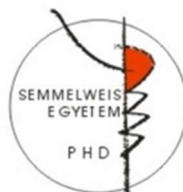


# Az NMDA receptorok modulációjának vizsgálata a percepció és a kognitív funkciók zavaraiiban

Doktori tézisek

**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., tud. főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szőkő 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

## **1. Bevezetés**

A neuronális diszfunkciók számos központi idegrendszeri (KIR) (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, röviden ismertetem a glutamáterg és a glicinerg rendszert, különös hangsúlyt fektetve az NMDA típusú glutamát receptorra, illetve az annak működését szabályozó tényezőkre.

### **1.1 A retina ischaemiás károsodásai**

A retina a szem belső burkát alkotó, 0,5 mm vastag, átlátszó hártya. 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 fényérzékeny területe tíz rétegre tagolódik. A retinát felépítő sejtek közül az oxigén és tápanyaghiányos állapotokra leginkább a ganglionsejtek és a fotoreceptorok érzékenyek. 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. 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.

## **1.2 Kognitív funkciók és a prefrontális kéreg (PFC)**

A magasabb rendű kognitív funkciók olyan percepciós, 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 piramissejtek. A piramissejtek leginkább glutamáterg, dopaminerg és GABAerg 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. 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.

### **1.3 A fájdalom percepció centrális komponensei, a PFC és az opioid tolerancia**

A fájdalom megélésében és emocionális feldolgozásában a mediális PFC-nek kitüntetett szerepe van. Számos kérgi összeköttetése, kifejezetten a periakveduktális szürkeállománnyal való kapcsolata miatt részt vesz antinociceptív folyamatokban, de a fájdalom krónikussá válásban is szerepe van. A neurodegeneratív folyamatok révén kialakuló neuropátiás fájdalom mechanizmusában a glutamáterg transzmisszió és az NMDA receptorok túlzott aktivációja is résztvesznek. A nehezen kezelhető neuropátiás fájdalom egyéb terápiákra nem reagáló eseteiben major analgetikum adása is szóbajön. Az opioid fájdalomcsillapítók terápiás felhasználását azonban a hosszútávú és ismételt adagoláskor észlelt, analgetikus hatásukhoz kialakuló, tolerancia nagyban limitálja. A tolerancia kifejlődésében számos, eddig még nem teljesen tisztázott mechanizmus, mint pl. a receptor deszenzitizáció, internalizáció, dimerizáció mellett a PFC és az itt található NMDA receptorok túlzott aktivációja is szerepet játszhatnak.

### **1.4 A glutamáterg és glicinerg transzmisszió, valamint az NMDA receptorok fiziológiája és patofiziológiája**

A klasszikus neurotranszmitterek közé tartozó glutamát a KIR legfőbb excitátoros neurotranszmittere. Pre- és posztszinaptikus receptorain hatva fontos szerepet tölt be a szinaptikus plaszticitás, a memória és a tanulás terén, illetve kognitív, emocionális, endokrin és viscerális funkciókat is irányít. A glutamát a szinaptikus részbe kerülve metabotrop és ionotrop receptorokhoz kötődik.

A glicin a legegyszerűbb nem esszenciális aminosav, a GABA mellett, a KIR fő gátló, klasszikus neurotranszmittere, leginkább az agytörzsben, a

gerincvelőben és a retinában található meg. A glicin azonkívül, hogy a fehérjeszintézis alapja, kettős funkciót tölt be a KIR-ben, egyrészt a glicinerg neuronok glicinreceptorain gátló neurotranszmitterként működik, másrészt az NMDA receptorok elengedhetetlen koagonistája, ezáltal pedig az excitátoros glutamaterg transzmisszióban vesz részt. Külön kiemelném a kutatásaink fontos tárgyát képező 1-es típusú glicin transzportert (GlyT-1), mely fiziológiásan működve a glicin szinaptikus részből való eltüntetéséért felel, azonban patológiás körülmények pl. ischaemia alkalmával fordított módú működése kapcsán, az extracelluláris térbe juttatott nagy mennyiségű glicin által, az NMDA receptorok túlzott aktivációját hozhatja létre, aminek következményeként excitotoxicitás alakulhat ki.

Az NMDA receptorok ligandfüggő transzmembrán ioncsatornák.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionokra permeábilisak, feszültség-függő  $\text{Mg}^{2+}$ -blokádnál állnak és az aktivációjukhoz feltétlenül szükséges két agonista, a glutamát és a glicin jelenléte. Az NMDA receptorok fontos integratív funkciót töltenek be az idegrendszer működésében. Különleges tulajdonságuk révén, miszerint detektálják és összehangolják a preszinaptikus agonista felszabadulást és a posztzinaptikus depolarizációt, hosszútávú változásokat tudnak létrehozni a szinaptikus aktivitás terén. Károsodásuk, mind az alul, mind a túlműködés komoly hatással van a KIR integritására, a kognitív funkciók mindkét esetben károsodnak.

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

A RAAS-t 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 rendszer. 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.

Disszertációm kapcsán az NMDA receptorok, a glutamáterg és a glicinerg rendszer, illetve az agyi 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 terápiási lehetőségeket feltárni a neurotoxikus folyamatok megelőzésére.

## **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 piramis sejteken,
- 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. Ketrecenként 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 [<sup>3</sup>H]glicint és [<sup>3</sup>H]glutamátot, a szövet oldására Soluene 350 oldatot használtunk (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA). A GlyT-1 gátlására a következő vegyületeket használtuk: a kompetitív, transzportálódó szarkozint (Sigma Chemicals Co.); a kompetitív, nem transzportálódó ACPPB-t; a nem-kompetitív, nem transzportálódó NFPS-t és az NFPS analóg SzV-2248-at. A GlyT-1 gátlókat, a szarkozin kivételével, Dr. Mátyus Péter szintetizálta (Szerves Vegytani Intézet, Semmelweis Egyetem). Továbbá Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-áz inhibitor ouabaint, a mitokondriális komplex I gátló rotenont, illetve a glikolízist gátló 2-deoxi-D-glukózt (2-DG) alkalmaztuk (Sigma Chemicals Co.). Széles spektrumú EAAT gátlóként TBOA-t használtunk (Tocris Bioscience).

A patch-clamp technika során NMDA-t, Ang II-t (Sigma-Aldrich). AT1R antagonistaként eprosartant, AT2R antagonistaként PD 123319 vegyületet alkalmaztunk (Sigma-Aldrich). Dopamin-1 receptor (DRD1) antagonistaként SCH 23390-t, dopamin-2 receptor (DRD2) antagonistaként sulpiridet, feszültségfüggő Na<sup>+</sup>-csatorna gátlására tetrodotoxint (TTX) (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<sub>A</sub> receptor antagonista bicucullint használtunk (Sigma-Aldrich).

### **3.3 Kísérletek**

#### **3.3.1 Szuperfúziós technika**

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% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) Krebs oldatban. A preparálást követően, a retinát tartalmazó hátsó szemszerleget [<sup>3</sup>H]glicin izotóp jelenlétében (10 μCi/1,5 ml), 30 percig, karbogenizált és előmelegített Krebs oldatban (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, pH 7.4) inkubáltuk. Ezután a preparátumokat 0,3 ml térfogatú szuperfúziós kamrákba helyeztük és 60 percig áramoltattuk 1ml/perc sebességgel, karbogenizált Krebs oldattal, 37°C-on, hogy az aspecifikusan kötött [<sup>3</sup>H]glicin kimosódjon. Ezt követően, a kísérleti



elrendezéstől függően (22 vagy 30 frakció), 3 percenként frakciógyűjtést kezdtünk, hogy meghatározzuk a [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást. A vegyületeket az 5. vagy a 10. frakciótól adtuk, egészen a kísérlet végéig. A 10. frakciótól kezdve biztosítottunk oxigén és glükóz megvonást (OGD) (glükózmentes Krebs oldat, 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). A Ca<sup>2+</sup>-függés vizsgálatánál a szuperfúzióhoz Ca<sup>2+</sup>-mentes Krebs oldatot használtunk, melyhez 1 mmol/l EGTA-t adtunk. Rotenon használatakor glükóz helyett 2 mmol/l koncentrációjú 2-DG-t használtunk az oldat készítéséhez. Néhány kísérletben, normoxiás és hipoxiás körülmények között, [<sup>3</sup>H]glutamát felszabadulást is vizsgáltunk. A patkányszemből preparált hátsó szemserleget ebben az esetben [<sup>3</sup>H]glutamát (10 µCi/1,5 ml) jelenlétében inkubáltuk karbogenizált Krebs oldatban (30 perc, 37°C), a kísérlet a továbbiakban a fentiek szerint zajlott. Excitátoros aminosav transzport (EAAT) inhibitornak TBOA-t alkalmaztunk.

### **3.3.2 Immunhisztokémia**

A fent részletezett preparálást követően a retina preparátumon gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP), illetve GlyT-1 immunhisztokémiai jelölését végeztük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Dr. Albert Mihály végezte.

### **3.3.3 Patch-clamp technika**

A kísérlet során 10-12 napos hím Wistar patkányokat dekapitáltunk, az agyat kipreparáltuk és jéghideg, karbogenizált (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) mesterséges cerebrospinális folyadékba (aCSF) merítettük. 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, amelyeket 36°C-ra melegített, karbogenizált aCSF-ben inkubáltuk 1 órán keresztül, majd szobahőmérsékleten tároltuk (22-24°C). Ezután egy-

egy agyszeletet mérőkamrába helyeztünk, ahol 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. A prefontális kéreg V. rétegének piramis sejtjei egy „upright” (egyenes állású) elrendezésű mikroszkóp segítségével lettek megjelenítve. 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, voltage-clamp üzemmódban.

### **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**

Az OGD hatás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy OGD alatt a  $[^3\text{H}]$ glicin kiáramlás megemelkedett, egy csúcs elérése után exponenciálisan lecsökkent a stimuláció előtti értékre.

Az OGD hatását vizsgálva a  $[^3\text{H}]$ glicin felvételre és kiáramlásra arra jutottunk, hogy az OGD csökkentette a  $[^3\text{H}]$ glicin felvételét, bár még ezen

kísérleti körülmények között is volt szignifikáns mennyiségű [<sup>3</sup>H]glicin felvétel a szövetbe. A párhuzamos kísérletben az OGD megnövelte a [<sup>3</sup>H]glicin effluxot, hasonlóan az előző kísérlethez. Tehát az OGD ellentétes hatásokat fejtett ki a [<sup>3</sup>H]glicin felvételre és kiáramlásra a retina preparátumokon.

Az OGD indukálta [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás külső Ca<sup>2+</sup>-függését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az OGD akkor is képes volt [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást indukálni, ha Ca<sup>2+</sup>-mentes Krebs oldatot használtunk. Ugyanilyen elrendezésben a transzportálódó, GlyT-1 inhibitor szarkozint vizsgálva, az sem mutatott külső Ca<sup>2+</sup>-függést.

A GlyT-1 inhibitorokat vizsgálata során azt találtuk, hogy 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 [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást. A gyenge, nem transzportálódó GlyT-1 inhibitor SzV-2248 (1 μmol/l) hatástalannak bizonyult az OGD okozta [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás csökkentésében, ahogy az EAAT inhibitor TBOA (10 μmol/l) is. Normoxiás körülmények között egyik transzporter inhibitor sem befolyásolta a nyugalmi [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást.

A transzportálódó GlyT-1 inhibitor szarkozin koncentrációfüggő módon indukálta a [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást, a koncentrációt 3 mmol/l-ról 10 mmol/l-re emelve megemelkedett a [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás.

Az energiadepléció hatását vizsgálva Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-áz inhibitor ouabaint használtuk (20 μmol/l), ami a [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás több, mint 50%-os emelkedését idézte elő. A mitokondriális komplex I gátló rotenon (20 μmol/l) és a Krebs oldatban glükóz helyett alkalmazott glikolízis inhibitor 2-DG (2 mmol/l) jelenlétében szintén megnőtt a [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás.

A nem transzportálódó, nem-kompetitív NFPS az OGD indukálta [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulás gátlása mellett, gátolta a szarkozin, az ouabain és a rotenon hatására kialakuló fokozott [<sup>3</sup>H]glicin felszabadulást is.

Kísérleteink egy másik részében a retinát tartalmazó hátsó szemserlegetek [<sup>3</sup>H]glutamáttal inkubáltuk és ennek a felszabadulását néztük nyugalomban és OGD körülmények között. Az OGD megnövelte a [<sup>3</sup>H]glutamát felszabadulását. Ezt a hatást az EAAT inhibitor TBOA (10 μmol/l) jelentősen csökkentette.

## **4.2 Immunhisztokémia**

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. A patkány retina vertikális metszetén GFAP immunofluoreszcencia volt látható a külső és belső plexiform rétegben, a belső nukleáris rétegben és az idegrostrétegben. Így a GlyT-1 immunoreaktivitásának megjelenése a glicinerg amakrin sejteken és a Müller gliasejteken megerősíti eddigi eredményeinket.

## **4.3 Az Ang II hatásának vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramisajtjein**

Az Ang II serkentő hatást váltott ki az NMDA áramokra a piramisajtjelek 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 hozzátétőlegesen egyharmadánál serkentést láttunk, míg másik részükben az Ang II nem váltott ki hatást. 1 μM Ang II a

sejtek felének NMDA áramait fokozta, negyedén gátló hatást fejtett ki, a maradékon nem volt megfigyelhető hatás. 3  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazott Ang II egyes sejteken szintén gátolta az NMDA áramokat.

Az angiotenzin receptor antagonisták hatásának vizsgálata során az AT1R antagonistá eprosartan (1  $\mu\text{M}$ ) az Ang II (0,01-1  $\mu\text{M}$ ) serkentő hatását felfüggesztette, míg az AT2R antagonistá PD 123319 (5  $\mu\text{M}$ ) nem befolyásolta.

További kísérleteinkben a sejtek szinaptikus izolációját vizsgálva a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$ -csatorna gátló TTX-t (0,5  $\mu\text{M}$ ) és  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes aCSF-t alkalmaztunk, melyek a serkentő hatást felfüggesztették.

A dopamin receptor antagonisták hatásának vizsgálatakor a serkentő hatást a DRD1 antagonistá SCH-23390 (10  $\mu\text{M}$ ) felfüggesztette, míg a DRD2 antagonistá sulpirid (20  $\mu\text{M}$ ) nem befolyásolta.

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

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

## 5. 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 piramissejtein patch-clamp technikával végzett kísérleteink során

- az Ang II hatásait vizsgálva az NMDA áramokra igazoltuk, hogy:
  - az Ang II kisebb (0,003-1  $\mu$ M) koncentrációban potenciózta az NMDA áramokat a sejtek egy szubpopulációján,
  - AT1R antagonistá (eprosartan) felfüggeszti a serkentést, AT2R antagonistá (PD 123319) nem befolyásolja → a serkentés AT1R mediált hatás,
  - $Ca^{2+}$ -mentes aCSF-ben, TTX jelenlétében nem figyelhető meg serkentés → interneuronok szerepet játszanak a serkentő hatásban,
  - DRD1 antagonistá (SCH-23390) felfüggeszti a serkentést, DRD2 antagonistá (sulpirid) nem befolyásolja → 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 NDMA receptor aktivációt és, hogy a 14-*O*-MeM6SU, a morfinhoz képest, tized 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.

## 6. 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)