van.	63
AZD9056	Potens, szelektív orálisan elérhető P2rx7 antagonista. Fázis II-ben megbukott reumatoid artritisz kezelésében.	87
CE-224,535	Szelektív P2rx7 antagonista. megbukott fázis IIA-ban reumatoid artritisz kezelésében.	88

A P2rx_ jelölés a P2X_ receptorokat jelenti.

Számos egyéb vegyületet is kifejlesztettek és szabadalmaztattak különböző gyógyszerfejlesztő cégek és csoportok, például a Pfizer. Ezek közé tartoznak a cián-guanidinek, triazolok, policiklikus benzamidok és növényi alkaloidák is. Jó néhány közülük klinikai vizsgálatban van és sikeresen átment a fázis I-en, mások viszont elbuktak a fázis II-ben^{89,90}.

2.1.2.3 P2X7 receptorok által indukált jelátviteli mechanizmus

A P2X7 receptorok különböző sejtípusokban különböző intracelluláris jelátviteli útvonalakat közvetítenek, amelyek összefoglalva a 2. táblázatban láthatók.

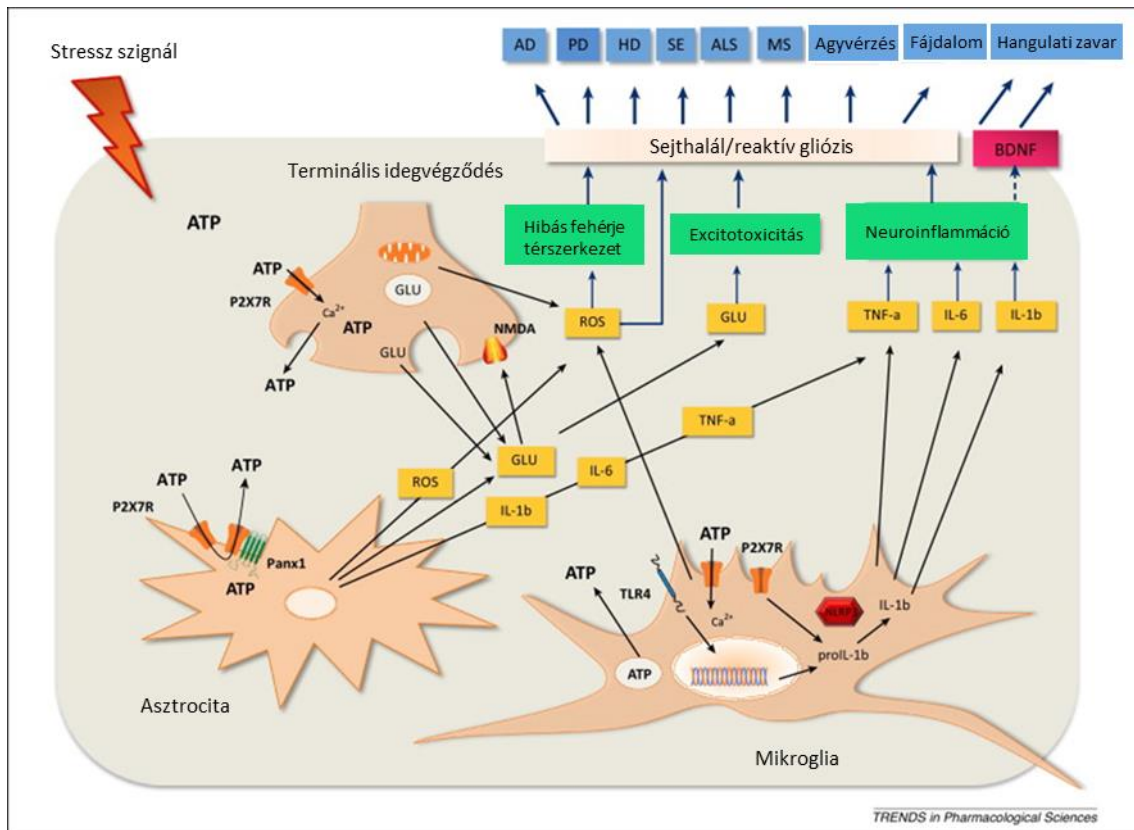
2. táblázat: A P2X7 receptor által aktivált jelátviteli útvonalak különböző sejtípusokban⁴⁷.

Jelátviteli útvonal	Sejtípus	Referenciák
Rho-függő útvonal	MG6 sejtek	91
Akt	Agykérgi asztrociták, 1321N1 asztrocitoma sejtvonala	92
ERK1/2	1321N1 asztrocitoma sejtvonala, kisagyi granuláris neuron, humán asztrociták, idegi progenitor sejtek, mikroglia, RBA-2, makrofág	93, 94, 95, 96, 97, 98
PKC	RBA-2 asztrociták, idegi progenitor sejtek, makrofágok, mikroglia	99, 100, 98
p38MAPK	Mikroglia, asztrociták, PC-12 sejtek, neuronok	101, 102, 99, 103
JNK	Mikroglia	104
GSK3	Kisagyi granuláris neuronok	105

Akt: Protein kináz B; ERK1/2: extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2; PKC: Protein kináz C; p38MAPK: p38 mitogén aktivált protein kináz; JNK: c-Jun N-terminális kináz; GSK3: glikogén szintáz kináz 3.

2.1.3 A P2X7 receptor funkciói

A P2X7 receptor szerepét leírták poszt- és preszinaptikus aktivitás kapcsán is az idegrendszer számos régiójában, amelyek befolyásolhatják a szinaptikus áramokat vagy a neurotranszmitter felszabadulást^{46,106,107} (4. ábra).



4. ábra: A P2X7 receptor által közvetített jelátviteli útvonalak a különböző etiológiájú központi idegrendszeri rendellenességekben¹⁰⁸. A P2X7 receptorok az idegvégződéseken, az asztrocitákon és a mikroglían expresszálódnak és különböző betegség állapotokban fokozódik az expressziójuk. A stressz szignálok, mint például a hipoxia/ischaemia, mechanikai sérülések és bakteriális vagy kémiai toxinok a P2X7 receptorok endogén aktiválódását eredményezik, amely önmagát erősítő ATP felszabaduláshoz, valamint a P2X7 receptorok további aktiválódásához vezetnek a szomszédos sejtekben.

2.1.3.1 *Glutamát felszabadulás*

A P2X7 receptor szerepét az idegvégződésekből származó glutamát felszabadulás szabályozásában először Sperlágh és mtsai mutatta ki 2002-ben³³. Emellett az asztrocitákon található P2X7 receptorok aktivációja excitátoros neurotranszmitterek, mint például glutamát és aszpartát felszabadulását eredményezi¹⁰⁹. A P2X7 receptorok által mediált glutamát felszabadulás pontosan jellemezhető. A P2X7 receptortól eltérő purinerg receptorok aktivációja az asztrocitákon olyan glutamát felszabadulást vált ki, mely lassú befelé irányuló áramot vált ki, míg a P2X7 receptorhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkező receptorok aktivációja tartós glutamát kiáramlást közvetít, amely tónusos áramot hoz létre a CA1 neuronokban¹¹⁰.

2.1.3.2 *Purin felszabadulás*

A BzATP a purin kiáramlást serkenti olyan asztrocita tenyészetekben, amelyekben a kiáramlás gátolva van réskapcsolat (gap junction) blokkolókkal. Az asztrocitákból származó ATP felszabadulás az intracelluláris Ca^{2+} hullámokat közvetíti az asztrocitákban, amely fontos szerepet játszik az intracelluláris kommunikációban^{111,112}. Szintén ATP felszabadulást figyeltek meg gerincvelői asztrocitákban és 1321 N1 sejtekben alacsony kétvegyértékű kationos oldattal való expozíció után, míg connexin-43 hemicsatornák nem játszanak jelentős szerepet ebben az ATP felszabadulásban¹¹².

2.1.3.3 *Citokinek felszabadulása*

Az extracelluláris ATP aktiválta P2X7 receptorok kulcsszereplői a gyulladásoz folyamatoknak a citokin termelés és apoptózis szabályozása révén. Legismertebb részvétele az IL-1 β termelésben és a makrofágokból, mikroglia és dendritikus sejtekből, monocitákból történő felszabadulásban van¹¹³⁻¹¹⁶, amely tovább fokozódik a lipopoliszacharid(LPS)-indukálta sejtekben. A P2X7 receptor által közvetített IL-1 β felszabadulás kulcsfontosságú lépés a gyulladásoz válasz, láz és fájdalom indukciójában¹¹⁷. A gerincvelő hátsó szarvában a mikroglia aktivációja az IL-1 β felszabadulását eredményezi a p38 MAPK útvonalon keresztül, amelyet fokozott nocicepció kísér¹¹⁸. Míg bakteriális endotoxin (LPS) ingerléssel önmagában csak pro-IL-1 β szabadul fel, addig az érett, aktív IL-1 β produkciójához szükséges másodlagos

externális szignál a P2X7 receptor aktivációja biztosítja, melyhez K^+ -ion konduktancia társul¹¹⁹⁻¹²¹. Az IL-1 β érését és felszabadulását különböző mechanizmusok befolyásolják különféle sejtekben. A P2X7 receptoroknak központi szerepe van a mikroglia sejtekben az IL-1 β LPS stimulációra történő poszttranszlációs feldolgozásában. Egér mikroglia sejtekben az LPS-indukálta ATP felszabadulás az IL-1 β gyors megérését és felszabadulását eredményezi az IL-1 konvertáz enzim aktiválódásával (ICE, kaszpáz-1)^{119,122}. Az egér makrofágokban azonban megfigyelték a kalcium és a kaszpáz-1 függő, valamint ezektől független IL-1 β felszabadulást is. Az utóbbi mechanizmus glicin jelenlétével blokkolható¹²³. Az IL-1 β felszabadulása a sejtekből különböző mechanizmusokon keresztül jöhet létre, mint pl. mikrovezikula lefűződésével, az IL-1 β exoszóma exocitózisaival, plazma membrán transzporterrel, lizoszóma szekrécióval vagy sejtlízissel^{115,124-126}. Ismert, hogy a P2X7 receptor aktivációját számos olyan downstream esemény követi, melyek maguk is részt vesznek a gyulladásos citokinek, így az IL-1 β transzkripciójában és processzáálásában. A Panx-1 lehet a P2X7 receptor által közvetített IL-1 β felszabadulás downstream effektora¹²⁷. Érdekes módon, a Glu496Ala P2X7 SNP (egy-pontos polimorfizmus) és vad típusú egyedek *ex vivo* vérvizsgálata kimutatta, hogy a Glu496Ala funkcióvesztéses mutáció (loss-of-function) esetén a P2X7 receptor megvédi az agyat a magas ATP szint toxikus hatásától, mivel ez a mutáció a felszabaduló citokinek mennyiségének megváltozásához vezet¹²⁸. Ezért a P2X7 receptor által közvetített citokin felszabadulás kritikus elemzése új lehetőségeket nyújthat a terápiás célpontok számára a központi idegrendszeri betegségekben.

2.1.3.4 MCP-1/CCL2 felszabadulás

Az asztrocita sejtek közreműködnek az idegszövet gyulladásos reakcióiban, a gyulladásos ingerek a glia sejtek proliferációját és hipertrófiáját idézik elő, amely folyamatot reaktív gliózisnak nevezünk és ezek a sejtek a gyulladásos stimulusra citokinek, kemokinek és más mediátorok expressziójával és termelésével válaszolnak. A P2X7 receptoroknak szerepük van ezekben a szabályozási útvonalakban, aktivációjuk elősegíti az MPC-1/CCL2 fehérje expresszióját, ami kritikus faktor a korai monocita infiltrációban idegrendszeri gyulladások során^{97,102}. Növelik emellett az ERK1/2 és p38MAPK fehérjék foszforilációját, amelyeknek meghatározó szerepük van a sejtek apoptózis iránti elkötelezettségében^{97,102,129}. Ez a gyulladásos hematogén sejtek központi idegrendszeri

infiltrációjához vezet, ezt támasztják alá patkányokon epilepsziás modellben végzett vizsgálatok, ahol a leukocita infiltráció az MCP-1 felszabadulás miatt következik be IL-1 β függő módon¹³⁰.

2.1.4 A P2X7 receptor és patológias állapotok

Az elmúlt évek technikai fejlődései új terápiás lehetőségek előtt nyithatnak utat és lehetővé teszik az eddig alkalmazott stratégiák paradigmaváltását az idegtudományi területeken. A P2X7 receptorok aktiválásán túl, felmerül főszerepe különböző kórképekben, beleértve az autoimmun betegségeket, mint például az ízületi gyulladást és gyulladással járó bélbetegségeket, krónikus és neuropátiás fájdalmat, neurodegeneratív rendellenességeket és rákot.

2.2 Fájdalom

A fájdalomkutatás nemzetközi szervezete (International Association for the Study of Pain, IASP) így határozza meg a fájdalom definícióját: egy kellemetlen szubjektív érzelmi és szenzoros élmény, amely tényleges vagy potenciális szövetkárosodást jelez. A fájdalom fizikai stresszorként azonosítható^{131,132}, mellyel együtt jár negatív érzelmi izgatottság és a szenvedés élménye is, amelyek adaptív szerepe a fájdalom okának megszüntetésére ösztönzi az egyént.

Neurobiológiai komponense a nocicepció (fájdalmas stimulus érzékelése), amely jól tanulmányozható állatkísérletek során, míg érzelmi komponense csak emberekben vizsgálható. Állat fájdalom modellekben a nociceptorok (a fájdalmat felvevő szabad idegvégződés) aktiválódását és a fájdalmas stimulusra adott elhárító viselkedést tudjuk vizsgálni.

A nociceptorokat különféle szempontok alapján csoportosíthatjuk, amelyek specifikusak a fájdalomra. Érzékenység alapján megkülönböztethetünk uni- (csak mechanikai és hő-ingerekkel stimulálható) és polimodális (mechanikai, hő- és kémiai ingerekkel is stimulálható) receptorokat. Axonjaik alapján két csoportra oszthatók: a bőrből, az izmokban, a belső szervekből a fájdalmas ingerületet szállító elsőrendű neuronokra – vékonyan mielinizált, gyorsan vezető (12-30 m/s), magas ingerküszöbű, szomatikus

fájdalomért felelős A δ nociceptorok–, és az un. másodlagos fájdalomért felelős C nociceptorokra – mielinhüvely nélküli, lassan vezető (0,5-2 m/s) rostok (I. neuron).

A fájdalom, mint impulzus, a tudatosulásig hosszú utat jár végig, a fájdalom pályát. A fájdalmat felvevő perifériás nociceptoroktól az ingerület a spinális, illetve agytörzsi idegeken jut be a központi idegrendszerbe (felszálló pálya). Az A δ - és C-típusú rostok továbbítják az ingerületet a gerincvelőbe, valamint az agytörzsbe az érző agyidegek magjaihoz. A spinális nociceptív afferens rostok a hátsó gyökön keresztül belépnek a gerincvelői szürkeállományba és a hátsó szarvban lévő projekciós neuronokon és interneuronokon végződnek (lamina I-II és V sejtjei). Ezek a neuronok és interneuronok (II. neuron) átkereszteződnek a gerincvelő oldalsó és elülső szarvába és továbbítják a fájdalom kiváltotta szignált (*lateralis tractus spinothalamicus*). Itt a hirtelen fellépő fájdalom kiváltja a reflexválaszt, de egyúttal a szignál átkapcsolódás nélkül tovább is utazik az agy felé, a thalamusba. A thalamusból a rostok egy része a kéreg felé halad, más részük ágakat ad le a putamen, a nucleus caudatus és a pallidum felé (subcorticalis fájdalom pályája). A fájdalmat agyunk, a recipiens kéreg area felismeri, képes pontosan lokalizálni és karakterizálni, meghatározni a fájdalom intenzitását és időtartamát (III. neuron).

A felszálló nociceptív pálya mellett működik egy leszálló gátló rendszer is (endogén analgetikus rendszer), amely gátolja a fájdalom impulzus terjedését a felszálló pályákon. A leszálló gátló pálya aktivációja a periaquaeductalis szürkeállományban (PAG) és a median raphe nucleusban történik. A locus coeruleusból eredő noradrenerg és szerotonerg pályák, valamint a gamma-aminovajsav (GABA) is szerepet játszik a leszálló pálya gátló funkcióiban.

Eredete szerint a fájdalom lehet szomatikus (testi), visceralis (zsigeri) vagy neuropátiás (idegi eredetű). A szomatikus fájdalom egy-egy sérülés, heveny betegség tünete, amely pontosan lokalizálható. Míg a visceralis fájdalom a belső szervek betegségét kíséri, nehezen körülírható és lokalizálható, több irányba kisugárzó fájdalom. A neuropátiás fájdalom forrása a perifériás vagy a központi idegrendszer károsodása, diszfunkciója, ami az esetek döntő többségében irreverzibilis. Ide sorolható a diabeteses neuropathia, a sclerosis multiplex, de még az olyan hétköznapiabb esetek is, mint a krónikus derékfájdalom, a tumor okozta neuropátiás fájdalom, vagy a migrén.

A lefolyás időtartama szerint megkülönböztetünk akut (egyszeri), rekuráló (visszatérő) vagy krónikus fájdalmat. Az akut fájdalom a szervezet legfontosabb védekező mechanizmusa, egy figyelmeztető jel, melyet szövetsérülés vált ki, és amelynek csillapítása az egyik legfontosabb tüneti kezelés. Krónikus fájdalomról akkor beszélünk, ha több mint három hónapja fennáll: ilyen esetekben a fájdalom eredeti figyelmeztető funkcióját elveszti és állandósul.

Az enyhe fájdalmas ingerek hatására kiváltott fokozott fájdalomérzetet hiperalgéziának, míg a nem fájdalmas ingerek hatására kialakuló fájdalomérzékenység fokozódást allodyniának nevezzük¹³³. Mind a mechanikai, mind a termális allodynia és hiperalgézia kialakulhat gyulladás, illetve eltérő eredetű centrális vagy perifériás idegsérülés hatására¹³⁴.

2.2.1 Purinerg mechanizmusok és fájdalom

A Nature-ben 2003-ban megjelent cikkben a gerincvelő mikroglia sejtjeiben a P2X4 receptor expressziójának növekedéséről számoltak be neuropátiás fájdalomban, amely P2X4 antiszensz oligonukleotidok alkalmazása után csökkent¹³⁵. Ezután kezdett nagyobb figyelem irányulni a purinerg jelátvitel szerepére a neuropátiás fájdalomban¹³⁶⁻¹³⁹ majd kimutatták, hogy a mikroglían kifejeződő P2X7 és P2Y12 receptorok is részt vesznek a neuropátiás fájdalomban¹⁴⁰⁻¹⁴³. A neuropátiás fájdalom hátterében álló pontos mechanizmusokban résztvevő P2X3, P2X2/3, P2X4, P2X7 és P2Y12 receptorok vizsgálata továbbra is intenzív kutatás tárgya¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

A DRG (hátsó gyöki ganglion) egy fájdalomingert közvetítő sejtcsoportjában kifejeződő homomer P2X3 és heteromer P2X2/3 receptorok is részt vesznek a fájdalmas ingerek érzékelésében¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Szerepet játszanak az akut, gyulladásos, neuropátiás, viscerális és rákos fájdalomban, amelyek során fokozott ATP felszabadulás figyelhető meg az extracelluláris térbe.

Az ATP akut veszély jelzésére szolgál és a gyulladás és immunitás közvetítője is egyúttal¹⁵¹. Az idegekben az mTOR jelátviteli útvonal gátlója, a rapamycin csökkentette a fájdalomérzetet neuropátiás fájdalom modellben; továbbá megállapították, hogy az

mTOR jelátviteli útvonal is részt vesz az ADP által kiváltott asztrocita aktivációban és az ATP felszabadulásban a gerincvelő dorzális szarvában¹⁵².

Az adenzin szintén potenciális fájdalomcsillapító célpont a gyulladásos és neuropátiás fájdalomban¹⁵³⁻¹⁵⁵, ugyanis szerepet játszik a nociceptív transzmisszió regulációjában, különösen A1 és A2A receptorokon keresztül¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. Míg az A1 receptorok aktivációja analgesiát okoz, feltehetőleg a leszálló purinerg gátló pálya A1 receptorain keresztül, az A2 receptorok aktivációja nociceptív hatású a nociceptív afferens neuron stimulálása révén. Mindemellett kutatások arról is beszámoltak, hogy patkányok krónikus fájdalmát A3 adenzin agonistákkal is sikerült befolyásolni¹⁶¹⁻¹⁶³.

2.2.1.1 P2X7 receptor szerepe a neuropátiás és gyulladásos fájdalomban

A P2X7 receptorok tulajdonságait először egér NTW8 mikroglia sejtvonalban¹⁶⁴, majd patkány agyi mikroglia sejtekben vizsgálták³¹. Később artritiszes patkányokban gyulladás által kiváltott mechanikai hiperalgémia enyhítésére, az idegvégződéseken található P2X7 receptorok gátlására, oxidált ATP-t alkalmaztak¹⁶⁵. A P2X7 receptorok aktivációját követően felszabadulhatnak biológiailag aktív gyulladásos citokinek, például az IL-1 β . Míg, a P2X7 KO egerekben a krónikus gyulladásos és neuropátiás fájdalom megszűnt, a normál nociceptív feldolgozási folyamat megmaradt, ami azzal magyarázható, hogy a P2X7 KO egerek nem voltak képesek a biológiailag aktív IL-1 β produkcióra¹⁶⁶. Mindezek mellett kimutatták, hogy a P2X7 receptor az érett IL-1 β termelés szabályozása révén szerepet játszik a neuropátiás és gyulladásos eredetű fájdalom kialakulásában¹¹⁸. A P2X7 receptor gátlása csökkentette a nocicepciót perzisztens neuropátiás és gyulladásos fájdalomban különböző egér modellekben¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Ezek a megállapítások, valamint a bizonyítékok növekvő száma alátámasztják azt az elképzelést, hogy a P2X7 receptoroknak modulációs szerepük van a proinflammatorikus IL-1 β feldolgozásban¹¹³. Mindezek az eredmények azt sugallják, hogy a P2X7 receptorok specifikus szerepet játszanak a folyamatos fájdalomhoz társuló idegi neuronális-gliális sejt kölcsönhatásokban⁶⁷.

A P2X4 és P2X7 génkiütött egerek közös vonása, hogy hasonló módon, csökkent mértékben reagálnak a fájdalomingerre, de ez a fenotípus különböző mechanizmusok révén jöhet létre¹⁷⁰. A P2X7 receptor aktivációja a p38 MAPK rendszeren keresztül TNF-

α termeléshez vezet mikrogliában, ugyanakkor a P2X7 antagonistákkal végzett kezelés a mechanikai hiperalgéria csökkenését és a TNF- α , IL-6 koncentrációjának a csökkenését eredményezte¹⁷¹.

A P2X7 receptorokat expresszáló immunsejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak a fájdalomküszöb változásában¹⁶⁶. Neuropátiás fájdalom modellben sérülést követően növekedett a P2X7 receptor mRNS és fehérje expressziója a gerincvelői mikrogliasejtekben¹⁷². Akut gyulladásos fájdalom modellben, a mikrogliai P2X7 receptorok fontos szerepet játszottak a nociceptív neuronok szenzitizálásában patkány gerincvelő hátsó szarvban¹⁷³.

A P2X7 receptorok aktivációja glutamátot szabadít fel a gerincvelőben, amely hozzájárul a mechanikai allodynia kialakulásához az ülőideg részleges elkötését követően¹⁷⁴.

Az oxaliplatin rák ellenes gyógyszerről kimutatták, hogy neuropátiás fájdalom kialakulását és a P2X7 receptorok aktivációját okozza¹⁷⁵. A P2X7 receptor antagonistá, A438079, megakadályozta a paclitaxel, egy másik daganatellenes szer által kiváltott allodyniát¹⁷⁶. A perifériás P2X7 receptor aktiváció mechanikai hiperalgériát okozott gyulladásos mediátorok különösen a bradikinin részvételével¹⁷⁷.

A P2X7 SNP polimorfizmusok egy része korrelál a fájdalomérzékenységgel, beleértve a cukorbetegségben szenvedő páciensek csoportját is¹⁷⁸.

2.2.2 A migrén

A migrén az agy komplex és sokrétű rendellenessége, amely több napig is eltarthat. Egyoldalú, lüktető fejfájás rohamok jellemzik, mozgási, vizuális és hallási és más tünetekkel társulva¹⁷⁹. Jellemzően a klasszikus, teljes tünetsorú migrén négy fázisra osztható: (1) figyelmeztető/bevezető szakasz (prodroma), (2) lehetséges aurafázis, (3) fejfájás és kísérő tünetek, (4) lábadozási, helyreállási szakasz (posztodroma). Ezek előfordulhatnak lineáris sorrendben, de a legtöbb esetben a migrén szakaszok jelentős átfedést mutatnak. Egyéb tünetek, mint a fáradtság, az ingerlékenység, a csökkent koncentrációs képesség és az ásítás legalább 48 órával megelőzhetik a fejfájás jelentkezését¹⁸⁰. A legtöbb rohamot órákig vagy napokig eltartó rossz közérzet követi fáradtsággal^{181,182}. Fontos megjegyezni, hogy az olyan tünetek, mint a fáradtság és a

koncentrációs zavarok, minden fázisban jelen lehetnek. A valóságban legtöbbször csak a fejfájás hiánya vagy jelenléte tűnik ki, ám a migrénes betegek körülbelül egyharmadában a migrénes rohamokhoz neurológiai deficitek is társulhatnak, amelyek magukba foglalják az olyan kortikális tüneteket, amelyeket együttesen migrén aurának neveznek¹⁸³ (3. táblázat).

3. táblázat: A fejfájás zavarainak nemzetközi osztályozása (ICHD)-3¹⁸⁴

Migrénre vonatkozó kritériumok	
Aura nélkül	Aurával
A. Legalább 5 olyan roham, amely megfelel az alábbi kritériumoknak (B-D)	A. Legalább 5 olyan roham, amely megfelel az alábbi kritériumoknak (B és C)
B. 4-72 óra hosszúságú fejfájás (kezeletlen vagy sikertelenül kezelt)	B. Egy vagy több reverzibilis aura tünet: 1. Vizuális 2. Szenzoros 3. Beszéd és/vagy nyelvi 4. Motoros 5. Agytörzsi 6. Retinális
C. A fejfájásnak legalább a következő négy jellemző közül kettőnek meg kell felelnie: 1. Egyoldalú elhelyezkedés 2. Pulzáló jelleg 3. Mérsékelt vagy súlyos fájdalomintenzitás 4. Fizikai aktivitás kerülése, vagy erre súlyosbodó fájdalom	C. Az alábbi négy jellemző közül legalább kettő érvényesül a fejfájásra: 1. Legalább egy aura tünet, amely legfeljebb 5 percig tart, és/vagy két vagy több tünet jelentkezik egymás után 2. Minden egyes aura tünet 5-60 percig tart 3. Legalább egy aura tünet egyoldalú 4. Az aurát 60 percen belül fejfájás kíséri vagy azt követi
D. Fejfájás alatt az alábbiak közül legalább egy teljesül: 1. Hányinger és/vagy hányás 2. Fotofóbia és fonofóbia	D. Másik ICHD-3 diagnózis nem jellemző, és a tranzienis ischaemiás roham kizárható
E. Másik ICHD-3 diagnózis nem jellemző	

Ismert, hogy a migrén etiopatogenezisében különböző agyi struktúrák vesznek részt: a trigeminus ideg magjával az agytörzsben, az érrendszer, az agykéreg, valamint különböző mechanizmusok és kóros folyamatok, amelyek magukban foglalják a trigeminus ideg szabályozatlan aktivációját, vazokonstriktációt és vazodilatációt, továbbá a tovaterjedő kérgi gátlást (CSD)¹⁸⁵. Ezeket a folyamatokat az extracelluláris jelátviteli molekulák és a

neurotranszmitterek kórosan megváltozott koncentrációi közvetítik, és ezek hatására gyulladás és fájdalom keletkezik. Egyes bizonyítékok megerősítik a purinok részvételét a fent említett folyamatokban a központi idegrendszer egészében¹⁵⁰.

2.2.2.1 Az ATP, a P2 receptorok és a migrén

A migrénes fájdalom keletkezésének legkorábbi hipotézise a vaszkuláris elméleten alapult¹⁸⁶. Ez az elmélet azt feltételezi, hogy a migrénes roham keletkezése két szakaszból áll. Kezdetben van egy vazokonstriktió, ami szöveti hipoxia kialakulásához vezet, de ekkor még nincs fájdalom. Ismeretes, hogy a helyi vazokonstriktió a simaizmokon jelen lévő P2X receptorok aktiválódásának lehetséges következménye az ATP-n keresztül, amely, mint egy kotranszmitter együtt raktározódik, majd szabadul fel a noradrenalin a perivascularis szimpatikus idegekből és sérült endothelsejtekből. A migrénes roham kezdetén az intracelluláris raktárakból noradrenalin kiürül, ami összefüggésben van a dopamin, prosztaglandin, ATP és adenozin fokozott felszabadulásával¹⁸⁷. A vazokonstriktiót ezután vazodilatáció követi, amely fájdalomérzéssel társuló hyperemiát eredményez^{188,189}. Továbbá, az ATP szintézise és felszabadulása az endotheliális sejtekből és vérlemezkékből a vérszérumba jelentősen megnő migrénes roham alatt, amelynek következtében a felszabadult ATP aktiválja a P2X és P2Y receptorokat az endothel sejteken (aktiválja még ADP, UTP). Ez az aktiválódás az endothelium-eredetű relaxációs faktor felszabadulását eredményezi a vérbe^{150,188}. Az extracelluláris nukleotidok az agyi artériák kontrakcióját indukálják elsősorban a simaizomsejteken expresszált P2X1 és P2Y6 receptorok aktiválódásával^{190,191}, ugyanakkor az adenozin elsősorban az endothel sejteken lévő A2A receptorokon keresztül relaxációs tényező¹⁹¹. Ez a mechanizmus magyarázza a purinok kettős szerepét a migrénes fejfájás keletkezésében.

Legutóbbi ismereteink alapján a migrénes fájdalom előidézésének kulcsfontosságú folyamata a trigemino-vaszkuláris rendszer aktivációja. Ez a folyamat vazoaktív molekulák, például kalcitonin gén relációs peptid (CGRP), P anyag és proinflammatorikus faktorok, valamint jelátviteli molekulák, mint az ATP, szerotonin, bradikinin és prosztaglandinok felszabadulását okozza. Mindezek a vegyületek hatással vannak a trigeminális ganglion neuronjaira és szatellit glia sejtjeire¹⁹².

Az ATP szerepét a migrén etiológiájában korábban csak a betegség vaszkuláris elméletével kapcsolatban hozták összefüggésbe. Jelenleg egyre nagyobb figyelmet fordítanak a fájdalom és neuronális diszfunkció, a trigeminális idegeken kifejeződő ATP-aktiválta receptorokon keresztül megvalósuló szabályozására. A purinerg jelátvitel részvétele a fájdalom vezetésben, az ATP-aktiválta P2 receptorokkal kapcsolatosan jól ismert a hátsó gyöki gerincvelő, és a perifériás érző ganglion területén¹⁹³. Ezenkívül a P2X3, P2X2 és P2X2/3 receptorok, valamint a P2Y1, P2Y2, P2Y4, és P2Y6 receptorok jelenlétét mutatták ki a trigeminális ganglion és a hátsó gyöki ganglion neuronális sejtestjein^{148,193-196}. Szintén leírták, hogy a trigeminális neuronokon jelen lévő P2Y1 és P2Y4 receptorok együttesen expresszálódnak a P2X3 receptorral¹⁹⁷. A szatellit glia sejteken hasonló P2Y receptorok expresszióját figyelték meg: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, és P2Y12, valamint P2Y13 (együtt a P2X2 és P2X2/3 receptorokkal)^{198,199}.

In vitro vizsgálatok azt mutatják, hogy az afferens trigeminális idegvégződéseken jelen lévő P2X3 vagy P2X2/3 receptorok aktivációja a gerincvelő hátsó szarvában fokozza a fájdalomimpulzusok transzmisszióját²⁰⁰. Az agytörzsben a nociceptív neuronok centrális szenzitizációját a P2X receptorok agonistáinak és antagonistáinak intratekális alkalmazása befolyásolta²⁰¹. Azt is kimutatták, hogy a P2X3 receptor kulcsszerepet játszik a trigeminális neuralgiában²⁰². A CGRP fokozott felszabadulása függ a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjától, és egyidejűleg a P2X3 receptorok szenzibilizációja is bekövetkezik²⁰³. Ez a folyamat fontos szerepet játszik az idegsejtek további aktiválásában és a perifériás és központi szenzitizáció kialakulásában.

Viszonylag új és még nem tisztázott elképzelés hogy a P2Y receptorok részt vesznek a migrén kialakulásában^{150,198,204}. Úgy vélik, hogy a P2Y receptorok aktivációjának lehetséges hatása mind analgetikus, mind algogén¹⁹⁹. A P2Y1 receptorok aktivációja gátolhatja a P2X3 receptorok aktivációját a dorzális ganglionok neuronjaiban, ami az ATP és ADP antialgogén szerepét támasztja alá. Az UTP és UDP, valamint egyéb P2Y receptor agonisták *in vivo* i.t. adása után kimutatták, hogy ezek fájdalomcsillapító hatást fejtenek ki, valószínűleg a gliális sejtekből történő citokin felszabadulás gátlása révén²⁰⁵⁻²⁰⁷. A migrén mechanizmusában a trigeminális ganglion neuronjain expresszáló P2Y6 receptor is szerepet játszik^{205,208}.

Jól ismert, hogy a migrénes fejfájást megelőzi a nociceptív receptorok aktiválása az agyhártyában és azután a trigeminális neuronok szenzoros rostjainak aktivációja követi, amelyek az agyhártya ereit innerválják²⁰⁹. Nemrég kimutatták, hogy a CSD nemcsak a trigeminális ganglion primer neuronjait aktiválja, hanem a gerincvelő felső szegmenseiben (C1-2) található másodlagos neuronokat is²¹⁰. A CSD során olyan molekulák szabadulnak fel a cerebrospinális folyadékba, mint az ATP, a nitrogén-oxid, a prosztaglandinok és a kálium^{211,212}. E molekulák koncentrációjának növekedése a trigeminális ganglion neuronjainak afferens szenzoros végződéseinek aktivációját és szenzitizációját eredményezi, majd az agytörzsben és a felső nyaki gerincvelőszegmensekben található trigeminus ideg másodlagos neuronjai közvetítik az agyhártyáról eredő nociceptív ingereket. Később, az agykéreg fokozott aktivitásának időszakában, amelyet közvetlenül a CSD követ, az ATP koncentrációja jelentősen megnő az extracelluláris térben. Az ATP lehet a felelős a nociceptív jelátvitel aktiválásáért és amplifikálásáért valamint a gyulladásért, amely az afferens szenzoros rostok aktiválódásához és szenzitizációjához vezet^{211,212}. Az ATP nociceptív és proinflammatorikus hatását a primer afferens rostokon lévő P2X és P2Y receptorok aktivációja váltja ki^{150,193,213-216}.

A P2X3 receptor részt vesz a neurotranszmisszió modulációjában olyan agyterületeken is, amelyek közvetítik a nocicepciót, mint például a trigeminus mag és a talamusz^{203,217,218}. A legtöbb nociceptív trigeminális neuron, amely a durát beidegzi, P2X3 receptorokat is expresszál és képes a CGRP felszabadítására^{194,207}. A P2X3 receptorok aktivációja fokozza a CGRP felszabadulását a dura materben és elősegíti a gyulladáshoz vezető folyamatok megindítását, valamint a CGRP további felszabadulását okozza az agytörzs trigeminális magjaiban, és ezáltal a szekunder neuronokat érzékenyebbé teszi a fájdalmas ingerekre²¹⁹. Ezenkívül a CGRP a trigeminális ganglionban jelen lévő P2X3 receptorok szenzitizációját is fokozza²⁰⁷.

A purinok különböző típusú sejtekben (erek, idegsejtek és szatellit glia sejtek) és különböző típusú purinerg receptorokon keresztül történő többirányú hatása hozzájárul és módosítja a migrénes fájdalom megindításához és erősödéséhez. Ezért a purinerg receptorok kiváló terápiás célpontot jelenthetnek az új antimigrén terápiákat kidolgozó farmakológusok számára. Azt is feltételezhetjük, hogy az ATP és az adenzin lebontását

elősegítő mechanizmusok megakadályozhatják a vazodilatációt és ezáltal elkerülhetik a migrénes roham során a szekunder centrális szenzitizációt.

2.2.2.2 *Fejfájás és migrén állatmodelljei*

Annak érdekében, hogy felmérjük az állatmodell valós értékét az emberi betegségekkel kapcsolatban, beleértve a krónikus fájdalmat és migrént, a vizsgálónak képesnek kell lennie a farmakodinamiás végpont megbízható értékelésére, a betegség szempontjából releváns kórélettani, tünettani és/vagy kezelési módok transzlációs vonatkozásaiban. A migrén olyan önálló fejfájás betegség, amelyet általában az egy oldalon elhelyezkedő fejfájás jellemez, amelyhez gyakran hányinger, hányás és figyelmeztető tünetek (pl. fényre és hangra való érzékenység) társulnak²²⁰. Azonban vitatható, hogy az állatok valóban spontán migrénszerű epizódokat tapasztalnak-e klinikai környezetben. Evolúciós szempontból nehéz elképzelni, hogy milyen biológiai előnye származhat az állatnak abból, hogy természetes szelekció révén erősítse meg ennek a fejfájás betegségnek a továbbörökítését. Mindazonáltal a rendelkezésre álló állatmodellek azt mutatják, hogy a rágcsálók kísérleti úton migrénszerű kórélettani állapotokba kerülhetnek, ami relevánssá teszi őket a gyógyszerkutatásban való alkalmazásukra²²¹⁻²²⁴.

Egy ismert vagy új vegyületnek, amelynek a hatásmechanizmusa már ismert, segíthet eldönteni, hogy az első elvégzett állatmodell neurovaszkuláris vagy neuronális jellegű legyen. Ha a hatásmechanizmus túlnyomórészt neurovaszkuláris, a következő modell lehetséges: zárt koponya ablak modell alkalmazása, mellyel felmérhető a drog hatása a craniális vérerek átmérőjére. Ez kiegészíthető a hízósejtek depléciós vizsgálataival, így tovább tudjuk vizsgálni a neurogén jellegét.

Ha a hatásmechanizmus túlnyomórészt neuronális, akkor a következő modellek lehetségesek: (1) meg kell állapítani a vegyület aktivitását CSD modellben, mely releváns aurás migrénben, vagy (2) különböző szenzitizációs modellekben, például NTG ismételt adásával. Jelenleg, kevert mechanizmusokat magában foglaló modellek (pl. durális „gyulladásos leves” NTG kezeléssel kombinálva) nem állnak rendelkezésre.

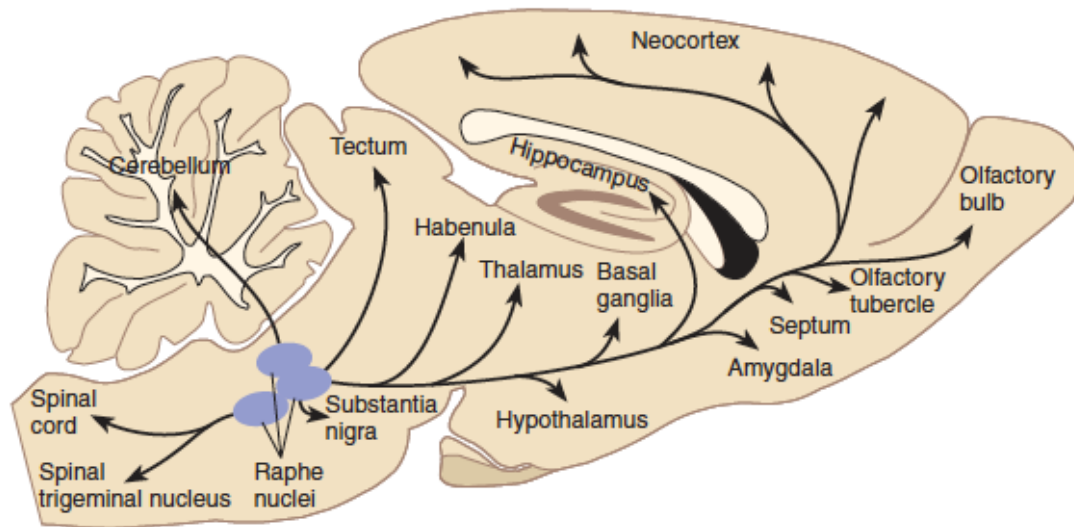
A genetikai modellek alkalmazása olyan monogénes familiáris hemiplegikus migrén (FHM) mutációkra vonatkozik, amelyekhez rendelkezésre állnak mutáns egerek (pl.:

CACNA1A), valamint olyan poligénes mutációk, amelyek kutatásra várnak állatmodellekben. Majd a vegyület hatásosságának értékelésére egy egyszerű gyulladásoz vagy neuropátiás modell (pl.: komplett Freund's adjuváns adása) a legalkalmasabb²²⁵.

Kísérleteink során a Bates és munkatársai által korábban leírt szenzitizációs NTG-indukált migrén modellt²²⁶ alkalmaztuk. Megvizsgáltuk az i.p. NTG kezelés által időfüggő módon kiváltott termális hiperszenzitivitást az egerekben és a végtagelrántási küszöbértéküket mértük hot plate teszt segítségével, valamint a modell validálásához szumatriptánt alkalmaztunk. Ez ugyan közvetlenül a migrénszerű fejfájást nem méri, de feltételezhető, hogy a hiperszenzitivitás a durát ellátó idegekben is hasonló mechanizmussal alakul ki.

2.3 Szerotonerg neurotranszmisszió

A szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) a biogén aminok csoportjába tartozó neurotranszmitter vegyület, az agyi szerotonerg neuronokon kívül még detektálható mennyiségben megtalálható a periférián, valamint a vérlemezkékben, a hízósejtekben, a gyomor-bél traktusban illetve a mellékvese velőállományában²²⁷. Az agyban a szerotonerg neuronokban szintetizálódik és azok varikozitásaiból szabadul fel²²⁸, majd ezt követően a felszabadult szerotonin nagy része aktív mechanizmussal visszavételre kerül. Bioszintézisének előanyaga a triptofán amelyből a triptofán-hidroxiláz hatására 5-hidroxi-triptofán keletkezik, majd dekarboxiláció révén keletkezik az 5-hidroxi-triptamin, azaz szerotonin. A központi idegrendszer szerotonerg neuronjainak többsége az agytörzsben lévő raphe magokban találhatóak²²⁹. Az axonok a raphe magokban található neuronokból kiindulva, mint leszálló pályák a gerincvelő mellső, középső, valamint hátsó szarvához, mint felszálló pályák az egyéb agytörzsi struktúrákhoz, a hipotalamuszhoz, a limbikus rendszerhez, a hippokampuszhoz és az agykéreghez futnak, így tehát szerotonerg axonok az agyban gyakorlatilag mindenhol kimutathatóak (5. ábra).



5. ábra: Patkány szerotonerg rendszere a raphe magokkal és a fő pályarendszerekkel. Az ábra azon sejtek projekciós útvonalát mutatja, melyek a szerotonint neurotranszmitterként szabadítják fel. A szerotonerg neuronok legfontosabb csoportja a raphe magok²³⁰. A 3 fő pálya: 1. Mediális felszálló pálya: a hippocampus és a preoptikus areát idegzi be. 2. Medio-laterális felszálló pálya: elsősorban a kortikális területeket idegzi be. 3. Laterális felszálló pálya: a nucleus caudatusba fut, és az extrapiramidális rendszert idegzi be.

Az emlős agyban lévő szerotonerg neuronokra ugyancsak jellemző a varikozitációs és szinaptikus ingerület-átvitel^{231,232}. Egyes agyterületeket a különböző raphe magokból érkező szerotonerg neuronok komplexen, többszörösen is beidegzenek²³¹⁻²³⁴. Ezenfelül a raphe magvak szerotonerg neuronjai a bemenetek nagy többségét olyan kortikális és szubkortikális területekről kapják, amelyek lényegében szerotonerg beidegzéssel rendelkeznek²³⁵, ami arra utal, hogy a felszálló szerotonerg pályákat főleg a már feldolgozott érzékszervi információk befolyásolják²³⁵.

Az, hogy a szerotoninnak eddig jelentősen sokrétű, gyakran egymásnak ellentmondó hatását tapasztalták, a nagyszámú, eltérő tulajdonságokkal rendelkező receptorainak köszönhető. Az 5-HT receptorokat 7 nagyobb csoportba soroljuk. Az idegvégződésekből preszinaptikusan felszabaduló 5-HT 16 féle 5-HT receptorral kerülhet interakcióba pre-

vagy posztszinaptikusan²³⁶. Az 5-HT kötődése a G-fehérje kapcsolt receptorokhoz, az adenil-cikláz vagy a foszfolipáz-C aktiválódását eredményezi.

Az 5-HT-t a szinaptikus résből az 5-HT transzporterek viszik vissza a preszinaptikus végződésekre, itt a szabad 5-HT vagy vezikulákban tárolódik, vagy monoamino-oxidáz (MAO) metabolizálja 5-hidroxi-indolecetsav végtermékké.

A szerotonerg rendszer szabályozása nagyon fontos a normál viselkedés, valamint a neurológiai és pszichiátriai rendellenességek szempontjából, mint pl. az obszesszív-kompulzív zavar, a bulimia, a krónikus impulzivitás, az elhízás, a kábítószer függőség, az agresszió, a depresszió, a szorongás, az öngyilkossági készletés, a skizofrénia, a mánia, az autizmus, az Alzheimer-kór, és a hirtelen csecsemőhalálozási kór²³⁷⁻²⁴¹.

2.3.1 A raphe magok eltérő szerepe a neuromodulációban

Az állat viselkedését, pillanatnyi és jövőbeli akcióit az idegrendszer különböző működési módjain keresztül végső soron az érzékszervek információi befolyásolják a legnagyobb mértékben. A külső ingerekből származó különböző információk párhuzamosan, elosztott módon dolgozódnak fel a funkcionálisan elkülönült kérgi területeken. Az egyik felmerült elképzelés szerint az idegsejtek szinkron tüzelése játszik szerepet abban, hogy szinkron módon befolyásolják, és ezáltal funkcionálisan összekapcsolják a különböző agyterületeket^{242,243}. Más adatok viszont azt az elképzelést támogatják, hogy a kéreg alatti aktivitásnak is szerepe lehet a kérgi szinkronizáció kialakításában²⁴⁴⁻²⁴⁶.

A kortikális információfeldolgozás a szubkortikális neuromodulációs rendszerek állapotfüggő szabályozása alatt áll. Ennek alapján, ez a modulációs hatás feltételezhetően elsősorban lassú, tónusos, nem szinaptikus receptorok által közvetített, de a fázisos, gyors szinaptikus átvitel is lehetséges^{247,248}. A lassú, tónusos és gyors, fázisos moduláció párhuzamos működésének kiemelkedő példája a felszálló szerotonerg rendszer. A dorsalis raphe (DR) szerotonerg neuronjainak vékony axonjai kis varikozitásúak és ritkán létesítenek szinapszisokat, míg a median raphe (MR) tónusos szerotonerg sejtjeinek vastag, nagy varikozitású axonjainak többsége szinaptikus kapcsolatokat alakít ki a kortikális GABAerg interneuronokkal²⁴⁹⁻²⁵¹. Következésképpen a DR projekció ideális a nagy területek diffúz befolyásolására az egymással tényleges kontaktusban nem lévő

sejtek közötti diffúzióval (volume transmission), míg az MR mind diffúz nem-szinaptikus, mind gyorsabb, cél specifikus fázisos modulációt is alkalmazhat.

A DR és az MR magok optogenetikus aktivációja az MR-hippokampális aktiváció gyors komponensét tárta fel²⁵². Ezek az adatok azt sugallják, hogy a DR és MR szubpopulációknak különféle hatásai vannak az élettani funkciókban és a viselkedésben.

2.3.2 Szerotonerg moduláció a hippokampuszban

A különféle jelentősebb neurotranszmitter jelátviteli útvonalak, mint a monoaminerg, glutamaterg és nitregerg neurotranszmitter rendszerek²⁵³, nagyon érdekesek a komplexitás és szabályozás szempontjából is és itt is különös figyelmet érdemel a szerotonerg rendszer. Ahhoz, hogy megértsük, a szerotonin hogyan modulálja a hippokampális funkciókat molekuláris szinten, meg kell ismerni, hogyan modulálja a szerotonin a különböző sejtípusokat és szubrégiókat, amelyeket a hippokampális neuronhálózatok tartalmaznak. Hossz tengely mentén a hippokampusz rágsálókban dorzális, közbenső és ventrális régiókra van elkülönítve²⁵⁴, hasonlóan, mint humánban²⁵⁵. A dorzális hippokampusz elsősorban a kognitív funkciókban játszik szerepet, beleértve a térbeli tanulást és memóriát^{256,257}, míg a ventrális hippokampusz elsősorban a stresszválasz az érzelmek, a szorongás szabályozásában²⁵⁸⁻²⁶⁰, másodsorban a memória feladatokban vesz részt²⁶¹. A hippokampusz több különböző zónára oszlik: a gyrus dentatusra, a CA3, CA2, CA1 és subiculum régiókra. A CA3, CA2, CA1 régiókat hippokampális gyrusnak vagy Ammon szarvnak is nevezik. A CA3 területen található piramis sejtek axonokat, ún. Schaffer kollaterálisokat projektálnak, a CA2 és CA1 régiókhoz. A hippokampális neuronhálózatokban kétféle fő serkentő típusú sejtípus található: a glutamaterg piramis sejtek az Ammon szarvban és a subiculum régiókban, valamint az ugyancsak glutamaterg szemcsesejtek a gyrus dentatusban. Általában serkentő hatást fejtenek ki a neuronokra, axon terminálisokat küldenek más glutamaterg, GABAerg, és monoaminerg, kolinerg és hisztaminerg sejtekhez.

A hippokampuszon belüli információ feldolgozása összetett folyamat, amelyet számos neurotranszmitter befolyásol. A hippokampuszban szinte mindegyik pre- és poszt-szinaptikus 5-HT receptort már azonosították²⁶², és megtalálhatók mind az excitátoros sejteken, mind a gátló interneuronokon, továbbá az 5-HT transzporter

kulcsfontosságú szerepet játszik a szerotonerg neurotranszmisszióban és a hippokampális funkciók állapotfüggő szabályozásában^{263,264}. A hippokampusban expresszálódik a triptofán-hidroxiláz enzim²⁶⁵, és további fontos enzim még a szerotonerg rendszerben a MAO, amely az 5-HT bontásáért felel²³⁸. Az 5-HT neurotranszmisszió fontos szerepet játszik a hippokampális neuronhálózat működésében, közvetlen hatással lehet a piramidális neuronok tüzelésére a membránpotenciál szabályozásával és közvetve a GABA neurotranszmisszió modulálásával.

Érdekes módon az 5-HT rostok gyakran nem rendelkeznek közvetlen szinaptikus kapcsolattal, és sok olyan 5-HT receptort észleltek azokon a neuronokon, amelyek nem kapnak 5-HTerg innervációt²⁶⁶⁻²⁶⁸. Ebből az következik, hogy a szerotonin diffúz formában szabadul fel és inkább modulátorként működik a hippokampusban, amelynek a homeosztázis fenntartása a funkciója.

A hippokampusz-függő memóriarögzülés mechanizmusában döntő szerepe van a hosszú távú szinaptikus hatékonyság fokozódásának (LTP, long term potentiation). E tekintetben korábban már beszámoltak a cAMP jelátviteli rendszer és az LTP közötti kölcsönhatásról, a Ca^{2+} és a cAMP közötti kritikus kapcsolatról²⁶⁹. Az LTP kiváltása során az AMPA/kainát és NMDA receptorok együttes aktivációja nagy mennyiségű Ca^{2+} beáramláshoz vezet, amelynek következtében aktiválódik a Ca-calmodulin rendszer, amely aktiválja az adenilát ciklázt és a cAMP kinázt, mely utóbbi a sejtmagban beindítja a fehérjeszintézist és strukturális változásokat indukál, új receptorok és szinapszisok kialakulásához vezet. Ezek a folyamatok a kalmodulin hatásának eredményeként és a másodlagos messenger cAMP közvetítésével jönnek létre. Az LTP kialakulásában interneuronok (GABA, opioidok, szerotonin szerepe), retrográd hírvivő anyagok (NO) is részt vesznek. Ezen a szinten az 5-HT receptorok mindegyike közvetlenül is részt vesz a hippokampusz normál működésében és a memória kialakulásában, ugyanis a metabotróp 5-HT receptorok serkentik vagy gátolják a cAMP keletkezését.

A neurogenesis a hippokampális működéssel kapcsolatos hosszan tartó változásokban érintett folyamat, mivel a felnőttkori neurogenesis éppen a gyrus dentatusban zajlik²⁷⁰. Az 5-HT_{1A} receptor valószínűleg szerepet játszik a neurogenesis szabályozásában, mely a raphe szerotonerg neuronjain expresszálódik, mint autoreceptor²⁷¹, és preszinaptikusan helyezkedik el a hippokampusban, továbbá fontos szerepet játszik az 5-HT felszabadulás

modulációjában is. Az 5-HT_{1A} receptor gátolja a neuronok tüzelését, aktiválja a G-fehérjékhez kapcsolt befelé egyenirányú kálium csatornákat és gátolja a Ca²⁺ csatornákat²⁷², valamint gátolja az LTP-t és az NMDA receptorok működését²⁷³. Az ionotróp 5-HT₃ receptor szintén részt vesz gyors hatások közvetítésével az LTP modulációjában a hippokampuszban²⁷⁴.

Az 5-HT_{1B} receptorok széleskörű eloszlása következtében megtalálhatók a hippokampuszban a projekciós neuronok axon terminálisain és dendritjein, amelyek magukban foglalják az Ammon szarvban lévő piramis sejteket és a gyrus dentatusban lévő szemcsesejteket²⁷⁵⁻²⁷⁷. Az 5-HT_{1D} receptorok alacsonyabb szinten expresszálódnak, mint az 5-HT_{1B} receptorok, ugyanakkor gyakran egy agyterületen fejeződik ki ez a két fajta receptor, esetleg heterodimert képezhetnek egymással^{276,278,279}. Így megkérdőjelezhető, hogy hatásukat lehet-e külön tárgyalni. Az 5-HT_{1B} receptorok aktivációja csökkenti a glutamaterg transzmissziót a hippokampusz subiculum és CA1 régiójában^{280,281}. Az 5-HT_{1B} receptorok modulációs hatását a memória és a tanulás viselkedési modellekben sokkal kevésbé tanulmányozták, mint az 5-HT_{1A} receptorok. De több tanulmány kimutatta, hogy az 5-HT_{1B} receptorok stimulálása negatívan befolyásolja a teljesítményt a hippokampusz-függő memória tesztekben.

Széles körben elterjedt, hogy a kortikális szerotonerg idegvégződéseknél megtalálhatók a preszinaptikus 5-HT_{1B/1D} terminális autoreceptorok, amelyek aktiválódása gátolja az 5-HT felszabadulást^{282,283}. Azonban a hippokampuszban lévő 5-HT_{1B/1D} receptorokat expresszáló idegvégzések eredési pontja még mindig nem ismertek.

A hippokampuszban a sejtek gyakran együtt expresszálják az 5-HT receptorok több típusát, amelyek vagy kiegészítő, vagy ellentétes hatással lehetnek a sejtfunkciókra. Ezenkívül az 5-HT receptorok más G-fehérje kapcsolt receptorokkal homodimer vagy heterodimer formákat is kialakíthatnak, ezzel tovább növelve az 5-HT jelátvitel komplexitását²⁸⁴. Továbbá a legtöbb 5-HT receptor a hippokampusz mindkét fő sejtípusán, a glutamaterg principális sejteken és GABAerg interneuronokon is megtalálható. Két kivétel van ez alól, az 5-HT₃ receptorok csak az interneuronokon^{285,286}, az 5-HT₄ receptor alosztály csak a piramis sejteken található meg²⁸⁷. Az 5-HT_{5A} receptorok részt vesznek az asztrociták érési folyamatában és aktivációjában, különösen gliosis után, ugyanakkor a hippokampusz piramis sejtjein is expresszálódnak²⁸⁸.

2.3.3 P2 receptorok szerepe a szerotonerg neurotranszmitter rendszerben

Már az 1990-es évek elején felismerték, hogy az ATP-érzékeny P2 receptorok részt vesznek a transzmitter felszabadulás szabályozásában²⁸⁹. Később kimutatták, hogy az agyi és a perifériás neuronok főbb neurotranszmittereinek (acetilkolin, noradrenalin, dopamin, szerotonin, glutamát, GABA) felszabadulását a P2X és/vagy P2Y receptorok modulálják.

A P2 receptorok aktivációja gátolta a szerotonin felszabadulását kortikális patkány agy szeletekből²⁹⁰. Az ATP ezen hatása kétfázisú lehet, mivel a szerotonin felszabadulás preszinaptikus P2X receptor által közvetített facilitációját is megfigyelték patkány hippokampuszban⁵. Ugyanakkor az egyszerű túlélő agyszeletben a közvetlen preszinaptikus P2 receptor hatás és a közvetett moduláló hatások megkülönböztetése nem egyszerű.

A monoamin és purinerg rendszer együttműködést bizonyítja az a megfigyelés is, hogy a glutamát/ATP interakcióból származó másodlagos messenger NO szabályozhatja a szerotonin termelését^{291,292}. Ugyanakkor fordítva is igaz, hogy a szerotonin is képes modulálni az ATP szinteket az agyban²⁹³. A P2 receptor antagonistá PPADS által indukált antidepresszáns szerű hatásokban a szerotonin szerepet játszhat, mert a PPADS és fluoxetin egyidejű alkalmazásával megfigyelt összeadódó hatás a P2 receptorok gátlásából is származhat, amely kedvezően befolyásolta a szerotonin biológiai hozzáférhetőségét²⁹⁴.

A P2X7 receptorok aktivációja glutamát és következményes GABA felszabadulást vált ki a hippokampuszból³³, de előidézheti az endogén agonista ATP felszabadulását is²⁹⁵. A P2X7 receptorok közreműködnek a depresszió patofiziológiájában²⁹⁶⁻²⁹⁹, a bipoláris betegségekben^{296,300}, és a szkizofréniában³⁰¹. A P2X7 KO egerekben változásokat észleltek az agy noradrenalin és szerotonin szintjében²⁹⁷.

Ugyanakkor a P2 receptorok részvétele a szerotonerg transzmisszió szabályozásában még nem teljesen tisztázott.

3 Célkitűzések

Vizsgálataink a következő főbb területeket érintették:

I. Dolgozatom első részében a purinerg jelátvitel és a migrén kapcsolatának tisztázatlan pontjaival foglalkozom. Irodalmi adatok alapján valószínű, hogy az endogén purinok potenciális triggerei vagy mediátorai a migrénnek, továbbá vizsgálták már egyes P2 receptor altípusok részvételét a migrén szabályozó folyamataiban.

A doktori munkámnak az egyik célja az volt, hogy megvizsgáljuk a P2X7 receptorok szerepét az NTG-indukált migrén modellben egerekben.

1. A termális hiperszenzitivitás kialakulásának vizsgálata NTG kezelt egerekben.

- Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a NTG indukálta migrén egér modellben találunk-e különbséget a P2X7 WT és P2X7 KO egerek fájdalomküszöbében?

2. A P2X7 receptor gátlásának vizsgálata az NTG indukált migrén modellben.

- Ezekben a vizsgálatokban az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk a P2X7 receptor antagonistá BBG akut és szubakut kezelésnek a hatását P2X7 WT és P2X7 KO egerekben.

3. A c-Fos expresszió változásának vizsgálata a migrénben közvetítő szerepet játszó egér felsőnyaki gerincvelőben és TNC-ben.

- Következő immunhisztokémiai vizsgálatainkban a két genotípus, továbbá a P2X7 receptor gátlás c-Fos expresszióra gyakorolt hatásait hasonlítottuk össze.

II. Dolgozatom második részében a P2 receptorok szerepével foglalkozom a szerotonerg transzmisszió szabályozásában. Mivel irodalmi adatok alapján ismert, hogy a P2X7 receptorok modulálják több más transzmitter felszabadulását, feltételezzük, hogy az endogén ATP modulálja a szerotonin termelődését is. Ugyanakkor az is ismert, hogy a szerotonin is modulálja az ATP szinteket az agyban. Ezen irodalmi eredmények alapján,

célszerűnek tűnt megvizsgálni, hogy a P2X7 receptor milyen szerepet játszik a szerotonerg transzmisszió modulációjában.

Tehát a doktori munka másik célja az volt, hogy a median raphe régió és a hippokampusz szerotonin felszabadulását jellemezzük és megvizsgáljuk a P2X7 receptorok ebben játszott feltételezett modulációs szerepét. Ehhez optogenetikai technikát alkalmaztunk, az afferenseket – amelyek az MRR-ből származnak és egyik célterületük a hippokampusz – szelektíven aktiváltuk és az MR régióból származó neuron szubpopuláció 5-HT felszabadulását jellemeztük *in vivo* és *in vitro*. A P2X7 receptorok aktivációjának elektromos és optikai stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulásra gyakorolt hatását a P2X7 receptor genetikai deléciójával és farmakológiai blokkolásával vizsgáltuk.

1. A median raphe régióból optikai stimulációra felszabaduló szerotonin kiáramlás jellemzése.

- Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk, hogyan hat az elektromos, kémiai és optikai stimuláció a szerotonin felszabadulásra vad típusú egerek MR régiójában.

2. A MRR optikai stimulációjának vizsgálata a szerotonerg rendszerhez köthető viselkedésre egerekben.

- Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogyan hat az MRR optikai stimulációja a ChR2-t expresszálló egerek viselkedésére?

3. *In vivo* optikai stimuláció hatására felszabaduló transzmitterek szintjének vizsgálata az MRR-ben.

- Ezekben a vizsgálatokban az volt a célunk, hogy megnézzük, hogyan változnak a szerotonin, a glutamát és a GABA szintek a MR régióban különböző paraméterű optikai ingerlés hatására.

4. A hippokampális optikai stimuláció indukálta szerotonin felszabadulás feltérképezése.

- Miután vad típusú egerek HP-ából sikerült szerotonin felszabadulást előidézni elektromos és kémiai stimulusra, megvizsgáltuk és összehasonlítottuk, hogyan hat az optikai stimuláció a szerotonin felszabadulásra?

- Megvizsgáltuk továbbá, hogy miként befolyásolják az 5-HT₁ agonisták a felszabaduló szerotonin mennyiségét.

5. A P2X7 receptor szerepének vizsgálata az elektromos és optikai stimuláció indukálta hippocampális szerotonin felszabadulásban.

- Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ionotróp P2X7 receptorok részt vesznek-e a szerotonin felszabadulás szabályozásában az agyi szerotonerg pályák hippocampális végződéseiből? Ennek kiderítésére a stimulációk előtt farmakológiai gátlással blokkoltuk a P2X7 receptorokat.

4 Módszerek

4.1 Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez mindkét kísérletsorozatban 2-4 hónapos hím C57Bl/6J alapú P2X7 receptor nullmutáns (knockout; KO) transzgén egereket és vad típusú (wild type; WT) alomtársaikat használtuk fel. Az eredeti P2X7 receptor génkiütött tenyészpárok Christopher Gabel (Pfizer Inc., Groton, CT, USA) felajánlásával kerültek az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegébe, ahol az egérvonalat SPF körülmények között tenyésztik. Az utódok genotípusát PCR módszerrel egyénenként ellenőrizték az OGR Genotipizáló laborjába. A P2X7 receptor génkiütésért felelős DNS konstruktum, P2X7-F1 (5'-CGGCGTGCGTTTTGACATCCT-3') és P2X7-R2 (5'-AGGGCCCTGCGTTCTC-3'). Az egérvonal alapját alkotó génkonstruktumban a P2X7 receptort kódoló gén egy szakaszát egy neomycin rezisztenciát kódoló génszakasszal helyettesítették, amelynek hatására a létrejövő homozigótákban a P2X7 receptort kódoló gén nem íródik át és ez a P2X7 receptor fehérje hiányát okozza¹²⁰.

Minden állatot standard körülmények között tartottunk az MTA KOKI OGR állattartó szobáiban, 23±2°C-os hőmérsékleten, 60±10%-os páratartalom, 12-12 órás fény-sötét ciklusban, ahol *ad libitum* táplálék és víz folyamatosan rendelkezésükre állt. A viselkedésvizsgálatokat 9-14 óra között, az MTA KOKI MD szintjén és Viselkedésvizsgáló Egységében (VVE) végeztük és az egerek a kísérletek előtt egy héttel kerültek a standard állattartó szobákba.

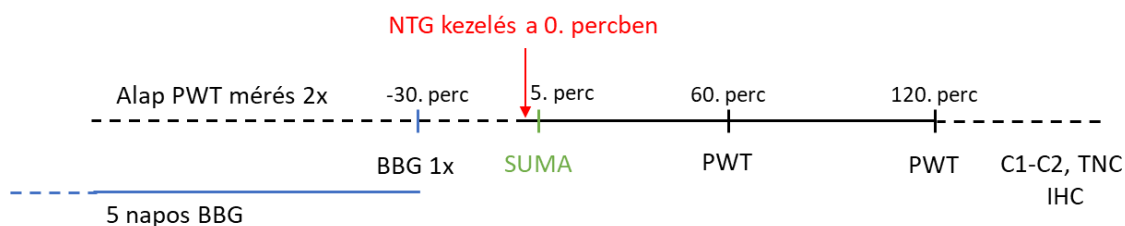
Az állatkísérleteket a nemzetközi és magyar törvényi szabályozással összhangban a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Munkahelyi Állatetikai Bizottság jóváhagyásával végeztük.

4.2 NTG indukált migrén modell

4.2.1 Emelkedő hőmérsékletű hot plate teszt

A tesztet megelőzően az egereket random 10-13 fős csoportokba soroltuk, és ötösével 1 hétre ketrecekbe raktuk. Az elfogultság elkerülése érdekében az Excel segítségével randomizáltunk, hogy melyik egér melyik csoportba tartozik. Az egerek nociceptív stimulációra való reakcióját – Almási és munkatársai tanulmányát követve³⁰² – egy emelkedő hőmérsékletű hot plate rendszerrel (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) határoztuk meg, a széles körben használt látencia mérések helyett. A tanulmány szerint ez a mérési technika a termális hiperalgédia pontosabb vizsgálatát teszi lehetővé.

A vizsgálat napján az állatokat 10 percig habituáltuk a vizsgálati készülékben, mielőtt a kiindulási nociceptív küszöbértéket mértük. Az állatokat egy elektromosan fűtött fémlemezre helyeztük, amelyet állandó 30°C-on tartottunk (kiindulási hőmérséklet). A habituációs idő után a lemez hőmérsékletét konstans 6°C/perc sebességgel növelni kezdtük, amíg az egerek nocifenzív viselkedést mutattak (a hátsó mancs rázása, nyalogatása, vagy a forró lemezről való elugrás). Ezután a fűtést azonnal leállítottuk, az egeret eltávolítottuk a készülékből, és a lemezt gyorsan lehűtöttük. A hőmérsékletet, amelyenél az egerek a nocifenzív viselkedést mutatták, mint végtagelrántási küszöbérték jegyeztük le (paw withdrawal threshold; PWT), és °C-ban adtuk meg. Körülbelül 1 órával később a mérést megismételtük, és a két érték átlagából a kiindulási termális nociceptív küszöbértéket számoltuk ki. A második mérés után az állatokat a lent leírt drogokkal és módon kezeltük, majd egy és két órával később mértük a poszt-drog nociceptív küszöbértéket (6. ábra).



6. ábra: A kísérleti eljárások bemutatása. Az ábra az NTG indukálta migrén egér modell kísérleti elrendezését mutatja. Az alap PWT értékek mérését követően az egereket azonnal kezeltük NTG-vel vagy az oldószerével. Az egyszeri BBG kezelés esetében az alap PWT értéket a BBG adását megelőzően mértük, míg 5 napos BBG kezelésnél az 5. napon az utolsó BBG adás előtt mértük.

4.2.2 Drogok és kezelések

Bates és mtsai²²⁶ által leírt NTG modell kissé módosított változatát alkalmaztuk. Az kiindulási termális nociceptív küszöbértékek mérése után az egerek intraperitoneálisan (i.p.) 15 mg/kg NTG (Nitro POHL®, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Németország) vagy oldószer (49 mg glükóz-monohidrát/ml) injekciót kaptak. Az NTG dózist irodalmi adatok és előzetes vizsgálatok alapján választottuk ki²²⁶. Kísérleteinkben nagyobb dózisban alkalmaztuk az NTG-t a PWT érték szignifikáns csökkentésére, mint amit a Bates féle cikk írt, ami megmagyarázható az NTG eltérő forrásával, és a fajok közti NTG érzékenységek eltéréseivel is^{226,303-305}. Szumatriptánt (Sigma-Aldrich; Budapest, Magyarország, oldva fiziológiás sóoldatban) alkalmaztunk kísérleteink validálására: az egereket 5 perccel az NTG i.p. beadást követően i.p. 600 µg/kg szumatriptán²²⁶ vagy fiziológiás sóoldat injekciót kaptak. A P2X7 receptor antagonistát, a Brilliant Blue G-t (BBG; Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) vagy annak oldószerét (fiziológiás sóoldat) két különböző protokoll alapján alkalmaztuk:

- akut kezelés: a kiindulási termális nociceptív küszöbérték mérése után és az NTG kezelés előtt 30 perccel 50 mg/kg i.p. BBG vagy fiziológiás sóoldat injekciót adtunk, vagy
- szubakut kezelés: az egereket 5 egymást követő napon kezeltük 50 mg/kg i.p. BBG vagy fiziológiás sóoldat injekcióval, az utolsó injekciót 30 perccel az NTG kezelést megelőzően adtuk (6. ábra).

A dózisok kiválasztása korábbi vizsgálatokon alapult^{226,296,306}. Minden oldat frissen lett elkészítve a felhasználás napján.

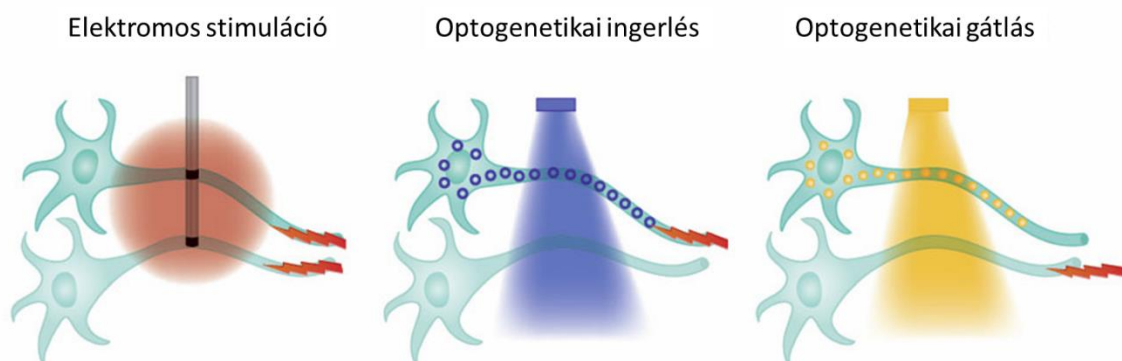
4.2.3 TNC immunhisztokémia

Kísérleti csoportok 5-6 egérből álltak. Két órával az i.p. NTG (15mg/kg) vagy oldószer injekciót követően, a mély altatásban lévő egereket 5%-os foszfát pufferes fiziológias sóoldattal oldott paraformaldehid (0.5% bóráx) oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az egész agyat és a nyaki szakaszi gerincvelőt eltávolítottuk, majd 3 órán át 5%-os paraformaldehid oldatban tartottuk, majd 20-24 órára 30%-os szacharóz tartalmú fixáló oldatba helyeztük át. Ezután a vizsgálandó területekről 30 µm-es koronális sorozatmetszeteket készítettünk száncás mikrotommal. Minden negyedik metszeten c-Fos immunhisztokémiát végeztünk. A szabadon úszó metszeteket 0.3%-os hidrogén-peroxid oldattal, majd 0.3%-os Triton X-100-at és 2%-os normál kecske szérumot tartalmazó PB oldatban 1 órán át szobahőmérsékleten előkezeltük, majd a metszeteket nyúlban termeltetett anti-fos primer antiszérumba helyeztük (1:10000, 72 óra, 4°C, sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország). A következőkben a metszeteket 0.1 M foszfát pufferes fiziológias sóoldattal (PBS, pH: 7.4) mostuk, mielőtt biotinilált, nyúl ellen termeltetett szekunder kecske antitestet tartalmazó oldatba helyeztük 1 órára, majd szintén 1 órán át ABC-t (avidin-biotin peroxidáz komplexet, Vectastain – ABC Kit PK-6100 Elite, Burlingame, CA, USA) tartalmazó oldatban inkubáltuk. Végül a metszeteket 3,3'-diamino-benzidint (DAB, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazó nikkell-szulfát oldattal kezeltük 2 percig, felvittük zselatinos tárgylemezre, majd lefedtük. A metszetekről mikrofotókat készítettünk és a fos-reaktív magokat számoltuk a nyaki gerincvelő mindkét oldalán és a TNC-ben ImageJ szoftver segítségével. Állatonként 30-30 bal és jobb féloldali metszetet (TNC) és 10-10 bal és jobb féloldali metszetet (nyaki gerincvelő) számoltunk és a c-Fos pozitív magok átlag értékét határoztunk meg területenként.

4.3 Optogenetika

Az elmúlt évtized idegtudományi kutatásait forradalmasító technika az optogenetika, amelynek során algákból és baktériumokból származó fényérzékeny fehérjét kódoló gént nyernek ki, majd az agy bizonyos idegsejtjeibe juttatják be vírusok segítségével. A gén kifejeződik, és létrejönnek a fényre aktiválódó ioncsatornák, amelyek beépülnek az idegsejt membránjába. A genetikailag módosított idegsejtekben mesterséges akciós potenciálokat generálnak a fény felvillanásával, így befolyásolva az idegsejtek aktivitását (7. ábra). A két legelterjedtebb fényaktiválható ioncsatorna a channelrhodopsin (ChR) és a halohodopszin (NpHR): az előbbin pozitív (Na^+ , Ca^{2+}), míg az utóbbin negatív (Cl^-) töltésű ionok jutnak át. A kétféle csatornát más-más hullámhosszúságú fény aktiválja, így téve lehetővé, hogy egy sejtben párhuzamosan kifejezve tetszőlegesen be- és kikapcsoljuk az adott idegsejt aktivitását. Az így nyert megfigyelésekből célzottan lehet vizsgálni, hogy mi a szerepe egyes agyterületeknek és sejtípusoknak egy-egy idegi működésben. Mindezek alapján pedig célzott gyógyszereket és kezeléseket lehet kifejleszteni.

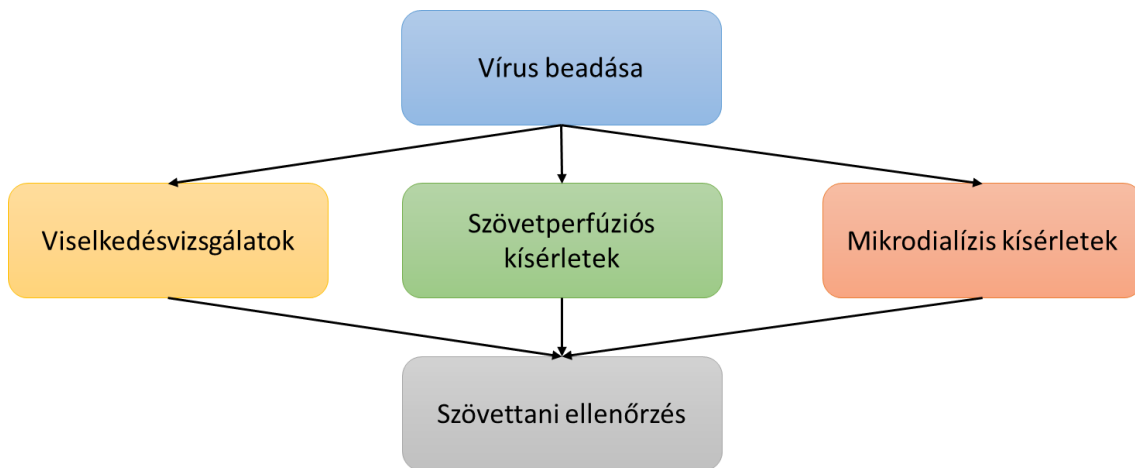
Azonban itt is körültekintően kell eljárni a kapott eredmények értelmezésével. Elég arra gondolni, hogy a fényérzékeny receptorok expressziója önmagában is befolyásolhatja az idegsejtek működését, esetleg a szomszéd idegsejteken is kifejeződhetnek a mesterségesen bevitt fényérzékeny fehérjék. Valamint óvatosan kell eljárni a viselkedés vizsgálatoknál a fény bejuttatásához szükséges implantátumok agyba való behelyezésekor is.



7. ábra: Ingerlés típusok közti eltérések. A célzott optikai gerjesztés vagy gátlás, lehetővé teszi az idegsejt működésének specifikus befolyásolását, míg az elektromos stimuláció erre nem alkalmas³⁰⁷.

4.3.1 Kísérleti elrendezés

A vírus beadását 50-70 nap közötti állatokon végeztük. 3 héttel a vírusbeadás után kezdtük a viselkedésvizsgálatokat elvégezni. A szövetperfúziós és mikrodialízis mérések 8 héttel a vírusbeadást követően történtek. A tesztek után ellenőrzés céljából szövettani vizsgálatot végeztünk, ahol vizualizáltuk a robusztus ChR2 expressziót, valamint az optrodok helyes elhelyezkedését (8. ábra).



8. ábra: Az optogenetikai kísérletek elrendezése. *A kísérletek során egy vírus injektált állatot csak egyszer használtunk fel egy fajta kísérletben, nem végeztünk ugyanazon állaton több vizsgálatot. A különböző kísérletekben részben eltérő stimulációs paramétereket (pl. frekvencia) használtunk, ennek az az oka, hogy minden kísérletben azt a frekvenciát választottuk, mely eredményeink szempontjából a legoptimálisabb volt (pl. szövetperfúziós kísérletek).*

4.3.2 Vírus beadása és optogenetikai paraméterek

Az AAV konstrukció beadását az egerekbe ketamin-xilazin keverékkel kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). 40 nl ChR2 fehérjét (AAV2.5.hSyn.hChR2(H134R)eYFP.WPRE.hGH; 2.04e13 GC/ml; Addgene26973, Penn Vector Core, Philadelphia, PA, USA) kódoló adenoasszociált vírus (AAV) vektort injektáltunk az egerek MRR-jába (AP: 4,10 mm; L: 0,0 mm; DV: 4,60 mm³⁰⁸) MicroSyringe szivattyúvezérlőhöz (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) csatlakoztatott

20-30 μm csúcsátmérőjű üveg kapillárisból. A vírus beadása után a kapilláris még 5 percre a helyén maradt, hogy segítse a vírus diffúzióját és minimálisra csökkentse a visszafolyását. Közvetlenül az injekció beadása után a furatot lezártuk és a fejbőrt varratoltuk.

A kísérletekben az optikai stimulushoz 473 nm-es DPSS lézert (IkeCool Corporation, Anaheim, CA, USA) használtunk.

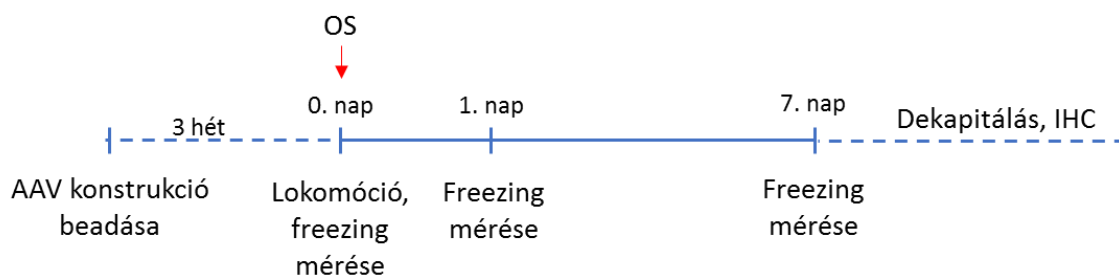
4.3.3 Vírus injektált egerek lokomotoros aktivitásának és freezing viselkedésének monitorozása optogenetikai ingerlés hatására

Az AAV konstrukció beadása után két héttel az optikai szál beültetését az egerekbe ketamin-xilazin keverékkel kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük (Kopf Instruments, USA). Az optikai szál a median raphe régió fölé ültettük be, a pontos koordinátái a következők: 10° -os dorzális szögben, AP: -4,80; L: 0,0 mm; DV: 4,062. A fény stimulációhoz használt optikai szál multimódusú optikai szálból (AFS 105/125Y, NA: 0.22, low-OH, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) és karimás cirkónium gyűrűből (LMFL-172-FL-C35-OSK, Senko, Cologne, Németország) készítették. Az implantátumokat akrilgyantával rögzítettük. A műtétet követően 4-7 nap múlva kezdődtek a viselkedés kísérletek. A lézersugarakat alacsony zajszintű diódalézerrel generáltuk (IkeCool Corporation, Anaheim, CA, USA) majd kollimáltuk és bevezettük az optrodához száloptikai patch kábelek segítségével. A kísérletek előtt és után teljesítménymérővel mértük az optikai szál által közvetített nettó energiát és a kísérlet mérési adatait csak akkor vettük figyelembe, mikor a teljesítmény min. 10 mW volt folyamatos fénykibocsátás mellett. Az egereket folyamatosan stimuláltuk 20 Hz-en 5 percre keresztül egy $30 \times 30 \times 30$ cm-es plexi stimulációs arénában. Két kontroll csoport volt, az egyikben olyan egerek, melyek injektálva és stimulálva is voltak, de ChR2 expressziót nem mutattak az MR-ben, a másokban pedig intakt egerek. A viselkedést videokamera segítségével rögzítettük. A lokomotoros aktivitást utólag a videofelvétel alapján a számítógép képernyőjére helyezett négyzetrácsos átlátszó műanyag lap segítségével határoztuk meg. Az aréna padlóját 9 db 10×10 cm-es négyzetekre osztottuk

fel és mértük az állatok által megtett utat, illetve a keresztezések számát (mind a 4 lábbal) (9. ábra).

A freezing (dermedés) viselkedési formát egyszerűen mértük, hiszen csak a mozgás teljes hiányát kellett regisztrálni, a légzés kivételével. A viselkedést videokamera segítségével rögzítettük. A freezing viselkedést utólag a videofelvétel alapján manuálisan elemeztük, mert a kontraszt arányok nem voltak megfelelőek egy megbízható automatizált elemzéshez. A freezing viselkedés elemzésénél a következő viselkedéseket különböztettük meg: exploráció, freezing, resting (nyugalmi) állapot, illetve egyéb viselkedési állapotok, pl. grooming (tisztálkodás). A freezingtól restinget a test pozíciója különbözteti meg, mivel az előbbi esetében meg van feszülve a test. Illetve az 5 perces teszt esetén egy aránylag idegen környezetben, nem valószínű, hogy a mozdulatlanság a restinget jelentené, hiszen az állat célja, hogy felfedezze a környezetét, hogy nincs veszély. A kísérlet során 20 Hz-es stimulust alkalmaztunk, a freezing állapotot a stimuláláskor (0. nap), az 1. nap és a 7. nap során elemeztük, amikor az egereket visszahelyeztük a stimulációs ketreche.

A viselkedésvizsgálatok után az egereket perfundáltuk, és szövettani vizsgálatot végeztünk, ahol ellenőriztük a robusztus ChR2 expressziót és az optrodák elhelyezkedését. Csak azon egerek eredményét vettük figyelembe melyek ezen feltételeknek megfeleltek.



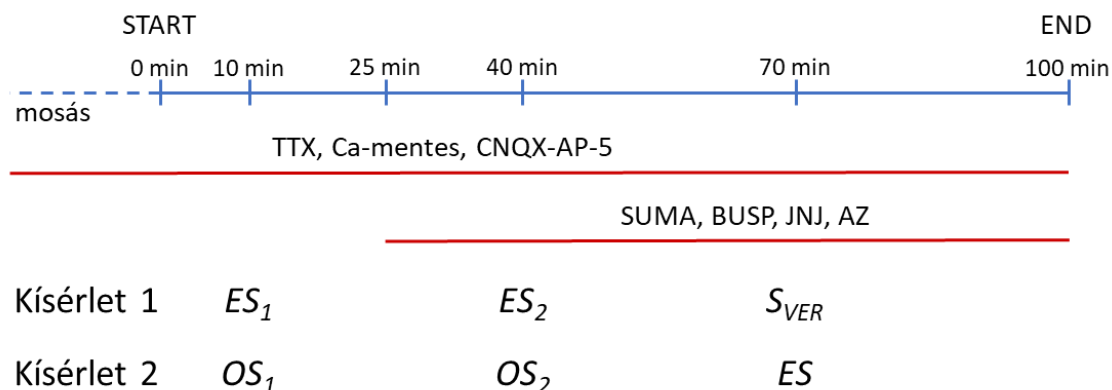
9. ábra: A kísérleti eljárások bemutatása. Az ábra a viselkedésvizsgálatok elrendezését mutatja. Az állatok lokomotoros aktivitásának mérése egy kísérletben a freezing viselkedés mérésével egyidejűleg a stimuláció napján történt (0. nap), majd a freezing viselkedést ismételten mértük a fény stimulációt követő 1. és 7. napon. Az ábrán az OS az optikai stimulációt jelöli.

4.3.4 Túlélő agyszelet preparálása

Miután dekapitáltuk az állatot, eltávolítottuk az agyat, majd Microm HM 650 V vibratom (Microm International GmbH, Walldorf, Germany) segítségével 300 µm-es koronális agyszeleteket vágunk, melyek preparálása mindvégig jéghideg karbogenizált (95% O₂; 5% CO₂) Krebs' oldatban történt (összetétele mM-ban: NaCl 113, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, NaHCO₃ 25, glükóz 11,5, aszkorbinsav 0,03, Na₂EDTA 0,1, pH 7,4). Ezt követően a szeleteket trícíált izotópot tartalmazó Krebs' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül, majd áthelyeztük a perfúziós kamrába, ahol 45 percen keresztül előperfúziót alkalmaztunk a felesleges radioaktivitás kimosása céljából. Ezután a szeleteken átfolyó oldatból mintákat vettünk szövetperfúziós technika segítségével (leírása a következő fejezetben található). Az inkubációs és perfúziós oldatot is karbogen gázkeverékkel buborékoltattuk 37 °C-on, ezzel biztosítva az oldat megfelelő O₂ tartalmát és pH-ját.

4.3.5 *In vitro* [³H]szerotonin és [³H]glutamát felszabadulás mérése egér median raphe és hippokampusz szeletekből szövetperfúziós technika segítségével

A [³H]szerotonin és [³H]glutamát felszabadulás kísérleteket korábbi munkáinkban leírt módszerek szerint végeztük kis módosítással³⁰⁹. Az inkubációt és perfúziós mosást követően a szeleten átfolyó oldatból 3 (Kísérlet 1) és 1 (Kísérlet 2) perces mintákat gyűjtöttünk (a mintavételi periódus 100 perc volt) és meghatároztuk a minták radioaktivitás tartalmát. A mintagyűjtési periódus alatt 3 alkalommal ingerlést alkalmaztunk, illetve amelyik kísérletben erre szükség volt, ott drogot adagoltunk a perfúzióban, a kísérleti eljárásokat lásd a következő oldalon a 10. ábrán.



10. ábra: A kísérleti eljárások bemutatása. Az ábra két kísérleti elrendezést mutat. A Kísérlet 1-ben két elektromos (ES_1 , ES_2) és egy kémiai (S_{VER}) ingerlést, a Kísérlet 2-ben két fény (OS_1 , OS_2) és egy elektromos (ES) ingerlést alkalmaztunk adott időpontban.

Az elektromos és fény ingerléseket Grass S88 stimulátor (Grass Medical Instruments, Quincy, MA, USA) segítségével végeztük. Az ingerlési paraméterek a következők voltak: elektromos - 3 V, 10-100 Hz, 5-10 msec, 10800 shock;

optikai - 15 mW, 473 nm, 10-100 Hz, 5-10 msec, 10800 shock.

A kísérletek végeztével a szöveteket 0,5 ml 10% triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 15 perc elteltével a szöveti minták 0,1 ml aliquotjainak radioaktivitását határoztuk meg. A vizsgálandó vegyületeket a második ingerlés előtt 15 perccel adtuk a perfúziós folyadékhoz, míg módosított Krebs' oldattal történő kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől a kísérlet végéig azt alkalmaztuk.

A minták radioaktivitását Wallac 1409 szcintillációs spektrométer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. A perfúziós mintákból 0,5 ml aliquotokat, a szöveti mintákból 0,1 ml aliquotokat 2 ml szcintillációs koktélhoz (Packard Ultima Gold, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) adagoltunk, majd 2 percig mértük a radioaktivitást. A kísérlet végén a megmaradó szövetek tömegét megmértük, elhomogenizáltuk őket triklórecetsavban, és a trícium tartalmat meghatároztuk. A kísérlet kiértékelése során az egyes perfuzátum minták radioaktivitás-tartalmát fejeztük ki a mintavétel időpontjában kalkulált szöveti tartalom százalékában (FR%). A szöveti

trícium felvételt az össz release + szövetben maradt tartalom kiszámolásával határoztuk meg és Bq/g-ban fejeztük ki. A nyugalmi transzmitter felszabadulást az ingerlést megelőző minta radioaktivitásával fejeztük ki, az ingerlés által indukált transzmitter felszabadulást (FRS, FRS₁) a görbe alatti terület módszerrel, az ingerlést megelőző minta aktivitásának az ingerlés alatt, illetve az azt követő mintákban mért radioaktivitásaiból való kivonásával számoltuk ki. A vizsgált anyagok illetve kezelések hatását az ingerlés által kiváltott [³H]transzmitter felszabadulásra a kontroll kísérletekkel analóg válaszaival (amikor nem adtunk drogot) hasonlítottuk össze.

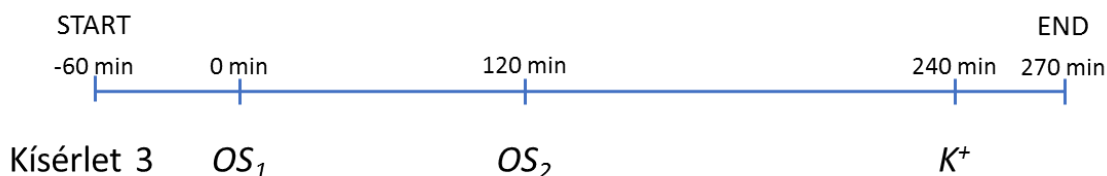
4.3.6 Mikrodialízis szonda beültetése

A mikrodialízis szonda beültetését az egerekbe 20% uretánnal kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). A mikrodialízis szondát (EICOM CX-I Brain Probe (membrane: artificial cellulose, molecular weight (MW) cut off: 50 000 Da, OD: 0,22 mm, length: 2 mm, Terenure, Írország)) a median rapheba ültettük (pontos koordináták: 10°-os dorzális szögben, AP:-4,80; L: 0,0 mm; DV: 5,50). Az optikai szál (AFS 105/125Y, NA: 0.22, low-OH, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) a szonda vezetőkanüljén keresztül volt bevezetve és a membrán tetején ért véget. A mikrodialízis kísérleteket a 2 órás kiegyenlítődési idő után kezdtük meg. A kísérletet követően az állatokat mély anesztéziában dekapitáltuk, majd az eltávolított agyszövetből metszeteket készítve konfokális mikroszkóp és sztereotaxiás atlasz segítségével igazoltuk a mikrodialízis szonda pontos beültetését.

4.3.7 Mikrodialízis kísérletek

A kísérletek során az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük és a mikrodialízis szondán keresztül ACSF-et (összetétele mM-ban: 120 Na⁺, 6 K⁺, 2 Ca²⁺, 125 Mg²⁺, 129 Cl⁻, 125 H₂PO⁴⁻, 21 HCO³⁻, pH 7,4) perfundáltunk. Az áramlási sebesség 2 µl/perc volt. A perfúzió kezdetétől számított 2 óra elteltével kezdtük a 30 perces minták gyűjtését. Az egyes frakciókat mintatartó csövekbe gyűjtöttük, majd HPLC-vel elemeztük. Minden állat esetén 12 db mintafrakciót gyűjtöttünk és az első mintából állapítottuk meg az alapkonzentrációkat. Az optikai stimulációt a negyedik (20 Hz) és nyolcadik (50 Hz théta

burst) minta gyűjtésének elejétől számítva 5 perccel később kezdtük, és 5 percig tartott (Kísérlet 3 eljárás, 11. ábra). Az optikai szál 10-20 mW nettó energiát szállított folyamatos fénykibocsátás mellett. Az utolsó minta esetében kémiai stimulációt alkalmaztunk, 100 mM KCl-t 5 percig.



11. ábra: A mikrodialízis során alkalmazott kísérleti eljárás bemutatása. A Kísérlet 3-ban két fény (OS₁, OS₂) és egy kémiai (K⁺) ingerlést alkalmaztunk adott időpontban.

4.3.8 Transzmitterek meghatározása magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)

A HPLC analízis során a MRR-ből származó dializátumokból meghatároztuk a szerotonin (5-HT), glutamát (Glu) és a GABA neurotranszmittereket, valamint a felszabaduló ATP-t hippocampusz szeletek szuperfúzáumából. Az extrakciós oldat 0,1 M perklórsav (PKS) volt, amely 10 μ M teofillint tartalmazott (belső standardként).

A dialízis minták kezdeti térfogatát mértük, majd azonos térfogatú jéghideg PKS-val hígítottuk, és az „A” mobil fázissal 300 μ l-re egészítettük ki. A mintát 3510 g-n 10 percig 0-4 °C-on centrifugáltuk, és 240 μ l-t injektáltunk a dúsító oszlopra. A mikrodialízis mintának a maradékát (60 μ l) desztillált vízzel hígítottuk, és a pH-t 2,7 M nátrium-karbonáttal 10,5-re állítottuk be. A mintákat 20 μ l 20 mM dansyl-kloriddal reagáltattuk 15 percig 70 °C-on, majd a reakciót 10 μ l hangyasavval leállítottuk. A Glu és GABA tartalmak meghatározásához 350 μ l reakcióelegyet injektáltunk a dúsító oszlopra.

Az *in vitro* szövetperfúziós szeletek szuperfúzáumának kiindulási térfogatát mértük, majd 50 μ l jéghideg PKS oldatot adtunk a mintákhoz, amelyeket centrifugáltunk a fent leírt módon, és 500 μ l-t használtunk a felszabaduló ATP tartalmának meghatározásához.

A 5-HT és az ATP szintjét online oszlopkapcsolásos elválasztással határoztuk meg a Discovery HS C18 50×2 mm-es és 150×2 mm-es oszlopok alkalmazásával. A mobil fázisok áramlási sebessége („A” 10 mM kálium-foszfát, „B” 0,25 mM EDTA 0,45 mM oktánszulfonil-sav nátriumsóval, 8 % acetonitril (v/v), 2% metanol (v/v), pH 5,2) 350 vagy 450 µl/perc volt a lépés gradiens alkalmazásával. A puffer (10 mM kálium-foszfát, pH 5,2) dúsítás és sztripelés áramlási sebessége 300 µl/perc a 4 perc alatt mikrodialízis mintáknál és 8 perc alatt szuperfúzált mintáknál. Az alkalmazott HPLC rendszer egy Shimadzu LC-20 AD analitikai és mérőrendszer volt, Agilent 1100 sorozatú változó hullámhossz-detektorral 253 nm-en, és egy elektrokémiai amperometrikus BAS 100 detektorral, a Bioanalytical System 730 mV potenciálra állítva.

A dansilezett aminosavak (Glu és GABA) szintjét a fenti oszloprendszer választotta el. A mobil fázisok áramlási sebessége („A” 10 mM ammónium-foszfát, 16,8% acetonitril (v/v), 4,8% metanol (v/v), B” 10 mM ammónium-foszfát, 70% acetonitril (v/v), 20% metanol (v/v), pH 3,0) lineáris gradiens módban 400 µl/perc volt. A puffer (10 mM ammónium-foszfát, 1,9% acetonitril (v/v), 1,1% metanol (v/v)) dúsítás és sztripelés áramlási sebessége 300 µl/perc volt a 4 perc alatt, és a teljes futtatási idő 55 perc volt. Az alkalmazott analitikai rendszer a fent említett Shimadzu LC-20 rendszer, a Gilson Model 121 Fluorimeter 340 nm-es gerjesztési és 450 nm-es emissziós hullámhosszra volt beállítva.

Az 5-HT, Glu és GABA *in vitro* extrahálási hatékonyságát $21,1 \pm 4,8\%$, $17,1 \pm 2,8\%$ és $21,9 \pm 3,4\%$ -re becsültük. Az 5-HT, Glu, GABA koncentrációját abszolút mennyiségben (nmol/ml vagy pmol/ml) vagy az alapkoncentráció százalékában (átlag \pm SEM) fejeztük ki.

4.3.9 Szöveti ellenőrzés

A viselkedési és mikrodialízis kísérletek után mély altatásban lévő egereket először 0,1 M foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal (PBS, pH: 7,4) 1 percig, majd 4%-os foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal oldott paraformaldehid (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) oldattal 10 percig (PFA, pH: 7,4) transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat kivettük és 24 órás +4°C-on történő utófixálás után krioprotekció céljából 20 %-os cukor-PBS oldatba tettük, majd a vizsgálandó területekről 40 µm-es koronális

sorozatmetszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal. Ezután minden harmadik metszeten a nem specifikus antitest kötődés blokkolására és az antitestek penetrációjának elősegítésére 30 perces 0.5 % TritonX-100-at (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Németország) és 30 perces 2 % BSA-t (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazó PBS oldatos inkubációt alkalmaztunk. Majd a metszeteket 2 napig +4°C-on a primer antitestben (Rabbit-anti-Serotonin, 1:10000, CatNo: 20080; ImmunoStar Inc., Hudson, WI, Chicken anti-GFP, 1:2000, CatNo: A10262, Life Technologies, Waltham, MA, USA) inkubáltuk, melyet PBS oldattal hígítottunk. Ezt követte a PBS-ben hígított szekunder antitestben (Cy3-conjugated Donkey-anti-Rabbit, 1:500, CodeNo: 711-165-152, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK; Alexa488-conjugated Goat-anti-Chicken, 1:1000, CatNo: A11039, Life Technologies, Waltham, MA, USA) való 1 éjszakán át történő inkubálás. Többszöri PBS-es mosást követően a szeleteket tárgylemezre húztuk, majd szárítás után 10 µg/ml bisbenzimidet (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazó Mowiol-lal (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Németország) lefedtük.

A transzmitter felszabadulás kísérletek után a szeleteket 4%-os foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal oldott paraformaldehid fixáltuk és további feldolgozás nélkül tárgylemezre húztuk a vírus konstrukció fluoreszcens jelének kimutatására.

A metszeteket Nikon C2 konfokális mikroszkóppal értékeltük ki. Az optikai szál, a mikrodialízis szonda és a vírusfertőzés helyét sztereotaxiás atlasz segítségével határoztuk meg³⁰⁸.

4.4 Statisztikai analízis

Minden adatot átlag ± standard hiba (SEM) formájában tüntettünk fel. Több adathalmaz összehasonlítására ANOVA tesztet használtunk, amit egy *post hoc* teszt követett a páronkénti különbségek vizsgálatára.

A migrén modell során használt statisztikai analízisek a következők:

A viselkedés kísérletekben a P2X7 WT és KO egerek termális hiperszenzitivitását kétszemponos ismételt méréses ANOVA-val, „genotípus”, „kezelés” és „idő” faktorokkal elemeztük. Csoportonként 9-20 állatot használtunk.

A c-Fos pozitív magok számát a nyaki gerincvelőben és TNC-ben multifaktoriális varianciaanalízissel hasonlítottuk össze és azt követően Wilks Lambda tesztet alkalmaztunk „genotípus” és „kezelés” változókkal. Fischer LSD tesztet használtunk *post hoc* összehasonlításra. A páronkénti összehasonlításhoz Student-t tesztet használtunk. Csoportonként 5-6 állatot használtunk.

Az optogenetikai kísérletek során használt statisztikai analízisek a következők:

A viselkedés kísérletekben a lokomóciót kétszemponos ismételt méréses ANOVA-val „kezelés” és „idő” változókkal elemeztük. Az adatokat négyzetgyök transzformáltuk, hogy megfeleljenek az ANOVA követelményeknek. Szignifikancia esetén *post hoc* Duncan tesztet alkalmaztunk a csoportok páros összehasonlítására. Csoportonként 6-9 állatot használtunk.

A [³H] transzmitter felszabadulás kísérletekben az adatok elemzésére egyszemponos ANOVA-t „kezelés” faktorról végeztünk. A különböző drogok hatásának vizsgálatokor *post hoc* Dunnett tesztet alkalmaztunk. A páronkénti összehasonlításhoz Student t-tesztet használtunk. A 4. táblázatban szereplő adatok elemzéséhez egyszemponos ANOVA-t és azt követő Tukey's *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Csoportonként 4-8 állatot használtunk.

A HPLC adatok elemzésére kétszemponos faktoriális ANOVA-t „kezelés” és „stimuláció” faktorokkal végeztünk. Szignifikancia esetén *post hoc* Dunnett/Fischer LSD tesztet alkalmaztunk a csoportok összehasonlítására. Csoportonként 5 állatot használtunk.

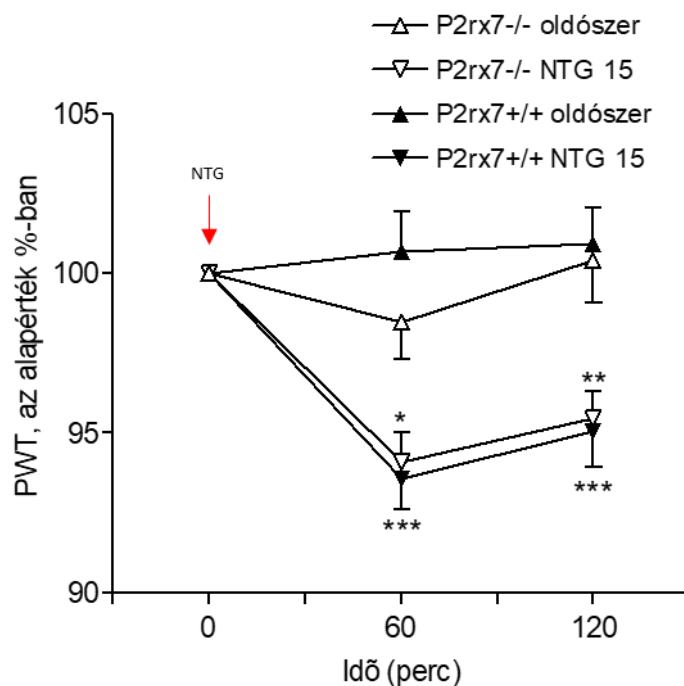
A számítások elvégzésére Statistica 13.1 (Dell Software, Round Rock, TX, USA) programot használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p > 0.05$ értéket vettük.

5 Eredmények

5.1 A P2X7 receptorok genetikai deléciójának és farmakológiai antagónizmusának hatása migrén állat modellben

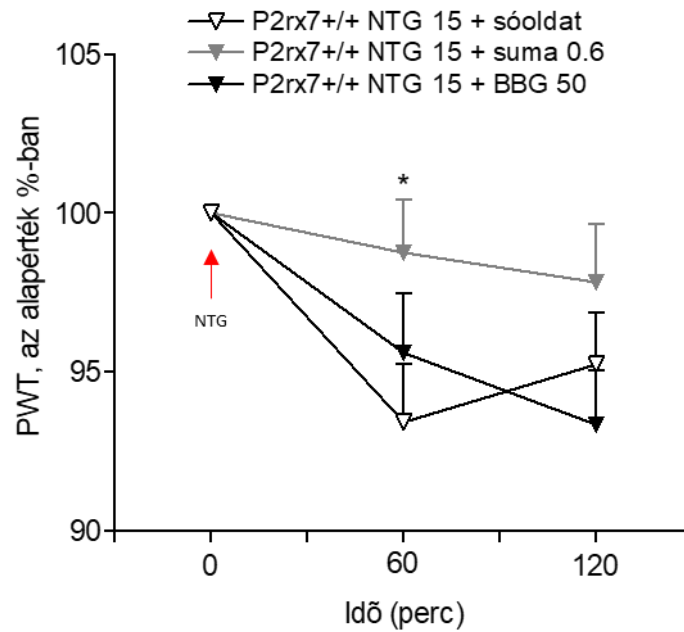
5.1.1 A P2X7 receptor genetikai deléciójának hatása az NTG indukált termális hiperszenzitivitásra

A vad típusú (P2X7 +/+) egerek kiindulási nociceptív küszöb értéke $45,95 \pm 0,14$ °C volt (n=68). Az NTG kezelés szignifikánsan és időfüggő módon csökkentette a végtagelrántási küszöbértéket (PWT, paw withdrawal threshold), szemben az oldószerral kezelt állatok PWT értékeihez képest (1 óránál: $100,70 \pm 1,25\%$, n=12 és $93,56 \pm 0,95\%$, n=13; 2 óránál: $100,92 \pm 1,13\%$, n=12; és $95,06 \pm 1,13\%$, n=13, oldószerral és NTG-kezelt egerekben, *** p<0,0001, 12. ábra). A P2X7 KO (P2X7 -/-) egerekben a kiindulási PWT értékek nem különböztek jelentősen a vad típusú egerekétől ($45,47 \pm 0,23$ °C, n=20, p=0,1015, Student t-teszt). Hasonlóképpen, az NTG-indukált PWT csökkenés sem különbözött szignifikánsan a vad és KO egerekben (ANOVA genotípus × kezelés hatása $F_{1,41}=1,00$, p=0,3243, 12. ábra).



12. ábra: Az NTG kezelés termális hiperszenzitivitást okoz vad és P2X7 KO egerekben. *I.p.* NTG kezelést követően a nociceptív küszöbérték változásait, mint PWT, az alapérték százalékában kifejezve mutatjuk be. A PWT szignifikánsan csökkent az NTG kezelt állatokban, szemben az oldószerrel kezeltékhez képest (ANOVA, effect of treatment, $F_{1,41}=37,34$, $p<0,0001$). Az NTG-indukált PWT csökkenés nem különbözött jelentősen a vad típusú és KO egerekben. A statisztikai analízis során kétszemponos ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Az alap PWT értékek mérése után azonnal kezeltük az állatokat NTG-vel.

A modell validálásához, migrén ellenes szerként, szumatriptán szukcinátot (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) használtunk, mivel ismert, hogy gátolja az NTG által kiváltott termális hiperszenzitivitást egerekben²²⁶. A vad típusú egerekben, az NTG adás után 5 perccel szumatriptánnal kezelt egerekben a PWT érték magasabb volt, mint azokban az állatokban, akik azonos térfogatú, fiziológiás sóoldatot kaptak (1 óránál: $98,74 \pm 1,66\%$, $n=10$, $93,43 \pm 1,80\%$, $n=10$, $p=0,0375$ NTG + szumatriptán és NTG + sóoldattal kezelt egerekben, 13. ábra).

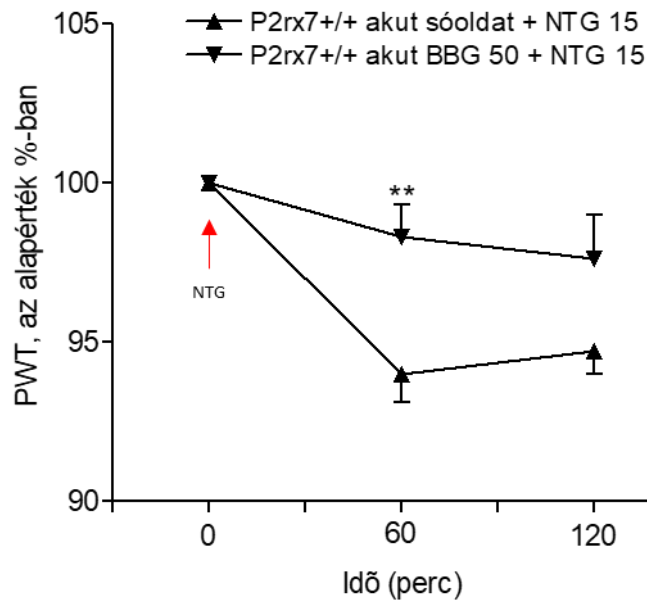


13. ábra: A szumatriptán és a P2X7 antagonistá BBG kezelés hatása a NTG indukált termális hiperszenzitivitásra egerekben. A vad típusú egereket 600 µg/kg szumatriptánnal vagy 50 mg/kg BBG-vel i.p., vagy azonos mennyiségű fiziológiai sóoldattal kezeltünk NTG adás után 5 perccel. Szignifikáns különbség volt a sóoldattal és szumatriptánnal kezelt egerek PWT értékei között. A statisztikai analízis során egyszempontos ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0,05$. Az alap PWT értékek mérése után azonnal kezeltük az állatokat NTG-vel.

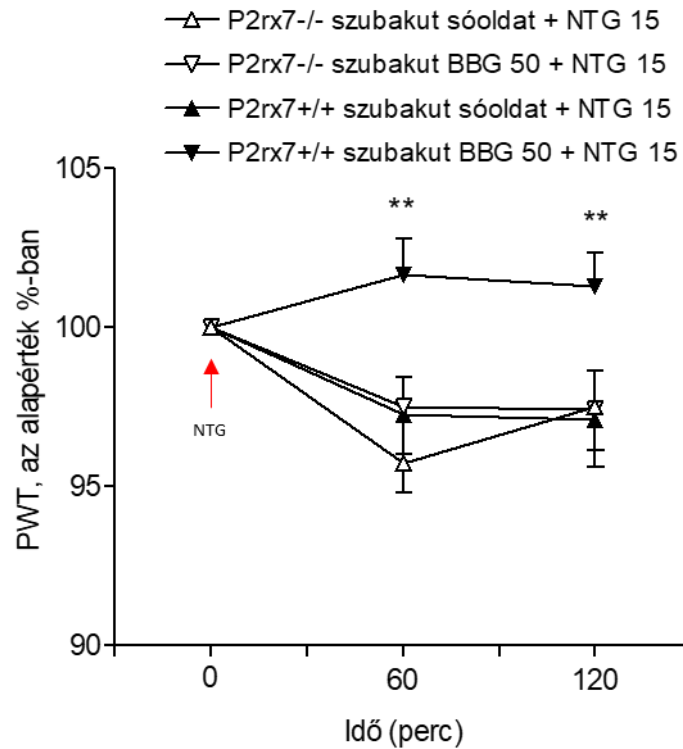
5.1.2 A P2X7 receptor antagonistá megakadályozza az NTG-indukált termális hiperszenzitivitást

A következő kísérletekben a P2X7 receptor közvetítő szerepét vizsgáltuk az NTG által kiváltott termális hiperszenzitivitásban. A kísérletsorozatban egy specifikus P2X7 antagonistá, BBG szisztémás adásának hatását vizsgáltuk, hogy képes-e enyhíteni az NTG-indukálta termális allodyniát egerekben. Az NTG injekció után 5 perccel beadva a BBG (50 mg/kg) nem volt hatással a termális hiperszenzitivitásra vad típusú egerekben (13. ábra). Azonban, amikor a BBG-t profilaktikus szerként alkalmaztunk, és 30 perccel az NTG beadása előtt adtuk, már hatékony volt egyszeri alkalmazása is (14. ábra), és teljesen kivédte az NTG hatását 5 napos kezelést követően vad típusú egerekben (15.

ábra). Ezzel szemben az azonos BBG kezelések nem voltak hatásosak az NTG-kezelt P2X7 KO egerekben (ANOVA genotípus \times kezelés hatása $F_{1,45}=6,36$, $p=0,0153$, 15. ábra). Az 5 napos BBG kezelés nem változtatta meg egyik genotípus kiindulási termális hiperszenzitivitását sem (P2X7 +/+ : $44,38 \pm 0,27$ °C, $n=16$, $p=0,9929$, P2X7 -/- : $44,86 \pm 0,39$ °C, $n=17$ $p=0,167$ vs. kiindulási PWT, Student t-teszt).



14. ábra: Akut profilaktikus BBG kezelés enyhíti az NTG kezelés által kiváltott termális hiperszenzitivitást vad típusú egerekben. Az egereket 50 mg/kg BBG-vel i.p. vagy azonos térfogatú sóoldattal kezeltük 30 perccel NTG adás előtt. A statisztikai analízis során egyszempontos ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztunk, $n=11-12$ egér/csoport, $**p<0,01$. Az alap PWT értékek mérése után azonnal kezeltük az állatokat BBG-vel vagy fizioológias sóoldattal.

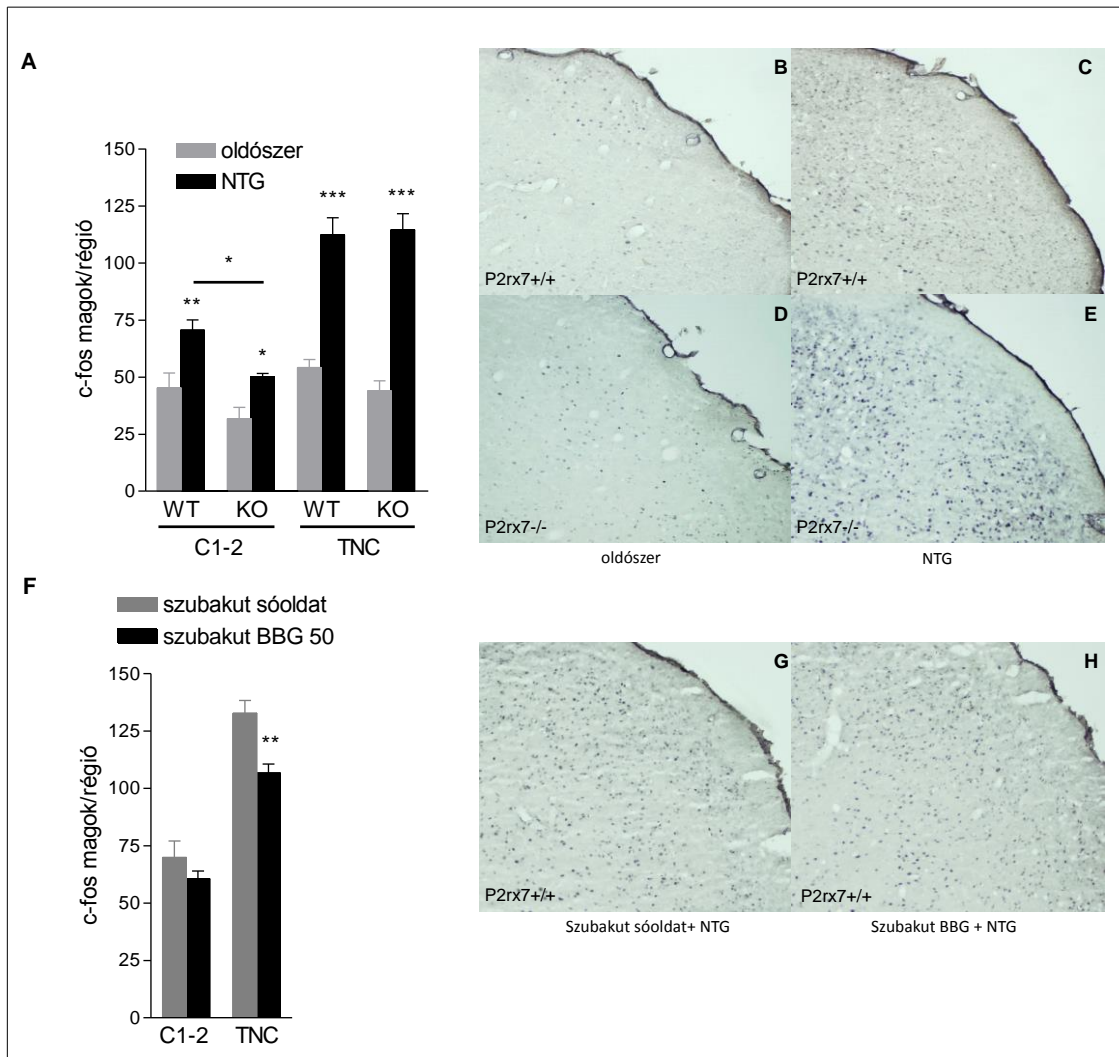


15. ábra: A szubakut BBG kezelés kivédte az NTG által kiváltott termális hiperszenzitivitást vad típusú, de nem P2X7 KO egerekben. Az egereket 5 egymást követő napon 50 mg/kg BBG-vel vagy azonos térfogatú sóoldattal i.p., és az 5. napon NTG adást megelőzően 30 perccel kezeltük, majd alávetettük az állatokat az emelkedő hőmérsékletű hot plate tesztnek. A statisztikai analízis során kétszemponos ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztunk, $n=9-16$ egér/csoport, $**p<0,01$. Az 5. napon az alap PWT értékek mérése után azonnal kezeltük az állatokat BBG-vel vagy fiziológias sóoldattal.

5.1.3 Az NTG indukálta c-Fos expresszió a trigeminus magban és a gerincvelőben

A migrénben érintett nociceptív rostok aktiválódásának egyik jeleként megváltozik a c-Fos-immun-reaktív magok számának átlaga a felső nyaki gerincvelő dorzális szarvában (C1-2) és a trigeminus magban (TNC) 2 órával a 15 mg/kg NTG i.p. injekció adását követően. A korábbi eredményekhez hasonlóan^{226,304} az NTG mindkét régióban növelte a c-Fos expresszióját az oldószerrel kezelt állatokhoz képest (16. ábra). A P2X7 KO egerekben az NTG kezelés hasonlóan a vad típusú egerekben, emelkedést okozott a c-Fos expressziójában TNC-ben, míg a gerincvelőben ez a c-Fos expresszió növekedése kissé alacsonyabb volt (16A. ábra). A C1-2 és TNC régiókban szignifikáns hatása volt az NTG i.p. kezelésnek, genotípus \times NTG kezelés interakciós hatás nélkül (C1-2: $F_{1,19}=13,92$, $p=0,0014$, TNC: $F_{1,19}=48,14$, $p<0,0001$). A csoportok összehasonlítására Kruskal-Wallis nemparaméteres tesztet használtunk. A teszt megmutatta, hogy az NTG kezelés jelentősen növelte a c-Fos expresszióját a C1-2 régióban (WT: $p=0,0374$; KO: $p=0,0679$) és a TNC-ben (WT: $p=0,0039$; KO: $p=0,0062$) a vad típusú és P2X7 KO egerekben. Továbbá, a Fischer *post hoc* teszttel végzett utólagos vizsgálat azt mutatta, hogy az NTG kezelés szignifikánsan növelte a c-Fos szintjét a C1-2 régióban vad típusú és P2X7 KO egerekben (16A, B, C, D, E. ábra).

A P2X7 antagonistával, BBG-vel (50 mg/kg) végzett 5 napos kezelés a c-Fos expresszió szignifikáns csökkenését eredményezte NTG kezelés után a TNC-ben vad típusú egerekben, összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal kezelt egerek eredményeivel (BBG+NTG: $106,63 \pm 3,99$, $n=8$, SAL+NTG: $132,68 \pm 3,94$, $n=6$, $p=0,0022$, Student t-teszt, 16F, G, H. ábra).



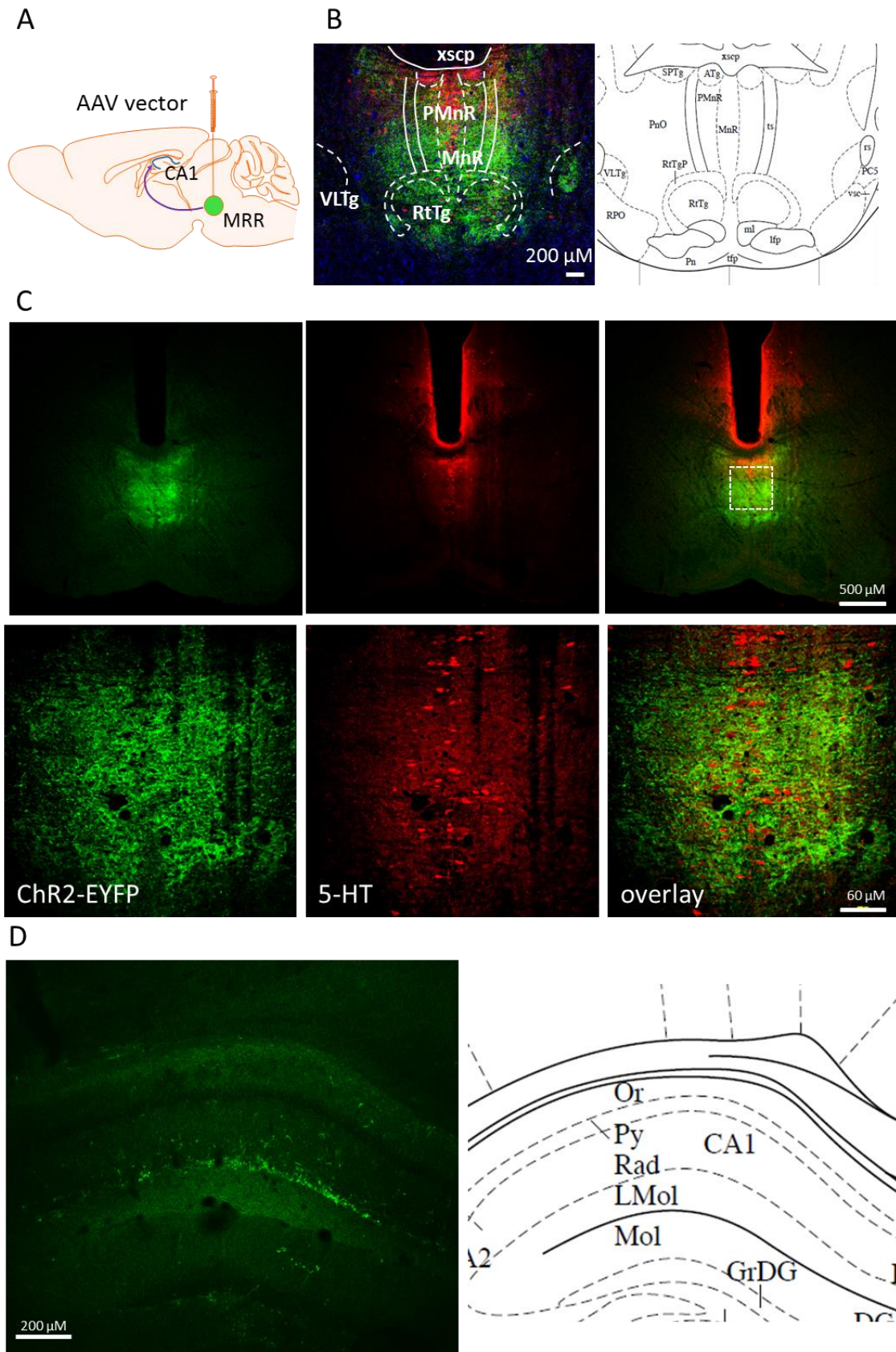
16. ábra: NTG kezelés által kiváltott c-Fos expresszió vad típusú és P2X7 KO egerekben. **A** A c-Fos immunreaktív magok számának meghatározása a gerincvelőben (C1-2) és a TNC-ben két órával a 15 mg/kg i.p. NTG vagy oldószer adását követően történt. A felső nyaki gerincvelőből 10 metszet mindkét féltekét, az agytörzsből, mely tartalmazta mindkét oldalán a TNC-t 30 metszet számoltunk meg (n=5-6 állat/csoport), Kruskal-Wallis nemparametrikus ANOVA és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztuk, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). **F** A szubakut 50 mg/kg i.p. BBG kezelés csökkentette a c-Fos immunreaktív magok számát a TNC-ben, de nem a gerincvelői C1-2 régióban vad típusú egerekben (n=5-6 állat/csoport, Student t-test, ** $p < 0,01$). **B,C,D,E,G,H** Reprezentatív példák a c-Fos immunreaktivitásra a TNC-ben 2 órával NTG vagy oldószer adást követően vad típusú (**B,C**) és P2X7 KO egerekben (**D,E**), valamint

szubakut BBG (50 mg/kg i.p.) vagy fiziológias sóoldat és NTG kezelés után a vad típusú egerekben (G,H). A képek tízszeres nagyítással készültek.

5.2 A P2X7 receptorok részvétele a hippocampális 5-HT felszabadulás szabályozásában a median raphe terminálisainak optogenetikai stimulálását követően

5.2.1 A ChR2-EYFP expressziója MRR és HP egér neuronokban

Optogenetikai eljárást alkalmaztunk, hogy szelektíven stimuláljuk a neurotranszmitter felszabadulást az MR neuronokból és az axon terminálisaikból *in vitro* és *in vivo* (17A. ábra). A vírus konstruktum kifejeződésének vizualizálásához először megvizsgáltuk a ChR2-EYFP-t expresszáló sejtek eloszlását az MRR-ben (17B, C. ábra) és a HP-ban (17D. ábra) 8 héttel a rAAV injekció beadását követően. A koronális metszetek konfokális képei a ChR2-EYFP robusztus expresszióját mutatták az MRR 5-HT pozitív és negatív sejtjeiben, a rAAV injektálása után, míg a DR-ben nemfejeződtek ki (17. ábra). A hippocampusz régióban a *stratum radiatum* és a *stratum lacunosum moleculare* rétegek határterületei mutatták a legintenzívebb ChR2-EYFP jelölést (17D. ábra).



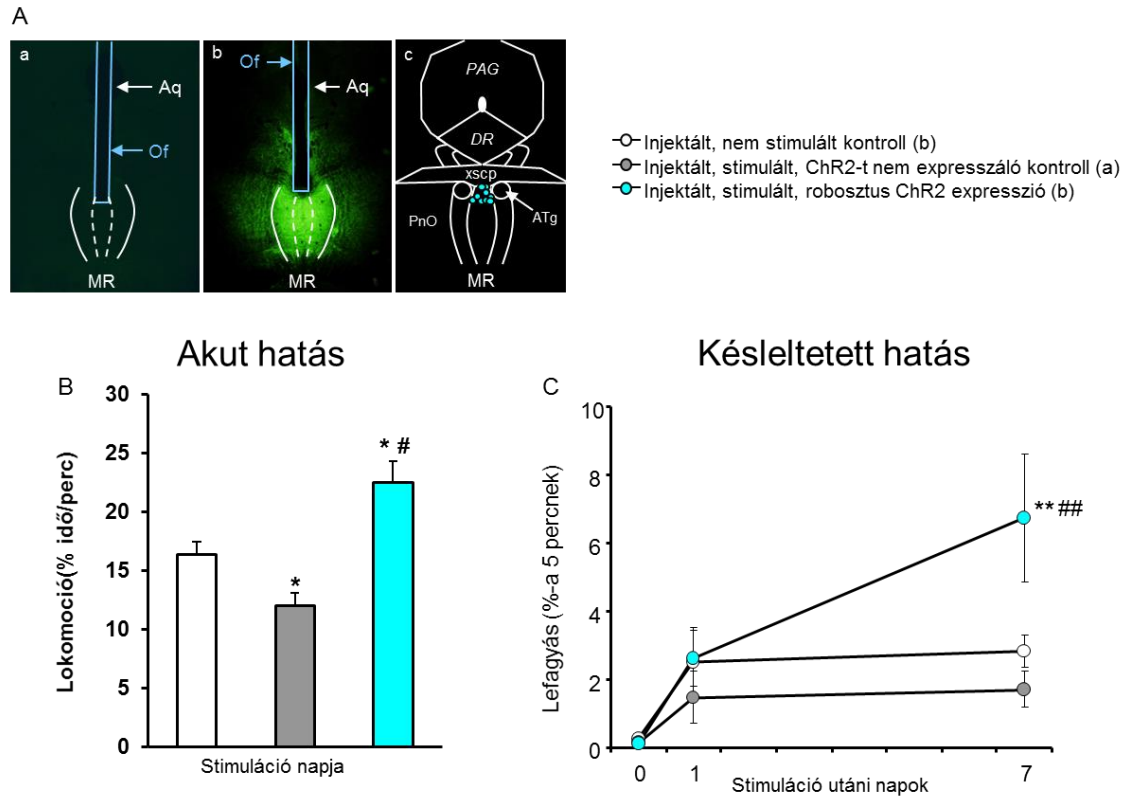
17. ábra: Koronális metszetek a pontine area-ról és a dorzális hippokampuszról 8 héttel a rAAV injektálás után egerekben. **A** Az egerek MR régióját vírusvektorral injektáltuk. **B** Az MR régióban (-4,60 mm-re a Bregma-tól) jól látszanak az EYFP fehérje marker (zöld) és az 5-HT-t tartalmazó sejtek (piros) konfokális mikroszkópiával. A sejtmagokat (kék) Hoechst 33258-vel festettük. **C** Az 5-HT (piros) számos EYFP-jelzett neuronban (zöld) kifejeződik a középvonal mentén az injektált egérben. Alul, a szaggatott vonallal jelzett terület nagyítása látszik. **D** Az MR-ből származó EYFP-t tartalmazó neuronális nyúlványok (zöld) a CA1 régióban a stratum radiatum területén -1,82 mm-re a Bregma-tól. A megfelelő régiók és jellegzetes magok rövidítései az adott területen Paxinos Egéragy Atlaszból származnak³⁰⁸. Lmol: stratum lacunosum moleculare, MnR: median raphe, Or: Oriens layer, PMnR: paramedian raphe, Py: piramidális sejtréteg, Rad: stratum radiatum, RtTg: n. tegmentalis reticularis, VLTg: n. ventrolateralis tegmentalis, xscp: decussatio pedunculi superior cerebellaris. Az immunfestés Demeter Kornél munkáját dicséri.

5.2.2 Az MRR ChR2-t expresszáló neuronjainak optikai stimulálása a lokomotoros aktivitás és a freezing viselkedésforma változásait okozza

Ezután megvizsgáltuk az MRR optogenetikai aktiválásának (20 Hz, 5 min, 473 nm) viselkedési relevanciáját, *in vivo* (18A. ábra), a lokomotoros aktivitásra és a freezing viselkedésre egerekben (18. ábra). Megállapítottuk, hogy az egerek mozgását a fény stimuláció befolyásolta (** $p < 0,01$). A *post hoc* analízis kimutatta, hogy a fény ingerlés ChR2-t nem expresszáló kontroll egerekben ($n=9$) csökkentette a lokomóciót, összehasonlítva az injektált fényt nem kapó kontrollokkal ($*p < 0,05$, $n=14$), ami lehetséges hőhatásra utal³¹⁰. Azonban, a ChR2-t expresszáló egerek MR régiójának optogenetikai stimulációja mindkét (nem stimulált és ChR2-t nem expresszáló) kontroll csoporthoz képest fokozott lokomóciót eredményezett ($*p=0,0200$, illetve $#p=0,0220$, 18B. ábra).

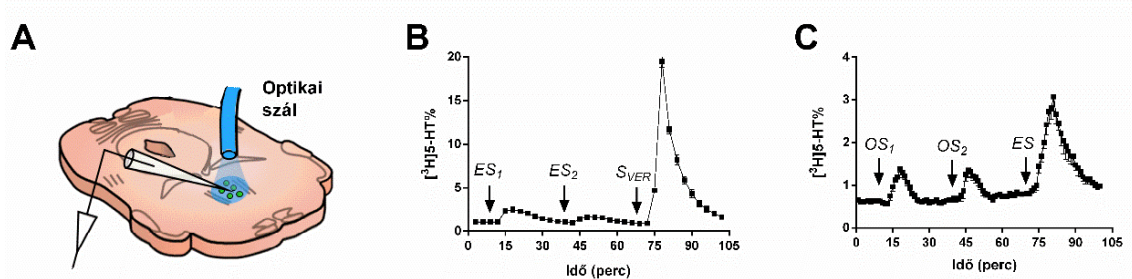
Ami a dermedési viselkedést (freezing) illeti, a 20 Hz-es stimulációnak sem a stimuláció napján (0. nap), sem a következő napon (1. nap) nem volt hatása, ugyanakkor a 7. napon fokozott freezing viselkedésforma volt megfigyelhető (stimuláció: $*p < 0,05$, idő: $**p < 0,01$, interakció: $*p < 0,05$, 18C. ábra). Ezért az MRR ChR2-t expresszáló neuronok

optogenetikai aktiválása hosszú távon is megváltoztatta az állatok viselkedését ennek a viselkedési paraméternek a tekintetében.



18. ábra: Az MRR optogenetikai stimulálása viselkedés vizsgálatokban. A *Reprezentatív képek, amelyek a ChR2 eloszlását mutatják egér MR-ben, ahol nincs jelen ChR2 expresszió (a), vagy ahol robosztus ChR2 expresszió van (b), és az optrod csúcsok helyzete stimulált egerekben (c).* **B** *Lokomóció, a vonal átlépésekből a kísérlet teljes időtartamára számítva.* **C** *Freezing viselkedésforma a kísérlet időtartamának %-ában kifejezve a stimuláció napján (0. nap), és első és hetedik napon. Aq: aqueduct (optrod), ATg: n. tegmentalis anterior, DR: dorsalis raphe, MRR: median raphe régió, Of: optic fiber (optikai szál), PAG: periaqueductalis szürkeállomány, xscp: decussatio pedunculi superior cerebellaris. A statisztikai analízis során egy- és kétszemponos ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Newman-Kleuls post hoc tesztet végeztünk, * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ szignifikáns eltérést jelöli az injektált, nem stimulált kontrolltól, # $p < 0,05$ és ## $p < 0,01$ szignifikáns eltérést mutatja az injektált, stimulált, ChR2-t nem expresszáló kontrolltól. A viselkedésvizsgálatokat Zelena Dóra és Balázsfi Diána végezte.*

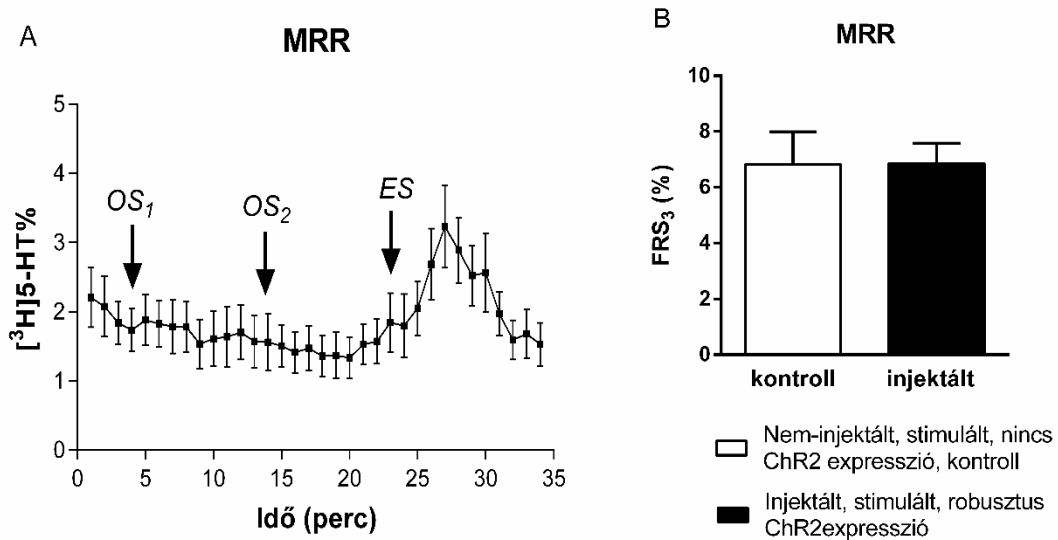
5.2.3 A MRR elektromos és optikai stimulációja [^3H]5-HT felszabadulást eredményez. A következő kísérletekben megvizsgáltuk, hogy egy hasonló optikai stimuláció eredményez-e detektálható neurotranszmitter felszabadulást *in vitro*, és ez összehasonlítható-e az elektromos és kémiai depolarizáció hatásaival. Az ezekben a kísérletekben alkalmazott protokoll a 10. ábrán látható. Az optikai szál helye és a stimuláló elektródok helyzete a 19A. ábrán látható, az elektromos, optikai és kémiai depolarizáció által indukált [^3H]5-HT felszabadulás időbeli lefolyása egér MRR szeletekből a 19B, C. ábrán látható.



19. ábra: Az elektromos és optikai ingerlés [^3H]5-HT felszabadulást eredményezett MRR szeletekből. A [^3H]neurotranszmitter felszabadulást szuperfuzált MRR-t tartalmazó koronális szeletekből mértük, melyhez különböző stimulációkat alkalmaztunk. Optikai stimulálás során vírus injektált egereket használtunk. A A sematikus ábra az optikai szál és bipoláris elektródok helyzetét mutatja. B, C Reprezentatív grafikonok, melyeken az elektromos (20 Hz, B) és optikai (50 Hz, C) stimulációra adott [^3H]5-HT felszabadulás időbeli lefolyása látható. ES: elektromos, S_{VER}: kémiai (20 μM veratridin), OS: fény ingerlés. A perfúziós minták tríciumtartalmát frakcionális transzmitter felszabadulás %-ában fejeztük ki (FR%) az idő függvényében. A görbe az azonos kísérletek átlag \pm SEM értékeit mutatja, n=4-5 egér. A nyilak jelzik a különböző típusú ingerlések kezdetét.

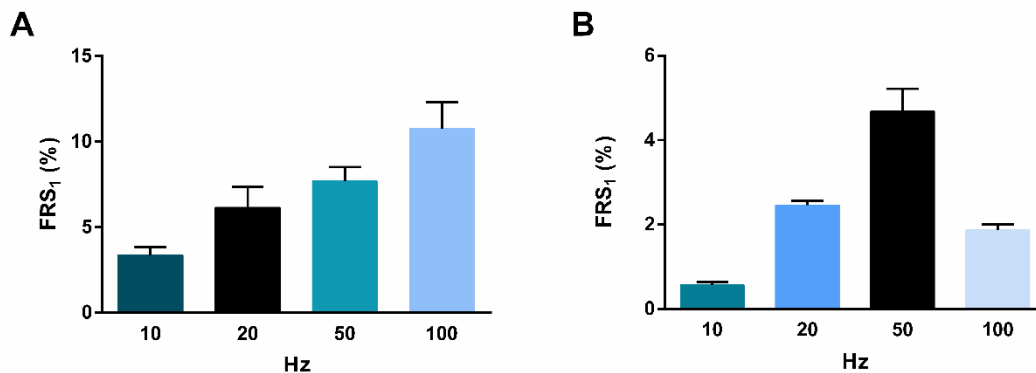
A Kísérlet 1-ben (protokoll a 10. ábrán) két azonos paraméterrel rendelkező elektromos stimulust (ES_{1-2}) követett egy 3 perces perfúzió a Na^+ csatorna aktiváló veratridinnel (20 μM , S_{VER} , 19B. ábra). Az első elektromos stimuláció (3V, 5ms, 20 Hz, 10800 impulzus) a [3H]5-HT felszabadulás átmeneti emelkedését eredményezte (FRS_1 : $6,16 \pm 1,22$ FR%). A második, azonos stimuláció is hasonló, de kisebb növekedést mutatott a [3H]5-HT felszabadulásban $0,49 \pm 0,06$ FRS_2/FRS_1 arányt eredményezve. A veratridinnel történő kémiai depolarizáció a kísérlet végén erőteljes [3H]5-HT felszabadulást okozott (FRS_{VER} : $50,5 \pm 1,72$ FR%), jelezve, hogy a szelet [3H]5-HT tartalma nem merült ki az előző stimulusok következtében.

8 héttel a vírusbeadás után a Kísérlet 2-ben (protokoll a 10. ábrán) két azonos paraméterű optikai stimulációt (OS_{1-2} : 50Hz, 473 nm, 10800 impulzus), majd a kísérlet végén egy hasonló elektromos stimulációt (ES: 50Hz, 3V, 10800 impulzus) alkalmaztunk (19C. ábra), hogy megvizsgáljuk, hogyan reagálnak a ChR2-EYFP konstrukciót kifejező MRR szeletek. Az optikai stimuláció reprodukálható [3H]5-HT felszabadulást (FRS_1 : $4,68 \pm 0,54$ FR%, FRS_2/FRS_1 : $1,101 \pm 0,29$) eredményezett, amelyek lényegesen kisebbek voltak, mint az azonos frekvenciájú és impulzus időtartamú elektromos stimuláció által kiváltott trícium kibocsátás (19B és C. ábra). A kontroll – naiv; és műtött, de ChR2-EYFP konstrukciót nem kapott – egerekben az optikai stimuláció nem eredményezett emelkedést a trícium felszabadulásban ($p=0,9874$) (20A, B. ábra).



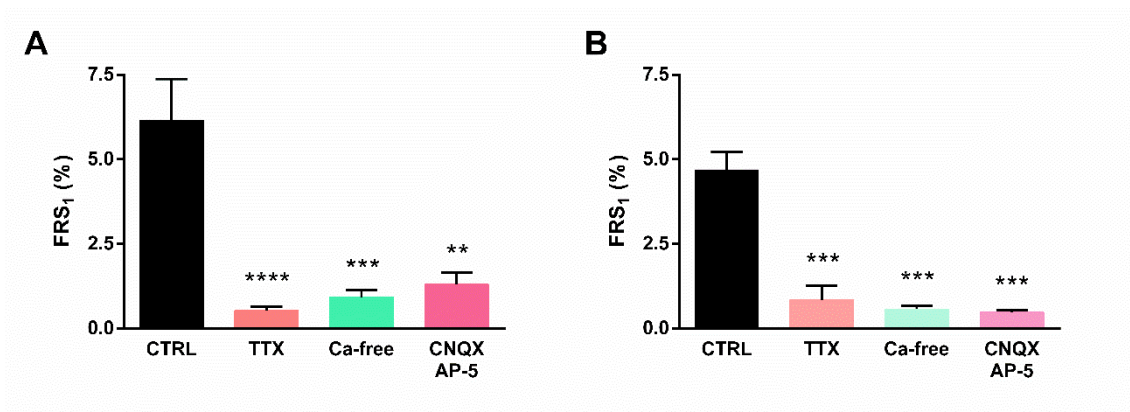
20. ábra: Az optikai stimuláció nem eredményezett növekedést a trícium felszabadulásban a MRR-ből kontroll, naiv egereknél. A Kísérlet 2 protokollt használtuk. Az optikai és elektromos stimulációt 50 Hz-en végeztük. A perfúziós minták (A) tríciumtartalmát frakcionális transzmitter felszabadulás %-ában fejeztük ki (FR%) az idő függvényében. A görbe az azonos kísérletek átlag \pm SEM értékeit mutatja, $n=4$ egér. B A grafikonon az elektromos ingerléssel kiváltott $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ felszabadulást hasonlítottuk össze a kontroll, naiv egerek és az injektált, stimulált egerek esetében (lásd, 19C. ábra). A két csoport között nem volt szignifikáns különbség. Az eredményeket az elektromos stimulus (FRS_3 , %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, és Student t -tesztet alkalmaztunk.

További kísérletekben, megvizsgáltuk a különböző frekvenciájú (10, 20, 50, 100 Hz) elektromos ingerlések hatását a [³H]5-HT felszabadulásra MRR-ből (21A. ábra) úgy, hogy a feszültséget és az impulzusszélességet nem változtattuk. A trícium felszabadulás frekvenciafüggő volt. Megállapítottuk, hogy az optikai stimuláció szintén minden frekvencián [³H]5-HT felszabadulást okozott, azonban a trícium kiáramlás csak 10-50 Hz között volt frekvenciafüggő (21B. ábra).



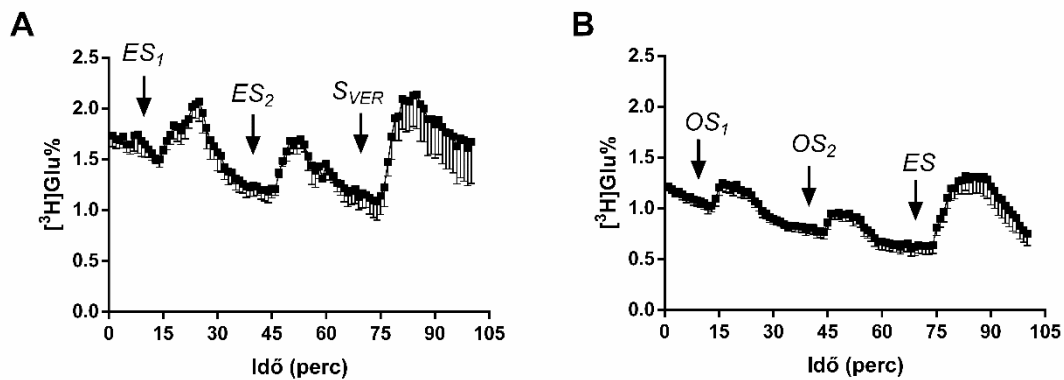
21. ábra: Az elektromos (A) és optikai (B) ingerlés részben frekvenciafüggő [³H]5-HT felszabadulását eredményezi MRR szeletekből. Különböző frekvenciákat (10, 20, 50, 100 Hz) használtunk, változatlan ingerlési paraméterekkel. Az eredményeket az első elektromos vagy optikai stimulus (FRS₁, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, n=4-5 egér/csoport.

A következő kísérletekben, megvizsgáltuk a feszültségfüggő, Na⁺ csatornablokkoló, TTX (1 μM); az NMDA és nem-NMDA receptor gátló AP-5 (50 μM) és CNQX (10 μM) együttes adásának, és a kalcium mentes Krebs' oldatnak a hatását az elektromos és optikai ingerlésre MRR-t tartalmazó szeletekben. Az elektromos stimulációra felszabaduló [³H]5-HT kalcium függő (**p=0,00022), és érzékeny volt a TTX gátlásra is (**p=0,00003). A AP-5 (50 μM) és CNQX (10 μM) együttes adása szintén gátolta a trícium kiáramlást (*p=0,00131, 22A. ábra). Az 50 Hz-es optikai stimuláció által kiváltott trícium kiáramlást szinte teljesen gátolta az 1 μM TTX (FRS₁: 0,85 ± 0,42 FR%, ***p=0,00063, 22B. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy az optikai stimulációra felszabaduló [³H]5-HT a nátriumcsatorna aktivitás következménye az MR régióban. Hasonlóképpen a kalciummentes körülmények (FRS₁: 0,57 ± 0,10 FR%, ***p=0,00063), és a AP-5 és CNQX együttes adása csökkentette a fény ingerlés által kiváltott [³H]5-HT felszabadulást (FRS₁: 0,48 ± 0,07 FR%, ***p=0,00033, 22B. ábra). Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a Chr2-t expresszáló neuronokból származó trícium kiáramlás részben az endogén Glu receptor aktiváció által közvetítődik az MRR-ben.



22. ábra: A TTX, CNQX-AP-5 és Ca²⁺-mentes körülmények hatása az elektromos (20 Hz, A) és optikai (50 Hz, B) stimuláció által kiváltott [³H]5-HT felszabadulásra az MRR-ből. A Ca²⁺-mentes Krebs' oldatot a mintagyűjtés megkezdése előtt 60 perccel, míg a TTX-et és CNQX-AP-5-öt tartalmazó Krebs' oldatot 15 perccel az első gyűjtött minta előtt perfundáltattuk. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS₁, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, n=4 egér/csoport, és egyszempontos ANOVA analízist alkalmaztunk, és azt követő Dunnett post hoc tesztet, ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják.

Az endogén Glu receptor aktiváció szerepének feltárása érdekében az MRR szeleteket feltöltöttük [^3H]Glu-tal és megvizsgáltuk, hogy azonos paraméterekkel (50 Hz, 473 nm, 10 ms, 10800 impulzus) végzett fény stimuláció indukál-e trícium kiáramlást. Az optikai ingerlés reprodukálható [^3H]Glu felszabadulást eredményezett (FRS_1 : $1,91 \pm 0,33$ FR%), ami összehasonlítható, de kisebb, mint az elektromos stimuláció hatása ($p=0,3270$; lásd 23A, B. ábra és 4. táblázat).



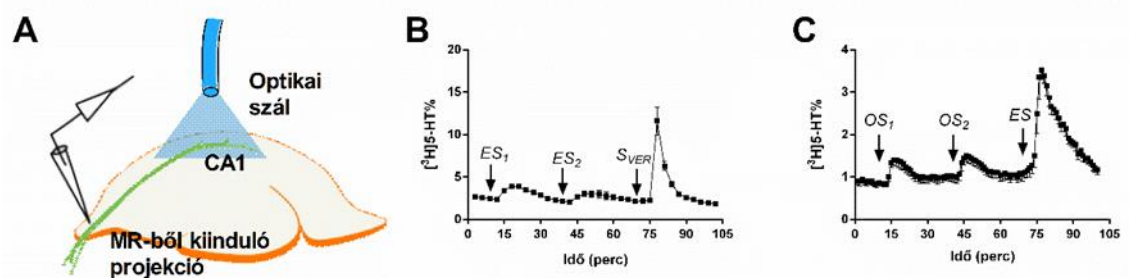
23. ábra: 50 Hz-es elektromos (A) és optikai (B) stimuláció [^3H]Glu felszabadulást eredményez a MRR-ből. A perfúziós minták tríciumtartalmát frakcionális transzmitter felszabadulás %-ában fejeztük ki (FR%) az idő függvényében. A görbe az azonos kísérletek átlag \pm SEM értékeit mutatja, $n=3-8$ egér. A nyilak jelzik a különböző típusú ingerlések kezdetét.

4. táblázat: A [³H]5-HT és [³H]Glu felvételének és felszabadulásának összehasonlítása egerek median raphe és hippokampusz régiójában.

Kísérlet 1					
Csoportok	[³ H] felvétel (×10 ⁵ Bq/g)	Nyugalmi felszabadulás (%)	ES ₁ Kiváltott felszabadulás (×10 ⁵ Bq/g)	S _{VER} Kiváltott felszabadulás (×10 ⁵ Bq/g)	Geno- típus
5-HT MR (n=4)	5.814±2.217 ^{***}	0.86±0.04	0.288±0.153	1.155±0.459	WT
Glu MR (n=3)	58.532±13.238	0.96±0.01	1.059±0.692	1.579±0.593	WT
5-HT HP (n=4)	1.373±0.182 ^{\$\$\$}	0.99±0.09	0.045±0.002	0.135±0.019	WT
Kísérlet 2					
Csoportok	[³ H] felvétel (×10 ⁵ Bq/g)	Nyugalmi felszabadulás (%)	OS ₁ Kiváltott felszabadulás (×10 ⁵ Bq/g)	ES Kiváltott felszabadulás (×10 ⁵ Bq/g)	Geno- típus
5-HT MR (n=5)	16.670±2.888 ^{***}	1.83±0.08 ^{###}	0.634±0.083	1.242±0.299 [*]	WT
Glu MR (n=8)	51.425±6.237	2.43±0.18	0.622±0.105	2.583±0.334	WT
5-HT HP (n=5)	11.761±1.939 ^{\$\$\$}	4.38±0.33 ^{\$\$\$}	0.247±0.085 [§]	0.526±0.096 ^{\$\$\$}	WT
5-HT HP (n=5)	13.617±2.014 ^{\$\$\$}	4.58±0.28 ^{\$\$\$}	0.172±0.039 ^{#,§}	0.264±0.077 ^{\$\$\$}	KO

A mintagyűjtési periódus kezdetét követő 10 és 40 percben két azonos paraméterű elektromos (50 Hz, Kísérlet 1) vagy optikai (50 Hz, Kísérlet 2) stimulust alkalmaztunk a neurotranszmitter felszabadulás emelkedésének kiváltására, majd ezt követően a 70. percben egy 3 perces veratridin perfúziót (20 μM, S_{VER}, Kísérlet 1) vagy egy 50 Hz-es elektromos stimulációt (Kísérlet 2) adtunk. A táblázat az azonos kísérletek átlag ± SEM értékeit mutatja, a kísérletek száma a zárójelben van megadva. 5-HT MR vs Glu MR ^{*}p<0,05, ^{***}p<0,001; 5-HT MR vs 5-HT HP [#]p<0,05, ^{###}p<0,01; 5-HT HP vs Glu MR ^{\$\$\$}p<0,001, egyszempontos ANOVA analízist alkalmaztunk, és azt követően Tukey post hoc tesztet.

5.2.4 A HP elektromos és optikai stimulációja [^3H]5-HT felszabadulást eredményez
 Az MR régió stimulációja után megnéztük, hogy hasonló optikai stimuláció eredményez-e detektálható neurotranszmitter felszabadulást *in vitro*, és összehasonlítható-e az elektromos és kémiai depolarizáció hatásaival az MR-ből származó EYFP-t tartalmazó neuronális hippokampális végződéseiből. A 24A. ábrán az optikai és az elektromos stimuláció sematikus ábrája, az 24B, C. grafikonokon az elektromos, optikai és kémiai stimuláció által kiváltott [^3H]5-HT felszabadulás időbeli lefolyása látható.



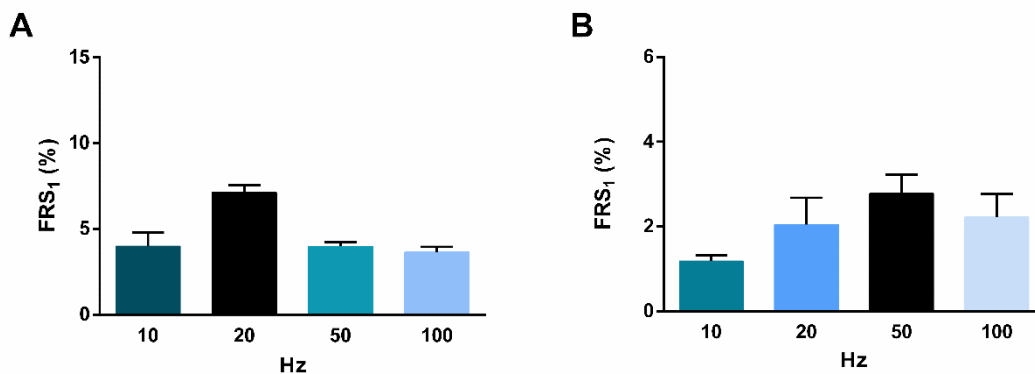
24. ábra: Az elektromos és optikai ingerlés [^3H]5-HT felszabadulását eredményezi HP szeletekből. A [^3H]neurotranszmitter felszabadulást vírus injektált egerekből származó superfuzált koronális HP szeletekből mértük, melyhez különböző stimulációkat alkalmaztunk. A sematikus ábra ez optikai szál és bipoláris elektródok helyzetét mutatja (A). Reprezentatív grafikonok (B, C), melyeken az elektromos (20 Hz, B) és optikai (50 Hz, C) stimulációra adott [^3H]5-HT felszabadulás időbeli lefolyása látható. ES: elektromos, S_{VER}: kémiai (20 μM veratridin), OS: fény ingerlés. A perfúziós minták tríciumtartalmát fracionális transzmitter felszabadulás %-ban fejeztük ki (FR%) az idő függvényében. A görbe az azonos kísérletek átlag \pm SEM értékeit mutatja, $n=4-5$ egér. A nyilak jelzik a különböző típusú ingerlések idejét.

A Kísélet 1-ben (10. ábra) két azonos paraméterrel rendelkező elektromos stimulust (ES₁₋₂) követett egy 3 perces perfúzió - Na⁺ csatorna aktiváló - veratridinnel (20 μM , S_{VER}). Az elektromos ingerlés (20 Hz, 3 V, 5 ms, 10800 impulzus) átmeneti reprodukálható [^3H]5-HT felszabadulás emelkedést váltott ki (FRS₁: $7,13 \pm 0,42$ FR%,

FRS₂/FRS₁: 0,74 ± 0,18), 24B. ábra. A kísérlet végén alkalmazott veratridin a tényleges tríciumtartalom 17,78 ± 1,69 FR%-át szabadította fel (n=4 egér).

Az optikai stimulusok által kiváltott [³H]5-HT felszabadulás a HP szeletekben hasonló volt, az MRR-ben megfigyelt [³H]5-HT felszabaduláshoz (Kísérlet 2 protokoll, 10. ábra). Az egymást követő fény (50 Hz, 473 nm, 10 ms) stimulációkra történő [³H]5-HT felszabadulás kisebb volt, mint MRR szeletekben, de még mindig jól detektálható (FRS₁: 2,78 ± 0,45 FR%, FRS₂/FRS₁: 0,99 ± 0,08), és összehasonlítható, de szintén kisebb volt, mint az elektromos stimulációra felszabaduló trícium kiáramlás a HP szeletekben (24C. ábra).

Amikor az elektromosan kiváltott [³H]5-HT felszabadulást vizsgáltuk HP szeletekből, nem derült ki egyértelmű frekvenciafüggés, és a legmagasabb trícium felszabadulás emelkedést 20 Hz-en figyeltük meg (25A. ábra). A fény stimulációval kiváltott [³H]5-HT kiáramlás esetén egy kismértékű frekvenciafüggést figyeltünk meg, amely 50 Hz-en volt a legmagasabb (25B. ábra).

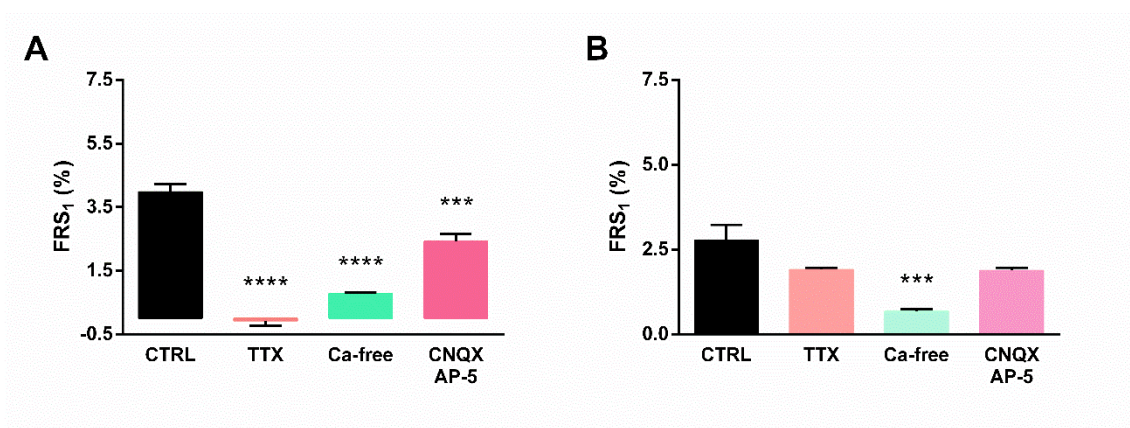


25. ábra: A [³H]5-HT felszabadulás frekvenciafüggése HP szeletekből. *Különböző frekvenciákat (10, 20, 50, 100 Hz) használtunk, változatlan ingerlési paraméterekkel. Az eredményeket az első elektromos (A) vagy optikai (B) stimulus (FRS₁, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, n=4-5 egér/csoport.*

A következő kísérletekben, megvizsgáltuk a TTX (1 μM); a AP-5 (50 μM) és CNQX (10 μM) együttes adásának, és a kalcium mentes Krebs' oldat hatását az elektromos és optikai ingerlésre HP szeletekben. A TTX szinte teljesen gátolta az elektromos ingerlés által

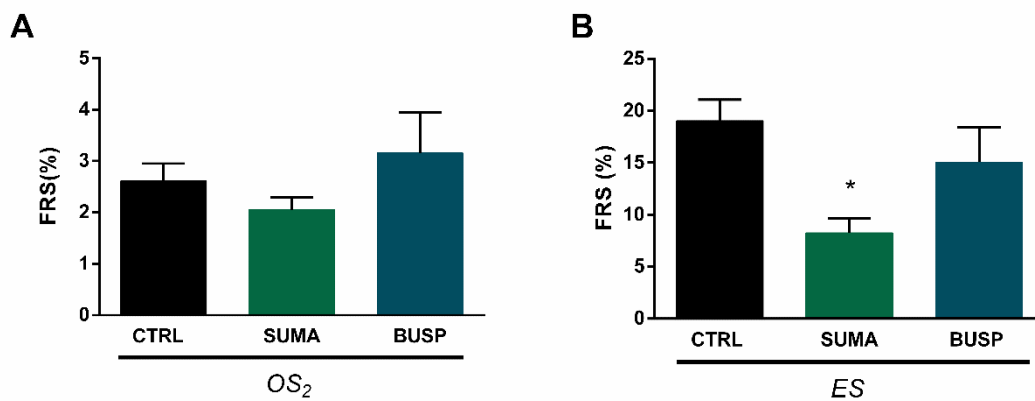
előidézett trícium kibocsátást ($0,08 \pm 0,15$ FR%, **** $p=0,0000001$, 26A. ábra). A [^3H]5-HT felszabadulást szintén lényegében gátolta a Ca^{2+} -mentes oldat (**** $p=0,00001$, 26A. ábra). Az AP-5 és CNQX szintén jelentősen csökkentette az elektromosan előidézett [^3H]5-HT felszabadulást (** $p=0,00075$).

Az elektromos stimuláció által kiváltott trícium felszabadulással szemben, sem a TTX, sem az AP-5 és CNQX nem befolyásolta szignifikánsan az optikai stimulus által kiváltott [^3H]5-HT felszabadulást (TTX: FRS_1 : $1,91 \pm 0,06$ FR%, $p=0,14936$, AP-5 és CNQX: FRS_1 : $1,78 \pm 0,12$ FR%, $p=0,13499$). A kapott eredmények azt mutatják, hogy a fény stimuláció az MRR-ből származó 5-HT-t felszabadító axon varikozitásokra közvetlenül gyakorol hatást, a glutamát transzmisszió közvetítése nélkül (26B. ábra). Ez a felszabadulás szintén exocitotikus természetű volt, mivel a Ca^{2+} -mentes Krebs' oldat gátolta a fény stimulus által kiváltott [^3H]5-HT felszabadulás HP szeletekben (FRS_1 : $0,67 \pm 0,07$ FR%, *** $p=0,00061$, 26B. ábra).



26. ábra: A TTX, CNQX-AP-5 és Ca^{2+} -mentes körülmények hatása az elektromos (50 Hz, A) és optikai (50 Hz, B) stimuláció által kiváltott [^3H]5-HT felszabadulásra a HP-ből. A Ca^{2+} -mentes Krebs' oldatot a mintagyűjtés megkezdése előtt 60 perccel, míg a TTX-et és CNQX-AP-5-öt tartalmazó Krebs' oldatot 15 perccel az első gyűjtött minta előtt perfundáltattuk. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS_1 , %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, $n=4$ egér/csoport, és egyszempontos ANOVA analízist és azt követő Dunnett post hoc tesztet alkalmaztunk, **** $p<0,0001$, *** $p<0,001$. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják.

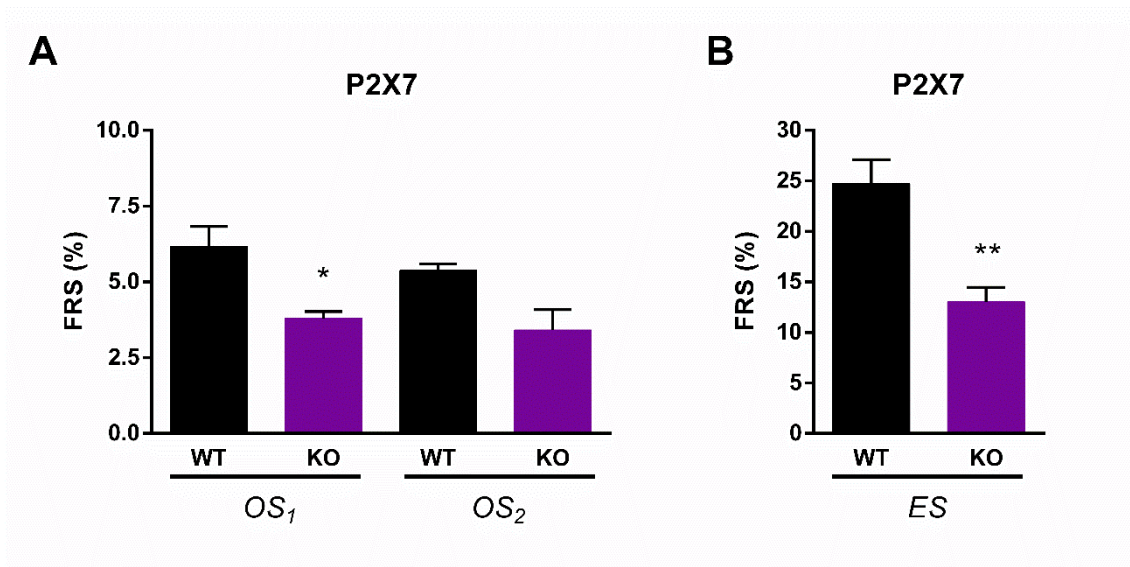
5.2.5 A hippokampális [³H]5-HT felszabadulás modulálása 5-HT₁ autoreceptorokkal
 Ezekben a kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a ChR2-t expresszáló terminálisokból elektromos és fény stimulációt követően a felszabaduló [³H]5-HT modulálható-e 5-HT_{1A/1B/1D} receptorokkal. A második optikai stimuláció (OS₂) előtt 5-HT_{1A/1B/1D} agonista, szumatriptánt (SUMA, 1 μM) kezdtünk el perfundáltatni, mely szignifikánsan csökkentette az elektromos stimuláció (ES) által kiváltott trícium felszabadulást (*p=0,01201, 27A, B. ábra), de az optikai stimuláció által kiváltott [³H]5-HT felszabadulást nem befolyásolta. Ezzel szemben a buspiron (BUSP, 0,1 μM), a szelektív 5-HT_{1A} parciális agonista nem volt hatással az optikai és fény stimulus által kiváltott trícium felszabadulásra sem (27A, B. ábra).



27. ábra: A szumatriptán csökkentette az elektromosan előidézett [³H]5-HT felszabadulást HP szeletekben, míg a buspiron hatástalan volt. A szumatriptánt és buspiron 15 perccel a második fény stimuláció előtt adtuk a Krebs' oldathoz. Az OS optikai, az ES elektromos 50 Hz-es stimulációt jelent. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS₁, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki, n=4-5 egér/csoport, és egyszempontos ANOVA analízist és azt követő Dunnett post hoc tesztet alkalmaztunk, *p<0,05. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják.

5.2.6 A hippokampális [³H]5-HT felszabadulás modulálása P2X7 receptorokkal

Ezután megvizsgáltuk, hogy a hippokampális ChR2-t expresszáló idegvégződésekben elektromos vagy fény stimulussal kiváltott [³H]5-HT felszabadulás szabályozható-e a P2X7 receptorok endogén aktiválódásával. Ezért, összehasonlítottuk a megfelelő stimulációval kiváltott trícium felszabadulást a vad típusú és P2X7 génkiütött egerekben, ehhez a Kísérlet 2 protokollt használtuk (10. és 28. ábrák). A [³H]5-HT izotóppal feltöltött HP szeletekben a radioaktivitás szöveti tartalma nem különbözött jelentősen a vad típusú (WT) és KO egerekben (4. táblázat). Mind az elektromos, mind az optikai stimuláció a [³H]5-HT kiáramlás növekedését eredményezte WT és KO egerekben, azonban a KO egerekben kisebb volt a [³H]5-HT felszabadulás mértéke (28A, B. ábra).



28. ábra: Az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott trícium felszabadulás alacsonyabb volt KO, mind WT egerekben. A [³H]5-HT felszabadulást 50 Hz-es optikai (A) és elektromos (B) stimulussal váltottuk ki. Az OS₁ és OS₂ optikai, az ES elektromos stimulációt jelent. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki (n=5 egér csoportonként). Egy szempontos ANOVA analízist és azt követő Scheffe post hoc tesztet alkalmaztunk, *p<0,05, **p<0,01. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják.

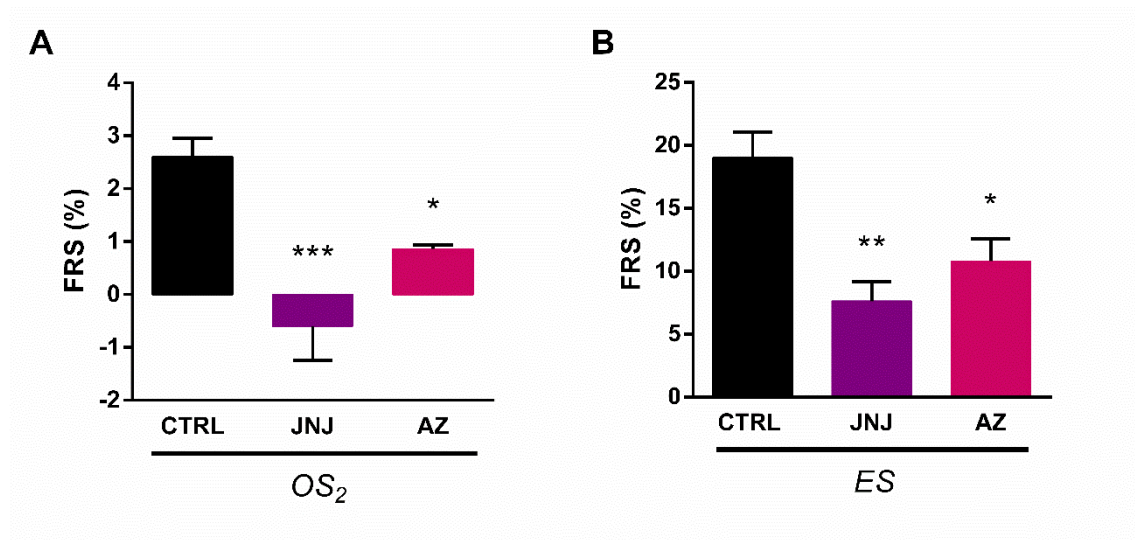
Ezután teszteltük a P2X7 receptor antagonisták hatását a fény és elektromos stimuláció által kiváltott [³H]5-HT felszabadulásra a HP szeletekben, WT egerekben. Az antagonisták a következők voltak:

JNJ-47965567 (100 nM), potens és szelektív P2X7 receptor antagonista³¹¹,

AZ-10606120 (100 nM), a P2X7 receptorok negatív allosztérikus modulátora⁷⁹.

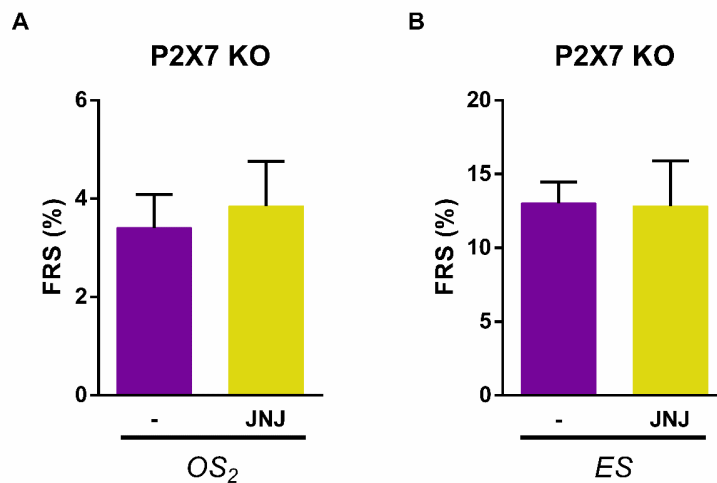
Ismét a Kísélet 2 protokollt használtuk. A JNJ-47965567 majdnem teljesen gátolta a fény stimuláció által kiváltott [³H]5-HT kiáramlást (**p=0,00030), és csökkentette az elektromosan kiváltott trícium kiáramlást is (29A. ábra).

Az azonos módon alkalmazott AZ-10606120 szintén csökkentette a fény és elektromos stimulációra kiváltott [³H]5-HT felszabadulást (OS₂: *p=0,02027, ES: *p=0,01983, 29B. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a szerotonin fény és elektromos ingerléssel kiváltott felszabadulása modulálható a hippokampuszban lévő P2X7 receptorok endogén aktiválásával.



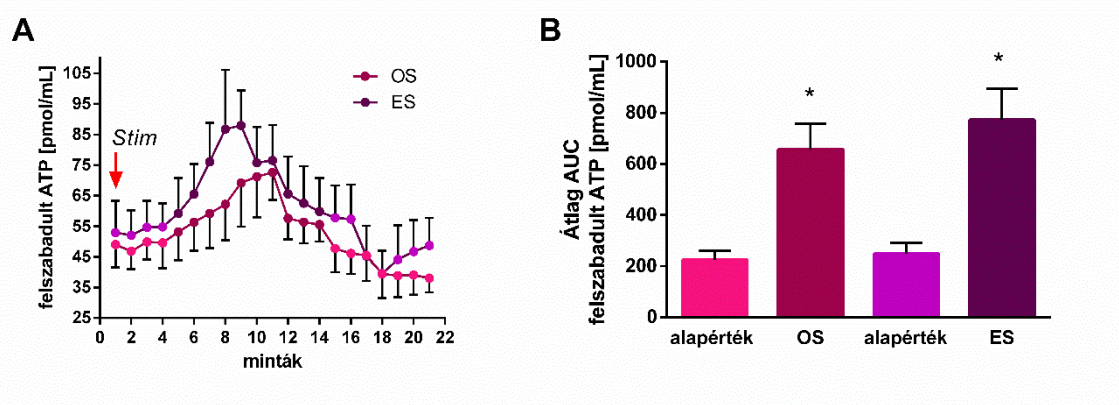
29. ábra: A JNJ-47965567 és AZ-10606120 szignifikánsan csökkentette a fény és elektromos ingerrel kiváltott [³H]5-HT felszabadulást. A [³H]5-HT felszabadulást 50 Hz-es optikai (A) és elektromos (B) stimulussal váltottuk ki. Az OS₂ optikai, az ES elektromos stimulációt jelent. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki (n=4 egér csoportonként). Egy szempontos ANOVA analízist alkalmaztunk, és azt követő Dunnett post hoc tesztet alkalmaztunk, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják.

Megvizsgáltuk a JNJ-47965567 P2X7 antagonistá hatását a hasonló ingerrel kiváltott [³H]5-HT felszabadulásra P2X7 KO egerek HP szeletében is. Ezekben a szeletekben a JNJ-47965567 nem eredményezett semmilyen csökkenést a trícium kiáramlásban a kontroll (P2X7 antagonistával nem kezelt) egerekhez viszonyítva (OS₂: p=0,6572, ES: p=0,9416, 30A, B. ábra).



30. ábra: A JNJ-47965567 kezelés nem csökkentette jelentősen a trícium kiáramlást a HP szeletekből P2X7 KO egerekben. A [³H]5-HT felszabadulást 50 Hz-es optikai (A) és elektromos (B) stimulussal váltottuk ki. Minden esetben a Kísérlet 2 protokollt alkalmaztuk (lásd 10. ábrát). Az OS₂ optikai, az ES elektromos stimulációt jelent. Az eredményeket az elektromos vagy optikai stimulus (FRS, %) által kiváltott nettó trícium felszabadulás formájában fejeztük ki (n=4 egér csoportonként). Egy szempontos ANOVA analízist és azt követő Scheffe post hoc tesztet alkalmaztunk.

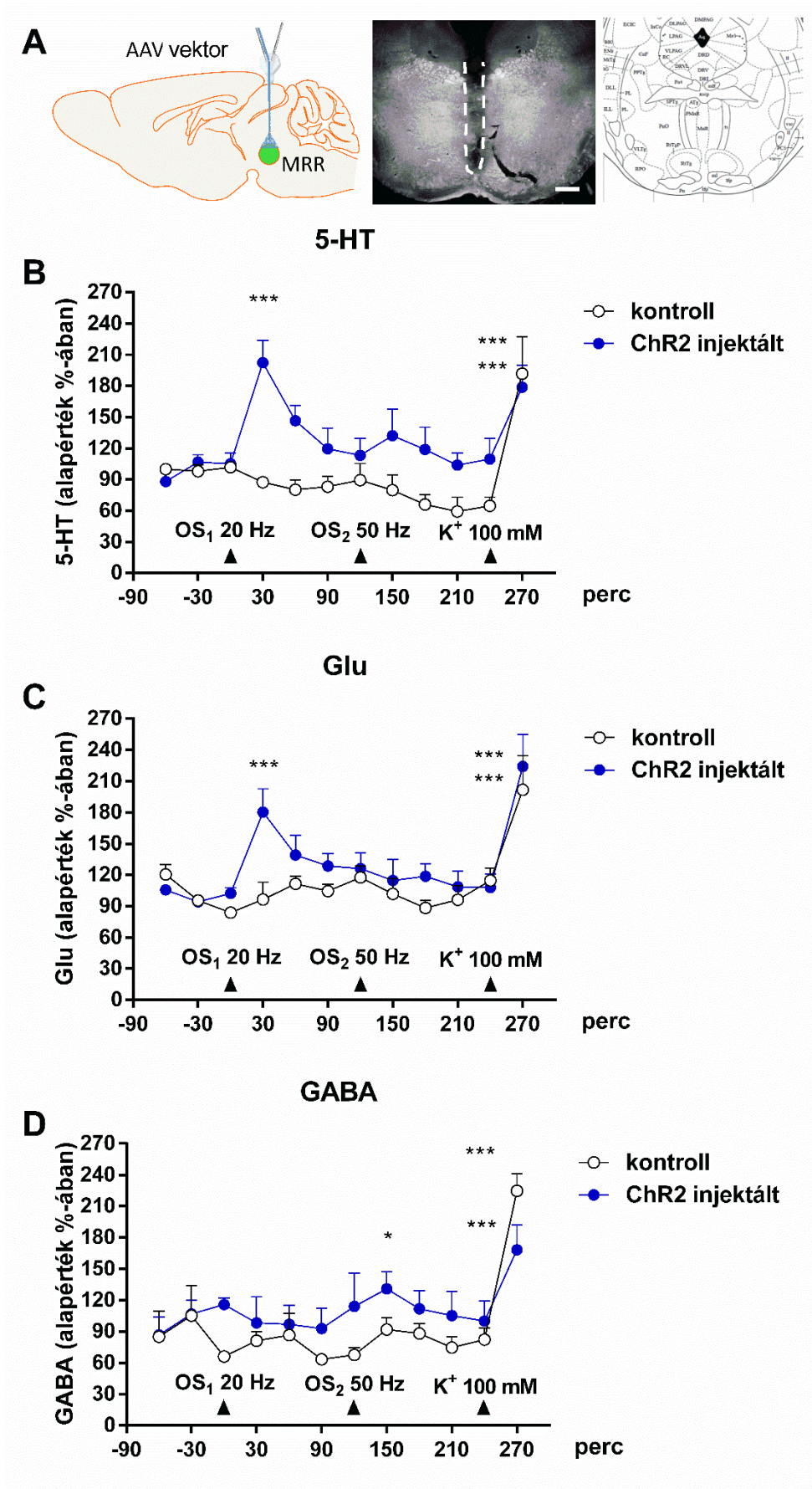
Annak igazolására, hogy az endogén ATP azonos körülmények között szabadul fel, elemeztük a szövetperfúziós kísérlet során vett minták ATP tartalmát HPLC-vel (31A. ábra). Az optikai és elektromos stimuláció hatására emelkedett az endogén ATP extracelluláris szintje (OS: * $p=0,0256$, ES: * $p=0,0151$, 31B. ábra).



31. ábra: Az optikai és elektromos stimulációk növelték az endogén ATP felszabadulást a vírus injektált WT egerekben. *A Kísérlet 2 protokollt használtuk. A Stim felirat az A ábrán az első optikai (OS) és utolsó elektromos (ES) stimulációt jelöli. Mindkét stimuláció ugyanazzal a paraméterekkel történ 50 Hz-en, de nem ugyanabban az időben. Az X tengely az 1 perces perfúziós mintákat mutatja az ingerlés kezdetétől. A B ábrán látható grafikon az A ábrán szereplő görbe alatti területéből (AUC) számított értékek. A kiindulási értékek az átlag ATP tartalmat jelentik az optikai és elektromos stimulus előtt, melyet AUC módszerrel számoltunk. Az adatokat a felszabadult ATP pmol/ml-ben fejeztük ki (átlag \pm SEM, $n=6$ egér/csoport). Kruskal-Wallis ANOVA analízist és azt követő Dunn's post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p<0,05$. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják. Az ATP szintek mérését HPLC-vel Baranyi Mária végezte.*

5.2.7 Az *in vivo* optikai és K⁺ stimuláció hatása az 5-HT, glutamát (Glu) és GABA szintekre az MRR-ben mikrodialízis vizsgálatokban

Végül azt vizsgáltuk, hogy a helyi optikai stimuláció (32A. ábra) az endogén neurotranszmitterek felszabadulásához vezet-e az MRR-ben, amit HPLC-vel mértünk (32. ábra). A 2 órás stabilizációs periódus után a bazális 5-HT, Glu és GABA szintek a következők voltak az MRR-ben (5-HT: $1,66 \pm 0,17$ pmol/ml; Glu: $3,41 \pm 0,43$ nmol/ml; GABA: $0,46 \pm 0,11$ nmol/ml, n=5 egér/csoport). Ezekben a kísérletekben két egymást követő 5 perces 20 és 50 Hz-es fény stimulációt alkalmaztunk, amelyeket egy 5 perces K⁺ depolarizáció (100 nM) követett (Kísérlet 3, 11. ábra). A kontroll egerek nem voltak injektálva a rAVV konstrukcióval, de optikai stimulációt kaptak.



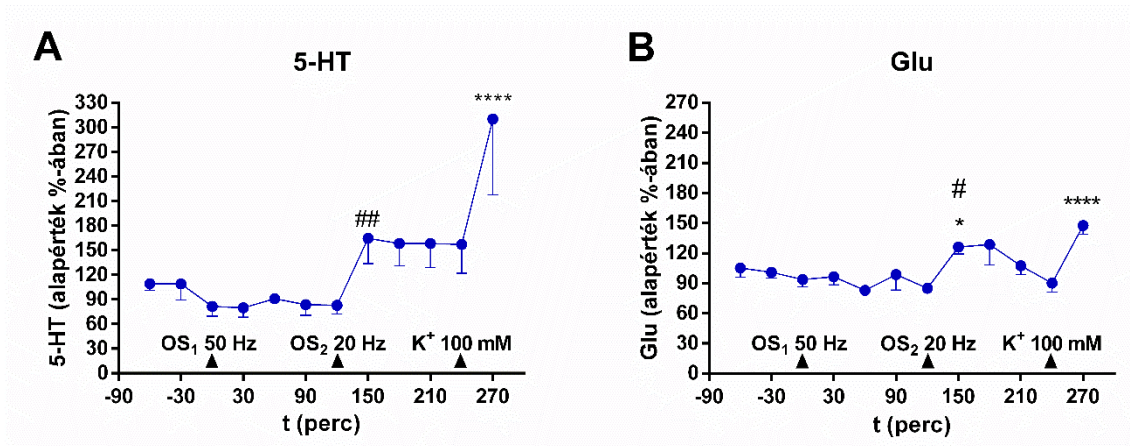
32. ábra: Az *in vivo* fény és K^+ stimuláció növelte az 5-HT, Glu és GABA extracelluláris szinteket az MRR-ben. *A Balra: a mikrodialízis szonda és az optikai szál elhelyezkedését mutatja. Középen: a sötét látóterű mikrofotón a szaggatott vonal mutatja a mikrodialízis szonda okozta sérülés helyét a dorsalis és median raphe magokban. Jobbra: A Paxinos egér agy atlaszból beillesztett kép -4,60 mm a Bregma-tól - a megfelelő területet mutatja. B, C Az első optikai stimuláció (OS_1 : 20 Hz, 5 perc) emelte az 5-HT és Glu szinteket az MRR-ben. D A második optikai stimuláció (OS_2 : 50 Hz, 5 perc) emelte a GABA szintet az MRR-ben. A nyilak jelzik a különböző típusú fény és kémiai stimulációk időpontját. Az adatokat a kiindulási érték %-ában fejeztük ki, mint átlag \pm SEM ($n=5/10$ egér per csoport). Kétszemponos ANOVA analízist és azt követő Dunnett/Fischer (GABA) post hoc tesztet alkalmaztunk $*p<0,05$, $***p<0,001$. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják. A transzmitter szintek mérését HPLC-vel Baranyi Mária végezte.*

A első fény stimuláció hatására az 5-HT és a Glu extracelluláris szintje jelentősen megemelkedett (5-HT: $F_{1,174}=20,2825$, $***p=0,00001$, Glu: $F_{1,174}=9,279$, $**p=0,0027$, 32B, C. ábra), amíg a GABA kiáramlás változatlan maradt a vírus injektált egerek MRR-jében ($F_{1,174}=0,0419$, $p=0,8380$, 32D. ábra). Abszolút mennyiségben az 5-HT és Glu szintek emelkedése $98 \pm 0,66$ pmol/ml ($F_{3,174}=4,0833$, $**p=0,0079$, 213,7%-a a bazálisnak) és $4,76 \pm 0,51$ nmol/ml ($F_{3,174}=2,77149$, $*p=0,0465$, 180,2%-a a bazálisnak) volt. A kontroll egerekben az azonos fény stimuláció nem változtatta meg a bazális extracelluláris 5-HT, Glu, GABA szinteket az MRR-ben (32B, C, D. ábra).

A második fényvel való ingerlésnél 50 Hz-es nagyfrekvenciás (theta-burst) stimulációt végeztünk (a burst-ök és intraburst-ök frekvenciája 50 Hz és az intraburst-ök közt eltelt idő 200 ms=5Hz), melynél nem találtunk szignifikáns növekedést az 5-HT és Glu szintekben az MRR-ben (32B, C, D. ábra). Ellentétben, a vírusinjektált egerek MRR-jében a GABA szintje jelentősen emelkedett $1,40 \pm 0,2$ nmol/ml-re (136,7%-a a bazálisnak, $*p=0,0205$, 32D. ábra). A kontroll egerekben szintén nem tapasztaltunk változást a transzmitterek szintjében ezen stimuláció hatására.

A K^+ depolarizáció jelentősen emelte az 5-HT ($F_{3,174}=15,5803$, $***p=0,000001$), a Glu ($F_{3,174}=22,4020$, $***p=0,000001$) és a GABA ($F_{3,174}=17,8765$, $***p=0,000001$) extracelluláris szintjét a vírus injektált és kontroll egerek MRR-jében (32B, C, D. ábra). Ez a stimulus egyben a kísérlet végén az agyterület életképességét és válaszreakcióképességét is megmutatta.

Megvizsgáltuk, hogy ha a helyi optikai stimulációk sorrendjét felcseréljük, eredményez-e transzmitter felszabadulást az 50 Hz-es fény stimuláció, azonban ez a stimuláció ebben az esetben is hatástalan volt (33A, B. ábra).



33. ábra: Az 50 Hz-es *in vivo* fény stimuláció nem növelte az extracelluláris 5-HT (A) és Glu (B) szinteket az MRR-ben, még akkor sem, ha első depolarizációs ingerként alkalmaztuk. A nyilak jelzik a különböző típusú fény és kémiai stimulusok időpontját. Az adatokat a kiindulási érték %-ában fejeztük ki, mint átlag \pm SEM ($n=3$ egér per csoport). Kétszemponyos ANOVA analízist és azt követő Fischer post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p<0,05$, **** $p<0,0001$. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatják. A kettőskeresztek a két fény stimulus közti szignifikáns eltérést mutatják, # $p<0,05$, ## $p<0,01$. A transzmitter szintek mérését HPLC-vel Baranyi Mária végezte.

6 Megbeszélés

Kutatócsoportunk évek óta tanulmányozza a purinerg jelátvitelt, azon belül is a P2X7 receptor változatos szerepét az idegrendszeri működésekben. Legújabb eredményeinkkel összefüggést találtunk a receptor aktív működése, valamint egyes központi idegrendszert érintő betegségek között. Elsőként a migrén egy egyszerű, de széles körben használt állatmodelljében vizsgáltuk a P2X7 WT és P2X7 KO egerek viselkedési és intracelluláris szignalizációs változásait. Következő vizsgálatainkban a P2X7 receptor gátlás hatását vizsgáltuk a hippokampális szerotonin felszabadulásra hagyományosnak tekinthető neurokémiai (neurotranszmitterfelszabadulás mérés) és újonnan beállított kombinált genetikai és optikai módszerekkel, melyeket viselkedés vizsgálatokkal és immunhisztokémiával egészítettünk ki.

Eredményeink a P2X7 receptor részvételét igazolták egér migrén modellben, valamint a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában elektromos és optikai stimuláció hatására.

6.1 A P2X7 receptorok genetikai deléciójának és farmakológiai antagonistusának hatása migrén állat modellben

A disszertáció első felében az eddig kevésbé ismert purinerg szabályozást vizsgáltuk a migrén patomechanizmusában. Megállapítottuk, hogy a P2X7 receptor előkezelésként alkalmazott gátlása – amit BBG-vel váltottunk ki – az NTG által kiváltott termikus hiperszenzitivitás enyhüléséhez vezet egerekben. Továbbá, mivel a BBG kezelés hatástalan volt P2X7 KO egerekben, ésszerű feltételezni, hogy ezt a hatást a P2X7 receptor közvetíti. A TNC-ben az NTG által kiváltott c-Fos expresszió is csökkent szubakut BBG kezelést követően, amely alátámasztja a TNC szerepét a BBG NTG által kiváltott hiperszenzitivitásra gyakorolt hatásának közvetítésében. Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a P2X7 gátlásában esetlegesen terápiás potenciál rejlik a migrén kezelésére.

Kísérleteinkben a Bates és munkatársai által korábban leírt NTG-indukált migrén modellt²²⁶ alkalmaztuk és reprodukáltuk is eredményeit, mivel az i.p. NTG kezelés időfüggő módon váltott ki termális hiperszenzitivitást, az NTG által kiváltott

hiperszenzitivitást a migrénellesen gyógyszer szumatriptán enyhíteni tudta, illetve az NTG kezelés c-Fos expresszió növekedést váltott ki a TNC-ben és a felső nyaki gerincvelőben.

Érdekes módon a P2X7 KO egerekben az NTG által kiváltott hiperszenzitivitás nem mutatott különbséget a vad típustól. Ennek a negatív eredménynek a legvalószínűbb magyarázata a nem-P2X7 P2X receptorok túlexpressziója lehet a P2X7 KO egerekben a fejlődés során, mint pl. a P2X3 és P2X4. Ezt támasztja alá korábbi megfigyelésünk, így pl. a P2X4 mRNS upregulációját figyeltük meg P2X7 KO egerek striatumában³¹².

A profilaktikusan alkalmazott, mind akut, mind szubakut BBG kezelés hatásos volt az NTG által kiváltott termikus hiperszenzitivitás csillapításában a P2X7 vad típusú egerekben. A BBG-ről ismert, hogy átjut a vér-agy gáton és az általunk alkalmazott dózisban specifikus a P2X7 receptorra. Bár *in vitro* kísérletek során kiderült, hogy a BBG tudja gátolni a Na⁺ csatornákat mikromoláris koncentrációkban³¹³, hasonló dózisu (45,5 mg/kg) *in vivo* vizsgálatokban a BBG koncentrációja az agyban nem nagyobb, mint 200 nM³¹⁴, ami a P2X7 receptorra szelektív³¹⁵. Valamint az az eredményünk, hogy a P2X7 KO egerekben a BBG hatása teljesen megszűnt is cáfolja a lehetőségét másik célpont részvételének kísérleteinkben.

Bár további vizsgálatokra van szükség a kérdés tisztázásához, számos lehetséges mechanizmus létezik, amelyek révén az endogén P2X7 receptor részt vehet a trigeminovaszkuláris rendszer szenzitizációjában.

Az ATP egy jól ismert vészjelző molekula, amely a sejtek sérülésére, gyulladásra, mechanikai behatásra és anyagcsere zavarára válaszul szabadul fel és önmagában is egy fájdalmat keltő vegyület^{35,316}. A P2X7 receptor is egy olyan Ca²⁺ permeabilis ligandfüggő kation csatorna, mely csatornák különböző módokon járulnak hozzá a fájdalom transzmisszióhoz. A hátsó gyöki ganglionokban a P2X7 a szatellit glia sejteken expresszálódik és a proinflammatorikus citokin TNF- α felszabadulása révén fokozza a P2X3 receptor közvetítette jelátvitelt³¹⁷. Hasonló mechanizmus szintén szerepet játszhat a migrénben, mivel a trigeminális ganglionban a szatellit glia sejtek szintén expresszálják P2X7 receptorokat³¹⁸ és P2X3 receptorok is részt vesznek a cranio-faciális fájdalomban NGF, substance P és CGRP kölcsönhatásával^{203,319}. A P2X3 receptorok fokozott aktivitását mutatták ki a migrén genetikai állatmodelljében is³²⁰. Ugyanakkor az is

lehetséges, hogy a P2X7 antagonisták hatáshelye centrálisan, a felső nyaki gerincvelő szintjén vagy a trigeminus magban van. A P2X7 receptor ismertén modulálja az afferens nociceptív információfeldolgozást a gerincvelő hátsó szarvában⁷⁵ és aktivációja részt vesz a centrális szenzitizációban, és annak következményeként kialakuló hátsótalpi hiperalgégiában³²¹. Mivel a trigeminális mag szürkeállományában közepesen nagy sűrűségű P2X7 receptor kötőhelyek találhatók, és az NTG által indukált c-Fos expresszió BBG kezelésre csökkent, a TNC egy potenciális célterülete a P2X7 receptor antagonistáknak. A P2X7 receptorok aktivációja ezen a területen excitátoros aminosavakat szabadít fel³²², amelyeknek blokkolása a BBG hatása alatt állhat.

Mivel a P2X7 receptor az agy más területein is expresszálódik³²³, nem zárható ki egyéb szupraspinalis közvetítő mechanizmus sem, köztiagi, agytörzsi vagy kortikális régiókon keresztül³²⁴. Végül a P2X7 kifejeződik a keringő és lokálisan képződő immunsejteken is és a P2X7 aktiváció egyik legismertebb hatása a proinflammatorikus citokinek posztranszlációs feldolgozásában játszott szerepe, például IL-1 β és TNF- α esetén^{120,166,325}, amelyek szintén ismert fájdalomkeltő vegyületek.

Végezetül az itt bemutatott adatok azt jelzik, hogy a P2X7 gátlása potenciális célpont lehet a migrén megelőzésében. Továbbá, mivel a BBG egy FDA által jóváhagyott, nem toxikus élelmiszer színezék zárt szerkezeti analógja, érdemes megfontolni terápiás alkalmazását^{326,327}.

6.2 A P2X7 receptorok részvétele a hippokampális 5-HT felszabadulás szabályozásában a median raphe terminálisainak optogenetikai stimulálásán követően

A disszertáció második felében szelektív, optogenetikai stimulációt alkalmaztunk az MRR neuronokból származó neurotranszmitter felszabadulás kiváltására. Míg az elektromos stimuláció vagy a kémiai depolarizáció egyidejűleg stimulálja az összes sejtestet, axonokat és idegi terminálisokat a stimulációs mezőben, addig az optogenetikai technika lehetővé teszi a kiválasztott neuronális útvonal specifikus aktiválását³²⁸.

A 20 Hz-es optikai stimuláció az állatok lokomotoros aktivitásának növekedését eredményezte és a stimuláció után 7 nappal dermedési viselkedést váltott ki, jelezve, hogy

ez a fajta stimuláció viselkedési szempontból releváns. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a felszálló szerotonerg pályák alapvető szerepet játszanak olyan motoros mozgásokban, mint a járás, a fej mozgatása vagy a testhelyzet megváltoztatása³²⁹. Legutóbbi tanulmányaink azt mutatják, hogy az MR régió stimulálása a félelem reakciók kialakításában szerepet játszik, továbbá közvetve szabályozza a fájdalomérzés agyi feldolgozását, befolyásolva a félelem emlékek kódolását és tárolását az amygdala, a hippokampusz és a prefrontális kortex által³³⁰. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a viselkedési kísérletek kísérleti körülményei, valamint az *in vivo* és *in vitro* transzmitterfelszabadulási kísérletek kísérleti körülményei nem teljesen azonosak voltak, a kapcsolat közöttük, hogy mindhárom kísérlet típust a ChR2 injekció után, 20 Hz-es stimulációval és az MRR neuronok optikai aktiválásával végeztük. Bár az itt összefoglalt munka nem erre irányult, későbbiekben érdekes lenne tovább vizsgálni az MRR optogenetikai aktiválásának késleltetett hatását is a különböző neurotranszmitterek felszabadulásra, amikor a freezing viselkedés már kialakult. Erre mutat, hogy a szakirodalomban leírták, hogy a P2X7 receptorok szerepet játszanak az averzív memória folyamatokban. A P2X7 receptor genetikai deléciónja, valamint specifikus antagonistájának intrahippokampális injekciója rágszálókban megakadályozta a freezing viselkedés kialakulását az adott félelemkondicionáló paradigmában³³¹.

Hasonló, bár nem teljesen azonos fotostimulációs protokollt használtunk az 5-HT felszabadulás kiváltására MRR és hippokampális szeletekből nyert perfúziós mintákban rAAV injektált egerekben. Az MRR-ben az optikai stimuláció reprodukálható 5-HT felszabadulást váltott ki, amelynek mennyisége kisebb, de összehasonlítható volt az elektromos stimuláció és kémiai depolarizáció által kiváltott transzmitter mennyiséggel. Ez a különbség teljesen reális, hiszen az elektromos stimuláció aktiválja az egész bejövő idegköteget, míg az optikai stimuláció specifikusabb, csak azokat a neuronokat és azok idegvégződéseit stimulálja melyek a ChR2 fehérjét expresszálják. Ez a megfigyelés azt az ismert megfigyelést támasztja alá, hogy a szerotonerg idegvégzések az MRR-ben, illetve a vírus injekció által nem érintett területeken egymást konzisztensen, kölcsönösen innerválják³³².

Az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás az MRR-ben $[Ca^{2+}]_o$ függő volt, amely azt igazolja, hogy vezikuláris exocitózis közvetíti. Mind az elektromosan, mind az optikailag kiváltott 5-HT felszabadulás érzékeny volt az ionotróp

Glu receptorok antagonistáira, ami azt mutatja, hogy az 5-HT felszabadulást a ChR2 fehérjét expresszáló MRR neuronokból a Glu váltja ki. Ez egybevág olyan anatómiai vizsgálatok eredményeivel, amelyek az MRR neuronok autapszisait és rekurrens axon kollaterálisait azonosítják³³³. Továbbá, az 5-HT tartalmú neuronok immunpozitívak Glu-*ra*³³⁴ és foszfát aktiválta glutaminázra³³⁵, amely a Glu bioszintézisében kulcsszerepet játszik, valamint a raphe mag 5-HT neuronjai expresszálják VGlut3 transzportert³³⁶. Mindezeket a feltételezéseket alátámasztják azok az általunk tett megfigyelések is, hogy egyidejűleg Glu is felszabadul az optikai stimulációra (23. ábra). Mivel az optikailag kiváltott 5-HT felszabadulás érzékeny volt a TTX-re, valószínűleg a felszabadult 5-HT és Glu különböző idegvégződések populációjából származik és az 5-HT ezenkívül származhat dendritekből és sejttestekből³³⁷. Ismeretes, hogy az 5-HT-t a raphe sejtekben lévő neuronok szomáiból és dendritjeiből felszabadul az NMDA receptorok aktivációjára $[Ca^{2+}]_o$ függő módon^{338,339}, valamint az 5-HT nagy része nem szinaptikus módon is felszabadulhat^{339,340}. Vizsgálatunk újdonsága az optogenetikai technika alkalmazása, amely segítségével az MR régiót szelektíven aktiváltuk, és amely segítségével a fenti jellemzőket egy neuronális szubpopuláció szintjén is igazoltuk.

Azt is megvizsgáltuk, hogy az 5-HT hasonló úton szabadul-e fel az MRR terminálisokból és az MRR egyik célterületéből a hippocampusból. Mindhárom féle stimuláció (elektromos, optikai, kémiai) 5-HT felszabadulást idézett elő, amely hasonló volt, mint az MRR-ben. Azonban abszolút mennyiségben az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás kevesebb volt a HP-ben, mint az MRR-ben. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy az EYFP jelölődési intenzitás kevésbé volt erős a HP-ben (17. ábra), amely megfelel a távoli célterület kevésbé sűrű beidegzésének.

Míg mind az optikai mind az elektromos stimulálással indukált 5-HT felszabadulás nagymértékben $[Ca^{2+}]_o$ függő volt ezen a területen is, a HP-on végzett kísérleteinkben két féle eltérés is mutatkozott a transzmitter felszabadulásban. Egyrészt másfajta frekvencia függést mutattak, jelezve, hogy különböző transzmitter-poolok mobilizálódtak a két féle stimulációval aktivált idegi terminálisok szubpopulációi különböző frekvenciákon. Ezenkívül, míg az elektromos stimuláció által indukált 5-HT felszabadulást gátolták a TTX és a Glu receptor antagonisták, addig az optikai stimuláció által kiváltott 5-HT efflux nem volt érzékeny a fenti drogokra, ami azt jelzi, a hippocampusban a ChR2 fehérjét expresszáló idegvégződések közvetlenül aktiválódtak a fény stimulus hatására és a

trícium kibocsátása az MRR-ből eredő varikozitásokból származó 5-HT kiáramlást reprezentálja. Mivel a ChR2 permeábilis a nátriumra³⁴¹, ésszerű feltételezni, hogy a csatornán keresztül történő közvetlen ionáramlás felelős az idegvégződések membránjának lokális depolarizációjáért és az ezt követő transzmitter felszabadulás kiváltásáért. Érdekes további megfigyelés, hogy az elektromos stimuláció által indukált 5-HT felszabadulás a HP-ben érzékeny volt az ionotróp Glu receptorok blokkolására. Ennek egyik meggyőző magyarázata, hogy az elektromos stimuláció, ellentétben a fény stimulációval depolarizálja az excitátoros idegi terminálisokat is és glutamátot szabadít fel, amely ezután hat az ionotróp glutamát receptorokra és közvetlenül vagy közvetve mobilizálja az 5-HT-t a DR-ből származó idegvégződésekben. Egy korábbi tanulmány²⁵² mutatta ki, hogy a hippokampális interneuronok erőteljesen és váratlanul gyorsan aktiválódnak az MR-hippokampális projekció révén, amelyet nemcsak a 5-HT, hanem a Glu is közvetít. Következésképpen, egy hasonló glutamáterg DR-hippokampális projekció vagy hippokampális principális neuronok lehetnek a glutamát forrásai, amelyek felszabadítják az 5-HT-t a hippokampuszban.

A közepagyti szerotonerg neuronok szomatodentritikus és az idegvégződésekben lokalizálódó, gátló autoreceptorokkal rendelkeznek³⁴². Ezek a receptorok fontos szerepet játszanak a szerotonerg transzmissziót befolyásoló különböző gyógyszerek hatásában is, mint például a szerotonin újrafelvételt gátló (SSRI) antidepresszánsok és a szerotonerg szorongás oldó szerek. Miközben a szomatodendrikus autoreceptorok aktivációja csökkenti az idegsejtek tüzelési rátáját lokálisan, az idegvégződésekben kifejeződő autoreceptorok aktivációja csökkenti az 5-HT felszabadulást a célterületeken, azaz a kéregben és a hippokampuszban, mindkét területen megtalálhatók ugyanis a 5-HT_{1B/1D} receptorok³⁴³⁻³⁴⁵. Kísérleteinkben az 5-HT_{1A/1B/1D} agonista szumatriptán csökkentette az elektromos, de nem az optikai stimulus által kiváltott 5-HT felszabadulást, míg a szelektív 5-HT_{1A} agonista buspiron nem volt hatással sem az elektromos sem a fény indukálta 5-HT felszabadulásra. Az 5-HT_{1B/1D} receptorok tehát nem szabályozták a fény indukálta 5-HT felszabadulást, ez azzal magyarázható, hogy azok a szerotonerg neuronok, amelyek hippokampális idegvégződéseiken 5-HT_{1B/1D} receptorokat expresszálnak az MRR-n kívül helyezkednek el, valószínűleg a DR-ben. Ez összhangban van azzal a korábban bemutatott eredményekkel, amely kísérleteknél különböző ingerlési technikákat alkalmaztak a DR neuronjainak aktiválására és mérték az 5-HT felszabadulást a

hippokampuszban³⁴⁶⁻³⁴⁸. Adataink jól illusztrálják az optogenetikai módszer alkalmazhatóságát a neurokémiai transzmisszió szubpopuláció szintű modulációjának vizsgálatára, amelyek sajátosságai nagyrészt eddig ismeretlenek voltak.

Vizsgálataink következő célja volt, hogy megvizsgáljuk a hippokampális terminálisokból felszabaduló 5-HT P2X7 receptorok általi modulációját. Megállapítottuk, hogy a P2X7 receptornak mind a genetikai deléciója, mind a farmakológiai gátlása csökkentette az elektromos és optikai stimulációval kiváltott 5-HT felszabadulást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fenti stimulációs paradigmák által felszabadított endogén ATP serkentette az 5-HT felszabadulását a szerotonerg varikozitásokból a P2X7 receptorok aktiválásával. E feltételezésünket alátámasztja az a megfigyelésünk, hogy az azonos elektromos és optikai stimulációk szignifikánsan növelték az extracelluláris ATP szinteket a hippokampuszban. Mivel az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulást a P2X7 receptorok gátlásával csökkentettük, ebből arra következtethetünk, hogy a P2X7 receptor aktivációja nem csak a *median raphe*ből származó szerotonerg idegvégződésekre gyakorolt hatást, hanem kiterjedt a nem median rapheből származó neuronokra is a hippokampuszban. Továbbá, mivel az optikai stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás érzéketlen volt a TTX-re, ebből azt feltételezhetjük, hogy azok a P2X7 receptorok, amelyek az 5-HT felszabadulást modulálják az MRR terminálisokból ugyanazokon a terminálisokon expresszálódhatnak. Azonban nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy az 5-HT felszabadulást szabályozó mediátorok a közeli asztrocitákból szabadulnak fel a P2X7 receptor asztrogliális aktivációjára. A [³H]5-HT felszabadulás P2X7 mediált szabályozását bemutató adataink nem ellentmondásosak korábbi eredményeinkkel sem, amelyek az endogén 5-HT szint emelkedését és az 5-HT transzporterek gátlását mutatták ki a P2X7 receptor genetikai deléciója és farmakológiai gátlása esetén^{296,300}. Ezek a változások a most leírt közvetlen hatásoktól független és kompenzatorikus változások is lehetnek, rámutatva a szerotonerg transzmisszió komplex szabályozására a P2X7 receptorok által. A 5-HT felszabadulás P2X7 receptor általi szabályozásának szerepe lehet a pszichiátriai rendellenességekben, mivel a közelmúltban végzett vizsgálataink rámutattak arra, hogy a P2X7 receptorok gátlásával enyhíthető a depresszió és szkizofrénia szerű viselkedés rágszáló állatmodellekben^{296,297,301}.

Végül az *in vitro* kísérlet során kapott eredményeink igazolására *in vivo* kísérleteket is végeztünk, amelyekben megvizsgáltuk a neurotranszmitterek egyidejű felszabadulását az optikai stimuláció hatására. Itt azt láttuk, hogy az 5-HT és a Glu egyidejűleg szabadul fel a 20 Hz-es optikai stimuláció hatására, míg a GABA szint nem emelkedett a stimuláció hatására. Másrésztől mind a három neurotranszmitter ugyanolyan jól reagált a K^+ depolarizációra, amely nem korlátozódik csak a ChR2 fehérjét expresszáló neuronokra. Ugyanakkor, az 50 Hz-es theta burst-ök a GABA szint szignifikáns emelkedését idézték elő, míg az 5-HT és Glu szintek ebben az esetben nem emelkedtek. Ez az eredmény azt szemlélteti, hogy a különböző mintázatú idegi aktivitások az MRR-ben különböző mintázatú transzmitter felszabadulásokat eredményeznek. Mivel a második optikai stimuláció viszonylag közel volt az első válasz lefutásához, felmerült az a lehetőség is, hogy a felszabadítható transzmitter pool-ok még nem voltak feltöltve ebben az időpontban. Azonban nem ez volt a helyzet, mert, ha a stimulációk sorrendjét felcseréltük, az 50 Hz-es stimuláció még akkor is hatástalan volt az 5-HT és Glu felszabadulásra (33. ábra).

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az optogenetikai aktiváció alkalmas modell *in vitro* és *in vivo* szelektív neuronális szubpopulációk ingerlésére és az azokból történő neurotranszmitter felszabadulásnak a tanulmányozására. Az optikai stimuláció, a feszültségfüggő Na^+ csatornák aktivációjával és azt követő Ca^{2+} függő exocitózissal váltott a fiziológiásnak megfelelő transzmitter ürülést. Eredményeink szerint az MRR-ben az 5-HT és a Glu is felszabadul a ChR2 fehérjét expresszáló neuronokból és az 5-HT felszabadulás az ionotróp Glu receptor aktiváció eredménye. A HP-ban az 5-HT az MRR terminálisokból közvetlenül szabadul fel, függetlenül a glutamáterg transzmissziótól és nem tárgy a preszinaptikus 5-HT_{1B/1D} autoreceptorok általi neuromodulációnak. Ezzel szemben a P2X7 receptorok endogén aktivációja a hippocampális MRR és nem-MRR terminálisokból származó 5-HT felszabadulását egyaránt.

7 Következtetések

Kutatásaink során a purinerg P2X7 receptor közreműködésére kerestünk bizonyítékokat a központi idegrendszert érintő migrén kórfolyamatában, illetve a hippokampális szerotonin felszabadulás szabályozásában.

A következő néhány pontban szeretném kiemelni kísérleteinkkel igazolt főbb eredményeinket a célkitűzések tükrében:

Migrén modell:

1. Migrén egér modellben demonstráltuk, hogy nincs különbség a vad típusú és P2X7 KO egerek termális hiperszenzitivitásában. A P2X7 KO egerek nem ellenállóbbak az NTG által kiváltott fájdalommal szemben, mint vad társaik.
2. Az akut és szubakut BBG kezelés befolyásolta a vad típusú egerek nocifenzív viselkedését, amíg a P2X7 KO egerekben hatástalan volt. Ebből arra következtethetünk, hogy a P2X7 receptor endogén aktivációja szerepet játszik a NTG által kiváltott fájdalominger feldolgozásában.
3. Az NTG aktiválja a fájdalom közvetítésében résztvevő agyterületeket, ahol befolyásolja a c-Fos expressziót. Kimutattuk, hogy az NTG kezelés növelte a c-Fos expressziót a gerincvelőben (C1-2) és a TNC-ben vad típusú és P2X7 KO egerekben is. Ebből arra következtethetünk, hogy a modell és a c-Fos expresszió kapcsolatban áll egymással.
4. Továbbá megállapítottuk, hogy a szubakut BBG kezelés csökkentette a c-Fos expressziót a TNC-ben vad típusú egerekben. Ez a megfigyelés is alátámasztja a P2X7 receptor aktiváció szerepét a migrénes fájdalomban és a jellegzetes tünetek kiváltásában.

Szerotonin felszabadulás szabályozása:

1. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy mind az elektromos, mind az optikai ingerlés hatására emelkedett az 5-HT felszabadulás az MRR-ben és a HP-ben. Tehát az optogenetikai aktiváció alkalmas modell az *in vitro* és *in vivo* neuronális szubpopulációkból származó neurotranszmitter felszabadulásnak vizsgálatára.

2. Vizsgáltuk a glutamát részvételét is a szerotonin felszabadulásban. A raphe magvak hippokampális afferenseiből az optikai ingerlés indukálta szerotonin felszabadulásra nincsenek hatással a glutamát receptor antagonisták.
3. Megvizsgáltuk az 5-HT_{1A/1B/1D} receptorok részvételét a hippokampális 5-HT felszabadulás modulációjában, azonban úgy tűnik, hogy a specifikus optikai ingerlésre felszabaduló 5-HT kiáramlásra nincsenek hatással 5-HT_{1A/1B/1D} és 5-HT_{1A} agonisták.
4. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a P2X7 receptor endogén aktivációja serkenti a median rapheból és a nem-median rapheból származó hippokampális szerotonerg idegvégződésekből a szerotonin felszabadulását.
5. Tovább erősíti a P2X7 receptor aktiváció szerepét, hogy mind az optikai, mind az elektromos stimuláció endogén ATP felszabadulást is kivált hasonló körülmények között.

Összefoglalva eredményeinket, a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepe igazolódott a migrén kórfolyamatában NTG indukált egér migrén modellben, és az elektromos és optikai stimulációk által kiváltott hippokampális 5-HT felszabadulás szabályozásában.

8 Összefoglalás

A P2X7 receptorok ligand-függő kation csatornák, amelyek a központi preszinaptikus excitátoros idegvégződéseken expresszálnak, és részt vesznek a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában, valamint a perifériás és centrális szenzitizációban. A P2X7 receptorok emellett szerepet játszanak különböző idegrendszeri és nem idegrendszeri kórképekben, beleértve az autoimmun betegségeket, a krónikus fájdalmat, a neurodegeneratív rendellenességeket és a rákot is.

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a P2X7 receptor genetikai deléciója nem, míg annak farmakológiai gátlása csökkentette az egerek által mutatott fájdalmat a migrén modellben, és az NTG által kiváltott felső nyaki gerincvelői és TNC neuronális aktivációjának növekedését.

A median raphe régió hippokampális projekcióinak elektromos és optikai stimulációjával 5-HT felszabadulás váltható ki a hippokampusban, amely a P2X7 receptor genetikai és farmakológiai módszerekkel előidézett gátlásával is tompítható volt.

Eredményeink alapján, a P2X7 receptorok részt vehetnek a migrén patogenezisében, bár más P2 receptorok upregulációja kompenzálhatja hatásukat. Ugyanakkor adataink azt is mutatják, hogy a P2X7 antagonisták eredményesek lehetnek a migrén kezelésében. Az MRR terminálisokból származó hippokampális 5-HT felszabadulás a P2X7 receptorok endogén aktiválásával szabályozható. Az 5-HT felszabadulás P2X7 receptor által közvetített szabályozása hozzájárulhat a hippokampusz szerotonerg transzmisszióhoz kapcsolódó különböző fiziológiai és patofiziológiai jelenségekhez.

9 Summary

P2X7 receptors are ligand-gated cation channels that are expressed in the central presynaptic excitatory nerve terminals and participate in the regulation of neurotransmitter release and in peripheral and central sensitization. In addition, P2X7 receptors play a role in various pathologies, including autoimmune diseases, chronic pain, neurodegenerative disorders and cancer.

Summarizing our findings, we can conclude that the genetic deletion of the P2X7 receptor did not, while its pharmacological inhibition reduced the mice's pain in the migraine model and the NTG-induced increased neuronal activity of upper cervical spinal cord and TNC.

Furthermore, the electrical and optical stimulation of the hippocampal projections of the median raphe region induces 5-HT release in the hippocampus, which could also be attenuated by the genetical and pharmacological inhibition of P2X7 receptor.

Based on our results, P2X7 receptors may be involved in migraine pathogenesis, although upregulation of other P2 receptors may compensate for their effect. However, our data show that P2X7 antagonists can be effective in migraine therapy. In addition, hippocampal 5-HT release from MRR terminals can be modulated by endogenous activation of P2X7 receptors. The P2X7 receptor mediated 5-HT release may contribute to the various physiological and pathophysiological phenomena associated with hippocampal serotonergic transmission.

10 Irodalomjegyzék

- 1 Sperlagh B, Illes P. (2006) Az ATP és az adenzin részvétele az idegsejtek közötti kommunikációban. *Természet Világa*, II.: 30-41.
- 2 Zhang YX, Yamashita H, Ohshita T, Sawamoto N, Nakamura S. (1995) ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. *Brain Res*, 691: 205-212.
- 3 Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Tasaki H, Kaneko S. (1997) Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J Neurochem*, 69: 2581-2588.
- 4 Okada M, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kondo T, Kaneko S. (1999) Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. *Eur J Neurosci*, 11: 1-9.
- 5 Okada M, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kaneko S. (1999) Interaction between purinoceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using in vivo microdialysis. *Neuropharmacology*, 38: 707-715.
- 6 Burnstock G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24: 509-581.
- 7 Khakh BS, Burnstock G. (2009) The Double Life of Atp. *Sci Am*, 301: 84-+.
- 8 Gordon JL. (1986) Extracellular Atp - Effects, Sources and Fate. *Biochemical Journal*, 233: 309-319.
- 9 Schwiebert EM. (2000) Extracellular ATP-mediated propagation of Ca²⁺ waves. Focus on "Mechanical strain-induced Ca²⁺ waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation". *Am J Physiol-Cell Ph*, 279: C281-C283.
- 10 Robertson SJ, Ennion SJ, Evans RJ, Edwards FA. (2001) Synaptic P2X receptors. *Current opinion in neurobiology*, 11: 378-386.
- 11 Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. (2003) Storage and release of ATP from Astrocytes in culture. *J Biol Chem*, 278: 1354-1362.
- 12 Cotrina ML, Lin JHC, Lopez-Garcia JC, Naus CCG, Nedergaard M. (2000) ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci*, 20: 2835-2844.

- 13 Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL, Bennett MR. (2003) Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *Neuroreport*, 14: 2177-2181.
- 14 Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. (2003) ATP released from Astrocytes during swelling activates chloride channels. *Journal of neurophysiology*, 89: 1870-1877.
- 15 Burnstock G. (1980) Purinergic nerves and receptors. *Progr Biochem Pharmacol*, 16: 141-154.
- 16 Burnstock G. (2009) Purinergic cotransmission. *Exp Physiol*, 94: 20-24.
- 17 Burnstock G. (2012) Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Brit J Pharmacol*, 167: 238-255.
- 18 Burnstock G. (1976) Do Some Nerve-Cells Release More Than One Transmitter. *Neuroscience*, 1: 239-248.
- 19 Burnstock G. (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 47-52.
- 20 Burnstock G, Kennedy C. (1985) Is There a Basis for Distinguishing 2 Types of P2-Purinoceptor. *Gen Pharmacol*, 16: 433-440.
- 21 Abbracchio MP, Burnstock G. (1994) Purinoceptors - Are There Families of P2x and P2y Purinoceptors. *Pharmacol Therapeut*, 64: 445-475.
- 22 Hynie S. (1995) Purinergic receptors--nomenclature and classification of types and subtypes. *Cesk Fysiol*, 44: 139-144.
- 23 Jacobson KA, Gao ZG. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 247-264.
- 24 Burnstock G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64: 1471-1483.
- 25 Cusack NJ, Hourani SMO. (1990) Subtypes of P2-Purinoceptors - Studies Using Analogs of Atp. *Ann Ny Acad Sci*, 603: 172-181.
- 26 Fischer W, Krugel U. (2007) P2Y receptors: Focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem*, 14: 2429-2455.
- 27 Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflug Arch Eur J Phy*, 452: 513-537.
- 28 Jarvis MF, Khakh BS. (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 56: 208-215.

- 29 Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM. (2012) The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood*, 120: 2365-2375.
- 30 Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. (1996) The cytolytic P-2Z receptor for extracellular ATP identified as a P-2X receptor (P2X₇). *Science*, 272: 735-738.
- 31 Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Nyunt AK, Umemura A, Mase M, Yamada A, Shimada S. (2008) Cellular localization of P2X₇ receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res*, 1194: 45-55.
- 32 Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco Vilbois M, North RA, Buell G. (1997) Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology*, 36: 1277-1283.
- 33 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.
- 34 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.
- 35 Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. (2006) P2X₇ receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 78: 327-346.
- 36 Anderson CM, Nedergaard M. (2006) Emerging challenges of assigning P2X₇ receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*, 29: 257-262.
- 37 Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TFC, 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.
- 38 Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K. (2005) Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol*, 481: 377-390.

- 39 Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 73: 384-399.
- 40 Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Won MH. (2004) GABA(B) receptor-mediated regulation of P2X7 receptor expression in the gerbil hippocampus. *Mol Brain Res*, 121: 12-18.
- 41 Sperlagh B, Szabo G, Erdelyi F, Baranyi M, Vizi ES. (2003) Homo- and heteroexchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system. *Brit J Pharmacol*, 139: 623-633.
- 42 Brandle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. (1998) Expression of the P2X(7)-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Mol Brain Res*, 62: 106-109.
- 43 Ferrero ME. (2009) A new approach to the inflammatory/autoimmune diseases. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 4: 108-113.
- 44 Fiebich BL, Akter S, Akundi RS. (2014) The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci*, 8.
- 45 Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. (2003) Extracellular ATP and neurodegeneration. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 2: 403-412.
- 46 North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82: 1013-1067.
- 47 Tewari M, Seth P. (2015) Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing research reviews*, 24: 328-342.
- 48 Costa HM, Vieira FS, Coutinho-Silva R. (2011) C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinerg Signal*, 7: 7-19.
- 49 Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S. (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem*, 278: 8853-8860.
- 50 Rodrigues RJ, Tome A, Cunha RA. (2015) ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci-Switz*, 9.

- 51 Soares-Bezerra RJ, Ferreira NCD, Alberto AVP, Bonavita AG, Fidalgo-Neto AA, Calheiros AS, Frutuoso VD, Alves LA. (2015) An Improved Method for P2X7R Antagonist Screening (vol 10, e0123089, 2015). Plos One, 10.
- 52 Klapperstuck M, Buttner C, Schmalzing G, Markwardt F. (2001) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor. J Physiol-London, 534: 25-35.
- 53 Young MT, Pelegrin P, Surprenant A. (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. Mol Pharmacol, 71: 92-100.
- 54 Yan ZH, Khadra A, Li S, Tomic M, Sherman A, Stojilkovic SS. (2010) Experimental Characterization and Mathematical Modeling of P2X7 Receptor Channel Gating. J Neurosci, 30: 14213-14224.
- 55 Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, Stojilkovic SS. (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. J Gen Physiol, 132: 563-573.
- 56 Acuna-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro JP. (2007) Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X(7) purinergic receptor. J Neurochem, 101: 17-26.
- 57 Dutot M, Liang H, Pauloin T, Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Warnet JM, Rat P. (2008) Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor. Mol Vis, 14: 889-897.
- 58 Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA. (1999) Ionic effects on human recombinant P2X(7) receptor function. N-S Arch Pharmacol, 359: 102-109.
- 59 Flittiger B, Klapperstueck M, Schmalzing G, Markwardt F. (2010) Effects of Protons on Macroscopic and Single-Channel Currents Mediated by the Human P2X7 Receptor. Biophys J, 98: 701a-701a.
- 60 Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F. (2011) The effect of anions on the human P2X7 receptor. Bba-Biomembranes, 1808: 2913-2922.
- 61 Alloisio S, Di Garbo A, Barbieri R, Bozzo L, Ferroni S, Nobile M. (2010) Evidence for two conductive pathways in P2X(7) receptor: differences in modulation and selectivity. J Neurochem, 113: 796-806.
- 62 Yan ZH, Khadra A, Sherman A, Stojilkovic SS. (2011) Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. J Gen Physiol, 138: 437-452.

- 63 Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FWK. (2011) A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Inv Drug*, 20: 897-915.
- 64 Volonte C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G. (2012) P2X7 Receptors: Channels, Pores and More. *Cns Neurol Disord-Dr*, 11: 705-721.
- 65 Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Baumert HG, Spatz-Kumbel G, Mutschler E. (1992) PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol*, 217: 217-219.
- 66 Dunn PM, Blakeley AG. (1988) Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol*, 93: 243-245.
- 67 Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol*, 151: 571-579.
- 68 Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol*, 48: 178-183.
- 69 Gargett CE, Wiley JS. (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol*, 120: 1483-1490.
- 70 Baraldi PG, del Carmen Nunez M, Morelli A, Falzoni S, Di Virgilio F, Romagnoli R. (2003) Synthesis and biological activity of N-arylpiperazine-modified analogues of KN-62, a potent antagonist of the purinergic P2X7 receptor. *J Med Chem*, 46: 1318-1329.
- 71 Baraldi PG, Makaeva R, Pavani MG, Nunez Mdel C, Spalluto G, Moro S, Falzoni S, Di Virgilio F, Romagnoli R. (2002) Synthesis, biological activity and molecular modeling studies of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as conformationally constrained analogues of KN62, a potent antagonist of the P2X7-receptor containing a tyrosine moiety. *Arzneimittel-Forschung*, 52: 273-285.
- 72 Park JH, Lee GE, Lee SD, Hien TT, Kim S, Yang JW, Cho JH, Ko H, Lim SC, Kim YG, Kang KW, Kim YC. (2015) Discovery of novel 2,5-dioxoimidazolidine-

- based P2X(7) receptor antagonists as constrained analogues of KN62. *J Med Chem*, 58: 2114-2134.
- 73 Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M. (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 12489-12493.
- 74 Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. (2006) A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 319: 1376-1385.
- 75 McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF. (2007) P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience*, 146: 1817-1828.
- 76 Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA. (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem*, 49: 3659-3666.
- 77 Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, Vaidyanathan SX, Perez-Medrano A, Wang Y, Carroll WA, Jarvis MF. (2009) [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, 56: 223-229.
- 78 Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A. (2006) Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol*, 149: 880-887.

- 79 Michel AD, Chambers LJ, Walter DS. (2008) Negative and positive allosteric modulators of the P2X(7) receptor. *Br J Pharmacol*, 153: 737-750.
- 80 Hibell AD, Thompson KM, Xing M, Humphrey PP, Michel AD. (2001) Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *J Pharmacol Exp Ther*, 296: 947-957.
- 81 Furber M, Alcaraz L, Bent JE, Beyerbach A, Bowers K, Braddock M, Caffrey MV, Cladingboel D, Collington J, Donald DK, Fagura M, Ince F, Kinchin EC, Laurent C, Lawson M, Luker TJ, Mortimore MM, Pimm AD, Riley RJ, Roberts N, Robertson M, Theaker J, Thorne PV, Weaver R, Webborn P, Willis P. (2007) Discovery of potent and selective adamantane-based small-molecule P2X(7) receptor antagonists/interleukin-1beta inhibitors. *J Med Chem*, 50: 5882-5885.
- 82 Carroll WA, Donnelly-Roberts D, Jarvis MF. (2009) Selective P2X(7) receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal*, 5: 63-73.
- 83 Alves LA, Bezerra RJS, Faria RX, Ferreira LGB, Frutuoso VD. (2013) Physiological Roles and Potential Therapeutic Applications of the P2X7 Receptor in Inflammation and Pain. *Molecules*, 18: 10953-10972.
- 84 Broom DC, Matson DJ, Bradshaw E, Buck ME, Meade R, Coombs S, Matchett M, Ford KK, Yu W, Yuan J, Sun SH, Ochoa R, Krause JE, Wustrow DJ, Cortright DN. (2008) Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-aminopyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 327: 620-633.
- 85 Ali Z, Laurijssens B, Ostefeld T, McHugh S, Stylianou A, Scott-Stevens P, Hosking L, Dewit O, Richardson JC, Chen C. (2013) Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of a P2X7 receptor allosteric modulator GSK1482160 in healthy human subjects. *Brit J Clin Pharmacol*, 75: 197-207.
- 86 Gao M, Wang M, Green MA, Hutchins GD, Zheng QH. (2015) Synthesis of [(11)C]GSK1482160 as a new PET agent for targeting P2X(7) receptor. *Bioorg Med Chem Lett*, 25: 1965-1970.
- 87 Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB, Team DCS. (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with

- active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Annals of the rheumatic diseases*, 71: 1630-1635.
- 88 Stock TC, Bloom BJ, Wei N, Ishaq S, Park W, Wang X, Gupta P, Mebus CA. (2012) Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *The Journal of rheumatology*, 39: 720-727.
- 89 Friedle SA, Curet MA, Watters JJ. (2010) Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent patents on CNS drug discovery*, 5: 35-45.
- 90 Gunosewoyo H, Kassiou M. (2010) P2X purinergic receptor ligands: recently patented compounds. *Expert Opin Ther Pat*, 20: 625-646.
- 91 Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Sato M, Hashimoto M, Kitani H. (2008) Lysophospholipids and ATP mutually suppress maturation and release of IL-1 beta in mouse microglial cells using a Rho-dependent pathway. *Journal of immunology*, 180: 7827-7839.
- 92 Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT. (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol*, 141: 1106-1117.
- 93 Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. (2003) Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284: C571-581.
- 94 Martel-Gallegos G, Casas-Pruneda G, Ortega-Ortega F, Sanchez-Armass S, Olivares-Reyes JA, Diebold B, Perez-Cornejo P, Arreola J. (2013) Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochimica et biophysica acta*, 1830: 4650-4659.
- 95 Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Teresa Miras-Portugal M. (2011) ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, 61: 1210-1221.
- 96 Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and

- cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*, 67: 1723-1733.
- 97 Tewari M, Monika, Varghse RK, Menon M, Seth P. (2015) Astrocytes mediate HIV-1 Tat-induced neuronal damage via ligand-gated ion channel P2X7R. *J Neurochem*, 132: 464-476.
- 98 Tsao HK, Chiu PH, Sun SH. (2013) PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis*, 4: e751.
- 99 Shiratori M, Tozaki-Saitoh H, Yoshitake M, Tsuda M, Inoue K. (2010) P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways. *J Neurochem*, 114: 810-819.
- 100 Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. (1999) ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *J Neurochem*, 73: 334-343.
- 101 Chen S, Ma Q, Krafft PR, Chen Y, Tang J, Zhang J, Zhang JH. (2013) P2X7 receptor antagonism inhibits p38 mitogen-activated protein kinase activation and ameliorates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. *Critical care medicine*, 41: e466-474.
- 102 Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA. (2001) P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 21: 7135-7142.
- 103 Xu H, Xiong C, He L, Wu B, Peng L, Cheng Y, Jiang F, Tan L, Tang L, Tu Y, Yang Y, Liu C, Gao Y, Li G, Zhang C, Liu S, Xu C, Wu H, Li G, Liang S. (2015) Trans-resveratrol attenuates high fatty acid-induced P2X7 receptor expression and IL-6 release in PC12 cells: possible role of P38 MAPK pathway. *Inflammation*, 38: 327-337.
- 104 Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci*, 24: 1-7.

- 105 Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT. (2009) P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity research*, 15: 193-204.
- 106 Burnstock G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, 87: 659-797.
- 107 Illes P, Ribeiro JA. (2004) Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol*, 483: 5-17.
- 108 Sperlagh B, Illes P. (2014) P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 537-547.
- 109 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.
- 110 Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem*, 281: 4274-4284.
- 111 Ballerini P, Rathbone MP, DiIorio P, Renzetti A, Giuliani P, DiAlimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R. (1996) Rat astroglial P2Z (P2X(7)) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, 7: 2533-2537.
- 112 Suadicanì SO, Brosnan CF, Scemes E. (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci*, 26: 1378-1385.
- 113 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. *Journal of immunology*, 176: 3877-3883.
- 114 Mingam R, De Smedt V, Amedee T, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R, Laye S. (2008) In vitro and in vivo evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 beta in the murine brain. *Brain, behavior, and immunity*, 22: 234-244.
- 115 Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandona D, Savaglio E, Di Virgilio F. (2007) Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, 109: 3856-3864.

- 116 Takenouchi T, Sugama S, Iwamaru Y, Hashimoto M, Kitani H. (2009) Modulation of the ATP-Induced release and processing of IL-1beta in microglial cells. *Critical reviews in immunology*, 29: 335-345.
- 117 Barbera-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F, Pelegrin P. (2012) P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1beta release. *Faseb J*, 26: 2951-2962.
- 118 Clark AK, Staniland AA, Marchand F, Kaan TK, McMahon SB, Malcangio M. (2010) P2X7-dependent release of interleukin-1beta and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide. *J Neurosci*, 30: 573-582.
- 119 Colomar A, Marty V, Medina C, Combe C, Parnet P, Amedee T. (2003) Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem*, 278: 30732-30740.
- 120 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.
- 121 Perregaux D, Gabel CA. (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem*, 269: 15195-15203.
- 122 Sanz JM, Di Virgilio F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *Journal of immunology*, 164: 4893-4898.
- 123 Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A. (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *Journal of immunology*, 180: 7147-7157.
- 124 Brough D, Rothwell NJ. (2007) Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of cell science*, 120: 772-781.
- 125 Eder C. (2009) Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology*, 214: 543-553.
- 126 Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and

- correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology*, 179: 1913-1925.
- 127 Pelegrin P, Surprenant A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J*, 25: 5071-5082.
- 128 Wesselius A, Bours MJ, Arts IC, Theunisz EH, Geusens P, Dagnelie PC. (2012) The P2X(7) loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects ex vivo cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels. *BMC immunology*, 13: 64.
- 129 Wang CM, Chang YY, Sun SH. (2003) Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF- β 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cellular signalling*, 15: 1129-1137.
- 130 Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI, Kang TC. (2010) P2X7 receptor regulates leukocyte infiltrations in rat frontoparietal cortex following status epilepticus. *Journal of neuroinflammation*, 7: 65.
- 131 Craig AD. (2003) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci*, 26: 303-307.
- 132 Chapman RC. in *Bonica's management of pain* (ed J.D. Loser) 461-477 (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
- 133 Merskey H, Bogduk N. (1994) Classification of Chronic Pain IASP, 2.
- 134 Tajti J, Vécsei L. (2006) Mozgásszervi megbetegedéseket utánzó neuropátiás fájdalom patomechanizmusa és terápiája. *Magyar Tudomány*, 167: 1191-1196.
- 135 Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424: 778-783.
- 136 Burnstock G. (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, 58: 58-86.
- 137 Inoue K. (2007) P2 receptors and chronic pain. *Purinergic Signal*, 3: 135-144.
- 138 McGaraughty S, Jarvis MF. (2006) Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Develop Res*, 67: 376-388.

- 139 Nakatsuka T,Gu JGG. (2006) P2X purinoceptors and sensory transmission. *Pflug Arch Eur J Phy*, 452: 598-607.
- 140 Horvath G, Goloncser F, Csolle C, Kiraly K, Ando RD, Baranyi M, Kovanyi B, Mate Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Muller CE, Von Kugelgen I,Sperlagh B. (2014) Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiology of disease*, 70: 162-178.
- 141 Jarvis MF. (2010) The neural-glia purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends Neurosci*, 33: 48-57.
- 142 Smith HS. (2010) Activated microglia in nociception. *Pain physician*, 13: 295-304.
- 143 Tsuda M, Tozaki-Saitoh H,Inoue K. (2010) Pain and purinergic signaling. *Brain research reviews*, 63: 222-232.
- 144 Beko K, Kovanyi B, Goloncser F, Horvath G, Denes A, Kornyei Z, Botz B, Helyes Z, Muller CE,Sperlagh B. (2017) Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 15: 1223-1235.
- 145 Trang T,Salter MW. (2012) P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain. *Purinergic Signal*, 8: 621-628.
- 146 Tsuda M, Inoue K,Salter MW. (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*, 28: 101-107.
- 147 Goloncser F,Sperlagh B. (2014) Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *The journal of headache and pain*, 15: 24.
- 148 Chizh BA,Illes P. (2001) P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev*, 53: 553-568.
- 149 Wirkner K, Sperlagh B,Illes P. (2007) P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol*, 36: 165-183.
- 150 Burnstock G. (2016) Purinergic Mechanisms and Pain. *Advances in pharmacology*, 75: 91-137.
- 151 Di Virgilio F, Boeynaems JM,Robson SC. (2009) Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol*, 9: 507-513.

- 152 Cui J, He W, Yi B, Zhao H, Lu K, Ruan H, Ma D. (2014) mTOR pathway is involved in ADP-evoked astrocyte activation and ATP release in the spinal dorsal horn in a rat neuropathic pain model. *Neuroscience*, 275: 395-403.
- 153 Burnstock G, Sawynok J. (2010) ATP and adenosine receptors and pain. *Pharmacology of pain*: 303-326.
- 154 Dickenson AH, Suzuki R, Reeve AJ. (2000) Adenosine as a potential analgesic target in inflammatory and neuropathic pains. *Cns Drugs*, 13: 77-85.
- 155 Sawynok J, Liu XJ. (2003) Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*, 69: 313-340.
- 156 Korboukh I, Hull-Ryde EA, Rittiner JE, Randhawa AS, Coleman J, Fitzpatrick BJ, Setola V, Janzen WP, Frye SV, Zylka MJ, Jin J. (2012) Orally Active Adenosine A(1) Receptor Agonists with Antinociceptive Effects in Mice. *J Med Chem*, 55: 6467-6477.
- 157 Loram LC, Harrison JA, Sloane EM, Hutchinson MR, Sholar P, Taylor FR, Berkelhammer D, Coats BD, Poole S, Milligan ED, Maier SF, Rieger J, Watkins LR. (2009) Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain. *J Neurosci*, 29: 14015-14025.
- 158 Sowa NA, Voss MK, Zylka MJ. (2010) Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A(1) receptor activation. *Mol Pain*, 6.
- 159 Vincenzi F, Targa M, Romagnoli R, Merighi S, Gessi S, Baraldi PG, Borea PA, Varani K. (2014) TRR469, a potent A(1) adenosine receptor allosteric modulator, exhibits anti-nociceptive properties in acute and neuropathic pain models in mice. *Neuropharmacology*, 81: 6-14.
- 160 Zylka MJ. (2011) Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med*, 17: 188-196.
- 161 Chen Z, Janes K, Chen C, Doyle T, Bryant L, Tosh DK, Jacobson KA, Salvemini D. (2012) Controlling murine and rat chronic pain through A3 adenosine receptor activation. *Faseb J*, 26: 1855-1865.
- 162 Little JW, Ford A, Symons-Liguori AM, Chen ZM, Janes K, Doyle T, Xie J, Luongo L, Tosh DK, Maione S, Bannister K, Dickenson AH, Vanderah TW,

- Porreca F, Jacobson KA, Salvemini D. (2015) Endogenous adenosine A(3) receptor activation selectively alleviates persistent pain states. *Brain : a journal of neurology*, 138: 28-35.
- 163 Paoletta S, Tosh DK, Finley A, Gizewski ET, Moss SM, Gao ZG, Auchampach JA, Salvemini D, Jacobson KA. (2013) Rational Design of Sulfonated A(3) Adenosine Receptor-Selective Nucleosides as Pharmacological Tools To Study Chronic Neuropathic Pain. *J Med Chem*, 56: 5949-5963.
- 164 Chessell IP, Michel AD, Humphrey PPA. (1997) Properties of the pore-forming P2X(7) purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *Brit J Pharmacol*, 121: 1429-1437.
- 165 Dell'Antonio G, Quattrini A, Dal Cin E, Fulgenzi A, Ferrero ME. (2002) Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis and rheumatism*, 46: 3378-3385.
- 166 Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 114: 386-396.
- 167 Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh CC, Honore P, Jarvis MF. (2008) Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 324: 409-415.
- 168 Hughes JP, Hatcher JP, Chessell IP. (2007) The role of P2X(7) in pain and inflammation. *Purinerg Signal*, 3: 163-169.
- 169 Nelson DW, Sarris K, Kalvin DM, Namovic MT, Grayson G, Donnelly-Roberts DL, Harris R, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA. (2008) Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbonylhydrazide P2X7 antagonists. *J Med Chem*, 51: 3030-3034.
- 170 Chessell IP, Hatcher JP, Hughes JP, Ulmann L, Green P, Mander PK, Reeve AJ, Rassendren F. (2006) The role of P2X7 and P2X4 in pain processing: common or divergent pathways? *Purinerg Signal*, 2: 46-47.
- 171 Teixeira JM, Oliveira MC, Parada CA, Tambeli CH. (2010) Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X7 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*, 644: 55-60.

- 172 Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K. (2011) Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett*, 504: 57-61.
- 173 Itoh K, Chiang CY, Li Z, Lee JC, Dostrovsky JO, Sessle BJ. (2011) Central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn involves purinergic P2X7 receptors. *Neuroscience*, 192: 721-731.
- 174 Ando RD, Sperlagh B. (2013) The role of glutamate release mediated by extrasynaptic P2X7 receptors in animal models of neuropathic pain. *Brain Res Bull*, 93: 80-85.
- 175 Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, Garnier-Legrand L, Rat P, Laprevote O, Coudore F. (2013) P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach. *Plos One*, 8: e66830.
- 176 Ochi-ishi R, Nagata K, Inoue T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. (2014) Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia. *Mol Pain*, 10: 53.
- 177 Teixeira JM, de Oliveira-Fusaro MC, Parada CA, Tambeli CH. (2014) Peripheral P2X7 receptor-induced mechanical hyperalgesia is mediated by bradykinin. *Neuroscience*, 277: 163-173.
- 178 Ursu D, Ebert P, Langron E, Ruble C, Munsie L, Zou W, Fijal B, Qian YW, McNearney TA, Mogg A, Grubisha O, Merchant K, Sher E. (2014) Gain and loss of function of P2X7 receptors: mechanisms, pharmacology and relevance to diabetic neuropathic pain. *Mol Pain*, 10: 37.
- 179 Society HCCotIH. (2013) The international classification of headache disorders. *Cephalalgia*, 3: 629-808.
- 180 Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, Altman J, Goadsby PJ, Macrae A. (2003) Premonitory symptoms in migraine - An electronic diary study. *Neurology*, 60: 935-940.
- 181 Giffin NJ, Lipton RB, Silberstein SD, Olesen J, Goadsby PJ. (2016) The migraine postdrome: An electronic diary study. *Neurology*, 87: 309-313.
- 182 Kelman L. (2006) The postdrome of the acute migraine attack. *Cephalalgia*, 26: 214-220.

- 183 Rasmussen BK, Olesen J. (1992) Migraine with Aura and Migraine without Aura - an Epidemiologic-Study. *Cephalalgia*, 12: 221-228.
- 184 Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S. (2017) Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol Rev*, 97: 553-622.
- 185 Villalón CM, Centurion D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR. (2003) Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol*, 1: 71-84.
- 186 Eadie MJ. (2005) The pathogenesis of migraine - 17th to early 20th century understandings. *J Clin Neurosci*, 12: 383-388.
- 187 Peroutka SJ. (2004) Migraine: a chronic sympathetic nervous system disorder. *Headache*, 44: 53-64.
- 188 Burnstock G, Ralevic V. (2014) Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev*, 66: 102-192.
- 189 Burnstock G. (1989) The role of adenosine triphosphate in migraine. *Biomed Pharmacother*, 43: 727-736.
- 190 Malmström M, Hou M, Pendergast W, Erlinge D, Edvinsson L. (2003) The stable pyrimidines UDPβS and UTPγS discriminate between contractile cerebrovascular P2 receptors. *Eur J Pharmacol*, 458: 305-311.
- 191 Haanes KA, Edvinsson L. (2014) Expression and characterization of purinergic receptors in rat middle meningeal artery-potential role in migraine. *Plos One*, 9: e108782.
- 192 Pietrobon D. (2005) Migraine: new molecular mechanisms. *Neuroscientist*, 11: 373-386.
- 193 Burnstock G. (2006) Purinergic signalling--an overview. *Novartis Foundation symposium*, 276: 26-48; discussion 48-57, 275-281.
- 194 Staikopoulos V, Sessle BJ, Furness JB, Jennings EA. (2007) Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*, 144: 208-216.
- 195 North RA. (2004) P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *The Journal of physiology*, 554: 301-308.

- 196 Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377: 428-431.
- 197 Ruan HZ, Burnstock G. (2003) Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol*, 120: 415-426.
- 198 Weick M, Cherkas PS, Hartig W, Pannicke T, Uckermann O, Bringmann A, Tal M, Reichenbach A, Hanani M. (2003) P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. *Neuroscience*, 120: 969-977.
- 199 Ceruti S, Fumagalli M, Villa G, Verderio C, Abbracchio MP. (2008) Purinoceptor-mediated calcium signaling in primary neuron-glia trigeminal cultures. *Cell Calcium*, 43: 576-590.
- 200 Sessle BJ. (2005) Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva anesthesiologica*, 71: 117-136.
- 201 Hu B, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. (2002) P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis. *Journal of neurophysiology*, 88: 1614-1624.
- 202 Shinoda M, Kawashima K, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. (2007) P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pain*, 8: 588-597.
- 203 Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, Simonetti M, Nistri A, Giniatullin R. (2006) Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide. *J Neurosci*, 26: 6163-6171.
- 204 Ruan HZ, Moules E, Burnstock G. (2004) Changes in P2X3 purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development. *Histochem Cell Biol*, 122: 539-551.
- 205 Gerevich Z, Illes P. (2004) P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal*, 1: 3-10.
- 206 Gerevich Z, Muller C, Illes P. (2005) Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol*, 521: 34-38.

- 207 Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. (2002) Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 66-73.
- 208 Svichar N, Shmigol A, Verkhatsky A, Kostyuk P. (1997) ATP induces Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores exclusively in large DRG neurones. *Neuroreport*, 8: 1555-1559.
- 209 Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. (2010) Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*, 30: 8807-8814.
- 210 Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M, Burstein R. (2011) Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Annals of neurology*, 69: 855-865.
- 211 Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*, 8: 136-142.
- 212 Schock SC, Munyao N, Yakubchuk Y, Sabourin LA, Hakim AM, Ventureyra EC, Thompson CS. (2007) Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. *Brain Res*, 1168: 129-138.
- 213 Bleehen T, Keele CA. (1977) Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain*, 3: 367-377.
- 214 Burnstock G, Wood JN. (1996) Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Current opinion in neurobiology*, 6: 526-532.
- 215 Hamilton SG, McMahon SB. (2000) ATP as a peripheral mediator of pain. *J Auton Nerv Syst*, 81: 187-194.
- 216 Jennings EA, Cho HJ. (2007) Peripheral sensitization in migraine-role for P2X purinergic receptors in the dura-vascular sensory pathway. *Drug Develop Res*, 68: 321-328.
- 217 Ambalavanar R, Dessem D. (2009) Emerging Peripheral Receptor Targets for Deep-tissue Craniofacial Pain Therapies. *J Dent Res*, 88: 201-211.

- 218 Ambalavanar R, Moritani M, Dessem D. (2005) Trigeminal P2X(3) receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation. *Pain*, 117: 280-291.
- 219 Masterson CG, Durham PL. (2010) DHE repression of ATP-mediated sensitization of trigeminal ganglion neurons. *Headache*, 50: 1424-1439.
- 220 Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD. (2012) Chronic migraine--classification, characteristics and treatment. *Nature reviews. Neurology*, 8: 162-171.
- 221 Jansen-Olesen I, Tfelt-Hansen P, Olesen J. (2013) Animal migraine models for drug development: status and future perspectives. *Cns Drugs*, 27: 1049-1068.
- 222 Storer RJ, Suprongsinchai W, Srikiatkachorn A. (2015) Animal models of chronic migraine. *Current pain and headache reports*, 19: 467.
- 223 Akerman S, Holland PR, Hoffmann J. (2013) Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: dural trigeminovascular nociception. *Cephalalgia*, 33: 577-592.
- 224 Romero-Reyes M, Ye Y. (2013) Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of headache: conscious behavioral research. *Cephalalgia*, 33: 566-576.
- 225 Munro G, Jansen-Olesen I, Olesen J. (2017) Animal models of pain and migraine in drug discovery. *Drug Discov Today*, 22: 1103-1111.
- 226 Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI, Ptacek LJ, Ahn AH. (2010) Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia*, 30: 170-178.
- 227 Zifa E, Fillion G. (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol Rev*, 44: 401-458.
- 228 Sanders-Bush E, Mayer SE. in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (ed J.G. Hardman et al.) 249-263 (McGraw-Hill, 1996).
- 229 Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. in *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (ed S. J. Watson) Ch. Chapter 42 (Lippincott Williams & Wilkins, 1998).
- 230 Carlson NR. *Physiology of Behavior*. 11 edn, (Pearson, 2013).
- 231 Palkovits M. (1987) Anatomy of neural pathways affecting CRH secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 512: 139-148.

- 232 Takeuchi Y. *Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain*. (John Wiley and Sons, 1988).
- 233 Murphy DL, Lesch KP, Aulakh CS, Pigott TA. (1991) Serotonin-selective arylpiperazines with neuroendocrine, behavioral, temperature, and cardiovascular effects in humans. *Pharmacol Rev*, 43: 527-552.
- 234 Murphy DL, Mueller EA, Aulakh CS, Bagdy G, Garrick NA. *Serotonin function in neuropsychiatric disorders*. p 257-264 (Macmillan Press, 1989).
- 235 Baumgarten HG, Grozdanovic Z. (1995) Psychopharmacology of central serotonergic systems. *Pharmacopsychiatry*, 28 Suppl 2: 73-79.
- 236 Barnes NM, Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152.
- 237 Filip M, Bader M. (2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*, 61: 761-777.
- 238 Nordquist N, Oreland L. (2010) Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. *Upsala journal of medical sciences*, 115: 2-10.
- 239 Martinowich K, Lu B. (2008) Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacol*, 33: 73-83.
- 240 Siever LJ. (2008) Neurobiology of aggression and violence. *The American journal of psychiatry*, 165: 429-442.
- 241 Waters K. (2010) Serotonin in the sudden infant death syndrome. *Drug News Perspect*, 23: 537-548.
- 242 Singer W. (1993) Neuronal Representations, Assemblies and Temporal Coherence. *Progress in brain research*, 95: 461-474.
- 243 Kirschfeld K. (1996) The temporal-correlation hypothesis. *Trends Neurosci*, 19: 415-416.
- 244 Ghose GM, Freeman RD. (1997) Intracortical connections are not required for oscillatory activity in the visual cortex. *Visual Neurosci*, 14: 963-979.
- 245 Ghose GM, Freeman RD. (1992) Oscillatory Discharge in the Visual-System - Does It Have a Functional-Role. *Journal of neurophysiology*, 68: 1558-1574.
- 246 Neuenschwander S, Singer W. (1996) Long-range synchronization of oscillatory light responses in the cat retina and lateral geniculate nucleus. *Nature*, 379: 728-733.

- 247 Sarter M, Parikh V, Howe WM. (2009) PERSPECTIVES Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci*, 10: 383-U386.
- 248 Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJY, Paladini CA, Phillips PEM, Palmiter RD. (2009) Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *P Natl Acad Sci USA*, 106: 7281-7288.
- 249 Mulligan KA, Tork I. (1988) Serotonergic Innervation of the Cat Cerebral-Cortex. *J Comp Neurol*, 270: 86-110.
- 250 Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gorcs T, Toth K. (1990) Serotonergic Control of the Hippocampus Via Local Inhibitory Interneurons. *P Natl Acad Sci USA*, 87: 8501-8505.
- 251 Wilson MA, Molliver ME. (1991) The Organization of Serotonergic Projections to Cerebral-Cortex in Primates - Regional Distribution of Axon Terminals. *Neuroscience*, 44: 537-553.
- 252 Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF. (2009) Fast Synaptic Subcortical Control of Hippocampal Circuits. *Science*, 326: 449-453.
- 253 Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS. (2007) Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress*, 10: 227-249.
- 254 Fanselow MS, Dong HW. (2010) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65: 7-19.
- 255 Poppenk J, Evensmoen HR, Moscovitch M, Nadel L. (2013) Long-axis specialization of the human hippocampus. *Trends in cognitive sciences*, 17: 230-240.
- 256 Moser E, Moser MB, Andersen P. (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 13: 3916-3925.
- 257 Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK. (2004) Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial

- learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*, 19: 705-712.
- 258 Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuisen HH, Feldon J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28: 273-283.
- 259 Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10825-10830.
- 260 Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN. (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*, 139: 197-213.
- 261 Rudy JW, Matus-Amat P. (2005) The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behavioral neuroscience*, 119: 154-163.
- 262 Berumen LC, Rodriguez A, Mileti R, Garcia-Alcocer G. (2012) Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal*, 2012: 823493.
- 263 Schoemaker H, Langer SZ. (1986) [3H]8-OH-DPAT labels the serotonin transporter in the rat striatum. *Eur J Pharmacol*, 124: 371-373.
- 264 Lesch KP, Mossner R. (1998) Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological psychiatry*, 44: 179-192.
- 265 Sugden K, Tichopad A, Khan N, Craig IW, D'Souza UM. (2009) Genes within the serotonergic system are differentially expressed in human brain. *BMC neuroscience*, 10: 50.
- 266 Oleskevich S, Descarries L, Watkins KC, Seguela P, Daszuta A. (1991) Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience*, 42: 777-791.
- 267 Umbriaco D, Garcia S, Beaulieu C, Descarries L. (1995) Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus*, 5: 605-620.

- 268 Vizi ES, Kiss JP. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 8: 566-607.
- 269 Wang H, Storm DR. (2003) Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 63: 463-468.
- 270 Djavadian RL. (2004) Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64: 189-200.
- 271 Albert PR, Le Francois B, Millar AM. (2011) Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Molecular brain*, 4: 21.
- 272 Bockaert J, Claeyssen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res*, 326: 553-572.
- 273 Staubli U, Otaky N. (1994) Serotonin controls the magnitude of LTP induced by theta bursts via an action on NMDA-receptor-mediated responses. *Brain Res*, 643: 10-16.
- 274 Passani MB, Pugliese AM, Azzurrini M, Corradetti R. (1994) Effects of DAU 6215, a novel 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) antagonist on electrophysiological properties of the rat hippocampus. *Br J Pharmacol*, 112: 695-703.
- 275 Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R. (1994) The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*, 58: 167-182.
- 276 Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D, Palacios JM. (1994) Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology*, 33: 367-386.
- 277 Sari Y, Lefevre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Verge D. (1997) Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT_{1B} receptors in the rat brain. *Brain Res*, 760: 281-286.
- 278 Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D. (1993) Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 347: 569-582.

- 279 Xie Z, Lee SP, O'Dowd BF, George SR. (1999) Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *Febs Lett*, 456: 63-67.
- 280 Boeijinga PH, Boddeke HW. (1993) Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat subicular cortex in vitro: a role for 5-HT_{1B} receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 348: 553-557.
- 281 Mlinar B, Falsini C, Corradetti R. (2003) Pharmacological characterization of 5-HT_{1B} receptor-mediated inhibition of local excitatory synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampus. *Br J Pharmacol*, 138: 71-80.
- 282 Trillat AC, Malagie I, Searce K, Pons D, Anmella MC, Jacquot C, Hen R, Gardier AM. (1997) Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT_{1B} receptors: in vivo microdialysis studies. *J Neurochem*, 69: 2019-2025.
- 283 Malagie I, Trillat AC, Bourin M, Jacquot C, Hen R, Gardier AM. (2001) 5-HT_{1B} Autoreceptors limit the effects of selective serotonin re-uptake inhibitors in mouse hippocampus and frontal cortex. *J Neurochem*, 76: 865-871.
- 284 Herrick-Davis K. (2013) Functional significance of serotonin receptor dimerization. *Exp Brain Res*, 230: 375-386.
- 285 Bloom FE, Morales M. (1998) The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochem Res*, 23: 653-659.
- 286 Morales M, Bloom FE. (1997) The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci*, 17: 3157-3167.
- 287 Penas-Cazorla R, Vilaro MT. (2015) Serotonin 5-HT₄ receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Struct Funct*, 220: 3413-3434.
- 288 Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. (1996) The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia*, 17: 317-326.
- 289 Sperlagh B, Vizi ES. (1991) Effect of presynaptic P₂ receptor stimulation on transmitter release. *J Neurochem*, 56: 1466-1470.

- 290 von Kugelgen I, Koch H,Starke K. (1997) P2-receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Neuropharmacology*, 36: 1221-1227.
- 291 Kuhn DM,Arthur R. (1997) Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: Attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center. *J Neurosci*, 17: 7245-7251.
- 292 Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C, Leprince C, Tauc L,Baux G. (1999) Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience*, 93: 597-603.
- 293 Koren-Schwartz N, Chen-Zion M, Ben-Porat H,Beitner R. (1994) Serotonin-induced decrease in brain ATP, stimulation of brain anaerobic glycolysis and elevation of plasma hemoglobin; the protective action of calmodulin antagonists. *Gen Pharmacol*, 25: 1257-1262.
- 294 Diniz CR, Rodrigues M, Casarotto P, Pereira VS, Crestani CC,Joca SRL. (2016) Antidepressant-like effects of P2 purinergic antagonist PPADS is dependent on serotonergic and noradrenergic integrity. peer-reviewed.
- 295 Heinrich A, Ando RD, Turi G, Rozsa B,Sperlagh B. (2012) K⁺ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br J Pharmacol*, 167: 1003-1020.
- 296 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 Neuropsychoph*, 16: 213-233.
- 297 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.
- 298 Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Dutheil 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. (2016) Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. *Biological psychiatry*, 80: 12-22.

- 299 Otrókocsi L, Kittel A, Sperlagh B. (2017) P2X7 Receptors Drive Spine Synapse Plasticity in the Learned Helplessness Model of Depression. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 20: 813-822.
- 300 Lord B, Aluisio L, Shoblock JR, Neff RA, Varlinskaya EI, Ceusters M, Lovenberg TW, Carruthers N, Bonaventure P, Letavic MA, Deak T, Drinkenburg W, Bhattacharya A. (2014) Pharmacology of a novel central nervous system-penetrant P2X7 antagonist JNJ-42253432. *J Pharmacol Exp Ther*, 351: 628-641.
- 301 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.
- 302 Almasi R, Petho G, Bolcskei K, Szolcsanyi J. (2003) Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol*, 139: 49-58.
- 303 Sokolowska M, Bednarski M, Kwiecien I, Filipek B, Wlodek L. (2004) Bioactivation of nitroglycerin to nitric oxide (NO) and S-nitrosothiols in the rat liver and evaluation of the coexisting hypotensive effect. *Fundam Clin Pharmacol*, 18: 449-456.
- 304 Tassorelli C, Joseph SA. (1995) Systemic Nitroglycerin Induces Fos Immunoreactivity in Brain-Stem and Forebrain Structures of the Rat. *Brain Res*, 682: 167-181.
- 305 Lambert GA, Donaldson C, Boers PM, Zagami AS. (2000) Activation of trigeminovascular neurons by glyceryl trinitrate. *Brain Res*, 887: 203-210.
- 306 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.
- 307 Deisseroth K. (2011) Optogenetics. *Nat Methods*, 8: 26-29.
- 308 Paxinos G, Franklin KB. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition edn, (Academic Press, 2001).
- 309 Balazsa T, Birio J, Gullai N, Ledent C, Sperlagh B. (2008) CB1-cannabinoid receptors are involved in the modulation of non-synaptic [H-3]serotonin release from the rat hippocampus. *Neurochem Int*, 52: 95-102.

- 310 Stujenske JM, Spellman T, Gordon JA. (2015) Modeling the Spatiotemporal Dynamics of Light and Heat Propagation for In Vivo Optogenetics. *Cell reports*, 12: 525-534.
- 311 Bhattacharya A, Wang Q, Ao H, Shoblock JR, Lord B, Aluisio L, Fraser I, Nepomuceno D, Neff RA, Welty N, Lovenberg TW, Bonaventure P, Wickenden AD, Letavic MA. (2013) Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol*, 170: 624-640.
- 312 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. *Molecular neurodegeneration*, 6: 28.
- 313 Jo S, Bean BP. (2011) Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol Pharmacol*, 80: 247-257.
- 314 Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, Leon-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, Lucas JJ, Garrido JJ, Gualix J, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M. (2012) In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging*, 33: 1816-1828.
- 315 Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol*, 58: 82-88.
- 316 Collier HO, James GW, Schneider C. (1966) Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate. *Nature*, 212: 411-412.
- 317 Zhang X, Chen Y, Wang C, Huang LY. (2007) Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 9864-9869.
- 318 Teixeira JM, Oliveira MC, Nociti FH, Jr., Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, Tambeli CH. (2010) Involvement of temporomandibular joint P2X3 and P2X2/3 receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 645: 79-85.
- 319 D'Arco M, Giniatullin R, Simonetti M, Fabbro A, Nair A, Nistri A, Fabbretti E. (2007) Neutralization of nerve growth factor induces plasticity of ATP-sensitive

- P2X3 receptors of nociceptive trigeminal ganglion neurons. *J Neurosci*, 27: 8190-8201.
- 320 Nair A, Simonetti M, Birsa N, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E. (2010) Familial hemiplegic migraine Ca(v)2.1 channel mutation R192Q enhances ATP-gated P2X3 receptor activity of mouse sensory ganglion neurons mediating trigeminal pain. *Mol Pain*, 6: 48.
- 321 Chu YX, Zhang Y, Zhang YQ, Zhao ZQ. (2010) Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. *Brain, behavior, and immunity*, 24: 1176-1189.
- 322 D'Amico M, Samengo I, Navarra P, Tagliatela M, Martire M. (2010) AMPA- and P2X7-receptor-mediated facilitation of [3H]D-aspartate release from nerve terminals isolated from the rat caudal brainstem. *Neurochem Int*, 57: 623-628.
- 323 Able SL, Fish RL, Bye H, Booth L, Logan YR, Nathaniel C, Hayter P, Katugampola SD. (2011) Receptor localization, native tissue binding and ex vivo occupancy for centrally penetrant P2X7 antagonists in the rat. *Br J Pharmacol*, 162: 405-414.
- 324 Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. (2011) Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci*, 12: 570-584.
- 325 Csolle C, Sperlagh B. (2010) Peripheral origin of IL-1beta production in the rodent hippocampus under in vivo systemic bacterial lipopolysaccharide (LPS) challenge and its regulation by P2X(7) receptors. *Journal of neuroimmunology*, 219: 38-46.
- 326 Remy M, Thaler S, Schumann RG, May CA, Fiedorowicz M, Schuettauf F, Gruterich M, Priglinger SG, Nentwich MM, Kampik A, Haritoglou C. (2008) An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *The British journal of ophthalmology*, 92: 1142-1147.
- 327 Wong HE, Qi W, Choi HM, Fernandez EJ, Kwon I. (2011) A safe, blood-brain barrier permeable triphenylmethane dye inhibits amyloid-beta neurotoxicity by generating nontoxic aggregates. *ACS chemical neuroscience*, 2: 645-657.
- 328 Melchior JR, Ferris MJ, Stuber GD, Riddle DR, Jones SR. (2015) Optogenetic versus electrical stimulation of dopamine terminals in the nucleus accumbens reveals local modulation of presynaptic release. *J Neurochem*, 134: 833-844.

- 329 Peck BK, Vanderwolf CH. (1991) Effects of raphe stimulation on hippocampal and neocortical activity and behaviour. *Brain Res*, 568: 244-252.
- 330 Balazsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserep C, Takacs VT, Nyiri G, Goloncser F, Sperlagh B, Freund TF, Haller J. (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *Plos One*, 12: e0181264.
- 331 Campos RC, Parfitt GM, Polese CE, Coutinho-Silva R, Morrone FB, Barros DM. (2014) Pharmacological blockage and P2X7 deletion hinder aversive memories: reversion in an enriched environment. *Neuroscience*, 280: 220-230.
- 332 Chazal G, Ralston HJ, 3rd. (1987) Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J Comp Neurol*, 259: 317-329.
- 333 Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F. (2002) Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain research. Brain research reviews*, 39: 154-180.
- 334 Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol*, 229: 374-392.
- 335 Kaneko T, Akiyama H, Nagatsu I, Mizuno N. (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res*, 507: 151-154.
- 336 Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, 22: 5442-5451.
- 337 De-Miguel FF, Nicholls JG. (2015) Release of chemical transmitters from cell bodies and dendrites of nerve cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370.
- 338 de Kock CP, Cornelisse LN, Burnashev N, Lodder JC, Timmerman AJ, Couey JJ, Mansvelder HD, Brussaard AB. (2006) NMDA receptors trigger neurosecretion of 5-HT within dorsal raphe nucleus of the rat in the absence of action potential firing. *The Journal of physiology*, 577: 891-905.

- 339 Harsing LG, Jr. (2006) The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Curr Neuropharmacol*, 4: 313-339.
- 340 Vizi ES, Fekete A, Karoly R, Mike A. (2010) Non-synaptic receptors and transporters involved in brain functions and targets of drug treatment. *Br J Pharmacol*, 160: 785-809.
- 341 Schneider F, Gradmann D, Hegemann P. (2013) Ion selectivity and competition in channelrhodopsins. *Biophys J*, 105: 91-100.
- 342 Vizi ES. (2000) Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 52: 63-89.
- 343 Maura G, Roccatagliata E, Raiteri M. (1986) Serotonin autoreceptor in rat hippocampus: pharmacological characterization as a subtype of the 5-HT1 receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 334: 323-326.
- 344 Maura G, Thellung S, Andrioli GC, Ruelle A, Raiteri M. (1993) Release-regulating serotonin 5-HT1D autoreceptors in human cerebral cortex. *J Neurochem*, 60: 1179-1182.
- 345 Maejima T, Maseck OA, Mark MD, Herlitze S. (2013) Modulation of firing and synaptic transmission of serotonergic neurons by intrinsic G protein-coupled receptors and ion channels. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7: 40.
- 346 Pineyro G, Castanon N, Hen R, Blier P. (1995) Regulation of [3H]5-HT release in raphe, frontal cortex and hippocampus of 5-HT1B knock-out mice. *Neuroreport*, 7: 353-359.
- 347 Hopwood SE, Stamford JA. (2001) Multiple 5-HT(1) autoreceptor subtypes govern serotonin release in dorsal and median raphe nuclei. *Neuropharmacology*, 40: 508-519.
- 348 Richer M, Hen R, Blier P. (2002) Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol*, 435: 195-203.

11 Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Göloncsér F, Baranyi M, Balázsfi D, Demeter K, Haller J, Freund TFF, Zelena D, Sperlág B. (2017) Regulation of hippocampal 5-HT release by P2X7 receptors in response to optogenetic stimulation of median raphe terminals of mice. *Front Mol Neurosci.* 2017 Oct 12;10:325. doi: 10.3389/fnmol.2017.00325. eCollection 2017.

Göloncsér F, Sperlág B. (2014) Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *J Headache Pain.* 2014 May 1;15:24. doi: 10.1186/1129-2377-15-24.

Egyéb közlemények:

Balázsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserép C, Takács VT, Nyíri G, Göloncsér F, Sperlág B, Freund TF, Haller J. (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *PLoS One.* 2017 Jul 14;12(7):e0181264. doi: 10.1371/journal.pone.0181264.

Bekő K, Koványi B, Göloncsér F, Horváth G, Dénes Á, Környei Z, Botz B, Helyes Z, Müller CE, Sperlág B. (2017) Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J Thromb Haemost.* 2017 Mar 27. doi: 10.1111/jth.13684.

Baranyi M, Porceddu PF, Göloncsér F, Kulcsár S, Otrókoci L, Kittel Á, Pinna A, Frau L, Huleatt PB, Khoo ML, Chai CL, Dunkel P, Mátyus P, Morelli M, Sperlág B. (2016) Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2016 Jan 13;11:6. doi: 10.1186/s13024-015-0067-y.

Huleatt PB, Khoo ML, Chua YY, Tan TW, Liew RS, Balogh B, Deme R, Göloncsér F, Magyar K, Sheela DP, Ho HK, Sperlág B, Mátyus P, Chai CL. (2015) Novel arylalkenylpropargylamines as neuroprotective, potent, and selective monoamine oxidase

B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease. *J Med Chem.* 2015 Feb 12;58(3):1400-19. doi: 10.1021/jm501722s. Epub 2015 Jan 28.

Horváth G, Gölöncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, Koványi B, Máté Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Müller CE, Von Kügelgen I, Sperlágh B. (2014) Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis.* 2014 Oct;70:162-78. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.011. Epub 2014 Jun 25.

Csölle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Gölöncsér F, Illes P, Papp E, Vizi ES, Sperlágh B. (2013) Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One.* 2013 Jun 21;8(6):e66547. doi: 10.1371/journal.pone.0066547. Print 2013.

Sperlagh B, Csölle C, Ando RD, Goloncsér F, Kittel A, Baranyi M. (2012) The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2012 Dec;14(4):231-8. Review.

Csölle C, Andó RD, Kittel Á, Gölöncsér F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Németh T, Mócsai A, Sperlágh 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.* 2013 Feb;16(1):213-33. doi: 10.1017/S1461145711001933. Epub 2012 Jan 16.

Kováts N, Ács A, Gölöncsér F, Barabás A. (2011) Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signal Behav.* 2011 Jun;6(6):777-9. Epub 2011 Jun 1.

Hracskó Z, Baranyi M, Csölle C, Gölöncsér F, Madarász E, Kittel A, Sperlágh B. (2011) Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2011 May 4;6:28. doi: 10.1186/1750-1326-6-28.

12 Köszönetnyilvánítás

Elsőként és elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek és tudományos mentoromnak, Dr. Sperlág Beáta professzor asszonynak segítségét, aki kezdetben irányt mutatott tudományos érdeklődésemnek, nagymértékben hozzájárult doktori munkám közvetlen elméleti és gyakorlati irányításához, továbbá értékes tanácsait, amelyek nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni közvetlen munkatársamnak, Baranyi Máriának a HPLC kísérletek elvégzéséért, aki felbecsülhetetlen mértékben járult hozzá kutatásaim eredményeihez.

Ugyancsak szeretnék köszönetet mondani Dr. Kittel Ágnesnek a hasznos útmutatásaiért, amelyek az immunhisztokémiai kísérletek kivitelezéséhez nyújtottak elengedhetetlen segítséget.

Szeretném kifejezni köszönetemet Borza Mónikának kitűnő asszisztensi munkájáért.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Zelena Dórának és Balázsfi Diának, akik munkája nagymértékben segítette kutatásainkat és jelentős hozzájárulásukat munkámhoz, a vírus beadás kivitelezéséért, az optogenetikai magatartástesztek és *in vivo* mikrodialízis kísérletek elvégzéséért.

Hálás vagyok Demeter Kornélnak az optogenetikai kísérletekben a szövettani ellenőrzések elvégzéséért.

Köszönettel tartozom belsőbírálómnak, Dr. Aliczki Manónak a disszertáció elkészítésében nyújtott értékes javaslataiért és tanácsaiért.

Ezen kívül köszönettel tartozom a KOKI valamennyi dolgozójának, legfőképpen a Gyógyszerkutató Osztály dolgozóinak.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni szüleimnek és páromnak, hogy mindvégig támogattak.

13 Függelék

További közlemények, amelyek a Könyvtári Adatlapon nem szerepelnek:

Stephan G, Huang L, Tang Y, Vilotti S, Fabbretti E, Yu Y, Nörenberg W, Franke H, Gölöncsér F, Sperlágh B, Dopychai A, Hausmann R, Schmalzing G, Rubini P, Illes P. (2018) The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. *Nat Commun.* 2018 Apr 10;9(1):1354. doi: 10.1038/s41467-018-03728-5.

Beamer E, Gölöncsér F, Horváth G, Bekő K, Otrókocsi L, Koványi B, Sperlágh B. (2016) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology.* 2016 May;104:94-104. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.019. Epub 2015 Sep 16. Review.

Kováts N, Gölöncsér F, Ács A, Razaey M. (2010) Quantification of the antibacterial properties of *Artemisia absinthium*, *A. vulgaris*, *Chrysanthemum leucanthemum* and *Achillea millefolium* using the *Vibrio fischeri* bacterial bioassay. *Acta Bot Hung.* 2009 Sep;52(1-2). doi: 10.1556/ABot.52.2010.1-2.e2