

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

2599.

HANUSKA ADRIENN

**Experimentális és klinikai farmakológia
című program**

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Köles László, egyetemi docens

Az NMDA receptorok modulációjának vizsgálata a percepció és a kognitív funkciók zavarában

Doktori értekezés

Dr. Hanuska Adrienn

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kozsurek Márk, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Mike Árpád, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lenkey Nóra, Ph.D., vendégkutató
(University of Oslo)

Budapest
2021

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1.1 Általános bevezetés	7
1.1.1 A retina és annak ganglionsejtjei.....	7
1.1.2 Kognitív funkciók és a prefrontális kéreg (PFC).....	9
1.1.3 A fájdalom percepció centrális komponensei, a PFC szerepe és az opioid tolerancia	11
1.1.4 A neurodegeneráció	12
1.2 A glutamáterg rendszer.....	13
1.2.1 A glutamát receptorai	14
1.2.1.1 A metabotrop glutamátreceptorok.....	14
1.2.1.2 Az ionotrop glutamátreceptorok.....	15
1.2.1.2.1 Az NMDA receptorok	15
1.2.1.2.1.1 Az NMDA receptorok fiziológiája és patofiziológiája.....	17
1.2.1.2.1.2 Az NMDA receptorok modulációja.....	18
1.2.1.3 Az AMPA receptorok.....	19
1.2.1.4 A kainát receptorok	20
1.2.2 A glutamáttranszporterek	21
1.3 A glicinerg rendszer.....	22
1.3.1 A glicin receptor	22
1.3.2 A glicin transzporterek	23
1.4 A glutamáterg és glicinerg rendszer fiziológiai és patofiziológiai szerepe	26
1.5 Az agyi renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS).....	27
2. Célkitűzések	31
3. Módszerek	32
3.1 Kísérleti állatok	32
3.2 Alkalmazott vegyületek.....	32
3.3 Kísérletek.....	33
3.3.1 Szuperfúziós technika.....	33
3.3.1.1 Preparálás	33

3.3.1.2	Oxigén és glükóz megvonás (OGD) indukálta [³ H]glicin felszabadulás patkány retinában	34
3.3.1.3	[³ H]glicin kiáramlás meghatározása.....	35
3.3.1.4	Az OGD hatásának vizsgálata a [³ H]glicin felvételre és kiáramlásra patkány retinában.....	35
3.3.2	Immunhisztokémiai jelölés patkány retinában	36
3.3.3	Patch-clamp technika.....	36
3.3.3.1	Preparálás	36
3.3.3.2	Teljes sejt (whole-cell) patch-clamp felvétel	37
3.3.3.3	NMDA indukálta ionáramok mérése patch-clamp technikával patkány PFC-ben	38
3.3.3.4	Az opioid vegyületek hatása a glutamáterg neurotranszmisszióra spontán excitatórikus posztzinaptikus áramok (sEPSC) mérésével.....	39
3.4	Statisztika	40
4.	Eredmények	41
4.1	Glicin felszabadulás vizsgálata patkány retinában	41
4.1.1	OGD-indukálta [³ H]glicin felszabadulás patkány retinából.....	41
4.1.2	OGD hatása a [³ H]glicin felvételre és kiáramlásra patkány retinában	42
4.1.3	OGD-indukálta [³ H]glicin felszabadulás külső Ca ²⁺ -függése patkány retinában.....	43
4.1.4	A szarkozin hatása a [³ H]glicin felszabadulásra patkány retinában	44
4.1.5	A nem transzportálódó GlyT-1 inhibitorok hatása OGD-indukálta [³ H]glicin felszabadulásra patkány retinában.....	44
4.1.6	Az ouabain hatása a [³ H]glicin felszabadulásra patkány retinában.....	46
4.1.7	A rotenon hatása a [³ H]glicin felszabadulásra patkány retinában	47
4.1.8	OGD hatása a [³ H]glutamát felszabadulásra patkány retinában.....	47
4.2	A GlyT-1 immunhisztokémiai jelölése a retina sejtjeiben	48
4.3	Ang II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein.....	49
4.3.1	Az Ang II különböző koncentrációinak (0,003-3 μM) hatása az NMDA áramokra.....	49
4.3.2	Angiotenzin-receptor antagonisták hatása az Ang II NMDA áramokat potenciózó hatására.....	51

4.3.3	A sejtek szinaptikus izolációjának hatása az Ang II NMDA áramokat potencírozó hatására.....	51
4.3.4	Dopamin-receptor antagonisták hatása az Ang II NMDA áramokat potencírozó hatására.....	52
4.4	Az opioid vegyületek hatása a spontán excitatórikus posztzinaptikus áramokra (sEPSC) patkány PFC V. rétegének piramissejtjein.....	53
5.	Megbeszélés.....	55
5.1	A [³ H]glicin felszabadulás és a GlyT gátlók hatásának vizsgálata patkány retinából	55
5.1.1	Az OGD hatása a [³ H]glicin felszabadulásra patkány retinából.....	55
5.1.2	Az IC Na ⁺ szint változása: [³ H]glicin felszabadulásra gyakorolt hatás patkány retinában	57
5.1.3	A GlyT-1 inhibitorok terápiás felhasználása ischaemiás retinadegenerációban.....	58
5.2	Az Ang II hatásának vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben	60
5.3	Opioid vegyületek hatásának vizsgálata a glutamáterg neurotranszmisszióra patkány PFC-ben.....	64
6.	Következtetések.....	66
7.	Összefoglalás	68
8.	Summary.....	69
9.	Irodalomjegyzék	70
10.	Saját publikációk jegyzéke	89
11.	Köszönetnyilvánítás	90

Rövidítések jegyzéke

2-DG:	2-deoxi-D-glukóz
ACE:	angiotenzin-konvertáló enzim
ACEi:	ACE-inhibitor
Ach:	acetilkolin
ACPPB/Merck 13-h:	2-amino-6-kloro-N-(1-[4-fenil-1-(propán-1-szulfonil)piperidin-4-il]etil)benzamid)
aCSF:	mesterséges cerebrospinális folyadék
Ang (1-7):	angiotenzin (1-7)
Ang (1-9):	angiotenzin (1-9)
Ang I:	angiotenzin I
Ang II:	angiotenzin II
Ang IV:	angiotenzin IV
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav
AP-A:	aminopeptidáz A
AP-N:	aminopeptidáz N
ARB:	angiotenzin-receptor blokkoló
AT1R:	1-es típusú angiotenzin-receptor
AT2R:	2-es típusú angiotenzin-receptor
AT4R:	Ang IV receptor
ATP:	adenozin-trifoszfát

BDNF:	idegi növekedési faktor
CaMKII:	kalcium/kalmodulin függő protein kináz II
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
DC:	dekarboxiláz
DRD1, DRD2:	dopamin-1; -2 receptor
EC:	extracelluláris
EAAT:	excitátoros aminosav transzporter
EGTA:	bis-aminoetil-glikoléter-tetraecetsav
EPSP:	excitátorikus posztszinaptikus potenciál
ERK 1/2:	extracelluláris szignál-regulált kináz1/2
GABA:	γ -aminovajsav
GFAP:	gliális fibrilláris savas fehérje
GlyT-1; -2:	1-es; 2-es típusú glicin transzporter
IC:	intracelluláris
IPSC:	inhibitoros posztszinaptikus áram
IRAP:	inzulin-regulált aminopeptidáz
KIR:	központi idegrendszer
LDP:	hosszú távú depresszió
LTP:	hosszú távú potenciáció
mGluR:	metabotróp glutamát receptor
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NO:	nitrogén-monoxid

NOS:	nitrogén-monoxid szintáz
NF- κ B:	nukleáris faktor-kappa B
NFPS:	N-[3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil]szarkozin
OGD:	oxigén és glukóz megvonás
PACAP:	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PBS:	foszfátpufferes sóoldat
PFC:	prefrontális kéreg
PKC:	protein kináz C
RAAS:	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
sEPSC:	spontán excitatórikus posztzinaptikus áram
SzV-2248:	N-[3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil]-N-metil (trifluorometil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-amin
TARP:	transzmembrán AMPA receptor regulációs proteinek
TBOA:	D,L-treo- β -benziloxiaszpartát
TTX:	tetrodotoxin
vGLUT:	vezikuláris glutamát transzporter

1 Bevezetés

1.1 Általános bevezetés

A neuronális diszfunkciók számos központi idegrendszeri (és egyéb) kórkép patomechanizmusában jelentős szerepet játszó elváltozások. Az idegrendszeri működések egyik alapvető funkcionális komponense a glutamáterg transzmisszió. Kutatásaim során a glutamáterg rendszer egyik legjelentősebb tényezőjét, az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú ionotrop glutamát receptort moduláló mechanizmusok szabályozását tanulmányoztam.

Dolgozatomban három tématerületen foglalom össze azon kutatásaimat, amelyek arra irányultak, hogy pontosabb adatokhoz jussunk az NMDA receptor funkció finomhangolásának a lehetőségeiről, amely új utakat nyithat meg, és új adatokat szolgáltat a terápiás lehetőségek fejlesztéséhez különböző kórállapotokban.

A továbbiakban röviden bemutatom a három tématerületet, azokat a kórállapotokat, amelyekben megfigyeléseimnek jelentősége lehet, illetve azokat az anatómiai/funkcionális struktúrákat, amelyeken kísérleteinket végeztük. Kitérek a neurodegeneráció folyamatára, amely számos patológiai eltérés hátterében áll. Ezután ismertetem a glutamáterg rendszer elemeit, különös hangsúlyt fektetve az NMDA típusú glutamát receptorra, illetve az annak működését szabályozó tényezőkre.

1.1.1 A retina és annak ganglionsejtjei

A retina a szem belső burkát alkotó, 0,5 mm vastag, átlátszó hártya (1). Fejlődéstanilag az elülső agyhólyagból származik. Két részre osztható, a belső 9 réteg a szemkehely belső részéből, a külső pigmenthám pedig a szemkehely külső részéből fejlődik. A retina hátsó kétharmada fényérzékeny idegszervként funkcionál (pars optica retinae), az elülső harmadnál, az ora serrata mentén fényre érzéketlen, egyrétegű köbhámmá vékonyodik (pars ceca retinae) és hátulról beborítja a sugártestet és a szivárványhártyát. A retina fényérzékeny területe tíz rétegre tagolódik (1. pigmenthám; 2. csapok és pálcikák rétege / fotoreceptor réteg; 3. külső határhártya; 4. külső nukleáris réteg; 5. külső plexiform

réteg; 6. belső nukleáris réteg; 7. belső plexiform réteg; 8. ganglionsejtréteg; 9. idegrostréteg; 10. belső határhártya), két kiemelt területe a vakfolt és a sárgafolt, ahol a szövettani felépítés is eltér. A vakfolt területén lép ki a ganglionsejtek axonjaiból összeszedődő látóideg a szemgolyóból, ezen a területen hiányzik az idegszövet. A sárgafolt középső része a látógödör (fovea centralis), az éleslátás színhelye, ahol csak csapok találhatóak és a fény közvetlenül érkezik a fotoreceptorokra. A fényingerek feldolgozása több szinten történik, amíg a fényinger a fotoreceptoroktól a ganglionsejtekig eléri, számos interneuronra tevődik át (bipoláris, horizontális, amakrin sejtek). Ezeken a szinteken a fotoreceptorokból érkező egységes jel átalakulhat, előjelváltó és előjelmegeőrző kapcsolódásokat, ON és OFF pályákat különböztetünk meg.

A retinát felépítő sejtek közül az oxigén és tápanyaghiányos állapotokra leginkább a ganglionsejtek és a fotoreceptorok érzékenyek (2). Hipoxia hatására megnő a Ca^{2+} beáramlás az NMDA receptorokon keresztül, ami az excitotoxicitás révén a sejtek apoptózisához vezethet. A retina neuronális hálózatában az NMDA receptorok eloszlása nem egyenletes, a ganglionsejtrétegben különösen nagy sűrűségben helyezkednek el, így a ganglionsejtek potenciális célpontjai lehetnek a neurotoxikus hatásoknak ischaemiás körülmények között (3, 4). Az NMDA receptor koagonista glicin koncentrációját a szinaptikus részben a glicin transzporterek szabályozzák. A központi idegrendszerben (KIR) az NMDA receptorok az 1-es típusú glicin transzporterek (GlyT-1) közelében helyezkednek el, ez a kapcsolat a retinában is megfigyelhető (5, 6). GlyT-1 deficiens egereken végzett vizsgálatok bizonyítják, hogy az NMDA receptorok glicin_B kötőhelyének szaturációját, és ezáltal a retina glutamáterg transzmisszióját, a GlyT-1 határozza meg (7).

Az ischaemia okozta retinakárosodások, többek között, a zöldhályog talaján kialakuló, a hipertónia és cukorbetegség okozta retinopátia, valamint a makuladegeneráció, megfelelő kezelés nélkül vaksághoz vezetnek. A neurodegeneratív folyamatok kialakulásában az NMDA receptorok túlzott aktivációjának jelentős szerepe van, így ennek a csökkentése lenne kívánatos a neuroprotekciónak elérése céljából (8). Az eddigi eredmények alapján, azonban, az NMDA receptorok direkt gátlása vagy a glutamáterg transzmisszió csökkentése a terápiás felhasználásban nem vált be vagy elfogadhatatlan mellékhatásokat

okozott. Így az ischaemiás retinakárosodások terápiája, a később említett neurodegeneratív betegségekéhez hasonlóan, jelenleg is sürgető kutatások tárgyát képezi.

1.1.2 Kognitív funkciók és a prefrontális kéreg (PFC)

A magasabb rendű kognitív funkciók olyan percepciók, tanulási fogalmakat, képességeket foglalnak magukba, amelyek jelzetten az állatvilágban is megtalálhatók, de a humán élettani folyamatokban minőségileg komplexebb, összetettebb, magasabb szintet képviselnek, és valószínűleg az emberré válás, a gondolkodás kulcstényezői. Több anatómiai struktúra is szerepet játszik ezekben a folyamatokban, közülük az egyik kiemelkedő a PFC, annak is az V. rétegében található piramis sejtek.

A PFC a homloklebenyben elhelyezkedő struktúra, melynek legfőbb szerepe a végrehajtó funkciókban, a viselkedésben, a döntéshozatalban, a figyelemben, a munkamemóriában, a kognitív flexibilitásban és a fájdalom megélésében van (9, 10). A humán PFC az egyéb emlősökéhez képest sokkal fejlettebb, komplexebb és nagyobb anatómiai egység (11). A neuroanatómiai kapcsolatok alapján két fő részre, a mediális és laterális PFC-re osztható, illetve az utóbbinak ventrális és dorzális alegységét különböztetik meg (9). A mediális PFC reciprokális összeköttetésben van a talamusszal, az amigdálával, a hippokampuszal, illetve a magasabbrendű percepcióért felelős temporális területekkel (12). Szerkezetileg nem különbözik a kéreg többi területétől, hat rétegből áll, a domináns sejtípust, a kérgi neuronok nagyjából 75%-át, a piramis sejtek alkotják (13). Az egyes rétegekben elhelyezkedő piramis sejtek különböző agyterületekkel vannak összeköttetésben (13, 14). A PFC legfőbb kimenő projekciói az V. rétegben található piramis sejtekből indulnak egyéb kérgi területek, az agytörzs és a gerincvelő felé, de összeköttetésben vannak a II/III. rétegben található piramis sejtekkel is (14, 15). Az V. rétegében található piramis sejtek leginkább glutamaterg, dopaminerg és γ -aminovajsavat tartalmazó (GABA) szinapszisokon keresztül kapnak bemenő információkat az agy egyéb területeiről, de kolinerg, purinerg és szerotoninerg inputok is befolyásolják a működésüket, a kimenő jelet a glutamát közvetíti, mely NMDA receptorokon keresztül hatva alapvető szerepet játszik a helyes kognitív működésben (16-18). A mediális PFC és az itt elhelyezkedő NMDA receptorok, valamint a jelátviteli rendszer károsodása neurokognitív, -

degeneratív kórképekhez és egyéb mentális betegségekhez, pl. szkizofréniához, epilepsziához vezethetnek, de a fájdalom krónikussá válásában is szerepet játszhatnak (19).

A kognitív funkciók zavarai, elsősorban a kognitív hanyatlás, társadalmunk egyik legfőbb és legsürgetőbb egészségügyi problémáját képezik. A Mentális Betegségek Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyvének (DSM-5) meghatározása szerint a neurokognitív kórképek alatt delíriumról, enyhe és súlyos kognitív károsodásról beszélhetünk (20). Az enyhe kognitív károsodás során a legfőbb funkciók, a tanulás, az emlékezés, a megismerés, a figyelem, a problémamegoldó képesség kismértékű károsodását észlelhetjük. A súlyos kognitív károsodás, maga a demencia, a kognitív funkciók nagymértékű hanyatlását jelenti, jelentős szellemi károsodással, a mindennapi normális életviteli funkciók ellehetetlenülésével.

2019-ben több, mint 50 millió ember szenvedett demenciában világszerte, ez a szám 2050-re elérheti a 152 millió főt (21). Ugyan fiatal korban is előfordulhat, de a demencia főleg az időseket érinti. Míg 65 éves kor felett a betegség prevalenciája globálisan körülbelül 7%, és ez az érték nagyjából 5 évente duplázódik (22), addig a 80 év felettieknek már 25-30%-a szenved demenciában (23). Becslések szerint a következő 30 évben a 65 év felettiek száma megkétszereződik, eléri az 1,5 milliárd főt, a 80 év felettiek száma 2050-re pedig fél milliárd főre becsülhető (24). Az enyhe kognitív károsodásban szenvedők nagyjából felénél alakul ki 5 éven belül a demencia (25). A demencia nem csak egyéni probléma, súlyos mértékben érinti a beteg családi környezetét, a társadalmat, illetve jelentős gazdasági terhet jelent. Aluldiagnosztizált kórkép, a legtöbb esetben már a késői, befolyásolhatatlan stádiumban kerül látótérbe a beteg, így jelenleg a prevenció lenne a legfőbb beavatkozási terület. Előregedő társadalmunkban az egyelőre limitált terápiás lehetőségekkel bíró neurodegeneratív betegségek és a demencia vállhatnak a legnagyobb egészségügyi és szociális problémává (26).

A kognitív hanyatlás és a demencia kialakulásához sokféle rizikótényező és kórkép járul hozzá. Legfontosabbak az életkor, a genetikai faktorok és a kardiovaszkuláris rizikótényezők (22). A genetikai faktorok közül az Apolipoprotein E ϵ 4 allél hordozása jelentősen növeli a rizikót (27, 28). A szív- és érrendszeri betegségek, mint például a hipertónia, az ischaemiás szívbetegség, a hiperlipidaemia, a cukorbetegség kialakulása

befolyásolható, megelőzhető lehet a fizikai inaktivitás, az elhízás, a dohányzás, az alkoholfogyasztás, az egészségtelen életmód megváltoztatásával. Elősegítheti a demencia kialakulását a szociális elszigetelődés, a szellemi inaktivitás, az alacsony iskolázottság is, és az ezek következtében kialakuló depresszió.

A kognitív károsodások háttérében leggyakrabban a neurodegeneratív betegségek, ezek közül is az esetek 60-70%-ban az Alzheimer-kór áll, de szintén okozhatja a Lewy testes demencia, a Parkinson-kór, a Huntington-kór, az amiotrófiás laterálszklerózis, szklerózis multiplex, prionbetegségek, illetve ischaemiás károsodás, ami kialakulhat trauma, agyi infarktus vagy epilepszia következtében. Szintén kognitív deficithez vezethet számos, egyéb mentális betegség, mint a szkizofrénia és az affektív kórképek, valamint a KIR-t is érintő, metabolikus, autoimmun és fertőző betegségek, neoplazmák kialakulása, toxikus károsodás és vitaminhiány is. A KIR-i neurodegeneratív betegségek közé nem csak kifejezetten az agyi diszfunkciókat okozó kórképek tartoznak, hanem, a fentebb említett, fejlődéstanilag szintén a KIR részeként említendő, retina betegségei is.

1.1.3 A fájdalom percepció centrális komponensei, a PFC szerepe és az opioid tolerancia

A különböző betegségek, állapotok talaján kialakuló fájdalom az életminőség jelentős rontásával súlyos, globális problémát okoz. A fájdalomnak három fő formáját különböztethetjük meg, az akut, nociceptív fájdalmat, a gyulladásszerű fájdalmat és a krónikus, idegszövet károsodásával járó neuropátiás fájdalmat (29). A felszálló fájdalomérző pályák először a gerincvelő hátsó szarvában, majd a talamuszban kapcsolódnak át és érik el a fájdalomérzés elsődleges központját, a gyrus postcentralist. A fájdalom megélésében és emocionális feldolgozásában a mediális PFC-nek kitüntetett szerepe van (30). Számos kérgi összeköttetése, kifejezetten a periakveduktális szürkeállománnyal való kapcsolata miatt részt vesz antinociceptív folyamatokban, de a fájdalom krónikussá válásban is szerepe van (31, 10). A neurodegeneratív folyamatok révén kialakuló neuropátiás fájdalom mechanizmusában a glutamáterg transzmisszió és az NMDA receptorok túlzott aktivációja is részt vesznek (31). A neuropátiás fájdalom nehezen uralható, egyéb terápiákra (antiepileptikumok, triciklusos antidepresszánsok,

szerotonin-noradrenalin visszavétel gátlók, topikális szerek) nem reagáló esetekben major analgetikum adása is szóbajön (32).

Az opioid fájdalomcsillapítók terápiás felhasználását a hosszútávú és ismételt adagoláskor észlelt, analgetikus hatásukhoz kialakuló, tolerancia nagyban limitálja. Ez kifejezetten igaz az arany standardként számontartott és legszéleskörűbben alkalmazott morfinra (33). A tolerancia kifejlődésében számos, eddig még nem teljesen tisztázott mechanizmus, mint pl. a receptor deszenzitizáció, internalizáció, dimerizáció mellett a mediális PFC és az itt található NMDA receptorok túlzott aktivációja is szerepet játszhatnak (34-37). A μ -opioid-receptor aktivációja protein kináz C enzimen (PKC) keresztül foszforilálja az NMDA receptorokat, amelyek megnyílásának hatására megnövekszik az intracelluláris (IC) Ca^{2+} koncentráció és ezáltal háromféle Ca^{2+} -függő enzimatis kaskád aktiválódik: a PKC, a kalcium/kalmodulin függő protein kináz II (CaMKII) és a nitrogén-monoxid szintáz (NOS), melyek az opioid tolerancia kifejlődését segítik elő (38). Az előbb említett megfigyeléseket alátámasztja, hogy az NMDA receptor antagonisták csökkenteni tudják a tolerancia kialakulását (39). A jelenleg terápiában alkalmazott opioid hatóanyagok használatát korlátozza a tolerancia kialakulása, így szükséges, új, kisebb tolerancia kialakítására képes opioid vegyületek kifejlesztése.

1.1.4 A neurodegeneráció

A neurodegeneráció során az idegszövet progresszív módon károsodik, sejthalál következhet be. Tekintettel arra, hogy az idegszövet megújulásra, regenerációra képtelen, a folyamat irreverzibilis. Attól függően, hogy a központi idegrendszer mely része érintett különböző funkciók károsodhatnak, így például a gondolkodás, a kognitív folyamatok, a mozgáskoordináció, viselkedés- és személyiségváltozás alakulhat ki, látás-, hallásvesztés léphet fel. A szomatoszenzoros rendszert érintve a nehezen befolyásolható neuropátiás fájdalom kialakulásában és fennállásában is alapvető szerepet játszik. Azonban ezen tünetek és a különböző betegségek patomechanizmusa nem határolódik el élesen egymástól. A neurodegeneratív betegségek kialakulásában sokféle tényező játszik szerepet. Genetikai mutációk mellett szerepe lehet a mitokondriális károsodásnak, az

oxidatív stressznek, a károsodott helyreállító funkcióknak, az excitotoxicitásnak, illetve jellegzetes a kóros intra- és extracelluláris fehérjeaggregátumok kialakulása (40, 41).

A kognitív funkciók és a neuroprotektív mechanizmusok helyes működéséhez szükséges idegrendszeri folyamatok komplex jelátviteli rendszeréből kiemelkedő jelentőségűek az NMDA receptorok, a glutamáterg és glicinerg rendszer. Károsodásuk, alul- vagy túlműködésük jelentős szerepet játszik számos patológiás állapot hátterében. Így pl. a szkizofrénia, az epilepszia és számos neurodegeneratív betegség, valamint a nehezen uralkodható neuropátiás fájdalom hátterében is az NMDA receptorok túlaktivációja miatt létrejövő excitotoxicitás állhat. Az említett betegségek kezelésében, megelőzésében, az NMDA receptoroknak, mint terápiás célpontoknak, a befolyásolása jelenleg sem megoldott, mivel sem a nagymértékű serkentés, sem a gátlás nem kívánatos hatás. Azonban mind a pozitív és negatív modulációk finom összehangolása, az egyensúlyi állapot helyrehozása, jelentősen javíthatja a kognitív funkciókat, befolyással lehet a neurodegeneráció folyamatára.

A következőkben az NMDA receptorok, a glutamáterg és a glicinerg rendszer, illetve az agyi renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) jelentőségét, szerepét szeretném bemutatni a kognitív zavarok és a neurodegeneráció patomechanizmusában, a retina patológiáját érintő kérdésekben, a neuropátiás fájdalmak kezelésére irányuló kutatásokban, illetve összességében beavatkozási és terápiás lehetőségeket feltárni a neurotoxikus folyamatok megelőzésére.

1.2 A glutamáterg rendszer

A klasszikus neurotranszmitterek közé tartozó glutamát a KIR legfőbb excitátoros neurotranszmittere (42). A gerincesek KIR-ben található szinapszisok 40%-a glutamáterg (43). Pre- és posztzinaptikus receptorain hatva fontos szerepet tölt be a szinaptikus plaszticitás, a memória és a tanulás terén, illetve kognitív, emocionális, endokrin és viscerális funkciókat is irányít (17). A glutamáterg rendszer károsodása kognitív zavarokhoz és neurodegeneratív kórképekhez vezethet.

A glutamát a vér-agy gáton nem jut át, szintézise az agyban történik (44). A szintézis legfőbb útjai az asztrocitákban keletkező glutamin dezamidálása és az α -ketoglutarát transzaminálása (45). A szintézist követően a glutamát szinaptikus vezikulákban raktározódik, ahová egy glutamát-transzporterrel keresztül jut be, protonpumpa által fenntartott elektrokémiai potenciál terhére (46). A vezikulákból, megfelelő stimulusra, Ca^{2+} beáramlás hatására, exocitózissal szabadul fel a szinaptikus részbe. A glutamát ezt követően a pre- és posztzinaptikus receptoraihoz köt, eldiffundál az extraszinaptikus térbe, illetve glutamát-transzporterekkel keresztül visszavevődik a preszinaptikus sejtekbe. Patológias körülmények között a glutamát a fordított működésű glutamát-transzporterekkel keresztül is kikerülhet a szinaptikus részbe (47).

1.2.1 A glutamát receptorai

A glutamát a szinaptikus részbe kerülve metabotrop és ionotrop receptorokhoz kötődik.

1.2.1.1 A metabotrop glutamátreceptorok

A glutamát G-fehérjéhez kötött metabotrop receptorainak (mGluR) 8 szubtípusa van, amelyek további 3 csoportba oszthatóak. Az I. csoportba a mGluR1 és mGluR5 Gq-fehérjéhez kapcsolt, a II. csoportba az mGluR2 és mGluR3, a III. csoportba mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8 Gi/o-fehérjéhez kapcsolt receptorok tartoznak (48). Pre- és posztzinaptikusan is elhelyezkedhetnek auto- és heteroreceptorként egyaránt. A KIR-ben legnagyobb mennyiségben a hippocampusban, a cerebellumban és kéregben találhatóak, de előfordulnak a periférián is (49). Felépítésüket tekintve hét transzmembrán doménből, a ligandkötőhelyet tartalmazó extracelluláris N-terminálisból és az intracelluláris C-terminálisból állnak. A főleg posztzinaptikus elhelyezkedésű mGluR1 és mGluR5 az NMDA receptorok aktivitását és ezáltal az excitotoxicitást fokozhatják, ellentétben a II. és III. csoportba tartozó receptorokkal, amelyek neuroprotektív hatással bírnak (50). A glutamáterg rendszeren kívül befolyásolják a dopaminerg és adrenerg rendszer működését is.

1.2.1.2 Az ionotrop glutamátreceptorok

Az ionotrop glutamátreceptorokat a szintetikus agonista ligandok iránti érzékenységük alapján nevezték el (51).

1.2.1.2.1 Az NMDA receptorok

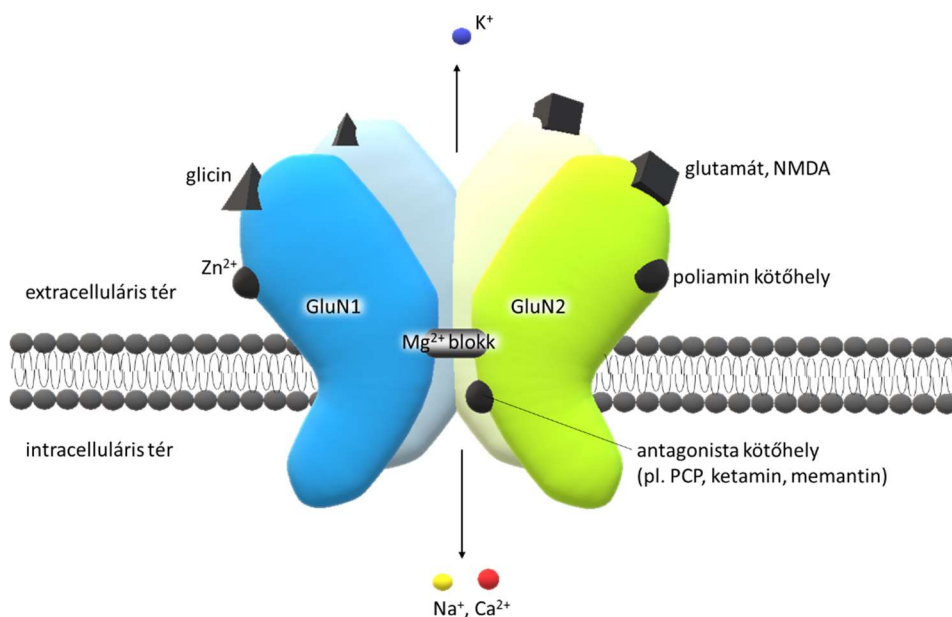
Az NMDA receptorok ligandfüggő transzmembrán ioncsatornák. Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionokra permeábilisak, feszültségfüggő Mg^{2+} -blokádnak alatt állnak és az aktivációjukhoz feltétlenül szükséges két agonista, a glutamát és a glicin jelenléte (52). Az idegi működésben alapvető szerepük van. Megtalálhatóak neuronokon és gliasejteken is, pre- és posztszinaptikusan, valamint az extraszinaptikus térben egyaránt (53).

Felépítésüket tekintve három alegységet különböztetünk meg (GluN1, GluN2 és GluN3), melyek heterotetramer komplexet képeznek. A GluN1 alegységnek nyolc különböző izoformája létezik (1-4/a-b), illetve négy GluN2 alegységet (A-D) és két GluN3 (A, B) alegységet ismerünk (54). A heterotetramer leggyakrabban két GluN1 és két GluN2 alegységből áll (55) (1. ábra). A receptor felépítése és alegység összetétele meghatározza, illetve befolyásolhatja a receptor elhelyezkedését, a funkcióját, valamint a fejlődés során az alegységösszetétel meg is változhat. Így a GluN1/GluN2A felépítésű receptorok leginkább szinaptikusan helyezkednek el és felnőttkorban dominálnak, míg a GluN1/GluN2B receptorok extraszinaptikus lokalizációjúak és a korai, posztnatális agyban vannak jelen nagyobb számban (56). A GluN3 alegységet tartalmazó receptorok kevésbé érzékenyek a Mg^{2+} blokádra és Ca^{2+} -ra is kevésbé permeábilisak (57).

A receptoralegységek az extracelluláris N-terminálisból, a ligandkötőhelyekből, a négy transzmembrán régióból és az intracelluláris C-terminálisból épülnek fel. Az extracelluláris ligandkötőhelyeket a transzmembrán-1 domén előtti régió és a transzmembrán-3-4 domén közötti hurok alkotja. A csatorna pórusát a visszakanyarodó transzmembrán-2 domén alakítja ki. A GluN2 alegységen található a glutamát és a poliamin kötőhely, a glicin_B kötőhely a GluN1, illetve a GluN3 alegységen található, amelynek endogén ligandjai a glicin, a D-szerin és az alanin. A glutamát kötőhely további

szubsztrátjai, többek között, az aszpartát, a homocisztein és a szintetikus parciális agonista NMDA. A receptor működése antagonizálható fenciklidinnel, ketamininnal, dizocilpinnel, Zn^{2+} -kel, amantadinnal, memantinnal, valamint a GluN2B alegységet tartalmazó receptorokra szelektív negatív allosztérikus modulátorral, az ifenoprodillel (52). A C-terminálison történő poszt-transzlációs foszforiláció, palmitoiláció, ubiquitináció szintén befolyásolja az NMDA receptorok funkcióját, permeabilitását (17).

Az NMDA receptorok aktivációja két-két glicin és glutamát molekula bekötődésével és a feszültségfüggő Mg^{2+} -blokk posztszinaptikus depolarizáció általi megszűnésével jön létre. Az aktivált receptorokon keresztül, Na^+ mellett, nagy mennyiségű Ca^{2+} áramlik a sejtbe. Az IC Ca^{2+} koncentráció megemelkedésével aktiválódik a Ca^{2+} /kalmodulin kináz, ami autofoszforilálódhat. A foszforilált kináz elnyújtott hatáskifejtésre képes, az IC Ca^{2+} koncentráció nyugalmi értékre való csökkenését követően is működőképes marad. Az NMDA receptorok ezen mechanizmus alapján tartós hatások kialakítására képesek, aminek nagyon fontos szerepe van a neuronális tanulási folyamatokban. A túlzott, elnyújtott ingerlés azonban az excitotoxicitás révén irreverzibilisen károsíthatja az idegsejteket, valamint a retina ganglionsejtjeit.



1. ábra. Az NMDA receptor felépítése. A heterotetramer leggyakrabban 2 GluN1 és 2 GluN2 alegységből épül fel, Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionokra permeábilis, feszültségfüggő Mg^{2+} blokádnak alatta áll, a glicin kötőhely a GluN1, a glutamát, poliamin és antagonisták kötőhely a GluN2 alegységen található. (saját ábra)

1.2.1.2.1.1 Az NMDA receptorok fiziológiája és patofiziológiája

Az NMDA receptorok fontos integratív funkciót töltenek be az idegrendszer működésében. Különleges tulajdonságuk révén, miszerint detektálják és összehangolják a preszinaptikus agonista felszabadulást és a posztszinaptikus depolarizációt, hosszútávú változásokat tudnak létrehozni a szinaptikus aktivitás terén (58). A tanulást, a memóriát, a szinaptikus plaszticitást és a kognitív funkciókat a hosszú távú potenciáció és depresszió (LTP, LTD) által befolyásolják.

Az NMDA receptorok szinaptikus és extraszinaptikus elhelyezkedése a lokalizációs hipotézis alapján szintén befolyásolja a funkciókat. A közvetített hatások alapján megfigyeltek különbségeket a receptorok alegység összetételében is (alegység hipotézis). A szinaptikusan elhelyezkedő, főleg GluN2A alegységet tartalmazó receptorok stimulációja növeli az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK 1/2) aktivációját, ami a Jacob fehérje foszforilációját okozza, emellett növeli a ciklikus adozin-monofoszfát (cAMP)-reszponzív elem kötő fehérje (CREB) foszforilációját, serkenti az idegi növekedési faktor (BDNF) expresszióját, elősegíti az antioxidáns hatásokat, amely hatások révén a szinaptikusan elhelyezkedő receptorok neuroprotektívek, a sejttúlélést szolgálják (59, 60). A GluN2B alegységgel rendelkező, inkább extraszinaptikus receptorok az előzőekkel ellentétes hatásokat közvetítenek és az excitotoxicitásban vesznek részt, sejthalált okozhatnak (60). Az agonisták kötődésében is van különbség az alegységek terén, ugyanis a glicin főleg az extraszinaptikus NMDA receptorokhoz kötődik, a szinaptikusan elhelyezkedőkhöz pedig a D-szerinnek nagyobb az affinitása (61).

Különböző patofiziológiai események, valamint az életkor előrehaladtával történő változások hatására az NMDA receptorok normális működése károsodhat, a receptor

alegységek összetétele is változik, csökken a GluN2B alegységet tartalmazó heterotetramer komplexek száma. Mind az alul, mind a túlműködés komoly hatással van a központi idegrendszer integritására, a kognitív funkciók mindkét esetben károsodnak. Az NMDA receptorok hipofunkciója felelős többek között a szkizofrénia nehezen befolyásolható negatív tüneteieért (62), túlműködése, excitotoxicitás révén neurodegeneratív betegségekhez, epilepsziához vezethet. A lokalizációs hipotézis alapján, az NMDA receptorok kiegyensúlyozott működésének megbomlása és eltolódása a GluN2B alegységet tartalmazó extraszinaptikus receptorok túlzott aktivációjának irányába, az egyik legfontosabb mechanizmus a neurodegeneratív kórképek patogenezisében (53).

Azonban sem a lokalizációs, sem az alegység hipotézis nem törvényszerű, ugyanis az előzőekkel ellentétes eredményeket is publikáltak. Bizonyos kísérleti körülmények között a szinaptikusan elhelyezkedő, GluN2A alegységet tartalmazó receptoroknak is volt jelentős excitotoxikus hatása, valamint szinaptikusan elhelyezkedő GluN2B alegység fokozott expressziójánál is beszámoltak a mentális és a kognitív funkciók javulásáról (61, 63). A receptorok kiegyensúlyozott működése alapvető a normális idegi funkciók fenntartásában.

1.2.1.2.1.2 Az NMDA receptorok modulációja

Az NMDA receptorok modulációja több szinten történhet (17). Egyrészt a receptor szubsztrátjainak, a glutamát, illetve a glicin mennyiségének változtatásával. Ez történhet a szubsztrátok felszabadulásának befolyásolásával, a transzporterekre, illetve a kötőhelyeikre ható szerekkel. Másik lehetőség a feszültségfüggő Mg^{2+} blokádfolyás befolyásolása és így depolarizáció vagy hiperpolarizáció (pl. GABA receptorok) létrehozása. Történhet IC jelátviteli utakon keresztül, vagy egyéb receptorokkal kialakított kölcsönhatások révén. A modulátorok okozta hatások gyakran poszttranszlációs változásokat, foszforilációt és egyéb csoportok átvitelét eredményezik, amelyek nemcsak a jelátvitelre, de az NMDA receptorok expressziójára is hatással lehetnek (17). Befolyásolják az NMDA receptorok működését többek között különböző G-fehérje kapcsolt receptorok, mint a metabotrop glutamát receptorok, az adrenerg,

kolinerg, dopaminerg, szerotonerg és purinerg rendszer, a neuroszteroidok, az endogén kannabinoidok, a morfin, a neuropeptid Y, a nitrogén-monoxid (NO), a neurotensin, a szomatosztatin, az inzulin, a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), a plazmin és a trombin (17).

A metabotrop glutamát receptorok közül leginkább az I. csoportba tartozó mGluR1-ről és mGluR5-ről ismert, hogy a posztzinaptikus membránon az NMDA receptorok közelében helyezkednek el és potenciózzák azok működését (64). A mGluR1-nek főleg a szinaptikus, míg a mGluR5-nek az extraszinaptikus NMDA receptorokra van serkentő hatása (64). Hasonló potenciózást hozhatnak létre a II. csoportba tartozó receptorok a PFC-ben. A potenciózó hatás mellett néhány esetben azonban NMDA receptor gátlást is leírtak.

A dopamin receptorok többféleképpen modulálhatják az NMDA receptorok működését. Preszinaptikusan elhelyezkedve gátolhatják a glutamát felszabadulását, míg posztzinaptikusan a receptor típusától és a dopamin koncentrációtól függően serkenthetik és gátolhatják is az NMDA receptorok működését (17).

1.2.1.3 Az AMPA receptorok

Az AMPA receptorok Na^+ és K^+ , néhány esetben Ca^{2+} -ot is átteresztő ioncsatornák. A receptor felépítését tekintve heterotetramer, 4 alegység alkotja (GluA1-4/GluR1-4) (51). Általában szimmetrikusan, a dimer dimereként épül fel. Az alegységek RNS-ének változása eltérő csatornafunkcióval rendelkező variánsokat hozhat létre, például megváltoztatja a Ca^{2+} permeabilitást (65). A felnőtt agyban az AMPA receptorok többsége már RNS változáson átesett GluA2 alegységet tartalmaz, amelyek Ca^{2+} -ra impermeabilisak (66). A receptorok szintézisét, eloszlását, lokalizációját és tulajdonságaikat a receptor alegységekkel interakcióban lévő transzmembrán AMPA receptor regulációs proteinek (TARP) és cornichon fehérjék befolyásolják (67). A receptoralegységek az extracelluláris N-terminálisból, a ligandkötőhelyekből, a transzmembrán régióból és az intracelluláris C-terminálisból épülnek fel. Az AMPA receptort felépítő alegységek mindegyikén található glutamát kötőhely, azonban a

receptor aktivációjához elegendő két molekula glutamát bekötődése (68). Az AMPA receptorok főleg posztszinaptikusan helyezkednek el és a gyors szinaptikus transzmisszióban vesznek részt, de hatásaikkal befolyásolják az LTP-t is. Egyrészt preszinaptikusan elősegítik a glutamát felszabadítását, másrészt a posztszinaptikusan létrejövő depolarizáció feloldja az NMDA receptorokat a Mg^{2+} -blokádtól, amelyeken keresztül így nagy mennyiségű Ca^{2+} áramlik a sejtbe (69). A megemelkedő IC Ca^{2+} szint pedig az AMPA receptorok posztszinaptikus up-regulációját hozza létre. Ezen hatások összegeként az excitatórikus posztszinaptikus potenciál (EPSP) mérete hosszútávon megnő, ami elősegíti az LTP-t. Emellett az AMPA receptoroknak szerepe lehet az epilepszia patomechanizmusában is, a receptor antagonisták antiepileptikumként való alkalmazhatóságát több tanulmány bizonyítja (70).

1.2.1.4 A kainát receptorok

Habár a kainát receptorok széleskörűen megtalálhatóak a KIR-ben, fiziológiai működésükről jelenleg még keveset tudunk. Na^+ és K^+ , ritkán Ca^{2+} -ot is áteresztő ioncsatornák. Öt féle alegységet tartalmazhatnak (GluK1-5), ezekből épül fel a tetramer struktúra (51). Preszinaptikusan a glutamát, illetve a GABA felszabadulást modulálják, a posztszinaptikusan elhelyezkedő receptorok az excitátoros neurotranszmisszióban vesznek részt (71). A kainát receptorok egy különleges tulajdonsága, hogy a klasszikus jelátvitel mellett nem kanonikus jelátvitel útján is tudnak működni (72). Így akár G-fehérje aktivációval metabotrop receptorként is viselkedhetnek. Ez a kettős jelátviteli tulajdonság lehet a magyarázata a kainát receptorok változatos hatásainak. Az AMPA receptorokhoz képest lassúbb EPSP-t hoznak létre, és lassúbb az aktivációs és a deaktivációs kinetikájuk is (73). A szinaptikus plaszticitásban kevésbé van szerepük, azonban a lassúbb kinetika révén integratív funkciókat tölthetnek be az információ továbbításban.

1.2.2 A glutamáttranszporterek

A glutamáttranszportereket két csoportra osztjuk (74). Az egyik csoportba az EC glutamát szintet szabályozó, a plazmamembránban található transzporterek tartoznak. Ilyenek a Na^+ -függő excitátoros aminosav transzporterek (EAAT), amelyekből ötfélét ismerünk (EAAT1-5) és a Na^+ -független, alacsony kapacitású X_c^- rendszer, amely cisztein/glutamát cserét bonyolít le (47). A másik csoportba az IC elhelyezkedő transzporterek tartoznak, melyek a glutamátot az IC térből vezikulákba transzportálják (vGLUT1-3) (75).

Az EAAT1 és EAAT2 főleg gliasejteken, az EAAT3 és EAAT4 inkább a neuronokon, míg az EAAT5 a retinában található meg (47). A KIR glutamát visszavétel 90%-áért az EAAT2 felel (74). Az EAAT antiporterek három Na^+ és egy H^+ kotranszportjával szállítják a glutamátot, miközben egy K^+ jut ki a sejtől. A transzporterek 3-5 alegységből felépülő oligomerek, egy-egy alegység 6-8 transzmembrán doménből, egy vagy két visszakanyarodó hurokból és intracellulárisan elhelyezkedő N- és C-terminálisokból áll (75). A glutamát szinaptikus résből való eltüntetéséért felelnek. A gliasejtekbe visszavett glutamát glutaminná alakul, ami visszajut a szinaptikus részbe és az így felszabaduló glutamint a neuronok veszik fel és alakítják át glutamáttá, majd vezikulákban tárolják. Ezt a folyamatot glutamát-glutamin ciklusnak nevezzük (76). Az EAAT-k glutamát mellett aszpartátot is szállítanak (77).

Az X_c^- rendszer gliasejteken fordul elő. EC ciszteint cserél IC glutamátra, a felvett cisztein pedig az antioxidáns tulajdonságú glutathion szintézisre fordítódik (78). Két alegységből álló heterodimer.

A vezikuláris transzporterek protongrádiensből függően szállítják a glutamátot a vezikulákba. Ezen transzporterek affinitása jóval kisebb a glutamáthoz, mint az EAAT-nek, viszont szelektívek glutamátra (75). 12 transzmembrán doménből és intracellulárisan elhelyezkedő N- és C-terminálisokból állnak.

Hipoxiás körülmények között, az ATP csökkenés hatására, felborul a protongradiens, így a vezikulákból a glutamát kijut az IC térbe. Az emelkedett glutamát koncentráció miatt megfordul az EAAT-k működése és a transzporterek fordított módban működnek, ezáltal nő a szinaptikus részben a glutamát koncentráció, ami fokozza az NMDA-receptorok

aktivitását és ezáltal excitotoxicitást válthat ki. Az emelkedett EC glutamát koncentráció az X_c^- rendszer működését is megfordíthatja, ami glutathion deplációhoz vezet.

1.3 A glicinerg rendszer

A glicin, a GABA mellett, a KIR fő gátló, klasszikus neurotranszmittere, leginkább az agytörzsben, a gerincvelőben és a retinában található meg (79, 80). A legegyszerűbb nem esszenciális aminosav. Szintézise a gerincesekben szerinből, illetve kolinból vagy etanolaminból történhet. Lebontását a glicin hasító enzim végzi. Glukoplasztikus aminosav révén a lebontása során keletkező piruvát a glukoneogenezisben és egyéb molekulák szintézisében vesz részt.

A glicin, a glutamához és egyéb klasszikus neurotranszmitterekhez hasonlóan az idegvégződésekben szintetizálódik, vezikulában tárolódik, felszabadul a szinaptikus részbe és tűnik el onnan (80).

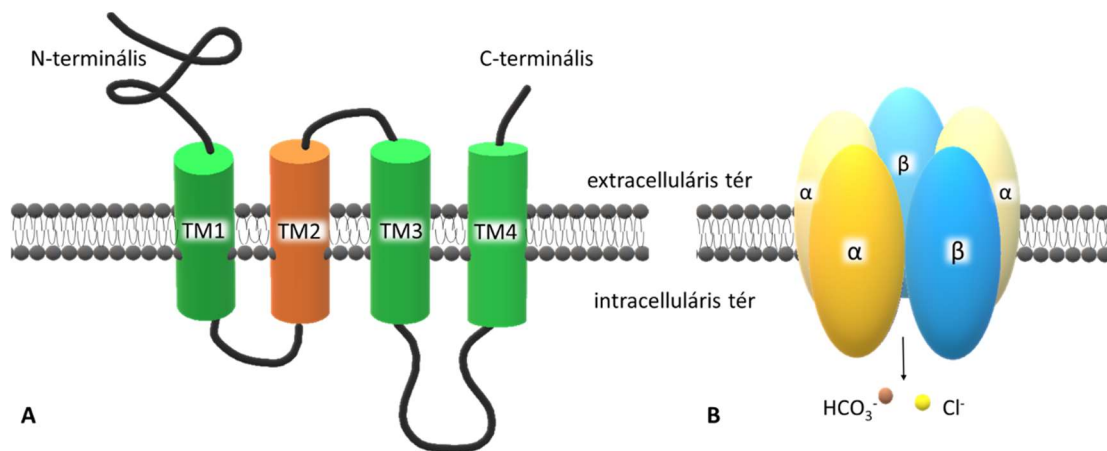
A glicin azonkívül, hogy a fehérjeszintézis alapja, kettős funkciót tölt be a KIR-ben, egyrészt a glicinerg neuronok glicin receptorain gátló neurotranszmitterként működik, másrészt az előzőekben ismertetett NMDA receptorok elengedhetetlen koagonistája, ezáltal pedig az excitátoros glutamáterg transzmisszióban vesz részt (81).

1.3.1 A glicin receptor

A glicin receptora egy ligandfüggő ionotrop receptor, Cl^- és HCO_3^- ionokra permeábilis csatorna, gátló hatást közvetít. A receptor kétféle alegység (α , β) pentamer elrendezéséből épül fel, 4 féle α ($\alpha 1-4$) és egyféle β alegységet ismerünk (82, 83). Leggyakrabban három α és két β alegységből áll a pentamer, de más sztöchiometriai arányú glicin receptorok is ismertek lokalizációtól, illetve fejlődési állapottól függően (83). Minden alegység extracelluláris N- és C-terminálisból, illetve négy transzmembrán szakaszból (M1-4) áll, az ioncsatornát a pozitív töltéseket tartalmazó M2 transzmembrán domének alkotják, ezáltal segítve az anionok áramlását (2. ábra). A ligandkötőhelyeket az N-terminális

tartalmazza. A glicin bekötődését követően a receptor aktiválódik (legalább 3 glicin molekulának kell bekötni), a membrán hiperpolarizálódik, illetve a beáramló gátló ionáram a kationcsatornák nyitására keletkező depolarizációt ellensúlyozza, ezáltal membránpotenciál-stabilizáló hatást fejt ki.

A glicin receptor antagonistája a sztrichnin, ami felfüggeszti a gátló folyamatokat, ezáltal izomgörcsöket okoz (84).



2. ábra. A glicin receptor. **A:** az alegységek felépítése; minden alegység extracelluláris N- és C-terminálisból, illetve négy transzmembrán szakaszból (M1-4) áll, az ioncsatornát a pozitív töltéseket tartalmazó M2 transzmembrán domének alkotják. **B:** a glicin receptor felépítése; leggyakrabban három α és két β alegységből áll a pentamer, Cl⁻ és HCO₃⁻ ionokra permeábilis. (saját ábra)

1.3.2 A glicin transzporterek

A glicin transzporterek felelősek a glicin szinaptikus részből való eltüntetéséért (85). Bizonyos feltételek mellett azonban, fordított működés esetén, a glicin felszabadulásban is szerepet játszanak.

A glicin transzporterek a Na⁺-függő monoamin és neuroaktív aminosav transzporterek családjába (SLC6) tartoznak (56). Az SLC6 családon belül kétféle glicin transzportert

azonosítottak, amelyek farmakológiai szempontból a szarkozinnal való gátolhatóságukban különböznek, az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT-1) gátolható szarkozinnal, míg a 2-es típusú (GlyT-2) nem (80). Mindkét transzportert két gén kódolja. Az 1-es típusú glicin transzporternek öt variánsa (GlyT-1a-e), a GlyT-2-nek 3 variánsa (GlyT-2a-c) létezik (86). A két transzporter felépítése és működési mechanizmusa szinte megegyezik. Felépítésüket tekintve tizenkét transzmembrán szegmensből állnak, a ligandkötőhely az 1-es és 6-os doménon található, működésük annyiban különbözik, hogy a GlyT-1 esetében 2 Na⁺/1 Cl⁻ ionnal, míg a GlyT-2 esetében 3 Na⁺/1 Cl⁻ ionnal történik a kotranszport (87). Lokalizációjukban és a jelátvitelben betöltött szerepükben azonban nagyban eltérnek.

A GlyT-1 a KIR-ben a gerincvelőben, az agytörzsben, a cerebellumban található meg, de előfordul a kérgi területeken, a hippokampusban és a retinában is (88). Gliasejteken és kisebb mennyiségben neuronokon is megtalálható. A glutamáterg szinapszisokkal összefüggő asztroglia sejteken a glicin visszavételét vagy felszabadulását irányítja, míg a neuronokon az excitátoros glutamáterg transzmissziót befolyásolja az NMDA receptor koagonista glicin szintjének szabályozásával (81). GlyT-1-ek az asztroglia sejtek extraszinaptikus oldalán is megtalálhatóak, ahol szintén a glicin koncentrációt befolyásolják (89). A GlyT-1-et a transzportálódó, szubsztrát típusú antagonistá, a szarkozin gátolja.

A GlyT-2 leginkább a gerincvelőben, az agytörzsben és a cerebellumban fordul elő (88), a gátló glicinerg szinapszisokban található meg. Legfőbb funkciója a glicin újrahasonosítása, a preszinaptikus vezikulák feltöltése.

A GlyT-ek kettős funkcióval rendelkeznek. Egyrészt a glicin transzlokációját biztosítják, másrészt ioncsatorna funkciót is betöltenek, mivel a glicin Na⁺/Cl⁻ ionokkal kotranszportálódik. Az ehhez szükséges elektrokémiai grádiens a sejtmembránban működő Na⁺/K⁺-ATP-áz tartja fenn. A glicin transzlokációjának lépései a következők: Na⁺ kötődik a transzporterhez, melynek hatására a glicinkötő oldal konformációs változáson megy keresztül és a transzporter megköti a glicint, a Na⁺ és Cl⁻ ionokat (GlyT-1 esetén 2 Na⁺/1 Cl⁻, GlyT-2 esetén 3 Na⁺/1 Cl⁻); a transzporter a szubsztrátjaival együtt az IC oldalra kerül, ahol, azok leválnak róla; ezt követően az üres transzporter visszahelyeződik a sejtmembrán külső oldalára, hogy újabb transzlokációt

bonyolíthatson le. A transzporter által beáramló nagy mennyiségű Na^+ depolarizálja a membránt és csökkenti a transzlokáció hajtóerejét, az elektrokémiai grádiens, illetve elősegíti az intraneuronális glicin transzporterhez kötődését és fordított irányú transzlokációját. Normális irányú működésük során a glicin transzporterek a glicint, a szinaptikus részbe történő felszabadulást követően, a sejtbe juttatják vissza, ezáltal neuroprotektív hatásúak. Reverz módban való működésük azonban glicint pumpálnak a szinapszisba, ami az emelkedett glicin szint miatt fokozott NMDA receptor aktivációt és ezáltal neurotoxicitást válthat ki.

A transzporterek bidirekcionális működésűek, a hajtóerő irányától függően Ca^{2+} -tól független neurotranszmitter felszabadító forrásként is szolgálhatnak. Ischaemiás körülmények, adenzin-trifoszfát (ATP) csökkenés hatására a vezikuláris transzporter megfordul és glicint juttat a citoplazmába, ahonnan a neurotranszmitter, a magas IC glicin koncentráció miatt fordítottan működő transzporterek által a szinaptikus/extraszinaptikus térbe kerül. Reverz működés létrejöhet még kívülről adott szubsztrátra válaszként (glicin indukálta glicin felszabadulás), okozhatja megnövekedett IC Na^+ koncentráció miatti depolarizáció, illetve a glutamát preszinaptikus AMPA/kainát receptorokhoz kötődve szintén membránde polarizációt válthat ki (85). Tekintettel arra, hogy a GlyT-2 3 Na^+ /1 Cl^- ionokkal bonyolítja le a glicin transzlokációt, ezek a transzporterek sokkal meredekebb transzmembrán grádiens és magasabb intraneuronális glicin koncentrációt tudnak fenntartani, ezáltal kevésbé képesek a reverz működésre, mint a GlyT-1 (90).

A fordított működésű transzporterek által az EC térbe juttatott glicin az NMDA receptorok túlzott aktivációját hozhatja létre, aminek következményeként excitotoxicitás alakulhat ki.

A káros hatások kivédése történhet közvetetten, a glicin szint csökkentésével, a glicin transzporterek reverz működésének gátlása útján. A neurotoxikus hatások kivédésében a GlyT-1 inhibitoroknak nagyobb terápiás jelentősége van, mint a GlyT-2 gátlásának. A GlyT-1 gátlók lehetnek a transzporter szubsztrátjai és blokkolói, attól függően, hogy transzportálódnak vagy sem a karrieren keresztül. A transzportálódo, szubsztrát típusú gátlók, például a szarkozin, a transzporter ligandkötőhelyeivel lépnek kapcsolatba és az IC Na^+ szint növelése útján lokális membránde polarizációt hoznak létre, így glicin felszabadulást eredményeznek (91). A nem transzportálódo inhibitorok lehetnek

kompetitívek, amelyek a szubsztrátkötőhellyel versengenek (pl. Merck-13), illetve nem-kompetitívek (pl. NFPS) (92). Ezen inhibitorok hatására a transzporterén keresztül nem történik ionáramlás.

1.4 A glutamáterg és glicinerg rendszer fiziológiai és patofiziológiai szerepe

A glutamáterg és glicinerg rendszer normális működése elengedhetetlen a fiziológias idegrendszeri folyamatokban. A két rendszer szoros, összehangolt kapcsolata leginkább az NMDA receptorok aktivációjánál található, mivel mindkét neurotranszmitter szükséges a receptorok működéséhez. A glutamáterg, mint legfőbb excitatórikus jelátviteli rendszer, a szinaptikus plaszticitásban, a kognitív funkciókban, a tanulásban, memóriában, a megismerésben, a fájdalom megélésben és az alapvető szabályozó funkciókban játszik kiemelkedő szerepet (58). A glicinerg rendszernek a motoros funkciók szabályozásában, a látás és hallás jelátvitelében és a fájdalomérzékelésben van kitüntetett szerepe, mind az inhibitoros glicin receptorokon, mind koagonistaként az NMDA receptorokon kifejtve hatását (93).

A glutamáterg rendszer alulműködését összefüggésbe hozták számos affektív kórképpel, depresszióval, bipoláris zavarral, illetve a glutamát hipotézis szerint a szkizofrénia kialakulását is az NMDA receptorok alulműködéséhez kötik, ugyanis az NMDA receptor antagonistá ketamint és fenciklidint (PCP) alkalmazva azok szkizofréniaszerű negatív és kognitív tüneteket okoztak (94, 95). Szkizofréniaiban szenvedő betegek post mortem vizsgálatai során a neuroprotektív mGlu5 receptorok hipofunkcióját is megfigyelték (96).

A glutamáterg rendszer túlműködése, az ionotrop és metabotrop glutamát receptorok fokozott aktivációja miatt excitotoxicitás révén sejthalált, neurodegenerációt okozhat. Akut excitotoxicitás alakul ki ischaemia, traumás agykárosodás, status epilepticus, hipoglikémia hatására (97, 98). A hosszabb idő alatt kialakuló neurodegeneratív betegségek patomechanizmusában a krónikus excitotoxicitásnak van szerepe (97). Ebben az elnyújtottan kialakuló hatásban valószínűleg a szervezet kompenzatórikus mechanizmusainak is szerepe van, például az mGluR1 neuroprotektív tulajdonsága késleltetheti a hosszútávon, enyhén emelkedett koncentrációjú glutamát által kiváltott

neurotoxikus hatásokat (99). Az NMDA receptorok patológiás aktivációja mellett az AMPA receptorok és a mGlu5 receptor is szerepet játszhatnak a krónikus fájdalom kialakulásában (100, 101).

A glicinerg rendszer alulműködése az inhibitoros glicin receptorok kóros működése kapcsán a motoros rendszer zavarait, izomgörcsöket okozhat, felerősítheti a fájdalomérzetet és befolyással van a látásra és a hallásra is (102).

Az NMDA receptorokra való hatásban a glicinerg rendszer alul- és túlműködése a glutamátéhoz hasonlóan alakul. Ischaemiás körülmények között, túlműködés esetén, megnő a glicin EC koncentrációja, ami fokozott NMDA receptor aktivációhoz vezethet. Megfigyelték, hogy a glicinnek nagyobb az affinitása az extraszinaptikusan elhelyezkedő és a neurodegenerációban kiemelkedő jelentőségű NR2B alegységet tartalmazó NMDA receptorokhoz (61).

1.5 Az agyi renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

A renin 1898-ban történt felfedezése óta jelentősen nőttek ismereteink a RAAS-ról (103). Kezdetben szisztémás endokrin rendszernek gondolták, de számtalan kutatás során igazolódott, hogy a klasszikus RAAS mellett, a különböző szervekben, így kifejezetten az agyban is, létezik helyi, a szisztémástól független, de azzal kölcsönhatásban lévő RAAS (104). Molekuláris biológiai módszerekkel kimutatták, hogy a RAAS minden eleme és a szintézisükhöz szükséges összes komponens megtalálható az agyban, ugyanis a vér-agy gát megakadályozza a perifériás RAAS komponenseinek KIR penetrációját (104). Az agyi RAAS-nak a kardiovaszkuláris homeosztázis fenntartása mellett nagyon fontos szerepe van a kognitív funkciók szabályozásában, patológiás működése neuroinflammáció, oxidatív stressz és következményes apoptózis útján neurodegenerációhoz vezethet.

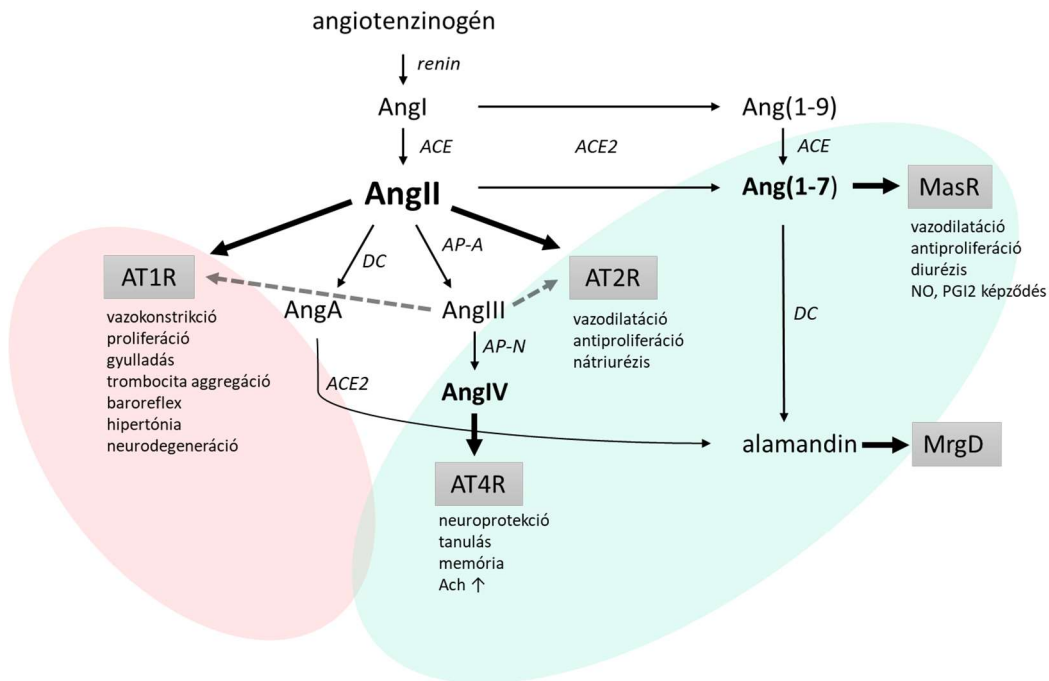
A kiindulási anyag az angiotenzinogén, amely több, mint 90%-ban asztrocitákban szintetizálódik, de neuronokban és gliasejtekben is termelődhet kisebb mértékben (105, 106). Ebből a renin hasítja az angiotenzin I-et (Ang I), ami az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hatására alakul tovább. Az ACE segítségével alakul ki a RAAS fő

mediátora az angiotenzin II (Ang II). Az Ang II kétféle receptorhoz kötődhet, azonos affinitással (107). A Gq-kapcsolt 1-es típusú angiotenzin receptoron (AT1R) vazokonstriktiót hoz létre, proliferatív hatása van, befolyásolja a baroreflexet, szerepe van a vérnyomás szabályozásában, gátolja a sejt-kommunikációban alapvető fontosságú acetilkolin (ACh) felszabadulását (108). A Gi/o kapcsolt 2-es típusú angiotenzin receptoron (AT2R) keresztül vazodilatációt hoz létre és antiproliferatív hatást közvetít (109). Az Ang II aminosavak segítségével Ang III-á konvertálódhat, ami szintén kötődhet AT1R és AT2R-hoz, de továbbalakulhat Ang IV-é, ami az Ang IV receptorhoz (AT4R), egy inzulin-regulált aminosavakhoz (IRAP) kötődve és azt gátolva, neuroprotektív hatásokat hoz létre, befolyásolja a tanulást, a memóriát, növeli az ACh felszabadulását a hippocampusban (110). Ang I-ből és Ang II-ből az ACE2 Ang (1-9)-t, illetve Ang (1-7)-t hoz létre. A szintén neuroprotektív hatású Ang (1-7) a G-fehérje kapcsolt Mas receptorhoz kötődik, amin keresztül vazodilatációt eredményez, antiproliferatív hatást közvetít, befolyásolja a diuresist, NO és prosztaciklin képződést indukál (111). Mas mRNS-t legnagyobb mennyiségben a hippocampusz piramissejtjein, illetve a gyrus dentatus granuláris sejtjein mutattak ki (107). Az Ang (1-7) dekarboxiláció útján továbbalakulhat a még kevésbé ismert alamandinná, ami a Mas-related G-protein kapcsolt receptorok (MrgD) ligandja. Alamandin szintén létrejöhet Ang II-ből angiotenzin A-n (Ang A) keresztül (3. ábra).

Az agyi RAAS felépítése alapján, az idegi és szisztémás hatások szempontjából, két fő tengely különíthető el. Az ACE-Ang II-AT1R tengely túlzott aktivitása kognitív károsodást közvetít, míg az ACE2-Ang (1-7)-Mas receptor tengely hozza létre a védő mechanizmusokat (vazodilatáció, antiproliferatív és antifibrotikus hatások) (112). A neurodegeneráció kivédésére többféle beavatkozási lehetőség adódik.

Egyrészt az ACE-Ang II-AT1R tengely gátlása, ahol a fő mediátor az Ang II túlzott aktivitása az AT1R-on reaktív oxigénradikálok keletkezését indukálja, aktiválja a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) útvonalat, glutamát excitotoxicitást okoz, károsítja a mitokondriális légzési láncot, csökkenti az agyi erekben a véráramlást és a glükózkínálatot (112, 113). Ezen folyamatok sejthalált okoznak és a neurodegeneráció irányába hatnak. Az egyes lépések gátlása, azonban protektív lehet az Ang II kiváltotta káros hatások megelőzésével. A legfőbb célpontok az Ang II termelésének gátlása

ACE-inhibitorokkal (ACEi), illetve az Ang II hatásának gátlása az AT1R-on angiotenzinreceptor blokkolókkal (ARB). Számos kutatás számol be a két hatóanyagcsoport KIR-be jól penetráló tagjainak jótékony hatásairól, mint a neuroinflammáció csökkentése, a kognitív diszfunkciók és memória javítása (114-119).



3. ábra. Az agyi RAAS sematikus ábrázolása. Részletes leírást ld. a szövegben. Szürke háttér: receptorok; dőlt: enzimek; piros háttér: neurodegeneráció; zöld háttér: neuroprotekción; Ang: angiotenzin; ACE: angiotenzin konvertáló enzim; DC: dekarboxiláz; AP-A: aminoszteinidáz A; AP-N: aminoszteinidáz N; Ach: acetilkolin; AT1/2/4R: angiotenzin-1/2/4-receptorok; MrgD: Mas-related G-protein kapcsolt receptorok

A neurodegeneráció kivédésének másik, újabb terápiás célpontja az ACE2-Ang (1-7)-Mas receptor tengely aktiválása, illetve az AT4R-ok serkentése. Az előbb említett ACEi-k és ARB-k felhasználásával a RAAS útvonal a káros hatásokat közvetítő tengelyről a védőmechanizmusokat mediáló tengelyre tolódik, ami vazodilatációt hoz létre, gátolja az NF- κ B jelátvitelt, csökkenti az oxidatív stresszt, ezáltal antiinflammatorikus hatást,

neuroprotekción közvetít (120). ACEi-ral történő kezelés hatására felhalmozódik az Ang I, amiből Ang (1-9), majd a protektív hatású MasR-hoz kötődő Ang (1-7) keletkezik, ARB-k használata esetén pedig az Ang II az AT2R-on fejti ki hatásait, illetve továbbalakulhat több lépésen keresztül Ang IV-é. A Mas-ról a védő hatások mellett kimutatták, hogy hetero-oligomert képezve az AT1R-ral gátolja az Ang II hatását (121). Ezen protektív mechanizmusok mellett új, ígéretes terápiát jelenthetnek a direkt AT2R agonisták, mint a compound 21 (C21) (122), valamint az Ang IV analógok kifejlesztése (123).

2 Célkitűzések

Kísérleteinkben a NMDA receptorok modulációját vizsgáltuk két különböző KIR struktúrán, a retinában és mediális PFC-ben.

- Egyrészt az NMDA receptorok aktivitásához feltétlenül szükséges koagonista glicin felszabadulását vizsgáltuk patkány retinából. Valamint arra kerestünk választ, hogy a GlyT gátlók befolyásolják-e a glicin felszabadulást.
- Kísérleteink másik részében az Ang II hatását vizsgáltuk az NMDA áramokra patkány mediális PFC V. rétegében található piramissejteken,
- valamint ugyanezen az agyi területen az opioid vegyületek hatását a glutamáterg neurotranszmisszióra.

3 Módszerek

3.1 Kísérleti állatok

A szuperfúziós módszer során 180-200 grammos, hím, Wistar patkányokat használtunk. Ketreceenként 5 állatot tartottunk együtt.

A patch-clamp technika esetében 10-12 napos hím, Wistar patkányokat használtunk, az anyaállattól nem választottuk el őket a kísérletig.

Az állatokat minden esetben hőmérséklet- és páratartalom-kontrollált, 12 órás váltott megvilágítású állatszobákban tartottuk. A kísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága által felállított etikai irányelvek által szabályozottan történtek, melyek a Helsinki Deklaráción alapulnak (EC Directive 86/609/EEC). Az állatok leölése humánusan, a szakmai irányelveknek megfelelően történt. Minden erőfeszítésünkkel törekedtünk a kísérleti állatok szenvedésének és számának minimalizálására.

3.2 Alkalmazott vegyületek

A szuperfúzió során jelölésre [³H]glicint és [³H]glutamátot, a szövet oldására Soluene 350 oldatot használtunk (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA). Folyadékszcintillációs reagensként Ultima Gold XR-t alkalmaztunk (Packard, Groningen, Hollandia). A GlyT-1 gátlására a következő vegyületeket használtuk:

- a kompetitív, transzportálódó szarkozint (Sigma Chemicals Co.),
- a kompetitív, nem transzportálódó ACPBB-t (Merck 13-h, 2-amino-6-kloro-N-(1-[4-fenil-1-(propán-1-szulfonil)piperidin-4-il]etil)benzamid),
- a nem-kompetitív, nem transzportálódó NFPS-t (N-(3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil)szarkozin)
- és az NFPS analóg SzV-2248-at (N-[3-(4'-fluorofenyl)-3-(4'-fenylfenoxi)propil]-N-metil-3-(trifluorometil)- [1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-amin).

A GlyT-1 gátlókat, a szarkozin kivételével, Dr. Mátyus Péter szintetizálta (Szerves Vegytani Intézet, Semmelweis Egyetem). Az IC Na⁺ szint emelésére Na⁺/K⁺-ATP-áz inhibitor ouabaint, a mitokondriális komplex I gátló, és ezáltal neurotoxikus hatást kifejtő rotenont, illetve a glikolízist gátló 2-deoxi-D-glukózt (2-DG) alkalmaztuk (Sigma Chemicals Co.). Széles spektrumú EAAT gátlóként a D,L-treo-β-benziloxiaszpartátot (TBOA) használtunk (Tocris Bioscience).

A patch-clamp technika során szelektív NMDA receptor agonistaként NMDA-t, az angiotenzin hatás vizsgálatához Ang II-t (Sigma-Aldrich). AT1R antagonistaként eprosartant, AT2R antagonistaként PD 123319 vegyületet alkalmaztuk (Sigma-Aldrich). A különböző kísérleti elrendezésekben dopamin-1 receptor (DRD1) antagonistaként SCH 23390 vegyületet, dopamin-2 receptor (DRD2) antagonistaként sulpiridet használtunk, feszültségfüggő Na⁺-csatorna gátlására tetrodotoxint (TTX) adtuk az oldathoz (Sigma-Aldrich). A hatóanyagok oldása bidesztillált vízben történt, kivéve az eprosartant és a sulpiridet, amelyek oldására dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtunk (Sigma-Aldrich).

Az opioid vegyületekkel történt kísérleteknél a 14-O-MeM6SU-t Hosztafi Sándor szintetizálta (Szerves Vegytani Intézet, Semmelweis Egyetem), emellett morfin-hidrokloridot (ICN, Tiszavasvári), valamint GABA_A receptor inhibitoraként bicucullint használtunk (Sigma-Aldrich).

3.3 Kísérletek

3.3.1 Szuperfúziós technika

3.3.1.1 Preparálás

A 180-200 grammos hím Wistar patkányokat guillotine segítségével dekapitáltuk, szemgolyójukat kipreparáltuk. A szemgolyót félbevágtuk, az üvegtestet és a szemlencsét eltávolítottuk. A retina által szegélyezett, kipreparált, hátsó szemszerleget 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, karbogenizált (95% O₂/5% CO₂) Krebs oldatban

(összetétel mM-ban: Na 118, KCl 4,7, CaCl₂ 1,25, NaH₂PO₄ 1,2, MgCl₂ 1,2, NaHCO₃ 25, glükóz 11,5, aszkorbinsav 0,3, Na₂EDTA 0,03; pH 7.4).

3.3.1.2 Oxigén és glükóz megvonás (OGD) indukálta [³H]glicin felszabadulás patkány retinában

A preparálást követően, a retinát tartalmazó hátsó szemszerleget [³H]glicin izotóp jelenlétében (10 µCi/1,5 ml), 30 percig, karbogenizált és előmelegített Krebs oldatban (95% O₂/5% CO₂, 37°C, pH 7.4) inkubáltuk. Ezután a preparátumokat 0,3 ml térfogatú szuperfúziós kamrákba helyeztük (Measuring, Development, Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) és 60 percig áramoltattuk át karbogenizált Krebs oldattal, 37°C-on, hogy az aspecifikusan kötött [³H]glicin kimosódjon. Az áramlási sebességet 1 ml/percre állítottuk, amelyet egy többcsatornás perisztaltikus pumpa biztosított (Gilson type M312, Villiers-Le Bel, France). Ezt követően, a kísérleti elrendezéstől függően (22 vagy 30 frakció), egy Glison többcsatornás frakciókolektorral (type FC-203B, Middletown, WI, USA), 3 percenként frakciógyűjtést kezdtünk, hogy meghatározzuk a [³H]glicin felszabadulást. A vegyületeket, szintén a kísérleti elrendezés alapján, az 5. vagy a 10. frakciótól adtuk, egészen a kísérlet végéig. A 10. frakciótól kezdve biztosítottunk OGD körülményeket (glükózmentes Krebs oldat, 95% N₂/5% CO₂). A Ca²⁺-függés vizsgálatánál a szuperfúzióhoz Ca²⁺-mentes Krebs oldatot használtunk, melyhez 1 mmol/l bis-aminoetil-glikoléter-tetraecetsavat (EGTA) adtunk. Rotenon használatakor glükóz helyett 2 mmol/l koncentrációjú 2-DG-t használtunk az oldat készítéséhez.

Néhány kísérletben, normoxiás és hipoxiás körülmények között, [³H]glutamát felszabadulását is vizsgáltuk. Ebben az elrendezésben a patkányszemből preparált hátsó szemszerleget [³H]glutamát (10 µCi/1,5 ml) jelenlétében inkubáltuk karbogenizált Krebs oldatban (30 perc, 37°C), a kísérlet a továbbiakban a fent részletezettek szerint zajlott.

3.3.1.3 [³H]glicin kiáramlás meghatározása

A szuperfúzió végeztével a preparátumokat 0,4 ml Soluene-350-ben oldottuk és 50 µl mennyiségből határoztuk meg a szövetek radioaktivitását. A retinából felszabadult radioaktivitás mérésére, a szuperfúzió során gyűjtött frakciókból, 1 ml mennyiségeket 5 ml szcintillációs reagenssel kevertünk össze és folyadékszcintillációs spektrometriának vetettük alá. A [³H]glicin efflux mértékét kBq/g/3 percben vagy frakcionális rátaként adtuk meg, azaz a szöveti radioaktivitás mennyiségének százalékaként a felszabadulás idejében. Az OGD vagy más vegyület indukálta fokozott [³H]glicin kiáramlás mérésére meghatároztuk a bazális kiáramlás átlagát a stimuláció előtt és után, ezeket kivontuk egymásból, majd összesítettük. A szöveti [³H]glicin tartalmat a szuperfúzió végén kBq/g-ban adtuk meg.

3.3.1.4 Az OGD hatásának vizsgálata a [3H]glicin felvételre és kiáramlásra patkány retinában

A hátsó szemszerlegek kipreparálása a fentiek szerint zajlott. A preparátumokat 37°C-ra melegített, 5 ml-es, duplafalú üvegekbe helyeztük, melyek alulról, kapilláriscsöveken keresztül kaptak gázellátást. A [³H]glicin felvétel meghatározásához a preparátumot 30 percig inkubáltuk 10 µCi [³H]glicin jelenlétében, 37°C-on, 1,5 ml karbogenizált Krebs oldatban vagy OGD körülmények között glukózmentes, 95% N₂/5% CO₂-vel áramoltatott Krebs oldatban. 30 perc inkubáció után a preparátumokat összegyűjtöttük, jég hideg Krebs oldatba mártottuk, tömegüket lemértük, majd 0,4 ml Soluene-350-ben oldottuk és a szövet radioaktivitását folyadékszcintillációs spektrometriával megmértük. A normál és OGD körülmények között felvett [³H]glicin mennyiségét kBq/g/30 percben fejeztük ki.

A [³H]glicin kiáramlás meghatározására a preparátumokat 30 percig inkubáltuk 10 µCi [³H]glicin jelenlétében, 37°C-on, 1,5 ml karbogenizált Krebs oldatban. A töltési periódust követően a preparátumokat tovább 30 percig inkubáltuk 1,5 ml karbogenizált Krebs oldatban vagy glukózmentes, 95% N₂/5% CO₂-vel áramoltatott Krebs oldatban. A normál

és OGD körülmények között az inkubációs folyadékba felszabadult [³H]glicin mennyiségét kBq/g/30 percben fejeztük ki.

3.3.2 Immunhisztokémiai jelölés patkány retinában

A fentiek szerinti preparálást követően a hátsó szemszerleget 4% paraformaldehidet tartalmazó foszfátpufferbe merítettük (pH 7.4). Fixációt követően a preparátumokat paraffinba ágyasztuk és 4 µm-es vastagságú metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai jelölés a paraffin eltávolítását és rehidrációt követően történt EZ-AR3 oldatban történő inkubálással (pH 6, magas hőmérséklet, 15 perc) a szöveti antigén detektálására. Ezt követően a metszetek 1 órát inkubálódtak 10% magzati borjú szérumot (FCS) és 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó foszfátpufferes sóoldatban (PBS) blokkolás céljából. Ezután 5% FCS-t és 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó PBS-ben, 1:500-es hígításban oldott kecske anti-GlyT-1 elsődleges antitestet (Chemicon International Inc, USA) alkalmaztunk szobahőmérsékleten egy éjszakán át. PBS-ben történő mosást követően, Cy3 konjugált szamár anti-kecske IgG-t használtunk másodlagos antitestként, 1:400-es hígításban 1 órán át. A preparátumokat 5% FCS-t és 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó PBS-ben, 1:1000-es hígításban, 1 órán át alkalmazott anti-egér-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) elsődleges antitestekkel (Merck Millipore, Billerica, USA) is megjelöltük. PBS-ben történt mosást követően másodlagos antitestként Alexa fluor 488-cal konjugált kecske anti-egér IgG-t (Merck Millipore, Billerica, USA) használtunk 1:500-os hígításban. Néhány metszetet hematoxin-eozinnal is megfestettünk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Dr. Albert Mihály végezte.

3.3.3 Patch-clamp technika

3.3.3.1 Preparálás

A kísérlet során 10-12 napos hím Wistar patkányokat dekapitáltunk, az agyat kipreparáltuk és jéghideg, karbogenizált (95% O₂/5% CO₂) mesterséges cerebrospinális

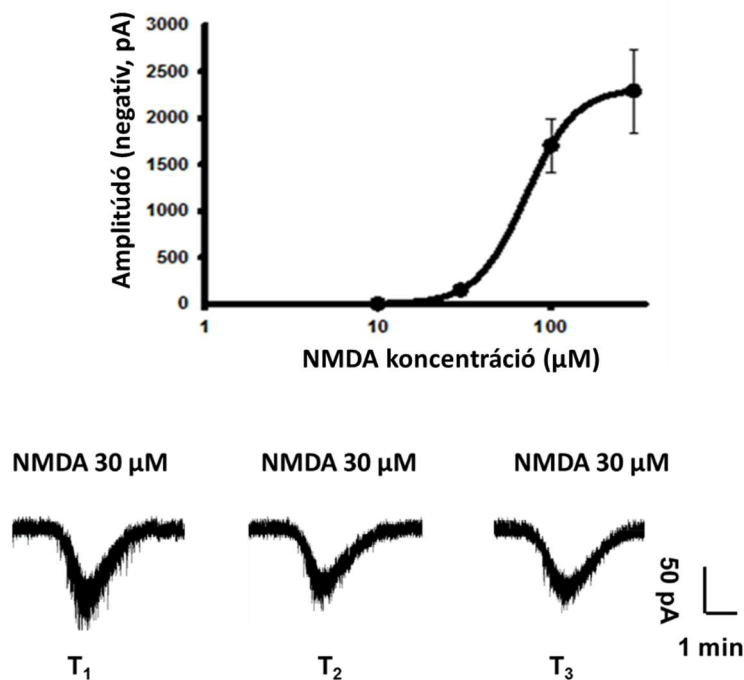
folyadékba (aCSF) merítettük (összetétel mM-ban: NaCl 126, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 2,4, MgCl₂ 1,3, NaHCO₃ 25, glükóz 11; pH 7.4). Alacsony hőmérsékleten csökken a sejtek anyagcseréje és oxigénigénye, így a szöveti károsodás minimalizálható. A medialis PFC-t tartalmazó frontális lebenyből egy rezgőkéses mikrotom segítségével vékony, 200 µM-es coronalis síkú agyszeleteket készítettünk. Egy agyból 6-8 szelet került metszésre. Ezt követően az agyszeleteket 36°C-ra melegített, karbogenizált aCSF-ben inkubáltuk 1 órán keresztül, majd szobahőmérsékleten tároltuk (22-24°C). Az inkubációs idő letelte után egy-egy agyszeletet 300-400 µl térfogatú mérőkamrába helyeztünk, ahol perisztaltikus pumpa segítségével folyamatosan, 3 ml/perc sebességgel, karbogenizált aCSF-fel perfundáltuk, szobahőmérsékleten. A kísérlet megkezdése előtt az agyszeletet 15 percig pihentettük. Szeletenként egy sejt került teljes sejt (whole-cell) patch-clamp mérésre.

3.3.3.2 Teljes sejt (whole-cell) patch-clamp felvétel

A mediális PFC V. rétegének piramis sejtjei egy, 40x vízimmerziós objektívvel felszerelt „upright” (egyenes állású) elrendezésű mikroszkóp segítségével lettek megjelenítve (Axioscope FS; Carl Zeiss). A boroszilikát üvegből készült kapillárisokat IC oldattal töltöttük meg (összetétel mM-ban: C₆H₁₁KO₇/ káliumglükonát 140, NaCl 10, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 11, Mg-ATP 1,5, Li-GTP 0,3; KOH oldattal beállított pH 7.3). A pipetta ellenállások 5-7 MΩ közötti tartományban voltak. A teljes sejt hozzáférés létrehozása után 5-10 percig várakoztunk, hogy beálljon a diffúziós egyensúly a patch pipetta és a sejt belseje között. Az áramok -70 mV-on tartott potenciál mellett kerültek rögzítésre, a patch-clamp erősítő voltage-clamp üzemmódjában (Axopatch 200B; Molecular Devices). A kapott adatokat 2 kHz-nél szűrtük a patch-clamp erősítőbe (Axopatch 200B; Molecular Devices) beépített szűrő segítségével, 5 kHz-nél kerültek digitalizálásra, az adatok számítógépen DigiData 1200 interfész és pClamp 10.0 szoftverrel kerültek feldolgozásra (Molecular Devices).

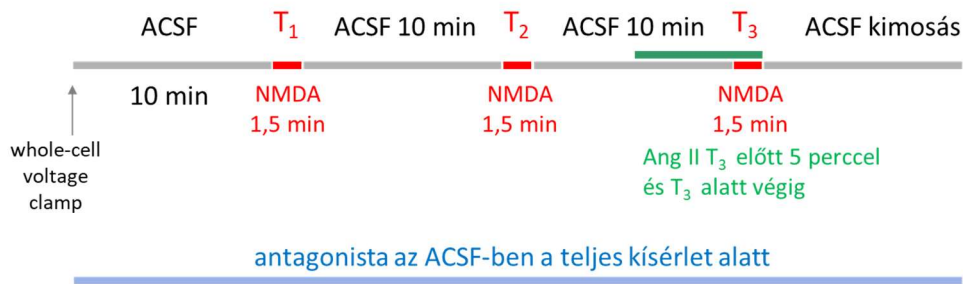
3.3.3.3 NMDA indukálta ionáramok mérése patch-clamp technikával patkány PFC-ben

Az NMDA, mint szelektív, NMDA-típusú glutamát receptor agonista, által kiváltott koncentráció-válasz görbék kerültek felvételre. 10 percenként 3 alkalommal egyenként 1,5 percig adott NMDA oldat (10-300 μM) a sejtbe irányuló áramokat váltott ki (T1-T3). Az NMDA adagolások közötti 10 perces periódusokban vegyületmentes aCSF-fel történő perfúziót végeztünk. Kontroll mérések során, a dózis-hatás görbe szerint a legstabilabb és reprodukálható áramokat 30 μM NMDA adásánál érték el (4. ábra). A kísérletek során az áramok nagymértékű variabilitása miatt a hatásokat T3/T2 hányadosként ábrázoltuk, a kontroll mérések alapján 15%-nál nagyobb eltérést értékeltünk serkentő, illetve gátló hatásként. A T3/T2 hányadosokat átlag \pm SEM-ként összegeztük.



4. ábra. Az NMDA dózis-hatás görbe. 10 percenként 3 alkalommal egyenként 1,5 percig adott NMDA oldat (10-300 μM) a sejtbe irányuló áramokat váltott ki (T1-T3). A legstabilabb és reprodukálható áramokat 30 μM NMDA adásánál érték el.

Az Ang II vizsgálatokor a vegyületeket T₃ előtt 5 perccel kezdtük adni. Antagonista, illetve TTX alkalmazása esetén, azok a teljes mérés alatt az aCSF-ben voltak. A Ca²⁺-függés vizsgálata során a teljes kísérlet alatt Ca²⁺-mentes aCSF-et alkalmaztunk (5. ábra).

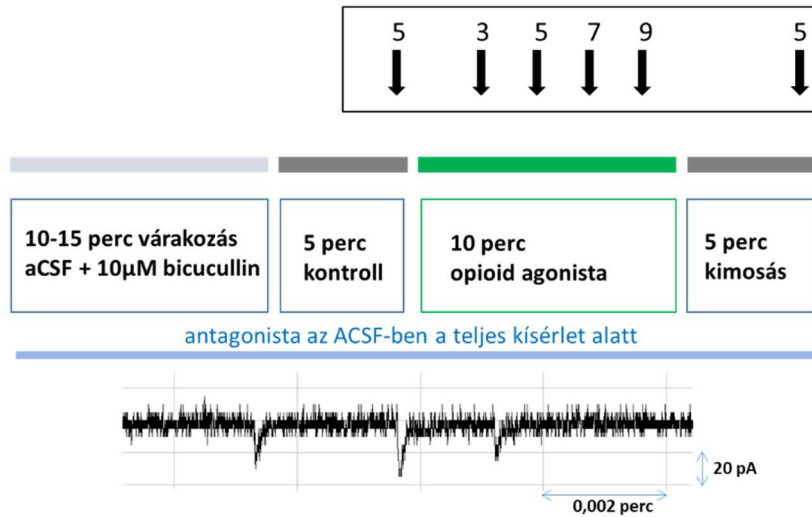


5. ábra. Az NMDA indukálta ionáramok mérésének menete. Részletes leírást ld. a szövegben.

3.3.3.4 Az opioid vegyületek hatása a glutamáterg neurotranszmisszióra spontán excitatórikus posztszinaptikus áramok (sEPSC) mérésével

A fent részletezett preparálást követően, a mérés előtt 15 perccel, az alacsony Mg²⁺ és magas Ca²⁺-tartalmú aCSF-hez (összetétel mM-ban: NaCl 126, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 3,6, MgCl₂ 0,1, NaHCO₃ 25, glükóz 11; pH 7.4) GABA_A receptor antagonist bicucullint (10 μM) adtunk, a GABA_A receptor mediálta gátló posztszinaptikus áramok (IPSC) kiküszöbölésére. Az opioid agonista morfin-hidrokloridot és a 14-*O*-metilmorfin-6-szulfátot (14-*O*-MeM6SU) a 15 perces kontroll periódust követően 10 percen keresztül alkalmaztuk. Antagonista vizsgálatokor az a teljes mérés alatt az aCSF-ben volt. Az sEPSC-k amplitúdó és frekvencia eloszlását pClamp 10.0 szoftverrel (Molecular Devices) elemeztük. A szoftver a küszöbértéket meghaladó amplitúdók alapján detektálja a sEPSC-eket. Az alapzaj alapján a küszöbértéket -5 pA-nél határoztuk meg és az sEPSC-eket vizuális ellenőrzés mellett értékeltük. Az sEPSC-k amplitúdóinak és frekvenciájának átlagértékeit a kontroll utolsó percében, illetve az agonisták alkalmazásának 3., 5., 7. és

9., valamint a kimosási fázis 5. percében határoztuk meg (6. ábra). Az adatokat a kontroll érték alapján normalizáltuk.



6. ábra. Az sEPSC-k mérésének menete. Részletes leírást ld. a szövegben.

3.4 Statisztika

A szuperfúziós kísérleteknél a statisztikai értékeléshez egyutas ANOVA tesztet, (Dunnett post hoc teszt), Student féle kétmintás t-próbát és páros t-próbát alkalmaztunk.

A patch-clamp méréseknél Kruskal-Wallis ANOVA tesztet (Dunn post hoc teszt) alkalmaztunk.

Az eredményeket, mint az átlag \pm S.E.M. fejeztük ki, n a kísérletek számát, p a szignifikanciát, jelöli. Statisztikailag szignifikáns eltérésnek $p < 0,05$ értéket tekintettük.

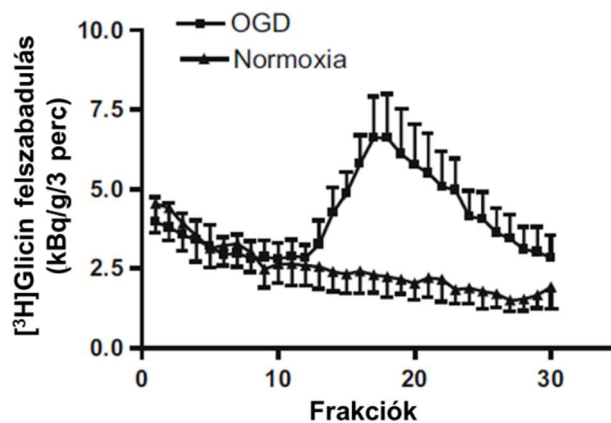
4 Eredmények

4.1 Glicin felszabadulás vizsgálata patkány retinában

4.1.1 OGD-indukálta [³H]glicin felszabadulás patkány retinából

A 60 perces kimosási fázist követően a szöveti [³H]glicin tartalom $172,05 \pm 25,73$ kBq/g ($n=4$) volt. A kimosási fázis után egy 90 perces frakciógyűjtés következett, a teljes [³H]glicin felszabadulás ezen idő alatt $120,99 \pm 20,85$ kBq/g volt. A retina szövetében $51,07 \pm 5,19$ kBq/g [³H]glicin maradt a szuperfúziót követően. A 60 perces kimosás után a spontán [³H]glicin kiáramlás $3,96 \pm 0,78$ kBq/g volt 3 percenként, az egész kísérlet alatt ilyen arányú maradt.

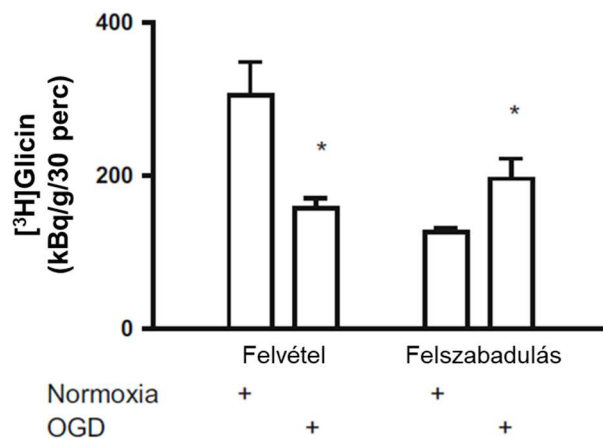
OGD alatt a [³H]glicin kiáramlás megemelkedett, egy csúcs elérése után exponenciálisan lecsökkent a stimuláció előtti értékre. Ez idő alatt a [³H]glicin felszabadulás $2,86 \pm 0,51$ kBq/g/3 percről $7,17 \pm 1,23$ kBq/g/3 perc értékre emelkedett az OGD hatására ($p < 0,05$, $n=4$). Ezen kiáramlási értékek megfeleltek a frakcionális [³H]glicin felszabadulásnak, $1,96 \pm 0,12$ és $6,33 \pm 0,35\%$ -a a 3 perc alatt felszabadult szöveti [³H]glicin tartalomnak. A nettó OGD indukálta [³H]glicin felszabadulás (kiváltott felszabadulás és a nyugalmi felszabadulás különbsége) $28,39 \pm 3,78$ kBq/g volt (7.ábra).



7. ábra. Az OGD hatása a [³H]glicin felszabadulásra patkány retinából. A retinát tartalmazó hátsó szemszerlegetek [³H]glicin izotóppal töltöttük és áramoltattuk. A karbogenizált Krebs oldatot (95% O₂/5% CO₂, 37°C, pH 7.4) a 10. frakciótól a kísérlet végéig glukózmentes Krebs oldatra (95% N₂/5% CO₂) cseréltük. Az OGD indukálta [³H]glicin felszabadulás 28,39±3,78 kBq/g volt. A normoxiás körülmények között mérhető [³H]glicin felszabadulást szintén jelöltük. Az adatok az átlagot a szórást mutatják (± SEM, n=4).

4.1.2 OGD hatása a [³H]glicin felvételre és kiáramlásra patkány retinában

Az OGD csökkentette a [³H]glicin felvételét, bár még ezen kísérleti körülmények között is volt szignifikáns mennyiségű [³H]glicin felvétel a szövetbe. A párhuzamos kísérletben az OGD megnövelte a [³H]glicin effluxot, hasonlóan az előző kísérlethez. Tehát az OGD ellentétes hatásokat fejtett ki a [³H]glicin felvételre és kiáramlásra a retina preparátumokon (8. ábra).

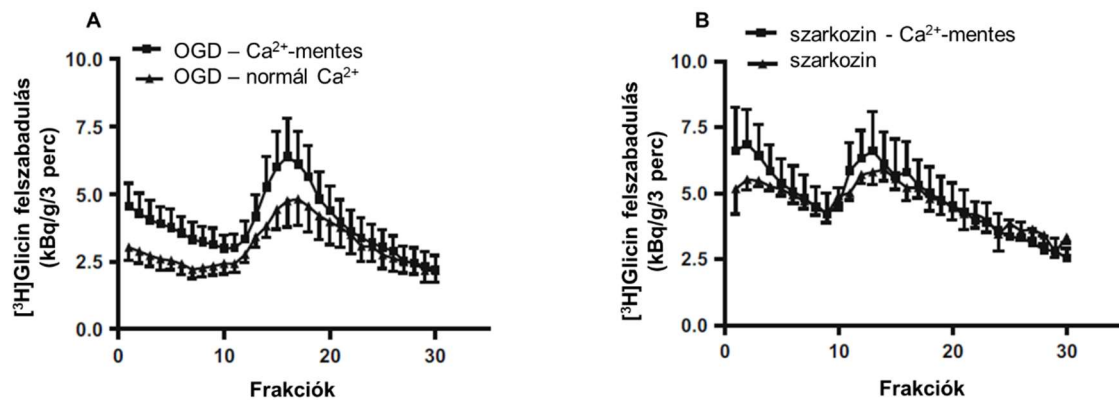


8. ábra. Az OGD ellentétes hatásai a [³H]glicin felvételre és kiáramlásra patkány retinában. A [³H]glicin felvétel vizsgálatára irányuló kísérletekben a retinát tartalmazó hátsó szemszerlegetek [³H]glicin izotóppal töltöttük és karbogenizált Krebs oldatban (95%

O₂/5% CO₂, 37°C, pH 7.4) vagy glukózmentes Krebs oldatban (95% N₂/5% CO₂) inkubáltuk. A felvett [³H]glicin mennyisége egy 30 perces inkubációs periódust követően került meghatározásra (szöveti radioaktivitás tartalom). A [³H]glicin kiáramlás vizsgálatára irányuló kísérletekben a töltés és az inkubáció a fent leírtak szerint történt. A [³H]glicin kiáramlás mennyiségének meghatározása az inkubációs oldatba egy 30 perces periódust követően történt. Statisztikai analízishez kétmintás Student's t-tesztet alkalmaztunk, **p* < 0.05, az ábra az átlagot a szórást mutatja (± SEM, n=4).

4.1.3 OGD-indukálta [³H]glicin felszabadulás külső Ca²⁺-függése patkány retinában

Eredményeink szerint az OGD akkor is képes volt [³H]glicin felszabadulást indukálni, ha Ca²⁺-mentes Krebs oldatot használtunk és 1 mmol/ EGTA-t adtunk a szuperfúzióhoz használt oldathoz. Ezekben a kísérletekben a [³H]glicin felszabadulás 26,06±3,11 és 26,13±6,33 kBq/g volt Ca²⁺ jelenlétében és hiányában (*p* > 0,90, n=6-7) (9. ábra, A).



9. ábra. A: OGD indukálta [³H]glicin felszabadulás külső Ca²⁺-függése patkány retinában. A [³H]glicin felszabadulás meghatározása normoxiás és OGD körülmények között, Ca²⁺-t tartalmazó, illetve -mentes oldat használatával történt. Az OGD kiváltására a karbogenizált Krebs oldatot (95% O₂/5% CO₂, 37°C, pH 7.4) a 10. frakciótól a kísérlet végéig glukózmentes Krebs oldatra (95% N₂/5% CO₂) cseréltük. Az ábrán megfigyelhető, hogy a [³H]glicin nyugalmi felszabadulása Ca²⁺-mentes oldat alkalmazásakor magasabb

volt. **B:** A szarkozin indukálta [³H]glicin felszabadulás külső Ca²⁺-függése patkány retinában. A szarkozint 10 mmol/l koncentrációban alkalmaztuk a 10. frakciótól a kísérlet végéig. A [³H]glicin felszabadulás Ca²⁺-t tartalmazó, illetve -mentes oldat használatával történt. Az ábra az átlagot a szórást mutatja (± SEM, n=4-7).

4.1.4 A szarkozin hatása a [³H]glicin felszabadulásra patkány retinában

A transzportálódó GlyT-1 inhibitor szarkozin (10 mmol/l) megnövelte a [³H]glicin felszabadulást patkány retinából. A szarkozin ezen hatása külső Ca²⁺-tól függetlennek bizonyult. Ca²⁺ jelenlétében a [³H]glicin felszabadulás 14,76±3,15 kBq/g volt, míg Ca²⁺-mentes környezetben 16,83±4,09 kBq/g (p>0,70, n=4-4) (9. ábra, B). A szarkozin koncentrációfüggő módon indukálta a [³H]glicin felszabadulást, a koncentrációt 3 mmol/l-ról 10 mmol/l-re emelve megemelkedett a [³H]glicin felszabadulás (9. ábra, B: 10 mmol/l, 10. ábra, B: 3 mmol/l szarkozin koncentráció).

A nem transzportálódó, nem-kompetitív NFPS 10 μmol/l koncentrációban alkalmazva meggátolta a 3 mmol/l koncentrációban alkalmazott szarkozin [³H]glicin felszabadító hatását (10. ábra, B). A felszabadult [³H]glicin mennyisége NFPS nélkül 8,53±0,97 kBq/g, míg NFPS jelenlétében 1,28±0,16 kBq/g volt (p<0,001, n=6-4).

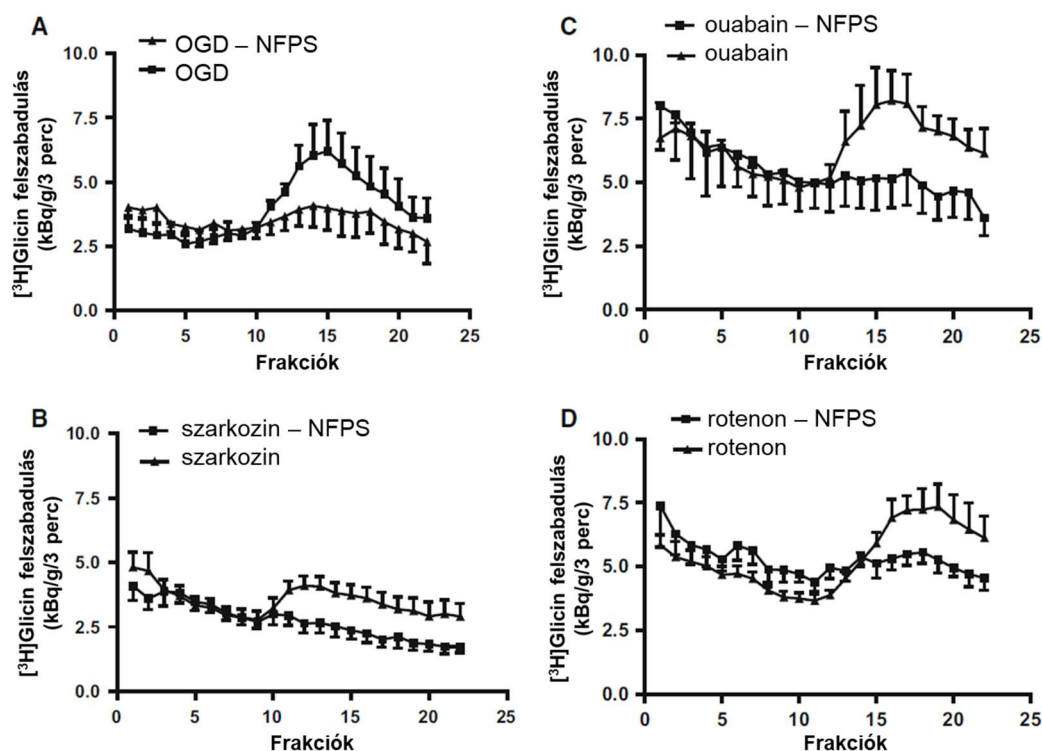
4.1.5 A nem transzportálódó GlyT-1 inhibitorok hatása OGD-indukálta [³H]glicin felszabadulásra patkány retinában

A nem transzportálódó, nem szubsztrát típusú GlyT-1 inhibitorok, a szarkozin alapú, nem-kompetitív NFPS és a nem-szarkozin alapú, kompetitív ACPPB (mindkét vegyület 1 μmol/l koncentrációban alkalmazva) csökkentette az OGD okozta [³H]glicin felszabadulást (10. ábra, A; 1. táblázat). Normoxiás körülmények között egyik nem transzportálódó, nem szubsztrát típusú GlyT-1 inhibitor vegyület sem befolyásolta a nyugalmi [³H]glicin felszabadulást (1. táblázat). Az 1. táblázatban látszik, hogy korábbi, patkány kérgi szinaptoszómákban történt mérések alapján (124), a vegyületek 11 nmol/l

IC₅₀ értéknél gátolták a GlyT-1-t. A gyenge, nem transzportálódó GlyT-1 inhibitor SzV-2248 (1 µmol/l) hatástalannak bizonyult az OGD okozta [³H]glicin felszabadulás csökkentésében (1. táblázat). Továbbá az EAAT inhibitor TBOA (10 µmol/l) sem gátolta az OGD okozta [³H]glicin felszabadulást (1. táblázat).

1. táblázat. A nem transzportálódó GlyT-1 gátlók hatása a nyugalmi és az OGD indukálta [³H]glicin felszabadulásra patkány retinában. A retinát tartalmazó hátsó szemserlegeket [³H]glicin izotóppal töltöttük. A nyugalmi [³H]glicin felszabadulás vizsgálatánál karbogenizált Krebs oldattal (95% O₂/5% CO₂, 37°C, pH 7.4) áramoltattuk. Az OGD hatás vizsgálatánál a karbogenizált Krebs oldatot a 10. frakciótól a kísérlet végéig glukózmentes Krebs oldatra (95% N₂/5% CO₂) cseréltük. A vegyületeket mindkét esetben az 5. frakciótól kezdve adtuk a kísérlet végéig. Statisztikai analízishez egyutas ANOVA tesztet, (Dunnett post hoc teszt) alkalmaztunk, a nyugalmi [³H]glicin felszabadulás: $F(3,12)=1.095$, $P=0.389$ a kontroll nyugalmi felszabaduláshoz viszonyítva; az OGD indukálta [³H]glicin felszabadulás: $F(4,17)=8.679$, $P=0.005$; * $P < 0.05$ a kontroll OGD indukálta felszabaduláshoz viszonyítva. Student féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk a kezeletlen és kezelt csoportokban normoxiában és OGD körülmények között # $P < 0.05$. NM: nem meghatározott. Az adatok az átlagot a szórás mutatják (\pm SEM, n=3-7). Az IC₅₀ értékek Hársing és mtsai korábbi közleményében lettek meghatározva (124).

Vegyület	Koncentráció (µmol/L)	[³ H]Glicin felszabadulás (kBq/g)	GlyT-1 gátlás (IC ₅₀ , µmol/L)
<i>Nyugalmi [³H]glicin felszabadulás</i>			
1. Nyugalmi kontroll	-	0.24 ± 0.04	-
2. NFPS	1	0.15 ± 0.06	0.011 ± 0.003
3. ACPPB	1	0.37 ± 0.06	0.011 ± 0.001
4. SzV-2248	1	NM	3.09 ± 0.01
5. TBOA	10	0.25 ± 0.12	NM
Vegyület	Koncentráció (µmol/L)	[³ H]Glicin felszabadulás (kBq/g)	Szignifikancia (P)
<i>OGD-indukálta [³H]glicin felszabadulás</i>			
6. OGD kontroll	-	23.85 ± 3.25 [#]	1:6 < 0.001
7. OGD – NFPS	1	1.42 ± 0.48 ^{*,#}	2:7 < 0.05
8. OGD – ACPPB	1	1.49 ± 0.42 ^{*,#}	3:8 < 0.05
9. OGD – SzV-2248	1	30.59 ± 7.62	4:9 NM
10. OGD - TBOA	10	32.95 ± 10.61 [#]	5:10 < 0.05



10. ábra. Az NFPS gátló hatása **A**: az OGD indukálta $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulásra; **B**: a szarkozin (3 mmol/l) indukálta $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulásra; **C**: az ouabain (20 $\mu\text{mol/l}$) indukálta $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulásra; **D**: a rotenon (20 $\mu\text{mol/l}$)/2-DG (2 mmol/l) indukálta $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulásra patkány retina preparátumból. A $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulást OGD körülmények vagy az alkalmazott hatóanyagok váltották ki, utóbbiakat a 10-22. frakcióig tartalmazta a pufferoldat. Az NFPS-t az 5. frakciótól a kísérlet végéig tartalmazta a pufferoldat. Az NFPS koncentrációja OGD alatt 1 $\mu\text{mol/l}$, szarkozin alkalmazásakor 10 $\mu\text{mol/l}$, ouabain és rotenon alkalmazásakor 0,3 mmol/l volt. Az ábra az átlagot a szórást mutatja (\pm SEM, $n=3-6$).

4.1.6 Az ouabain hatása a $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulásra patkány retinában

Ebben a kísérleti elrendezésben a Na^+/K^+ -ATP-áz inhibitor ouabaint használtuk az energiadepléción és a $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulás kapcsolatának vizsgálatára. Az ouabain 20 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva a $[^3\text{H}]$ glicin felszabadulás több, mint 50%-os emelkedését okozta. Ha az NFPS-t 15 perccel az ouabain adása előtt kezdtük, 0,3 mmol/l

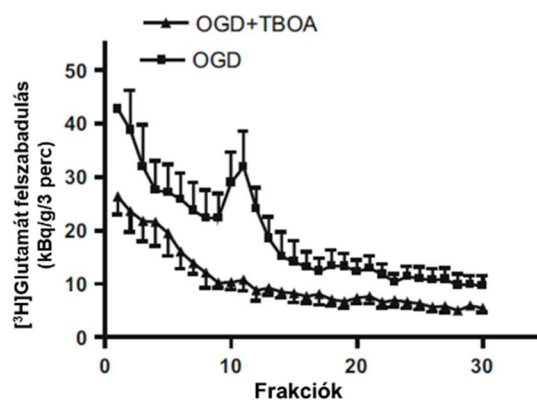
koncentrációban, akkor azt tapasztaltuk, hogy meggátolta az ouabain indukálta [^3H]glicin kiáramlást (10. ábra, C). Az ouabain indukálta [^3H]glicin felszabadulás $10,46 \pm 2,57$ kBq/g és $3,17 \pm 0,65$ kBq/g volt NFPS nélkül és jelenlétében ($p < 0,05$, $n=3-4$).

4.1.7 A rotenon hatása a [^3H]glicin felszabadulásra patkány retinában

A mitokondriális komplex I gátló rotenon ($20 \mu\text{mol/l}$) és a Krebs oldatban glükóz helyett alkalmazott glikolízis inhibitor 2-DG (2 mmol/l) jelenlétében megnőtt a [^3H]glicin felszabadulás. $0,3 \text{ mmol/l}$ koncentrációban alkalmazott NFPS meggátolta ezt a hatást (10. ábra, D). A [^3H]glicin mennyisége $11,29 \pm 1,65$ és $4,65 \pm 0,49$ kBq/g volt NFPS nélkül és jelenlétében ($p < 0,01$, $n=4-4$).

4.1.8 OGD hatása a [^3H]glutamát felszabadulásra patkány retinában

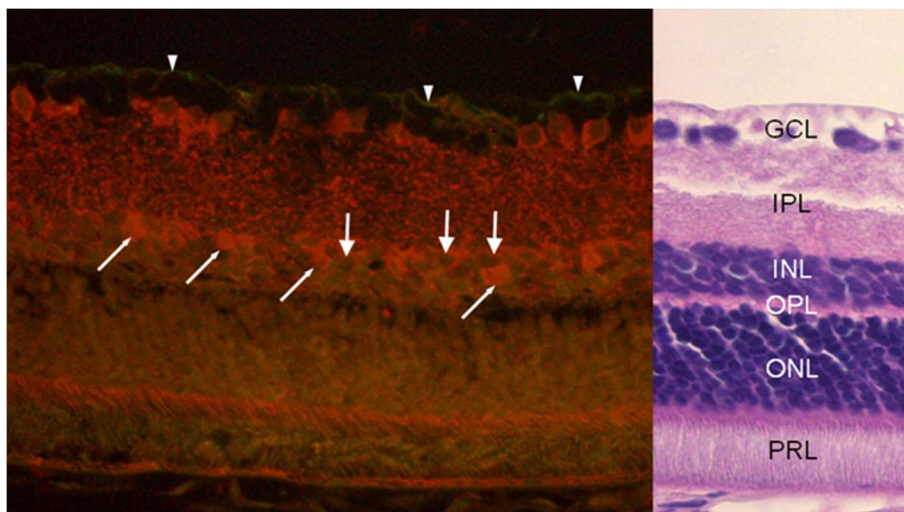
Kísérleteink egy másik részében a retinát tartalmazó hátsó szemserlegeket [^3H]glutamáttal inkubáltuk és ennek a felszabadulását néztük nyugalomban és OGD körülmények között. Az OGD megnövelte a [^3H]glutamát felszabadulását. Ezt a hatást a széles spektrumú excitátoros aminosavtranszporter inhibitor TBOA ($10 \mu\text{mol/l}$) jelentősen csökkentette, a felszabadult [^3H]glutamát mennyisége $28,25 \pm 7,66$ kBq/g-ról $4,65 \pm 0,49$ kBq/g-ra csökkent ($p < 0,05$, $n=4-4$) (11. ábra). Ahogy korábban bemutattuk a TBOA nem befolyásolta az OGD indukálta [^3H]glicin felszabadulást (1. táblázat).



11. ábra. OGD indukálta [^3H]glutamát felszabadulás patkány retina preparátumból. A TBOA meggátolta a fokozott [^3H]glutamát felszabadulást. A TBOA-t 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk az 5-30. frakcióig. Az ábra az átlagot a szórást mutatja (\pm SEM, n=4-4).

4.2 A GlyT-1 immunhisztokémiai jelölése a retina sejtjeiben

GlyT-1 immunoreaktivitás volt megfigyelhető a patkány retina belső nukleáris rétegében lévő amakrin sejtek sejttesteiben, illetve a belső plexiform rétegben lévő dendritekben. Szintén észlelhető volt GFAP immunoreaktivitás, illetve GlyT-1 jelölés a Müller gliasejteken (12. ábra). A patkány retina vertikális metszetén GFAP immunofluoreszcencia volt látható a külső és belső plexiform rétegben, a belső nukleáris rétegben és az idegrostrétegében. Így a GlyT-1 immunoreaktivitásának megjelenése a glicinerg amakrin sejteken és a Müller gliasejteken megerősíti eddigi eredményeinket.



12. ábra. Müller gliasejtek és glicinerg amakrin sejtek GlyT-1 expressziója patkány retinában. Patkány retina vertikális metszetén GFAP (zöld) és GlyT-1 (piros) megjelenítésére immunjelölést alkalmaztunk. A Müller gliasejtek GFAP immunoreaktivitást (sejttest – vékony nyíl, axonterminális – nyílhegy) és GlyT-1 festődést is mutatnak. A GlyT-1 expressziója a glicinerg amakrin sejteken is

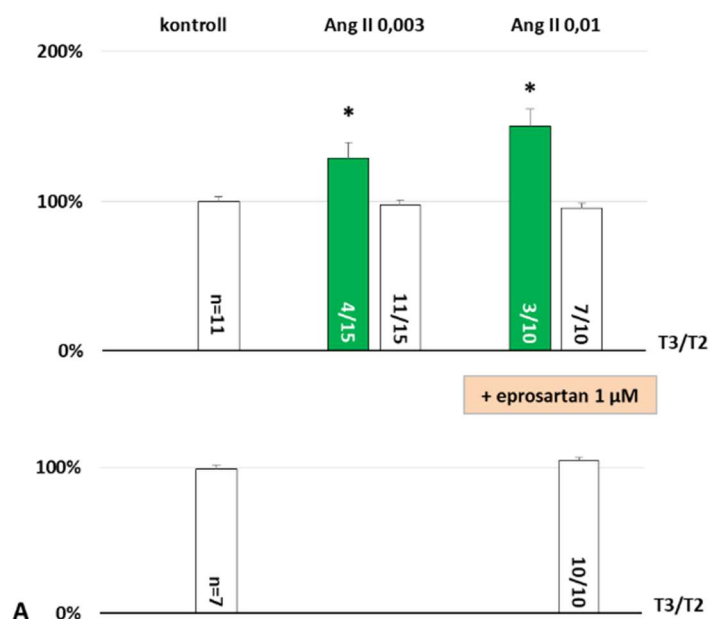
megfigyelhető (vastag nyíl). A hematoxinin-eozinnal festett vertikális retina metszet mutatja a retina rétegeit. GCL: ganglionsejtréteg, IPL: belső szemcsés réteg, INL: belső magvas réteg, OPL: külső szemcsés réteg, ONL: külső magvas réteg, PRL: fotoreceptor réteg; (Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Dr. Albert Mihály végezte.)

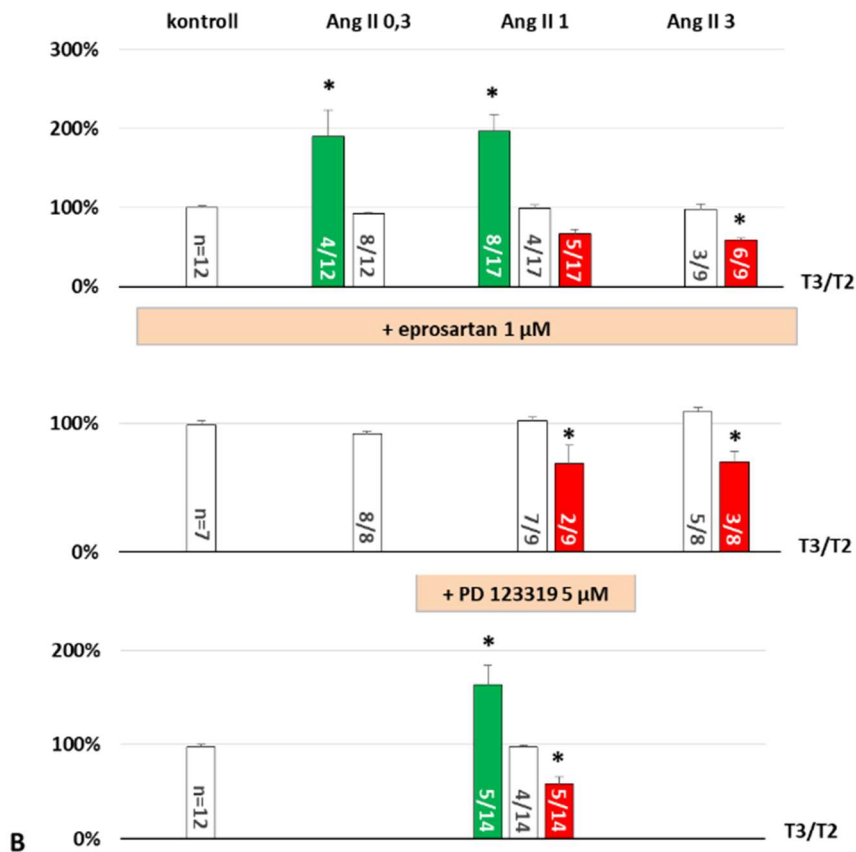
4.3 Ang II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein

4.3.1 Az Ang II különböző koncentrációinak (0,003-3 μM) hatása az NMDA áramokra

Az Ang II serkentő hatást váltott ki az NMDA áramokra a piramissejték egy részén 0,003-1 μM koncentrációtartományban. A fiziológiás szintet megközelítő 0,003 μM , 0,01 μM , illetve az annál magasabb 0,3 μM koncentrációknál a sejtek hozzávetőlegesen egyharmadánál serkentést láttunk, míg másik részükben az Ang II nem váltott ki hatást (13. ábra A-B).

1 μM Ang II a sejtek felének NMDA áramait fokozta, negyedén gátló hatást fejtett ki, a maradékon nem volt megfigyelhető hatás (13. ábra, B). 3 μM koncentrációban alkalmazott Ang II egyes sejteken szintén gátolta az NMDA áramokat (13. ábra, B).





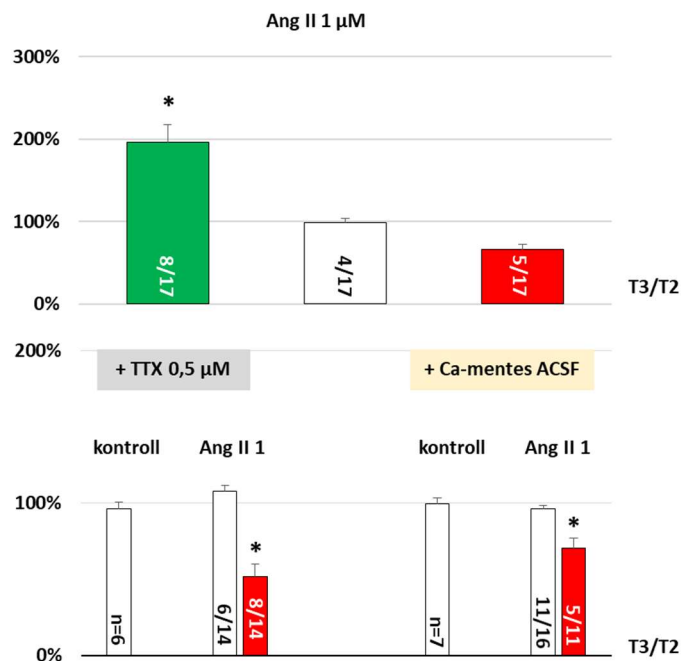
13. ábra. Az Ang II különböző koncentrációinak (0,003-3 μM) hatása az NMDA indukálta ionáramokra. 10-12 napos patkányok PFC V. rétegének piramis sejteinek whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre. 10 percenként, 3 alkalommal, egyenként 1,5 percenként adott NMDA (30 μM) a sejtbe irányuló áramokat hozott létre (T1, T2, T3). Az NMDA adagolások közötti 10 perces periódusokban aCSF-fel történő perfúziót végeztünk. Az Ang II vizsgálatokat az 5 perccel T3 előtt kezdtük és adtuk T3 alatt végig. Antagonista alkalmazásakor az az egész mérés alatt az oldatban volt. A hatásokat T3/T2 hányadosként ábrázoltuk. A T3/T2 hányadosokat átlag \pm S.E.M.-ként összegeztük, n a sejtek számát, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,05$, statisztikai analízisre Kruskal-Wallis ANOVA-t és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk. **A:** 0,003-0,01 μM Ang II hatása az NMDA (30 μM) áramokra, illetve AT1R antagonistá eprosartan (1 μM) vizsgálata. **B:** 0,3-3 μM Ang II hatása az NMDA (30 μM) áramokra, illetve az AT1R antagonistá eprosartan (1 μM) és az AT2R antagonistá PD 123319 (5 μM) hatásának vizsgálata.

4.3.2 Angiotenzin-receptor antagonisták hatása az Ang II NMDA áramokat potenciózó hatására

Az AT1R antagonistá eprosartan (1 μM) az Ang II (0,01-1 μM) serkentő hatását felfüggesztette, míg a gátlást nem befolyásolta (13. ábra, A-B). Az AT2R antagonistá PD 123319 (5 μM) nem befolyásolta sem a serkentést, sem a gátlást (13. ábra, B).

4.3.3 A sejtek szinaptikus izolációjának hatása az Ang II NMDA áramokat potenciózó hatására

További kísérleteinkben a feszültségfüggő Na^+ -csatorna gátló TTX-t (0,5 μM) és Ca^{2+} -mentes aCSF-t alkalmaztunk a jelátvitel vizsgálatára, melyek a serkentő hatást felfüggesztették, míg a gátlást nem befolyásolták (14. ábra).

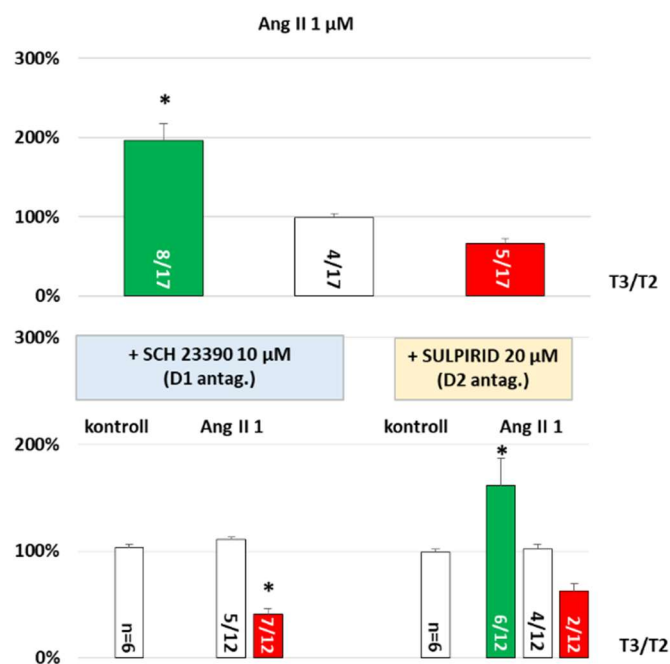


14. ábra. TTX és Ca^{2+} -mentes aCSF hatása az NMDA (30 μM) indukálta ionáramokra 1 μM Ang II alkalmazása mellett. A kísérlet a fentiek szerint zajlott. A TTX (0,5 μM) alkalmazása esetén, az a teljes mérés alatt az aCSF-ben voltak. A Ca^{2+} -függés vizsgálata

során a teljes kísérlet alatt Ca^{2+} -mentes aCSF-et alkalmaztunk. A hatásokat T3/T2 hányadosként ábrázoltuk. A T3/T2 hányadosokat átlag \pm S.E.M.-ként összegeztük, n a sejtek számát, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,05$, statisztikai analízisre Kruskal-Wallis ANOVA-t és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk.

4.3.4 Dopamin-receptor antagonisták hatása az Ang II NMDA áramokat potencírozó hatására

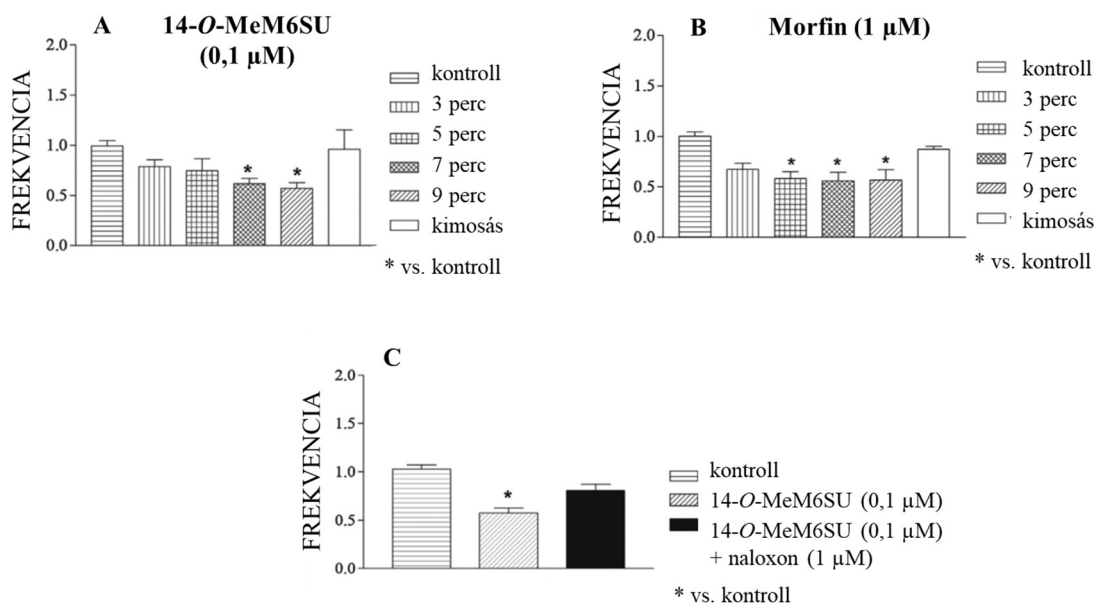
A serkentő hatást a DRD1 antagonistá SCH-23390 (10 μM) felfüggesztette, míg a DRD2 antagonistá sulpirid (20 μM) nem befolyásolta (15. ábra). A gátlásra egyik vegyületnek sem volt hatása.



15. ábra. Dopamin receptor antagonisták hatása az NMDA (30 μM) indukálta ionáramokra 1 μM Ang II alkalmazása mellett. A kísérlet a fentiek szerint zajlott. A D1DR antagonistá SCH 23390 (10 μM) és a D2DR antagonistá sulpirid (20 μM) alkalmazása esetén, azok a teljes mérés alatt az aCSF-ben voltak. A hatásokat T3/T2 hányadosként ábrázoltuk. A T3/T2 hányadosokat átlag \pm S.E.M.-ként összegeztük, n a sejtek számát, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,05$, statisztikai analízisre Kruskal-Wallis ANOVA-t és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk.

4.4 Az opioid vegyületek hatása a spontán excitatórikus posztzinaptikus áramokra (sEPSC) patkány PFC V. rétegének piramissejtjein

0,1 μM morfin, alacsony Mg^{2+} és magas Ca^{2+} -tartalmú aCSF-ben, GABA_A receptor antagonistá bicucullin (10 μM) jelenlétében, nem befolyásolta sem az sEPSC-k amplitúdóját, sem a frekvenciáját a kontroll mérésekhez viszonyítva. 1 μM koncentrációban alkalmazott morfin azonban szignifikánsan csökkentette az sEPSC-k frekvenciáját az 5., 7., 9. percben, de nem befolyásolta az amplitúdót (16. ábra, B). A 14-*O*-MeM6SU 0,1 μM -ban alkalmazva, a morfinhoz hasonlóan, csökkentette az sEPSC-k frekvenciáját, de nem befolyásolta az amplitúdót (16. ábra, A). A nem-szelektív, kompetitív opioid receptor antagonistá naloxon (1 μM) gátolta a 14-*O*-MeM6SU sEPSC frekvenciát csökkentő hatását (16. ábra, C).



16. ábra. Opioid agonisták és antagonistá hatása a sEPSC-kre patkány PFC V. rétegének piramissejtjein. **A, B:** 0,1 μM 14-*O*-MeM6SU és 1 μM morfin csökkentette az sEPSC-k frekvenciáját. Az egyes percek frekvencia értékének átlagai a kontroll mérés 5. percének frekvencia értékére lett normalizálva. **C:** 1 μM naloxon gátolta a 0,1 μM 14-*O*-MeM6SU által létrehozott sEPSC frekvencia csökkentést. A 9. perc frekvencia értékének átlaga a

kontroll mérés 5. percének frekvencia értékére lett normalizálva. Az adatok átlag \pm S.E.M.-et, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,05$, statisztikai analízisre Kruskal-Wallis ANOVA-t és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk.

5 Megbeszélés

5.1 A [³H]glicin felszabadulás és a GlyT gátlók hatásának vizsgálata patkány retinából

Kísérleteink legfőbb tanulsága, hogy energiamegvonás hatására a retina neuronjaiból és gliasejtjeiből a GlyT-1 fordított transzportjával glicin szabadul fel. A nem transzportálódó GlyT-1 gátlók csökkentik ezt a glicin felszabadulást és az NMDA receptorok túlzott stimulálásának gátlása útján neuroprotektív hatásúak lehetnek.

5.1.1 Az OGD hatása a [³H]glicin felszabadulásra patkány retinából

Ismert tény, hogy ischaemiás körülmények hatására fokozódik az excitátoros aminosav felszabadulás a neuronokból és a gliasejtekből. Az így felszabaduló neurotranszmitterek a receptoraik túlműködését okozva neurodegeneratív folyamatokat indíthatnak el a KIR-ben és a retinában. A megnövekedett IC Ca^{2+} koncentráció, az oxigén szabadgyökök, a mitokondriális károsodás, a fehérje-, nukleinsav- és foszfolipid-degradáció együttesen ischaemiás károsodáshoz, idegsejt pusztuláshoz vezethet (125). Az előbb említett események kiváltásában a glutamát/glicin aktiválta NMDA receptor mediálta glutamáterg transzmisszió kiemelkedő jelentősége van (126).

Kísérleteinkben az OGD fokozott glicin felszabadulást váltott ki, ami az energiahányos állapot következménye lehet. Ezen felszabadulás mögött több folyamat állhat, ilyen a Na^+/K^+ -ATP-áz gátlása, a következményesen megemelkedett IC Na^+ koncentráció és a Na^+ -függő GlyT-1 működésének megfordulása. Már korábban kimutatták, hogy ischaemiában, az emelkedett IC Na^+ koncentráció hatására, a neurotranszmitterek csatornái fordítottan működhetnek (127). Energiahiányos állapotban, a transzmembrán Na^+ gradiens összeomlásával a fordított működésű GlyT-1 fokozott glicin kiáramlást okozhat a szinaptikus és extraszinaptikus térbe.

Az OGD hatására kialakuló fokozott [³H]glicin felszabadulás mechanizmusát a következő megfigyelések magyarázhatják. Egyrésztől kísérleteinkből igazolódott, hogy

a [^3H]glicin felszabadulás Ca^{2+} -tól független módon zajlott, míg általánosan elfogadott, hogy a vezikuláris neurotranszmitter felszabadulás külső Ca^{2+} jelenlétéhez kötött (128). Másrészt alátámasztja a GlyT-1 szerepét a [^3H]glicin kiáramlásban az is, hogy két, szerkezetileg különböző, nem transzportálódó GlyT-1 inhibitor, a nem-kompetitív NFPS és a kompetitív ACPPB is gátolta az OGD indukálta [^3H]glicin felszabadulást a retinából. Az NFPS és az ACPPB eltérő kinetikája alapján, mind a nem-kompetitív, mind a kompetitív GlyT-1 gátlók kiváltják ezt a hatást (124). Harmadrészt pedig a szerkezetileg hasonló, de elhanyagolható GlyT-1 gátló hatással rendelkező GlyT-1 inhibitor, NFPS analóg, SZV-2248, nem gátolta az OGD indukálta [^3H]glicin felszabadulást. Ezen megfigyelés alapján összefüggés lehet a hatóanyagok GlyT-1 gátló potenciálja és az OGD indukálta glicin felszabadulásra kifejtett gátló hatásuk között. Pinto és mtsai leírták, hogy az NFPS által létrehozott GlyT-1 gátlás prekondicionáló hatásként neuroprotektív lehet egér hippocampusban (129).

Kísérleteinkben, mindemellett, azt is demonstráltuk, hogy ischaemiás körülmények között, hasonlóan a glutamát transzporterek működéséhez, a GlyT-1 normál módú működése is megfigyelhető, mivel vizsgálataink során OGD körülmények között is tapasztaltunk [^3H]glicin felvételt (130, 131). Bemutattuk továbbá, hogy hipoxiás retinában a GlyT-1 normál és fordított működésének egyensúlya a fordított működés felé tolódik el és, hogy ezt a felborult egyensúlyt a GlyT-1 gátlók megváltoztathatják. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy az agyban és a retinában lévő GlyT-1-ek, az ischaemiás körülmények súlyosságától függően, neuroprotektív módból neurodegeneratív módba válhatnak, ahogy a hippocampusban levő glutamát transzporterek (132-134).

Befelé történő transzportot gátló endogén vagy exogén anyag esetén arra számíthatunk, hogy a hatóanyag a kifelé irányuló transzportot is gátolja. Azonban lehetséges, hogy egy anyag aszimmetrikusan befolyásolja a transzporter működését (135). A reverz transzportot, vagyis a felszabadulást gátló neurotranszmitter transzporter inhibitorok neuroprotektív hatásúak lehetnek (136). Ez igaz lehet a GlyT-1 működésével kapcsolatban is. Tehát azok a hatóanyagok, amelyek képesek különbözőképpen gátolni a GlyT-1 kétirányú működését, terápiás lehetőséget jelenthetnek ischaemiában (124).

Kísérleteinkből látszik, hogy normoxiás körülmények között a nem transzportálódó NFPS és az ACPPB nem befolyásolták a [^3H]glicin kiáramlást patkány retinából. Ezzel

ellentétben a transzportálódó, kompetitív, szubsztrát típusú GlyT-1 inhibitor szarkozin, a bazális [^3H]glicin felszabadulás koncentrációfüggő emelkedését váltotta ki (87). A szarkozin [^3H]glicin felszabadulást eredményező hatása heterocseremechanizmussal történhet, amikor egy hatóanyag megfordítja a transzporter működésének irányát és neurotranszmitter felszabadulást vált ki (137). Ez alapján a transzportálódó szarkozin a GlyT-1-en keresztül felvevődhet a neuronokba vagy gliasejtekbe és a transzporter reverz működését kiváltva következményes [^3H]glicin felszabadulást okoz. Azzal együtt, hogy ez a mechanizmus nem teljesen tisztázott, hasonlóságot mutathat az amfetamin által kiváltott trace-amin kapcsolt receptor (TAAR) mediálta katekolamin kiáramlás mechanizmusával (138). A kísérleteinkben bemutatott szarkozin okozta fokozott [^3H]glicin felszabadulás magyarázhatja az NMDA és szarkozin adását követően megfigyelt felgyorsult retinális ganglionsejt degenerációt (4).

5.1.2 Az IC Na^+ szint változása: [^3H]glicin felszabadulásra gyakorolt hatás patkány retinában

További kísérletekben az IC Na^+ koncentráció változásának hatását vizsgálatuk a [^3H]glicin felszabadulásra. Ismert tény, hogy a plazmamembránon belüli Na^+ koncentráció emelése csökkenti a kifelé irányuló transzport K_m értékét, ami a transzporterek fordított irányú működésének kedvez (139). Különböző kísérleti elrendezéseinkben a Na^+/K^+ -ATP-áz inhibitor ouabaint és a mitokondriális komplex I gátlásával neurotoxicitást okozó növényvédő rotenont használtuk az IC Na^+ koncentráció növelésére.

Az ouabain, mint Na^+/K^+ -ATP-áz inhibitor, gátolja a Na^+ kifelé irányuló transzportját, ezáltal megemeli az IC Na^+ koncentrációt és membránpolarizációt okoz, így ez a hatóanyag képes a citoplazmából történő neurotranszmitter felszabadításra (140). Kísérletünkben az ouabain masszív [^3H]glicin felszabadulást eredményezett a retinából, ez a hatás csirke Müller glia sejt kultúrában a nagy affinitású glicin felvétel gátlásával függött össze (141). Az ouabain glicin felszabadító hatása valószínűleg a transzport megfordításával történik, mivel az NFPS, az irreverzibilis, nem transzportálódó, nem-kompetitív GlyT-1 inhibitor, csökkentette a glicin felszabadulást. Az ouabain hatása

alátámasztja, hogy az emelkedett IC Na^+ koncentráció jelentős szerepet játszik a GlyT-1 fordított működésében és ezáltal a [^3H]glicin felszabadulásban. Az ouabain és az OGD nyugalmi [^3H]glicin felszabadulásra kifejtett hasonló hatása összefüggést sejtet a Na^+/K^+ -ATP-áz gátlás, az oxigén/glukóz hiány miatti sejt energiakárosodás, illetve a nem akciós potenciál által kiváltott [^3H]glicin felszabadulás között.

Kísérleteink másik csoportjában rotenonnal gátoltuk a sejt energiafüggő folyamatait és ezáltal megváltoztattuk az iongrádienszt a retinában. Ezekben a kísérletekben a Krebs oldatban lévő glükózt 2-DG-re cseréltük. A rotenon csökkentette a hippokampusz szeletek ATP tartalmát és növelte az IC Na^+ koncentrációt a cerebrokortikális szinaptoszómákban (142). Ez a sejttanyagszere inzulturn erősíthető volt a glikolízist gátló 2-DG-vel (143, 136). Amikor rotenont és 2-DG-t adtunk az oldathoz a GlyT-1 fordított működésének kedvező feltételek jöttek létre, ami fokozott [^3H]glicin felszabadulást eredményezett. Az NFPS teljesen megszüntette ezt a hatást. A glicin felszabadulás mechanizmusában szerepet játszik az energiamegvonás okozta Na^+/K^+ -ATP-áz gátlás és a következményes IC Na^+ felszaporodás, ami elősegíti a GlyT-1 Na^+ -függő reverz működését. Így a rotenon adására létrejövő emelkedett IC Na^+ koncentrációnak szintén szerepe lehet a rotenon hatására kialakuló retina degenerációban (144).

5.1.3 A GlyT-1 inhibitorok terápiás felhasználása ischaemiás retinadegenerációban

Már korábban kimutatták, hogy az NMDA receptorok különböző alegység összeállításban jelen lehetnek a retina ganglionsejteiben: GluN1/N2B NMDA receptorok nagyobb arányban fordultak elő az ON ganglionsejteken, míg az GluN1/N2A NMDA receptorokat mind az ON, mind az OFF ganglionsejtek dendritjein kimutatták (145). Ahogy korábban már kitértem rá, a különböző alegységekből felépülő NMDA receptorok elhelyezkedése is eltér, GluN1/N2B receptorok extraszinaptikusan helyezkednek el, a szinaptikus NMDA receptorok pedig főleg GluN1/N2A alegységekből állnak (146, 61). Az NMDA receptorok elhelyezkedése és a lokalizációs hipotézis továbbra is vita tárgya, de ischaemiás körülmények között fontos szerepe lehet, ugyanis az extraszinaptikus GluN1/N2B receptorok érzékenyebbek glicinre és így a nagyobb aktiváció révén

különböző IC jelátviteli utakon keresztül sejthalált okozhatnak (147, 53). Az immunhisztokémiai vizsgálataink megerősítettek korábbi beszámolókat, miszerint az amakrin sejtek (a belső nukleáris és plexiform rétegben) és a Müller gliasejtek GlyT-1-t expresszálnak patkány retinában (148, 149). Az OGD indukálta neurotoxicitás során a glicin a Müller gliasejtekből a fordított működésű GlyT-1-en keresztül szabadul fel, valamint a glicinerg amakrin sejtekből történő túlzott felszabadulásból származik: ezek a mechanizmusok, amelyek az extraszinaptikus glicin szintet fenntartják (81). A belső vér-retina határon a GlyT-1-nek szintén szerepe lehet a retina glicin koncentrációjának szabályozásában, akár ischaemiás körülmények között is. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy egy gliális toxin, az L-2-amino-adipinsav (150) jelentősen csökkentette, de nem szüntette meg teljesen a szarkozin indukálta [³H]glicin felszabadulást. Ez az eredmény a gliasejtre, mint a glicin felszabadulás forrására hívja fel a figyelmet. A hipoxiás körülmények között létrejövő túlzott glutamát kiáramlás a retinában a Müller gliasejtekből történhet, míg a KIR-ben főleg a kortikális asztrocitákból származik (151, 152). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy OGD hatására mind a [³H]glicin, mind a [³H]glutamát felszabadulás szimultán megnövekszik a retinában. Ez a felszabadulás megerősíti a túlzott mennyiségben lévő agonista és a koagonista jelenlétét az GluN1/N2B NMDA receptorokon ischaemiásan károsodott retinában. Kimutattuk, hogy a nem transzportálódó GlyT-1 inhibitorok (NFPS, ACPFB) alkalmazása csökkentheti az GluN1/N2B NMDA receptorok túlstimulációját hipoxiás körülmények között a GlyT-1 fordított módú működésének gátlásával, és így a receptor aktivációhoz feltétlenül szükséges glicin elérhetőségének csökkentésével.

Összességében elmondhatjuk, hogy ischaemiásan károsodott retinában a túlzott extraszinaptikus glicin felhalmozódás befolyásolható lehet a transzporter-mediálta kiáramlás gátlásával. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek, hogy ezen mechanizmus milyen mértékű neuroprotekción tud létrehozni a károsodott retina ganglionsejtjein. A nem transzportálódó GlyT-1 inhibitorok anélkül tudják csökkenteni a koagonista glicin felszabadulását, hogy befolyásolják a glutamát elérhetőségét az egyéb glutamát receptorokon keresztül történő neurotranszmisszióban. Így a fenntartott glutamát felszabadulás aktiválhatja az GluN1/N2A NMDA receptorokon a sejt túléléséért felelős jelátvitelt patkány kortikális sejt kultúrában (145) és hasonló mechanizmusok jelen lehetnek a retinában is. Különböző körülmények és hatóanyagok által kiváltott

metabolikus retinakárosodás alatt a GlyT-1 fordított irányban működik és neurotoxikus szintű EC glicin koncentrációt okoz.

Következtetésként levonható, hogy az NMDA receptor koagonista glicin koncentrációjának csökkentése ischaemiás körülmények vagy metabolikus károsodás alatt neuroprotekciónak vezethet a retina ganglionsejtjeiben, amelyek kifejezetten érzékenyek a neurotoxicitásra. Annak a lehetősége, hogy a GlyT-1 mediálta glicin felszabadulás jobban gátolható, mint a felvétel, terápiás jelentősége lehet a retina hipoxia indukálta neurodegenerációjában, például a. ophthalmica elzáródást követően (153).

5.2 Az Ang II hatásának vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben

Kutatásunk másik részében patkány mediális PFC V. rétegében elhelyezkedő piramissejtjein azt vizsgáltuk, hogy az Ang II hogyan befolyásolja az NMDA receptorok működését.

Kísérleteink első részében az Ang II különböző koncentrációit vizsgáltuk a fiziológiás szintet megközelítőtől egészen magas koncentrációkig (0,003-3 μM). Fiziológiásan az Ang II agyi koncentrációja nagyon alacsony, pM nagyságrendű, a különböző agyterületek közül a hipotalamuszban mérték a legmagasabb szintet (154). Az irodalom alapján, agyszeleteken, neuronokon patch clamp technikával végzett kísérleteknél azonban a nM- μM nagyságrend alkalmazása a jellemző (155-157). A preparálás folyamán ugyanis sérülhetnek a sejtek kapcsolatai, illetve a lassú perfúziós adagolás során a hatóanyagok be kell diffundálni a receptorokhoz. Eredményeink alapján az Ang II kisebb, a fiziológiás szintet megközelítő koncentrációban alkalmazva (0,003-1 μM) potenciózta az NMDA áramokat a sejtek egy szubpopulációján. A fenti eredményeink több, korábbi megfigyelést alátámasztanak. Az NMDA receptorok és az agyi RAAS fiziológiás működésének meghatározó szerepe van a kognitív funkciók fenntartásában (58). Az NMDA receptorok serkentéséről kimutatták, hogy bizonyos körülmények között javítják a kognitív működéseket (63). Így eredményeink is alátámaszthatják, hogy az agyi RAAS fiziológiásan működve az NMDA receptorok normális szinten történő potenciózása révén elősegítheti a helyes kognitív funkciókat. Ezzel együtt az NMDA receptorok túlzott serkentése káros hatásokat is létrehozhat, túlzott potenciózásuk megnövekedett IC Ca^{2+}

koncentrációt eredményezve a neurotoxicitás egyik alapvető mechanizmusa. Ez lehet az alapja azoknak a később részletezett megfigyeléseknek, hogy a RAAS gátló vegyületek esetében neuroprotektív hatásokról számoltak be bizonyos kórképekben.

A serkentő hatás további vizsgálatára az AT1R antagonistá eprosartant és az AT2R antagonistá PD 123319 vegyületet alkalmaztuk annak eldöntésére, hogy mely receptor mediálja a serkentő hatást. Eredményeink alapján az eprosartan felfüggesztette, míg a PD 123319 nem befolyásolta az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott Ang II potencírozó hatását. Ezáltal igazoltuk, hogy a serkentés AT1R mediálta folyamat.

Az ARB vegyületek elsősorban a kardiovaszkuláris betegségek terápiájában használatosak, azonban számos kutatás bizonyította, hogy hatékonyan javítják a kognitív funkciókat, illetve protektív hatásúak az Alzheimer kór kialakulásában, csökkentik a neuroinflammációt és a toxikus β -amiloid peptidek akkumulációját (158-161). Hipertóniás állatmodelleken igazolták, hogy az ARB-k, az antihipertenzív hatás mellett, védelmet nyújthatnak a magasvérnyomás betegség során kialakult fokozott AT1R aktiváció következtében a KIR-ben létrejövő ischaemiás vagy inflammatórikus kórképek esetén is (162-164). A neuroprotekciónak vonatkozásában a legtöbbet tanulmányozott, szisztémás adagolás mellett a vér-agy gáton átjutó, ARB vegyületek a candesartan, a telmisartan, illetve a losartan (165-168). Választásunk azért esett az eprosartanra, mert amellett, hogy ennek a vegyületnek is jó a KIR penetrációja (169), szelektívebb az AT1R-ra, mint a többi ARB vegyület, amelyek az AT1R gátlása mellett a peroxiszóma proliferáció aktiválta receptor γ -ra (PPAR γ) is hatnak (168). A PPAR γ aktiváció egy nagyon lényeges neuroprotektív mechanizmus a KIR-ben, és az eprosartan alkalmazásával ezt a kettős védekező hatást szerettük volna kiküszöbölni és kizárólag az AT1R-on létrejövő hatásokat vizsgálni.

A serkentés további vizsgálataiban arra kerestünk választ, hogy az AT1R mediálta hatás preszinaptikusan, esetleg interneuronon keresztül jön-e létre és egy másik neuromodulátor az, ami a hatást létrehozza. Vagy ellenkezőleg, az AT1R a NMDA receptorral azonos sejten, posztszinaptikusan található meg, és a jelátvitel során szabadul fel olyan anyag, vagy aktiválódik egy olyan mechanizmus, ami az NMDA áramok fokozódásához vezet. Ennek eldöntésére a vizsgált sejtet szinaptikusan izoláltuk: Ca^{2+} -mentes aCSF-et és a Na^+ csatorna gátló TTX-t alkalmaztuk. Eredményeink azt mutatták,

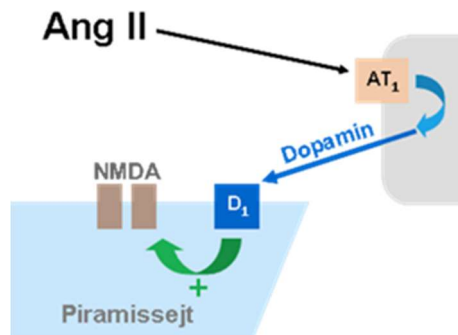
hogy sem Ca^{2+} -mentes aCSF-ben, sem TTX jelenlétében nem volt megfigyelhető a serkentés. Ezen adatok arra utalnak, hogy az Ang II által kiváltott potencírozás létrejöttében interneuronok játszhatnak szerepet. Feltételezhető, hogy az interneuronon lévő AT1R aktivációja során egy másik neurotranszmitter felszabadulás útján jön létre a posztszinaptikus NMDA receptorok aktivációja. A Ca^{2+} hiány hatására megszűnő serkentés extracelluláris Ca^{2+} -függő vezikuláris exocitózist feltételez.

Irodalmi adatok alapján a glutamáterg aktivitás egyik fő modulátora a dopamin (170). A dopamin receptorok szubtípus alapján potencírozó és gátló hatást is létrehozhatnak, DRD1 alacsony dopamin koncentráció mellett serkenti, míg a DRD2 magasabb dopamin koncentráció mellett gátolja az NMDA áramokat (170-172). Így további vizsgálataink során dopamin receptor antagonistákat alkalmaztunk, annak tisztázására, hogy a dopamin szerepet játszhat-e a serkentő hatásban. Eredményeink szerint a DRD1 antagonistá SCH-23390 vegyület felfüggesztette, míg a DRD2 antagonistá sulpirid nem befolyásolta a serkentést. Mindez arra enged következtetni, hogy az Ang II által kiváltott potencírozás dopamin felszabadulásán keresztül létrejövő DRD1 mediálta hatás.

A dopamin-NMDA receptor interakciónak több formája lehet. Számos korábbi publikáció igazolta, hogy az NMDA receptorok potencírozása, a DRD1 stimuláció következtében aktiválódó jelátviteli rendszereken keresztül jön létre (173, 174, 171, 172). A jelátvitelben a PFC területén a foszfokináz A, az emelkedett IC Ca^{2+} szint és az ERK 1/2 játszik szerepet az NMDA áramok serkentésében (175, 18). A dopamin-NMDA receptor kapcsolat direkt receptor kölcsönhatás útján, fehérje interakciók révén is létrejöhet, pl. DRD2 és a GluN2B alegységek C-terminálisai között striatális neuronokban (176). Az előzőekben említettekén kívül a striatumban leírták, hogy a DRD1 aktiváció befolyásolhatja az NMDA receptor alegységek kihelyeződését a sejtmembránon, illetve receptor oligomer komplexek is képződhetnek (177-180).

Eredményeink alapján tehát az alacsony koncentrációban (0,003-1 μM) alkalmazott Ang II a piramissejtek egy szubpopulációján serkentette az NMDA áramokat. Az AT1 receptor antagonistá eprosartan felfüggesztette, míg az AT2 receptor blokkoló PD 123319 nem befolyásolta a serkentést, így a potencírozás AT1 receptor mediálta folyamatnak bizonyult. Ca^{2+} -mentes aCSF és TTX alkalmazása során igazolódott, hogy a hatás közvetítésében interneuronok játszanak szerepet. Dopamin receptor antagonistákkal

végzett kísérleteink során pedig bebizonyosodott, hogy a serkentés dopamin felszabadulás útján jön létre DRD1-en keresztül (17. ábra).



17. ábra. Alacsony koncentrációban alkalmazott Ang II (0,003-1 μM) serkentő hatásának feltételezett mechanizmusa az NMDA receptorokon. AT₁: 1-es típusú angiotenzin receptor, D₁: dopamin receptor 1

Nagyobb koncentrációban alkalmazott Ang II (1-3 μM) a sejtek egy másik szubpopulációján gátolta az NMDA áramokat. Kutatásunk folytatásában ezen nagyobb Ang II koncentrációk által létrehozott gátló hatások vizsgálatát tervezzük, hasonló elrendezésekben, mint ahogy azt a serkentésnél tettük. Tervezzük továbbá egyéb angiotenzin peptidek (pl. Ang IV) hatásának vizsgálatát az NMDA áramokra.

Az angiotenzin receptor ligandok egymással ellentétes hatásai azonban nem ismeretlenek az irodalomban: sokrétű, szerteágazó hatásokat fejtenek ki a neuronális struktúrákon. Hipotalamusz/talamusz/septum/középgy (HTSM) sejt kultúrákon például kimutatták, hogy az Ang II kivédte az NMDA receptor aktiváció okozta sejthalált. A neuroprotektív folyamat AT₂R mediált volt, mivel az AT₂R blokkoló felfüggesztette a védő hatást, emellett az AT₁R blokkolóként használt losartan szintén kivédte az apoptózist (181).

5.3 Opioid vegyületek hatásának vizsgálata a glutamáterg neurotranszmisszióra patkány PFC-ben

Kísérleteink ezen részében a morfin és a 14-*O*-MeM6SU glutamáterg neurotranszmisszióra való hatását vizsgáltuk patkány PFC V. rétegében lévő piramisjelek sEPSC-inek mérésével.

A mediális PFC a fájdalom emocionális feldolgozásában kiemelt szerepet játszik (30). Az irodalom alapján a PFC még egy kevésbé kutatott régió az opioid vegyületek glutamáterg transzmissziójára való hatása szempontjából. Az agy egyéb, fájdalomérzéssel kapcsolatos területeit az opioid vegyületek és a GABA_Aerg/glutamáterg transzmisszió vonatkozásában pl. az amigdalát, a subthalamicus magot és a periakveduktális szürkeállományt szélesebb körben vizsgálták (182-184).

Az opioid fájdalomcsillapítók közül a leggyakrabban alkalmazott vegyület a morfin, melynek terápiás lehetőségeit az analgetikus hatásához kialakuló tolerancia jelentősen korlátozza (33). Az opioid toleranciában szintén szerepet játszik a túlzott glutamáterg transzmisszió és NMDA receptor aktiváció (37). Kimutatták, hogy az NMDA receptor antagonisták csökkenteni tudják a tolerancia kialakulását (39).

A kísérleteink során, a morfin mellett, a 14-*O*-MeM6SU, a morfinnál nagyobb affinitással, hatáserősséggel (efficacy) és antinociceptív hatással rendelkező μ -opioid-receptor agonistát vizsgáltuk (185, 186). Fiziológiás körülmények között a sEPSC-k NMDA komponense a Mg^{2+} blokád miatt a nyugalmi membránpotenciálon alacsony, azonban kísérleteinkben alacsony Mg^{2+} tartalmú aCSF-et alkalmazva, és így a Mg^{2+} blokád kiiktatva, növeltük az NMDA komponenst a sEPSC-kben (51). A GABA_A receptor mediálta IPSC-k blokkolását pedig a GABA_A receptor inhibitor bicucullin használatával értük el. Patkány PFC V. rétegének piramisjeleiben teljes-sejt patch-clamp technikával mértük a sEPSC-k frekvencia és amplitúdó eloszlását. Eredményeink alapján a morfin 1 μ M koncentrációban, míg a 14-*O*-MeM6SU, a morfinnál tízszer alacsonyabb koncentrációban, 0,1 μ M-ban alkalmazva, szignifikánsan csökkentette a sEPSC-k frekvenciáját. A sEPSC-k amplitúdóját egyik vegyület sem befolyásolta. Az opioid agonisták okozta frekvencia mérséklődés a preszinaptikus glutamát felszabadulás csökkenésére utal, ezáltal csökkent posztzinaptikus Ca^{2+} beáramlást okozva.

Vizsgálatainkban kimutattuk továbbá azt is, hogy a 14-*O*-MeM6SU ezen hatása opioid receptor mediálta, mivel a frekvenciacsökkentő hatást az opioid-receptor antagonistá naloxon gátolta.

Korábbi publikációk alapján különböző fájdalommodellekben vizsgálták a 14-*O*-MeM6SU antinociceptív hatását (187, 188). Gyulladásos fájdalommodellekben főleg perifériás hatás volt észlelhető, mivel a vegyület a KIR-be rosszul penetrál (188, 189, 185). Kimutatták továbbá, hogy a 14-*O*-MeM6SU magas hatékonysága (efficacy) miatt kevés tartalék receptoron keresztül is létre tudja hozni az analgetikus hatást (185). Így a magas hatékonyságnak és a rossz KIR penetrációnak szerepe lehet abban, hogy a 14-*O*-MeM6SU analgetikus hatásához kevésbé alakulhat ki tolerancia (190).

Jelen vizsgálatainkban a mediális PFC, mint a fájdalom feldolgozásában érintett glutamaterg struktúra lehetséges befolyásolását vizsgáltuk. A glutamaterg transzmisszió egyensúlyának felborulása, akár a glutamát mennyiségének csökkenése vagy emelkedése a mediális PFC-ben befolyással lehet a neuropátiás fájdalom emocionális megélésére. A glutamaterg transzmisszió csökkenése szerepet játszhat a fájdalom emocionális feldolgozása mellett az opioid toleranciában is.

Kísérleteink tehát azt bizonyítják, hogy a morfin, illetve az eddig különböző fájdalommodellekben vizsgált, új opioid vegyület, a 14-*O*-MeM6SU (188, 189) a mediális PFC-ben befolyásolja a glutamaterg transzmissziót, csökkentik a sEPSC-k frekvenciáját és ennek hatása lehet a fájdalom emocionális feldolgozására, illetve összefüggésben állhat az opioid tolerancia kialakulásával is, azonban az észlelt hatások elemzéséhez és jelentőségének megállapításához további kísérletek szükségesek.

6 Következtetések

Kísérleteink során két KIR struktúrán, a retinában és a mediális PFC-ben vizsgáltuk az NMDA-receptorok modulációjának lehetőségeit.

A patkány retinán végzett szuperfúziós kísérleteink igazolták, hogy:

- energiamegvonás hatására a retina neuronjaiból és gliasejtjeiből a GlyT-1 fordított transzportjával glicin szabadul fel,
- a nem transzportálódó GlyT-1 gátlók csökkentik az OGD indukálta a glicin felszabadulást és az NMDA receptorok túlzott stimulálásának gátlása útján neuroprotektív hatásúak lehetnek.

A patkány mediális PFC V. rétegének piramisisejtein patch-clamp technikával végzett kísérleteink során

- az Ang II hatásait vizsgálva az NMDA áramokra igazoltuk, hogy:
 - az Ang II kisebb (0,003-1 μ M) koncentrációban potenciózta az NMDA áramokat a sejtek egy szubpopulációján,
 - AT1R antagonistá (eprosartan) felfüggeszti a serkentést, AT2R antagonistá (PD 123319) nem befolyásolja \rightarrow a serkentés AT1R mediált hatás,
 - Ca^{2+} -mentes aCSF-ben, TTX jelenlétében nem figyelhető meg serkentés \rightarrow interneuronok szerepet játszanak a serkentő hatásban,
 - DRD1 antagonistá (SCH-23390) felfüggeszti a serkentést, DRD2 antagonistá (sulpirid) nem befolyásolja \rightarrow a serkentés dopamin felszabadulásán keresztül DRD1 mediált hatás.
- opioid vegyületek hatását vizsgálva a glutamáterg neurotranszmisszióra, sEPSC-k mérésével, igazoltuk, hogy:
 - a morfin és a 14-O-MeM6SU csökkentik az NMDA receptor aktivációt és, hogy a 14-O-MeM6SU, a morfinhoz képest, tízed akkora koncentrációban alkalmazva

is szignifikánsan csökkenti a sEPSC-k frekvenciáját. A sEPSC-k amplitúdójára egyik vegyület sem volt hatással.

- a 14-*O*-MeM6SU által létrehozott sEPSC frekvencia csökkentés opioid receptoron keresztül jön létre, mivel azt a nem-szelektív opioid receptor antagonistá naloxon felfüggesztette.

7 Összefoglalás

Előregedő társadalmunkban a kognitív zavarok és a neurodegeneratív kórképek egyre sürgetőbb, világméretű egészségügyi, szociális és gazdasági problémát okoznak.

Kutatásunk során a kognitív zavarok befolyásolásának és a neurodegeneráció megelőzésének lehetőségeit két KIR struktúrán, a retinában és a mediális PFC-ben vizsgáltuk, az excitotoxicitásban kulcsszerepet játszó NMDA receptorok befolyásolása révén. A mediális PFC-ben, mint a fájdalom megélésben kiemelt jelentőségű agyi struktúrában, az előzőek mellett opioid vegyületek hatását is vizsgáltuk.

Kísérleteink első részében patkány retina preparátumon tanulmányoztuk az NMDA receptor működésében alapvető koagonista glicin felszabadulását, valamint vizsgáltuk a GlyT-1 gátlók hatását az ischaemia által kiváltott túlzott glicin felszabadulásra. Eredményeink alapján OGD hatására a retina neuronjaiból és gliasejtjeiből a GlyT-1 fordított transzportjával glicin szabadul fel és a nem transzportálódó GlyT-1 gátlók csökkentik ezt a felszabadulást, így az NMDA receptorok túlzott stimulálásának gátlása útján neuroprotektív hatásúak lehetnek.

Kísérleteink második részében patkány PFC V. rétegében lévő piramissejtein patch-clamp technikával vizsgáltuk az Ang II hatását a NMDA áramokra, illetve a morfin és a 14-O-MeM6SU hatását a glutamáterg transzmisszióra sEPSC-k mérésével. Kimutattuk, hogy az Ang II kisebb (0,003-1 μ M) koncentrációban potenciózza az NMDA áramokat a sejtek egy szubpopulációjában. Az AT1R antagonistá a serkentő hatást felfüggeszti, míg az AT2R antagonistá erre nem képes, tehát a hatás AT1R mediálta. A serkentő hatás Ca^{2+} -mentes oldatban, illetve TTX jelenlétében eltűnik, így annak kialakulásában interneuronok játszhatnak szerepet. Feltételezhető, hogy az Ang II az interneuronokból dopamint felszabadítva fejt ki a serkentő hatását, mivel a DRD1 antagonistá a potenciózást felfüggeszti. Kimutattuk továbbá, sEPSC-k mérésével, hogy az opioid vegyületek közül, a fájdalomcsillapításra leggyakrabban alkalmazott morfin és egy új vegyület, a 14-O-MeM6SU, az NMDA receptor aktivitás csökkentésével hatással vannak a mediális PFC glutamáterg transzmissziójára.

Eredményeink alapján az NMDA receptorok megfelelő szintű modulációja ígéretes terápiás célpontot jelenthet, mind a neurodegeneratív kórképekben, a kognitív zavarokban és a neuropátiás fájdalomban egyaránt.

8 Summary

In our ageing society cognitive disturbances and neurodegenerative disorders are emerging global problems of healthcare, social and economic fields.

In our experiments we studied the prevention and the possible modulation of the cognitive and neurodegenerative disorders on two CNS areas, the medial PFC and the retina, by modulation of the NMDA receptors that plays a fundamental role in excitotoxicity. The medial PFC also plays a pivotal role in pain process, here we also studied the effects of opioid compounds.

During the first part of our research we studied the release of the NMDA receptor coagonist glycine from rat retina preparation. We also studied the effects of GlyT-1 inhibitors on the increased glycine release induced by ischaemic conditions. According to our results OGD induces glycine release from the neuronal and glial cells of the retina by reverse operation of the GlyT-1, which can be decreased by the non-transportable GlyT-1 inhibitors. This mechanism can be neuroprotective by the inhibition of the overactivated NMDA receptors.

In the second part of our experiments we studied the effects of Ang II on NMDA currents of the pyramidal cells in the medial PFC's 5th layer with whole cell voltage clamp method, and the effects of opioid compounds on the glutamatergic transmission by measurements of sEPSCs. We found that Ang II in lower concentrations (0,003-1 μ M) potentiates the NMDA currents in a subpopulations of cells. The AT1R antagonist reversed the enhancement, but the AT2R antagonist did not affect it. According to our findings enhancement is AT1R mediated. The potentiation diminished in Ca²⁺-free aCSF and in the presence of TTX, so interneurons can take part in the mechanism of enhancement. It is presumable that Ang II exerts the enhancement by the release of dopamine from interneurons, which was confirmed by our results that the DRD1 antagonist reversed the potentiation. Furthermore, by the measurements of sEPSCs, we proved that morphine and 14-O-MeM6SU decreased NMDA receptor activity, therefore these compounds have effect on the glutamatergic neurotransmission in the medial PFC.

The principal finding of our experiments is that the fine tuning of the NMDA receptor modulation can be a promising target in the therapy of neurodegenerative disorders, cognitive disturbances and neuropathic pain.

9 Irodalomjegyzék

1. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. In: H Kolb, E Fernandez ,R Nelson, Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. University of Utah Health Sciences Center Copyright: © 2021 Webvision . Salt Lake City (UT), 1995.
2. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. (2008) Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*, 2: 879-889.
3. Fletcher EL, Hack I, Brandstätter JH, Wässle H. (2000) Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol*, 420: 98-112.
4. Hama Y, Katsuki H, Tochikawa Y, Suminaka C, Kume T, Akaike A. (2006) Contribution of endogenous glycine site NMDA agonists to excitotoxic retinal damage in vivo. *Neurosci Res*, 56: 279-285.
5. Cubelos B, Giménez C, Zafra F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex*, 15: 448-459.
6. Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL. (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron*, 8: 927-935.
7. Reed BT, Sullivan SJ, Tsai G, Coyle JT, Esguerra M, Miller RF. (2009) The glycine transporter GlyT1 controls N-methyl-D-aspartic acid receptor coagonist occupancy in the mouse retina. *Eur J Neurosci*, 30: 2308-2317.
8. Casson RJ. (2006) Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 34: 54-63.
9. Jobson DD, Hase Y, Clarkson AN, Kalaria RN. (2021) The role of the medial prefrontal cortex in cognition, ageing and dementia. *Brain Commun*, 3: fcab125.
10. Ong WY, Stohler CS, Herr DR. (2019) Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. *Mol Neurobiol*, 56: 1137-1166.
11. Semendeferi K, Armstrong E, Schleicher A, Zilles K, Van Hoesen GW. (2001) Prefrontal cortex in humans and apes: a comparative study of area 10. *Am J Phys Anthropol*, 114: 224-241.
12. Wood JN, Grafman J. (2003) Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 139-147.

13. Lewis DA. (2004) Structure of the human prefrontal cortex. *Am J Psychiatry*, 161: 1366.
14. Little JP, Carter AG. (2012) Subcellular Synaptic Connectivity of Layer 2 Pyramidal Neurons in the Medial Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 32: 12808-12819.
15. Takata Y, Nakagawa H, Ninomiya T, Yamanaka H, Takada M. (2021) Morphological features of large layer V pyramidal neurons in cortical motor-related areas of macaque monkeys: analysis of basal dendrites. *Scientific Reports*, 11: 4171.
16. Henny P, Jones BE. (2008) Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *European Journal of Neuroscience*, 27: 654-670.
17. Köles L, Kató E, Hanuska A, Zádori ZS, Al-Khrasani M, Zelles T, Rubini P, Illes P. (2016) Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal*, 12: 1-24.
18. Tseng KY, Donnell P. (2004) Dopamine–Glutamate Interactions Controlling Prefrontal Cortical Pyramidal Cell Excitability Involve Multiple Signaling Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 24: 5131.
19. Sanada LS, Sato KL, Machado NL, Carmo Ede C, Sluka KA, Fazan VP. (2014) Cortex glial cells activation, associated with lowered mechanical thresholds and motor dysfunction, persists into adulthood after neonatal pain. *Int J Dev Neurosci*, 35: 55-63.
20. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™, 5th ed. (2013), Arlington, VA, US: American Psychiatric Publishing, Inc. xlv, 947-xlv, 947.
21. Bhatt, J., et al., *The World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. 2019.
22. Gale SA, Acar D, Daffner KR. (2018) Dementia. *Am J Med*, 131: 1161-1169.
23. NIH/WHO. (2011) *Global Health and Aging*. NIH Publication no 11-7737.
24. Nations, U., *World Population Ageing 2019 Highlights*. (2019)
25. Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H,

- Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B. (2006) Mild cognitive impairment. *Lancet*, 367: 1262-1270.
26. Wyss-Coray T. (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 539: 180-186.
 27. Liu C-C, Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews. Neurology*, 9: 106-118.
 28. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD. (1993) Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43: 1467-1467.
 29. Yang S, Chang MC. (2019) Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. *Int J Mol Sci*, 20.
 30. Etkin A, Egner T, Kalisch R. (2011) Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci*, 15: 85-93.
 31. Medeiros P, Negrini-Ferrari SE, Palazzo E, Maione S, Ferreira SH, de Freitas RL, Coimbra NC. (2019) N-methyl-D-aspartate Receptors in the Prelimbic Cortex are Critical for the Maintenance of Neuropathic Pain. *Neurochem Res*, 44: 2068-2080.
 32. Deng Y, Luo L, Hu Y, Fang K, Liu J. (2016) Clinical practice guidelines for the management of neuropathic pain: a systematic review. *BMC Anesthesiol*, 16: 12.
 33. Sverrisdóttir E, Foster DJR, Upton RN, Olesen AE, Lund TM, Gabel-Jensen C, Drewes AM, Christrup LL, Kreilgaard M. (2015) Modelling concentration–analgesia relationships for morphine to evaluate experimental pain models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 50-58.
 34. Allouche S, Noble F, Marie N. (2014) Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol*, 5: 280.
 35. Gledhill LJ, Babey AM. (2021) Synthesis of the Mechanisms of Opioid Tolerance: Do We Still Say NO? *Cell Mol Neurobiol*, 41: 927-948.
 36. Király KP, Riba P, D'Addario C, Di Benedetto M, Landuzzi D, Candeletti S, Romualdi P, Furst S. (2006) Alterations in prodynorphin gene expression and

- dynorphin levels in different brain regions after chronic administration of 14-methoxymetopon and oxycodone-6-oxime. *Brain Research Bulletin*, 70: 233-239.
37. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J. (2012) The Mu-Opioid Receptor and the NMDA Receptor Associate in PAG Neurons: Implications in Pain Control. *Neuropsychopharmacology*, 37: 338-349.
 38. Trujillo KA. (2002) The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: Mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotoxicity Research*, 4: 373-391.
 39. Marek P, Ben-Eliyahu S, Gold M, Liebeskind JC. (1991) Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res*, 547: 77-81.
 40. Dugger BN, Dickson DW. (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9: a028035.
 41. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. (2013) Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698: 6-18.
 42. Hollmann M, Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17: 31-108.
 43. Fairman WA, Amara SG. (1999) Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol*, 277: F481-486.
 44. Hawkins RA. (2009) The blood-brain barrier and glutamate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90: 867S-874S.
 45. Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H. (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*, 61: 546-558.
 46. Li F, Eriksen J, Finer-Moore J, Chang R, Nguyen P, Bowen A, Myasnikov A, Yu Z, Bulkley D, Cheng Y, Edwards RH, Stroud RM. (2020) Ion transport and regulation in a synaptic vesicle glutamate transporter. *Science*, 368: 893-897.
 47. Sheldon AL, Robinson MB. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*, 51: 333-355.

48. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP. (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*, 60: 1017-1041.
49. Niswender CM, Conn PJ. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 295-322.
50. Suh YH, Chang K, Roche KW. (2018) Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91: 10-24.
51. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62: 405-496.
52. Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*, 63: S191-203.
53. Parsons MP, Raymond LA. (2014) Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82: 279-293.
54. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256: 1217-1221.
55. Laube B, Kuhse J, Betz H. (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18: 2954-2961.
56. Al-Khrasani M, Mohammadzadeh A, Balogh M, Király K, Barsi S, Hajnal B, Köles L, Zádori ZS, Harsing LG. (2019) Glycine transporter inhibitors: A new avenue for managing neuropathic pain. *Brain Research Bulletin*, 152: 143-158.
57. Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M. (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences*, 35: 240-249.
58. Collingridge GL, Volianskis A, Bannister N, France G, Hanna L, Mercier M, Tidball P, Fang G, Irvine MW, Costa BM, Monaghan DT, Bortolotto ZA, Molnár E, Lodge D, Jane DE. (2013) The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology*, 64: 13-26.

59. Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, König I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Boeckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR. (2008) Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol*, 6: e34.
60. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5: 405-414.
61. Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150: 633-646.
62. Nakazawa K, Sapkota K. (2020) The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacology & therapeutics*, 205: 107426-107426.
63. Tang Y-P, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401: 63-69.
64. Benquet P, Gee CE, Gerber U. (2002) Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22: 9679-9686.
65. Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. (2006) Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, 16: 288-297.
66. Henley JM, Wilkinson KA. (2016) Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17: 337-350.
67. Kato AS, Gill MB, Ho MT, Yu H, Tu Y, Siuda ER, Wang H, Qian YW, Nisenbaum ES, Tomita S, Brecht DS. (2010) Hippocampal AMPA receptor gating controlled by both TARP and cornichon proteins. *Neuron*, 68: 1082-1096.
68. Clements JD, Feltz A, Sahara Y, Westbrook GL. (1998) Activation kinetics of AMPA receptor channels reveal the number of functional agonist binding sites. *J Neurosci*, 18: 119-127.

69. Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. (2017) Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*, 94: 713-730.
70. Leo A, Giovannini G, Russo E, Meletti S. (2018) The role of AMPA receptors and their antagonists in status epilepticus. *Epilepsia*, 59: 1098-1108.
71. Lerma J. (2006) Kainate receptor physiology. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 89-97.
72. Rozas JL, Paternain AV, Lerma J. (2003) Noncanonical Signaling by Ionotropic Kainate Receptors. *Neuron*, 39: 543-553.
73. Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA. (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, 388: 182-186.
74. Danbolt NC. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65: 1-105.
75. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews*, 45: 250-265.
76. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 98: 641-653.
77. Todd AC, Hardingham GE. (2020) The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 9607.
78. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, Massie A, Smolders I, Methner A, Pergande M, Smith SB, Ganapathy V, Maher P. (2013) The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 18: 522-555.
79. Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ, Haverkamp S. (2009) Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front Mol Neurosci*, 2: 6.
80. Zafra F, Giménez C. (2008) Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life*, 60: 810-817.

81. Harsing LG, Jr., Matyus P. (2013) Mechanisms of glycine release, which build up synaptic and extrasynaptic glycine levels: the role of synaptic and non-synaptic glycine transporters. *Brain Res Bull*, 93: 110-119.
82. Breitinger H-G, Becker C-M. (2002) The Inhibitory Glycine Receptor—Simple Views of a Complicated Channel. *ChemBioChem*, 3: 1042-1052.
83. Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. (1997) The glycine receptor. *Pharmacology & Therapeutics*, 73: 121-146.
84. Larson AA, Beitz AJ. (1988) Glycine potentiates strychnine-induced convulsions: role of NMDA receptors. *J Neurosci*, 8: 3822-3826.
85. Harsing LG, Jr., Juranyi Z, Gacsalyi I, Tapolcsanyi P, Czompa A, Matyus P. (2006) Glycine transporter type-1 and its inhibitors. *Curr Med Chem*, 13: 1017-1044.
86. Thomsen C. (2006) Glycine transporter inhibitors as novel antipsychotics. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3: 539–545.
87. Harsing LG, Zsilla G, Matyus P, Nagy KM, Marko B, Gyarmati Z, Timar J. (2012) Interactions between glycine transporter type 1 (GlyT-1) and some inhibitor molecules - glycine transporter type 1 and its inhibitors (review). *Acta Physiol Hung*, 99: 1-17.
88. Zafra F, Aragón C, Olivares L, Danbolt NC, Giménez C, Storm-Mathisen J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci*, 15: 3952-3969.
89. Papp A, Juranyi Z, Nagymajtenyi L, Matyus P, Harsing LG, Jr. (2008) The synaptic and nonsynaptic glycine transporter type-1 inhibitors Org-24461 and NFPS alter single neuron firing rate in the rat dorsal raphe nucleus. Further evidence for a glutamatergic-serotonergic interaction and its role in antipsychotic action. *Neurochem Int*, 52: 130-134.
90. Roux M, J., Supplisson S. (2000) Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron*, 25: 373-383.
91. Mallorga PJ, Williams JB, Jacobson M, Marques R, Chaudhary A, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C. (2003) Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology*, 45: 585-593.

92. Mezler M, Hornberger W, Mueller R, Schmidt M, Amberg W, Braje W, Ochse M, Schoemaker H, Behl B. (2008) Inhibitors of GlyT1 affect glycine transport via discrete binding sites. *Mol Pharmacol*, 74: 1705-1715.
93. Kirsch J. (2006) Glycinergic transmission. *Cell and Tissue Research*, 326: 535-540.
94. Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D. (1983) The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*, 79: 565-575.
95. Wise T, Taylor MJ, Herane-Vives A, Gammazza AM, Cappello F, Lythgoe DJ, Williams SCR, Young AH, Cleare AJ, Arnone D. (2018) Glutamatergic hypofunction in medication-free major depression: Secondary effects of affective diagnosis and relationship to peripheral glutaminase. *Journal of Affective Disorders*, 234: 214-219.
96. Wang H-Y, MacDonald ML, Borgmann-Winter KE, Banerjee A, Sleiman P, Tom A, Khan A, Lee K-C, Roussos P, Siegel SJ, Hemby SE, Bilker WB, Gur RE, Hahn C-G. (2020) mGluR5 hypofunction is integral to glutamatergic dysregulation in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 25: 750-760.
97. Lewerenz J, Maher P. (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci*, 9: 469.
98. Meldrum B, Garthwaite J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 379-387.
99. Sagara Y, Schubert D. (1998) The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress. *J Neurosci*, 18: 6662-6671.
100. Li JQ, Chen SR, Chen H, Cai YQ, Pan HL. (2010) Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain. *J Neurochem*, 112: 162-172.
101. Zhou HY, Chen SR, Pan HL. (2011) Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 4: 379-388.
102. Dutertre S, Becker CM, Betz H. (2012) Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem*, 287: 40216-40223.
103. Tigerstedt R, Bergman PQ. (1898) Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, 8: 223-271.

104. Jackson L, Eldahshan W, Fagan SC, Ergul A. (2018) Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *International journal of molecular sciences*, 19: 876.
105. Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. (1986) Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res*, 374: 195-198.
106. Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. (1988) Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242: 1444-1446.
107. Bodiga VL, Bodiga S. (2013) Renin Angiotensin System in Cognitive Function and Dementia. *Asian Journal of Neuroscience*, 2013: 102602.
108. Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, Sigmund CD. (2000) Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest*, 106: 103-106.
109. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. (2000) Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35: 155-163.
110. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*, 276: 48623-48626.
111. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ. (2018) The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*, 98: 505-553.
112. Abiodun OA, Ola MS. (2020) Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi J Biol Sci*, 27: 905-912.
113. Saavedra JM. (2017) Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. *Pharmacological Research*, 125: 91-103.
114. Danielyan L, Klein R, Hanson LR, Buadze M, Schwab M, Gleiter CH, Frey WH. (2010) Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res*, 13: 195-201.
115. Davies NM, Kehoe PG, Ben-Shlomo Y, Martin RM. (2011) Associations of anti-hypertensive treatments with Alzheimer's disease, vascular dementia, and other dementias. *J Alzheimers Dis*, 26: 699-708.

116. Li NC, Lee A, Whitmer RA, Kivipelto M, Lawler E, Kazis LE, Wolozin B. (2010) Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis. *Bmj*, 340: b5465.
117. Saavedra JM. (2016) Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36: 259-279.
118. Tota S, Kamat PK, Awasthi H, Singh N, Raghubir R, Nath C, Hanif K. (2009) Candesartan improves memory decline in mice: involvement of AT1 receptors in memory deficit induced by intracerebral streptozotocin. *Behav Brain Res*, 199: 235-240.
119. Wiesmann M, Roelofs M, van der Lugt R, Heerschap A, Kiliaan AJ, Claassen JA. (2017) Angiotensin II, hypertension and angiotensin II receptor antagonism: Roles in the behavioural and brain pathology of a mouse model of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 2396-2413.
120. Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. (2012) Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*, 167: 1520-1532.
121. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, 111: 1806-1813.
122. Jing F, Mogi M, Sakata A, Iwanami J, Tsukuda K, Ohshima K, Min LJ, Steckelings UM, Unger T, Dahlöf B, Horiuchi M. (2012) Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32: 248-255.
123. Wright JW, Harding JW. (2010) The brain RAS and Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 223: 326-333.
124. Harsing LG, Jr., Timar J, Szabo G, Udvari S, Nagy KM, Marko B, Zsilla G, Czompa A, Tapolesanyi P, Kocsis A, Matyus P. (2015) Sarcosine-Based Glycine Transporter Type-1 (GlyT-1) Inhibitors Containing Pyridazine Moiety: A Further

- Search for Drugs with Potential to Influence Schizophrenia Negative Symptoms. *Curr Pharm Des*, 21: 2291-2303.
125. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*, 23: 91-147.
 126. Coyle JT, Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262: 689-695.
 127. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403: 316-321.
 128. Vizi ES. (1998) Different temperature dependence of carrier-mediated (cytoplasmic) and stimulus-evoked (exocytotic) release of transmitter: a simple method to separate the two types of release. *Neurochem Int*, 33: 359-366.
 129. Pinto MC, Lima IV, da Costa FL, Rosa DV, Mendes-Goulart VA, Resende RR, Romano-Silva MA, de Oliveira AC, Gomez MV, Gomez RS. (2015) Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against NMDA-induced excitotoxicity. *Neuropharmacology*, 89: 274-281.
 130. Bull ND, Barnett NL. (2004) Retinal glutamate transporter activity persists under simulated ischemic conditions. *J Neurosci Res*, 78: 590-599.
 131. Napper GA, Pianta MJ, Kalloniatis M. (1999) Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis Neurosci*, 16: 149-158.
 132. Kalló I, Jekkel C, Hrabovszky E, Jurányi Z, Vida B, Járási A, Wilhelm T, Harsing LG, Jr., Liposits Z. (2008) Immunohistochemical and in situ hybridization studies on glycine transporter 1 after transient ischemia in the rat forebrain. *Neurochem Int*, 52: 799-808.
 133. Mitani A, Tanaka K. (2003) Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J Neurosci*, 23: 7176-7182.
 134. Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Todd KG, Dempsey RJ. (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain. *Eur J Neurosci*, 13: 119-128.

135. Campiani G, De Angelis M, Armaroli S, Fattorusso C, Catalanotti B, Ramunno A, Nacci V, Novellino E, Grewer C, Ionescu D, Rauen T, Griffiths R, Sinclair C, Fumagalli E, Mennini T. (2001) A rational approach to the design of selective substrates and potent nontransportable inhibitors of the excitatory amino acid transporter EAAC1 (EAAT3). new glutamate and aspartate analogues as potential neuroprotective agents. *J Med Chem*, 44: 2507-2510.
136. Colleoni S, Jensen AA, Landucci E, Fumagalli E, Conti P, Pinto A, De Amici M, Pellegrini-Giampietro DE, De Micheli C, Mennini T, Gobbi M. (2008) Neuroprotective effects of the novel glutamate transporter inhibitor (-)-3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]-isoxazole-4-carboxylic acid, which preferentially inhibits reverse transport (glutamate release) compared with glutamate reuptake. *J Pharmacol Exp Ther*, 326: 646-656.
137. Sperlágh B, Szabó G, Erdélyi F, Baranyi M, Vizi ES. (2003) Homo- and heteroexchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system. *Br J Pharmacol*, 139: 623-633.
138. Miller GM. (2011) The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *J Neurochem*, 116: 164-176.
139. Scholze P, Zwach J, Kattinger A, Pifl C, Singer EA, Sitte HH. (2000) Transporter-mediated release: a superfusion study on human embryonic kidney cells stably expressing the human serotonin transporter. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 870-878.
140. Vizi ES, Sperlágh B. (1999) Separation of carrier mediated and vesicular release of GABA from rat brain slices. *Neurochem Int*, 34: 407-413.
141. Gadea A, López E, López-Colomé AM. (1999) Characterization of glycine transport in cultured Müller glial cells from the retina. *Glia*, 26: 273-279.
142. Milusheva E, Sperlágh B, Shikova L, Baranyi M, Tretter L, Adám-Vizi V, Vizi ES. (2003) Non-synaptic release of [3H]noradrenaline in response to oxidative stress combined with mitochondrial dysfunction in rat hippocampal slices. *Neuroscience*, 120: 771-781.
143. Bissonnette P, Gagné H, Blais A, Berteloot A. (1996) 2-Deoxyglucose transport and metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol*, 270: G153-162.

144. Rojas JC, Saavedra JA, Gonzalez-Lima F. (2008) Neuroprotective effects of memantine in a mouse model of retinal degeneration induced by rotenone. *Brain Res*, 1215: 208-217.
145. Kalbaugh TL, Zhang J, Diamond JS. (2009) Coagonist release modulates NMDA receptor subtype contributions at synaptic inputs to retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 29: 1469-1479.
146. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27: 2846-2857.
147. Hardingham GE, Bading H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*, 26: 81-89.
148. Lee SC, Zhong YM, Yang XL. (2005) Expression of glycine receptor and transporter on bullfrog retinal Müller cells. *Neurosci Lett*, 387: 75-79.
149. Peña-Rangel MT, Riesgo-Escovar JR, Sánchez-Chávez G, Salceda R. (2008) Glycine transporters (glycine transporter 1 and glycine transporter 2) are expressed in retina. *Neuroreport*, 19: 1295-1299.
150. Sullivan SJ, Miller RF. (2010) AMPA receptor mediated D-serine release from retinal glial cells. *J Neurochem*, 115: 1681-1689.
151. Barnett NL, Pow DV, Bull ND. (2001) Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem Int*, 39: 291-299.
152. Goux E, Léveillé F, Nicole O, Melon C, Had-Aissouni L, Buisson A. (2009) Reverse glial glutamate uptake triggers neuronal cell death through extrasynaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci*, 40: 463-473.
153. Wakabayashi Y, Yagihashi T, Kezuka J, Muramatsu D, Usui M, Iwasaki T. (2006) Glutamate levels in aqueous humor of patients with retinal artery occlusion. *Retina*, 26: 432-436.
154. Phillips MI, Stenstrom B. (1985) Angiotensin II in rat brain comigrates with authentic angiotensin II in high pressure liquid chromatography. *Circulation Research*, 56: 212-219.

155. Cato MJ, Toney GM. (2005) Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. *Journal of neurophysiology*, 93: 403-413.
156. Hu B, Qiao H, Cao T, Sun B, Luo X, Jia R, Fan Y, Wang N, Lu Y, Yan J. (2018) Angiotensin II facilitates GABAergic neurotransmission at postsynaptic sites in rat amygdala neurons. *Neuropharmacology*, 133: 334-344.
157. Izumisawa Y, Ito K, Sugita K, Arai T, Kokudo H, Kitamura N, Shibuya I. (2021) Mechanisms of GABA-mediated inhibition of the angiotensin II-induced cytosolic Ca²⁺ increase in rat subfornical organ neurons. *Brain Research*, 1763: 147451.
158. Anderson C, Teo K, Gao P, Arima H, Dans A, Unger T, Commerford P, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Paolasso E, Holwerda N, Chazova I, Binbrek A, Young J, Yusuf S. (2011) Renin-angiotensin system blockade and cognitive function in patients at high risk of cardiovascular disease: analysis of data from the ONTARGET and TRANSCEND studies. *Lancet Neurol*, 10: 43-53.
159. Benicky J, Sánchez-Lemus E, Honda M, Pang T, Orecna M, Wang J, Leng Y, Chuang DM, Saavedra JM. (2011) Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology*, 36: 857-870.
160. Kwon HS, Ha J, Kim JY, Park HH, Lee EH, Choi H, Lee KY, Lee YJ, Koh SH. (2021) Telmisartan Inhibits the NLRP3 Inflammasome by Activating the PI3K Pathway in Neural Stem Cells Injured by Oxygen-Glucose Deprivation. *Mol Neurobiol*, 58: 1806-1818.
161. Ouk M, Wu CY, Rabin JS, Edwards JD, Ramirez J, Masellis M, Swartz RH, Herrmann N, Lanctôt KL, Black SE, Swardfager W. (2021) Associations between brain amyloid accumulation and the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin receptor blockers. *Neurobiol Aging*, 100: 22-31.
162. Drews HJ, Yenkovyan K, Lourhmati A, Buadze M, Kabisch D, Verleysdonk S, Petschak S, Beer-Hammer S, Davtyan T, Frey WH, 2nd, Gleiter CH, Schwab M, Danielyan L. (2019) Intranasal Losartan Decreases Perivascular Beta Amyloid, Inflammation, and the Decline of Neurogenesis in Hypertensive Rats. *Neurotherapeutics*, 16: 725-740.

163. Kono S, Kurata T, Sato K, Omote Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K. (2015) Neurovascular protection by telmisartan via reducing neuroinflammation in stroke-resistant spontaneously hypertensive rat brain after ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 24: 537-547.
164. Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra JM. (2005) Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25: 878-886.
165. Bild W, Hritcu L, Stefanescu C, Ciobica A. (2013) Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 43: 79-88.
166. Saavedra JM. (2012) Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)*, 123: 567-590.
167. Unger T. (2003) Inhibiting angiotensin receptors in the brain: possible therapeutic implications. *Current Medical Research and Opinion*, 19: 449-451.
168. Wang J, Pang T, Hafko R, Benicky J, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM. (2014) Telmisartan ameliorates glutamate-induced neurotoxicity: roles of AT(1) receptor blockade and PPAR γ activation. *Neuropharmacology*, 79: 249-261.
169. Saad MAE, Fahmy MIM, Sayed RH, El-Yamany MF, El-Naggar R, Hegazy AAE, Al-Shorbagy M. (2021) Eprosartan: A closer insight into its neuroprotective activity in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Biochem Mol Toxicol*, 35: e22796.
170. Cepeda C, André VM, Jocoy EL, Levine MS. *Frontiers in Neuroscience NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems*. In: AM Van Dongen, *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis Copyright © 2009, Taylor & Francis Group, LLC., Boca Raton (FL), 2009.
171. Wirkner K, Krause T, Köles L, Thümmel S, Al-Khrasani M, Illes P. (2004) D1 but not D2 dopamine receptors or adrenoceptors mediate dopamine-induced potentiation of N-methyl-d-aspartate currents in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 372: 89-93.

172. Zheng P, Zhang XX, Bunney BS, Shi WX. (1999) Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience*, 91: 527-535.
173. Cepeda C, Radisavljevic Z, Peacock W, Levine MS, Buchwald NA. (1992) Differential modulation by dopamine of responses evoked by excitatory amino acids in human cortex. *Synapse*, 11: 330-341.
174. Chergui K, Lacey MG. (1999) Modulation by dopamine D1-like receptors of synaptic transmission and NMDA receptors in rat nucleus accumbens is attenuated by the protein kinase C inhibitor Ro 32-0432. *Neuropharmacology*, 38: 223-231.
175. Sarantis K, Matsokis N, Angelatou F. (2009) Synergistic interactions of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors in rat hippocampus and prefrontal cortex: involvement of ERK1/2 signaling. *Neuroscience*, 163: 1135-1145.
176. Liu XY, Chu XP, Mao LM, Wang M, Lan HX, Li MH, Zhang GC, Parelkar NK, Fibuch EE, Haines M, Neve KA, Liu F, Xiong ZG, Wang JQ. (2006) Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron*, 52: 897-909.
177. Dunah AW, Standaert DG. (2001) Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci*, 21: 5546-5558.
178. Fiorentini C, Gardoni F, Spano P, Di Luca M, Missale C. (2003) Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 278: 20196-20202.
179. Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG, Dunah AW. (2006) Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci*, 26: 4690-4700.
180. Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chéry N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, 111: 219-230.
181. Jing G, Grammatopoulos T, Ferguson P, Schelman W, Weyhenmeyer J. (2004) Inhibitory effects of angiotensin on NMDA-induced cytotoxicity in primary neuronal cultures. *Brain Research Bulletin*, 62: 397-403.

182. Shen KZ, Johnson SW. (2002) Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *J Physiol*, 541: 219-230.
183. Vaughan CW, Christie MJ. (1997) Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol*, 498 (Pt 2): 463-472.
184. Zhu W, Pan ZZ. (2005) Mu-opioid-mediated inhibition of glutamate synaptic transmission in rat central amygdala neurons. *Neuroscience*, 133: 97-103.
185. Lacko E, Varadi A, Rapavi R, Zador F, Riba P, Benyhe S, Borsodi A, Hosztafi S, Timar J, Noszal B, Furst S, Al-Khrasani M. (2012) A novel μ -opioid receptor ligand with high in vitro and in vivo agonist efficacy. *Curr Med Chem*, 19: 4699-4707.
186. Zádor F, Balogh M, Váradi A, Zádori ZS, Király K, Szűcs E, Varga B, Lázár B, Hosztafi S, Riba P, Benyhe S, Furst S, Al-Khrasani M. (2017) 14-O-Methylmorphine: A Novel Selective Mu-Opioid Receptor Agonist with High Efficacy and Affinity. *European Journal of Pharmacology*, 814: 264-273.
187. Balogh M, Zádor F, Zádori ZS, Shaqura M, Király K, Mohammadzadeh A, Varga B, Lázár B, Mousa SA, Hosztafi S, Riba P, Benyhe S, Gyires K, Schäfer M, Furst S, Al-Khrasani M. (2019) Efficacy-Based Perspective to Overcome Reduced Opioid Analgesia of Advanced Painful Diabetic Neuropathy in Rats. *Front Pharmacol*, 10: 347.
188. Balogh M, Zádori ZS, Lázár B, Karádi D, László S, Mousa SA, Hosztafi S, Zádor F, Riba P, Schäfer M, Furst S, Al-Khrasani M. (2018) The Peripheral Versus Central Antinociception of a Novel Opioid Agonist: Acute Inflammatory Pain in Rats. *Neurochem Res*, 43: 1250-1257.
189. Khalefa BI, Mousa SA, Shaqura M, Lackó E, Hosztafi S, Riba P, Schäfer M, Ferdinandy P, Furst S, Al-Khrasani M. (2013) Peripheral antinociceptive efficacy and potency of a novel opioid compound 14-O-MeM6SU in comparison to known peptide and non-peptide opioid agonists in a rat model of inflammatory pain. *Eur J Pharmacol*, 713: 54-57.
190. Kiraly K, Caputi FF, Hanuska A, Kató E, Balogh M, Köles L, Palmisano M, Riba P, Hosztafi S, Romualdi P, Candeletti S, Ferdinandy P, Furst S, Al-Khrasani M.

(2015) A new potent analgesic agent with reduced liability to produce morphine tolerance. *Brain Res Bull*, 117: 32-38.

10 Saját publikációk jegyzéke

A doktori értekezéssel összefüggő publikációk jegyzéke:

Hanuska, A ; Szenasi, G ; Albert, M ; Koles, L ; Varga, A ; Szabo, A ; Matyus, P ; Harsing, LG Jr. Some Operational Characteristics of Glycine Release in Rat Retina: The Role of Reverse Mode Operation of Glycine Transporter Type-1 (GlyT-1) in Ischemic Conditions NEUROCHEMICAL RESEARCH 41 : 1-2 pp. 73-85. , 13 p. (2016)

Kiraly, K ; Caputi, FF ; Hanuska, A ; Kató, E ; Balogh, M ; Köles, L ; Palmisano, M ; Riba, P ; Hosztafi, S ; Romualdi, P et al. A new potent analgesic agent with reduced liability to produce morphine tolerance BRAIN RESEARCH BULLETIN 117 pp. 32-38. , 7 p. (2015)

Köles, L ; Kató, E ; Hanuska, A ; Zádori, ZS ; Al-Khrasani, M ; Zelles, T ; Rubini, P ; Illes, P. Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems PURINERGIC SIGNALLING 12 : 1 pp. 1-24. , 24 p. (2016)

A doktori értekezéssel nem összefüggő publikációk jegyzéke:

Kovanyi, B ; Csolle, C ; Calovi, S ; Hanuska, A ; Kato, E ; Koles, L ; Bhattacharya, A ; Haller, J ; Sperlagh, B. The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. SCIENTIFIC REPORTS 6 Paper: 36680 , 16 p. (2016)

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet a kutatásban nyújtott iránymutatásért, segítségért és támogatásért témavezetőmnek, Dr. Köles Lászlónak.

Szintén hatalmas köszönettel tartozom Dr. Hársing László Gábornak a farmakológia és a kutatómunka megszerettetéséért már orvostanhallgató koromban.

Köszönöm továbbá a kutatócsoport tagjainak, Dr. Kató Erzsébetnek és a TDK-hallgatóknak.

Szintén köszönöm a közös munkákban nyújtott segítséget Dr. Király Kornélnak, Dr. Al-Khrasani Mahmoudnak és Dr. Riba Pálnak.

Köszönöm Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, aki lehetővé tette, hogy Ph.D. munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben végezzem.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom az intézet összes munkatársának, barátaimnak és családomnak, akik mindvégig segítettek a doktori munkám létrejöttét.

A doktori értekezés az „EFOP-3.6.3.-VEKOP-16-2017-00009, Az orvos-, egészség tudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” projekt-támogatással jött létre.