

**P2 receptorok részvétele a központi idegrendszer
fiziológiás és kóros működésében: a neurotranszmitter
felszabadulástól a teljes genom microarray analízisig**

Doktori értekezés

Csölle Cecília



Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola

Programvezető: Dr. Vizi E. Szilveszter egyetemi tanár, MTA r. tagja

Témavező: Dr. Sperlág Beáta egyetemi tanár, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Edit egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Pintér Erika egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár, Csc

Szigorlati bizottsági tagok: Dr. Köles László egyetemi docens, Ph.D

Dr. Zádori Zoltán egyetemi adjunktus, Ph.D

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Bevezetés	7
2.1.	A purinerg neurotranszmisszió	7
2.1.1.	Az ATP szinaptikus jelátvivő anyag.....	7
2.1.2.	P2 receptor altípusok.....	8
2.1.2.1.	A P2X receptorok.....	9
2.1.2.2.	A P2Y receptorok.....	11
2.1.3.	Adenozin receptorok.....	12
2.1.4.	Az ATP, a neurotranszmitter felszabadulást szabályozó neuromodulátor.....	13
2.1.5.	A P2X7 receptor.....	16
2.1.5.1.	A P2X7 receptor jellemzői.....	16
2.1.5.2.	A P2X7 receptor funkciója a központi idegrendszerben.....	18
2.1.5.3.	A P2X7 receptor szerepe a citokin produkció szabályozásában.....	22
2.1.5.4.	A P2X7 receptor szerepe a depresszió patomechanizmusában.....	25
2.2.	A neurodegeneráció	26
2.2.1.	A neurodegeneráció: az ischemia és a noradrenalin kapcsolata.....	26
2.2.2.	Az Interleukin-1 β érintettsége a neurodegenerációban.....	32
2.3.	A depresszió patomechanizmusa	34
3.	Célkitűzések	37
4.	Módszerek	39
4.1.	Kísérleti állatok	39
4.1.1.	Kísérleti állatok.....	39
4.1.2.	In vivo gyulladásozó modell.....	40
4.2.	Neurofarmakológiai módszerek	41
4.2.1.	In vitro [3 H]noradrenalin felszabadulás mérése patkány hippocampusz szeletekből szövetperfúziós technika segítségével.....	41
4.2.2.	In vitro ischemiás modell.....	43
4.3.	Molekuláris biológiai módszerek	44
4.3.1.	RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction).....	44
4.3.2.	Citokin fehérje mérése ELISA technikával.....	46
4.3.3.	SYBR Green alapú real-time PCR.....	47
4.3.4.	Microarray alapú génepressziós mérés.....	48

4.3.4.1. RNS szeparálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés.....	49
4.3.4.2. Génexpressziós microarray mérés.....	49
4.3.4.3. A microarray adatok statisztikai és bioinformatikai értékelése.....	51
4.3.4.4. Gene Ontology elemzés.....	52
4.3.4.5. TaqMan alapú real-time PCR.....	53
4.4. Statisztikai módszerek.....	54
5. Eredmények.....	56
5.1. A hippokampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése.....	56
5.1.1. Szemikvantitív RT-PCR analízis eredménye.....	56
5.1.2. [³ H]noradrenalin felszabadulás patkány hippokampusz szeletben.....	57
5.1.3. P2 purin receptor agonisták vizsgálata az elektromos téringlerlés által kiváltott [³ H]noradrenalin felszabadulásra.....	59
5.1.4. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata az elektromos téringlerlés által kiváltott [³ H]noradrenalin felszabadulásra.....	64
5.1.5. A glutamaterg és GABAerg transzmisszió szerepe az ATP hatásának közvetítésében az elektromos téringlerléssel kiváltott [³ H]NA felszabadulás szabályozásában.....	65
5.1.6. Az A ₁ adozin receptor és a heteromer P2Y ₁ /A ₁ receptor szerepe az elektromos téringlerléssel kiváltott [³ H]NA felszabadulás szabályozásában.....	67
5.2. Kombinált oxigén és glükózmegvonás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippokampusz szeletekben.....	68
5.2.1. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata a kombinált oxigén és glükózmegvonás által kiváltott [³ H]noradrenalin felszabadulásra.....	70
5.3. A P2X7 receptor aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1β (IL-1β) termelődés szabályozásában rágsáló hippokampuszban in vivo gyulladásoos modellben.....	73
5.3.1. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés hatása patkány hippokampusz IL-1β termelésére.....	74
5.3.2. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1β termelésre patkány hippokampuszban.....	75
5.3.3. P2 purin receptor agonisták vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1β termelődésre patkány hippokampuszban.....	77

5.3.4. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés hatása a P2X receptor altípusok expressziójára egér hippocampusban.....	80
5.3.5. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés és a P2X7 receptor génkiütés hatása egér szérum és hippocampus IL-1 β termelésére.....	82
5.3.6. P2 purin receptor antagonisták, az ATP és a hemichannel blokkoló CBX vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre egéhippocampusban.....	84
5.4. Microarray alapú génexpressziós analízis.....	89
5.4.1. Microarray alapú génexpressziós mérés.....	89
5.4.2. Gene Ontology elemzés.....	92
5.4.3. Kiválasztott gének expressziójának megerősítése független TaqMan real-time PCR módszerrel.....	94
6. Megbeszélés.....	100
6.1. A hippocampális [³ H]noradrenalin felszabadulás preszinaptikus gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése.....	100
6.2. Kombinált oxigén és glükóz megvonás hatása a [³ H]noradrenalin felszabadulás patkány hippocampusz szeletekben.....	109
6.3. A P2X7 receptor aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1 β termelődés szabályozásában rágszáló hippocampuszban in vivo gyulladásoos modellben.....	111
6.4. Microarray alapú génexpressziós analízis.....	117
7. Következtetések.....	122
8. Összefoglalás.....	125
9. Summary.....	126
10. Irodalomjegyzék.....	127
11. Saját publikációk.....	152
12. Köszönetnyilvánítás.....	154

1. Rövidítések jegyzéke

2-AG - 2-arachidonoylglycerol

2-MeSADP - 2-metiltio-ADP

2-MeSAMP - 2-metiltio-AMP

5-HT- szerotonin

ABC - ATP binding cassette protein

AC - adenilát cikláz

Ado - adenzin

ADP - adenzin 5'-difoszfát

AMP - adenzin 5'-monofoszfát

ARL67156 - 6-N,N-dietil-D b,c-dibromometilén ATP

AP-5 - 2-amino-5-phosphonopentanoate

ASC - inflammasome accessory protein

(inflammászóma asszociált fehérje)

ATP - adenzin 5-trifoszfát

BBG - Brilliant Blue G

Bic - (-)-bicucullin metobromid

BDNF- brain derived neurotrophin factor

BzATP - 3'-O- (4-benzoyl) benzoyl-ATP

CNQX - 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

COX-2 - ciklooxigenáz-2

CREB – cAMP response element binding protein

DA - dopamin

DPCPX - 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine

EDTA - etiléndiamintetraecetsav

EGTA – etilén glikol-bisz(-aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraecetsav

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

ERK - extracellular-regulated-kinase

FR% - fractional release % (frakcionális transzmitter felszabadulás)

GABA - gamma-amino-butyric-acid (gamma aminovajsav)

GDP - guanozin 5'-difoszfát

GFAP - glial fibrillary acidic protein

GLU - glutamát

H₂O₂ - hidrogén-peroxid

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

IFNγ - interferon-γ

IL-1β - interleukin-1β

IL-1RA - interleukin-1 receptor antagonist

IL-6 - interleukin-6

IL-10 - interleukin-10

i.p. - intraperitoneálisan

JNK - c-Jun N-terminal kinase

KO - knock out (génkiütött)

LPS - lipopoliszacharid

LTD - long-term-depression

LTP - long-term-potential

MAO - monoamin oxidáz

MAPK - mitogén aktivált protein kináz

p38 MAPK, p38 mitogén aktivált protein kináz

MEK - MAPK kináz

MEKK - MAPK kináz kináz

mGLUR - metabotróp glutamát receptor

MRS2179 - 2-deoxi-N6-metiladenozin 3,5-biszfófat tetraammonium

MRS2365-1 S,2 R,3 S,4 R,5 S-4-[(6-amino-2-metiltio-9H-purin-9-yl)-1 difosforiloximetil]biciklo[3.1.0]hexane-2,3-diol

NA - noradrenalin

NF-κB - nuclear factor-κB

NGF- neuronal neurotrophin factor

NMDA - N-metil-D-aszpartát

NO - nitrogen-monoxid

iNOS - indukálható nitrogen monoxin szintáz
NR2A, NR2B - NMDA receptor 2A alegység, NMDA receptor 2B alegység
oxiATP – periodate-oxidized ATP
PBS - foszfát-pufferelt sóoldat
PKA - protein kináz A
PKC - protein kináz C
PLA2 - foszfolipáz A2
PLC - foszfolipáz C
PLD - foszfolipáz D
PMSF fenilmetánszulfonil fluorid
PPADS - pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid
PPNDS - pyridoxal-5-foszfát-6-(2-naftiazo-6-nitro-4,8-diszulfonát) tetraszodiam só
pro-IL-1 β - pro-Interleukin.-1 β
RBA - astrocita sejtvonal
Rho - GTP kötő fehérje, GTPáz aktivitással
ROCK - Rho effektor kináz
TCA - triciklusos antidepresszáns
TBST - Tris-Buffered Saline Tween-20
THP-1 - humán akute monocita leukemia sejtvonal
TLR4 - Toll-like receptor 4
TNF - tumor nekrozis faktor
TTX - tetrodotoxin
UDP - uridin 5'- difoszfát
UTP - uridin 5'- trifoszfát
WT- wild type (vad típusú)

2. Bevezetés

2.1. A purinerg neurotranszmisszió

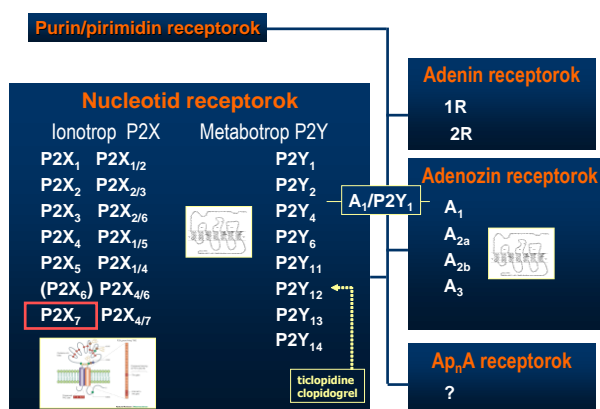
2.1.1. Az ATP, mint idegrendszeri jelátvivő anyag

Az adenosin 5-trifoszfát (ATP) alapvető fontosságú nemcsak a sejten belül, mint energiatároló molekula, de az extracelluláris térben is, mint neurotranszmitter, neuromodulátor, és növekedési faktor (Neary és mtsai 1996, Fredholm és mtsai 1996, Burnstock 1997, Ralevic és Burnstock 1988, Rathbone és mtsai 1999, Weight és mtsai 1999, Boeynaems és mtsai 2000, Vizi 2000). Az ATP jelátvivő szerepe azonban ennél sokkal széleskörűbb, az ATP fontos szerepet játszik a nem idegi sejtek és idegi sejtek közötti jelátvitelben, így pl. a glia-neuron kommunikációban, illetve a nem idegi sejtek, mint pl. az immunsejtek egymás közötti kommunikációjában. A sejten belüli ATP koncentrációk millimoláris (mM) tartományban vannak, míg a sejten kívüli ATP koncentrációk a felszabadulási és a lebontási folyamatok egyensúlyától függően nanomoláristól mikromoláris (nM- μ M) tartományig becsülhetők (Agteresch és mtsai 1999, Schwiebert 2000). Idegi aktivitás és számos kóros stimulus hatására felszabaduló ATP az extracelluláris térbe jutva fejti ki hatásait saját receptorain. Mivel az ATP erősen poláris molekula, nem képes önálló membrán transzportra, az extracelluláris térbe való jutása elvileg a következő módokon mehet végbe: exocitózissal a szinaptikus vezikulákból (pl. idegsejtek) vagy granulumokból (pl. nem idegsejtek), melyet Ca^{2+} -függő membrán / vezikula fúzió közvetít (Gordon 1986, Schwiebert 2000, Robertson és mtsai 2001, Coco és mtsai 2003). Az ATP továbbá átjuthat az intakt sejtmembránon transzmembrán transzporttal is, felhasználva a plazma membrán ATP transzportereket vagy csatornákat, (Cotrina és mtsai 2000), vagy az anion csatornához kapcsolt ozmotikus transzportereket (Abdipranoto és mtsai 2003, Darby és mtsai 2003), valamint citolitikus ATP felszabadulás is lehetséges a membránréseken keresztül a sérült sejtekből. Kísérletes modellekben alkalmazott az ATP felszabadulást kiváltó legfontosabb stimulusok közé sorolható a fiziológias neuronális aktivitást modellező elektromos téringelés vagy kémiai depolarizáció, a hipoxia / hipoglikémia és az energia

depriváció. Emellett a pre- illetve posztszinaptikus receptorok agonistákkal történő közvetlen aktivációja, különböző gyulladáscsökkentő stimulusok és sejthalál is képes jelentős ATP felszabadulást előidézni. Az ATP életideje azonban rövid az extracelluláris térben, és hamarosan inaktiválódik az idegvégződésben jelenlevő ektoenzimek segítségével, melyek az ATP-t a P2 receptorokon már inaktív AMP-vé és adenzinná hidrolizálják. Az ektoenzim család egyik legfontosabb képviselője az ekto-ATP-difoszfahidroláz (ekto-ATPáz, NTPDáz vagy apiráz néven is ismert), egy plazmamembránhoz kötött enzim, mely defoszforilálja az extracelluláris adenzin 5'-trifoszfátot (ATP) és adenzin 5'-difoszfátot (ADP), adenzin 5-monofoszfáttá (AMP). Az ekto-ATPáz szelektív gátlószere az ARL67156, mely potencirozhatja az endogéneen felszabadult és hozzáadott ATP hatását egyaránt. Az adenzin megjelenésével egy új extracelluláris szignál is keletkezik, amely saját receptorain, az adenzin receptorokon hat. Az adenzin egy specifikus transzporter segítségével visszavevődik az őt kibocsájtó sejtbe és reinkorporálódik az ATP raktárakba. A sejtben kívüli purinok fő forrásai az idegrendszerben a neuronok, a glia sejtek és az endotélium.

2.1.2. P2 receptor altípusok

A nem metabolizált ATP hatásait az extracelluláris térben P2 receptorok közvetítik, amelyek ionotróp P2X (P2X_{1,2,3,4,5,6,7}) és metabotróp P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) családokra oszthatók (1. ábra). (Chambers és mtsai 2000, North 2002, von Kugelgen és Wetter 2000).



1. ábra Az ATP és egyéb nukleotidok receptor családjai

2.1.2.1. P2X receptorok

A P2X ionotróp receptorok a nem szelektív kation csatornák egy sajátos családját képezik. Közös jellemzőjük, hogy a különböző alegységek (altípusok) homo- vagy heterooligomerjeiként hoznak létre funkcionálisan működő ioncsatornát. A P2X receptoroknak hét ismert altípusuk van, melyeket P2X1-7 számozással azonosítanak, és különböző kinetikával illetve farmakológiai fenotípussal rendelkeznek (North és Surprenant 2000, Roberts és mtsai 2006, Guo és mtsai 2007). Az alegységek közül a P2X6 kivételével valamennyi P2X receptor altípus homomer formában is képes funkcionálni, illetve heteromerizációjuk 18 különböző funkcionális receptort eredményezhet, mégpedig trimer formában. (Torres és mtsai 1999). Közülük a homomer P2X1,7 (North 2002) és a heterooligomer P2X1/2 (Brown és mtsai 2002), P2X1/4 (Nicke és mtsai 2005), P2X1/5 (Torres és mtsai 1998), P2X2/3 (Lewis és mtsai 1995), P2X2/4, P2X2/6 (King és mtsai 2000), P2X4/6 (Le és mtsai 1998) és P2X4/7 alegység kombinációkat jellemezték eddig farmakológiailag, rekombináns rendszerekben. Az egyes alegységek két transzmembrán átívelő régióból, 10 hasonló elhelyezkedésű ciszteint, és glikozilációs oldalakat hordozó extracelluláris hurokból, és intracelluláris N és C végződésekből állnak (Ralevic és Burnstock, 1998). A sejten kívüli hurok, a két transzmembrán régió extracelluláris vége közelében tartalmazza az ATP kötőhelyet, valamint az antagonisták és modulátorok kötődési helyeit. A C terminális régió fontos szerepeket tölt a deszenzitizáció sebességének meghatározásában (Khakh és mtsai 1999). A P2X receptorok egy és kétértékű kationok számára átjárhatóak, ezen belül Ca^{2+} permeabilitásuk viszonylag magas, és aktivációjuk gyors, befelé irányuló kationáramot indukál (Rogers és mtsai 1997, Valera és mtsai 1994). A P2X receptorok farmakológiájára és funkcionális sajátosságaira vonatkozó adatok folyamatosan bővülnek, az eredmények megértéséhez szükséges legszűkebb ismeretek a következőek: az endogén ligand, az ATP és az ADP valamennyi receptoron agonista, a többi agonistával szembeni érzékenység tekintetében azonban az egyes receptorok eltérnek. Az antagonisták közül a PPADS és suramin, mint nem szelektív P2X receptor antagonisták gátolja valamennyi P2X receptort, kivéve a P2X4-et és a P2X6-t. Egyéb relatíve szelektív antagonistákat is ismerünk, ilyen a TNP-ATP, mely a P2X2-t, P2X3-t és a P2X2/P2X3-t gátolja, a P2X1 szelektív NF279, illetve a P2X7-szelektív Brilliant

blue G és oxyATP. Bár a P2X receptorok eloszlásában és farmakológiájában jelentős különbségek vannak az egyes fajok között, illetve azonos fajok különböző szervei között is, a receptorok között elsősorban az agonista érzékenység és az antagonistaszenszitivitás tekintetében lehet különbséget tenni (Dunn és mtsai 2001). A szelektív ligandok hiánya miatt azonban sok esetben, a válaszban résztvevő receptor egyetlen altípusra való leszűkítése még ma sem lehetséges. A P2X receptorok egyes altípusai széles körben expresszálódnak a szervezet különböző szöveteiben, különösen gazdag lokalizációjuk az agyban és az immunrendszerben. A központi idegrendszer területén valamennyi P2X receptor altípus kifejeződik, a receptorok jelenlétét mRNS szinten és immunhisztokémiai vizsgálatokkal is kimutatták (pl. Atkinson és mtsai 2000, Collo és mtsai 1997, Rubio és Soto 2001). A P2X receptorokat nemcsak az idegsejtek, hanem egyéb nem neuronális elemek, így az asztrociták, illetve az immunsejtek központi idegrendszeri rezidensei, a mikroglia sejtek is expresszálják. A P2X receptorok tehát fontos szerepet játszanak a neuronok és nem neuronális sejtek közti párbeszédben (Fields és Stevens 2000). P2X receptor mediált szinaptikus áramot mutattak ki a mediális habikulában (Edwards és mtsai 1992), a hippocampusz CA1 és CA3 régió excitátoros szinapszisaiban (Mori és mtsai 2001, Pankratov és mtsai 1998), a szomatoszenzoros kéregben (Pankratov és mtsai 2002), a gerincvelőben (Bardoni és mtsai 1997), valamint az agytörzsi katekolaminerg neuronok autoszinapszisaiban (Nieber és mtsai 1997, Poelchen és mtsai 2001). A periférián többek között a szimpatikus végkészülékeken (Sneddon és mtsai 2000) igazolódott a P2X receptorok közvetítő szerepe a szinaptikus transzmisszióban. A P2X receptoroknak – elsősorban a P2X3 altípusnak – kiemelten fontos szerepe van a fájdalomban, melyben mind a perifériás érzőideg végződéseken, mind a gerincvelő bemeneti szinapszisaiban lokalizálódó P2X receptorok részt vesznek (Chizh és Illes 2001). A P2X receptorok funkcionális szerepét egyes P2X receptor altípusokra deficiens transzgenikus egerek segítségével is igazolták (Cockayne és mtsai 2000, Mulryan és mtsai 2000, Souslova és mtsai 2000). A preszinaptikusan lokalizálódó P2X receptorokra csak az utóbbi időben terelődött a figyelem, modulációs szerepüket eddig az agytörzsi és gerincvelői glutamaterg és GABAerg neuronok (Gu és MacDermott 1997, Hugel és Schlichter 2000, Khakh és Henderson 1998) működésében sikerült elektrofiziológiai módszerekkel igazolni. Kutatócsoportunk közölte első alkalommal preszinaptikus P2 receptorok

jelenlétét a tengerimalac ileumot beidegző kolinerg és noradrenerg idegvégződéseken (Sperlagh és Vizi 1991). A P2X receptorok élettani jelentősége a neuronális funkciók mellett számos számos egyéb szervi működésben felvetődött. Ezek közé tartozik az részvételük az immunmodulációban, mivel a P2X receptorok egyes altípusai, az adenosin és P2Y receptorokkal egyetemben – mind a sejtes, mind a humorális immunválasz számos folyamatát képesek befolyásolni, beleértve a citokinek és gyulladáshoz vezető mediátorok expresszióját, és a kemotaxist.

2.1.2.2. P2Y receptorok

A P2Y receptor család a G proteinhez kapcsolt receptorok nagycsaládjába sorolható, szerkezeti jellemzője az extracellulárisan elhelyezkedő aminoterminalis, a hét transzmembrán régió, intracellulárisan elhelyezkedő karboxiterminális és hurokrendszer, mely magába foglalja a ligand kötő és G protein kötő alegységeket (Boarder and Webb 2001, Ralevic és Burnstock, 1998). Feltehetően dimer formában funkcionálnak. A P2Y receptorok leggyakrabban G_q és G_i proteinekhez, valamint az ahhoz kapcsolódó szignál transzdukciós elemekkel kapcsolódnak, de ioncsatornák működését is modulálhatják. A P2Y receptorcsaládnak szintén számos tagját azonosították molekulárisan, ezek közül jelenleg a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ receptorok felelnek meg a funkcionális receptor kritériumainak, de funkcionális vizsgálatok tanúsága szerint még további altípusok azonosítása sem kizárt a jövőben. A P2Y receptorok farmakológiájukat illetően mind az agonisták, mind az antagonisták vonatkozásában is jelentős átfedésben vannak egymással. A P2X receptoroktól is általában nem farmakológiai úton, hanem egyéb jellegzetességeik alapján ($[Ca^{2+}]_o$ és $[Ca^{2+}]_i$ -függőség, pertussis toxin szenzitivitás stb.) különböztetik meg. A P2Y ezen receptorok egyes altípusai érzékenyek a természetesen előforduló ligandok közül a pirimidin nukleotidokra is, elsősorban az UTP-re és az UDP-re (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆), ennek megfelelően adenin- (P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃) és uridin nukleotidokat (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) is preferáló alcsoportokra oszthatóak, továbbá az ADP, illetve az ATP inaktív egyes altípusokon (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆). Az antagonisták közül a suramin és a reactive blue 2 széles altípus specificitással rendelkeznek, a

suramin nem hat a P2Y₄-en, a PPADS viszont csak a P2Y₁ altípuson hat. Noha a P2Y receptorok egyes altípusai az agyban intenzíven expresszálódnak, az egyes altípusok pontos központi idegrendszeri eloszlásáról és funkciójáról még hiányosak a rendelkezésre álló adatok. Ismert ugyanakkor, hogy a neuronok mellett gliasejteken, mikroglia sejteken expresszálódhatnak. Élettani funkcióikat illetően említésre érdemes a fejlődési, differenciálódási folyamatokban, a neuron-glia interakcióban, a pre- és posztszinaptikus neuromodulációban, valamint az idegrendszeri gyulladásos folyamatokban való részvételük.

2.1.3. Adenozin receptorok

Az adenozin receptorok ugyancsak a G-proteinhez kapcsolt receptor nagycsalád tagjai közé tartoznak, és négy altípusuk, az A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃ különíthető el (Lorenzen és Schwabe 2001). A G proteinek közül mind a G_i (A₁, A₃), a G_o (A₁), G_{olf} (A_{2A}), G_s (A_{2A}, A_{2B}) illetve a G_q proteinekkel funkcionális interakcióba léphetnek és ennek megfelelően aktiválhatják, vagy gátolhatják az adenilcikláz enzimet, a foszfolipáz C-t illetve serkenthetik vagy gátolhatják a K⁺ és Ca²⁺ csatornákon keresztül folyó ionáramokat. Az adenozin receptorok közös jellegzetessége, hogy nukleotidokra nem, hanem elsősorban az adenozinra és származékaira érzékenyek és az egyes receptorok gátolhatóak különböző xanthin származékokkal így többek között a természetesen előforduló xanthinok (koffein, teofillin) is adenozin receptor antagonisták. A természetesen előforduló agonista ligand, az adenozin valamennyi receptor altípuson aktív, de különböző hatékonysággal, csakúgy, mint a természetesen előforduló xanthinok. Míg az A₁ adenozin receptorok szelektív agonistája a ciklohexil adenozin (CHA), illetve a ciklopentiladenozin (CPA), a szelektív A₁-antagonisták közül legismertebb az 1,3-dipropil-8-ciklopentilxantin (DPCPX). Az A_{2A} receptorok szelektív agonistája a CGS 21680, szelektív antagonistája a ZM241385. Az A_{2B} receptorok esetében szelektív agonistával nem rendelkezünk, az A₃ receptorok legszelektívebb agonistája a Cl-IB-MECA, antagonistája az MRS1191. Az adenozin receptorok szervezetbeni eloszlásáról tehát ma már meglehetősen részletes információink vannak, különös tekintettel az elsőként felfedezett és talán legszélesebb reprezentációban jelen levő A₁ receptorra

(Reppert és mtsai 1991, Rivkees és mtsai 1995). Az A_1 receptorok nagy sűrűségben expresszálódnak az agy különböző területein, így a kéregben, a hippocampusban, a cerebellumban, a talamuszban, az agytörzsben és a gerincvelőben is. Az A_1 receptorok talán legismertebb funkciója hogy a receptor aktivációja preszinaptikusan gátolja a legtöbb neurotranszmitter, így a glutamát, az acetilkolin, a noradrenalin, a szerotonin, és a dopamin felszabadulását a központi idegrendszerben és a periférián, míg a posztszinaptikus A_1 receptorok ingerlése hiperpolarizálja a posztszinaptikus membránt és gátolja a neuronális kisülést. Az adenzin, az A_1 receptorok közvetítésével a központi idegrendszerben tehát általános gátló neuromodulátorként funkcionál, melynek különösen fontos szerepe lehet az agy energiahiányos állapotaiban, így ischemiás inzultus során, Az ischemia során felszabaduló adenzin endogén neuroprotektív mechanizmusként védi az agyat a fokozott neuronális kisülés káros hatásaitól, illetve prekondicionáló stimulusként egy rákövetkező ischemiás stimulus következményeitől (Dunwiddie és Masino 2001). Az A_{2a} receptor eloszlása az agyban az A_1 receptornál jóval körülírta, elsősorban a bazális ganglionokra (striatum, nucleus accumbens) és a limbikus rendszerre (szaglógumó) korlátozódik, emellett az mRNS kifejeződik számos perifériás szövetben is (Dixon és mtsai 1996). Az A_{2A} receptorok ingerlése az agyban jellegzetes neuroleptikus hatást okoz. Az A_{2B} receptorok az agyban elsősorban a gliasejteken lokalizálódnak, emellett számos perifériás szövetben is kifejeződnek, ennek a receptornak azonban az adenzin iránti affinitása lényegesen alacsonyabb, mint a többi adenzin receptoré, ezért funkciójáról is kevesebbet tudunk (Lorenzen és Schwabe 2001). Az A_3 receptorok eloszlása az A_1 receptorokhoz hasonlóan széleskörű és mind az agyra és a perifériás szövetekre kiterjed.

2.1.4. Az ATP a neurotranszmitter felszabadulást szabályozó neuromodulátor

Ismert, hogy a hippocampusban az endogén ATP elektromos téringerlés hatására (Cunha és Riberio 2000) vagy a Schaffer kollaterálisok ingerlésére frekvenciafüggő módon szabadul fel (Wieraszko és mtsai 1989) és a posztszinaptikus P2X receptorokat aktiválva gyors neurotranszmitterként funkcionál a CA1 régió excitátoros szinapszisaiban (Pankratov és mtsai 1998). A P2X receptorok P2X3, P2X4 és P2X6

alegységeit azonosították a CA1 régió excitátoros szinapszisaiban és a posztszinaptikus megvastagodásokban is, de vizsgálataink kezdetén még kevésbé volt ismert a központi idegrendszerben a noradrenalin (NA) felszabadulás preszinaptikus P2 receptorok által közvetített szabályozása. A katekolaminerg idegvégződések mind a periférián, mind a hippocampusban a preszinaptikus auto- és heteroreceptorok széles skáláját fejezik ki, beleértve a metabotróp α_2 -adrenerg, A_1 -adenozin és a P2Y-nukleotid receptorokat, amelyek kotranszmittereik által a noradrenalin felszabadulás negatív és pozitív feedback modulációs helyeiként működnek (Boehm és Kubista 2002). Korábbi vizsgálatainkban (Sperlágh és mtsai 2000a) és másokéban (Boehm 1999, Queiroz és mtsai 2003) igazolódott, hogy a szimpatikus idegvégződésekben kiáramló NA felszabadulását serkentő, ionotróp P2X receptorok szabályozzák: a P2X receptor agonista α,β MeATP stimulálta a NA kiáramlást, tengerimalac jobb szívpitvarban, és a résztvevő receptor farmakológiai profilja hasonló volt a P2X3 vagy P2X2/P2X3 receptorokéhoz (Sperlágh és mtsai 2000a), melyeknek mRNS-e is kifejeződik a szimpatikus ganglionokban. Azóta patkány vas deferensben is jellemezték a NA kiáramlás szabályozását, és a P2X1, P2X3 vagy P2X2/P2X3 receptorokat azonosították a hatás közvetítésében (Queiroz és mtsai 2003). Említésre méltó, hogy a különféle P2X receptor alegységek mRNS expressziója is eltér fajonként és ugyanabban a fajban szinaptikus ganglionokként is különbözhet (Dunn és mtsai 2001). Az agyban a locus coeruleusban lévő, többek között a hippocampusz noradrenerg innervációját is biztosító neuronok expresszálják az ATP-érzékeny P2X-és P2Y-szerű receptorokat, melyek aktivációja serkenti a spontán akciós potenciálok kisülését (Frohlich és mtsai 1996). Korábban már azonosítottuk a hippocampális NA felszabadulás preszinaptikus serkentő szabályozásában a P2X1 és P2X3 receptorokat (Papp és mtsai 2004a), melyeket a szimpatikus idegvégződéseken is kimutattak (Boehm 1999, Sperlágh és mtsai 2000, Queiroz és mtsai 2003). Az agyszövetekből a NA kiáramlást a hippocampuszban gátló A_1 R-ok (Jonzon és Fredholm 1984) és P2Y-szerű receptorok (Koch és mtsai 1997) is szabályozzák. Más munkák igazolták, hogy a P2X receptorok aktivációja glutamát felszabadulást is kiválthat agytörzsben (Jin és mtsai 2004, Kato és mtsai 2001, Khakh és Henderson 1998, Shigetomi és Kato 2004), hippocampuszban (Rodrigues és mtsai 2005, Sperlágh és mtsai 2002, Khakh és mtsai 2003, Fellin és mtsai 2006, Inoue 1998), mely hatásokért a P2X1 (Rodrigues és mtsai 2005), P2X2 (Khakh és mtsai 2003), P2X3, P2X2/3

(Rodrigues és mtsai 2005, Kato és mtsai 2001) és P2X7 (Sperlágh és mtsai 2002, Shigetomi és Kato 2004, Fellin és mtsai 2006, Patti és mtsai 2006) receptor altípusokat tették felelőssé. A P2X2 (Khakh és mtsai 2009) és P2X7 receptor (Papp és mtsai 2004b) altípusok szerepét, génkiütött egerek alkalmazásával is megerősítették. Emellett a P2Y receptorokról is megfigyelték, hogy serkentik a glutamát felszabadulást a központi idegrendszerben: az UDP és az UTP növelték a preszinaptikus glutamát felszabadulás valószínűségét a P2Y4 receptorokon keresztül (Price és mtsai 2003), valamint a P2Y₁ receptorok aktivációja vezikuláris glutamát felszabadulást idézett elő asztrocitákból (Domercq és mtsai 2006) és Schwann sejt kultúrákból (Jeftinija 1998). Ismert, hogy a hippokampális piramis sejtek kifejeznek P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₄ receptorokat, melyek aktivációja gátolta a glutamát felszabadulást (Rodrigues és mtsai 2005). További érdekesnek tűnő adalék, hogy a hippokampális asztrocita kultúrák mechanikai stimulációja Ca²⁺ - hullámokat generált, melyek ATP felszabadítás révén aktiválva a P2 receptorokat, csökkentették a neuronok közötti serkentő szinaptikus jelátvitelt. Ebben a glia-vezérelt szinaptikus depresszióban részben az ATP önmaga a P2Y receptorokon keresztül, részben az adenzin az A₁ receptorokon hatva vett részt (Koizumi és mtsai 2003). Hasonló mechanizmust figyeltek meg ép hippokampusz szeletekben, ahol az idegsejtekből és asztrocitákból felszabadult ATP a P2Y₁ receptorokon keresztül hatva serkentette az interneuronokat, megnövekedett szinaptikus gátlást eredményezve intakt hippokampális neuronhálózaton belül (Bowser és Khakh 2004). Az ATP emelet GABA felszabadulást is képes kiváltani, középagyi GABAerg szinaptoszómákban P2X3 receptor aktiváción keresztül (Gomez-Villafuertes és mtsai 2001), gerincvelőben (Hugel és Schlichter 2000) és hippokampális (Inoue 1998) sejt kultúrákban, ahol a serkentő és gátló szinaptikus jelátvitelt a P2X3 és P2X1 receptorok aktivációja serkentette (Watano és mtsai 2004). Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiból ismert, hogy a P2X7R aktiváció közvetlenül glutamátot, majd ennek következményeként GABA-t is felszabadít hippokampuszból, nem-NMDA típusú glutamát receptorokon keresztül, mely hatást a Na⁺ - függő GABA transzporterek megfordulása közvetíti (Sperlágh és mtsai 2002). A legjelentősebb hatásnak azonban a hippokampális interneuronok szomáján/dendritjén lévő P2Y1 receptorok aktiváció tűnik, mely növelve a gátló posztzinaptikus áramok (IPSCs) frekvenciáját, fokozza a GABA felszabadulást akut hippokampális szeletekben (Kawamura és mtsai 2004).

2.1.5. P2X7 receptor

Mivel a disszertációm alapját képező három publikáció közül kettő is a P2X7 receptorok központi idegrendszer működésében betöltött szerepét próbálta feltárni, a következő fejezetben ezen purin receptorok részletebb ismertetése következik. A bővebb terjedelmi kifejtést indokolja: (1) a P2X receptorok között a P2X7 receptor, több szempontból is sajátos csoportot képez, ezért szerkezeti, farmakológiai profilja, a receptor aktivációt követő intercelluláris események és sejtszintű expressziós megoszlásának ismerete nélkül az általa szabályozott folyamatok sem érthetőek meg teljesen; (2) az utóbbi egy évtizedben robbanásszerűen megemelkedett a P2X7 receptorok sokrétű biológiai (fiziológiás és kóros) folyamatokban betöltött szerepét feltáró közlemények száma, amelyek alapján elmondható, hogy korántsem kizárólag a perifériás immunfolyamatok szabályozásában számottevő a szerepük.

2.1.5.1. A P2X7 receptor jellemzői

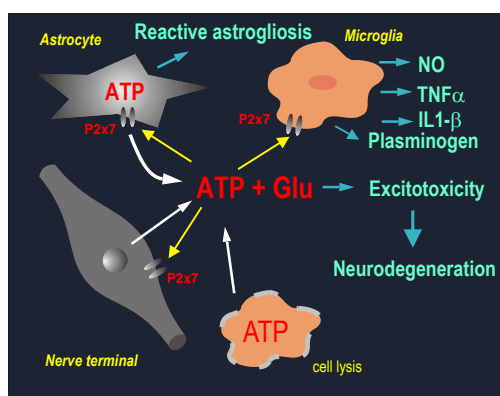
A P2X7 receptor a P2X receptorok alcsaládjába tartozik, de 595 aminosav hosszú, karboxil végződése hosszabb (239 aminosav), mint a P2X receptor család többi tagjéé (27-129 aminosav) (North 2002). A karboxi terminális közelében fedezték fel a lipopolyszaccharid (LPS) kötőhelyet (Denlinger és mtsai 2001, 2003), illetve kimutatták, hogy ezen a régió belül, az 551-581 aminosavak között található a receptor trafficking domén (Wiley és mtsai 2003), ami a P2X7R sejtfelszíni expressziójához szükséges (Smart és mtsai 2003). Ezzel ellentétben, az ATP kötőhely feltehetően az antiparalel 6-szálás béta-lemezben helyezkedik el (Freist és mtsai 1998), közel a receptor extracelluláris doménjének ciszteinben gazdag régiójához (Worthington és mtsai 2002, Gu és mtsai 2004), az M1 és M2 transzmembrán régiók között, hasonlóan a többi P2X receptor alegységekhez. A P2X7 receptor a P2X receptorok közül a lassan deszenzitizáló receptorok közé sorolható (North 2002). Ez a receptor elsősorban homooligomerként működik (Torres és mtsai 1999), bár heterooligomerizációját is leírták P2X4 receptorokkal (Guo és mtsai 2007). A P2X7R-on agonistaként hat több endogén nukleotid és szintetikus analógjai, melyek között a következő hatásereőségi sorrend állítható fel: BzATP>>ATP>2-Methylthio-ATP>ATP- γ -S>>ADP. Ezek a

ligandok a P2X receptor család egyéb tagjain is aktívak, de egyedül a P2X7 receptorra, valamint a P2X1 receptorra jellemző az, hogy a BzATP sokkal hatásosabb az ATP-nél (Bianchi és mtsai 1999). A kétértékű kationok közül a Ca^{2+} , a Mg^{2+} , a Zn^{2+} , a Cu^{2+} ionok és az alacsony pH gátolja a receptor-ioncsatorna komplexen keresztül ionáramlást. A P2X7R-on antagonistá hatással rendelkezik a Brilliant Blue G (BBG), mely hatékony, szelektív nem-kompetitív antagonistá (szelektív koncentráció patkányban 100 nM, egérben 1 μM). Egy másik szelektív P2X7R antagonistá a periodate-oxidized ATP (oATP), ami irreverzibilis antagonistá (Murgia és mtsai 1993), s amelyet korábban széles körben alkalmaztak a P2X7R közvetített hatások azonosítására, különösen az immunrendszerben (Beigi és mtsai 2003, Di Virgilio 2003). A P2X7 receptorra jellemző valamennyi ismert P2X altípus közül, hogy a Zn^{2+} gátló irányban modulálja, míg a Mg^{2+} hiány potenciózza a receptor ioncsatorna komplex nyitódását (Cockcroft és Gomperts 1980). A gap-junction csatornablokkolók közül a carbenoxolone (Michel és mtsai 1999) és a mefloquine (Hibell és mtsai 2000), gátolják a BzATP által indukált Ca^{2+} - ion beáramlást 1321N1 asztrocitóma sejtekben stabilan expresszált patkány P2X7R-on keresztül (Suadecani és mtsai 2006). A P2X7R rövid ideig tartó aktivációja nem szelektív kation beáramlást eredményez. Egy további érdekes sajátossága a P2X7 receptornak, hogy tartós agonista expozíció a membrán pórus progresszív dilatációját idézi elő, amely akár 600 kDA molekulásúlyig áteresztővé válik kationok számára; ezt a pórusképzést leginkább a P2X7 receptor citotoxikus hatásaival hozzák összefüggésbe. A pórus kialakítás molekuláris mechanizmusa valószínűleg magában foglalja a P2X7 receptor alegységek aggregációját a karboxil végződés által közvetített protein-protein kölcsönhatás folyamatán keresztül (Surprenant és mtsai 1996). A pórus nyílása a citoplazmatikus tartalom lízisét okozza, ami a sejten belüli ionok és alacsony molekulatömegű metabolitok kiürítéséhez vezet. Így nem meglepő, hogy az ATP-nek kifejezett citotoxikus hatása van. A nem neurális sejteken, elsősorban mikroglían az ATP apoptózist (Zanovello és mtsai 1990, Molloy és mtsai 1994, Chvatchko és mtsai 1996) és nekrozist (Murgia és mtsai 1992) is előidézhethet, és úgy tűnik, hogy ezeket a sejthalált okozó válaszokat főként a P2X7 receptorok közvetítik. Bár a P2X7 receptort először az agyból izolálták (Surprenant és mtsai 1996), a korábban elterjedt nézet az volt, hogy e receptor elsősorban az immunrendszer sejtjei expresszálják, ma már bizonyítottá vált, hogy a P2X7

receptorok mégsem korlátozódnak az immunsejtekre. Sőt, a P2X7 receptorok széles körben expresszálódnak az agyban, a gerincvelőben, a harántcsíktolt izomban, a tüdőben, a placentában, a csecsemőmirigyben és a lépben (Surprenant és mtsai 1996, Rassendren és mtsai 1997, Collo és mtsai 1997). Sejtbeni lokalizációját illetően a P2X7R-t kódoló mRNS expresszióját igazolták asztrocita (Duan és mtsai 2003) és mikroglia sejtekben (Collo és mtsai 1997), valamint a periférián lévő szimpatikus neuronokon (Allgaier és mtsai 2004), hátsó gyöki ganglion idegsejtekben (Kobayashi és mtsai 2005), illetve centrális neuronokban kisagyi szemcsesejtekben (Hervas és mtsai 2003), és fehérje szinten is megtalálható a patkány gerincvelő serkentő idegvégződéseiben (Deuchars és mtsai 2001, Atkinson és mtsai 2002, Deng és Fyffe 2004), a medulla oblongatában (Deuchars és mtsai 2001, Atkinson és mtsai 2002), a kisagyban, a striatumban, a talamuszban, az amygdalában (Atkinson és mtsai 2002, Hervas és mtsai 2005), valamint patkány (Armstrong és mtsai 2002, Sperlágh és mtsai 2002, Atkinson és mtsai 2002) és mongol ugróegér hippocampusában is (Kang és mtsai 2004). A kollokizációs vizsgálatokban a P2X7R immunreaktivitás együtt jelent meg a vezikuláris glutamát transzporterek (VGLUT1,2) immunreaktivitásával, valamint a vezikuláris GABA transzporterrel (VGAT) és a vezikuláris acetilkolin transzporterrel (VACHT) is az agy és a gerincvelő számos területén (Atkinson és mtsai 2004).

2.1.5.2. A P2X7 receptor funkciója a központi idegrendszerben

Mivel az endogen agonista, az ATP a P2X7 receptorokon meglehetősen alacsony affinitást mutat, valószínűnek tunic, hogy ezek a receptorok elsősorban olyan patológias körülmények között aktiválódnak, amikor sejtlitikus folyamatok következtében magasabb ATP koncentrációk alakulnak ki a receptorok környezetében. Ezt támasztja alá, hogy ischemiás állapotot követően az extracelluláris ATP metabolizáló enzim, ektoATPáznak expressziója megemelkedik és az ischemiás terület környezetében intenzív P2X7R immunreaktivitást is találtak (Collo és mtsai 1997). A **2. ábrán** foglaltuk össze a P2X7 receptor lehetséges támadáspontjait a neurodegeneráció folyamatában.

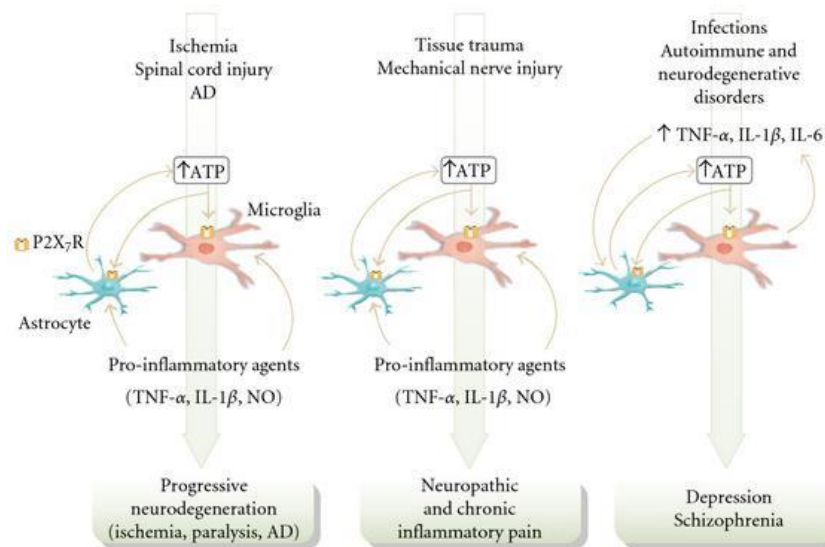


2. ábra A P2X7 receptorok aktivációja több ponton is hozzájárul neurodegenerációhoz

Az idegvégződésen a P2X7 receptor patológiás aktivációja hozzájárulhat az excitátoros aminosavak önerősítő jellegű felszabadulásához és az általuk okozott excitotoxicitáshoz. Tartós aktivációjuk a membránon nagy molekulatömegű kationok számára átjárható pórus képződését indukál és a kaszpáz-1 enzim aktiválásával közvetlenül is apoptózist idézhet elő. A mikroglia sejteken kifejeződő P2X7 receptor aktiváció ionáramokat indukál, valamint az ischémiás neurodegenerációban és azt követő szöveti átépülésben fontos szerepet játszó extracelluláris faktorokat (IL-1 β , TNF- α , NO) szekretál. Makrofág sejteken a P2X7R aktiválódása fokozza az LPS-indukált NO produkciót, sőt, az LPS stimulus endogén ATP-t szabadít fel a makrofágokból (Sperlágh és mtsai 1998). Ezen mediátorok neurodegenerációban játszott szerepe közismert: kísérletes adatok igazolják, hogy míg az IL-1 β , TNF- α és a NO súlyosbítják a neurodegenerációt, az IL-1 receptor antagonisták protektív jellegű. Az asztrocita sejtek a P2X7 receptor aktiváció hatására purinfelszabadulással válaszolnak és résztvesznek az emelkedett excitátoros aminosav szint eltakarításában. Az ischémiát követő nagymértékű gluamátfelszabadulás jelentős részben gliális eredetű (Duan és mtsai 2003) és a P2X7 receptorok hozzájárulhatnak az emelkedett glutamátfelszabaduláshoz, illetve befolyásolhatják az IL-1 β asztrocita sejtekre kifejtett hatásait is, például fokozva az NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorok szintjét, mely a megváltozott citokin válaszhoz vezet. Emelett, a P2X7R-ok aktivációja GABA-t (Wang és mtsai 2002), 2-arachidonoylglycerolt (2-AG) (Walter és mtsai 2004) és purinokat

(Ballerini és mtsai 1996) is felszabadít asztrocita sejt kultúrákból. Érdekes továbbá, hogy az első, P2X7R közvetített transzmitter felszabadulásra utaló adatot primer kortikális asztrocita sejtekből mutatták ki. Ischemia-szerű körülmények ATP felszabadulást előidéző hatását kutatócsoportunk már korábban leírta a hippokampuszban (Juranyi és mtsai 1999) és izolált lépben (Sperlágh és mtsai 2000b), ami arra utal, hogy patológias körülmények közt valóban fokozott P2X7R expozícióval kell számolnunk.

A mikroglia és asztrocita sejteken expresszálandó P2X7 receptorok a sejtpusztulás elleni védekezésben is résztvehetnek pl. a mikroglia sejtek által termelt védő hatású mediátor, a plazminogén (Inoue 1998) produkciójának szabályozásával. (Sperlágh és mtsai 2006). A P2X7R-oknak tehát egyszerre lehet súlyosbító vagy védő szerepük a neurodegeneratív és az idegrendszer egyéb gyulladásos betegségeiben (Sperlágh és mtsai 2006, **3. ábra**).



Skaper és mtsai Cardiovascular Psychiatry and Neurology, 2009

3. ábra. A P2X7 receptorok részvétele a neuropatiás fájdalomban, a neurodegeneratív és neuropszichiátriai betegségekből

A P2X7-szerű receptorok aktivációja Ca^{2+} - ion beáramlást idéz elő izolált közepagyti szinaptikus végződésekből (Miras-Portugal és mtsai 2003). A P2X7 receptor immunreaktivitás a hippokampus gyurus dentatus, valamint a CA1 és CA3 régióinak a serkentő idegvégződéseit jelöli meg, és aktivációja szabályozza, a serkentő

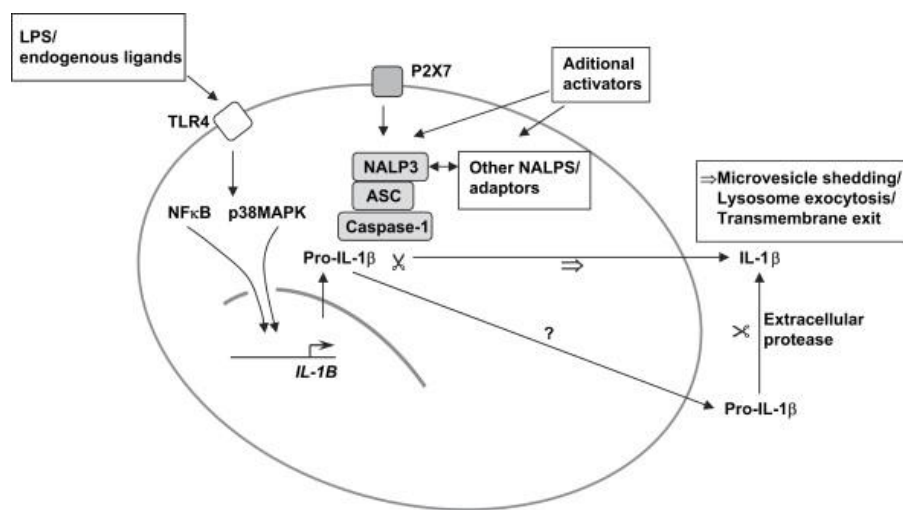
idegvégződésekből, valamint azok interneuron célpontjaiból felszabaduló glutamát és GABA kiáramlást egyaránt (Sperlágh és mtsai 2002). Az asztrocita sejtek közreműködnek az idegszövet gyulladással való reakciójában, a gyulladással indukált ingerek a glia sejtek proliferációját és hipertrófiáját idézik elő, mely folyamatot reaktív gliózissal neveznek, és ezek a sejtek a gyulladással indukált citokinek, kemokinek és más mediátorok expressziójával és termelésével válaszolnak. A P2X7R-oknak szerepük van ezekben a szabályozási útvonalakban, aktivációjuk elősegíti az MCP1 protein expresszióját, ami kritikus faktor a korai monocita bevándorlásban idegrendszeri gyulladással (Panenka és mtsai 2001). Növelik emellett az ERK1/2 és p38 MAPK proteinek foszforilációját, melyeknek meghatározó szerepük van a sejtek apoptózissal való elkötelezettségében (Panenka és mtsai 2001, Wang és mtsai 2003). A P2X7R-ről továbbá kimutatták, hogy az ATP-nek az IL-1 β indukált nukleáris faktor (NF- κ B) expresszióját serkentő hatását közvetíti, és elősegíti az aktivátor protein-1 (AP-1) protein expresszióját is (John és mtsai 2001). Emellett az asztrocita sejtek a Ca²⁺ közvetített jelátvitelen keresztül nemcsak egymással, de a szomszédos sejtekkel, beleértve az idegsejteket és mikrogliait is kommunikálnak. Így az asztrocita sejtekből származó ATP aktiválhatja a mikroglia sejteken lévő P2X7R-eket és intracelluláris Ca²⁺ emelkedést vált ki a mikrogliaiban, mely végül annak citolíziséhez vezet (Verderio és Matteoli 2001). A P2X7R-ek mRNS és fehérje expressziójának fokozódását figyelték meg számos patológiai modellben, mint az *in vitro* energia megvonás (Cavaliere és mtsai 2001, 2004), az *in vivo* ischémia (Franke és Illes 2006), a mechanikai sérülés (Franke és Illes 2006) és az Alzheimer kór (Parvathenani és mtsai 2003). A kombinált oxigén és glükóz megvonás (OGD), amit az ischémia *in vitro* modelljének is tekinthetünk, fokozta a P2X7R immunreaktivitást organotipikus hippokampusz kultúrákban (Cavaliere és mtsai 2004), míg a P2X7R szelektív antagonistákkal oxATP kezelés megakadályozta mind a metabolikus károsodás által kiváltott up-regulációt, mind az idegsejthalált. Megnövekedett P2X7R expresszió megfigyelhető más patológiai modellekben is, így mechanikai sérülés a korábban hiányzó P2X7R-ek expressziójához vezet asztrocitákban és fokozott P2X7R immunfestődést azonosítottak reaktív asztrocitákban szklerózis multiplexben szenvedő páciensek autopsziás agyrészeiben a léziók körül (Narcisse és mtsai 2005). A nem szelektív P2R antagonisták neuroprotektív hatása jól dokumentált glutamát (Volonte és mtsai 1999, Volonte és Merlo 1996) és

kainát (Zona és mtsai 2000) által közvetített excitotoxicitás, glükóz megvonás (Cavaliere és mtsai 2001, Geng és mtsai 1997) és kémiai hypoxia (Cavaliere és mtsai 2001) in vitro modelljeiben.

2.1.5.3. A P2X7 receptor szerepe a citokin produkció szabályozásában

A gyulladáshoz vezető citokin hálózat működtetésében kulcsfontosságú Interleukin 1- β (IL-1 β) termelés transzkripcionális és poszttranszlációs szabályozása összetett folyamat. A primer fehérje termék a pro IL-1 β egy 31-kDa prekursor molekula melyből, az interleukin-konvertáz enzim (ICE, ami kaspáz-1 néven is ismert) (Thornberry és mtsai 1992) hasítása révén keletkezik a biológiailag aktív, mintegy 17-kDa tömegű érett IL-1 β (Mosley és mtsai 1987). Az érett IL-1 β felszabadulásához két egymást követő aktivációs stimulus szükséges (Chin és Kostura 1993): míg bakteriális endotoxin (LPS) ingerléssel monocitákban önmagában csak pro-ICE és pro-IL-1 β szabadul fel (Perregaux és Gabel 1994), egy második stimulus szükséges ahhoz, hogy a pro IL-1 β hasítása megtörténjen és az érett IL-1 β felszabaduljon. A periférián a bakteriális endotoxin hatására létrejövő, biológiailag aktív IL-1 β produkcióhoz szükséges másodlagos externális szignál a P2X7 receptor aktiváció biztosítja (Perregaux and Gabel, 1994, Solle és mtsai 2001) K^+ - ion kiáramlás közvetítésével, amely független az ugyancsak P2X7 receptor által közvetített apoptózistól (Ferrari és mtsai 1996, 1997a, 1997b). Ismereteink szerint a makrofágok bakteriális endotoxinnal történő előkezelésére (úgynevezett „priming”), az LPS kötő receptor TLR4 aktiválódik, melyet intracellulárisan az NF κ B és p38 MAPK útvonal aktiválódása (Kim és mtsai 2004a, 2004b, Simi és mtsai 2002), majd a pro-IL-1 β és az inflammaszóma (inflammasome accessory protein (ASC)) megjelenése követ **(4. ábra)**. Kutatócsoportunk már korábban kimutatta, hogy a P2X7 receptoraktiváció fokozza a p38MAPK expresszióját egér hippocampusban (Papp és mtsai 2007). Ismeretes továbbá, hogy a hippocampális P2X7 receptorok nemcsak fiziológiai körülmények között (Papp mtsai 2007; Sperlagh mtsai 2002), hanem in vitro ischemia-szerű inzultust követően is fokozzák a neurotransmitter felszabadulást (Wirkner mtsai 2005). Számos in vitro gyulladáshoz

modellben már sikeresen azonosították a P2X7 receptorok szerepét az LPS kezelést követően detektálható, érett IL-1 β produkció szabályozásában: így mikroglia és kevert mikroglia sejtenyészetben, hippocampális organotipikus szelettenyészetben egyaránt (Ferrari és mtsai 1997a, Bernardino és mtsai 2008, Mingam és mtsai 2008). Hasonlóan a perifériás immunsejtekhez, a P2X7 receptor aktiváció, mint második externális szignál a mikroglia sejtekben is az IL-1 β LPS stimulációra történő poszttranszlációs feldolgozásában tölt be szerepet (Brough és mtsai 2002, Ferrari és mtsai 1997b, Sanz és Di Virgilio 2000, Simi és mtsai 2007).



Simi és mtsai 2007

4. ábra Az IL-1 β produkció P2X7 receptor függő szabályozásának feltételezett mechanizmusa

A fenti eredmények nagy részét azonban in vitro körülmények között szereztek, ehhez képest, elenyésző az agyi IL-1 β produkciót és annak P2X7 receptor függő szabályozását in vivo modellekben leíró közlemények száma. Mingam és munkacsoportja pár éve kimutatta, hogy a szisztémás LPS kezelés P2X7 receptor függő módon váltott ki a hipotalamuszban IL-1 β mRNS expresszió növekedést (Mingam és mtsai 2008), de további meggyőző bizonyíték nem állt rendelkezésre.

Napjainkban már nem kérdéses, hogy a P2X7R-ok szerepe kulcsfontosságú a gyulladásoz folyamatokban a citokin termelés és apoptózis szabályozása révén. Gyulladásoz stimulus hatására a P2X7R-ok intenzív expresszió növekedést is mutatnak,

és a P2X7 receptorokra először, mint a mononukleáris fagocitákból felszabaduló IL-1 β -nak egy potenciális modulátoraként terelődött a figyelem (Perregaux és Gabel 1994, Ferrari és mtsai 1997a, 1997b, Murgia és mtsai 1992, Falzoni és mtsai 1995, Di Virgilio 1995). A monocita-makrofág rendszer sejtjein kifejeződő P2X7 receptorok az alábbi citokinek és a gyulladáshoz vezető mediátorok expressziójának és felszabadulásának szabályozását modulálják: IL-1 β (Ferrari és mtsai 1997b, Grahames és mtsai 1999, Mehta és mtsai 2001, Lábasi és mtsai 2002, Gudipaty és mtsai 2003, Verhoef és mtsai 2003, Brough és mtsai 2003), IL-2 (Loomis és mtsai 2003), IL-4, IL-6, IL-13, IL-18 (Mehta és mtsai 2001, Sluyter és mtsai 2004), TNF- α (Bulanova és mtsai 2005), NO (Hu és mtsai 1998, Sperlágh és mtsai 1998) és szuperoxid anionok (Suh és mtsai 2001). Ahogy korábban már említettük az érett IL-1 β felszabadulásához két egymást követő stimulus szükséges (Chin és Kostura 1993): míg LPS ingerléssel monocitákban önmagában csak pro-ICE és pro-IL-1 β szabadul fel (Perregaux és Gabel 1994), egy második stimulus szükséges ahhoz, hogy a pro IL-1 β hasítása megtörténjen és az érett IL-1 β felszabaduljon. Az egyik ilyen másodlagos stimulus az ATP-stimulált K⁺ - ion kiáramlás (Perregaux és Gabel 1994), ami P2X7R-mediált, és független a P2X7 receptor aktiváció által kiváltott apoptózistól (Ferrari és mtsai 1997a). Ezt megerősítették farmakológiai tanulmányokban (Sanz és Virgilio 2000), valamint P2X7 receptor génkiütött (KO) egereket használva, melyekből származó peritoneális makrofágok képtelenek voltak érett IL-1 β termelésre LPS, illetve ATP jelenlétében. Mindezen eredmények azt sugallják, hogy normál egerekben az endogén ATP elegendően magas koncentrációkban van jelen a gyulladás helyeinél, hogy aktiválja a P2X7 receptort (Solle és mtsai 2001, Lábasi és mtsai 2002). Ez in vitro körülmények között 0.5-5 mM ATP koncentrációt jelent, legalábbis az P2X7R-közvetített IL-1 β felszabadulás vonatkozásában (Elssner és mtsai 2004). Ismert továbbá, hogy az LPS ATP-t is felszabadíthat a mikroglia sejtekből, és a P2X7R szelektív antagonistá, oATP exogén ATP hiányában is megakadályozta az LPS-indukált IL-1 β felszabadulást mikroglia sejtekben (Ferrari és mtsai 1997a, 1997b). Ezt támasztja alá, hogy P2X7R -/- KO egerekből származó mikroglia kultúrából nem szabadult fel IL-1 β ATP és LPS stimulációt követően (Brough és mtsai 2002). Az ATP felszabadulása elképzelhető haldokló sejtekből is, mely P2X7R aktivációhoz vezethet, ami IL-1 β felszabadulást eredményez, az IL-1 β pedig indukálja a COX-2 enzimet, ami további sejtelhalást von

maga után és további ATP felszabadulást idézhet elő. Ez az önerősítő ciklus végső soron hozzájárulhat a lézió kiterjedéséhez az ischémiás és traumás agykárosodás során (Le Feuvre és mtsai 2003).

2.1.5.4. A P2X7 receptor szerepe a depresszió patomechanizmusában

Időközben a fent vázoltak mellett egy újabb lehetséges indikációs területre terelődött figyelmünk, ahol számottevő lehet a P2X7 receptorok által közvetített szabályozó funkció az említett neurodegenerációs és neuroinflammációs betegségek mellett. Az irodalmi áttekintés 2.3. fejezetében részletes ismertetjük a major depresszió és bipoláris betegség etiológiai okait, a P2X7 receptort kódoló gént érintő polimorfizmusról és a neuropszichiátriai betegségekhez való asszociációjáról azonban itt fog szó esni.

A közelmúltban génpolimorfizmus vizsgálatok a P2X7 receptort kódoló gén egy GLN460Arg mutációjának szignifikáns asszociációját mutatták ki mind major depresszióban, mind bipoláris betegségben szenvedő betegeknél, amely a betegségre történő szuszeptibilitást is befolyásolhatja (Barden és mtsai 2006, Lucae és mtsai 2006). A fenti mutációról később kiderült, hogy gain-of function hatást eredményez (Stokes és mtsai 2010). A fenti adatokat azóta megjelent újabb vizsgálatok eredményei részben ugyan cáfolták (Green és mtsai 2009, Serbanescu és mtsai 2009), azonban a legújabbak ismét megerősítették (Hejjas és mtsai 2009; McQuillin és mtsai 2009, Backlund és mtsai 2011). Egy másik, a GLN496Ala mutációról ugyanakkor kiderült, hogy szignifikánsan társítható gyulladási betegségekhez. A pontmutációt a P2X7 receptort kódoló gén 1513 pozíciójánál, azonosították, mely a C terminális 496-os pozíciójában glutaminsav alanin cserét eredményezve egyúttal receptor funkció kieséséhez (loss of function) is vezet (Gu és mtsai 2001). Ez a polimorfizmus az ATP indukált K^+ - ion kiáramlást csökkenti, és ennek következményeként késlelteti az ATP-indukált IL-1 β felszabadulást. A késleltetett, de meg nem szűnő IL-1 β felszabadulás valószínűsíti egyéb kompenzációs mechanizmusok aktiválódását is (Stokes és mtsai 2010). Csökkent gyulladás iránti érzékenységet és a P2X7 receptor funkcióvesztő mutációjának asszociációját számos gyulladási betegség vonatkozásában leírták (Denlinger és mtsai 2003). A fenti vizsgálatok eredményei, ha nem is bizonyítják, de mindenképpen felvetették a P2X7 receptorok szerepét a depresszió patofiziológiájában,

amelynek állatkísérletes igazolására vállalkozott kutatócsoportunk (Csölle és mtsai 2013). Egy széles körben alkalmazott, a depresszió-szerű viselkedést modellező vizsgálatban, a Porsolt kényszeres úzás tesztben a P2X7 receptor génkiütött egerek, valamint vad típusú társaik önfeladás viselkedését hasonlítottuk össze. A teszt során a kísérleti állatokat egy vízzel telt üveghengerbe helyezük, amelyekben az egerek, hogy a süllyedést elkerüljék, úzásra vannak kényszerítve. Ugyanakkor egy idő után az állatok feladják és abbahagyják az úzást, sőt, az ismételt tesztek során egyre hamarabb hagyják abba az úzást, vagyis kialakul az ún. „behavioral despair”, a magatartási önfeladás jelensége. Ez a jelenség tekinthető a depresszió-szerű viselkedésnek, mivel párhuzam vonható a humán depresszióban is jól megfigyelhető stressz tűrőképesség és a cselekvések iránti motiváció csökkenésével. A P2X7 receptor génkiütött egerek vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a magatartási önfeladás ezekben az egerekben egyáltalán nem alakul ki, vagyis a P2X7 receptort kódoló gén és ezáltal a P2X7 receptor megléte szükséges ahhoz, hogy a megfigyelt depresszió-szerű jelenség kifejlődjön. A P2X7 receptor génkiütött egerekben a gyulladáscsökkentő endotoxin kiváltott depresszív magatartás szintén csökkent mértéket mutatott. A kutatócsoportunk által elvégzett viselkedés teszt eredményeit időközben megjelent irodalmi adatok is megerősítették (Basso és mtsai 2009, Boucher és mtsai 2011).

Összefoglalva jelenlegi tudásunk szerint a P2X7 receptor aktiváció feltehetően súlyosító szerepet játszik a depresszióban, a P2X7 receptor aktiváció és a depresszió kialakulása közötti kapcsolat azonban nagyrészt még feltáratlan ezért annak kutatása indokolt és időszerű.

2.2. A neurodegeneráció

2.2.1. A noradrenalin szerepe az ischemiás neurodegenerációban

Az idegtudományi kutatások egyik legfontosabb és eddig megválaszolatlan kérdése a neurodegenerációhoz, azaz az idegsejtek pusztulásához vezető folyamatok okainak és pontos mechanizmusának feltárása. Az idegi sejtelhalás fiziológiásan kis agyi területre koncentrálódva a normál öregedési folyamatok kísérői, míg számos nagy jelentőségű

idegrendszeri betegség (pl. stroke, agyvérzés, arteriosclerosis cerebri, Alzheimer kór, Parkinson kór) esetében már kóros neurodegenerációról beszélünk, mely jelentős funkcionális deficiettel jár és kihat az életminőségre is. A legújabb vizsgálatok kimutatták a neurodegeneratív folyamatok részvételét a neuropszichiátriai betegségek patomechanizmusában is. A kiterjedt sejtpusztulás klinikai következménye a neuronális diszfunkciója, mely az érintett agyterület funkciójától függően szenzoros, motoros, vagy asszociatív funkciók deficitjével, továbbá demenciában nyilvánul meg. A területen folyó intenzív kutatás ellenére nem megoldott az említett megbetegedések gyógykezelése: bár a neurodegeneráció összetett folyamatában számos lehetséges célpont (pl. glutamát receptor antagonisták, Ca^{2+} -antagonisták, neurotróf faktorok) kínálkozik a gyógyszeres beavatkozásra, az eddigiekben használt terápiás megközelítések ez idáig nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, mivel vagy hatékonyságuk elégtelen, vagy a működő ingerületátviteli folyamatokba is beavatkozva jelentős pszichés és/vagy neurológiai mellékhatásokkal járnak. Feltételezésünk szerint, a neuronok és a központi idegrendszerben jelenlevő nem neuronális sejtek felszínén expresszálódó receptorok nem egyöntetű mértékben vesznek részt fiziológias működésekben és a neurodegeneráció folyamatában; a receptorok egy része patológiás körülmények közt aktiválódik. Ebből kifolyólag, a neuronális sejtelhalás folyamatába való beavatkozásra az eddigieknél eredményesebb megközelítés lehet olyan receptorok serkentése vagy éppen gátlása, amelyek élettani körülmények közt csak kismértékben játszanak szerepet, ugyanakkor patológiás körülmények közt több támadásponton is befolyásolhatják a neuronok túlélését. Ilyen új terápiás lehetőséget rejthet magában a purinerg neurotranszmisszió mélyebb megismerése, mely az eddigi adatok alapján egyszerre több támadásponton keresztül is befolyásolhatja a neurodegeneráció folyamatát. A purinerg jelátvitel egyik fontos specifikuma, hogy az ATP nem csak idegi sejtekben található, hanem az idegrendszer egyéb sejtjeiben is (pl. asztrocita sejtek, mikroglia, endothel); azokból fel is szabadulhat, többek között patológiás stimulusra is, továbbá hatásait nem csak az idegsejteken fejt ki, vagyis univerzális jelátvivő molakulaként funkcionál. Mint ismeretes, ischemia-szerű körülmények között a [3H]purinok, köztük a [3H]ATP, nagy mennyiségben szabadul fel a hippocampusból (Borst és Schrader 1991, Juranyi és mtsai 1999), továbbá az is elképzelhető, hogy ennek a purinfelszabadulásnak van egy önerősítő jellegű mechanizmusa, amely P2 receptorok

részvételével történik. A purinerg jelátvitel másik fontos jellegzetessége az ATP érzékeny P2 receptorok diverzitása, amely új terápiás célpontok tárházát kínálja, ezek azonban mindeztidáig nagyrészt kihasználatlanok maradtak a gyógyszerfejlesztés számára.

A P2 receptorok lokalizációja alapján megkülönböztetünk szomato-dendritikus elhelyezkedésű (posztszinaptikus) és axonterminálison elhelyezkedő (preszinaptikus) receptorokat. A posztszinaptikus P2 receptorok általában serkentő, míg a preszinaptikus P2 receptorok közül az eddigi kutatások alapján a P2X receptorok serkentő, míg a P2Y receptorok gátló hatást közvetítenek. Munkacsoportunk eddigi kutatási eredményei alapján a noradrenerg végződések a periférián és a központi idegrendszerben serkentő P2X receptorokat fejeznek ki, melyek fokozzák a noradrenalin felszabadulását (Sperlágh és mtsai 2000a, Papp és mtsai 2004a), a gátló purinerg szabályozásról azonban egyelőre kevés ismerettel rendelkezőnk. A disszertáció első részében ezt a hiányt pótolandó a centrális noradrenalin felszabadulás szabályozásában résztvevő gátló ATP érzékeny receptorok feltérképezését és farmakológiai azonosítását tűztük ki célul. Kíváncsiak voltunk, hogy ezen receptorok aktiválódnak-e fiziológias neuronális aktivitás során, másrészt olyan patológias körülmények között, mint az *in vitro* ishémiászerű körülmények. Ismert ugyanis, hogy az ischémiára különösen érzékeny hippocampusban ilyen körülmények között fokozódik a noradrenalin kiáramlása, amely hozzájárulhat a neurotranszmitter egyensúly ilyenkor megfigyelt felborulásához, illetve magához a neuronális sejtelhaláshoz is, tudniillik a reperfüzió során a monoaminokból autooxidáció révén toxikus szabadgyökök is keletkezhetnek, amelyek súlyosbíthatják az ischémiát már elindított, a sejtelhaláshoz vezető kóros eseményt (White és mtsai 2000, Milusheva és mtsai 2003). A várható eredmények alapján tehát újfajta terápiás célpontokat azonosíthatunk az ischémiás neurodegeneráció kezelésére, illetve olyan terápiás területeken, amelyekben a noradrenerg rendszer jelenlegi ismereteink szerint fontos szerepet játszik (pl. depresszió, hipertenzió, alvás-ébrenléti ciklus szabályozása).

Az akut neurodegeneratív kórképek közé sorolható ischémiás agykárosodás (klinikai szóhasználatban: stroke) során az agyi regionális véráramlás-csökkenés következménye az energiatartalékok (glikogén, oxigén, ATP) kimerülése, az energiakrízis. Kritikus mértéket meghaladó áramlás-csökkenés hatására térben és időben

különböző mechanizmusok eredményezik a szövetkárosodást, szövetpusztulást. Bebizonyosodott, hogy számos neurokémiai változás követi az energia tartalékok kiürülését agyi ischemiás kórképekben, ezek a teljesség igénye nélkül az excitotoxicitás, reaktív szabadgyökök termelődése és a citokinek által mediált gyulladásos reakció. Az ischemia pathomechanizmusát több szakaszra osztják, térben és időben a károsodás központi részétől (ischemiás core) távolodva különböző neurokémiai folyamatok zajlanak le. Percek alatt aktiválódnak az azonnali korai válasz gének (c-fos, fos-B. stb), indukálódnak a citokinek (TNF α , IL-1 β), egyéb gyulladásos faktorok, adhéziós molekulák, majd megkezdődik az oxigényökök és reaktív származékaik termelődése. Napok alatt következik be a kaspázok és nukleázok aktiválódása következtében a kiterjedt sejtpusztulás. A kezdeti fázisban az oxigén és a glükóz hiánya miatt a sejtek ATP szintje csökken (Milusheva és mtsai 1996), amelynek hatására az energiát biztosító nagyenergiájú foszfátok szintézise szubsztrát utánpótlás nélkül marad. Korábbi kísérleteinkben hippocampusz szeletekben 30 perces kombinált oxigén és glükózmegvonás hatására az ATP tartalom valamint az „energy charge” jelentős redukcióját észleltük (Milusheva és mtsai 1996). Mivel a termelt energia nagy része neuronokban a nyugalmi membránpotenciált fenntartó ionpumpák működésének ellátására fordítódik, az energiakrízis azonnali következménye az ionkonduktanciák és az excitabilitás megváltozása. Így leállnak olyan energiaigényes folyamatok, mint a Na⁺-K⁺ - pumpa működése, ezért a sejtekben megnő az intracelluláris Na⁺ koncentráció miközben a K⁺ ionok a sejtekből kifelé mozognak. Az ideg- és gliasejtek ezért nem képesek biztosítani normális nyugalmi membrán potenciáljukat és depolarizálódnak. A kezdeti, lassú membránpotenciál növekedést, egy hirtelen és nagyfokú depolarizációs ugrás, majd egy plató fázis követi (Martin és mtsai 1994, Muller és Somjen 2000, Wang és mtsai 2000). A Na⁺K⁺ pumpa elégtelen energiaellátottsága miatt intracellulárisan Na⁺ akkumulálódik, mely depolarizálva a neuronokat jelentős mértékű többlet neurotranszmitter felszabadulást idéz elő. Ez a típusú neurotranszmitter felszabadulás azonban a fiziológiával ellentétben [Ca²⁺]_o független (Nakai és mtsai 1999) és transzporterrel inaktiválódó neurotranszmitterek esetében (noradrenalin, excitátoros aminosavak) a Na⁺ függő transzporter megfordulásának köszönhető (Nakai és mtsai 1999). Ennek fővetkezményeként kialakuló fontos változás emellett a neurotranszmitterek felszabadulásának megbomlott egyensúlya, amely önálló patológiás

tényezőként is hozzájárul a neurodegeneráció kialakulásához. Az excitátoros szinapszisokban a glutamát tartósan, extrém (akár 10 mM-os koncentrációt elérve) módon megemelkedik, melyet részben a tartós depolarizáció, részben az ezzel lépést tartani nem képes reuptake rendszer elégtelensége eredményez. A neuronok önerősítő jellegű aktiválódása következtében az ATP fogyasztás tovább emelkedhet és az energiakészlet teljesen kimerül. A Na^+ és Cl^- beáramlás passzívan vizet von magával az intracelluláris térbe. A sejtek és az agyszövet megduzzad, kialakul az agyödéma. Ezeket a még reverzibilis károsodást eredményező eseményeket az ischemiás kaszkád további elemei, a végrehajtó mechanizmusok követik. Ezek közé sorolható az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése, a glutamát felszabadulása, az intracelluláris pH csökkenése és az intracelluláris Zn^{2+} koncentráció növekedése. A két utóbbi változás jelentősége korántsem elhanyagolható a neurotoxicitásban. A „forrás specificitás” hipotézis szerint nem a megemelkedett intracelluláris kalcium koncentráció a meghatározó a sejtkárosodásban, hanem az, hogy milyen mechanizmussal áramlik a sejtbe a Ca^{2+} (Sattler és Tymianski 2000). Az excitotoxicitás lényege, hogy az excitátoros aminosavak neurondegenerációt váltanak ki azokban az agyi régiókban, melyekben fiziológiásan is magas az excitátoros aminosav koncentrációja (excitotoxicitás hipotézis), míg a gliasejtek és az ezeket a területeket keresztező axonok megőrzöttek maradnak. A glutamátnek kétféle sejtkárosító hatását írták le. A kezdeti hatást (azonnali excitotoxicitás) Na^+ - illetve Cl^- -függőnek találták, ezt akut vagy ozmotikus szakasznak is szokták hívni, mely a neuronok ödémás duzzanatát és pusztulását idézi elő. A késői sejtkárosodás (késleltetett sejthalál, késői excitotoxicitás) proteolitikus és csak Ca^{2+} jelenlétében alakul ki. A magas glutamátszint ingerületbe hozza az összes glutamát-receptor-altípust (NMDA, AMPA/kainát, metabotróp glutamát receptorok), melyek túlingerlődése és az NMDA- receptor csatornákon belépő Ca^{2+} ionok megemelik az intracelluláris Ca^{2+} szintet, mely kalcium dependens proteázokat, lipázokat aktivál, amelyek végül a sejt lízisét eredményezik. Mindkét sejtkárosító komponensre jellemző, hogy önmagában is képes irreverzibilis sejtkárosodást előidézni (Choi 1987a, 1987b), bár az akut szakasz kis kiterjedése miatt csökkent sejtpusztulással jár. A felszabaduló glutamát fő mechanizmusa valószínűleg a Na^+ -függő glutamát transzporter megfordulása (Rossi és mtsai 2000, Sperlagh és mtsai 2007). Mindezen változások végső következménye a neuronális sejtelhalás az

intracelluláris Ca^{2+} tútelítődés és a sejt lítikus fehérjéinek aktiválódása által. A helyzetet a reperfüziós fázis tovább ronthatja, mivel ilyenkor toxikus szabadgyökök keletkeznek, melyek neurotoxikus hatása immár visszafordíthatatlanná teheti a neurodegeneráció folyamatát, még akkor is, ha az ischemiás inzultus rövid és átmeneti volt (Cadet és Brannock 1998). Az ischemiára különösen érzékeny hippocampusban kimutatták, hogy in vitro ischemia-szerű körülmények között fokozódik a noradrenalin kiáramlása, mely egyrészt hozzájárul a neurotranszmitter egyensúly ilyenkor megfigyelhető felborulásához, másrészt a monoaminokból autooxidáció révén toxikus szabadgyökök is keletkezhetnek, amely (Milusheva és mtsai 2003), amely súlyosbíthatja az ischemia által már elindított a sejthalálhoz vezető kóros eseménysort.

Annak ellenére, hogy a monoaminerg sejtek száma meglehetősen alacsony az agyban, ezek a sejtek jelentős hatást fejtenek ki a központi idegrendszer működésének szabályozásában. A noradrenerg sejteknek számottevő populációja található a nyúltvelő A1-A3-as magvaiban és a híd területén található A4-A7-es magokban. Ezek közül a legjelentősebb a locus coeruleus (A6-os mag), melyből kiinduló rostok adják a dorzális előagy, a limbikus kéreg, akisagy, a hipotalamusz és a disszertáció tárgyát képező hippocampusz noradrenerg innervációját is. A centrális noradrenerg transzmisszió kitüntetett szerepet játszik a táplálékfevétel, a vérnyomás, bizonyos neuroendokrin hormonok szekréciójának szabályozásában, akár csak a fájdalomcsillapításban, az önjutalmazási / büntetési rendszer és a hangulat szabályozásában. Többek között a noradrenerg transzmisszió deficitjét feltételezzük olyan affektív kórképekben, mint amilyen a depresszió, és számos általánosan alkalmazott anitdepresszáns (pl. desipramine, imipramine) ezt ellen súlyozandó gátolja a noradrenalin visszavételét az idegvégződésekre. A kokain és a hozzá hasonló pszichostimulánsok a dopamin és noradrenalin transzporterén hatva fokozzák a katekolaminerg rendszer funkcióját. Az alvás-ébrenlét ciklus szabályozása során a locus coeruleus neuronjainak tüzelési frekvenciája ébredéskor fokozódik, míg lassú hullámú és REM alvás alatt jelentősen csökken. Továbbá, a locus coeruleus sejteit tehetők felelőssé leginkább az ártalmas vagy stresszes ingerek által kiváltott félelemért, ugyanis ezek tüzelési frekvencia növekedést okoznak a locus coeruleus sejteit között, noradrenalin szint emelkedést előidézve a beidegzett agyi régiókban (pl. az α_2 adrenerg receptor antagonistá yohimbine, amely a gátló autoreceptorokat blokkolja és így növeli a locus coeruleus sejtek tüzelését,

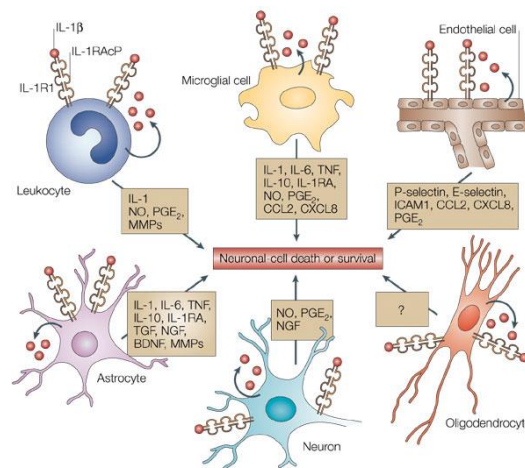
szorongást és félelmet vált ki laboratóriumi állatban és emberben egyaránt). A noradrenerg rendszer a normális félelem és stressz válaszokhoz is hozzájárulhat, valamint olyan neuropszichiátriai betegségekhez társult félelem és stressz tünetegyüttesekben, mint a pánikbetegség, vagy a poszttraumás stresszbetegség.

A noradrenalin felszabadulás szabályozása azonban nem az egyetlen lehetséges támadáspont, amely által a neurodegeneráció purinerg mechanizmusokon keresztül szabályozható. A gyulladáscsökkentő citokinek, így az Interleukin-1 β (IL-1 β) idegi sejtelhalást súlyosbító hatásai már régóta ismertek (Martin F. Lister és mtsai 1998), melyek az ischémiát követően elsősorban a nem idegi sejtekből, tehát a mikroglia- és asztrocita sejtekből szabadulnak fel. Ugyanakkor jelenlegi ismereteink szerint a hippocampusz a rövid-távú memóriáért és a tanulási folyamatokért is felelős agyterület, ezen folyamatokban pedig az IL-1 β az LTP gátlásán keresztül tölt be kiemelt szerepet (Kelly és mtsai 2003, Cunningham and Sanderson, 2008).

2.2.2. Az Interleukin-1 β részvétele a neurodegenerációban

Az Interleukin-1 β (IL-1 β) sokrétű biológiai hatásai közül kiemelendő, hogy kulcsfontosságú szabályozó szerepet tölt be nemcsak a perifériás immunrendszer, de az agyi citokin hálózat működésében is (Laye és mtsai 2000), szabályozva a neuroinflammációt és a neurodegeneratív folyamatok lefolyását. A leggyakrabban felmerülő neurodegeneratív kórképek között egyaránt megtalálható az akut (ischemia, idegi sérülés) és a krónikus idegsejtpusztulással járó progresszív betegségek (Alzheimer demencia, Parkinson kór) (Allan és mtsai 2005). Az aktivált mikroglia-sejtekről, valamint az asztrocita sejtek szubpopulációjáról ismert, hogy részt vesznek a központi idegrendszer gyulladáscsökkentő folyamataiban egyrészt fagocita funkcióval, másrészt a proteinázok felszabadításával, valamint a citokin termelésének képességével. A citokinek nagy családjába olyan peptid molekulák tartoznak, melyek a sejtnövekedésben, a gyulladáscsökkentő folyamatokban is részt vesznek, továbbá az immunrendszer sejtjei között a kommunikáció is citokineken keresztül valósul meg. A citokinek rendszerint kaszkádok formájában, felerősítve fejtik ki hatásukat nagy affinitású receptorok közvetítésével. Bizonyos citokinek egyértelműen fokozzák a gyulladást, ezeket proinflammatorikus citokineknek nevezik, míg más citokinek

ellensúlyozzák a proinflammatorikus citokinek aktivitását, ezek az antiinflammatorikus citokinek. A kettő közötti határ sokszor nem egyértelmű, az immunválaszt a gyulladásos fehérjék komplex és bonyolult hálózata alakítja ki. A pro- és antiinflammatorikus citokinek egyensúlya, illetve ezen egyensúly felborulása befolyásolhatja az egyes betegségek kialakulását és azok kimenetelét. Az egyértelműen proinflammatorikus citokinek közül legismertebb az IL-1, IL-2, IFN-gamma és a TNF-alfa., míg az IL-4 és IL-10 döntően antiinflammatorikus citokin. Az IL-1 családot az IL-1 α , IL-1 β , és a hatásukat gátló IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) alkotja. Az IL-1 α -t és az IL-1 β -t a mononukleáris sejtek termelik gyulladás és baktériumendotoxin hatására. Az IL-1 β stimulálja a T- és a B-limfocitákat. Az IL-1 β a TNF α -val szinergista módon hatva fokozza a foszfolipáz A2, az iNOS aktivitását, az endotéliális adhézión molekulák expresszióját és a kemokin szintézist. Ennek eredménye vazoaktív és gyulladásos mediátorok termelődése. A központi idegrendszerben, a rezidens makrofágnak tekintett mikroglia sejtek a fő forrásai az IL-1 β produkciónak, de az asztroglia sejtek, neuronok, endothél sejtek és infiltráló leukocita sejtek is hozzájárulhatnak a neuroinflammációhoz. Az **5. ábrán** látható, hogy IL-1 β receptorán, az IL-1R-on hatva számos sejtípus esetében további inflammatorikus (IL-1, IL-6, TNF- α , NO) de neuroprotektív mediátor (IL-1R antagonist, BDNF, NGF) felszabadulását is indukálhatja. Ezen mediátorok hatásának eredője határozza meg az adott mikro környezet sejtjeinek sorsát, ami lehet sejt túlélés vagy sejtpusztulás.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

5. ábra Az Interleukin-1 β központi idegrendszeri hatásai és célsejtjei

2.3. A depresszió patomechanizmusa

A major depresszió és a bipoláris betegség az egyik leggyakoribb előfordulású pszichiátriai betegségcsoport. A hangulat-kedélyállapot és az önértékelés krónikus, negatív irányú eltolódottsága jellemzi, amely a munkaképességet és az életminőséget is alapjaiban befolyásoló pszichés és pszichomotoros tünetekben nyilvánul meg. Mivel a depresszió jelentős mértékben emelheti az egyéb megbetegedések (pl. szív- és érrendszeri betegségek), illetve az idő előtti elhalálozás gyakoriságát (Harris és Barraclough 1998), a depressziós tünetegyüttes jelentős egészségügyi rizikófaktornak tekinthető, amelynek felismerése és kezelése az alapellátás szintjén is fontos a későbbi magatartási zavarok, egészségügyi következmények megelőzése céljából. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy gyógyszeres kezeléssel csak a depressziós betegek 60-70 %-a kezelhető eredményesen. A depresszió neurokémiai hátterének jobb megértése minden bizonnyal elősegítené a hatékonyabb antidepresszív szerek kifejlesztését. Etiológiájában a ma uralkodó nézet biológiai, genetikai és környezeti okokat egyaránt megemlíti, patofiziológiája azonban csak részben tisztázott. Az elfogadott elméletek szerint a legfontosabb változások többek között az agyi monoaminerg rendszert, a HPA axis működését valamint az immunrendszer megváltozott reakcióját és a gyulladáshoz vezető választ érintik. Ezek a változások természetesen egymással is kölcsönhatásban állhatnak, a közöttük létrejövő pontos ok-okozati összefüggéseket azonban nem sikerült felderíteni. A következőkben pár, de nem az összes depressziót magyarázó elméletet soroljuk fel. A depresszió kialakulásának jelenleg legelfogadottabb magyarázata a monoamin teória, amely szerint a betegség a noradrenalin illetve a szerotonin által közvetített ingerületátviteli folyamatok elégtelenségének a következménye (Schildkraut 1965, Coppen 1967). A depressziós tünetek kezelésében ma a monoaminerg rendszeren ható gyógyszerek gyakorlatilag egyeduralkodóak, noha elméletileg sok egyéb támadáspont szerepe is felmerül. Ezek a gyógyszercsoportok (TCA, SSRI, MAO bénítók, atípusos, több támadáspontú szerek) - noha a betegek jelentős hányadában képesek remissziót és akár teljes tünetmentességet előidézni -, alapvetően tüneti és nem oki terápiát reprezentálnak és a betegek 15-20 %-ban hatástalanok maradnak. Emellett speciálisan, gyakorlatilag valamennyi forgalomban levő antidepresszánt érintő hátrány a lassan kialakuló hatás, amely súlyos esetekben akár életet veszélyeztető kockázatot rejthet magában. Bevezetésre kerültek

azonban olyan vegyületek is, melyek mai ismereteink szerint nem a monoamin teóriával összhangban működnek (Mennini és mtsai 1987, Fattacini és mtsai 1990, Loo és mtsai 1999). Számos egyéb megfigyelés sem illeszthető be a monoamin teória keretei közé. Mindezidáig nem sikerült meggyőző bizonyítékot szolgáltatni a monoaminerg neurotranszmisszió zavaráról a depressziós betegek körében. Az antidepresszánsok felszívódásuk után azonnal kifejtik hatásukat a monoaminerg neurotranszmisszióra, klinikai hatásuk azonban csak 2-3 héttel a kezelés megkezdése után jelentkezik (Nestler 1998). A citokin elmélet egyesíti a depresszió immun- ill. hypophysis-hypothalamus-mellékvesekéreg hiperreaktivitás elméletét. A citokineket több vonatkozásban is kapcsolatba hozzák a depresszió etiológiájával. Citokinekkal kezelt betegekben depressziós tüneteket észleltek, ill. depressziós betegekben az immunrendszer fokozott aktivitását figyelték meg. Emellett bizonyos citokinek agyi noradrenerg ill. szerotonerg rendszereket is aktiválnak (Dunn és mtsai 2005, Simmons és Broderick 2005, Schiepers és mtsai 2005, Leonard és Song 2002). Egy további, egyre inkább elfogadottá váló alternatív depresszió teória a depresszió tüneteit az információfeldolgozás zavarával magyarázza, a depresszió valódi kiváltó okának, pedig a neuron-hálózatok csökkent plaszticitását tekinti (Duman és mtsai 1997, Castren 2005). Jelenlegi ismereteink szerint az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek dinamikájának kulcsszerepe van a neuronok LTP és LTD közötti elköteleződésében, így a magas Ca^{2+} permeabilitással rendelkező P2X7 receptorok szerepe is felmerült a plaszticitási folyamatok szabályozásában. A depresszió egyik legmodernebb felfogása, az ún. network-hipotézis szerint a depresszió elsődleges kiváltó oka az idegrendszert ért különböző ártalmas hatások következtében fellépő sejtd degeneráció illetve sejtpusztulás. Emiatt először csökken a szinaptikus kapcsolatok száma, majd a neurális hálózatokat felépítő sejtek száma is, ami az információfeldolgozás zavaraihoz, végeredményben, pedig a depresszió kialakulásához vezet (Castren, 2005). Az elmélet szerint az antidepresszánsok hatása azért fejlődik ki lassan, mert az általuk indukált plaszticitási folyamatokhoz, melyek az ideghálózatok regenerációját segítik elő, hosszabb időre van szükség. Az elképzelést igazolni látszik az a megfigyelés, hogy az antidepresszánsok serkentik az új idegsejtek képződését patkány hippocampusában (Malberg és mtsai 2000). Az elmélet képes egyesíteni a korábban említett számos depresszió teóriát, hiszen az agyi sejthálózatokat a korábban felsorolt tényezők mindegyike képes

befolyásolni, így az említett rendszerek megfelelő irányba történő elmozdulása előidézheti a hálózatok ismertett leépülését és a depresszió következményes kialakulását.

Napjainkban a genetikai kutatások fontos szerepet játszanak a hangulatzavarok feltérképezésében. A humán genetikai kutatás egyik fő irányvonala a humán szekvencia variánsoknak az ún. polimorfizmusoknak az azonosítása és funkcionális jellemzése. A komplex öröklődésű betegségek, mint a depresszió etiológiájában több gén együttesen vesznek részt. A genetikai hajlamosító faktorok vizsgálatának egyik legelterjedtebb módszere a kandidáns gének asszociáció-analízise. A depresszió számos kandidáns génje közül kiemelten fontos a szerotonin transzporteré (SLC6A4), melynek két funkcionális polimorfizmusa ismert az 5HTTLPR és a STin2, valamint a purin receptor gének közül P2RX7, melynek több nem szinonim egy-pontos polimorfizmusa (SNP) ismert, amely kapcsolatba hozható a hangulatzavarral.

3. Célkitűzések

Vizsgálataink a következő főbb területeket érintették:

I. A hippocampális noradrenalin felszabadulás gátló purinerg szabályozásának receptor szintű feltérképezése fiziológiai körülmények között

Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ionotrop P2 receptorok aktivációja gátolja-e a noradrenalin (NA) felszabadulást az agyi katekolaminerg pályák hippocampális végződéseiből, és ha igen, milyen purinoceptor altípusok közvetítik ezt a hatást.

II. A hippocampális noradrenalin felszabadulás gátló purinerg szabályozásának receptor szintű feltérképezése patológiás, ischemia-szerű körülmények között

Ezekben a vizsgálatokban az volt a célkitűzésünk, hogy kimutassuk, a patológiás állapotban, ischémia szerű stimulus hatására a katekolaminerg pályák végződéseiből felszabaduló hippocampális noradrenalin áll-e kettős purinerg szabályozás alatt, és ha igen, mely receptor altípusok vesznek részt ebben a modulációban.

III. A P2X7 receptor szerepe az IL-1 β termelődés szabályozásában rágsáló hippocampusban in vivo gyulladási modellben

Perifériás immunsejtek vonatkozásában és in vitro gyulladási modellben már sikeresen azonosították az LPS kezelést követően detektálható, érett IL-1 β produkció szabályozásában a P2X7 receptorok szerepét. Mi a centrális IL-1 β termelődésre vonatkozóan kerestünk bizonyítékot, ezen receptorok részvételére in vivo gyulladási modell alkalmazásával. A hatásmechanizmus vizsgálatok egy további megoldatlan kérdése volt, hogy alapvetően perifériás vagy centrális eredetű-e a P2X7 receptor mediált hatás, amelyre ugyancsak választ kerestünk.

IV. P2X7 receptor génkiütés hatása a depresszióhoz köthető gének kifejeződésére teljes egér genom microarray alapú génexpressziós analízis segítségével

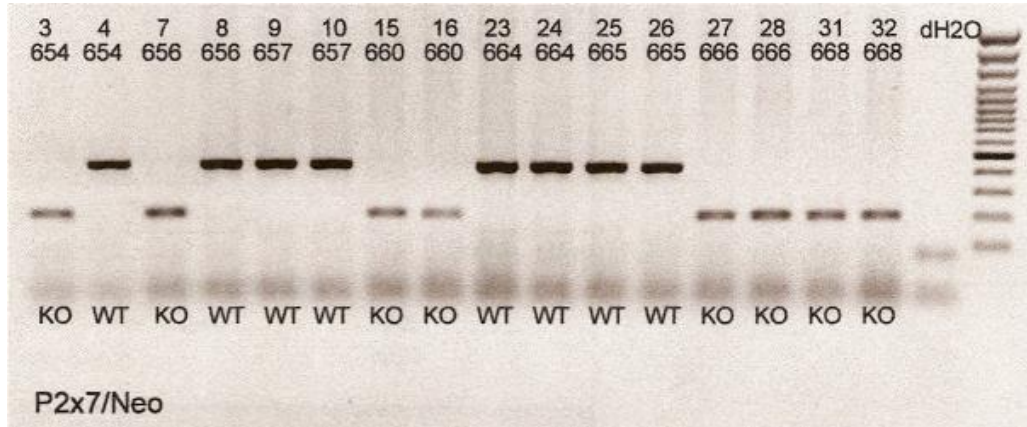
A legújabb kutatási irányvonalnak megfelelően a P2X7 receptor génkiütésnek a depresszióval kapcsolatba hozható gének, illetve a P2X7R által regulált eddig megismert funkciókban szereplő inter és intracelluláris komponensek expressziós

mintázatára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A génexpressziós microarray analízissel a P2X7 receptor aktivitása és a depresszió patomechanizmusával összefüggő új biológiai útvonalakat szeretnénk volna azonosítani és feltárni.

4. Módszerek

4.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez hím Wistar (Richter Gedeon Rt. Bp., Magyarország) patkányokat és 2-3 hónapos hím P2X7 receptor nullmutáns (-/-) transzgén egereket és vad típusú (wild type; WT) alomtársaikat használtuk fel. A homozigóta P2X7 receptor vad típusú (P2rx7+/+) törzs genetikai háttere a C57Bl/6J egértörzs. Az eredeti P2rx7-/- tenyészpárok Christopher Gabel (Pfizer Inc., Groton CT, USA) felajánlásával került az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegébe, mely állatpárban a P2X7 receptor géniütésért felelős DNS konstruktum a következő: P2X7-F1 (5'-CGGCGTGCGTTTTGACATCCT-3') és P2X7-R2 (5'-AGGGCCCTGCGGTTCTC-3') (Solle és mtsai 2001). Az egérvonal alapját alkotó génkonstruktumban a P2X7 receptort kódoló gén egy szakaszát egy neomycin rezisztenciát kódoló génszakasszal helyettesítették, amelynek hatására a létrejövő homozigótákban a P2X7 receptort kódoló gén nem íródik át és ez a P2X7 receptor fehérje hiányát okozza. Az egérvonalat az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében (OGR) tenyésztik, SPF körülmények között. Az utódok genotípusát PCR módszerrel egyenként verifikálták az OGR Genotipizáló laborjában (3. ábra): a P2X7 -/- egerekben a neomycin rezisztenciát kódoló gén, míg a vad típusban a P2X7 receptort kódoló gén szelektív expressziója detektálható. A tenyésztésük rendszeres farok genotipizálás mellett zajlik génspecifikus primerek segítségével (P2rx7 WT forward primer, GCAGCCCAGCCCTGATACAGACATT, reverse primer, TCGGGACAGCACGAGCTTATGGA; P2X7R-/- NEO forward Std, GCAGGATCTCCTGTCATCTCACC; reverse Std; GATGCTCTTCGTCCAGATCATCC) (Solle és mtsai 2001).



6. ábra. Genotipizálási vizsgálat eredménye PCR technikával: a P2x7^{-/-} egerekben (KO) a neomycin rezisztenciát kódoló gén, míg a vad típusú egerekben (WT) a P2X7 receptort kódoló gén szelektív expressziója detektálható.

4.1.2. In vivo gyulladási modell

Hím Wistar patkányokkal (200-300g) végzett előkísérleteink során beállítottunk egy új in vivo gyulladási modellt, melyet a transzgenikus P2X7 receptor null mutáns (-/-) egértörzssel és vad típusú társaikkal végzett kísérleteink során is alkalmaztunk. A protokoll szerint intraperitoneálisan (i.p.) oltottunk patkányokat 300 µg/kg (az injektált végtérfogat 0.2-0.3 ml), egereket 250 µg/kg (az injektált végtérfogat 0.1 ml) dózisban bakteriális lipopoliszachariddal (LPS 055:B5 szerotípus; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), melyet előzőleg steril pirogén mentes vízben oldottunk fel és a felhasználásig 4 °C-on tároltunk. A kontroll csoport egyedét azonos végtérfogatban steril fiziológiás sóoldattal (0.9%-os NaCl) vagy 10%-os DMSO tartalmú fiziológiás sóoldattal kezeltük szintén intraperitoneálisan. A bakteriális endotoxinnal kiváltott gyulladási állapotban hatásközvetítő szerepet betöltő receptorok farmakológiai azonosítására irányuló kísérleteinkben a tesztelt vegyületeket (agonistákat illetve antagonistákat) szintén i.p. adtuk az állatoknak. A kísérleti protokollok további részleteit l. az Eredmények (5.) leírásánál. A kezeléseket minden esetben a 12 órás fény ciklus alatt, 8.30. és 10.30. között hajtottuk végre. A LPS/ kontroll kezelést követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat, a vizsgált agyi régiók közül a hippocampuszt a kivételt követően száraz jégen, míg az amigdalát folyékony N₂-ben fagyasztottuk le és a további felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk. A perifériás gyulladási válasz vizsgálata során a kezelést követő 7. órában a hasüregből és a mellüregből gyűjtöttünk vért, melyet 12 órán át tároltunk 2-

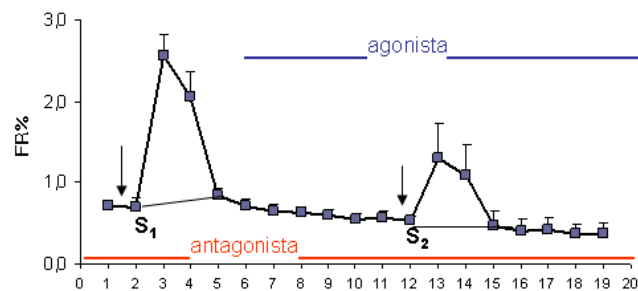
8°C-on, majd a szérum mintákat 20 percig 2000g-vel centrifugáltuk. Ezt követően a további felhasználásig három adagban történő szétválasztással tároltuk a mintákat -80°C-os hűtőben. Egyes kísérletekben a kezeléseket követően nembutállal (50 mg/kg i.p.) túlaltattuk és fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk az egereket.

4. 2. Neurofarmakológiai módszerek

4.2.1. In vitro [³H]noradrenalin felszabadulás mérése patkány hippocampusz szeletekből szövetperfúziós technika segítségével

A [³H]noradrenalin felszabadulás kísérleteket korábbi munkáinkban leírt módszerek szerint végeztük (pl. Sperlagh és Vizi, 1992). A kísérleti állatok dekapitálását az agyat a koponyaüregből kiemeltük és jéghideg, karbogenizált Krebs' oldatban végeztük el a megfelelő agyterület, a hippocampusz kimetszését. A hippocampuszokat (megtisztítva a környező szövetről), 400 µm vastag keresztirányú szeletekre (3-5 mg) vágtuk McIlwain típusú szövetszeletelővel, melyeket ezt követően 1 ml módosított Krebs' oldatban (összetétele mM-ban: NaCl 115, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, glükóz 10, aszkorbinsav 0.03, Na₂EDTA 0.1, pH 7.4) 1 ml 5µCi/ml trícíált noradrenalin ([³H]NA) jelenlétében 45 percig 37 °C-on, 95% O₂- és 5% CO₂ atmoszférában inkubáltunk. Az inkubációt követően a szövet szeleteket háromszor 6 ml Krebs' oldattal átmostuk, majd a négycsatornás perfúziós berendezés 100µl térfogatú kamráiba 4-4 hippocampusz szeletet helyeztünk el és folyamatosan karbogénnel telített módosított Krebs' oldattal 37 °C -on perfundáltuk őket. A felesleg radioaktivitás kimosása céljából 60 perces előperfúziót alkalmaztunk, mely során 0.7 ml/perc perfúziós sebességgel mostuk a szeleteket. Ezt követően a szeleteken átfolyó oldatból 3 perces mintákat gyűjtöttünk (a mintavételi periódus 57 perce alatt 19 darab egyenként három perces perfuzátum mintát gyűjtöttünk) és meghatároztuk a minták radioaktivitás tartalmát (l. 4.2.2). A mintagyűjtési periódus alatt 2 alkalommal a 3. és a 13. minta elején (S₁, S₂) elektromos téringerlést alkalmaztunk, Grass S88 stimulátor és a perfúziós kamrákba vezetett gyűrűs platinaelektrodok segítségével, illetve drogokat adagoltunk perfúzióban, vagy az ischemiás modellt alkalmaztuk (l. 4.2.3). Az ingerlési paraméterek

a következők voltak: unipoláris négyszögimpulzusok, 25V, 2Hz, 1 msec, 360 shock melyet a Grass S88 Stimulator segítségével adtunk le (Grass Medical Instruments, Quincy, Ma, USA). Hasonló körülmények között végzett korábbi kísérletek tapasztalatai alapján az elektromos ingerlés által kiváltott trícium kiáramlás döntő hányada a [³H]noradrenalin felszabadulását reprezentálja (pl. Nakatsuka és mtsai 1995). A kísérletek végeztével a szöveteket 0.5 ml 10% triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 30 perc elteltével a szöveti minták 100 µL aliquotjainak radioaktivitását határoztuk meg. A vizsgálandó vegyületeket (drogokat) vagy az első (S₁) vagy a második elektromos ingerlés (S₂) előtt 15 perccel adtuk a perfúziós folyadékhoz, míg módosított Krebs' oldattal történő kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől volt jelen a tesztelésre kiválasztott drog. Ha agonista hatását vizsgáltuk, 18 perccel a második téringérés (S₂) előtt adtuk a vegyületet (**8. ábra**). A hatását kétféle módon értékeltük: a vegyület hatása a nyugalmi és a stimulált transzmitter felszabadulásra nyugalmi transzmitter felszabadulás formájában illetve aránypárokban kifejezve (lásd az eredmények részt). Ezzel szemben az antagonistákat a mintavételi periódus elején adtuk a perfúziós folyadékhoz. Mértünk antagonisták kontrollakat is, amikhez a későbbi kísérletekben statisztikailag viszonyítani lehetett az agonista hatását az antagonisták jelenlétében (8. ábra). A kísérleti protokollok további részleteit l. az Eredmények (5.) leírásánál.



8. ábra. A kísérleti adatok értelmezése. Az ábra olyan kísérleti elrendezést mutat, amiben éppen az agonista hatását vizsgáltuk az antagonisták jelenlétében. Az S₁ által kiváltott transzmitter felszabadulást FRS₁-nek, az S₂ által kiváltottat, pedig FRS₂-nek nevezzük. Az FRS értékeket a görbe alatti jelölt területek kiszámolásával kaptuk meg. A nyíllal jelölt pontok a nyugalmi transzmitter felszabadulás értékelése során figyelembe vett pontok. Az ezekből képzett aránypár (FRS₂/FRS₁) szolgáltat adatokat a különféle vegyületek hatásairól. X tengelyen a perfuzátum minták, Y tengelyen a frakcionált release (FR%) százalék van feltüntetve.

A minták radioaktivitását Packard 1900 Tricarb szcintillációs spektrométer (Canberra, Australia) segítségével határoztuk meg. A perfúziós mintákból 0.5 ml aliquotokat, a szöveti mintákból 0.1 ml aliquotokat 2 ml szcintillációs koktéllhoz (Packard Ultima Gold) adagoltunk, majd 2 percig mértük a radioaktivitást. A kísérlet végén a megmaradó szövetek tömegét megmértük, elhomogenizáltuk őket triklórecetsavban, és a trícium tartalmat meghatároztuk. A kísérlet kiértékelése során az egyes perfuzátum minták radioaktivitás-tartalmát fejeztük ki a mintavétel időpontjában kalkulált szöveti tartalom százalékában (FR%). A szöveti trícium felvételt az össz release + szövetben maradt tartalom kiszámolásával határoztuk meg és Bq/g-ban fejeztünk ki. A nyugalmi transzmitter felszabadulást az ingerlést megelőző minta radioaktivitásával fejeztük ki, az elektromos ingerlés által indukált transzmitterfelszabadulást (FRS_1 , FRS_2) a görbe alatti terület módszerrel, az ingerlést megelőző minta aktivitásának az ingerlés alatt, illetve az azt követő mintákban mért radioaktivitásaiból való kivonásával számoltuk ki. A vizsgált anyagok illetve kezelések hatását az ingerlés által kiváltott [3H]transzmitter felszabadulásra az FRS_2/FRS_1 hányadosokkal fejeztük ki, mely az adott kísérletre jellemző érték.

4.2.2. In vitro ischemiás modell

Az ischemiás körülményeket korábbi kísérleteinkben használt módszer szerint (Milusheva és mtsai 1992), kombinált glükóz és oxigénmegvonással szimuláltuk: a patkány hippocampusz szeleteken 95% N_2 +5% CO_2 gázkeverékkel telített és folyamatosan buborékoltatott glükózmentes perfúziós oldatot áramoltattunk át 30 percig (6. perctől a 36. percig), majd ezt követően normoxiás-normoglikémiás oldattal folytattuk a perfúziót egészen a kísérlet végéig (reperfúziós fázis). Szárazjég hozzáadásával kötöttük meg azt az oxigén mennyiséget, amely az oldatcsere során esetlegesen beoldódhatott a perfúziós folyadékba. A kontroll kísérletben az oldatcsere s Krebs' oldattal szimuláltuk. A vizsgálandó anyagokat 18 perccel az ischemiás inzultus megelőzően tettük a perfúziós oldatba és a kísérlet végéig adagoltuk őket. A transzmitter felszabadulás mechanizmusát feltáró vizsgálataink során Ca^{2+} mentes perfúziós oldatot alkalmaztunk, míg az ischemiás hatás által kiváltott noradrenalin

felszabadulás és a tovaterjedő akciós potenciál kapcsolatát a Na⁺ csatorna blokkó tetrodotoxin jelenlétében vizsgáltuk. Az ischemia által kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulás mennyiségét görbe alatti terület módszerrel számoltuk ki, és ezeket hasonlítottuk össze a különböző kezelések hatására.

4.3. Molekuláris biológiai módszerek

4.3.1. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

Hím Wistar patkányokat (160-180g) dekapitáltunk, az agyat kiemeltük és jéghideg Krebs' oldatba (összetétele mM-ban: NaCl 115, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, glükóz 10, aszkorbinsav 0.03, Na₂EDTA 0.1, pH 7.4) helyezve, 95%-os O₂ és 5%-os CO₂ összetételű karbogénnel oxigenáltuk, majd az agytörzset eltávolítottuk és folyékony N₂-be helyeztük. A mintákat 1 ml fenol és guanidine isothiocyante tartalmú TriPure Izolation Reagent-ben (Roche) feloldottuk, mely szétválasztja a sejteket és denaturálja az endogén nukleázokat. Szobahőmérsékleten 5 perces inkubálást követően 200 µl kloroformot adtunk a mintákhoz és 15 percig 12000 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk, ami által három elkülöníthető fázist kaptunk az egyes csövekben. A szintelen, felső fázist új eppendorf csövekbe öntöttük, melyből 500 µl izopropanol hozzáadásával nyertük ki a totál RNS-t. 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után a mintákat 15 percig 12000 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítva az eppendorf cső alján lévő RNS-t 1 ml 75%-os etanolban tároltuk 12 órán keresztül. Ezt követően a csövek tartalmát 5-10 percig 37 °C-os vízfürdőben szárítottuk, mialatt összeállítottuk a Master Mixet (MM): 10 µl 5x FAGRB (formaldehyde gel running buffer), 17.5 µl formaldehid, 50 µl formamid, 2 µl etídium-bromid, amiből vortexelés után 8 µl-t adunk az egyes mintákhoz. 65 °C-on történő, 15 perces inkubációt követően, hogy a csövek alján lévő folyadékot összegyűjtsük. Ezt követően jégen lehűtöttük a mintákat, majd 5 msp-ig centrifugáltuk. Ezután 50 µl DEPC (diethyl pyrocarbonate)-al kezelt steril desztillát vízben szuszpendáltuk az RNS-t és 2 µl 6X felvivő festéket (Loading Dye) adtunk hozzá. A gélkészítésnél 1.2 g agarózt 80 ml DEPC-kezelt steril vízben forralásig melegítettünk, majd lehülés után 30 ml FAGRB és

3 ml formalint (37%) adtunk az oldathoz. Futtató pufferként 1.2%-os TBE (Tris-Borate-EDTA) használtunk. Mindegyik mintából 12 µl-t vittünk fel és futtatunk meg a gélen 32 V-os feszültség alkalmazásával ellenőrizve az RNS izolálás hatékonyságát. Ezt követően első szál cDNS templátot szintetizáltunk az 1 µg RNS mintákból a RevertAid First cDNA Sythesis Kit-tel (Fermentas, Vilnius, Lithuania) random hexamer primer felhasználásával 20 µl teljes térfogatban a gyártó leírása szerint: 1 µg total RNS-hez 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase-t, 5 µl 5X reaction buffer-t, 1 µl random hexamer primer - (10 pmol/µl), 1 µl of RiboLock™ RNase Inhibitor-t (20 u/µl) és 2 µl of 10mM dNTP mix-et adtunk, kiegészítve 0.1% DEPC kezelt vízzel 20 µl-re. A részletes protokollt korábban publikált közleményeinkben írtuk le (Sperlagh és mtsai 2002; Csölle és mtsai 2009). A reverz transzkripció reakció paraméterei a következők voltak: 70°C-on 5 percig, 25°C-on 5 perces inkubáció következik, amit 25°C-on 10 percig és 42°C-on 60 percig követ a cDNS szintézis. Az átírt cDNS templát mintákat további felhasználásig -20°C-os hűtőben tároltuk. A P2Y purin receptorok agytörzsi mRNS expresszióját kimutató PCR reakció során a tárolt első szálú cDNS templátot különböző P2Y receptorokra és az endogén kontrollként alkalmazott (housekeeping gén) β-actinra specifikus primerekkel (0.4 µM) 2U Taq DNS polimeráz jelenlétében amplifikáltuk az alábbi protokoll szerint: 95°C-on, 5 percig denaturálás, 80°C-on hot start követ majd 40 cikluson keresztül 94°C-on 1 perc, 59°C-on 1 perc és végső lépésként 72°C-on 5 percig tartó extenzió követ. A következő primereket használtuk: *P2Y₁₂ receptor* forward primer: CAGGTTCTCTTCCCATTGCT, reverz primer: CAGCAATGATGATGAAAACC; *P2Y₁₃ receptor* forward primer: GGCATCAACCGTGAAGAAAT, reverz primer: GGGCAAAGCAGACAAAGAAG; *β-actin* forward primer: ATGGATGACGATATCGCTG, reverz primer: ATGAGGTAGTCTGTCAGGT. Az így nyert amplifikációs produktumokat agaróz gélelektroforézissel (1,5%-os gél, 1X TBE puffer, 32V) futtatuk meg és elemeztük, két független párhuzamos kísérletben.

4.3.2. IL-1 β citokin termelés mérése enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technikával

Az *in vivo* gyulladási modell (4.1.2.) alkalmazása során gyűjtött patkány és egér hippokampusz valamint egér vérérum Interleukin-1 β (IL-1 β) tartalmát határoztuk meg szilárd fázisú sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technika segítségével. A gyűjtött és tárolt hippokampuszokat 0.1 g szövetnek megfelelő 500 μ l 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF és 4M urea tartalmú pufferben homogenizáltuk. A kiindulási szövet (hippokampusz) mennyisége patkány esetében 80 mg, egér esetében 30 mg-nak adódott átlagosan. A homogenizátum mintákat 20 percig 4 °C-on 15.000 g-vel centrifugáltuk majd a felülúszót 500 μ l 10 mM Tris-HCl, 1% BSA és 0.2% Tween 20 tartalmú pufferben gyűjtöttük és a későbbi felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk. A rendelkezésünkre álló kitek a pro-IL-1 β -t és a biológiailag aktív, érett IL-1 β -t nem tudják egymástól specifikusan elkülöníteni, így az általunk detektált citokin produkcióban mindkét forma részt vett. A hippokampális IL-1 β termelés meghatározása során az R&D system patkány és egér specifikus ELISA DouSet IL-1 β kitekét használtuk fel (kat. szám: patkány: DY501, egér: DY401), a gyártó utasításait és javaslatait követve. A hét pontos standard görbe kezdő legmagasabb koncentrációjú pontja a patkány kit esetében 4000 pg/ml, az egér kit esetében 1000 pg/ml volt; mindkét IL-1 β assay érzékenységi határa 5 pg/ml. A gyártó leírásának megfelelően az ú.n. Reagent Diluent pufferrel (1% BSA tartalmú PBS puffer) hígítottuk a standard törzsoldatokat és a mintáinkat is; az ELISA plate-re felező hígításban vittük fel ez egyes mintákat négyszeres ismétlés számmal. Mintáink optikai denzitását, abszorbanciáját 450nm-en mértük a Perkin-Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter spektrofotométerrel, majd Microplate Manager/PC Data Analysis Software (Biorad) segítségével a standard görbéből határoztuk meg a citokin koncentrációját. Az IL-1 β termelést pg/ml-ben illetve a sóoldattal vagy 10%-os DMSO tartalmú sóoldattal kezelt kontroll kísérletek átlagának százalékában fejeztük ki. Pilóta kísérleteinkben igazoltuk az általunk alkalmazott kit-tek specificitását, valamint a keresztreakciók meglétét is kizártuk: pozitív kontroll (250 pg/ml koncentrációjú rekombináns IL-1 β) és negatív kontroll (desztillát víz, illetve Reagent Diluent) jelenlétében vizsgáltuk a felülúszó minták detektálhatósági határait hígítási sorozat (hígítatlantól mintától

kezdődően a 10x higításig) formájában. A perifériás IL-1 β termelést a gyulladásoz modell alkalmazása (4.1.2.) során gyűjtött és tárolt vészerum mintákból határoztuk meg. A felhasznált gyári assay a Quantikine Mouse IL-1 β /IL-1F2 volt (R&D System, Minneapolis, MN, USA; kat. szám: MLB00B). A kísérletek kivitelezésénél a gyártó protokollját követtük. A hét pontos standard görbe kezdő pontja 500pg/ml koncentrációnak felel meg, az assay detektálhatósági alsó határa 3pg/ml volt. Mintáink abszorbanciáját 450nm-en mértük Perkin-Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter spektrofotométer segítségével.

4.3.3. SYBR Green alapú real-time PCR (Reverz transzkripció és mRNS expresszió mérés SYBR Green valósidejű PCR módszerrel)

Az *in vivo* gyulladásoz modell protokollját (4.1.2.) alkalmazva kezeltük intraperitoneálisan a CB57/B16J egereket sóoldattal illetve LPS-sel, majd az injekciózást követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat. A vizsgált agyi régiót, a hippocampuszt száraz jégen fagyasztottuk és további felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk. A mintákból RNS-t izoláltunk az RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA; kat. szám: 74804) felhasználásával, a gyártó utasításait követe. 2 μ l RNS-t reverz transzkriptáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit felhasználásával, amit az Anyagok és Módszerek 4.3.1. fejezetében részletesen leírtunk. Az általunk vizsgálni kívánt P2X receptorok mRNS expressziójának meghatározását az átírt első szálú cDNS templátból végeztük el kvantitatív real-time PCR segítségével (készülék : Rotor-Gene 3000; Corbett Research, Sydney, Australia). A gyártó által javasolt kitet (LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit (kat.szám: 12015099001, Roche, Indianapolis, IN, USA) és standard protokollt használtuk: 125ng cDNS templátot 250nM specifikus forward és reverz primer jelenlétében amplifikáltuk 12.5 μ l Master Mix, 1 μ l Eva Green festék, és PCR víz hozzáadásával 25 μ l reakció végtérfogatban. A PCR ciklus protokollja a primerek, a MgCl és templát koncentráció optimalizálását követően a következő volt: kezdő denaturálás 95°C-on 10 perc; 95°C 15 mp; 59°C 10 mp, 72°C 10 mp; mindez 45 cikluson át. cDNS templát nélküli negatív kontrollt minden target gén esetében futtattunk a primer-dimer amplifikációs termékek ellenőrzése céljából.

A következő primereket használtuk a purin receptorok expresszójának meghatározásához Brautigam és munkatársai 2005-ös publikációja alapján: *P2X2 receptor* forward primer: 5'-ATG GTG CAG CTG CTC ATT, reverz primer: 3'-AAA CGT GCA GTG CTT CAG; *P2X4 receptor* forward primer: 5'-ATC GTC ACC GTG AAC CAG ACA CA, reverz primer: 3'-CCA CGA TTG TGC CAA GAC GGA AT; *P2X6 receptor* forward primer: 5'-CTG TGG GAT GTG GCT GAC TT, reverz primer: 3'-TCA AAG TCC CCT CCA GTC AT; *P2X7 receptor* forward primer: 5'-CCA CAA CTA CAC CAC GAG AAA C, reverz primer: 3'-ACT TCT TGG CCC TTG ACA TCT T; *18S* forward primer: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT, reverz primer: 3'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG (Brautigam és mtsai 2005). A real-time PCR mérés analízisa során minden reakció után olvadási görbe elemzést végeztünk (melting curve analysis). A mérések során a 18S rRNS génjét használtuk endogén kontrollnak, az adott target gént és a referencia gént ugyanazon PCR reakcióban amplifikáltuk, 2 párhuzamos mérést végezve el. A 18S rRNS-hez normalizált szignálértékeket az összehasonlító Ct (Δ Ct) módszer felhasználásával határoztuk meg a Rotor Gene 5 software (Corbett Research, Sydney, Australia) segítségével. A CT érték azt a ciklus számot jelenti, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan emelkedni kezd. Az eltérően expresszálódó purin receptorok normalizált mRNS szintjét, a különböző kezelést kapott csoportok között Pfaffl modellje szerint számoltuk (Pfaffl 2001). Az adatokat a normalizált expressziós hányadosként \pm SEM mutatjuk be.

4.3.4. Microarray alapú génexpresszió mérés

A kísérleteinkben használt nagyteljesítményű microarray rendszer, az úgynevezett Expression Work-Flow első eleme az Agilent microarray custom-chip gyártása volt. Az általunk alkalmazott ún. 44k custom array szabadon választott felépítésben tartalmazta a 60-as oligo hosszúságú szakaszokból felépülő teljes egér genomot, amely szakaszokat „szintenként” fényérzékeny védőcsoportokkal ellátott, előre meghatározott nukleotidok építik fel. Az eljárás során, megfelelő pontokon átluggatott „maszkok” segítségével alakítják ki a kétdimenziós mintázatot.

4.3.4.1. RNS izolálás, koncentrációmérés és minőségellenőrzés

Az *in vivo* gyulladási modell protokollját (4.1.2.) alkalmazva kezeltük intraperitoneálisan a CB57/J6 és a P2X7 receptor null mutáns (-/-) egereket sóoldattal illetve LPS-sel, majd az injekciózást követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat. A négy kísérleti csoportot egyenként négy egér alkotta. A vizsgált agyi régiót, az amygdalát a kivételt követően folyékony N₂-ben fagyasztottuk és további felhasználásig -80°C-os hűtőben tároltuk. Az RNS-t az RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen, Valencia Ca; kat. szám : 74804) felhasználásával izoláltuk a gyártó által megadott protokoll alapján. A kinyert RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) mértük meg, minőségét (integritását) Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) készülék segítségével, RNA6000 Nano Kit-tel (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) határoztuk meg. A továbbiakban csak azokat a mintákat használtuk fel a különböző microarray mérésekhez, melyek RNS integritás száma (RIN: RNA Integrity Number) meghaladta a 8.2-as értéket, koncentrációja meghaladta a 40 ng/μl-os küszöbértéket, tiszta gélszerű képet mutattak, nem tartalmaztak DNS kontaminációt, valamint a NanoDrop készüléken mért 260/280 és a 260/230 arányuk nagyobb volt, mint 1.8.

4.3.4.2. Génexpressziós microarray mérés (teljes genom génexpressziós profil meghatározása)

A génexpresszió microarray vizsgálatokhoz Agilent Whole Mouse Genome Oligo custom Microarray 4X44K (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; egyedi azonosító: 16392) lemezeket használtunk, mely a jelenleg forgalomban lévő génexpressziós arrayek közül az egyik legnagyobb felbontást nyújtó array formátum: összesen 41 041 transzkriptum analízisére alkalmas egy hibridizáció során. Az RNS minták reverz transzkripcióját, egyszínű fluoreszcens jelölését és array hibridizációját a Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunobiológiai Intézet Agilent Microarray Core Facility laboratóriumában végezték el <http://www.dgci.sote.hu/microarray>). 1000-1000ng minőségellenőrzött teljes amygdala mintából származó RNS-ből reverz transzkripció

reakcióban *Low-input RNA Linear Amplification Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) felhasználásával cDNS-t szintetizáltak olyan oligo-dT primerek alkalmazásával, amelyek a T7 RNS polimeráz enzim promóter szekvenciáját tartalmazzák. Ezután egy *in-vitro* transzkripció reakcióban a T7 RNS polimerázzal a cDNS molekulákról CY3 fluoreszcens molekulákkal jelölt cRNS-t készítettek a gyártó utasításai szerint. A jelölt cRNS-t tisztították (RNeasy kit, Qiagen, Valencia, CA), és ezután NanoDrop ND-1000 spektrofotométer készüléken megmérték (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) a festék beépülésének a hatékonyságát, valamint a tisztított cRNS koncentrációját. Azokkal a mintákkal dolgoztak csak tovább, amelyeknél a festékbeépülési hatékonyság elérte a 9.0 pmol festék / μg cRNS értéket. 825 ng CY3 jelölt cRNS-t összekeverték a hibridizációs reakcióhoz szükséges *Agilent Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) megfelelő komponenseivel, majd kémiai módszerrel fragmentálták a jelölt cRNS molekulákat. A fragmentáció megkönnyíti a jelölt cRNS molekuláknak az array felületén található próbákhoz való kötődését. A fragmentációs reakció leállítását követően a mintákat 65 °C-on 17 órán keresztül a microarray lemezekhez hibridizáltattuk. A hibridizáció során a mintákból származó különböző fluoreszcens jelöléssel rendelkező cRNS molekulák versengenek a microarray felületén lévő, velük komplementer 60 nukleotid hosszúságú próbákhoz való kötődésért. A hibridizáció során kialakult CY3 jelintenzitás megmutatja, hogy egy adott transzkriptum az egyes mintákban egymáshoz képest milyen mértékben fejeződött ki. Ezután a lemezeket az ózon biztos módszer szerint mosták *Stabilizing and Drying Solution* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) oldat felhasználásával, majd Agilent Microarray Scanner segítségével leolvasták. A műveletek során alkalmazott összes lépés a gyártó utasításainak megfelelően történt (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, monocolour protocol version 6.0; publication number: G4140-90040). A leolvasás során nyert TIFF képeket a Feature Extraction software version 9.5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) programmal tömörítették ki, majd a kapott adatokat az egyszínű oligonukleotid microarray formátumokra javasolt paraméterek alkalmazásával normalizálták.

4.3.4.3. A microarray adatok statisztikai és bioinformatikai értékelése

A hibridizáció során nyert fluoreszcencia intenzitási adatokat és további bioinformatikai valamint a statisztikai értékeléseket az Agilent GeneSpring GX 9.0. (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) szoftver segítségével analizáltuk és végeztük el. A GeneSpring programban a normalizálás és az adatok transzformációja a gyártó által az egyszínű custom microarray formátumokra javasolt műveletek és paraméterek szerint történt. A génexpressziós eredmények elemzésének első lépése a nyers fluoreszcencia adatok az ún. „raw data”, az adott gent reprezentáló spot intenzitásának (a scanner által mert nyers szignalerkek, mely kifejezi az adott gen expresszióját) alsó és felső küszöbértékének meghatározása (fluoreszcencia intenzitás 40.0 és 425943.938 közé essen) és ezen adatok többszörös normalizálása volt. Az ún. „per chip” normalizálás lehető teszi a nem biológiai természetű, a hibridizáció természetéből adódó varianciák kiküszöbölését. A „per gene” normalizálási lépéssel, mely az alapvonal kijelölését jelenti, a különböző minták, összehasonlítása válik lehetővé melyet mi a só kezelt vad típusú csoport súlyozott átlagára húztunk. A normalizációs lépések után a hibridizáció minőségellenőrzése következett, az ún. „quality control”. A chippen lévő 41.041 transzkriptum közül csak azokat vettük figyelembe, melyekhez az amygdala minták megfelelően hibridizáltak. A program az egyes array elemekben „spot”-okban található megfelelő („match”) és nem megfelelő („mismatch”) próbapárok intenzitási értékéből a háttérérték korrekciójával számol egy valószínűségi értéket, mely alapján értékeli a hibridizáció sikerességét egy adott spot-hoz. Az analízis során csak azokat a transzkriptumokat vettük figyelembe, amelyek a 16 mintából 9-ben jelen („present, p”) illetve megfelelő marginal indexel szerepeltek. Az ily módon szűrt transzkript listán végeztük el a további statisztikai analíziseket. Első lépésben a kísérleti értelmezést adtuk meg, így a fold-change (FC) vizsgalatnál 4 fele parositási kombináció lehet, majd változás mértékének küszöbértékét. Az expresszáldó transzkriptumok közül a legalább kétszeres up vagy down-regulációt mutató génekkel folytattuk az analízist. A fold-change vizsgalatnál 4 fele parositási kombináció lehet A különböző csoportok között eltérően expresszáldó gének statisztikai értékelését kétutas ANOVA-val végeztük. Mivel a microarray adatok kiértékelésénél a statisztikai próbák során nagyszámú gen esetében tesszük fel a nullhipotézist, feltétlenül szükséges korrekciót használni az

álpozítív találatok (úgynevezett első fajú hiba) számának a csökkentésére. Ezért az összehasonlítások során a Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekciót használtuk minden esetben. A kiértékelés során legalább kétszeres változást mutató géneket (up- v. down-regulált) vetettük statisztikai analízis alá, mely során a következő szignifikancia analízis kritériumokat vettük figyelembe: p value cut-off: 0.05; T-test unpaired; multiple test correction: Benjamini-Hochberg; illetve p value cut-off : 0.01; T-test unpaired.

4.3.4.4. Gene Ontology elemzés

A microarray adatértékelés során kapott eredmények alapján a különbözőképpen expresszálódó géneket génontológiai analízisnek vetettük alá. A Gene OntologyTM (GO) konzorcium adatbázisa a géntermékek jellemzésének (úgynevezett GO terminusok, osztályok) ellenőrzött rendszere, melyben tájékoztatást kaphatunk a génekről kifejeződő fehérjék molekuláris funkciójáról, valamint a különböző biológiai folyamatokban való részvételéről. Ezen kívül megtudhatjuk azt is, hogy az adott protein (ha szerkezeti elemről van szó például), milyen celluláris alkotórész kialakításában vesz részt. A GeneCodis program azt vizsgálja, hogy egyes GO terminusok a microarray adatfeldolgozás során kapott génlistán belül milyen gyakorisággal fordulnak elő ahhoz a gyakorisághoz képes, amivel a teljes NCBI GenBank adatbázis által szolgáltatott adathalmazon belül előfordulnak. A GeneCodis program a hipergeometrikus eloszlás alapján p értéket számol az említett szignifikancia kifejezésére. A p érték az adott GO terminus relatív fontosságát (az úgynevezett „enrichment score” értékét) jelzi a kiválasztott génlistán belül az összes gént tartalmazó adatsorhoz képes. Természetesen a többszörös összehasonlítások miatt itt is kellett p érték korrekciót alkalmazni. Az elemzéseink során csak azokkal a GO terminusokkal foglalkoztunk, amelyeknek a Benjamini-Yekutieli módszerrel korrigált p értéke kisebb volt, mint 0.01. A területi korlátok miatt sajnálatos módon adatközlésünk legjobb szándékunk ellenére sem lehet tökéletes. Olyan hatalmas adatállományt eredményező vizsgálatoknál, mint amilyen a génexpressziós microarray analízis és az azt követő, általunk is végrehajtott génontológiai analízis, ugyanis maga csak az adatok bemutatása mintegy 20 gépelt

oldalt venne igénybe. Mivel egy doktori disszertációval szemben támasztott követelmények túlmutatnak a szimpla adatbemutatáson, továbbá ezen eredményeinket már sikeresen publikáltuk is, az idevágó eredményeket a továbbiakban, a témában megjelent cikkekre hivatkozva prezentáljuk. A szóban forgó cikk : Csölle C., Andó RD., Kittel Á., Göloncsér F., Baranyi M., Soproni K., Zelena D., Haller J., Németh T., Mócsai A., Sperlág B. (2013): The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.*: 16(1):213-33. Internetes elérhetősége: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22243662>. A cikkhez csatolva, függelék formájában található meg a Go analízis során vizsgált génlista és a géntonológiai analízis eredményeit összefoglaló Supplementary Table S2a-c.

4.3.4.6. TaqMan alapú real-time PCR módszer

A microarray analízis során kapott génexpressziós profilok eredményét 79 kiválasztott génnél TaqMan alapú real-time PCR módszerrel, TLDA kártyák (TaqMan Low Density Array) alkalmazásával erősítettük meg. A validálás célja, hogy a kiválasztott gének expressziójának összehasonlító vizsgálata, a microarray adatokkal azonos irányú és detektálható mértékű változást mutasson. A felhasznált TLDA mikrofluid kártya (Applied Biosystems, Santa Clara, CA; kat. szám.: 4342261) 384 mintahelye a vizsgálni kívánt gének mellett a 18S rRNS (TaqManID: Hs99999901_s1), a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh; TaqManID: Mm99999915_g1), a hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (Hprt; TaqManID: Mm00446968_m1), és a beta2-microglobulin (B2m; TaqManID: Mm00437762_m1) háztartási kontroll géneket is tartalmazta. Az alkalmazott géneket és Taqman primereik azonosítóját a Függelék x. táblázatban foglaltuk össze. A real-time PCR primerek kiválasztása a gyártó honlapján elérhető TaqMan inventoried primer adatbázisból történt a felhasznált Agilent Probe ID számok alapján. A validálás során a microarray kísérleteknél is alkalmazott RNS mintákkal dolgoztunk: 1µg total RNS reverztanszkripcióját végeztük el High Capacity cDNA Archive Kittel a gyártó protokolljának (Applied Biosystems) megfelelően. A

génexpresszió mennyiségi meghatározása az ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) készülék segítségével történt, a q-PCR reakciót a gyártó útmutatásai szerint végeztük el: 4µg cDNS/kártya felhasználásával 800 µl/kártya végtérfogóban. Valamennyi vizsgálni kívánt target génnek megfelelő génspecifikus real-time PCR assay tartalmazta a FAMdye-festékkel jelölt TaqManMGB probe-t (250 nM végkoncentrációban) és a forward/reverse PCR primereket (900nM végkoncentrációban). A real-time PCR ciklus paramétereit a következők voltak: 2 perc 50 °C-on, 10 perc 95°C-on, majd 40 cikluson át 30 msp 97°C-on és 1 perc 59.7 °C-on. Az eredmények értékelésére a Livak és munkatársai által publikált ún. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk, mely a belső kontroll gének expressziós mediánjához mérten akár több ezer értéket képes egyszerre kezelni az erre a célra kifejlesztett Real Time Stat- Miner (Integromics, Granada, Spain) szoftver segítségével. A $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer alkalmazása során először az RQ managerrel a C_t (áttörési pont) értékeket számoltuk ki minden egyes gén esetében, és ekkor zártuk ki a további analízisből a 18S rRNS belső kontrollt is, mivel instabil volta miatt nem volt detektálható C_t értéke. A ΔC_t értékeket a megmaradó 3 belső kontrollokra normalizálva számoltuk, a következő formula szerint: $\Delta C_t(\text{gene}) = C_t(\text{gene}) - C_t(\text{Computed_Endogenous})$. A $-\Delta\Delta C_t$ értékeket a só kezelt vad genotípusú kísérleti csoport (későbbiekben WTsal) átlagára normalizáltuk: $-\Delta\Delta C_t(\text{sample}) = -\Delta C_t(\text{sample}) - \text{average}\Delta C_t(\text{WTsal})$. A normalizálással számolt $-\Delta\Delta C_t$ jelentése $\log_2(RQ)$ ahol RQ a relative quantity (relatív változás), tehát minden egységnyi különbség kétszeres expressziós szintkülönbségnek feleltethető meg. Az Eredmények fejezetben az összefoglaló táblázat már ezt a számolt RQ értéket tünteti fel.

4.4. Statisztikai módszerek

Az elvégzendő kísérletekben statisztikai analízis kiindulási alapját az analóg pontoknak megfelelő elvégzett párhuzamos mérési eredmények, az azokból számolt átlag és szórás (SEM) képezte.

A neurofarmakológiai kísérletek eredményeinek értékelése során a különböző drogok hatásának összehasonlításakor a csoportok számától függően Student t tesztet illetve egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk (ANOVA) és azt követő kísérleti

elrendezésnek megfelelő *post hoc* tesztek (Dunnett próba) használtunk. A dóziszfüggés vizsgálatakor szintén a Dunnett tesztet alkalmaztuk *post hoc* tesztként. A statisztikai analízisekhez a Graphpad Prism 3.0 programot használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értéket vettük. A droghatást jellemző kvantitatív farmakológiai paramétereket (EC_{50} , IC_{50}) értékeket a Prism görbeillesztő program segítségével (Graph Pad, San Diego, CA) számoltuk ki. Csoportonként 6-12 független kísérletet végeztünk el. Az adatokat átlag \pm S.E.M. formájában ábrázoltuk.

Az ELISA technikával történt fehérjexpressziós méréseknél csoportonként 4 állatot használtunk. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk az antagonisták kezelése és a só illetve az LPS kezelés közötti szignifikáns különbség meghatározásához. A só és LPS kezelése közötti szignifikáns különbségeket student-t teszttel határoztuk meg. A * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ szignifikanciaszintet jelöl.

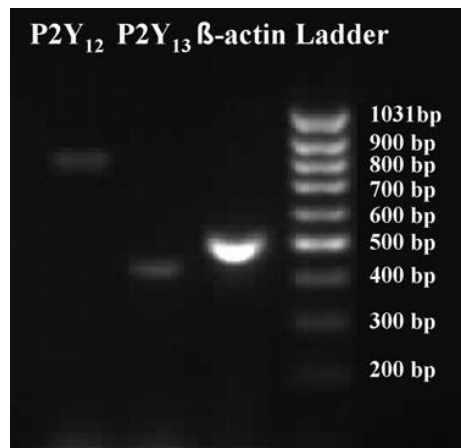
A real-time PCR alapú expressziós kísérletek eredményei esetében egyszempontos ANOVA (SYBR Green qPCR), illetve kétszempontos ANOVA (TaqMan qPCR) analízist alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket vettük. Csoportonként 4-6 állatot használtunk.

5. Eredmények

5.1. A hippocampális noradrenalin felszabadulás gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése

5.1.1. Szemikvantitatív RT-PCR analízis eredménye

Reverz Transzkripció-PCR technikával vizsgáltuk a potenciális P2Y receptor altípusokat kódoló mRNS jelenlétét a hippocampusz noradrenerg innervációját adó (a locus coeruleust is magába foglaló) patkány agytörzsön. Kutatócsoportunk korábban már kimutatta a P2X1-, P2X2-, P2X3-, P2X4-, P2X6-, P2X7 -, valamint a P2Y1 receptorok fehérjéit kódoló génről átíródó mRNS jelenlétét a katekolaminerg neuronpopuláció sejtestjeit tartalmazó agytörzsből. A vizsgálat érintette, de a kódoló mRNS jelenlétét nem mutatta ki a P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆ receptor alegységek esetében (Papp és mtsa 2004a). Mi éppen ezért vizsgáltuk a még eddig nem vizsgált P2Y receptorok (P2Y₁₂-, P2Y₁₃ receptorokat) mRNS expresszióját. Az analízisből kihagytuk a P2Y₁₁ receptor alegység vizsgálatát, mivel tudomásunk szerint ennek a receptornak nincs rágcsálókban orthológ megfelelője. RT-PCR analízisünk kimutatta mindkét, a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor altípust kódoló génről átíródó mRNS expressziós jelenlétét a katekolaminerg sejteket magába foglaló agytörzsben, mely igazolta, hogy a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor a hippocampális noradrenalin felszabadulás gátló szabályozásában részt vehet (**9. ábra**).



9. ábra: Patkány agytörzsön végzett szemikvantitatív RT-PCR analízis eredménye. Az izolált totál RNS mintát reverz transzkriptáltuk, majd génspecifikus primerek segítségével amplifikáltuk a P2Y-alegységeket kódoló DNS szekvenciákat. 100bp léptékű DNS standard-ot (létra, ladder) és A β-aktin endogén kontrollt használtunk (Fermentas, Vilnius).

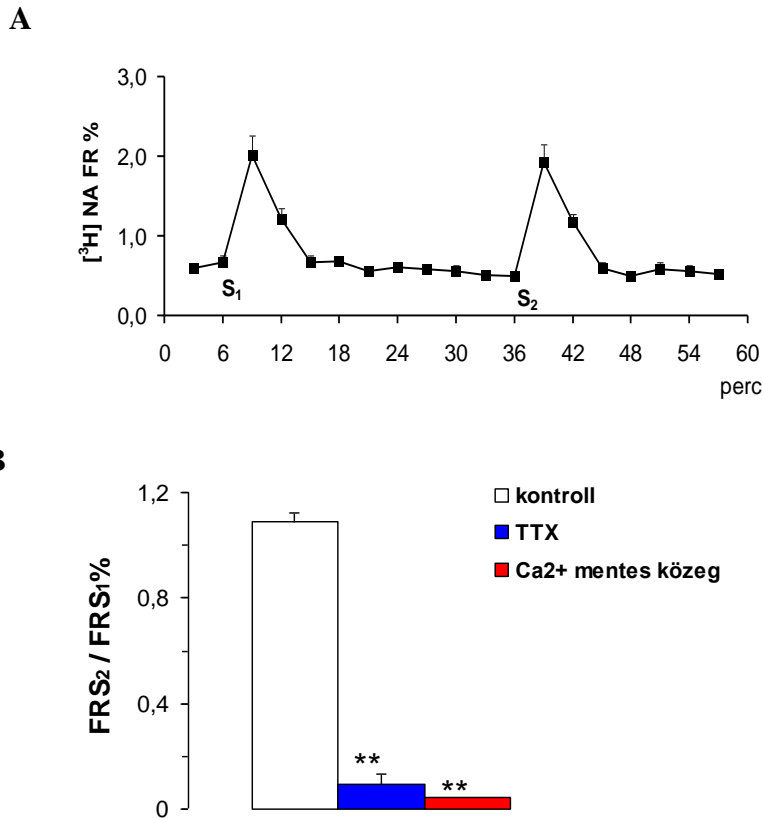
5.1.2. [³H]noradrenalin felszabadulás patkány hippocampusz szeletben

Kísérleteinkben a 45 perc triciált noradrenalinnal való inkubálás és a 60 perc előperfúziót követően a szeletek teljes radioaktív-anyag felvétele átlagosan $1.96 \pm 0.11 \times 10^5$ Bq/g (n=12, meghatározásának módját l. a Felhasznált Anyagok és Módszerek 4.2.2. fejezetében) volt. A mintavételi periódus alatt gyűjtött 3 perces perfuzátum minták radioaktivitás-tartalmát a mintavétel időpontjában kalkulált szöveti tartalom százalékában fejeztük ki, ez az ún. fractional release százalék (FR%). Az adatfeldolgozás további részleteit l. a Felhasznált Anyagok és Módszerek fejezetben (4.2.2.). A 60 perc előperfúziót követően a nyugalmi [³H]NA kiáramlás $0.56 \pm 0.04\%$ -nak (n=12) adódott, mely relatíve konstans maradt a mintagyűjtési periódus során és nem tért el szignifikánsan a különbözőképpen kezelt kísérleti csoportok között sem. A mintavétel 6. percétől alkalmazott elektromos téringlerlés hatására (S₁:25 V, 2 Hz, 240 shock) a [³H]NA felszabadulás többszörösére (FRS₁: $2.03 \pm 0.04\%$ n=12) és reprodukálható módon megemelkedett, a 36. percétől alkalmazott második elektromos téringlerlés (S₂) hasonló mennyiségű triciált noradrenalin felszabadulását eredményezte, az FRS₂/FRS₁ hányados 1.09 ± 0.03 (n=12) volt (**10A ábra**). Kísérleti modellünk tehát reprodukálható választ adott az elektromos téringlerlésre, a további kísérletekben az

egyres kezelések/ drogok hatásvizsgálatánál ezt tekintettük kontroll értéknek.

A következőkben a hippokampális noradrenalin felszabadulását modellező rendszerünkben a feszültségfüggő Na^+ csatornák reverzibilis gátlószere, a tetrodotoxin (TTX) hatását teszteltük, melyet a perfúziós folyadékba S_2 előtt 15 perccel tettünk. Két koncentrációban ($1\mu\text{M}$ és $3\mu\text{M}$) is néztük hatását az elektromos téringelés által kiváltott $[\text{}^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. Mindkét alkalmazott koncentrációban a TTX jelenléte szignifikánsan csökkentette az $\text{FRS}_2/\text{FRS}_1$ hányadost, mely hatás dóziszfüggőnek is bizonyult, a TTX nagyobb koncentrációban szinte teljesen gátolta a transzmitter felszabadulását (TTX $1\mu\text{M}$: $\text{FRS}_2/\text{FRS}_1=0.62\pm 0.03$, $n=8$; $p<0.05$ vs. kontroll; TTX $3\mu\text{M}$: $\text{FRS}_2/\text{FRS}_1=0.095\pm 0.04$, $n=7$; $p<0.01$ vs. kontroll) (10B ábra). A bazális transzmitter ürülést a tetrodotoxin szignifikánsan nem befolyásolta ($0.47\pm 0.05\%$, $n=8$ vs. $0.56\pm 0.04\%$; $p>0.05$). Ezek alapján elmondható, hogy az elektromos téringelés túlnyomórészt a feszültségfüggő Na^+ csatornák aktivációja, azaz az axonális depolarizáció révén váltotta ki a $[\text{}^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulást.

A transzmitter felszabadulás mechanizmusát feltáró kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől Ca^{2+} -mentes ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) módosított Krebs' oldatot használtunk, melyet a CaCl_2 megvonásával és EGTA (1mM) hozzáadásával állítottunk elő. Az elektromos téringelés által kiváltott $[\text{}^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás csaknem teljes mértékben $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -függőnek bizonyult (**10B ábra**), miközben a bazális $[\text{}^3\text{H}]\text{NA}$ kiáramlásra nem volt szignifikáns hatással a Ca^{2+} -mentes közeg ($0.47\pm 0.01\%$, $n=8$ vs. $0.56\pm 0.04\%$; $p>0.05$). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az elektromos téringelés által kiváltott noradrenalin felszabadulás a klasszikus transzmitter ürülés módját követi; vezikuláris eredetű és melyet a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül beáramló Ca^{2+} vált ki.

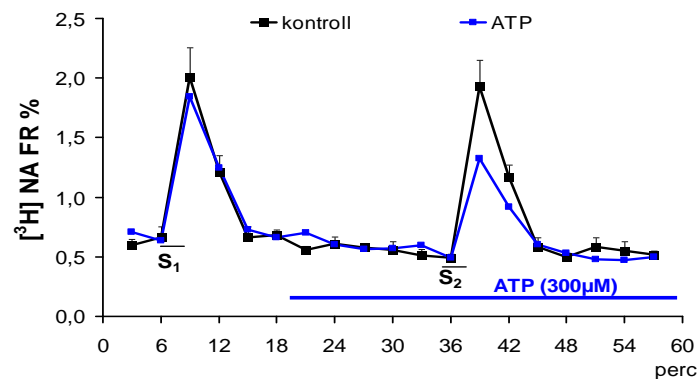


10. ábra. A Nyugalmi és az elektromos téringérléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulás patkány hippoakmpusz szeletekben. A. A mintagyűjtési periódust 45 perces triciált noradrenalinval való inkubáció majd a 60 perces előperfúzió előzte meg. S₁, S₂ a 3. és a 13. perfuzátum mintavételi ideje alatt leadott első és második elektromos stimulációt jelzik **B.** TTX és a Ca²⁺-mentes közeg hatása az elektromos téringérléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, ** p<0.01.

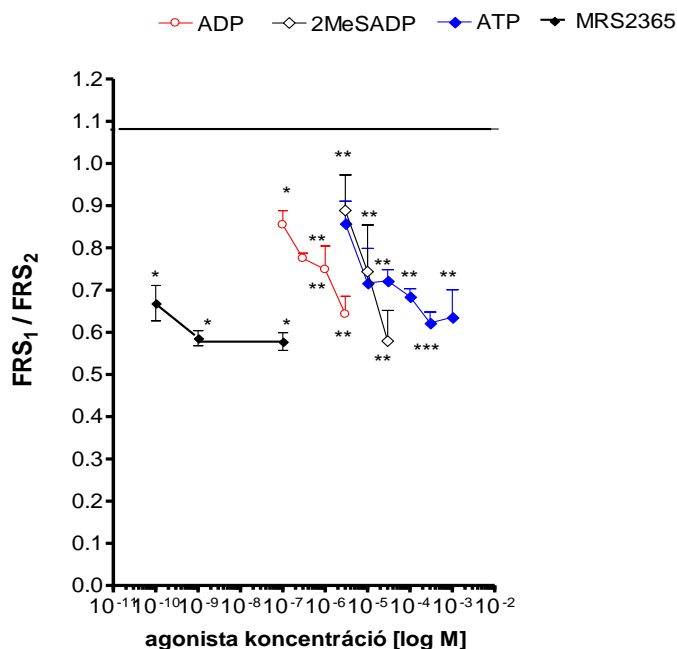
5.1.3. P2 purin receptor agonisták vizsgálata az elektromos téringérlés által kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra

Az ismert P2 purin receptor agonisták közül növekedő koncentrációban vizsgáltuk a következők hatását: a nem szelektív P2 receptor agonista ATP és ADP, a szelektív P2Y receptor agonista 2MeSADP és a szelektív P2Y1 receptor agonista MRS2365. Ezeket 18 perccel az S2 előtt adtuk a perfúziós folyadékhoz. A kísérletekben az egyes agonistákat, az idevágó szakirodalom alapján a P2 purin receptorokra, P2Y receptor

alcsaládra illetve a P2Y₁ receptor altípusra szelektív koncentráció tartományban megfelelő koncentrációban alkalmaztuk. Mindegyik P2 receptor agonista koncentrációfüggő módon csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [³H]NA felszabadulást. A nem szelektív P2 receptor agonista ATP 3 μM – 1 mM tartományban csökkentette szignifikánsan az FRS₂/FRS₁ hányadost, (**11-12. ábrák**), a maximális gátlás ~43%-nak adódott, melyet 300 μM-os koncentrációjú ATP jelenlétében tapasztaltunk (n = 8, p<0.01). Az ATP hatásának IC₅₀ értéke 30 μM - nak bizonyult (**12. ábra**). Az ATP a nyugalmi transzmitter kiáramlást szignifikánsan nem befolyásolta (kivéve 3 μM-os koncentrációban; **1. táblázat**).



11. ábra. A P2Y purin receptor agonisták hatása az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippocampusz szeletekben. Az ATP (300 μM) a 7. mintától került a perfúziós folyadékba, ahogy a kék vonal is jelzi (kék görbe). S₁, S₂ a 3. és a 13. perfuzátum mintavételi ideje alatt leadott első és második elektromos stimulációt jelzik (25 V, 2 Hz, and 240 shocks).



12. ábra A P2Y receptor agonisták koncentráció-függő (0.1nM és 1mM tartományban) módon csökkentették az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulást patkány hippokampusz szeletekben. A vízszintes vonal a kontroll kísérletek FRS₂/FRS₁ hányadosának átlagát reprezentálja. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

A többi három agonista közül az ADP-t a 0.1- 3μM-os tartományban, a 2MeSADP-t a 3-30μM-os tartományban, az MRS2365-öt a 0.1-100nM-os tartományban vizsgáltuk (**12. ábra**). Az MRS2365 100nM-os koncentrációban váltott ki ~38%-os gátlást, míg az ADP ugyan ebben a dózisban alkalmazva ~22%-os csökkenést idézett elő az elektromos téringerlés által kiváltott [³H]NA felszabadulásban. A dózis hatás görbe további elemzése alapján az agonisták hatás-erősség sorrendje a következő volt: MRS2365>> ADP>2MeSADP ≥ ATP. Akárcsak az ADP, a 2MeSADP és MRS2365 sem volt szignifikáns hatással a nyugalmi [³H]NA felszabadulásra (**1. táblázat**).

1. táblázat A P2Y receptor agonisták és antagonisták hatása a nyugalmi [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippokampusz szeletekben. A 45 perces triciált noradrenalinvaló inkubációt majd a 60 perces előperfúziót követően 19 darab 3 perces perfuzátum mintát gyűjtöttünk. PPNDs-t 18 perccel az ischemia szerű stimulus kezdete előtt adtuk a Krebs' oldathoz. A nyugalmi transzmitter kiáramlást a második elektromos ingerlés vagy az ischemia szerű inzultus előtt 3 perccel mértük. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, *p<0.05, ns p>0.05.

Vegyület	Nyugalmi [³ H]NA			n	szignifikancia
	μM	felszabadulás	FR% ± S.E.M.		
kontroll			0.566 ± 0.038	12	
ATP	3		0.370 ± 0.061	8	*
	10		0.469 ± 0.044	8	ns
	30		0.492 ± 0.031	8	ns
	100		0.502 ± 0.054	8	ns
	300		0.524 ± 0.067	8	ns
	1mM		0.491 ± 0.068	8	ns
ADP	0.1		0.482 ± 0.037	8	ns
	0.3		0.433 ± 0.042	8	ns
	1		0.482 ± 0.052	8	ns
	3		0.429 ± 0.027	8	ns
2-MeSADP	3		0.471 ± 0.046	8	ns
	10		0.493 ± 0.061	8	ns
	30		0.509 ± 0.065	8	ns
PPADS	30		0.493 ± 0.036	9	ns
MRS2179	10		0.508 ± 0.058	8	ns
2-MeSAMP	30		0.481 ± 0.071	4	ns
PPNDS	1		0.468 ± 0.031	8	ns
DPCPX	250 nM		0.511 ± 0.058	6	ns
CNQX+AP-5	10		0.438 ± 0.037	3	ns
Bicuculline	100		0.445 ± 0.011	3	ns

Ezen eredmények önmagukban még nem elegendőek ahhoz, hogy a hatásközvetítésben résztvevő receptort azonosítani tudjuk, ezért további anyagok hatását vizsgáltuk meg, amelyek segítségével megerősíthető, vagy kizárható a lehetséges purin receptorok részvétele az agonsiták hatásában. E célból, pontosabban az adenosin receptorok lehetséges részvételének feltárása céljából teszteltük az agonisták hatását az ekto-ATPáz szelektív gátlószer, az ARL67156 jelenlétében, az ATP ugyanis felszabadulását követően egy extracellulárisan jelenlevő enzimrendszer, az ektonukleotidázok segítségével adenosinná alakul (Zimmermann és mtsai 1998). Az enzimrendszer első tagja az ektoATPáz enzim (vagy más néven ektoATP difoszfohidroláz), amely az ATP-ből, illetve az ADP-ből AMP-t hidrolizál a terminális foszfátcsoportok lehasításával. A következő lépésben az AMP-ből adenosin keletkezik az ekto-5' nukleotidáz enzim segítségével. Az ekto-5' nukleotidáz reakció a reakciósor sebesség-meghatározó lépése, így döntő fontosságú szerepe van az ATP/ADP és adenosin szint közti

balanszírozásában. Mivel az ATP és ADP nem hat adenozin receptorokon és az adenozin sem hat ATP receptorokon, az ekto-5' nukleotidáz reakció által egy új extracelluláris szignál keletkezik, mely az ATP-től illetve ADP-től eltérő, nemegyszer éppen ellentétes hatásokat közvetít. Az ARL67156 az általunk is alkalmazott koncentrációban (50 μ M) szelektíven képes gátolni az ATP/ADP extracelluláris lebontását, melyet korábban már sikeresen igazoltak (Sperlágh 2007). Kísérleteinkben a mintavételi periódus kezdetén adtuk az ARL67156-ot a perfúziós folyadékhoz, míg az agonisták alkalmazására a korábbi protokollnak megfelelően 18 perccel a második elektromos téringerlés előtt került sor. A szelektív ecto-ATPáz inhibitor jelenléte sem az ADP (3 μ M), sem az ATP (3-300 μ M-os koncentráció tartományban) gátló hatására nem volt szignifikáns hatással az elektromos téringerléssel kiváltott [3 H]NA felszabadulásban. A kísérletes eredményeket a **2. táblázat** foglalja össze; ahol az FRS₂/FRS₁ hányadost hasonítottuk össze ARL67156 hiányában, illetve jelenlétében az adott agonista mellett.

2. táblázat A szelektív ecto-ATPáz inhibitor ARL67156 (50 μ M) hatása az ADP (3 μ M) és ATP (3-300 μ M) gátló hatására az elektromos téringerléssel kiváltott [3 H]NA felszabadulásban patkány hippocampusz szeletekben. Az ARL67156-ot a mintagyűjtési periódus kezdetén, míg az ATP-t és ADP-t 18 perccel a második elektromos ingerlés előtt adtuk a perfúziós folyadékhoz. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztuk, ns p>0.05.

Vegyület	μ M	Kiváltott [3 H]NA felszabadulás		Kiváltott [3 H]NA felszabadulás		szignifikancia
		FRS ₂ /FRS ₁ % \pm SEM	n	FRS ₂ /FRS ₁ % \pm SEM	n	
				+ARL67156		
ATP	3	0.857 \pm 0.052	6	0.814 \pm 0.085	4	ns
	30	0.721 \pm 0.026	8	0.708 \pm 0.024	4	ns
	300	0.652 \pm 0.025	8	0.614 \pm 0.084	4	ns
ADP	3	0.643 \pm 0.042	8	0.754 \pm 0.047	4	ns

5.1.4. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata az elektromos téringelés által kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra

Ebben a kísérletsorozatban kétféle protokoll szerint alkalmaztuk az antagonistákat. Amikor saját hatásukra voltunk kíváncsiak, a második elektromos téringelés (S_2 ; 25 V, 2 Hz, 240s, 1ms) előtt 18 perccel kerültek alkalmazásra csakúgy, mint az agonisták. A következő P2 purin receptor antagonisták hatását vizsgáltuk: a nem szelektív P2 receptor antagonistá PPADS (30 μ M), a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor antagonistá 2MeSAMP (10 μ M) és a P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 (10 μ M). A második elektromos téringelés előtt adva a PPADS és a 2MeSAMP nem volt szignifikáns hatással az ingerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra (**3. táblázat**), ezzel szemben az MRS2179 önmagában is szignifikánsan csökkentette az ingerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulást mintegy ~28%-os gátlást eredményezve: MRS2179 kontroll $FRS_2/FRS_1=0.79\pm 0.09\%$, n=8 vs. elektromos téringelés kontroll $FRS_2/FRS_1=1.09\pm 0.03$ n=12; p<0.05, (**3. táblázat**). A nyugalmi transzmitter felszabadulás a kontroll kísérletben 0.56 \pm 0.04%-nak n=12) adódott, melyet az alkalmazott P2 receptor antagonisták jelenléte szignifikánsan nem befolyásolt (**1. táblázat**). Amikor az agonista hatását próbáltuk felfüggeszteni, a teljes kísérleti periódus alatt jelen voltak az antagonisták. Ez esetben az agonista nélkül mért FRS_2/FRS_1 hányados képezte az antagonistá kontrollokat (**3. táblázat; 13. ábra**) amelyekhez viszonyítottuk a P2 receptor agonista hatását az antagonistá jelenlétében. Az általunk alkalmazott agonista ezekben a kísérletekben az ATP volt, 300 μ M-os koncentrációban adtuk 18 perccel S_2 előtt, mivel ennél a dózisonál tapasztaltuk korábban a maximális gátló hatást, mely ~43%-nak adódott: (5.1.3. fejezet, **12. ábra**). Mindhárom antagonistá (PPADS, MRS2379, 2MeSAMP) teljes kísérleti periódus alatti jelenléte képes volt felfüggeszteni az ATP szignifikáns gátló hatását (**13. ábra**). A PPADS kontrollnál az FRS_2/FRS_1 arány 0.71 \pm 0.09 volt, amelyre az ATP jelenléte nem volt hatással, a 10 μ M-os MRS2179 esetében a gátló hatású ATP-vel együtt alkalmazva az antagonistát az $FRS_2/FRS_1=0.68\pm 0.06$ értékre csökkent, de nem érte el a szignifikancia küszöbértékét. A 2MeSAMP (10 μ M) kontroll kísérletben az FRS_2/FRS_1 hányados 0.87 \pm 0.09 volt, mely ATP jelenlétében nem szignifikáns mértékben csökkent; az átlagos FRS_2/FRS_1 arány ezen kísérletekben 0.67 \pm 0.05 volt (n=4-7; p>0.05). Összefoglalva: a P2 receptor

antagonista PPADS és P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor antagonisták 2MeSAMP nem befolyásolta a nyugalmi és ez elektromos ingerléssel kiváltott transzmitter felszabadulást, a P2Y₁ receptor antagonisták MRS2179 viszont csökkentette a stimulálással kiváltott [³H]noradrenalin ürülését anélkül, hogy a nyugalmi transzmitter felszabadulásra hatással lett volna. Ugyanakkor, mindhárom antagonisták jelenléte sikeresen kivédte a nem szelektív P2 receptor agonista ATP gátló hatását.

3. táblázat A P2Y receptor és egyéb antagonisták hatása az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippocampusz szeletekben. A mintagyűjtési periódus alatt két alkalommal elektromos téringerlést alkalmaztunk (25 V, 2 Hz, and 240 shocks) 30 perces időközönbséggel. Az antagonistákat 18 perccel a második téringerlés előtt tettük a perfúziós folyadékba és a mintagyűjtés hátralevő időtartama alatt jelen voltak. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$.

Vegyület	μM	Kiváltott [³ H]NA felszabadulás		
		FRS ₂ /FRS ₁ % ± SEM	n	szignifikancia
kontroll		1.086 ± 0.033	12	ns
PPADS	30	0.975 ± 0.111	9	ns
MRS2179	10	0.790 ± 0.087	8	*
2-MeSAMP	10	0.900 ± 0.006	4	ns
DPCPX	0.25	0.937 ± 0.104	6	ns
CNQX+AP5	10	0.886 ± 0.017	4	ns
Bicuculline	100	0.819 ± 0.064	4	ns

5.1.5. A glutamáterg és GABAerg transzmisszió szerepe az ATP hatásának közvetítésében az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulás szabályozásában

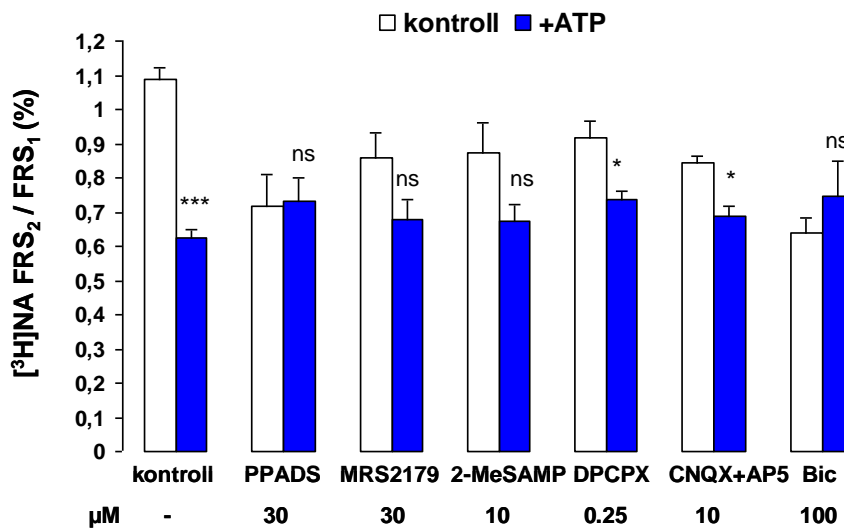
A hippocampális noradrenerg idegvégződéseken az ATP hatásának közvetítésében a neuronokon kifejeződő P2 purin receptorok mellett egyéb receptorok is részt vehetnek közvetett szabályozás formájában. Következő kísérletsorozatunkban az excitátoros

transzmitter glutamát részvételét vizsgáltuk az elektromos téringéréssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásban. Amikor az AMPA/kainát és az NMDA típusú glutamát receptorok antagonistáit, a CNQX-et (10 μ M) és az AP-5-öt (10 μ M) 18 perccel S₂ előtt adtuk a perfúziós folyadékhoz, a saját hatásukat szeretnénk volna megvizsgálni. Ebben az esetben a nyugalmi és az ingerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulást nem befolyásolta szignifikánsan az ionotróp glutamát receptorok gátlása (**3. táblázat**). Ezt követően a nem szelektív P2 receptor agonista ATP hatását teszteltük a glutamát receptorok blokkolása mellett: a szokásos Krebs' oldatunkat a mintavételi periódus kezdetén cseréltük a CNQX-et és az AP-5-öt tartalmazó perfúziós folyadékra, majd 18 perccel S₂ előtt adtuk az ATP-t (300 μ M) a kísérleti rendszerhez. ATP hiányában az AMPA/kainát és az NMDA típusú glutamát receptor antagonisták szintén nem voltak hatással a stimulussal kiváltott transzmitter felszabadulásra; a CNQX+AP-5 kontroll kísérlet FRS₂/FRS₁ hányadosa 0.88 \pm 0.02 volt. Az ATP önmagában 43 \pm 2.5%-os gátlással csökkentette az ingerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulást; mely a glutamát receptor antagonisták jelenlétében 18.18 \pm 3.3 %-os csökkentő hatásra mérséklődött (**13. ábra**). Az ionotróp glutamát receptorok blokkolása, tehát ha nem is teljes mértékben, de részlegesen képes volt felfüggeszteni a P2 receptor agonista hatását.

A gátló GABAerg transzmisszió részvételét az elektromos téringéréssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulás szabályozásában a GABA_A receptor antagonistá Biccuculline (Bic) jelenlétében vizsgáltuk. Amikor 18 perccel S₂ előtt adtuk a Biccuculline-t (100 μ M) a perfúziós folyadékhoz, a nyugalmi és az ingerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulást nem befolyásolta szignifikánsan a GABA_A receptorok gátlása (**3. táblázat**). Ezzel szemben, amikor a teljes kísérleti periódus alatt jelen volt a GABA_A receptor antagonistá és S₂ előtt 18 perccel az ATP-t adtuk a perfúziós folyadékhoz, az ATP gátló hatását teljes mértékben felfüggesztette a GABAerg transzmisszió gátlása (**13. ábra**). A Biccucullin és az ATP együttes jelenléte 12.21 \pm 9.8%-os serkentést eredményezett az FRS₂/FRS₁ hányados értékében az ATP által kiváltott 43 \pm 2.5%-os gátláshoz képest (**13. ábra**).

5.1.6. Az A₁ adenozin receptor és a heteromer P2Y₁/A₁ receptor szerepe az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulás szabályozásában

A következő kísérletsorozatban az A₁ adenozin receptor szelektív antagonistája DPCPX hatását vizsgáltuk, mely hatékonyan képes gátolni a heteromer P2Y₁/A₁ receptor agonista indukált aktivációját is (Yoshioka 2001). Ezekben a kísérletekben is kétféle módon alkalmaztuk az antagonistát. Amikor 18 perccel S₂ előtt adtuk a perfúziós folyadékhoz a DPCPX-et (250nM), az elektromos ingerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulás szignifikánsan nem változott (**3.táblázat**). A nyugalmi transzmitter ürülésre hasonló módon nem volt hatással az A₁ adenozin receptor szelektív antagonistája jelenléte (**1. táblázat**). Ezt követően vizsgáltuk a DPCPX hatását a nem szelektív P2 receptor agonista ATP mellett: a szokásos Krebs' oldatunkat a mintavételi periódus kezdetén cseréltük DPCPX-et tartalmazó perfúziós folyadékra, majd 18 perccel S₂ előtt adtuk az ATP-t (300μM) a kísérleti rendszerhez. Az ATP által kiváltott 43±2.5%-os gátló hatás az A₁ adenozin receptor egyidejű blokkolásával jelentős mértékben csökkent, 20±2.2%-os csökkenést eredményezve az ingerléssel kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásban (**13. ábra**). Ugyanakkor az ATP gátló hatása a DPCPX mellett is szignifikáns maradt (**13. ábra**).

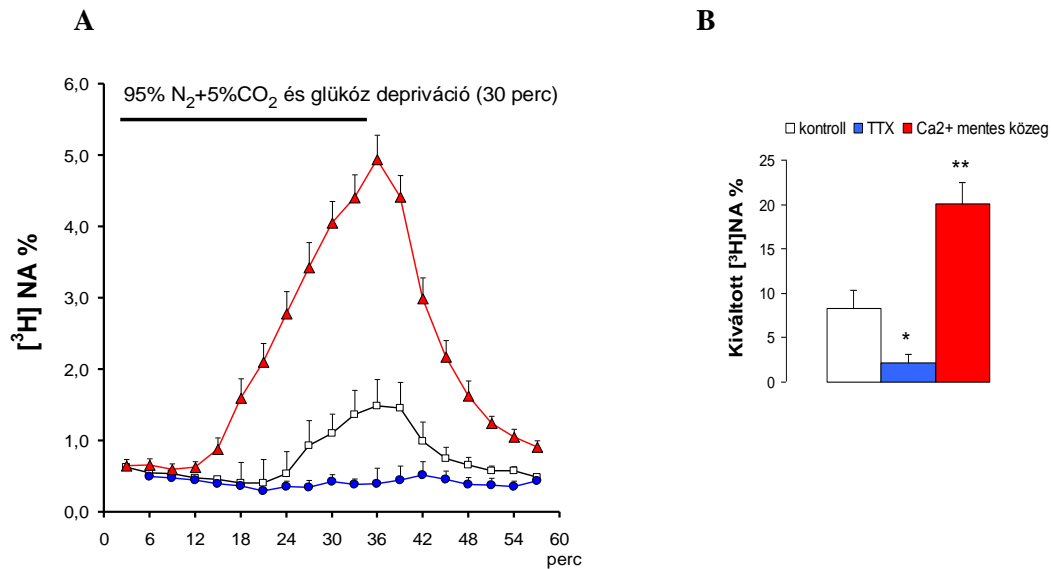


13. ábra. P2Y receptor és egyéb antagonisták hatása ATP jelenlétében az elektromos téringerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulásra patkány hippocampusz szeletekben. Az antagonistákat fehér oszlop sor (PPADS, MRS2179, 2-MeSAMP, DPCPX, CNQX + AP-5, és bicuculline (Bic) a mintagyűjtési periódus kezdetén adtuk a perfúziós folyadékhoz, míg az ATP-t 18 perccel a második elektromos ingerlést megelőzően (kék oszlop sor). ATP (300μM) önmagában szignifikánsan csökkenti az elektromos ingerléssel kiváltott [³H]NA felszabadulást ($p < 0.0001$, kontroll oszloppár). A statisztikai analízis során Student-t tesztet alkalmaztuk páros összehasonlításban, $p < 0.05$.

5.2. Kombinált oxigén és glükózmegvonás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippocampusz szeletekben

Kísérleteinkben az ischemia-szerű állapotot kombinált oxigén és glükózmegvonással idéztük elő (a kísérleti protokoll részleteit l. a Felhasznált Anyagok és Módszerek 4.2.3. fejezetében). Az OGD-nek (oxigén és glükóz depriváció) is hívott kísérleti rendszer annak ellenére a leggyakrabban alkalmazott *in vitro* ischemia modell, hogy az ischemiának kizárólag csak egyik elemét képes modellezni. A 30 perces ischemia-szerű stimulus a kísérleti periódus 6. percétől a 36.-ig percig tartott. A 60 perces előperfúziót követően a mintavételezés kezdetekor a nyugalmi a [³H]noradrenalin felszabadulás 0.55 ± 0.02 % ($n=8$) volt, mely relatíve konstansnak mutatkozott a teljes mintagyűjtési periódus során. A [³H]transzmitter kiáramlás mértéke az *in vitro* ischemiás stimulus (a

továbbiakban az egyszerűség kedvéért: ischemia) hatására késleltetetten, de igen jelentős mértékben megemelkedett (14A. ábra). Az emelkedés 15 perccel az ischemiás inzultus után kezdődött, maximumát 21 perc elteltével érte el, és 30 perc múltán tért vissza az alapvonalra, vagyis hatása reverzibilis volt (**14A ábra**). Az ischemiás inzultus által kiváltott össz noradrenalin felszabadulás $8.32 \pm 1.97\%$ -nak adódott ($n=8$), melyet a további kísérletekben az ischemia-szerű állapotot jellemző kontroll értéknek vettünk. A következő kísérletsorozatban a feszültségfüggő Na^+ csatornák reverzibilis gátlószere, a tetrodotoxin (TTX) hatását teszteltük. A TTX-et 18 perccel az ischemiás inzultust megelőzően raktuk a perfúziós folyadékba és a reperfúziós fázisban is folyamatosan jelen volt. A tetrodotoxin $1\mu\text{M}$ -os koncentrációban teljesen gátolta a kombinált oxigén és glükózmegvonással kiváltott ^3H noradrenalin felszabadulását (TTX: $2.11 \pm 1.05\%$, $n=8$ vs. ishemiás kontroll $8.32 \pm 1.97\%$ $p < 0.05$) (**14B ábra**). A nyugalmi ^3H transzmitter kiáramlást azonban szignifikánsan nem befolyásolta (TTX: $0.64 \pm 0.05\%$, $n=8$ vs. $0.55 \pm 0.02\%$; $p > 0.05$). A ^3H NA felszabadulás mechanizmusát feltáró kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől Ca^{2+} -mentes ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) módosított Krebs' oldatot használtunk, melyet a CaCl_2 megvonásával és EGTA (1mM) hozzáadásával készítettünk. Az ischemia által kiváltott ^3H NA felszabadulás Ca^{2+} -mentes közegben további robusztus emelkedésnek indult (**14B ábra**), ugyanakkor a nyugalmi ^3H transzmitter kiáramlás nem változott szignifikáns mértékben ($[\text{Ca}^{2+}]_o$: $0.469 \pm 0.07\%$, $n=8$ vs. $0.55 \pm 0.02\%$; $p > 0.05$). Összefoglalva: a 30 perces kombinált oxigén és glükózmegvonás a patkány hippocampusban túlnyomórészt a feszültségfüggő Na^+ csatornák aktivációja, azaz az axonális depolarizáció révén váltotta ki a ^3H NA kiáramlást, mely nem vezikuláris, hanem citoplazmatikus raktárakból szabadul fel Ca^{2+} független módon.

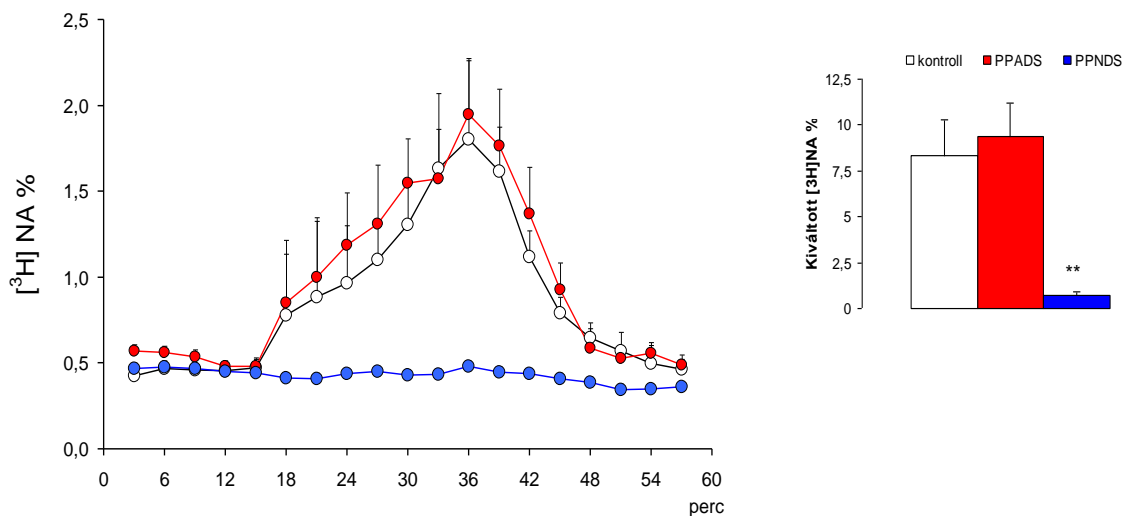


14. ábra. In vitro ischémia-szerű stimulussal (kombinált oxigén és glükóz depriváció) kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulás patkány hippoakmpusz szeletekben. A. A mintavételezés 6. percétől oxigén és glükóz mentes perfúziós folyadékot használtunk 30 percen át, ahogy a fekete vonal is jelzi. TTX (kék görbe) és a Ca²⁺-mentes közeg (piros görbe) hatása a stimulus által kiváltott [³H]NA felszabadulásra. **B** Az ischémia által kiváltott össz [³H]noradrenalin felszabadulás mennyiségét görbe alatti terület módszerrel számoltuk TTX és Ca²⁺-mentes közeg hiányában illetve jelenlétében. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, * p<0.01, ** p<0.01.

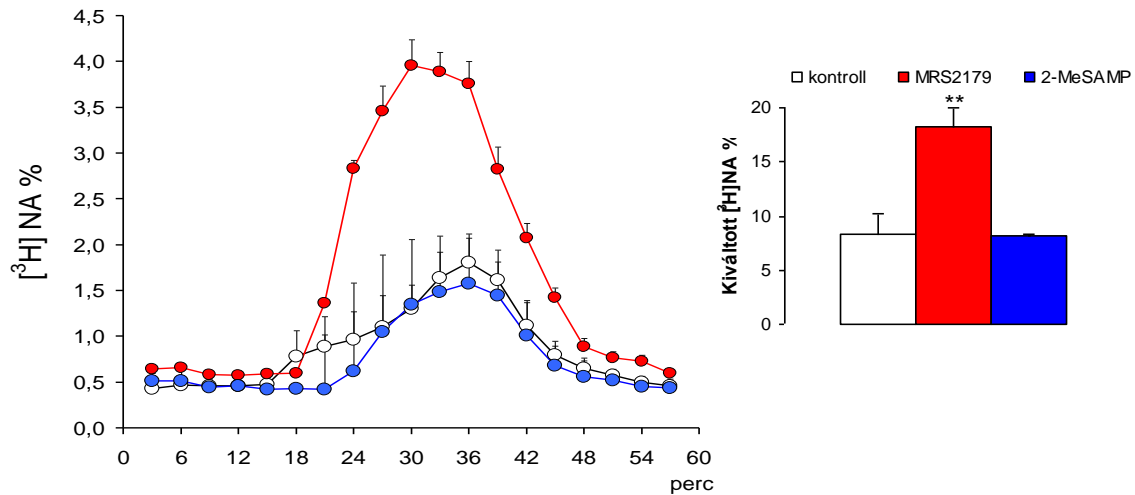
5.2.1. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata a kombinált oxigén és glükózmegvonás által kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra

A következő kísérletekben P2 receptorok közvetítő szerepét vizsgáltuk az ischemia által kiváltott [³H]transzmitter felszabadulásban. A kísérletsorozatban a vizsgált antagonisták a 30 perces ischémiás stimulus előtt 18 perccel kerültek alkalmazásra. A következő P2 purin receptor antagonisták hatását vizsgáltuk: a nem szelektív P2 receptor antagonistá PPADS (30 μM), a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor antagonistá 2MeSAMP (10 μM), a szelektív P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 (10 μM) és a potens P2X1 receptor antagonistá PPNDS (1 μM). A PPADS és a 2MeSAMP nem volt szignifikáns hatással az ischémiás stimulussal kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra (**15. és 16. ábra**). Ezzel szemben, a P2X1 receptor antagonistá, PPNDS (100 μM) esetében (15. ábra) mintegy 91%-os

gátló hatást tapasztaltunk a 30 perces kombinált oxigén és glükóz depriváció által kiváltott transzmitter felszabadulásban (PPNDS $0.74 \pm 0.711\%$, $n=8$ vs. ischemiás kontroll $8.32 \pm 1.97\%$, $p < 0.01$). A szelektív P2Y₁ receptor antagonistista MRS2179 pedig jelentős mértékben, 120%-os serkentő hatással fokozta az ischemiás stimulussal kiváltott [³H]noradrenalin kiáramlást (MRS2179 $18.19 \pm 3.95\%$ $n=8$ vs. ischemiás kontroll $8.32 \pm 1.97\%$ $p < 0.01$). A nyugalmi transzmitter felszabadulásra egyik P2 receptor antagonistista sem volt hatással (16. ábra).



15. ábra. P2 receptor antagonisták (PPADS, PPNDS) hatása az in vitro ischemia szerű stimulussal (kombinált oxigén és glükóz depriváció) kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippoakampusz szeletekben. A mintavételezés 6. percétől oxigén és glükóz mentes perfúziós folyadékot használtunk 30 percen át. A PPADS (30 μ M, piros görbe) és PPNDS (1 μ M, kék görbe) hatása a kiváltott [³H]NA felszabadulásra. Az ischemia által kiváltott össz [³H]noradrenalin felszabadulás mennyiségét görbe alatti terület módszerrel számoltuk PPADS és PPNDS hiányában illetve jelenlétében. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$.



16. ábra. P2 receptor antagonisták (MRS2179, 2-MeSAMP) hatása az *in vitro* ischemia szerű stimulussal (kombinált oxigén és glükóz depriváció) kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippoakmpusz szeletekben. A mintavételezés 6. percétől oxigén és glükóz mentes perfúziós folyadékot használtunk 30 percen át. MRS2179 (10 μ M, piros görbe) és 2-MeSAMP (10 μ M, kék görbe) hatása. Az ischemia által kiváltott össz [³H]noradrenalin felszabadulás mennyiségét görbe alatti terület módszerrel számoltuk MRS2179 és 2-MeSAMP hiányában illetve jelenlétében. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$.

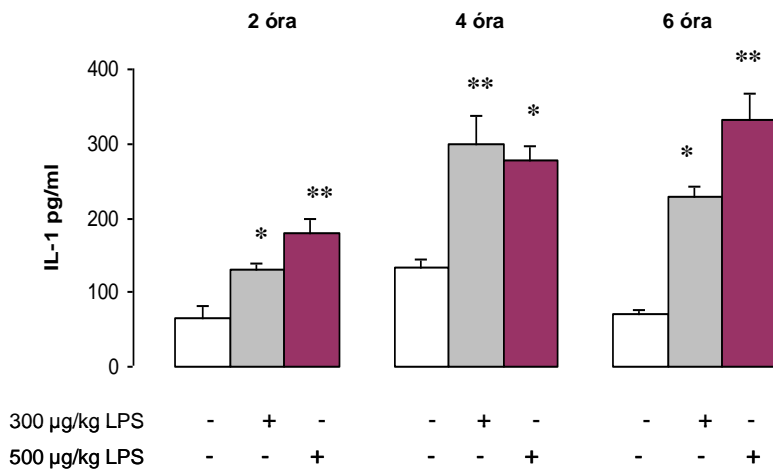
5.3. A P2X7 receptor aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1 β (IL-1 β) termelődés szabályozásában rágsáló hippocampusban *in vivo* gyulladáso modellben

A noradrenalin felszabadulás szabályozása nem az egyetlen lehetséges és még kevésbé feltárt támadáspont, amely által a neurodegeneráció folyamata purinerg mechanizmusokon keresztül szabályozható. Régóta ismert a gyulladáso citokinek, közülük is kiemelten az Interleukin-1 β -nak az idegi sejtelhalást súlyosbító hatásai (Martin F. Lister 1998). Ezek a gyulladáso mediátorok az ischémiás inzultust követően elsősorban a nem idegi sejtekből szabadulnak fel, fő forrásaik a mikroglia és asztroglia sejtek. Ugyanakkor az is ismert, hogy a periférián a bakteriális endotoxin (lipopoliszacharid, LPS) hatására létrejövő, biológialilag aktív IL-1 β termeléshez szükséges másodík, extracelluláris szignáltk a P2X7 receptor aktivációjá biztosítja. Korábbi kísérletekben már megállapítást nyert a P2X7 receptorok kulcsfontosságú részvétele a gyulladáso citokin poszttraszlációs feldolgozásának szabályozásában a perifériás immunkompetens sejtek vonatkozásában. *In vitro* gyulladáso modellekben is igazolták az agyi IL-1 β termelés szabályozásában a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepét (Chafke és mtsai 2002) Ugyanakkor nem ismert, hogy a központi idegrendszerben, kiemelten a hippocampusban milyen szerepet játszanak a P2X7 receptorok a nyugalmi és gyulladáso stimulusokra létrejövő IL-1 β termelődésben. Az értekezés másodík részében, *in vivo* gyulladáso modell alkalmazásával vizsgáltuk a P2X7 receptor aktiváció IL-1 β termelésre gyakorolt hatását nyugalmi állapotban és bakteriális endotoxin kezelést követően. A kísérletsorozatban külön vizsgáltuk patkány és eger hippocampus esetén a gyulladáso citokin tartalom változását a különböző kezeléseket követően. A gyulladáso modell további részleteit l. a Felhasznált Anyagok és módszerek 4.3.2. fejezetében. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg melyet l. a Felhasznált Anyagok és módszerek (4.3.3.) fejezetben.

5.3.1. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés hatása patkány hippocampusz IL-1 β termelésére

A kísérletek során a patkányok intraperitoneális injekció formájában kapták a bakteriális endotoxint, a lipopoliszacharidot (LPS), amely a Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó erősen immunogén anyag. A kiindulási kezelési idő hosszát Roche és munkatársai által leírt megfigyelés alapján választottuk ki, mely szerint 2 órával a szisztémás LPS injekciót követően már detektálható növekedést mutatható ki a centrális IL-1 β termelésben (Roche és mtsai 2006). Ezt követően kétféle LPS dózist (300 μ g/kg és 500 μ g/kg) és további két kezelési időt (4, 6 óra) teszteltünk, a gyulladós modell paramétereinek optimalizálása érdekében (**17. ábra**). A só és LPS kezelések közötti szignifikáns különbségeket student-t teszttel határoztuk meg. A * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ szignifikanciaszintet jelöl.

A nyugalmi IL- β termelés már 2 órával a só kezelést követően is jól kimutatható szinten mozgott (64.44 \pm 15.92 pg/ml, n=4), mely megegyezett a 6 órás kontroll kezelést követően mért bazális citokin szinttel (70.32 \pm 5.92 pg/ml; n=4). Ezzel szemben 4 órával a só injekcióját követően lényegesen magasabb nyugalmi IL-1 β koncentrációt mutattunk ki. A szisztémás LPS injekció már a két órás kezelés esetén robosztus növekedést idézett elő a kezdeti bazális IL-1 β tartalomban, mely emelkedés dózisfüggőnek bizonyult a patkány hippocampuszban: 300 μ g/kg: 131.6 \pm 6.1 pg/ml, n=4, $p < 0.05$; 500 μ g/kg: 178.4 \pm 20.3 pg/ml, n=4, $p < 0.01$, összehasonlítva nyugalmi 2 órás IL-1 β szinttel (**17. ábra**). A 4 órás és 6 órás LPS kezelések esetében is szignifikáns növekedést tapasztaltunk a mért IL-1 β koncentrációban, azonban dózisfüggést csak az utóbbi esetben láttunk (6 órás kezelés 300 μ g/kg: 227.6 \pm 14.4 pg/ml, n=4, $p < 0.05$, 320%-os emelkedés; 500 μ g/kg: 332.9 \pm 35.2 pg/ml, n=4, $p < 0.01$ 474%-os emelkedés; 4 órás kezelés 300 μ g/kg: 298.50 \pm 36.63 pg/ml, n=4, $p < 0.01$ 17. ábra). A további kísérletekben, melyek a hatásközvetítő receptor azonosítására irányultak, gyulladós kontrollként a 6 órás 300 μ g/kg LPS kezelést alkalmaztuk.



17. ábra. A nyugalmi és LPS (*Escherichia Coli*) kiváltotta IL-1 β termelés patkány hippocampuszban. Az IL-1 β válaszokat 2, 4 és 6 órával a feltüntetett dózisu intraperitoneális LPS-injekció után hasonlítottuk össze. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból.

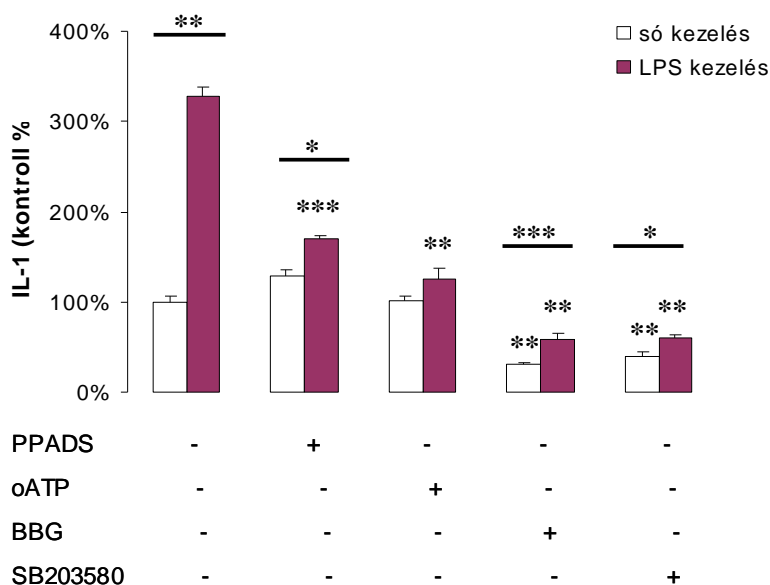
5.3.2. P2 purin receptor antagonisták vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin által kiváltott IL-1 β termelésre patkány hippocampuszban

Az ismert P2 purin receptor antagonisták közül a következők hatását vizsgáltuk: a nem szelektív P2 receptor antagonista PPADS (25mg/kg), mely több P2X (P2X1, P2X3, P2X7) és P2Y (P2Y₁, P2Y₄, P2Y₆) receptor altípuson is hat, a P2X7 receptor antagonista BBG (100mg/kg) és a szelektív P2X7 receptor antagonista oATP (0.9mg/kg). A kísérletekben az egyes antagonistákat irodalmi adatok alapján a P2 purin receptorokra, a P2X receptor alcsaládra illetve a P2X7 receptor altípusra szelektív koncentráció tartománynak megfelelő in vivo dózisban alkalmaztuk (Gourine és mtsai 2005, Griffiths és mtsai 1995). Ebben a kísérletsorozatban kétféle protokoll szerint injektáltuk intraperitoneálisan az antagonistákat: míg a BBG-t és PPADS-t 30 perccel, addig az oATP-t 2 órával adtuk a só, illetve LPS (300 μ g/kg) injekciót megelőzően. Amikor a só kezeléseket megelőzően adtuk az antagonistákat, a nyugalmi IL-1 β szintre gyakorolt hatásukra voltunk kíváncsiak. Az oATP esetében a hosszabb kezelési időt az indokolta, hogy legalább 120 perces időtartam szükséges ahhoz, hogy az oATP irreverzibilisen

képes legyen gátolni a P2X7 receptort. 6 órával a só, illetve LPS injekciót követően dekapitáltuk az állatokat. A kísérletsorozatban az antagonisták mellett minden esetben párhuzamosan só és LPS kezeléseket is végeztünk, melyek a tesztelni kívánt vegyületek kontroll csoportjait képezték. Az IL-1 β termelődést a pg/ml-ben kifejezett só oldattal kezelt kontroll kísérletek átlagának százalékában fejeztük ki, ahol a só kezeléseket átlagértékét vettük 100 \pm 6.87%. A statisztikai analízis során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és azt követő Dunnett *post hoc* tesztet alkalmaztunk az antagonista kezeléseket és a só illetve az LPS kezelés közötti szignifikáns különbség meghatározásához. A só és LPS kezeléseket közötti szignifikáns különbségeket student-t teszttel határoztuk meg. A * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 szignifikanciaszintet jelöl.

A PPADS és az oATP jelenléte önmagában nem volt hatással a bazális IL-1 β szintre (**18. ábra**). Ezzel szemben a BBG önmagában is szignifikánsan csökkentette a nyugalmi IL-1 β szintet a patkány hippocampusban mintegy ~69%-os gátlást eredményezve: BBG 30.93 \pm 5.91% a só kezelés százalékában kifejezve vs. 100 \pm 6.87%, n =4, p <0.01 (**18. ábra**). Ezzel szemben mindhárom antagonista (PPADS, oATP, BBG) jelenléte képes volt felfüggeszteni az LPS (300 μ g/kg) által kiváltott szignifikáns, mintegy 330%-os növekedést a hippocampális IL-1 β termelésben (**18. ábra**) (PPADS+LPS 169.61 \pm 3.37%; oATP+LPS 124.99 \pm 12.85%; BBG+LPS 58.84 \pm 5.75% a só kezelés százalékában kifejezve). Ismert, hogy a P2X7 receptor aktivációt számos olyan downstream esemény követi, melyek maguk is részt vesznek a gyulladáshoz vezető citokinek, így az IL-1 β transzkripciójában és processzáálásában. A p38 MAP kináz foszforilációjának hozzájárulását az érett IL-1 β processzááláshoz makrofág sejtkultúrában már igazolták (Kim 2004, 2004b), valamint kutatócsoportunk a P2X7 receptor aktivációfüggő p38 MAPK expressziót is kimutatta rágcsáló hippocampusban (Papp és mtsai 2007). Ezek a korábbi eredmények indokolták, hogy megvizsgáljuk a p38 MAPK szignál transzdukciós elem részvételét a hippocampális gyulladáshoz vezető mediátorok termelésének szabályozásában is. A p38 MAP kináz részvételét a nyugalmi és az LPS kiváltotta IL-1 β termelésben, a szelektív p38 MAP kináz inhibitor, SB203580 (0.42 mg/kg) jelenlétében vizsgáltuk. Az SB203580-t 30 perccel a só illetve LPS injekciót megelőzően adtuk i.p., majd 6 órával az LPS kezelés után dekapitáltuk az állatokat. A p38 MAP kináz inhibitor jelenléte a nyugalmi és a szisztémásan indukált gyulladáshoz vezető IL-1 β termelést egyaránt szignifikánsan csökkentette (SB203580

39.24±5.25% vs. só kezelés 100±6.87%, SB203580+LPS 59.78±3.60% vs. LPS kezelés 327.34±10.91%, n=4, p<0.01 **18. ábra**).

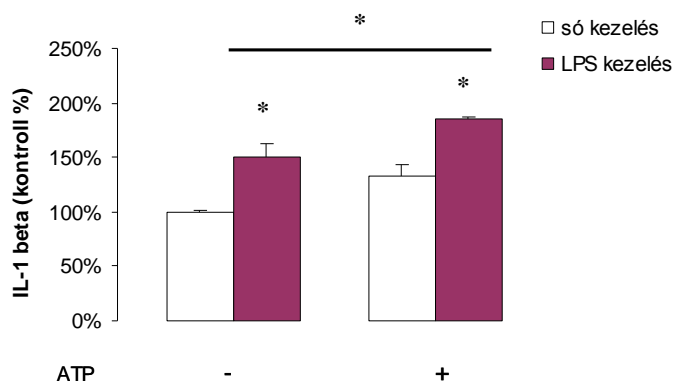


18. ábra. A P2 purin receptor antagonisták és a p38 MAPK inhibitor SB203580 hatása a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre patkány hippocampusban. A nem szelektív P2 receptor antagonista PPADS-t (25mg/kg), a P2X7 receptor antagonista BBG-t (100mg/kg) és az SB203580-z (0.42 mg/kg) 30 perccel, míg a szelektív P2X7 receptor antagonista oATP-t (0.9mg/kg) 2 órával adtuk az intraperitoneális só illetve az LPS (300 μ g/kg) injekciót megelőzően. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból. A citokin szinteket reprezentáló adatokat a só kezelés százalékában kifejezett átlag \pm S.E.M. ábrázoltuk.

5.3.3. P2 purin receptor agonisták vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre patkány hippocampusban

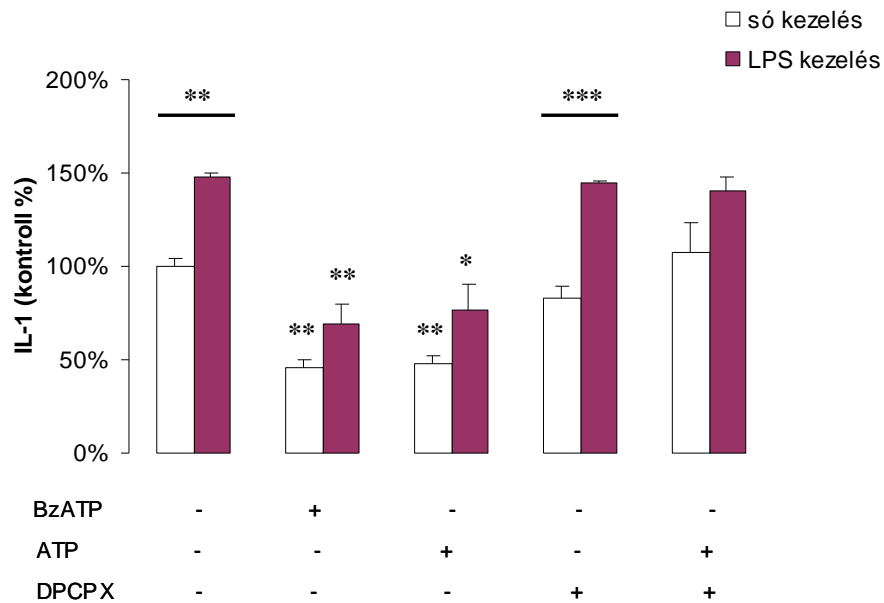
A szisztémás bakteriális endotoxin által kiváltott emelkedést az IL-1 β produkcióban számos P2X receptor agonista hatású purin nukleotid képes modulálni. Az ismert P2 receptor agonisták közül az endogén ligand és nem szelektív P2 receptor agonista ATP (9 mg/kg), és a P2X1, P2X3, P2X7 receptor agonista BzATP (6.4 mg/kg) hatását vizsgáltuk. A kísérletekben az egyes agonistákat irodalmi adatok alapján a P2 purin receptorokra illetve a P2X receptor alcsaládra szelektív koncentráció tartománynak

megfelelő in vivo dózisban alkalmaztuk (Guerra és mtsai 2003). A tesztelni kívánt agonistákat ebben a kísérletsorozatban kétféle protokoll szerint injektáltuk intraperitoneálisan. A BzATP-t 30 perccel adtuk a só, illetve LPS (300 μ g/kg) kezelést megelőzően. Az ATP esetében két kezelési időt is teszteltünk, 2 órával a só / LPS injekció előtt, illetve 4 órával a só / LPS kezelést követően adagoltuk ugyanabban a dózisban. Akárcsak az antagonistákkal végzett kísérletek esetében itt is, amikor a só kezeléseket megelőzően adtuk az agonistákat, a nyugalmi IL-1 β szintre gyakorolt saját hatásukra voltunk kíváncsiak. 6 órával a kontroll nyugalmi és gyulladásoos kezeléseket követően dekaptáltuk az állatokat. A kísérletsorozatban az agonisták mellett minden esetben párhuzamosan só és LPS (300 μ g/kg) kezeléseket is végeztünk, melyek a tesztelni kívánt vegyületek nyugalmi és gyulladásoos kontroll csoportjait képezték. Az IL-1 β termelést itt is, akárcsak az antagonisták esetében a pg/ml-ben kifejezett só oldattal kezelt kontroll kísérletek átlagának százalékában fejeztük ki, ahol a só kezeléseek átlag értékét vettük 100%-nak. Az ATP időfüggő módon modulálta a hippokampális IL-1 β szintet, mely hatás a kétféle kezelési protokollnak megfelelően ellentétes irányúnak bizonyult. Amikor az ATP-t, 4 órával a só illetve LPS injekció után adtuk, a nyugalmi IL-1 β szintre nem volt hatással az ATP rövid időtartamú jelenléte (**19. ábra**). Ezzel szemben a gyulladásoos stimulus által kiváltott IL-1 β termelésben további, mintegy ~23%-kal serkentő hatású növekedést tapasztaltunk (**19. ábra**).



19. ábra. ATP hatása a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre patkány hippokampuszban. Az intraperitoneális só illetve az LPS (300 μ g/kg) injekciót után 4 órával adtuk az ATP-t (9 mg/kg). ATP jelenlétében szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az LPS kiváltotta IL-1 β termelésben. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból. A citokin szinteket reprezentáló adatokat a só kezelés százalékában kifejezett átlag \pm S.E.M. ábrázoltuk.

Ugyanakkor, amikor a másik protokollt alkalmaztuk, és az ATP-t 2 órával a kezeléseket megelőzően injektáltuk i.p., az a bazális és az LPS kiváltott IL-1 β termelést is egyaránt szignifikánsan csökkentette **(20. ábra)**. A BzATP -t 30 perccel a só illetve az LPS injekció előtt adagolva szintén szignifikáns, csökkenő hatást tapasztaltunk a nyugalmi és a bakteriális endotoxin kiváltott IL-1 β termelésben **(20. ábra)**. A mindkét agonista esetében megfigyelt gátló hatás egy újabb lehetséges hatásközvetítő mediátor közreműködését feltételezi. A következő kísérletsorozatban az A₁-adenozin receptor részvételét vizsgáltuk a hippokampális IL-1 β termelés szabályozásában, szelektív antagonistája a DPCPX jelenlétében. A DPCPX-t (10mg/kg) 30 perccel adtuk a só illetve LPS (300 μ g/kg) kezelést megelőzően, az alkalmazott dózist Higgins és munkatársai által közölt publikáció alapján választottuk (Higgins és mtsai 2007). A DPCPX önmagában a nyugalmi citokin szintre nem volt hatással és az LPS-kiváltott IL-1 β termelést sem befolyásolta szignifikánsan **(20. ábra)**. Ezzel szemben ATP kezeléssel kombinálva, amikor az ATP injekciót követte a DPCPX kezelés, az A₁-adenozin receptorok blokkolása kivédte az ATP gátló hatását a gyulladásos stimulust követően (ATP+DPCPX+LPS 140.59 \pm 7.29% a só kezelés százalékában kifejezve vs. ATP+LPS 76.33 \pm 14.17% a só kezelés százalékában kifejezve, n=4, p>0.05) (20. ábra). A bazális IL-1 β tartalmat ATP jelenlétében sem befolyásolta a DPCPX **(20. ábra)**. Összefoglalva: A szisztémás LPS kiváltott IL-1 β termelés szabályozásában patkány hippokampusz esetében, az A₁-adenozin receptor gátló hatással, míg a felállított farmakológiai (agonista és antagonist) profil alapján P2X7 altípusként azonosított P2X receptor altípus serkentő hatás közvetítésével vesz részt.

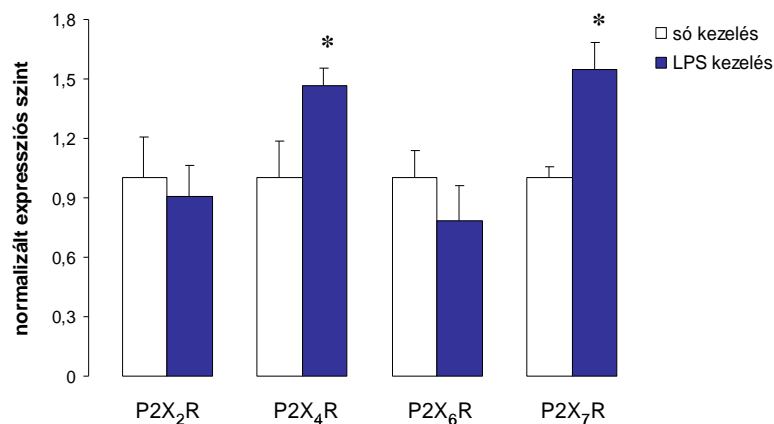


20 . ábra. A P2 purin receptor agonisták (ATP, BzATP) és az A1-adenozin receptor antagonistá DPCPX hatása a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre patkány hippocampuszban ATP-t (9 mg/kg) 2 órával, míg a P2X1, P2X3, P2X7 receptor agonista BzATP-t (6.4 mg/kg) és a DPCPX-t (10mg/kg) 30 perccel adtuk az intraperitoneális só, illetve az LPS (300 μ g/kg) injekciót megelőzően. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból.

5.3.4. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés hatása a P2X receptor altípusok expressziójára egér hippocampuszban

SYBR Green alapú real-time PCR technikával vizsgáltuk az agyban kifejeződő főbb P2X receptor altípusokat kódoló mRNS jelenlétét és expressziójának változását a szisztémás LPS kezelés hatására egér hippocampuszban. 2 hónapos hím C57Bl/6J egereket oltottunk intraperitoneálisan fiziológiás sóoldattal illetve bakteriális endotoxinnal (250 μ g/kg), majd a kezeléseket követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat. A kísérleti protokoll részleteit l. a Felhasznált Anyagok és módszerek 4.3.2. fejezetében. Az általunk vizsgálni kívánt P2X2, P2X4, P2X6 and P2X7 receptor alegységek mRNS expressziójának meghatározását az átírt első szálú cDNS templátból végeztük el kvantitatív real-time PCR segítségével. A PCR reakció részleteit l. a Felhasznált Anyagok és módszerek 4.3.1. és 4.3.4. fejezetében. Minden egyes mintában meghatároztuk a vizsgált P2X receptor altípusok és a háztartási kontroll gén 18sRNA

expressziójára jellemző áttörési pontokat (Ct), majd minden gén esetében, a megfelelő kalibrációk segítségével intrapolációval kiszámoltuk az abszolút mRNA koncentrációkat. A purin receptorok mRNA koncentrációit a endogén kontroll koncentrációihoz vonatkoztattuk, így a nyert adatok egymással összevethetőkké váltak. A statisztikai analízis során az egyes P2X receptor altípusok normalizált expressziós szintjeit hasonlítottuk össze a só illetve az LPS kezelést kapott csoportok között. Kontroll értéknek a sóoldattal kezelt csoport normalizált mRNA szintjét tekintettük, melyet 100%-nak vettünk az LPS kezeléssel való összehasonlítás során (**21. ábra**).



21. ábra. A P2X receptor altípusok mRNA expressziójának változása perifériás LPS kezelés hatására egér hippocampusban. A 250µg/kg i.p. LPS kezeléseket követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat, a kivett hippocampuszokból total RNS-t izoláltunk és a reverz transzkripcióval átírt cDNS templátból végeztük el a P2X₂, P2X₄, P2X₆ and P2X₇ receptor alegységek mRNA expressziójának mérését. A purin receptorok mRNA koncentrációit a 18sRNS endogén kontroll mRNA koncentrációihoz vonatkoztattuk. A statisztikai analízis során az egyes P2X receptor altípusok normalizált expressziós szintjeit hasonlítottuk össze a só illetve az LPS kezelést kapott csoportok között. Az adatokat a só kezelés százalékában kifejezett átlag ± S.E.M. ábrázoltuk. Csoportonként 6-8 állatot használtunk. A statisztikai analízis során student-t tesztet alkalmaztunk, *p<0.05, szignifikanciaszintet jelöl.

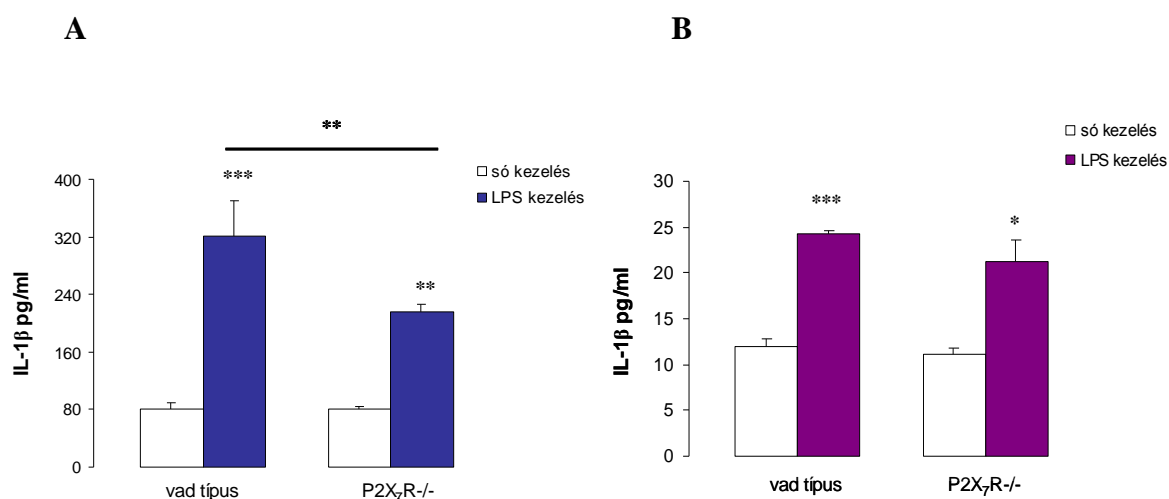
6 órával a perifériás LPS kezelést követően a P2X₇ receptor expressziójában mintegy 54.62 ± 0.13 %-os emelkedést mutattunk ki a sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz képest (21. ábra; n=8, p<0.05). Hasonló tendenciát tapasztaltunk a P2X₄ receptor esetében is, a bakteriális endotoxin szignifikáns, mintegy 46.58 ± 0.08 %-os serkentő

hatást eredményezett a receptor mRNS expressziójában (**21. ábra**; $n=8$, $p<0.05$). A P2X6 receptor altípust kódoló génről áltírodó mRNS szint esetében nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a gyulladáshoz követhetően (78.69 ± 0.17 %-ra csökkent az expressziós szint a sóoldattal kezelt kontroll csoport mRNS szintjéhez képest, $n=6$, $p>0.05$). A P2X2 receptor altípus expressziójára sem volt hatással a perifériás LPS kezelés (**21. ábra**).

5.3.5. Perifériás bakteriális endotoxin kezelés és a P2X7 receptor génkiütés hatása egér szérumban és hippocampusz IL-1 β termelésére

A következő kísérletsorozatban 2-3 hónapos egereket oltottunk intraperitoneálisan fiziológiás sóoldattal, illetve bakteriális endotoxinnal ($250\mu\text{g/kg}$), majd a kezeléseket követő 7. órában dekapitáltuk az állatokat. Kezelési időnek a patkány kísérletek során már sikeresen alkalmazott 6 órát választottuk, az LPS dózist $250\mu\text{g/testsúly kg-on}$ határoztuk meg, előzetes kísérleteink eredményei alapján. A gyulladáshoz követhetően további részleteit l. a Felhasznált Anyagok és módszerek 4.3.2. fejezetében. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a C57Bl/6J genetikai háttérű P2rx7 $^{+/+}$ vad típusú és a P2rx7 $^{-/-}$ null mutáns egerek perifériás és centrális IL-1 β termelését nyugalmi állapotban és gyulladáshoz követhetően. A hippocampusz nyugalmi IL-1 β termelése 6 órával a só kezelést után 80.91 ± 8.18 pg/ml-nak adódott a vad típusú egerekben (**22A. ábra**, $n=8$), amely nem tért el szignifikánsan a P2rx7 $^{-/-}$ egereknél mért bazális citokin szinttől (**22A. ábra** 81.41 ± 6.72 pg/ml, $n=8$). Vad típusú egerekben a szisztémás LPS ($250\mu\text{g/kg}$) kezelés mintegy ~390%-os, robusztus növekedést eredményezett a kiindulási IL-1 β tartalomban (**22B. ábra**). A P2X7 receptor deficiens egerek esetén ugyanez a gyulladáshoz követhetően 265%-os emelkedést váltott ki (**22B. ábra**), mely szignifikánsan kisebb mértékű növekedésnek bizonyult, mint amit a vad típusú társaiknál tapasztaltunk (LPS 320.4 ± 51.3 pg/ml a vad típusú egér esetében vs. 215.5 ± 16.1 pg/ml a P2rx7 $^{-/-}$ egér esetében, $n=8$, $p<0.01$; **22B. ábra**). A következő kísérletsorozatban a dekapitálás előtt transzkardiális perfúziót végeztünk. A hippocampusz nyugalmi IL-1 β termelése 6 órával a só kezelést után 11.9 ± 0.9 pg/ml volt, mely szignifikánsan alacsonyabbnak

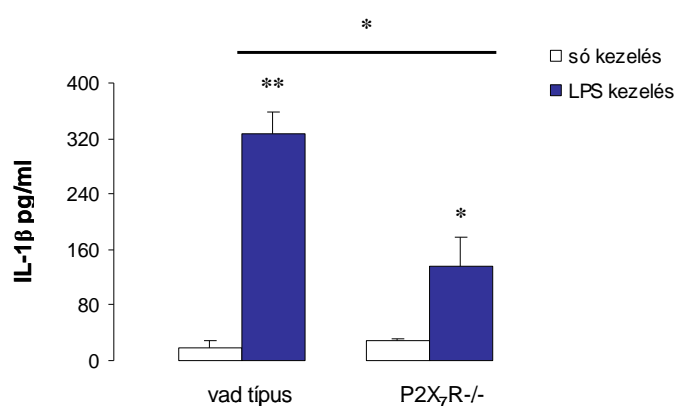
adódott, mint a perfúzió nélküli hippocampusz esetében (80.91 ± 8.18 pg/ml, $n=4$; $P < 0.001$ 22B ábra). A perifériás LPS ($250 \mu\text{g}/\text{kg}$) kezelés hatására az IL-1 β termelés 287%-kal megemelkedett a vad típusú egér perfundált hippocampuszában, de a detektált IL-1 β mennyisége messze elmaradt a perfúzió nélküli hippocampuszban mért citokin koncentrációtól (transzkardiális perfúzió után: 24.3 ± 0.3 pg/ml, $n=4$ vs. perfúzió előtt: 320 ± 50.6 pg/ml, $n=8$, $p < 0.01$ 22B ábra). A transzkardiális perfúziót követően sem a nyugalmi, sem az LPS kiváltotta IL-1 β termelésben nem tapasztaltuk szignifikáns különbséget a vad típusú és a P2rx7 $^{-/-}$ egerek között, mely kizárja a P2X7 receptor hatásközvetítő szerepét.



22. ábra. A nyugalmi és LPS ($250 \mu\text{g}/\text{kg}$, Escherichia Coli) által kiváltott IL-1 β termelés P2rx7 $^{+/+}$ vad típusú és a P2rx7 $^{-/-}$ null mutáns egér hippocampuszban. **A Transzkardiális perfúzió előtt: vad típusú egér hippocampuszban az 6 órás LPS kezelés hatására jelentős növekedést tapasztaltunk az IL-1 β termelésben. A P2X7 $^{-/-}$ egerekben szignifikánsan kisebb mértékű emelkedést indukált a szisztémás gyulladás. **B Transzkardiális perfúzió után:** nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vad típusú és P2RX7 $^{-/-}$ egerek LPS által kiváltott hippocampális IL- β termelésében. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból.**

A perifériás gyulladásos válasz vizsgálata során a 6 órás só, illetve LPS ($250 \mu\text{g}/\text{kg}$) kezelést követően a hasüregből és a mellüregből gyűjtöttünk vért és ennek nyugalmi illetve LPS kiváltott IL-1 β tartalmát mértük. A kísérleti protokoll részleteit l. a Felhasznált Anyagok és módszerek 4.3.2. és 4.3.3. fejezetében. A szérum nyugalmi

IL- β termelése szignifikánsan nem különbözött a P2rx7^{+/+} vad típusú és a P2rx7^{-/-} null mutáns egerek között (23. ábra). Az intraperitoneálisan adott LPS hatására a hippocampuszhoz hasonló emelkedést tapasztaltunk a vad típusú egér szérumban (23. ábra, 307.6 \pm 36.1 pg/ml 1600%-os emelkedés), melynél lényegesen kisebb növekedést mértünk az IL-1 β termelésben a P2X7 receptor deficiens egerek esetén (23. ábra, 136.99 \pm 39.54 pg/ml).

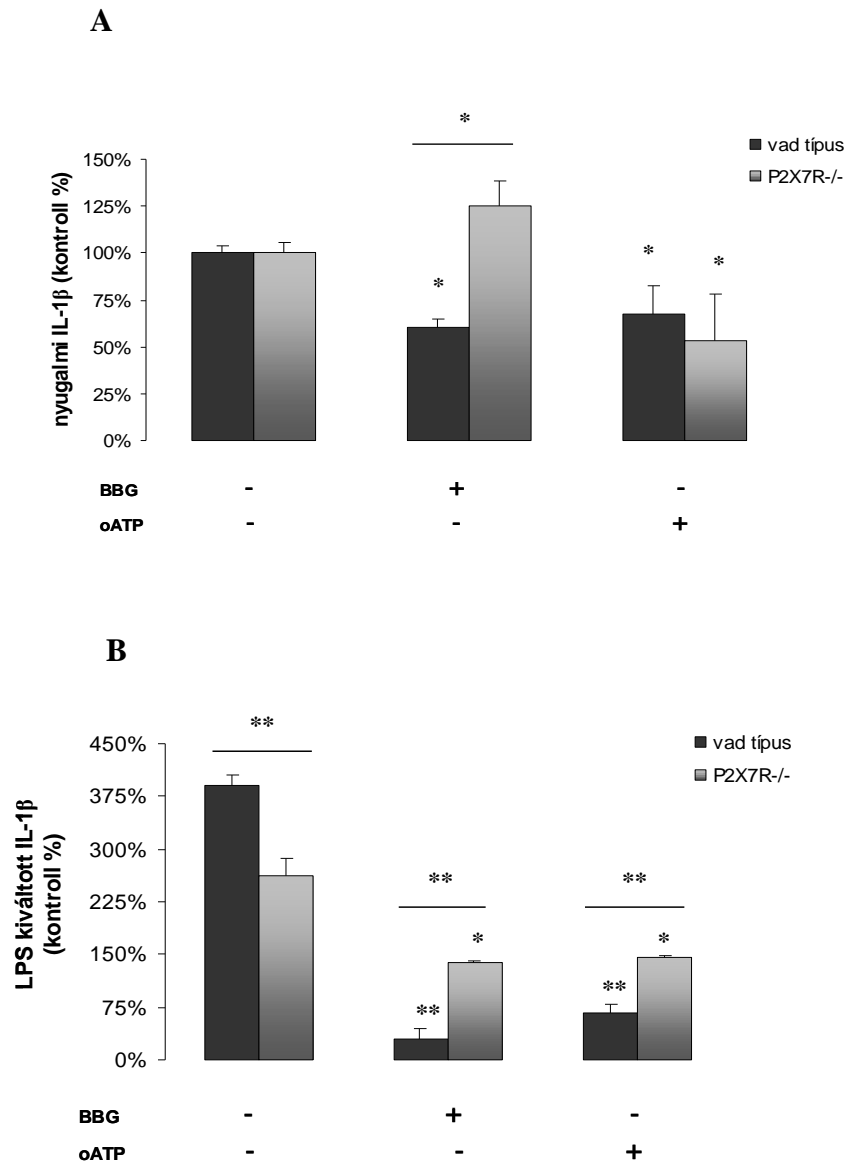


23. ábra. 6 órával az intraperitoneális só illetve a bakteriális endotoxin (250 μ g/kg) injekció után a hasüregből és a mellüregből gyűjtött vérszérumból határoztuk meg a nyugalmi, illetve LPS kiváltott IL-1 β tartalmat. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból.

5.3.6. P2 purin receptor antagonisták, az ATP és a széles spektrumú réskapcsolat félcsatorna (Gap junction hemichannel) blokkoló CBX vizsgálata a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre egér hippocampuszban

A patkány hippocampusz vizsgálata során kapott eredményeink alapján felállított farmakológiai profilnak megfelelően, célzottan vizsgáltuk a P2X7 purin receptor antagonisták közül a P2X7 receptor antagonista BBG (100mg/kg) és a szelektív P2X7 receptor antagonista oATP (0.9mg/kg) hatását. A transzgénikus P2X7 receptor null mutáns egértörzs esetében a nem szelektív P2 receptor antagonista PPADS vizsgálatára már nem került sor. Kísérleteinkben az antagonistákat, az irodalmi adatok és a korábbi patkány kísérletekben már sikeresen alkalmazott, a P2X7 receptor altípuson hatékony,

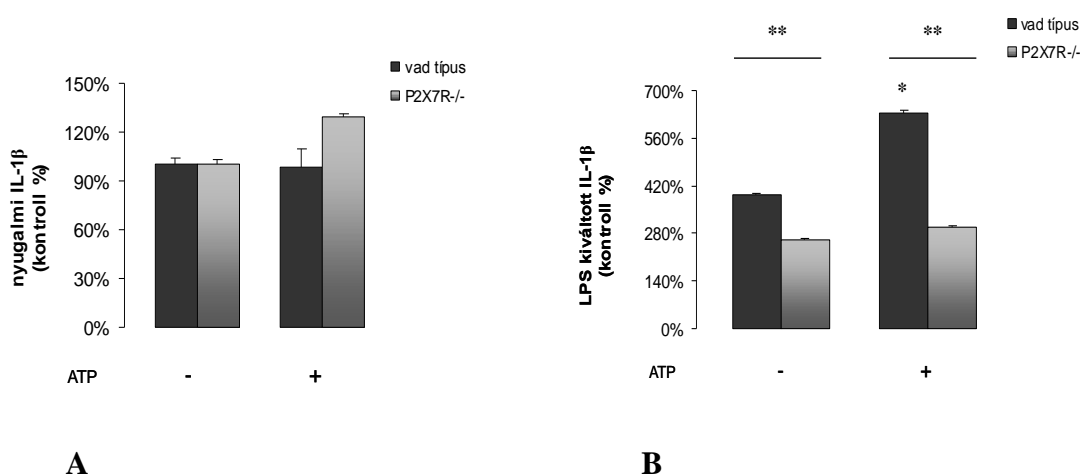
illetve altípusra szelektív koncentráció tartománynak megfelelő in vivo dózisban adtuk (Gourine és mtsai 2005, Griffiths és mtsai 1995). Kétféle protokoll szerint injektáltuk intraperitoneálisan a vegyületeket, a BBG-t 30 perccel, az oATP-t 2 órával adtuk a só illetve LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) injekciót megelőzően. Amikor a só kezeléseket megelőzően adagoltuk az antagonistákat, a nyugalmi IL-1 β szintre gyakorolt saját hatásukra voltunk kíváncsiak. 6 órával a só, illetve LPS injekciót követően dekapitáltuk az állatokat. A kísérlet sorozatban az antagonisták mellett minden esetben párhuzamosan só és LPS kezeléseket is végeztünk, melyek a tesztelni kívánt vegyületek kontroll csoportjait képezték. Az IL-1 β termelést a pg/ml-ben kifejezett só oldattal kezelt kontroll kísérletek átlagának százalékában fejeztük ki, ahol a só kezeléseket átlag értékét vettük $100 \pm 3.67\%$ -nak a vad típusú egér esetén, míg $100 \pm 5.34\%$ -nak a P2rx7 $^{-/-}$ egér esetében. Mindkét P2X7 receptor antagonistája jelenléte szignifikánsan csökkentette a nyugalmi IL-1 β szintet a P2X7 receptort kifejező vad típusú egér hippocampusában (**24A ábra**). A BBG önmagában mintegy $\sim 39\%$ -os gátlást eredményezett a bazális citokin termelésben, míg az oATP valamivel kisebb mértékben csökkentette a nyugalmi IL-1 β szintet (**24A ábra**). Ezzel szemben, P2X7 receptorok hiányában kizárólag az oATP kezelés mellett tapasztaltunk szignifikáns csökkenést az alap IL-1 β tartalomban, a BBG esetében nem tapasztaltunk szignifikáns hatást (oATP $53.37 \pm 24.77\%$ - a só kezelés százalékában kifejezve vs. $100 \pm 5.34\%$, $n=8$, $p<0.05$; **24A ábra**). Vad típusú egerek esetében a BBG és oATP egyaránt képes volt felfüggeszteni az LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) által kiváltott szignifikáns, mintegy 290% -os növekedést (**24B ábra**). A P2X7 receptor génkiütött egér hippocampus esetében a BBG és oATP kimutatott gátló hatása a gyulladásos IL-1 β termelésére szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a vad típusú egerek esetében (**24B ábra**).



24. ábra. P2 purin receptor antagonisták hatása a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre P2rx7 $^{+/+}$ vad típusú és a P2rx7 $^{-/-}$ null mutáns egér hippocampuszban. (A) P2X7 receptor antagonistá BBG-t (100mg/kg) 30 perccel, míg a szelektív P2X7 receptor antagonistá oATP (0.9mg/kg) 2 órával adtuk az intraperitoneális só illetve az (B) LPS (250 μ g/kg) injekciót megelőzően. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból. A citokin szinteket reprezentáló adatokat a só kezelés százalékában kifejezett átlag \pm S.E.M. ábrázoltuk.

Az ismert P2 receptor agonisták közül az endogén ligand és nem szelektív P2 receptor agonista ATP (9 mg/kg), hatását vizsgáltuk. Az ATP-t 4 órával a só illetve LPS kezelést követően adagoltuk. 6 órával a kontroll nyugalmi és gyulladáscsökkentő kezeléseket követően

dekapitáltuk az állatokat. Az IL-1 β termelést itt is akárcsak az antagonisták esetében a pg/ml-ben kifejezett só oldattal kezelt kontroll kísérletek átlagának százalékában fejeztük ki, ahol a só kezelések átlag értékét vettük 100 \pm 4.4%-nak (vad típusú egér) illetve 100 \pm 12.9%-nak (P2rx7 $^{-/-}$ egér) vettük. Az ATP a nyugalmi IL-1 β szintre nem volt hatással sem a vad típusú egér, sem a P2rx7 génkiütött egér hippocampusz esetében (**25A ábra**). Ezzel szemben, a vad típusú egerek esetén, ATP jelenlétében a gyulladásoos stimulus által kiváltot IL-1 β termelésben további növekedést tapasztaltunk (**25B ábra**). Az ATP kiváltott serkentő hatás azonban teljesen hiányzott a P2X7 receptor hiányában (**25B ábra**).



25. ábra. ATP hatása a nyugalmi és a perifériás bakteriális endotoxin kiváltotta IL-1 β termelésre P2rx7 $^{+/+}$ vad típusú és a P2rx7 $^{-/-}$ null mutáns egér hippocampuszban. (A) ATP-t (9 mg/kg) 4 órával adtuk az intraperitoneális só illetve (B) LPS (250 μ g/kg) injekciót követően. Az IL-1 β koncentrációját szilárd fázisú enzim immunoassay-vel határoztuk meg felülúszó mintákból. A citokin szinteket reprezentáló adatokat a só kezelés százalékában kifejezett átlag \pm S.E.M. ábrázoltuk.

A P2X7 receptor aktivációt követő szubcelluláris jelátviteli események közül a patkány hippocampusz esetében már vizsgált p38 MAP kináz részvételén túlmenően egyéb lehetőségekkel is kell számolni. Így a réskapcsolat félcsatornák (Gap junction hemichannel) aktivációja, mely P2X7 receptor mediált folyamat, szintén hozzájárul az IL-1 β termelés szabályozásához, melyet a perifériás gyulladásoos citokinek vonatkozásában már igazoltak (Pelegrin és Suprenant 2007). A réskapcsolat félcsatornák aktiváció részvételét a nyugalmi és a szisztémás LPS kiváltotta IL-1 β termelődés szabályozásában, széles spektrumú inhibitora a carbenoxolone (CBX; 30

mg/kg) vizsgálatával vettük górcső alá. A CBX az alkalmazott koncentráció függvényében képes a pannexinek illetve connexinek által mediált eseményeket blokkolni, illetve alacsony dózisban a PanX1-függő gátlás esete áll fenn (Iglesias és mtsai 2008). Az általunk alkalmazott dózist Nolan és munkatársai publikálták 2007-ban (Nolan és mtsai 2007). CBX-t 30 perccel a só illetve LPS injekciót megelőzően adtuk i.p., majd 6 órával az LPS kezelés után dekapitáltuk az állatokat. A réskapcsolat félcsatornák blokkolása a nyugalmi és a szisztémásan indukált gyulladáshoz IL-1 β termelést egyaránt szignifikánsan csökkentette (CBX 5.01 \pm 0.60% a só kezelés százalékában kifejezve vs. só kezelés 100 \pm 3.62%, n=4, p<0.01; CBX+LPS 57.00 \pm 4.80% a só kezelés százalékában kifejezve vs. LPS kezelés 392.40 \pm 14.70%, n=4, p<0.01).

5.4. Microarray alapú génexpressziós analízis

5.4.1. Microarray alapú génexpressziós mérés

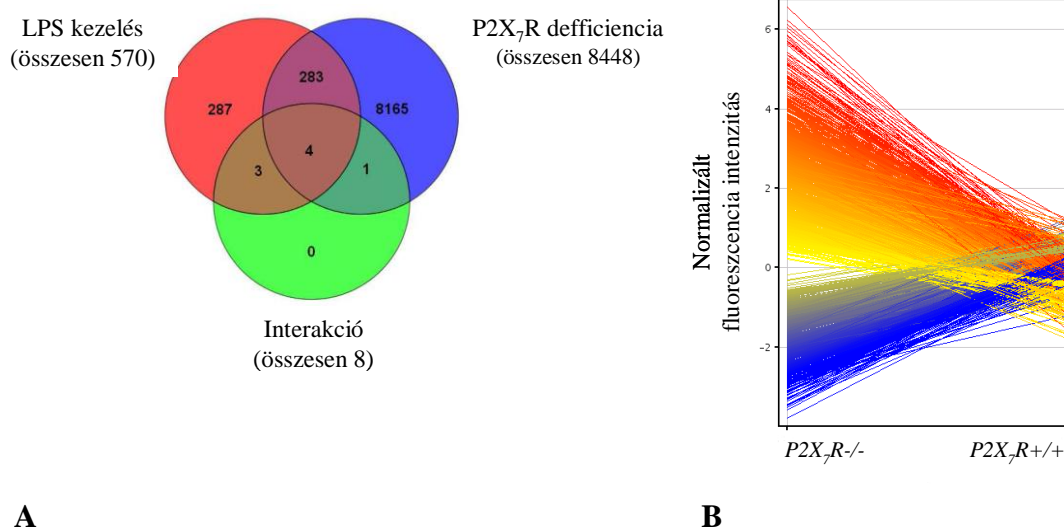
Saját kutatásaink és irodalmi adatok a neuroinflammációs betegségek mellett egy további lehetséges indikációs terület irányába fordították figyelmünket, ahol a P2X7 receptoron ható ligandok fejlesztése újszerű és ígéretes lehet – ez a depresszió. Kiderült ugyanis, hogy a P2X7 receptorok hiánya illetve farmakológiai gátlása gátolja a depresszió-szerű magatartást állatkísérletes modellekben és hangulatstabilizáló fenotípust eredményez (Basso és mtsai 2009, Boucher és mtsai 2011, Csölle és mtsai 2013). Munkánk harmadik szakaszában teljes genomra kiterjedő génexpressziós profilösszehasonlítást végeztünk, mely során számos olyan gént azonosítottunk, amely a P2X7 receptor szabályozó hatása alatt áll, és amelynek a hangulati életben is szerepe lehet. Ebben a munkaszakaszban génexpressziós microarray segítségével a bakteriális endotoxin (LPS kezelés) teljes egér genom expressziós mintázatára gyakorolt hatását vizsgáltuk P2rx7+/+ illetve P2rx7-/- egerekben, kiemelt figyelemmel kísérve a depresszióval kapcsolatba hozható géneket, illetve a P2X7 receptor által regulált eddig megismert funkciókban szereplő inter és intracelluláris komponenseket. Az általunk vizsgált agyi régió, az emocionális funkciókban fontos szerepet játszó amigdala volt. Kísérleteinkben az Agilent cég által kifejlesztett custom array-t használtuk, mely a génexpressziós array-ek között az egyik legnagyobb felbontású, mintegy 41041 transzkriptum analizésére alkalmasa egyetlen hibridizáció során. A kísérleteket 2-3 hónapos, CB57Bl/6J vad típusú (WT) és P2X7 receptor génkiütött, 20-22 g súlyú hím egereken végeztük. A kísérletsorozat kezdete előtt a kijelölt állatokat elkülönített ketrecekben környezetükhöz 1 hétig szoktattuk. A kísérlet napján az állatokat intraperitoneálisan oltottuk azonos végtérfogatú fiziológiás sóoldattal, illetve LPS-sel (250 µg/kg), majd az injekciózást követő 7. órában dekapitáltuk az egereket és jégen kiperaráltuk az amigdalákat. Mindkét egértörzs esetében 4-4 állat képezte a kontroll és az LPS kezelt csoportot.

Az ilyen jellegű génexpressziós microarray analízis esetén arra keressük a választ, hogy két összehasonlítandó mintában (például egy biológiai hatóanyag hatása, mint amilyen az LPS-é a kontrollhoz képest) mely gének kifejeződési mintázatában van

különbség, illetve ezek mennyiségileg hogyan viszonyulnak egymáshoz. Ezt nevezzük génexpressziós profilnak. A profilok összehasonlításával felismerhetők és azonosíthatók az adott hatásra (kezelésre, genotípusra) jellemző gének. Nyilvánvalóan, a különböző hatásokhoz különböző génkifejeződési mintázatok tartoznak. Például a sejtek különböző receptorain keresztül kiváltott jelátviteli útjainak génexpressziós mintázatát elemezve, azonosítani lehet ismert szignálok molekuláris következményeit mRNA-szinten. Mi a normalizált adatokat figyelembe véve azonosítottuk a szignifikánsan alul és felülreprezentált géneket. Az analízis első szakaszában, a két szempontos ANOVA analízist követően azt tapasztaltuk, hogy az amigdalában a génexpressziós profilra gyakorolt legnagyobb hatást a P2X7 receptorok közvetítik. A sókezelt P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek expressziós profiljának összevetésekor a vizsgált 41041 transzkriptum közül a kétfajta genotípusban összesen 8448 transzkriptum expressziójában tapasztaltunk legalább kétszeres, szignifikáns változást, ezek közül 3133 felregulálódott, míg 5315 gén alulregulálódott (**26. ábra**). Az ilyen nagyszámú génváltozás még génkiütött állatok expressziós profilja tekintetében is mindenképpen meglepő eredmény, ami P2X7 receptor széleskörű regulációs szerepére utal, mivel a fals pozitív és fals negatív eredmény a megfelelő pozitív és negatív kontrollok beiktatása miatt kevésbé valószínű. Mivel ilyen nagyszámú gén egyenkénti azonosítása még jelentős további időt vett volna igénybe, első megközelítésben azt az 588 gént azonosítottuk, amelyek a legnagyobb változást mutatták a kétfajta genotípus között (A Felhasznált anyagok és módszerek fejezet 4.3.5.4 alfejeztében leírtaknak megfelelően ezt a génlistát a disszertáció témájában megjelent saját közlemények közül a Csölle és mtsai 2013-as cikk függelékeként feltüntetett táblázat jeleníti meg, mely a cikk Supplementary Table S2a részeként került megjelenésre) A későbbi génontológiai elemzést is ezen a génlistán hajtottuk végre.

Az egér amigdala génexpressziós profiljára a P2X7 receptor deficiencia mellett az endotoxin kezelés is jelentős hatást gyakorolt. Az i.p. LPS kezelés hatására P2rx7 +/+ egereken összesen 570 gén expressziójának intenzitása változott meg legalább kétszeresére (**26A ábra**) a statisztikailag szignifikáns 0.05 szignifikancia küszöböt is figyelembe véve. Ezek közül mintegy 287 transzkriptum regulációjában tapasztalt változás kizárólag az endotoxin kezelés expressziós profilra gyakorolt hatásával hozható összefüggésbe (**26A ábra**). A felülregulálódó gének közül kiemelhetőek a szignál

transzdukciós folyamatban résztvevő fehérjét kódoló gének, mint pl. a foszfatidil-inozitol foszfát kináz II (PIIp4k2b) vagy a Creb313, receptorokat kódoló gének, mint a Gpr182, vagy az interleukin 4 receptor alfa (Il4ra), míg az alulregulálódó gének közül hőshock proteinek (pl. Hspb3) illetve immun modulációban résztvevő gének (pl. Nfatc1) emelhetőek ki.

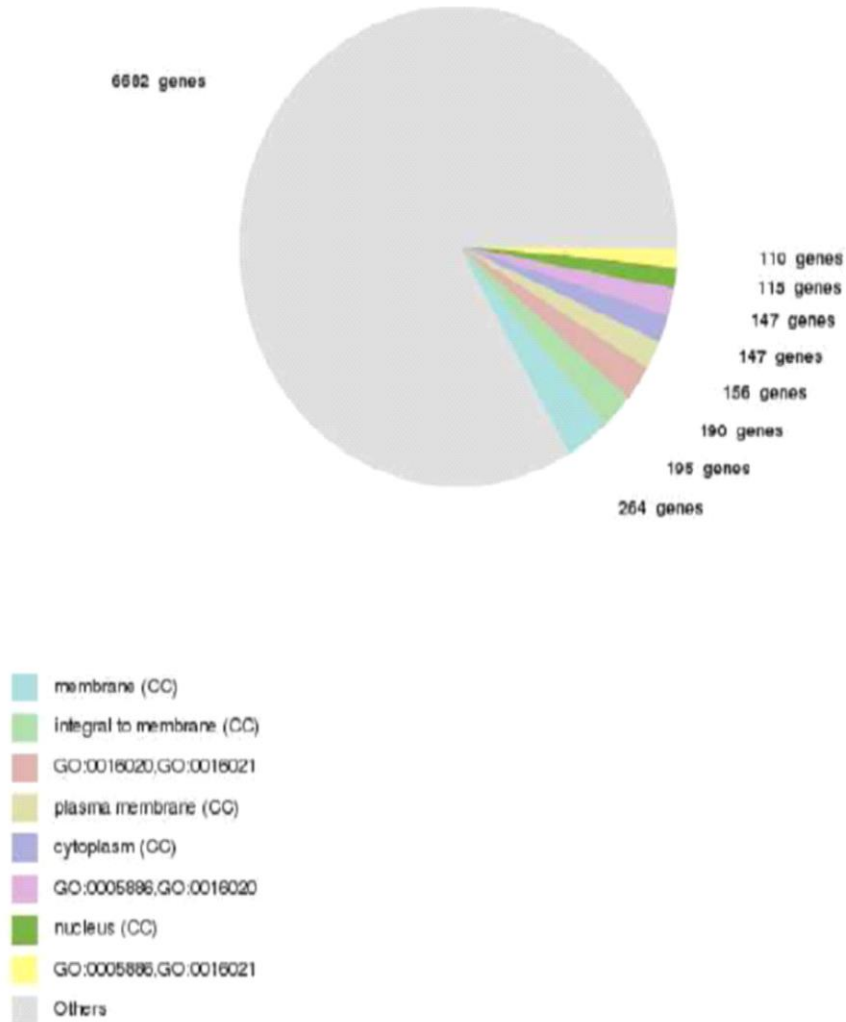


26. ábra A microarray génexpressziós analízis eredményeinek összefoglalása (A) A microarray adatokon elvégzett kétszemponos ANOVA analízis (Benjamin-Hochberg korrekciót alkalmazva és a 0.05 alatti p értéket szignifikánsnak elfogadva) során kapott legalább kétszeres fold change (FC) expressziós változást mutató transzkriptumok megoszlása a három fő hatás (genotípus, LPS kezelés, interakció) függvényében. A Venn diagram részalmazában feltüntetett számok a szignifikánsan változó transzkriptumok számát jelölik. **(B)** A P2X₇ receptor deficiencia gyakorolta a génexpressziós profilra a legnagyobb hatást: 8448 transzkriptum expressziója változott szignifikáns mértékben. Ezek közül, 3133 transzkriptum expressziós intenzitása növekedést (vörös), míg 5315 transzkriptum csökkenést (kék) mutatott a kontrollnak tekintett vad típusú mintákhoz képest A szintónus a transzkriptumok expressziójának mértékét szimbolizálja, a skála log₂ alapú.

5.4.2. Gene Ontology elemzés

Az analízis második szakaszában a microarray adatértékelés során kapott eredmények alapján a legnagyobb expressziós változást mutató géneket tartalmazó listán géntonológiai elemzést hajtottunk végre. Az elemzés célja az volt, hogy statisztikailag szignifikánsan ($p < 0.01$) felülreprezentált géncsaládokat találjunk az egyes kísérleti csoportokban. A gének besorolása a biológiai funkciójuk (GO Biological Process (BP)) alapján történt, bár meg kell említeni, hogy bizonyos géntermékek több funkcionális csoportba is besorolhatók. Az alkalmazott gén ontológiai adatbázis az NCBI GenBank volt, *Mus Musculus* referencia lista alapján. Az egyes annotációs géncsaládokhoz kapcsolódó gének listáját a Felhasznált anyagok és módszerek fejezet 4.3.5.4 fejeztében leírtaknak megfelelően szintén a disszertáció témájában megjelent saját közlemények közül a Csölle és mtsai 2013-as cikk függelékeként feltüntetett táblázata foglalja össze mely a cikk Supplementary Table S2b-c részeként került megjelenésre. A P2X7 receptor génkiütött csoportban tapasztalt, legfigyelemreméltóbb mértékben feldúsult 373 géncsaládról a 27. ábra mutat összefoglalót, míg a fent említett Supplementary Table S2b-c nevű táblázat tartalmazza a bővebb tájékoztatást. A biológiai funkciók elemzése során a legtöbb különbséget amint, az, várható volt, a szinaptikus transzmisszióval, iontranszporttal, jelátviteli hálózattal kapcsolatos gének között találtunk. A G-fehérje kapcsolt receptor jelátviteli útvonal, ATP szintézis kapcsolt proton transzport, transzkripció szabályozás és GABA jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó géncsaládok elemei szintén nagymértékben indukálódtak a P2X7 receptorok hiányában (l. a Felhasznált anyagok és módszerek fejezet 4.3.5.4 fejeztében leírtaknak megfelelően e disszertáció témájában megjelent saját közlemények közül a Csölle és mtsai 2013-as cikk függelékeként feltüntetett táblázatát, mely a cikk Supplementary Table S2b-c részeként került megjelenésre).

Number of genes per concurrent annotations



27. ábra GO analízis eredménye Az általunk alkalmazott ontológia a gének biológiai funkciója volt. A kördiagram a P2X7 receptor génkiütött egércsoportban a legjelentősebb statisztikailag szignifikánsan ($p < .001$) felülreprezentált géncsaládokat ábrázolja.

Ezenkívül, célzott kereséssel érdemes volt a szignifikánsan megváltozott génállományban azokat a géneket is feltérképezni, amelyek mai tudásunk szerint összefüggnek a depresszióval. Így egyrészt megvizsgáltuk a depresszióban és társbetegségiben polimorfizmust mutató géneket (l. Harvey és mtsai 2007), másrészt egyéb a központi idegrendszeri ingerületátvitellel, illetve a depresszió mai

hipotéziseivel (neuroplaszticitással) kapcsolatba hozható géneket. A kiértékelés harmadik szakasza a következő eredményeket adta: a P2X7 génkiütés esetében szignifikánsan alulregulálódó gének között több gap junction fehérjét kódoló gén (Gja1, Gjb6, Gjc1, Gjd2). Kiemelhető emellett még a a neutrofin receptor családba sorolható glial cell lin derived neurotrphic factor family receptor alpha 1-et (Gfra1) kódoló gén, a neuropeptid Y receptort kódoló gén (Npyr5) és a ryanodin receptort kódoló gén (RrY3) is amelyek szintén alulregulációt mutattak. Számos egyéb, a depresszióval korábbi irodalmi adatok alapján összefüggésbe hozható gén ugyanakkor nem változott szignifikánsan a P2X7 receptor génkiütött állatokban, ezek közé tartoznak egyéb, a monoamin transzmisszióval kapcsolatos gének (MAO, COMT, SERT stb.), transzkripciós faktorok (pl. CREB) intracelluláris jelátvivő proteinek (p38MAPK, CAMKII, NFAT stb), citokinek és gyulladásoos mediátorok (IL-1 β , IL-6, IFN γ és NOS2 stb.).

5.4.3. Kiválasztott gének expressziójának validációja TaqMan real-time PCR módszerrel

Az expressziós microarray technika egyik problémája, hogy szemikvantitatív. A microarray-re rögzített target szekvenciák megválasztása, és a hibridizáció körülményei egyaránt befolyásolják azt, hogy az adott microarray rendszerrel milyen pontossággal lehet egy adott génexpressziós változást detektálni. A fenti okok miatt, annak megerősítésére, hogy a chipen kapott jelintenzitás valóban korrelál-e a gén expressziós szintjével, független vizsgálati módszert kell alkalmaznunk. A leginkább elfogadott megerősítő módszer a microarray vizsgálat során alul-, illetve túlexpresszálnak mutatózó kiválasztott gének real-time PCR-es vizsgálata. Microarray eredményeinket 8-8 vad típusú és P2X7 receptor génkiütött egér amigdala mintán TaqMan alapú real-time PCR módszerrel, TaqMan Low Density Array más néven Mikrofolydék Kártyarendszer alkalmazásával ellenőriztük (Applied Biosystems). Kísérleteink során egyaránt felhasználtuk a microarray analízis során is vizsgált mRNS mintákat, valamint attól független új kísérlet sorozatból nyert amigdala mRNS mintákat is. Célunk volt, hogy ne csak a microarray eredmények megbízhatóságát ellenőrizzük, hanem egyúttal a

kísérlet/kezelés reprodukálhatóságát is megerősítsük. Kísérleteinket 79 válaszott gént tartalmazó TLDA-n végeztük el, amely a 18S rRNS Gapdh, Hprt, B2m háztartási kontroll géneket is tartalmazta. A kiértékelés során a depresszió szempontjából releváns és legnagyobb változást mutató transzkriptumok közül, melyek kizárólag a P2X7 receptor génkiütés hatására mutattak szignifikáns legalább kétszeres fold change változást, 62 gén expressziójának változását mértük (4A és 4B táblázat). 17 további gén arról a génlistánról került kiválasztásra, amely kizárólag az LPS kezelés hatására mutatott expresszió növekedést (5. táblázat) és a gyulladásos és immunválaszhoz kapcsolódott. Amint a **4. táblázatból** kitűnik, 29 gén mRNS-e esetében a mért génexpressziós változások a microarray adatokhoz hasonló irányultságúnak adódtak, amely mintegy 47%-os validálási hatékonyságot jelentett. Ezek között a gének között 25 gén esetében erősítettük meg a P2X7 receptor hiánnyal összefüggésbe hozható expressziócsökkenést, melyek közé sorolhatóak a GABA_A receptor alegysegeket (Gabbr2, Gabrb3, Gabrg2, Gabrg3), az ionotróp glutamát receptorokat (AMPA2, AMPA4), metabotróp glutamát receptort (Grm7), az α 2 adrenerg receptor (Adra2a), a CB1 kannabinoid receptort (Cnr1), a D2 dopamin receptort (Drd2), dopa decarboxylázt (Ddc), és a glicin receptor alegysegeket (Gla2, Glrb) kódoló géneket. (**4A táblázat**). A P2X7 receptor hiányában felülexpresszált 29 gén közül azonban csak 4 gén esetében tudtuk megerősíteni a microarray eredményeket (NMDA2B ionotróp glutamát receptort (Grin2b), corticotrophin releasing hormone 2 receptort (Crhr2), bradykinin receptor (Bdkrb1), neurexin II (Nrxn2) (**4B táblázat**).

4. táblázat A P2X7 receptor génkiütés hatására szignifikánsan regulálódó 62 gén microarray és a TLDA analízis eredményeinek összehasonlítása, 4A táblázat a felülexpresszált géneket, míg a 4B táblázat az alulexpresszált géneket foglalja össze. A gén szimbólum mellett a GenBank azonosító és a TaqMan primerek esetében a gyártói inventorié azonosító van feltüntetve.

Table 1A					
Symbol	GeneID	Gene name and Accession number	Agilent (FC)	Real-time PCR (RQ)	TaqManID
Adra2a	11551	adrenergic receptor, alpha 2a [NM_007417]	2.72	1.34±0.38 p=0.0171	Mm00845383_s1
Adrb1	11554	adrenergic receptor, beta 1 [NM_007419]	4.77		Mm00431701_s1
Ak5	229949	adenylate kinase 5 [NM_001081277]	5.71		Mm00461978_m1
Aplp2	11804	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 [NM_009691]	5.55		Mm00507819_m1
Bdnf	12064	brain derived neurotrophic factor isoform 1 [NM_007540]	3.89		Mm01334047_m1
Casp8	12370	caspase 8 [NM_009812]	9.57		Mm00802247_m1
Chkb	12651	choline kinase beta [NM_007692]	4.160		Mm00432498_m1
Cnr1	12801	cannabinoid receptor 1 [NM_007726]	2.081	1.31±0.28 p=0.0087	Mm01212171_s1
Ddc	13195	dopa decarboxylase [NM_016672]	2.051	1.58±0.84 p=0.0249	Mm00516688_m1
Drd2	13489	dopamine receptor 2 [NM_010077]	2.37	2.44±0.47 p=0.0120	Mm00438545_m1
Gabarapl1	57436	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1 [NM_020590]	4.47		Mm00457880_m1
Gabra1	14394	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 1 [NM_010250]	4.130		Mm00439046_m1
Gabra5	110886	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 5 [NM_176942]	7.79		Mm00621092_m1
Gabrb2	14401	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 2 [NM_008070]	2.141	2.51±1.12 p=0.0036	Mm00549788_s1
Gabrb3	14402	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 3 [NM_008071]	2.041	1.34±0.55 p<0.0005	Mm00433473_m1
Gabrg1	14405	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit gamma 1 [NM_010252]	2.55	2.04±0.89 p=0.0012	Mm00439047_m1
Gabrg2	14406	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit gamma 2 [NM_008073]	2.43	1.33±0.42 p=0.0241	Mm00433489_m1
Gad1	14415	glutamic acid decarboxylase 1 [NM_008077]	2.171	1.10±0.06 p=0.0009	Mm00725661_s1
Gfra1	14585	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1	2.231	1.82±0.54 p=0.0308	Mm00833897_m1
Gja1	14609	gap junction protein, alpha 1 [NM_010288]	4.097		Mm00621092_m1

Gjb6	14623	gap junction protein, beta 6 [NM_001010937]	4.48	1.40±0.28	p<0.0016	Mm00433661_s1
Gjc1	14615	gap junction protein, gamma 1 [NM_008122]	2.161	1.24±0.11	p=0.0050	Mm01253027_m1
Gjd2	14617	gap junction protein, delta 2 [NM_010290]	4.61			Mm00439121_m1
Gje1	76743	gap junction membrane channel protein epsilon 1 [NM_080450]	2.00	1.49±0.18	p=0.0022	Mm00519120_s1
Glr2	237213	glycine receptor, alpha 2 subunit [NM_183427]	2.34	1.30±0.25	p=0.0157	Mm00439140_m1
Glr3	14658	glycine receptor, beta subunit [NM_010298]	5.089	1.16±0.25	p=0.0018	Mm00439140_m1
Gria2	14800	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2) [NM_013540]	2.59	1.13±0.05	p<0.0002	Mm00442822_m1
Gria4	14802	glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4), transcript variant 1	2.74	1.41±0.66	p=0.0014	Mm00444754_m1
Grm7	108073	glutamate receptor, metabotropic 7 [NM_177328]	35.81	1.07±0.16	p=0.0317	Mm01189424_m1
Gstm4	14865	glutathione S-transferase, mu 4 [NM_026764]	3.34			Mm00728197_s1
Klhl12	240756	kelch-like 12 (Drosophila)	6.98	1.19±0.31	p=0.0074	Mm00462323_m1
Narg1l	66897	NMDA receptor regulated 1-like [NM_025832]	6.98	1.77±0.21	p=0.0032	Mm00462323_m1
Ncam1	17967	neural cell adhesion molecule 1 [NM_010875]	3.310			Mm00456815_m1
Npy5r	18168	neuropeptide Y receptor Y5 [NM_016708]	6.68			Mm02620267_s1
P2ry1	18441	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1 [NM_008772]	3.89	1.47±0.73	p=0.0467	Mm00435471_m1
Pcdh10	18526	protocadherin 10 [NM_001098171]	14.93			Mm00477987_s1
Pcmt1	18537	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1 [NM_008786]	2.251	1.23±0.28	p=0.0073	Mm00476600_m1
Pde1a	18573	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent [NM_016744]	2.191	1.24±0.74	p=0.0123	Mm00450244_m1
Plp1	18823	proteolipid protein (myelin) 1 [NM_011123]	9.031	1.51±0.18	p=0.0033	Mm00456892_m1
Ryr3	20192	ryanodine receptor 3 [BC116740]	2.80	1.79±0.22	p<0.0002	Mm01335482_m1

Table 1B					
Symbol	GeneID	Gene name and Accession number	Agilent (FC)	Real-time PCR (RQ)	TaqManID
Adcy8	11514	adenylate cyclase [NM_009623]	17.56		Mm00507722_m1
Adrbk1	110355	adrenergic receptor kinase, beta 1 [NM_130863]	5.55		Mm00804778_m1
Adrbk2	320129	adrenergic receptor kinase, beta 2 [NM_177078]	4.38		Mm00622037_m1
Aloxe3	23801	arachidonate lipoxygenase 3 ([NM_011786]	5.121		Mm00478628_m1
Anxa7	11750	annexin A7 [NM_009674]	3.94		Mm00477549_m1
Avp	11998	arginine vasopressin [NM_009732]	57.00		Mm00437761_g1
Bai1	107831	brain-specific angiogenesis inhibitor 1 [NM_174991]	2.52		Mm00558144_m1
Bdkrb1	12061	bradykinin receptor, beta 1 [NM_007539]	27.79	1.60±0.43 p=0.0498	Mm00432059_s1
Crhr2	12922	corticotropin releasing hormone receptor 2 [NM_009953]	5.110	5.89±0.43 p=0.0040	Mm00438303_m1
Drd4	13491	dopamine receptor 4 [NM_007878]	4.580		Mm00432893_m1
Gabrd	14403	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit delta [NM_008072]	2.72		Mm00433476_m1
Gabbr1	14408	gamma-aminobutyric acid (GABA-C) receptor, subunit rho 1 (NM_008075]	4.123		Mm00433499_m1
Gcat	26912	glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate-coenzyme A ligase) [NM_013847]	25.45		Mm00496962_m1
Glul	14645	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase) [NM_008131]	4.56		Mm00725701_s1
Grik1	14805	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 [NM_010348]	12.130		Mm00446882_m1
Grik5	14809	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2) [NM_008168]	9.95		Mm00433774_m1
Grin2b	14812	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2) [NM_008171]	2.77	1.10±0.13 p=0.0062	Mm00433820_m1
Grin2d	14814	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4) [NM_008172]	7.168		Mm00433822_m1
Grm1	14816	glutamate receptor, metabotropic 1 [NM_016976]	33.64		Mm00810231_s1
Grm5	108071	glutamate receptor, metabotropic 5 [NM_001081414]	6.110		Mm00690332_m1
Nrxn2	18190	neurexin II [NM_020253]	7.131	1.28±0.18 p=0.0328	Mm01236851_m1
P2rx2	231602	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2 [NM_153400]	11.180		Mm00462952_m1

Kizárólag a szisztémás endotoxin kezelésre szignifikáns expresszió növekedést mutató gének TLDA analízise valamennyi gén esetében sikeresen megerősítette a microarray kísérlet eredményeit (5. táblázat).

5. táblázat Az intraperitoneális LPS (250 µg/kg) kezelés hatására szignifikáns növekedést mutató 17 gén microarray és a TLDA analízis eredményeinek összehasonlítása. A gén szimbólum mellett a GenBank azonosító és a TaqMan primerek esetében a gyártói inventoriált azonosító van feltüntetve

Table 2						
Symbol	GeneID	Gene name Accession number	Agilent (FC)	Real-time PCR (RQ)		TaqManID
Ifit1	15957	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 [NM_008331]	>1000	25.77	p<0.0001	Mm00515153_m1
Casp4	12363	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase [NM_007609]	>1000	19.24	p=0.0007	Mm00432307_m1
Ccl5	20340	chemokine (C-C motif) ligand 5 [NM_013653]	>1000	745.12	p=0.0002	Mm01302428_m1
Ccl9	20308	chemokine (C-C motif) ligand 9 [NM_011338]	>1000	20.22	p=0.0001	Mm00441260_m1
Cxcl10	15945	chemokine (C-X-C motif) ligand 10 [NM_021274]	>1000	518.39	p=0.0002	Mm99999072_m1
Cxcl16	66102	chemokine (C-X-C motif) ligand 16 [NM_023158]	55.71	7.94	p=0.0007	Mm00469712_m1
Gbp2	14469	guanylate nucleotide binding protein 2 [NM_010260]	>1000	68.13	p=0.0001	Mm00494575_m1
Gpr65	14744	G-protein coupled receptor 65 [NM_008152]	>1000	10.44	p=0.0021	Mm02619732_s1
Igtp	16145	interferon gamma induced GTPase [NM_018738]	>1000	10.43	p=0.0002	Mm00497611_m1
Iigp1	60440	interferon inducible GTPase 1 [NM_021792]	>1000	46.86	p=0.0001	Mm00649928_s1
Il1rn	16181	interleukin 1 receptor antagonist [NM_001039701]	>1000	>1000	p=0.0001	Mm01337566_m1
Il4ra	16190	interleukin 4 receptor, alpha [NM_001008700]	23.58	6.81	p<0.0001	Mm00439634_m1
Irgm	15944	immunity-related GTPase family [NM_008326]	>1000	21.93	p=0.0024	Mm00492596_m1
Isg20	57444	interferon-stimulated protein [NM_020583]	>1000	12.29	p=0.0001	Mm00469585_m1
Mpa2l	100702	macrophage activation 2 like [NM_194336]	>1000	61.41	p=0.0001	Mm00843395_m1
Saa1	20208	serum amyloid A 1 [NM_009117]	>1000	34.91	p=0.0026	Mm00656927_g1
Tlr2	24088	toll-like receptor 2 [NM_011905]	>1000	36.57	p=0.0004	Mm00442346_m1

6. Megbeszélés

Vizsgálatainkban a centrális P2 receptorok szerepét kutatócsoportunkban hagyományosnak tekinthető neurokémiai (neurotranszmitterfelszabadulás mérés) és újonnan beállított molekuláris biológiai (IL-1 β fehérje mérés, real-time PCR, teljes genom microarray analízis) módszerekkel vizsgáltuk. Eredményeink a P2 receptorok sokrétű részvételét igazolták neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában, a gyulladáshoz vezető citokinek termelésében és a génexpresszió szabályozásában, fiziológiai körülmények között illetve kóros stimulusok (ischemia-szerű állapot, gyulladáshoz vezető endotoxin) hatására.

6.1. A hippokampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése

A disszertáció első részében az eddig még kevésbé ismert preszinaptikus gátló purinerg szabályozást vizsgáltuk a hippokampális noradrenalin felszabadulásban. Körülbelül 100 milliárd neuron található az emberi agyban, amelyeknek csak 0,0005%-ára, azaz 500000-re becsülik azokat, amelyek katekolaminokat használnak neurotranszmitterként. Annak ellenére, hogy a monoaminerg sejtek száma meglehetősen alacsony, ezek a sejtek jelentős hatást fejtenek ki a központi idegrendszer működésének szabályozásában. A noradrenalin (NA) fontos szerepet játszik az alvási-ébrenléti, figyelmi, tanulási és memória folyamatokban. A noradrenerg rendszer a célpontja sok, a depresszió, fájdalom, hipertenzió és egyéb betegségek kezelésére használt gyógyszerek, emiatt a központi idegrendszeri noradrenalin felszabadulás pontos mechanizmusának megismerése illetve a szabályozásban szerepet játszó modulációs pontok feltárása alapvető jelentőségű.

Elsőként azt teszteltük, hogy kísérleti modellünk alkalmas-e a neuronális [3 H]NA felszabadulás tanulmányozására. Mivel az egymást követő két, alacsony frekvenciájú elektromos téringerlés által kiváltott [3 H]NA kiáramlás hasonló mértékűnek adódott, továbbá az nagymértékben TTX- függő is volt ezen idegi aktivitás alatt, elmondható, hogy a [3 H]NA felszabadulás döntő hányada neuronális eredetű, és akciós potenciál-függő. A noradrenerg végkészülékben a noradrenalin főként

vezikulákban tárolódik. A vezikulákat morfológiailag két csoportra lehet bontani: kis (50nm) és nagy (>75nm) átmérőjű elektrodenz vezikulákra, melyek tartalmukat tekintve is eltérnek egymástól. A nagy vezikulák noradrenalin mellett tartalmaznak dopamin- β -hidroxilázt, reverzibilisen kötött formában ATP-t, secretogranin-II-t, chromogranin A és B nevű fehérjéket, illetve neuropeptid Y-t és enkefalinokat. A chromograninok az ATP-vel és a noradrenalinnal komplexet képezve a raktározást segítik elő, a secretograninnak az exocitózisban van szerepe. A kis elektrodenz vezikulákban secretogranin, chromograninok és neuropeptidok nincsenek jelen. Specifikusan jellemző viszont a synaptophysin, mely a kis vezikulák exocitózisában játszik szerepet. A kis vezikula nem tartalmaz dopamin- β -hidroxiláz enzimet sem, tehát az ilyen típusú vezikulák noradrenalin-tartalmát kizárólag az újrafelvétel biztosítja. A noradrenerg végkészülékekben a vezikulák mellett a plazmában is vannak könnyen felszabadítható noradrenalin raktárak, ezeknek a raktáraknak sokkal gyorsabb az anyagcseréjük, (az itt tárolódó noradrenalin féleletideje kb. 2 óra, míg a vezikuláris noradrenaliné 24 óra). A raktározott noradrenalinból valamennyi mindig kiáramlik a koncentrációgrádiensnek megfelelően a vezikulákból a citoplazmába, illetve a citoplazmából az extracelluláris térbe, de mind a vezikulák, mind, pedig a végkészülékek membránjában nagyon aktív felvevő (reuptake) apparátus működik, mely a kiáramló noradrenalint felveszi. A kísérletben ezt a reuptake mechanizmust használtuk fel a [3 H]NA sejtekbe juttatására. A Dale által ajánlott neurotranszmitter kritériumok egyike, hogy az idegvégződésben raktározott anyag fiziológiás ideg ingerlésre felszabadul az extracelluláris térbe. Ennek klasszikus formája az ideg ingerléssel belépő Ca^{2+} ionok által kiváltott vezikuláris exocitózis. Kísérleteinkben 1 mM EGTA-val kiegészített Ca^{2+} mentes oldat perfúziója csaknem teljesen gátolta az elektromos ingerlés által kiváltott [3 H]NA felszabadulást. A [3 H]NA kiáramlás döntő hányada tehát a konvencionális neurotranszmitterfelszabadulásra jellemző módon történik idegi aktivitás alatt. Fontos megjegyeznünk, hogy ahhoz, hogy az ATP, noradrenalin és chromogranin képezte hármas komplex hatékonyan a vezikulákban megtartsa a noradrenalint, folyamatos 4:1 arányú noradrenalin: ATP tartalom szükséges. Könnyen belátható, hogy nem csak a Ca^{2+} függő transzmitterfelszabadulás energia igényes folyamat (Milusheva és mtsai 1992), hanem magának a neurotranszmitter vezikuláris raktározása is (Erecinska és Silver 1996), mely folyamat ebből kifolyólag rendkívül érzékeny az intracelluláris ATP

koncentráció változására. Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy ATP hatására felszabaduló [³H]NA független az extracelluláris Ca²⁺ koncentrációtól, ami arra utal, hogy a noradrenalin ilyen körülmények között nem vezikuláris, hanem citoplazmikus raktárakból szabadul fel (Papp és mtsai 2004a).

Az ismert tény, hogy több neurotranszmitter felszabadulása kettős purinerg szabályozás alatt áll. P2-receptorok lokalizációja alapján megkülönböztetünk szomatodendritikus elhelyezkedésű (posztzinaptikus), és axonterminálisokon elhelyezkedő (preszinaptikus) receptorokat. Míg a posztzinaptikus P2-receptorok általában serkentők, addig a preszinaptikus P2-receptorok közül az eddigi kutatások alapján a P2X-receptorok serkentő (Hussl és Boehm, 2006, Sperlagh és mtsai 2007b), a P2Y-receptorok pedig gátló hatást közvetítenek. A P2Y receptorcsaládnak szintén számos tagját azonosították molekulárisan, ezek közül jelenleg a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ és P2Y₁₃, P2Y₁₄ receptorok felelnek meg a funkcionális receptor kritériumainak (Abbracchio és mtsai 2003, Burnstock 2006a-b). Kutatócsoportunk korábban már kimutatta a P2Y₁ receptorok fehérjéit kódoló génről átíródó mRNS jelenlétét a katekolaminerg neuronpopuláció sejtestestjeit tartalmazó agytörzsből (nem volt jelen a kódoló mRNS a P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ receptor alegységek esetében (Papp és mtsai 2004a). Mivel jelenlegi ismereteink szerint a P2Y₁₁ receptor rágszálókban nem fejeződik ki (Abbracchio és mtsai 2003), a jelen munkában a még két nem ismert P2Y receptor (P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor) mRNS expresszióját vizsgáltuk és mutattuk ki a hippokampusz noredrenerg innervációját adó patkány agytörzsben. A noredrenerg idegvégződéses változatos preszinaptikus auto- és heteroreceptorokkal rendelkeznek. A perifériás idegrendszer szimpatikus noredrenerg idegvégződéseiben a negatív visszacsatolásban szerepet játszó, gátló hatású α₂-adrenerg, A₁-(adenozin)-receptor mellett az ATP preszinaptikus ionotróp P2X-receptorokon keresztül, serkenti a noradrenalin felszabadulást. Így pl. a tengerimalac jobb szívpitvarban végzett kísérletben az ATP P2X₃- és/vagy P2X₂/P2X₃- receptorok közvetítésével a patkány vas deferens-ben P2X₁-, P2X₃- vagy P2X_{2/3}-receptorokon keresztül, növelte a noradrenalin felszabadulást (Queiroz és mtsai 2003). A központi idegrendszerben a noradrenalin felszabadulás az eddigi eredmények alapján mind pre-, mind pedig posztzinaptikus purinerg moduláció alatt áll. Patkány locus coeruleusában a neuronok sejtestestjein ATP érzékeny, serkentő hatású P2X- és P2Y-receptorokat azonosítottak (posztzinaptikus

moduláció), melyek aktivációja növelte a spontán akciós potenciálok kialakulását (Frohlich és mtsai 1996). A kortikális noradrenerg idegvégződések jelentős részében bizonyították gátló hatású A₁-(adenozin) receptorok (Jonzon és Fredholm, 1984), illetve szintén gátló hatást közvetítő P2Y-receptorok (Koch és mtsai 1997) létezését, melyek negatív visszacsatolással gátolják a noradrenalin felszabadulást (preszinaptikus moduláció). A hippokampuszba futó noradrenerg rostokból felszabaduló NA esetében a preszinaptikus, pozitív irányú modulációban a homomer P2X1- vagy homomer P2X3-receptorok vesznek részt (Papp és mtsai 2004a). Ugyanakkor a hippokampusz esetében gátló P2Y receptor mediált modulációt eddig még nem mutattak ki, így ebben a munkában egy ilyen gátló preszinaptikus moduláció vizsgálatára tettünk kísérletet. A hatásközvetítő receptor(ok) azonosításában három szempontot vettünk figyelembe: 1. Az RT-PCR analízis eredményét; 2. az agonista hatáserősséget; 3. az antagonistá profilt.

Korábbi megfigyelések szerint az elektromos téringerlés által kiváltott noradrenalin felszabadulást gátolja az ATP és egyéb P2 receptor agonisták (von Kugelgen és mtsai 1993, von Kugelgen és mtsai 1994, Koch és mtsai 1997). Mi a következő agonisták hatását vizsgáltuk: a nem szelektív P2 receptor agonista ATP és ADP, a szelektív P2Y receptor agonista 2MeSADP és a szelektív P2Y₁ receptor agonista MRS2365. Ez utóbbi olyan 2-MeSADP analóg vegyület, amely magasabb P2Y₁ receptor szelektivitása miatt kevésbé kötődik a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptorokhoz (Chhatriwala és mtsai 2004). Mindegyik P2 receptor agonista koncentráció-függő módon csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [³H]NA felszabadulást a hippokampusz szeletekből, és közülük leghatékonyabb az MRS2365 volt, míg az ADP, majd a 2MeSADP kevésbé hatékony, az ATP pedig igen gyenge agonistának bizonyult. Irodalmi adatok alapján az ismert agonista hatáserősségi sorrend a P2Y₁ receptor esetében MRS2365 > 2-MeSADP = 2Me-SATP > ADP (Tokuyama és mtsai 1995, Chhatriwala és mtsai 2004, Jacobson és mtsai 2006), a P2Y₁₂ receptornál a 2-MeSADP >> ADP > ATP (Hollopeter és mtsai 2001, Simon és mtsai 2002) míg a P2Y₁₃ receptornál ADP > 2-MeSADP >> ATP (Fumagalli és mtsai 2004). Így tehát kísérleteinkben az elektromos téringerlés által kiváltott [³H]NA felszabadulás gátlásáért felelős receptor agonista profilja a P2Y₁ és a P2Y₁₃ receptor farmakológiai fenotípusával esik egybe. Kísérleteinket ezen altípusok farmakológiai azonosításának irányában folytattuk: az ATP által közvetített gátló hatást megvizsgáltuk különböző

antagonisták jelenlétében. Sajnos a legtöbb P2X-receptor altípusra nem létezik szelektív antagonisták, az antagonistaként használt vegyületek két-három receptoraltípuson is gátló hatással rendelkeznek, ami jelentősen megnehezíti a résztvevő receptor azonosítását. Kísérleteiben az is jelentős problémát jelentett, hogy a különböző P2X-receptorok antagonisták érzékenységről rendelkezésre álló adatok általában rekombináns receptorokra vonatkoznak és a mérési eredmények többsége izolált receptoralegységeken, elektrofiziológiai mérésekből származik. Valamennyi vizsgált antagonisták, a nem szelektív P2 receptor antagonisták PPADS (30 μ M), a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor antagonisták 2MeSAMP (10 μ M) és a P2Y₁ receptor antagonisták MRS2179 (10 μ M) kivédte az ATP gátló hatását. Ezek közül az MRS2179 az alkalmazott koncentrációban P2Y₁ receptor szelektívnek tekinthető (von Kugelgen 2006), továbbá ismert, hogy a P2Y₁ receptor aktiváció blokkolja a neuronális N-típusú Ca²⁺ csatornák működését, mely a vezikuláris NA felszabadulás gátlásához vezet (Filippov és mtsai 2000). Míg a 2MeSAMP hasonló hatékonysággal antagonizálja a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptorokat, addig a nem szelektív P2 receptor antagonisták PPADS P2Y₁ és P2Y₁₃ receptor preferenciával bír (von Kugelgen 2006). Az elektromos téringerléssel által kiváltott [³H]NA felszabadulást gátló irányban moduláló receptorok farmakológiai profilja tehát a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok farmakológiai fenotípusával mutatott hasonlóságot. A P2Y₁₂ receptorok részvétele az ATP gátló hatásának közvetítésében kevésbé valószínű, de teljesen nem zárható ki. Ugyanakkor, egyéb receptor vagy akár nem receptorális hatás lehetősége is felmerül az ATP jelenlétében tapasztalt gátló hatás mögött. Az ATP ugyanis felszabadulását követően egy extracellulárisan jelenlevő enzimrendszer, az ektonukleotidázok segítségével rendkívül gyorsan inaktiválódik (Zimmermann és mtsai 1998). Az ektoATPáz enzim (vagy más néven ektoATP difoszfohidroláz) az ATP-ből, illetve az ADP-ből AMP-t hidrolizál a terminális foszfátcsoportok lehasításával, a végső termék pedig az új szignál molekula az adenozin. Az adenozin a központi idegrendszerben általános, gátló neuroprotektív modulátorként funkcionál és hatásának fontos összetevője, hogy preszinaptikusan gátolja a legtöbb transzmitter felszabadulását (Dunwiddie and Masino 2001). A hippocampusban az A₁-adenozin receptorok nagy sűrűségben fejeződnek ki, és pre- és posztzinaptikus lokalizációban egyaránt jelen vannak (Deckert és Jorgensen 1988, Fastbom és mtsai 1987). Az A₁-receptorok közvetítik az endogén adenozin

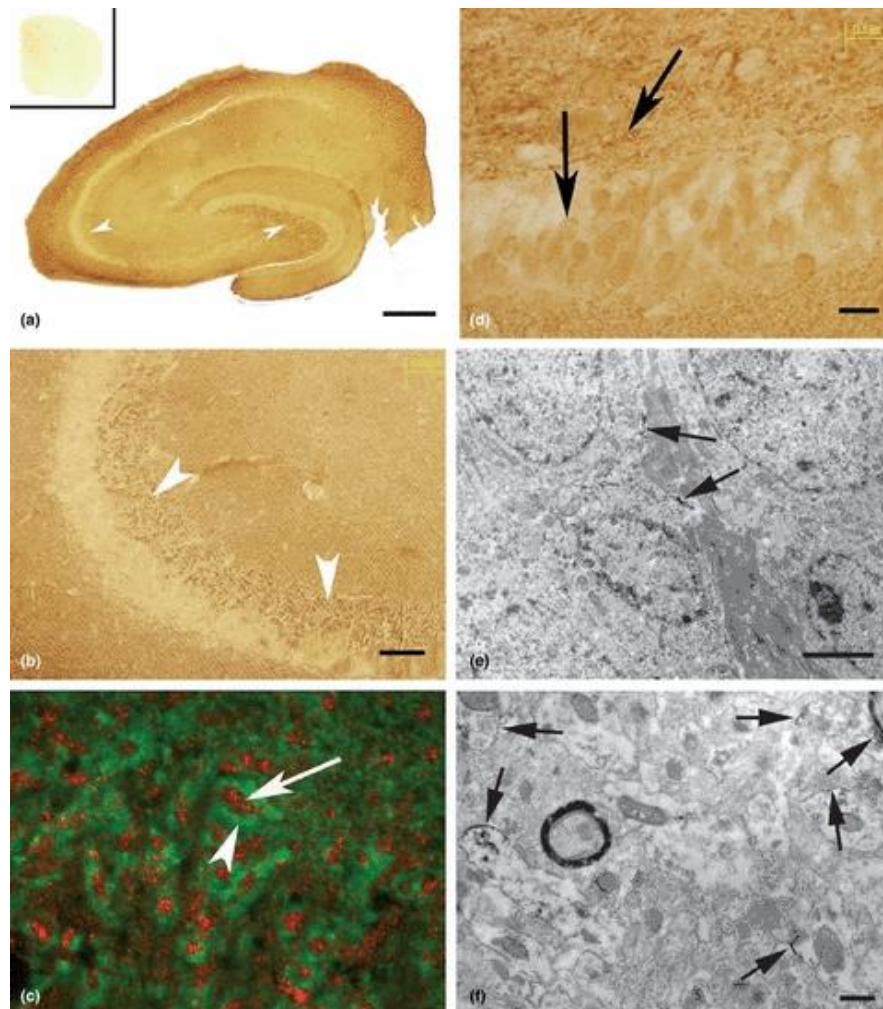
preszinaptikus gátló hatását az acetilkolin és a glutamát (Thompson és mtsai 1993) felszabadulására valamint posztzinaptikus membrán hiperpolarizáló hatását a hippocampusz mindhárom régiójában (Thompson és mtsai 1992). A hippocampuszban igen magas ektoATPáz enzim aktivitást mutattak ki korábban (Cunha és Ribeiro 2000), továbbá az is ismert, hogy ezen agyi régióban az A_1 -adenozin receptorok gátló hatás közvetítésével szabályozzák a noradrenalin felszabadulást (Jonzon and Fredholm 1984). Ezek alapján érdemesnek tűnt az ekto-ATPáz és az A_1 -adenozin receptorok részvételét is megvizsgálnunk. Az A_1 -adenozin receptorok szelektív antagonistája a DPCPX jelentősen csökkentette, de nem tudta meg felfüggeszteni az ATP gátló hatását. Tudni érdemes, hogy a DPCPX emellett hatékonyan képes gátolni a heteromer $P2Y_1/A_1$ receptor aktivációját is (Yoshioka és mtsai 2001). Az általunk leírtakhoz hasonlóan mások is részleges A_1 -adenozin receptor mediált szabályozást figyeltek meg az ATP által csökkentett hippocampális noradrenalin felszabadulásban (Koch és mtsai 1997). Az ekto-ATPáz szelektív gátlószeré az ARL67156, az alkalmazott koncentrációban ($50\mu\text{M}$) hatékonyan kivédve az ATP/ADP extracelluláris lebontását, ugyanakkor nem volt hatással az ATP gátló hatására a [^3H]NA felszabadulásban. Eredményeink alapján feltételezzük tehát, hogy a noradrenalin felszabadulás gátló modulációjában az A_1 -adenozin és $P2Y_1$ receptorok is részt vesznek. Mivel a $P2Y_1$ és A_1 receptorok koexpressziója kimutatható a hippocampuszban (Yoshioka és mtsai 2002), lehetséges, hogy a két receptor heteromert képezve gátolja a noradrenalin felszabadulást, bár ezt eléggé kizárja az a tény, hogy az általunk leghatékonyabbnak talált MRS2179 gyakorlatilag hatástalan anagonista a $P2Y_1/A_1$ receptoron (Yoshioka és mtsai 2001). Vizsgálatainkban nem csak a hatásközvetítő receptorok farmakológiai azonosítására tettünk kísérletet, hanem ezen receptorok lokalizációjának meghatározására is. A hippocampális noradrenerg végződés varikozitásai rendkívül gazdagok NMDA és nem-NMDA típusú glutamát receptorokban, melyek aktivációja fokozza a noradrenalin felszabadulását (Pittaluga és Raiteri 1992). Az excitátoros neuronok nagy számban expresszálják az $P2Y_1$ receptorokat (Rodrigues és mtsai 2005), a glutamáterg szinapszisokban pedig pre és posztzinaptikusan is megjelenik a $P2Y_1$ receptor immunreaktivitás (Tonazzini és mtsai 2007), amelynek kolokalizációját a VGLUT immunreaktivitással szintén kimutatták a hippocampuszban (Rodrigues és mtsai 2005). Kíváncsiak voltunk, hogy vajon az ATP gátló hatásának közvetítésében a neuronokon

kifejeződő P2 purin receptorok mellett egyéb sejteken expresszáldó ATP érzékeny receptorok is részt vesznek-közvetett szabályozás formájában. Így megvizsgáltuk, hogy a jelen esetben a tapasztalt gátló ATP hatás közvetlenül, vagy glutamát közvetítésével csökkenti a noradrenalin felszabadulást. Ezt a lehetséges indirekt ATP hatást két ionotróp glutamát-receptor antagonistá felhasználásával vizsgáltuk. Az NMDA-receptor antagonistá AP-5 és a nem NMDA-receptor antagonistá CNQX együttes adása csak részlegesen függesztette fel az ATP által kiváltott gátló hatást a [³H]NA felszabadulásra, melyből következik, hogy az ATP hatása részben glutamát receptorok közvetítésével valósul meg.

Korábban már tárgyaltuk, hogy az akciós potenciál gátlása milyen hatással volt az elektromos téringelés által kiváltott transzmitter felszabadulásra. A mintákat feszültség függő Na⁺-csatorna blokkolóval, tetrodotoxin kezelve jelentős csökkenést észleltünk a felszabaduló noradrenalin mennyiségében, ami a tovaterjedő akciós potenciálnak a szerepét bizonyítja ebben a folyamatban, vagyis neuronális eredetű [³H]NA felszabadulást mértünk. Hippokampális szinaptoszóma preparátumban kimutatták, hogy a P2Y receptorok gátolják a glutamát felszabadulást (Rodrigues és mtsai 2005), így az egyik lehetséges magyarázat a P2Y receptor aktiváció indirekt NA felszabadulást csökkentő hatására, hogy a glutamáterg axonterminálison elhelyezkedő P2Y₁ receptorok közvetítik a gátló hatást, amelyek aztán csökkent NMDA/nem-AMPA receptor aktiváció révén a noradrenerg axonterminálisokból is csökkentik a transzmitter felszabadulást. Kísérleteinkben ugyanakkor az ionotróp glutamát receptorok blokkolása csak részlegesen tudta kivédeni a P2Y receptor aktiváció hatását a noradrenalin felszabadulásban, mely azt sejteti, hogy egyéb faktorok is szerepet játszanak ebben a szabályozásban. Így egyre több adat támasztja alá azt, hogy az ATP P2Y receptorokon keresztül képes modulálni a glutamát hatását az NMDA receptorokon (Luthardt és mtsai 2002; Resende és mtsai 2007) ezért mi sem zárhatjuk ki teljesen a P2Y₁ receptorok direkt gátló hatását a pre és posztzinaptikus NMDA receptorokon.

A gátló GABA_Aerg transzmisszió részvételét a [³H]NA felszabadulásban GABA_A receptor antagonistá Bic jelenlétében vizsgáltuk. A Bicucullin az ATP közvetítette gátló hatást teljes mértékben képes volt kivédeni. Ebből következik, hogy a GABA_Aerg gátló neurotranszmisszónak is meghatározó szerepe van a P2Y receptor aktivációnak a hippocampális [³H]NA felszabadulásra gyakorolt hatásában. A feltételezésünk szerint

ez indirekt hatás: az excitátoros végződésekkel szinaptizáló interneuronok terminálisai a GABA felszabadulás helyei. Ezt alátámasztják olyan megfigyelések, hogy a P2Y₁ receptor aktiváció a GABAerg interneuronokon fokozza a posztzinaptikus gátlás frekvenciáját (Kawamura és mtsai 2004), továbbá egy immunhisztokémiai vizsgálat kimutatta, hogy a hippocampális interneuron populáció is expresszálja a P2Y₁ receptorokat (Moran-Jimenez és Matute 2000). Saját hippocampuszra vonatkozó immunhisztokémiai eredményeink is megerősítik a korábbi adatokat. Erős P2Y₁ immunreaktivitást találtunk az interneuronokban gazdag hilus és stratum lucidum területén, az idegsejttesteken és dendriteken (**28. ábra**). Terjedelmi okok miatt a bővebb magyarázatot és metodikai leírást az idevágó cikk tartalmazza (Csölle és mtsai 2008). Az immunfestés Kittel Ágnes munkáját dicséri.



28. ábra P2Y₁ receptor immunkolokalizációja patkány hippocampuszban
(a) Intenzív pozitív P2Y₁ receptor immunjelölés mutatható ki a gyrus dentatus (DG) hilus régiójában és a CA3 régió területén egyaránt (skála: 504 μ m). **(b)** A stratum lucidum területe erőteljes DAB pozitív festődéssel volt jellemezhető (fehér nyílfej)

(skála: 63 μm). **(c)** Konfokális mikroszlóp felvételen pozitív P2Y₁ immunoreaktivitást (Cy3 festés, vörös) tapasztaltunk a dendriteken (fehér nyíl), míg a terminálisok körül VGLUT-1 immunoreaktivitás (FITC festés, zöld) volt kimutatható **(d)** A dendriték intenzív P2Y₁ immunoreaktivitása mellett (felső nyíl), gyenge P2Y₁ immunoreaktivitás kimutatható volt a granulás sejtek vonatkozásában is. (skála: 21 μm). **(e)** Elektronmikroszkópos felvételen látható, hogy a neuronális sejtestek membránján (nyíl) tapasztaltuk a kimutatott, pozitív P2Y₁ receptor immunjelölést. **(f)** A hilus területén, a dendritekre (nyíl) jellemző az erőteljes P2Y₁ immunjelölést.

Másrésről viszont a hippokampusz szeletben (Barik és Wonnacott 2006) és szinaptoszómában is (Fassio és mtsai 1999) a GABA_A receptor aktiváció dizinhibíciós mechanizmussal, vagyis a gátlás gátlásával inkább fokozza, mint csökkenti a [³H]NA felszabadulást. Ezeket az elentmondásos adatokat és a rájuk épített elméleteket kizárólag komplex, indirekt szabályozást feltételezve értelmezhetjük. Két lehetséges magyarázatunk van az általunk megfigyeltekre. Az első szerint a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok által aktivált interneuron szubpopuláció csökkent GABA felszabadulással válaszol az aktivációra és ez a kisebb mértékű gátlás eredményezheti a csökkent NA felszabadulást (mivel a GABA gátló hatást közvetít olyan interneuronokon amelyek nyugalomban fokoznák a noradrenalin kiáramlását ebben az esetben tehát feltételezhetően indirekt hatásról van szó). A második lehetséges magyarázatunk, hogy a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptor aktiváció gátolja az interneuronális pre-és posztzinaptikus excitátoros neurotranszmissziót azon interneuronok esetében, melyek nyugalomban serkentő hatás közvetítésével fokoznák a noradrenalin felszabadulást.

Érdekes módon agonista nélkül adva egyik P2Y receptor antagonistá sem volt önmagában hatással az elektromos téringlerlés által kiváltott [³H]NA felszabadulásra. Ez az eredmény azt mutatja, hogy endogén ATP hiányában (mely csak magas frekvenciájú elektromos téringlerlésre szabadul fel a hippokampuszban a P2Y receptorok a mi kísérleti körülményeink között feltételezhetően nem aktiválódnak. Ismert, hogy a hippokampuszban magas ektoATPáz aktivitás is jellemző mely az ATP gyors extracelluláris lebontását eredményezi. Mindezek alapján erősen kétséges, hogy az általunk is alkalmazott fiziológias idegi aktivitást modellező alacsony frekvenciájú elektromos téringlerlés olyan mennyiségű ATP-t szabadítana fel, amely a jelen lévő gyors lebontó enzimrendszert „túlélve” aktiválni tudná a noradrenalin felszabadulást

gátló P2Y receptorokat. Ugyanakkor korábbi munkákból ismert, hogy olyan patológiás állapotokban, mint az *in vitro* (Juranyi és mtsai 1999) és *in vivo* (Melani és mtsai 2005) ischemia-szerű körülmények az ATP, már nagyobb mennyiségben szabadul fel a hippokampuszból, amely akár alkalmas is lehet a noradrenalin kiáramlás gátló szabályozásában résztvevő P2Y receptorok aktiválására is. Érdeemes megjegyezni, hogy a purinfelszabadulásnak van egy önerősítő jellegű mechanizmusa is a hippokampuszban, amely szintén a P2Y₁ receptorok részvételével történik (Pascual és mtsai 2012) és ezek a P2Y₁ receptorok az asztrocia sejtek felszínén vannak.

6.2. Kombinált oxigén és glükózmegvonás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippokampusz szeletekben

Kísérleteinkben tehát az *in vitro* ischemia szerű állapot, - melyet kombinált oxigén és glükózmegvonással modelleztünk, - hatásait vizsgáltuk a [³H]NA felszabadulásra az ischémiával szemben megkülönböztetett érzékenységet mutató patkány hippokampusz szeletekben. 30 perces kombinált oxigén és glükózmegvonás hatására a [³H]NA felszabadulás késleltetetten, de igen jelentős mértékben megemelkedett majd 30 perc múltán tért vissza az alapvonalra, vagyis hatása reverzibilis volt. A [³H]NA felszabadulás mechanizmust feltáró kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől Ca²⁺-mentes ([Ca²⁺]_o) módosított Krebs' oldatot használtunk, ez további robosztus emelkedést váltott ki a transzmitter kiáramlásban. Ezzel szemben, a feszültségfüggő Na⁺ csatornák reverzibilis gátlószere, a tetrodotoxin (TTX) teljesen gátolta a kombinált oxigén és glükózmegvonással kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulását. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a 30 perces OGD a patkány hippokampuszban túlnyomórészt a feszültségfüggő Na⁺ csatornák aktivációja, azaz az axonális depolarizáció révén váltotta ki a [³H]NA kiáramlást, amely azonban nem vezikuláris, hanem citoplazmatikus raktárakból szabadult fel, Ca²⁺-független módon. Megfigyeléseinket korábbi vizsgálatok eredményei is alátámasztják, melyek *in vitro* ischemia szerű körülmények között a gerincevelő (Uchihashi és mtsai 1998, Nakai és mtsai 1999) és hippokampusz szeletekben (Milusheva és Baranyi 2003, Milusheva és mtsai 2003) mutattak ki a citoplazmatikus raktárakból, TTX-függő noradrenalin

felszabadulást. A kombinált oxigén és glükózmegvonással kiváltott robosztus noradrenalin felszabadulást, a Na^+K^+ pumpa elégtelen ellátottsága miatt intracellulárisan akkumulálódó Na^+ (Vizi 1972; Kauppinen és mtsai 1988) váltja ki, a Na^+ függő transzporter megfordulása révén (Nakai és mtsai 1999). Ezt követően a P2 receptorok közvetítő szerepét vizsgáltuk az ischemia szerű körülmények által kiváltott [^3H]NA felszabadulásban. A szelektív P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 szignifikánsan fokozta az ischemia által kiváltott [^3H]NA felszabadulást, mely az előzőekben leírt kísérletekben azonosított gátló P2Y₁ receptor patológiás aktivációjára utal. Eredményeink egybevágóak korábbi adatokkal, Moran-Jimenez kutatócsoportja már korábban magas P2Y₁ receptor expressziót azonosított a hippocampusban (Moran-Jimenez és Matute 2000). Ugyanakkor a PPADS, a másik P2Y₁ receptoron is ható P2 receptor antagonistá nem változtatta meg a [^3H]NA kiáramlást a hippocampus szeletekben, amelyet azzal magyaráztunk, hogy egy másik PPADS-érzékeny receptor hatása állhat a háttérben, amely ellenkező irányban modulálja az ischemia-által kiváltott [^3H]NA kiáramlást. A PPADS ugyanis nem csak a P2Y_{1,2,4,6} receptorok, hanem a rekombináns homomér P2X_{1,2,3,5} és a heteromér P2X_{2/3} and P2X_{1/5} receptor altípusok hatékony gátlószere is egyben. (Ralevic és Burnstock 1998). Mivel ismert, hogy a P2X₁ és P2X₃ receptor aktiváció fokozza a hippocampális noradrenalin felszabadulást (Papp és mtsai 2004a), feltételezésünk szerint az ischemia által kiváltott endogén ATP P2X₁ és P2X₃ receptorokat aktiválva járul hozzá az ischemia által kiváltott [^3H]NA kiáramláshoz. A P2X₁ és P2X₃ receptorok közvetítte serkentő és a P2Y₁ receptor közvetítte gátló hatás tehát ellentétes szabályozás formájában jelenik meg egyidejűleg az ischemia szerű körülmények között, mely összességében a PPADS antagonistá hatástalanságát eredményezi. Elméletünket alátámasztandó, megvizsgáltuk a feltételezett P2X receptor-mediált serkentő szabályozást is ischemia szerű körülmények között. A PPNDS, a szelektív P2X₁ receptor antagonistá jelenlétében valóban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a [^3H]NA felszabadulásban, mely igazolja a serkentő hatású P2X₁ receptor részvételét. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a PPNDS olyan magas koncentrációban, mint amiben mi is alkalmaztuk gátolja az α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptor aktivációt is (Suzuki és mtsai 2004), tehát a PPNDS esetében a glutamát receptorokkal való kölcsönhatást nem zárhatjuk ki teljesen a NA felszabadulás szabályozásában. Ezzel

szemben, a 2MeSAMP a P2Y_{12/13} receptor antagonista nem változtatta meg a [³H]NA kiáramlás mértékét, azaz a noradrenalin felszabadulás gátló modulációjában ischemia szerű körülmények között ezen P2Y receptor altípusok nem vesznek részt. Eredményeinket összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a 30 perces ischemia szerű stimulus jelentős mértékben megnöveli a citoplazmatikus raktárakból a noradrenalin kiáramlást az extracelluláris térbe. A preszinaptikus P2 receptorok patológiás körülmények között is kettős, ellentétes hatás közvetítésével vesznek részt a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában. Míg a P2X1 receptorok serkentő hatást mediálnak, a P2Y₁ receptorok gátló hatás közvetítésével járulnak hozzá a hippocampális purinerg neuromodulációhoz.

6.3. A P2X7 receptor aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1 β termelődés szabályozásában rágsáló hippocampusban in vivo gyulladós modellben

A disszertáció második részében a centrális IL-1 β termelődés purinerg szabályozását vizsgáltuk, a fókuszpontban a perifériás IL- β produkció szabályozásában már igazolt P2X7 receptorok álltak. Nemcsak a gyulladós stimulus indukálta változást követtük nyomon, hanem a konstitutívan termelődő nyugalmi IL-1 β szintet is mértük a különböző kezeléseket követően, melyet az IL-1 β -nak a tanulási és memória folyamatokban betöltött szerepe indokolt. A tágabb témát érintő közlemények száma bár igen magas, a szakirodalom csak az utóbbi pár évben kezdett el érdemben foglalkozni a nyugalmi IL-1 β produkció vizsgálatával, köszönhetően annak a technikai fejlődésnek, amely a korábbiaknál sokkal érzékenyebb fehérje detektáló ELISA assay-ek megjelenését eredményezte. Míg Quan 1996-os közleményében a konstitutívan expresszált IL-1 β fehérjekoncentrációját gyakorlatilag nem mérhető mértékűnek írta le (Quan és mtsai 1996), az általunk is alkalmazott gyári assay-ek már 3pg/ml-es érzékenységi küszöbvel rendelkeznek. Hozzánk hasonlóan, kimutatható nyugalmi IL-1 β szintet mértek rágsáló hippocampusban azon közleményekben is, amelyekben az i.p. LPS kezelést követően ez az alapszint a többszörösére emelkedett (Barrientos és mtsai 2009, Nguyen és mtsai 1998, Vereker és mtsai 2000). Az általunk megfigyelt

nyugalmi és LPS indukálta IL-1 β fehérje értékek, bár relatíve magasak, de nem egyedülállóak: hasonló szisztémás kezelési és szövetfeldolgozási protokoll mellett Vereker és Nguyen is hasonló mértékű fehérje produkciót azonosítottak a hippocampusban (Vereker és mtsai 2000, Nguyen és mtsai 1998). Ugyanakkor meg kell említenünk, hogy az utóbbi közleményben a hipotalamuszban mért nyugalmi és LPS által indukált IL-1 β koncentráció még magasabbnak adódott, amely valószínűleg az IL-1 β produkció régió specifikus eltéréseinek köszönhető (Nguyen és mtsai 1998). Perifériás kezelések esetében mindig kardinális kérdés, hogy a szisztémásan beadott szer, legyen az gyulladásozó ágens vagy receptor agonista / antagonist, átjut-e a vér-agy gáton vagy sem. Jelenlegi ismeretünk szerint a vér-agy gát ugyan dinamikus határfelületet képez az agy és a vérkeringés között, de mint féligáteresztő lipid membrán, az oldott anyagoknak csak egy részét engedi át, a nagy részecskéket és a makromolekulákat nem. Fiziológiai körülmények között a vér-agy gát nem tekinthető az LPS számára áteresztőnek, vagy csak igen kis mértékben. A vér-agy gát többszörös védelmi rendszere azonban számos esetben sérülhet, így bakteriális-fertőzésekben is, ezáltal nő az áteresztőképessége, amelyhez a periférián felszabaduló citokinek is nagymértékben hozzájárulnak (Simi és mtsai 2007). Ezek alapján feltételezhető, hogy a perifériás LPS kezelésnek egyszerre lehet direkt (a központi idegrendszerben kifejtett) és indirekt (a periférián indukált) hatása a hippocampális IL-1 β termelés szabályozására (Raison és mtsai 2006). Szisztémás LPS kezelésre, az aktivált perifériás immunkompetens sejtek rendkívül gyorsan és jelentősen emelkedett gyulladásozó citokin és kemokin termeléssel válaszolnak, melyek, mint sürgősségi vészjelző molekulák beáramlanak az agyba. Ugyanakkor, az LPS, az ilyen körülmények között immár nagyobb áteresztőképességű vér-agy gáton átjutva, lokálisan is képes szelektív receptorát, a TLR4-t expresszáló mikrogliá sejtet aktiválni (Chakravarty és Herkenham 2005), fokozott IL-1 β termelést eredményezve. Az azonban, hogy a hippocampusban ilyenkor megjelenő IL-1 β produkció milyen mértékben perifériás és centrális azaz lokális eredetű, korábban nem volt ismert. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy milyen arányban járul hozzá a szisztémás LPS kezelést követően a hippocampusban mért IL-1 β produkcióhoz a perifériáról beáramló citokin invázió. Összehasonlítottuk vad típusú egerek esetében, a vérszérum és a transzkardiális perfúziót követően a hippocampusban detektált adatokat a perfúzió nélkül a hippocampusban mért

eredményeinkkel. A vérszérumban, hasonlóan a korábbi megfigyelésekhez (Li és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2008) intenzív IL-1 β emelkedést mutattunk ki az LPS hatására és az itt mért pg/ml-ben kifejezett koncentráció értékek nagyságrendben hasonlóan adódtak, mint amit a hippocampusz kísérleteinkben kaptunk. A transzkardiális perfúzióval az agyat vértelenítettük a dekapitálást megelőzően, így zártuk ki a vérkeringéssel a hippocampuszba jutó vörsejtek és humorális faktorok jelenlétét. Noha a peritoneális LPS injekció ebben az esetben is szignifikáns emelkedést váltott ki a hippocampális IL-1 β szintben, de jóval alacsonyabb koncentráció értékeket mutattunk ki. Ez a jelentős mennyiségi különbség a nyugalmi IL-1 β produkcióban is megmutatkozott. Eredményeink tükrében úgy tűnik, hogy a szisztémás LPS kezelést követően a perifériás eredetű IL-1 β produkció a meghatározó a hippocampális citokin szint emelkedésében, bár a lokálisan fokozott mértékű IL-1 β válasz szintén jól korrelál a gyulladásos stimulusra. Kísérleteinkkel jelentős lépést tettünk az agyi IL-1 β produkció szabályozás mélyebb megismerése felé. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a szisztémás gyulladásos állapotokat kísérő perifériás és centrális immunválaszok komplexitása miatt, a centrális citokin produkció szabályozása korrekten, olyan egyszerű modellrendszerrel nem vizsgálható, mint amilyen a lokális vagy in vitro LPS kezelés.

Az általunk elvégzett kísérletek elsődleges célja volt, hogy a P2X7 receptorok közvetítő szerepét tárjuk fel a hippocampális IL-1 β termelésben in vivo modellekben. Mivel felmerült e receptor farmakológiai azonosítóra irányuló kísérleteknél a faji különbségekből adódó eltérő érzékenység lehetősége, célszerűnek tűnt patkány és egér csoportokon is elvégezni ezeket a vizsgálatokat. Először a Wistar patkányokkal végzett kísérleteink során állítottuk be azt a gyulladásos modellt, amelyet a későbbiekben a transzgénikus P2X7 receptor null mutáns egereken és vad típusú társaikon is alkalmaztunk. A farmakológiai eszköztáron túlmenően a rendelkezésre álló P2X7 null mutáns egértörzs bevonásával a hatásközvetítő receptor(ok) pontosabb azonosítására nyílt lehetőség. A lehető legpontosabb farmakológiai profilt többféle szelektív és nem P2X7 receptor szelektív antagonistá bevonásával határoztuk meg. Előbb a purin receptorok részvételét igazolandó, egy nem specifikus P2 receptor antagonistá, a PPADS hatását teszteltük, majd a kandidáns P2X7 receptorra szelektivitást mutató antagonisták következtek, a BBG és az oATP. Patkány hippocampuszban mindhárom

antagonista, a PPADS, a BBG és az oATP jelenléte is erőteljesen csökkentette az LPS indukálta IL-1 β termelődést. Hasonló gátló hatást tapasztaltunk vad típusú egér hippocampuszában is a gyulladáshoz követoen. Kis kitero erejéig azonban, meg kell jegyeznünk, hogy in vivo modellekben, intraperitoneális kezelés esetén nem áll fenn az egyértelmű receptor szelektivitas az antagonisták / agonisták vonatkozásában. Ennek ellenére mindkét antagonistát széles körben használják P2X7 receptor mediált folyamatok azonosítására, a jelenlétükben kimutatott gátló hatást elfogadott módon a P2X7 receptor gátláshoz kötik. Míg a PPADS széles hatás spektrumú, általános P2 receptor antagonisták (P2X1,3 receptorokon és P2Y_{1,4,6} receptorokon hat), addig az oATP olyan irreverzibilis, szelektív P2X7 receptor antagonisták, amelynél leírták P2X7 receptor aktivációtól független hatást is (Beigi és mtsai 2003). A BBG viszont jelenlegi ismereteink szerint szelektív P2X7 receptor antagonistának tekinthető (Jiang és mtsai 2000). Mindezek ismeretében és hasonló gyulladáshoz követoen modelleket leíró közlemények alapján határoztuk meg a kísérletekben alkalmazott antagonisták dózisokat a lehető legpontosabb farmakológiai karakterizálás érdekében. Természetesen, a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepéről a legmeggyozőbb bizonyítékot a P2X7 receptor null mutáns egerek vizsgálata jelentette: a szisztémás bakteriális endotoxin indukálta IL-1 β termelődés szignifikáns mértékben alacsonyabb volt ezeknek az egereknek a hippocampuszában, mint vad társaik esetében. A P2X7 receptor antagonisták gátló hatása szintén kisebb mértékben volt kimutatható, egyúttal azt is bizonyítva, hogy jelenlétükben tapasztalt gátló hatást a P2X7 receptorok specifikus gátlása eredményezte. Eredményeinket alátámasztják olyan korábbi adatok, amelyek az i.p. LPS által kiváltott hipotalamikus IL-1 β mRNS expresszióban mutattak ki, szignifikánsan kisebb mértékű emelkedést a P2X7 génkiütött egerek estében vad társaikhoz képest (Mingam és mtsai 2008). P2X7 receptor null mutáns egér vérérum analízisünk hasonló csökkent IL-1 β választ mutatott ki a szisztémás LPS kezelésnél, míg a transzkardiális perfúziót követően nem volt lényegi különbség a P2X7 receptor génkiütött egér hippocampusz és vad társaik hippocampuszában mért citokin termelődés között. Az LPS kezelést kísérő megemelkedett perifériás IL-1 β produkcióban a P2X7 receptor aktiváció szerepét már korábban leírták (Solle és mtsai 2001, Chessell és mtsai 2005), és a fenti, saját eredményeink tükrében is a perifériás eredetű szabályozás tűnik a legvalószínűbbnek. Ennek nem mond ellent sem az, hogy az intraperitoneálisan adott endotoxin kezelést

követően a P2X7 és P2X4 receptorok emelkedett mRNS expresszióját tapasztaltuk, sem az, hogy mikroglia sejt kultúrában és organotipikus hippocampusz szelettenyészetben a lokálisan adott LPS hatására (a mi eredményeinkkel egybevágóan) is IL-1 β expresszió és szekréció növekedést mutattak ki más munkacsoportok, amely mind P2X7 receptor génkiütésre, mind a P2X7 receptor antagonistá gátlására érzékeny volt (Choi és mtsai, 2007, Bernardino és mtsai 2008). Bernardino és munkacsoportja felveti annak lehetőségét is, hogy a centrális citokin szabályozás, függően attól, hogy lokális vagy szisztémás gyulladás indukálja, eltérő mechanizmusokkal mehet végbe. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az LPS injekciót kísérő centrális citokin produkcióban a perifériás makrofág, leukocita és egyéb vérsejteken kifejeződő P2X7 receptorok részvétele a meghatározó. Mint említettük, ezt számos korábbi megfigyelés is alátámasztja, melyek a perifériás immunsejtek P2X7 receptor függő IL-1 β termeléséről számolnak be (Perregaux és Gabel 1994, Humphreys és Dubyak 1998, Labasi és mtsai 2002, Qu és mtsai 2007).

Kísérleteinkben és másokéban is (Mingam és mtsai 2008), a P2X7 receptor mediált hippocampális IL-1 β termelődést ATP előkezelés nélkül az LPS önmagában is képes volt kiváltani. Bár nem vizsgáltuk az endogén ATP szint változását a szisztémás endotoxin kezelést követően, makrofág és mikroglia sejtek vonatkozásában már régóta bizonyított, hogy az LPS kezelés fokozza a felszabaduló endogén ATP mennyiségét (Ferrari és mtsai 1997b, Sperlagh és mtsai 1998b, Verderio és Matteoli 2001). Nemrégiben ezt a hippocampusz vonatkozásában is beigazolták (Pascual és mtsai 2012). P2X7 receptor null mutáns egerekkel végzett kísérleteink további érdekes adatokkal szolgáltak. A P2X7 receptor hiányában csökkent, de mérhető mennyiségű IL-1 β produkciót mutattunk ki nyugalmi és LPS kezelést követő állapotban egyaránt. Ugyanakkor a P2X7 receptor antagonisták teljes mértékben gátolták az LPS által kiváltott IL-1 β produkciót vad típusú egerek hippocampuszában. és ezt a hatást szűkebb mértékben ugyan, de a P2X7 receptor génkiütött egerek esetében is kifejtette. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy: (1) a hippocampuszban jelen lévő reziduális IL-1 β produkció nem csak a P2X7 receptorok szabályozása alatt áll; (2) lehetséges, hogy a nyugalmi és gyulladáscitokin termelődés szabályozásában különböző mechanizmusok vesznek részt. Mindenképp szükségesnek látjuk a pontos hatásmechanizmusok azonosítása céljából a jövőben kiterjedt funkcionális vizsgálatok

elvégzését.

A P2X7 receptor aktivációt követő szignál transzdukciós elemek között kiemelt szerepet tölt be a p38 MAPK foszforiláció, melynek szerepét az IL-1 β produkció szabályozásában makrofág sejtkultúrában már kimutatták (Kim és mtsai 2004a, 2004b). Kísérleteinkben, a széles körben alkalmazott szelektív p38 MAP kináz inhibitor, SB203580 a nyugalmi és LPS indukált IL-1 β termelődést is gátolta, mely ezen szignál transzdukciós elem aktív részvételét igazolta az agyi IL-1 β produkcióban in vivo modellrendszer esetében is.

Hasonló gátló hatást tapasztaltunk a réskapcsolat félcsatorna (gap junction hemichannel) inhibitor CBX jelenlétében is, mely egybevághat olyan korábbi megfigyelésekkel, melyek a Pannexin-1 hemicsatorna pórus nyitódásával és az azon keresztül történő kation beáramlással magyarázzák a kaszpáz-1 aktivációt és az ezt követő érett IL-1 β processzálást (Martinez-Francois és mtsai 2002, Pelegrin és Surprenant 2006). Sajnos napjainkban sem teljesen tisztázott, hogy a P2X7 receptorok és a Pannexin-1 típusú hemicsatornák milyen módon (páros aggregáció, vagy sem) alkotnak ioncsatorna komplexet, melynek aktiválódása az ASC és kaszpáz-1 függő IL-1 β felszabadulást eredményezhet. Továbbá ismert az is, hogy a carbenoxolone-nak egyéb, az ionkonduktanciákra nem specifikus hatása is van, ezért mindenképp további vizsgálatok szükségesek a hatásmechanizmus feltárásához (de Groot és mtsai 2003).

A receptor azonosításhoz szükséges agonista hatásokat P2X7 receptorra érzékeny koncentrációtartományban vizsgáltuk, az endogén ligand ATP, és a kb. tízszer potensebb BzATP bevonásával. Az ATP jelenlétében tapasztalt hatás a kezelési idő függvényében változott. Amikor az endotoxin kezelést követően 4 órával adtuk az ATP-t, intenzív emelkedést tapasztaltunk az IL-1 β produkcióban, ahogy azt mások is megfigyelték mikroglia sejteken és makrofágokon (Ferrari és mtsai 1997b, North és Surprenant 2000, Solle és mtsai 2001, Brough és mtsai 2002, Le Feuvre és mtsai 2002a, 2002b, Bernardino és mtsai 2008, Mingam és mtsai 2008). Ezzel szemben, amikor hosszabb kezelési időt alkalmaztunk, az agonista i.p. injekciózása megelőzte az LPS kezelést, az ATP és a BzATP egyaránt jelentősen csökkentette a gyulladásos IL-1 β termelődés mértékét. Feltételezésünk szerint a P2 receptor agonistáknál tapasztalt gátló hatást az ATP metabolikus terméke, az adenzin közvetítte, mivel az ATP és származékai életideje rövid az extracelluláris térben, és az idegvégződésben jelenlevő

ektoenzimek az ATP-t a P2 receptorokon inaktív AMP-vé és adenzinná hidrolizálják. Az adenzin receptorok közül az A_{2A} receptor altípus a centrális IL-1 β produkció szabályozásában serkentő hatás közvetítésével vesz részt, és a citokin egyensúlyt a gyulladós fenotípus felé tolja el (Fiebich és mtsai 1996, Abbracchio és Ceruti 2007). Ezzel ellentétes hatást közvetítenek az A₁ adenzin receptorok a perifériás idegrendszerben, így pl. A₁ receptor deficiens egerek gerincvelőjében megemelkedett IL-1 β mRNS expressziót mutattak ki a sclerózis multiplex állatmodelljében (Tsutsui és mtsai 2004). Munkánkat megelőzően az A₁ adenzin receptorok szerepét a centrális citokin termelés szabályozásában még nem vizsgálták. Kísérleteinkben a szelektív A₁ adenzin receptor antagonistá, DPCPX a P2X7 receptorok hiányában is hasonló mértékben védte ki az ATP gátló hatását, mely igazolja felvetésünket ezen receptorok hatásközvetítő szerepét illetően. Összefoglalva eredményeinket és azok jelentőségét: munkánkkal jelentős lépést tettünk az agyi IL-1 β produkció szabályozás mélyebb megismerése felé. Kimutattuk, hogy a szisztémás LPS kezelést követő agyi gyulladós válasz szabályozásában elsősorban a perifériás P2X7 receptorok vesznek részt. Míg a P2X7 receptorok fokozzák a hippokampális IL-1 β produkciót, addig az A₁ adenzin receptorok gátló hatás közvetítésével neuroprotektív szerepet tölthetnek be.

6.4. Microarray alapú génexpressziós analízis

A disszertáció harmadik részében funkcionális genomikai vizsgálataink során egér modellrendszerben vizsgáltuk a P2X7 receptor génkiütést kísérő génexpressziós változásokat a limbikus rendszer egyik fontos területén, az amigdalaiban. A görög eredetű amigdala jelentése mandula, mely sajátos alakú neuronjaira utal. Az „érzelmi agyként” is emlegetett limbikus rendszer kapcsolatban áll a frontális kéreggel, szerepet játszik a kognitív teljesítmény szabályozásában is, mivel ez a tanulás érzelmi háttere is. Kitüntetett régió az antidepresszánsok hatásmechanizmusának közvetítésében is (Castro és mtsai 2010). Depresszióban szenvedő páciensekben neuropathológiai vizsgálatok kimutatták a gliasejtek csökkent számát és sűrűségét az amigdala régiójában (Bowley és mtsai 2002), tehát nem csak funkcionális, hanem struktúrális elváltozások is észlelhetők az affektív kórképek esetében. A legújabb genetikai kutatások és saját eredményeink

alapján is feltételezhető, hogy a genetikai alterációk már a transzkripció szintjén képesek módosítani és betegség specifikus expressziós profilt kialakítani a neuropszichiátriai betegekben. Microarray analízissel a P2X7 receptor génkiütés génexpresszióra gyakorolt hatását mértük fel, különös tekintettel a depresszióra biológiai plauzibilitást mutató génekre. E célból amigdala minták teljes egér genom génexpressziós mintázatát elemeztük esetében 6 órával a perifériás LPS kezelést (250µg/kg i.p.) követően. Az általunk alkalmazott in vivo gyulladásoz protokoll paramétereit (kezelési idő, a bakteriális enotoxin dózis) előkísérleteink alapján állítottuk be, figyelembe véve, hogy az depresszió-szerű viselkedéshez és a transzkripció változások kiváltásához is ez a kezelési idő és az alacsony bakteriális enotoxin dózis optimális. A P2X7 receptor génkiütés rendkívül nagyszámú, a klasszikus microarray adatelemző módszerekkel értékelve statisztikailag szignifikánsan eltérő expressziót mutató gént eredményezett a kontrollnak tekintett vad típusú csoporthoz képest. Minegy 8165 transzkriptum esetében mutattunk ki, a P2X7 receptor deficienciával összefüggő minimum kétszeres expressziós változást. Ez az eredmény már önmagában is rendkívül érdekesnek tűnt, bár meglepőnek korántsem mondható. Egyrészt, mert gyakori, hogy hasonlóan magas számú gén expresszióváltozása kíséri akár egyetlen gén kiütését is, amennyiben teljes genomra kiterjed az expressziós profil összehasonlítása. Így a génkiütést követő közvetlen és közvetett (kompenzatórikus) hatásokban szerepet játszó gének expressziója is változik, számuk, pedig a genetikai módosítás targetjének vett géntermék molekuláris és biológiai funkcióinak relevanciájától függően elérheti az akár több ezres értéket is. Másrészt, jelenlegi ismereteink szerint a P2X7 receptor celluláris lokalizációja nem csak a sejtmembránra korlátozódik. Hatalmas áttörést jelenethet a purinerg neurotransmisszió mélyebb megértésében, Atkinson eredményének további megerősítése, mely kimutatta, hogy a P2X7 receptorok a sejtmembránon is kifejeződnek fehérje szinten, felvetve annak lehetőségét, hogy ezek a receptor transzkripciósfaktorként működve akár hosszú távú és kiterjedt változásokat is generálhatnak (Atkinson és mtsai 2002). A P2X7 receptor génkiütést kísérő génexpressziós változások mélyebb, átfogóbb megértésének céljából GO elemzést végeztünk el a kapott microarray adathalmazon. A GO analízis világosan kimutatta a szinaptikus transzmisszióhoz, iontranszportoz, jelátviteli hálózathoz, a G-fehérje kapcsolt receptor jelátviteli útvonalhoz, ATP szintézis kapcsolt proton

transzporthoz, illetve a transzkripció szabályozásához kapcsolódó géncsaládok elemeinek erőteljes indukcióját. A feldúsulást mutató géncsaládokhoz rendelt gének azonosítását követően feltérképeztük azon géneket is, amelyek szintén a szignifikánsan megváltozott génállomány részét képezték, és amelyek mai tudásunk szerint összefügghetnek a depresszióval. Így azonosítottuk a központi idegrendszeri ingerületátvitellel, illetve a depresszió mai hipotéziseivel (neuroplaszticitással) kapcsolatba hozható géneket. Ezen eredmények alapján állítottuk össze azt a biológiai plauzibilitást tükröző génlistát, amelyet a további TaqMan alapú real-time PCR analízisnél is vizsgáltunk. A real-time PCR analízisek elsődleges célja, hogy megerősítsék a microarray alapú expressziós vizsgálatok eredményeit. Mi több mint, 60, a P2X7 receptor génkiütés hatására szignifikánsan megváltozó expressziót mutató gén vonatkozásában végeztük el a minta és a kezelés validálást. A real-time PCR eredményeink jól korreláltak a microarray adatokkal, 29 olyan gént validáltunk melyek a szinaptikus jelátvitel, a neuroplaszticitás és a depresszió patomechanizmusával hozhatóak összefüggésbe. A P2X7 receptor deficiens egércsoportban alulexpresszált gének közül kimutattuk az ionotróp glutamát receptorokat (AMPA2, AMPA4), a metabotróp glutamát receptort (Grm7) valamint a gliális neurotrofikus faktort (GDNF) kódoló géneket, melyek jól korrelálnak a napjainkban a depresszió patomechanizmusát a megnövekedett glutamáterg neurotransmisszióval és szinaptikus plaszticitással magyarázó elméletekkel (Sanacora és mtsai 2008). Ezzel ellentétes irányultságú, felülexpresszált változást azonosítottunk viszont az NMDA típusú ionotróp glutamát receptor NR2B alegységét kódoló gén (Grin2b) esetében. A GABAerg neurotransmisszióra szintén hatással volt a génkiütés: a GABA_A receptor alegysegeket kódoló gének között egyaránt találtunk alul-, és felülexpresszált géneket is (Gabrb2, Gabrb3, Gabrg2, Gabrg3 gének expressziója csökkent, akárcsak a GABA szintetizáló enzim, a GAD expressziója, míg a GABA_C egyik alegységét kódoló gén, a Gabrr1 emelkedett expressziót mutattak). Ezek az eredmények a P2X7 receptor altípus szintű szabályozó szerepére utalnak a glutamát és GABA receptorok expressziójának vonatkozásában. Ezeket az eredményeket alátámasztják olyan korábbi adatok, amelyek az idegvégződésekből és asztocita sejtekből fokozott glutamát és azt követő GABA felszabadulásról számolnak be P2X7 receptor aktivációt követően (Papp és mtsai 2004b; Patti és mtsai 2006, Sperlággh és mtsai 2003, Duan és mtsai 2003). Mindezeket és

eredményeinket figyelembe véve, feltételezésünk szerint a P2X7 receptor aktiváció túlműködése részt vehet a depresszív kórképek tüneteinek mögött húzódó patomechanizmusok kialakulásában. P2X7 receptor hiányában viszont olyan kompenzatórikus mechanizmusok lépnek életbe, melyek már mRNS szintén érintik a különböző glutamát és GABA receptor altípusok expresszióját. Mind kísérletes állatmodellek, mind humán vizsgálatok megerősítik a glutamát transzmisszió részvételét az affektív kórképek patofiziológiájában. A nagymértékű glutamát szint emelkedése mellett (Hashimo és mtsai 2007), genetikai polimorfizmusok (Mundo és mtsai 2003) és a glutamát receptor alegységek megváltozott expressziós mintázata is kimutatható a major depressziós és bipoláris zavarban szenvedő betegeknél (Meador-Woodruff és mtsai 2001, Toro és mtsai 2005). Az alkalmazott gyógyszeres terápiában már napjainkban is kiaknázzák a glutamát receptor antagonisták antidepresszáns hatását (Sanacora és mtsai 2008), miközben számos közlemény számol be egyéb támadáspontú antidepresszánsok glutamát receptor altípus expressziójára gyakorolt hatásáról (Nowak és mtsai 1998; Skolnick és mtsai 1996). Hipotézisünk bizonyítására a jövőben kiterjedt funkcionális vizsgálatok szükségesek, melyek a P2X7 receptorok és a neuroplaszticitás kapcsolatát tárják fel.

Összefoglalva, microarray analízisünk kimutatta, hogy a P2X7 receptorok jelentős hatást gyakorolnak a depresszióval összefüggésbe hozható gének expressziójára. A kutatás új irányvonala a fenti génexpresszióra gyakorolt hatások funkcionális következményeinek feltérképezése lehet, mely hozzásegíthet a depresszió folyamatának jobb megértéséhez, emellett kiindulópontot jelenthet új típusú antidepresszáns gyógyszerek tervezéséhez.

A perifériás bakteriális endotoxin kezelést követő génexpressziós változások száma nagyságrendben elmaradt a P2X7 receptor génkiütést kísérő változásoktól. Ez részben annak tudható be, hogy hat órával a viszonylag alacsony dózisban alkalmazott LPS kezelés, csak a gyulladáshoz és immunválaszhoz, valamint a citokin és kemokin funkciókhoz kapcsolódó gének expresszióját volt képes nagymértékben indukálni. Amigdala mintáinkban az LPS által indukált transzkriptumok közül mintegy 287 mutatott kizárólag az endotoxin kezeléssel összefüggő legalább kétszeres, szignifikáns expresszió növekedést. Eredményeink jól korrelálnak olyan korábbi adatokkal, amelyek hasonló szisztémás endotoxin kezelést követően azonosították a gyulladáshoz kapcsolódó immunválasz

jellegzetes kemokin, citokin profilját, a megnövekedett humorális immunválaszt és fagocitózist és egyéb szignálmolekulák fokozott jelenlétét (Marques és mtsai 2009, Marsh és mtsai 2009, Mastronardi és mtsai 2007, Perreau és mtsai 2007).

7. Következtetések

Főbb eredményeink a célkitűzések tükrében:

I. A hippokampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése

1. A hippokampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus purinerg szabályozásában gátló hatást közvetítő P2Y receptorok részvételét mutattuk ki. A hippokampuszba futó noradrenerg rostokból felszabaduló NA preszinaptikus pozitív irányú modulációjában a homomer P2X1- vagy homomer P2X3-receptorok részvételét már korábban kimutattuk (Papp és mtsai 2004a).
2. Az elektromos téringerléssel kiváltott noradrenalin felszabadulás konvencionális, vezikuláris transzmitterfelszabadulásra jellemző, Ca^{2+} függő módon ment végbe. Idegi aktivitás alatt, az ingerléssel kiváltott noradrenalin kiáramlás a P2Y receptor agonisták jelenlétében csökkent. A hatásközvetítő receptorok agonista érzékenysége / antagonistá profilja a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok farmakológiai fenotípusának felelnek meg. A preszinaptikus P2X és P2Y receptorok fiziológias körülmények között tehát kettős, ellentétes hatás közvetítésével vesznek részt a neurotranszmitter szabályozásában.

II. Patológiás állapotban, kombinált oxigén és glükózmegvonás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippokampusz szeletekben

1. Az ischémia in vitro modelljében, a kombinált oxigén és glükózmegvonás (OGD) alkalmazása jelentős növekedést idézett elő a hippokampális noradrenalin felszabadulásban. A 30 perces ischémia szerű stimulussal kiváltott noradrenalin Ca^{2+} -független módon szabadult fel. A citoplazmatikus raktárakból kiáramló nagy mennyiségű, többlet noradrenalin két irányban volt modulálható purin ligandokkal. A farmakológiai profil alapján a gátló hatás a P2Y₁ receptorokon közvetítődik, míg a serkentő hatásért a P2X1 receptorok felelősek.

Összefoglalva eredményeinket a hippokampális noradrenalin felszabadulás fiziológias (alacsony frekvenciájú elektromos téringerlés) és patológiás körülmények (kombinált oxigén és glükózmegvonás) között egyaránt P2 purin receptor mediált

kettős szabályozás alatt áll. A már ismert P2X receptorok mellett a preszinaptikus gátló P2Y receptorok esetlegesen célpontja lehet a neuroprotektív terápiának is.

III. A P2X7 receptor patológiás aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1 β (IL-1 β) termelődés szabályozásában rágszáló hippocampusban in vivo gyulladásoos modellben

1. A P2X7 receptor patológiás aktivációja nem csak a perifériás, hanem a centrális IL1 β termelődés szabályozásában is részt vesz. A szisztémás endotoxin stimulációt követően P2X7 receptor függő módon emelkedett a hippocampális IL-1 β produkció.
2. Bizonyítást nyert, hogy a szignáltranszdukciós elemek közül a p38 MAPK aktiváció a centrális IL-1 β produkció szabályozásában is részt vesz.
3. Transzkardiális perfúziót követően, a szisztémás LPS kezelés megemelte ugyan a hippocampális IL-1 β szinteket, de az emelkedés mértéke abszolút értékben lényegesen kevesebb volt, akár csak a nyugalmi citokin szintek esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy a hippocampusban a nyugalmi és gyulladásoos IL-1 β produkció is nagyobb részben perifériás eredetű. Továbbá, a transzkardiális perfúziót követően sem a bazális, sem az LPS kiváltott IL-1 β produkció nem mutatott függést a P2X7 receptorok jelenlététől.

Összefoglalva eredményeinket, a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepe igazolódott a hippocampális nyugalmi és gyulladásoos IL-1 β produkció szabályozásában, de ezen receptorok nem a központi idegrendszerben, hanem a periférián fejtik ki hatásukat, feltehetően a vér sejtés elemein vagy az immunkompetens sejteken találhatóak.

IV. P2X7 receptor génkiütés hatása a teljes egér genom microarray alapú génexpressziós analízis során

1. Mintegy 8165 transzkriptum esetében mutattunk ki, a P2X7 receptor deficienciával összefüggő minimum kétszeres mRNS expressziós változást.
2. A P2X7 receptor deficiens egércsoportban alulexpresszált gének közül validáltuk az

ionotróp glutamát receptorokat (AMPA2, AMPA4), a metabotróp glutamát receptort (Grm7) valamint a gliális neurotrofikus faktort (GDNF) kódoló géneket, melyek jól korrelálnak a napjainkban a depresszió patomechanizmusát a megnövekedett glutamáterg neurotranszmisszióval és szinaptikus plaszticitással magyarázó elméletekkel. A már leírt P2X7 receptort kódoló gén gain-of-function mutációja és a receptoraktiváció követően észlelt fokozott glutamáterg transzmisszió között szoros összefüggés állhat fenn.

Mindezeket és eredményeinket figyelembe véve, feltételezésünk szerint a P2X7 receptor aktiváció túlműködése hozzájárulhat végső soron a depresszív kórképek tüneteinek mögött húzódó patomechanizmusok megjelenéséhez.

8. Összefoglalás

Az elmúlt két évtizedben a purinerg jelátvitel iránti érdeklődés jelentősen megugrott, amelynek egyik oka a purin receptoroknak a neurodegeneráció patomechanizmusában betöltött kiemelten fontos szerepe. A P2X7 receptorok emellett génpolinorfizmus kutatások révén a major depresszió és a bipoláris betegség kapcsán is előtérbe kerültek. Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a hippokampális noradrenalin felszabadulás fiziológias (elektromos téringerlés) és patológias (kombinált oxigén és glükózmegvonás) körülmények között egyaránt P2 purin receptor mediált kettős, serkentő-gátló szabályozás alatt áll. A gátló hatásközvetítő receptorok agonista érzékenysége/antagonista profilja a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok farmakológiai fenotípusának felelnek meg az alacsony frekvenciájú elektromos téringerléssel való stimulálás esetében. A 30 perces ischémia szerű stimulussal kiváltott noradrenalin felszabadulásra gyakorolt, P2 purinerg gátló hatás a P2Y₁ receptorokon közvetítődik, míg a serkentő hatásért a P2X1 receptorok felelősek. A preszinaptikus gátló P2Y receptorok esetlegesen célpontjai lehetnek a már ismert P2X receptorok mellett a neuroprotektív terápiának is. Munkánkban elsőként igazoltuk a P2X7 purin receptorok hatásközvetítő szerepét a hippokampális nyugalmi és gyulladási IL-1 β produkció szabályozásában in vivo gyulladási modellben. Eredményeink alapján ezen receptorok, nem a központi idegrendszerben, hanem a periférián fejtik ki hatásukat, feltehetően a vér sejtsejtein vagy az immunkompetens sejteken találhatóak. Harmadik vizsgálatunkban a P2X7 receptor génkiütés markáns hatását mutattuk ki a depresszióhoz köthető gének kifejeződésére. Teljes egér genom microarray alapú génexpressziós analízis segítségével azonosítottuk a P2X7 receptor deficiens egércsoportban alulexpresszált gének közül az ionotróp glutamát receptor alegységeket (AMPA2, AMPA4), metabotróp glutamát receptort (Grm7) valamint a gliális neurotrofikus faktort (GDNF) kódoló géneket, melyek jól korrelálnak a napjainkban a depresszió patomechanizmusát a megnövekedett glutamáterg neurotranszmisszióval és szinaptikus plaszticitással magyarázó elméletekkel. A P2X7 receptort kódoló gén depresszióban már leírt gain-of-function mutációi és a receptor aktivációt követően észlelt fokozott glutamáterg transzmisszió között szoros összefüggés állhat fenn. Mindezeket és eredményeinket figyelembe véve, feltételezésünk szerint a P2X7 receptor aktiváció túlműködése hozzájárulhat végső soron a depresszív kórképek hátterében álló patomechanizmusok kialakulásához.

9. Summary

Purinergic signaling has attracted increasing interest in the past decades, which is partly due to the prominent role of P2 receptors in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In addition gene polymorphism shed light on the potential role of P2X7 receptors in major depression and bipolar diseases as well. In the present study we revealed a dual, excitatory-inhibitory P2 purinergic modulation of hippocampal noradrenaline release during both physiological neuronal activity (electric field stimulation) and under pathological condition (in vitro ischemic-like stimulus). Our data are the first demonstration of inhibitory modulation of the electrically-evoked [³H]noradrenaline release in the hippocampus, through activation of P2Y receptors with a pharmacological profile similar to that of the P2Y₁ and P2Y₁₃ receptor subtypes. Furthermore, it might be assumed that both facilitatory P2X₁ and inhibitory P2Y₁ receptors are involved in the modulation of the excessive cytoplasmic release of noradrenaline from the hippocampus upon combined oxygen and glucose-deprivation. Our results therefore indicate that in addition to P2X receptors, inhibitory P2Y receptors could also be a potential target for neuroprotection. Our data are also the first demonstration of the involvement of P2X7 receptors in the regulation of basal and LPS-induced IL-1 β production of the rodent hippocampus in an in vivo inflammatory model. Our results indicate that P2X7 receptors, responsible for this facilitatory regulation are mainly localized peripherally, presumably on blood cells or immune cells. In our third series of experiments, we revealed that P2X7 receptor deficiency elicits widespread alteration in the expression of genes responsible for synaptic signaling and neuroplasticity in the limbic system. A whole genome microarray analysis was performed in the amygdala and consistent with the presumed dysfunction of glutamatergic transmission and consequent neuroplasticity changes in depression, a downregulation of different ionotropic glutamate receptors (AMPA2, AMPA4), a metabotropic glutamate receptor subunit (Grm7) and the glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) was detected in P2rx7^{-/-} mice. These changes are consistent with previous results showing that the activation of P2X7 receptors in the brain leads to an increased glutamate. Therefore, it is tempting to speculate that the increased activation due to gain-of-function mutations of P2X7 receptor encoded gene, described in depression, may lead to glutamatergic overactivation and subsequent it would lead to depressive symptoms.

10. Irodalomjegyzék

- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA and Burnstock G. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences* 24:52-55.
- Abbracchio, M.P., Ceruti, S. (2007) P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic signalling* 3, 13-25.
- Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL, Bennett MR. (2003) Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *Neuroreport*, 14 (17): 2177-2181.
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. (1999) Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs*, 58 (2): 211-232.
- Allan, S.M., Tyrrell, P.J., Rothwell, N.J., 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature reviews* 5, 629-640.
- Allgaier C, Reinhardt R, Schädlich H, Rubini P, Bauer S, Reichenbach A, Illes P. (2004) Somatic and axonal effects of ATP via P2X₂ but not P2X₇ receptors in rat thoracolumbar sympathetic neurones. *J Neurochem*, 90: 359-367.
- Armstrong JN, Brust TB, Lewis RG, MacVicar BA. (2002) Activation of presynaptic P2X₇-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 22 (14): 5938–5945. *J Neurosci*, 1 (7): 602-609.
- Atkinson L, Batten TF, Deuchars J. (2000) P2X₂ receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex and area postrema of the rat. *Neuroscience*, 99, 683-696.
- Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Deuchars J. (2002) An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature*, 420: 6911-6942
- Atkinson L, Batten TF, Moores TS, Varoqui H, Erickson JD, Deuchars J. (2004) Differential co-localisation of the P2X₇ receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience*, 123: 761-768.
- Backlund L, Nikamo P, Hukic DS, Ek IR, Träskman-Bendz L, Landén M, Edman G, Schalling M, Frisén L, Osby U. (2011) Cognitive manic symptoms associated with the P2RX₇ gene in bipolar disorder *Bipolar Disord.*: 13(5-6):500-8.
- Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R. (1996) Rat astroglial P2Z (P2X₇) receptors regulate

intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, 7: 2533-2537.

- Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott AB. (1997) ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 17, 5297-5304
- Barik J and Wonnacott S. (2006) Indirect modulation by alpha7 nicotinic acetylcholine receptors of noradrenaline release in rat hippocampal slices: interaction with glutamate and GABA systems and effect of nicotine withdrawal. *Molecular pharmacology* 69:618-628.
- Barrientos, R.M., Frank, M.G., Hein, A.M., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F. (2009) Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain, behavior, and immunity* 23, 46-54.
- Beigi, R.D., Kertesy, S.B., Aquilina, G., Dubyak, G.R. (2003) Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *British journal of pharmacology* 140, 507-519.
- Bernardino, L., Balosso, S., Ravizza, T., Marchi, N., Ku, G., Randle, J.C., Malva, J.O., Vezzani, A. (2008). Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release. *Journal of neurochemistry* 106, 271-280.
- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, 376 (1-2): 127-138.
- Boarder MR and Webb, T.E. (2001) P2Y receptors: structure and function. In: *Handbook of Experimental Pharmacology: Purinergic and Pyrimidinergic Signalling*, Vol. 151/I, MP Abbracchio, Williams, M eds, Springer, Berlin, pp 65-89.
- Boehm S. (1999) ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. *The Journal of neuroscience* 19:737-746.
- Boehm S and Kubista H. (2002) Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacological reviews* 54:43-99.
- Boeynaems JM, Communi D, Savi P, Herbert JM. (2000) P2Y receptors: in the middle of the road. *Trends Pharmacol Sci*, 21 (1): 1-3.

- Borst MM and Schrader J. (1991) Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circulation research* 68:797-806.
- Boucher AA, Arnold JC, Hunt GE, Spiro A, Spencer J, Brown C, McGregor IS, Bennett MR, Kassiou M. (2011) Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test *Neurosci*, 189:170:177
- Bowley MP, Drevets WC, Ongür D, Price JL. (2002) Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. : 52(5):404-12
- Bowser DN and Khakh BS. (2004) ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J Neurosci*, 24 (39): 8606-8620.
- Brautigam, V.M., Frasier, C., Nikodemova, M., Watters, J.J. (2005). Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. *Journal of neuroimmunology* 166, 113-125.
- Brough, D., Le Feuvre, R.A., Iwakura, Y., Rothwell, N.J. (2002) Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Molecular and cellular neurosciences* 19, 272-280.
- Brough D, Le Feuvre RA, Wheeler RD, Solovyova N, Hilfiker S, Rothwell NJ, Verkhratsky A. (2003) Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages. *J Immunol*, 170: 3029-3036.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF. (2002) Heteromultimeric P2X1/2 receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 673–680.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Peteresen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. (2005) Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol*, 174: 3880-3890.
- Burnstock G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules.
- Burnstock G. (2006a) Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacology & therapeutics* 110:433-454.
- Burnstock G. (2006b) Purinergic signalling--an overview. *Novartis Foundation symposium* 276:26-48; discussion 48-57, 275-281.
- Cadet JL and Brannock C (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international* 32:117-131.
- Castren E (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6:241-6.
- Castro JE, Varea E, Márquez C, Cordero MI, Poirier G, Sandi C. (2010) Role of the amygdala

in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat. *PLoS One*. 8;5(1):e8618.

Cavaliere F, D' Ambrosi N, Ciotti MT, Mancino G, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C. (2001) Glucose deprivation and chemical hypoxia: neuroprotection by P2 receptor antagonists. *Neurochem Int*, 38: 189-97.

Cavaliere, F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C. (2004) Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24: 392-398.

Chakravarty, S. and Herkenham, M. (2005) Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *The Journal of neuroscience* 25, 1788-1796.

Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Berquma DJ, Wilson S, Livi GP. (2000) A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem*, 275: 10767–10771.

Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., Grahames, C.B., Casula, M.A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., Buell, G.N. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386-396.

Chin J. and Kostura MJ. (1993) Dissociation of IL-1 beta synthesis and secretion in human blood monocytes stimulated with bacterial cell wall products. *J Immunol*, 151 (10): 5574-5585.

Chizh BA and Illes P. (2001) P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev*, 53, 553-568.

Choi DW (1987a) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.

Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987b) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.

Choi, H.B., Ryu, J.K., Kim, S.U., McLarnon, J.G. (2007) Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *The Journal of neuroscience* 27, 4957-4968.

Chvatchko Y, Valera S, Aubry JP, Renno T, Buell G, Bonnefoy JY. (1996) The involvement of an ATP-gated ion channel, P (2X1), in thymocyte apoptosis. *Immunity*, 5 (3): 275-283.

- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP. (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. *Nature*, 407, 1011-1015.
- Cockcroft S. and Gomperts BD. (1980) The ATP₄-receptor of rat mast cell. *J. Biochem*, 188 (3): 789-98.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem*, 278 (2): 1354-1362.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. (1997) Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology*, 36, 1277-1283.
- Coppen A. (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113:1237-64.
- Cotrina ML, Lin JH, López-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M. (2000) ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20 (8): 2835-2844.
- Csölle C., Andó RD., Kittel Á., Gölöncsér F., Baranyi M., Soproni K., Zelena D., Haller J., Németh T., Mócsai A., Sperlágh B. (2013): The absence of P2X₇ receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.*: 16(1):213-33
- Cunha RA and Ribeiro JA. (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life sciences* 68:119-137.
- Cunningham, C., Sanderson, D.J. (2008) Malaise in the water maze: Untangling the effects of LPS and IL-1beta on learning and memory. *Brain, behavior, and immunity.*: 22(8):1117-27
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. (2003) ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol*, 89 (4): 1870-1877.
- Deckert J, Jorgensen MB. (1988) Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A₁ receptors in the CA1 region of rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 12;446(1):161-4.
- de Groot, J.R., Veenstra, T., Verkerk, A.O., Wilders, R., Smits, J.P., Wilms-Schopman, F.J., Wiegerinck, R.F., Bourier, J., Belterman, C.N., Coronel, R., Verheijck, E.E. (2003) Conduction slowing by the gap junctional uncoupler carbenoxolone. *Cardiovascular research* 60, 288-297.

- Denlinger LC, Fisetto PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ. (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 167 (4): 1871-1876.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fisetto PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ. (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol*, 171 (3): 1304-1311.
- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*, 21: 7143-7152.
- Di Virgilio F. (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *J Immunol Today*, 16: 524-528.
- Di Virgilio F. (2003) Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol*, 140 (3): 441-443. Review.
- Dixon AK, Gubitzi AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol*, 118, 1461-1468.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P. (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem*, 281 (41): 30684-30696.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*.15;23(4):1320-8.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54:597-606
- Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R. (2005) Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29:891-909.
- Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. (2001) P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*, 65, 107-134.
- Dunwiddie TV and Masino SA. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 24, 31-55.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359, 144-147.

- Erecinska M and Silver IA (1996) Calcium handling by hippocampal neurons under physiologic and pathologic conditions. *Advances in neurology* 71:119-136.
- Fassio A, Rossi F, Bonanno G and Raiteri M. (1999) GABA induces norepinephrine exocytosis from hippocampal noradrenergic axon terminals by a dual mechanism involving different voltage-sensitive calcium channels. *Journal of neuroscience research* 57:324-331.
- Fastbom J, Pazos A, Probst A, Palacios JM. (1987) Adenosine A1 receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, 22(3):827-39.
- Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem*, 281 (7): 4274-4284.
- Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F. (1996) Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol*, 156: 1531-1539.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. (1997a) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*, 159: 1451-1458.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. (1997b) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*, 185 (3): 579-582.
- Fiebich, B.L., Biber, K., Lieb, K., van Calker, D., Berger, M., Bauer, J., Gebicke-Haerter, P.J. (1996) Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Glia* 18, 152-160.
- Fields RD and Stevens B. (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23, 625-633
- Filippov AK, Barnard EA and Brown DA. (2000) The adenine nucleotide P2Y(1) receptor (highly abundant in brain) couples to both N-type Ca²⁺ and M-type K⁺ channels in neurons. *British Journal of Pharmacology* 129:U30-U30.
- Franke H and Illes P. (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & therapeutics* 109:297-324.
- Fredholm BB, Adén U, Lindström K, Bona E, Hagberg H. (1996) Caffeine and ischemia-effects on immediate early genes and adenosine receptors. *Adv Neurol*, 71: 469-474.
- Freist W, Verhey JF, Stühmer W, Gauss DH. (1998) ATP binding site of P2X channel proteins:

structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett*, 434 (1-2): 61-65.

- Frohlich R, Boehm S and Illes P. (1996) Pharmacological characterization of P2 purinoceptor types in rat locus coeruleus neurons. *European journal of pharmacology* 315:255-261.
- Fumagalli M, Trincavelli L, Lecca D, Martini C, Ciana P and Abbracchio MP. (2004) Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. *Biochemical pharmacology* 68:113-124.
- Geng MY, Saito H, Nishiyama N. (1997) Protective effects of pyridoxal phosphate against glucose deprivation-induced damage in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*, 68: 2500-2506.
- Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem*, 77 (1): 84-93.
- Gordon JL. (1986) Extracellular ATP: effect, sources and fate. *J Biochem*, 233 (2): 309-319. Review.
- Gourine, A.V., Poputnikov, D.M., Zhernosek, N., Melenchuk, E.V., Gerstberger, R., Spyer, K.M., Gourine, V.N. (2005) P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *British journal of pharmacology* 146, 139-145.
- Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. (1999) Pharmacological characterization of ATP-and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br J Pharmacol*, 127: 1915-1921.
- Green EK, Grozeva D, Raybould R, Elvidge G, Macgregor S, Craig I, Farmer A, McGuffin P, Forty L, Jones L, Jones I, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, Craddock N. (2009) P2RX7: A bipolar and unipolar disorder candidate susceptibility Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. : 150B(8):1063-9.
- Griffiths, R.J., Stam, E.J., Downs, J.T., Otterness, I.G. (1995) ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 154, 2821-2828.
- Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petron S, Wiley JS. (2004) An Arg 307 to Gln polymorphism within the ATP binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 279 (30): 31287-

31295.

- Gu JG and MacDermott AB. (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*, 389, 749-753.
- Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubyak GR. (2003) Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1 β secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C286-299.
- Guerra, A.N., Fisette, P.L., Pfeiffer, Z.A., Quinchia-Rios, B.H., Prabhu, U., Aga, M., Denlinger, L.C., Guadarrama, A.G., Abozeid, S., Sommer, J.A., Proctor, R.A., Bertics, P.J. (2003) Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. *Journal of endotoxin research* 9, 256-263.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. (2007) Evidence for functional P2X4/7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol*, 72 (6):1447-1456.
- Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. (2007). Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biological Psychiatry* 62, 1310–1316.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 73: 384-399.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT. (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol*, 70: 770-785.
- Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PP, Michel AD. (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X (7) receptors. *Br J Pharmacol*, 130 (1): 167-173.
- Higgins, G.A., Grzelak, M.E., Pond, A.J., Cohen-Williams, M.E., Hodgson, R.A., Varty, G.B. (2007) The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2A receptors. *Behavioural brain research* 185, 32-42.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D and Conley PB. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.
- Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. (1998) Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*, 273: 27170-2717
- Hugel S and Schlichter R (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic

transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *The Journal of neuroscience* 20:2121-2130.

- Humphreys, B.D. and Dubyak, G.R. (1998) Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *Journal of leukocyte biology* 64, 265-273.
- Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A.P., Dahl, G., Spray, D.C., Scemes, E. (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *American journal of physiology* 295, C752-760.
- Inoue K. (1998) ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Japanese journal of pharmacology* 78:405-410.
- Jeftinija SD, Jeftinija KV. (1998) ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. *Neuroscience*, 82 (39): 927-934.
- Jiang, L.H., Mackenzie, A.B., North, R.A., Surprenant, A. (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Molecular pharmacology* 58, 82-88.
- Jin YH, Bailey TW, Andresen MC. (2004) Cranial afferent glutamate heterosynaptically modulates GABA release onto second-order neurons via distinctly segregated metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*, 24 (42): 9332-9340.
- John GR, Simpson JE, Woodroffe MN, Lee SC, Brosnan CF. (2001) Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *J Neurosci*, 21: 4134-4142.
- Jonzon B and Fredholm BB. (1984) Adenosine receptor mediated inhibition of noradrenaline release from slices of the rat hippocampus. *Life Sci*, 35 (19): 1971-1979.
- Juranyi Z, Sperlagh B. and Vizi ES. (1999) Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Brain research* 823:183-190.
- Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Won MH. (2004) GABA (B) receptor-mediated regulation of P2X7 receptor expression in the gerbil hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 121: 12-18.
- Kato F, Shigetomi E. (2001) Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol*, 530 (Pt3): 469-486.
- Kauppinen RA, McMahon HT and Nicholls DG. (1988) Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca²⁺ concentration in

isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience* 27:175-182.

- Kawamura M, Gachet C, Inoue K and Kato F. (2004) Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice. *The Journal of neuroscience* 24:10835-10845.
- Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C.E., Mills, K.H., Lynch, M.A. (2003) Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *The Journal of biological chemistry* 278, 19453-19462.
- Khakh BS and Henderson G. (1998) ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol*, 54 (2): 372-378.
- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA. (1999) Allosteric control of gating and kinetics at P2X (4) receptor channels. *J Neurosci*, 19 (17): 7289-7299.
- Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A. (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci*, 23: 7426–7437.
- Khakh BS. (2009) ATP-gated P2X receptors on excitatory nerve terminals onto interneurons initiate a form of asynchronous glutamate release. *Neuropharmacology*, 56 (1): 216-222.
- Kim, S.H., Kim, J., Sharma, R.P. (2004a) Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacological research* 49, 433-439.
- Kim, S.H., Smith, C.J., Van Eldik, L.J. (2004b) Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiology of aging* 25, 431-439.
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G. (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci*, 20 (13): 4871-4877.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K. (2005) Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol*, 481 (4): 377-390.
- Koch H, von Kugelgen I and Starke K. (1997) P2-receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*

355:707-715.

- Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K. (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci, U. S. A.* 100 (19): 11023-11028.
- Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brissette, W., Wicks, J.R., Audoly, L., Gabel, C.A. (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 168, 6436-6445.
- Laye, S., Gheusi, G., Cremona, S., Combe, C., Kelley, K., Dantzer, R., Parnet, P. (2000) Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *American journal of physiology* 279, R93-98.
- Le Feuvre, R., Brough, D., Rothwell, N. (2002a) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *European journal of pharmacology* 447, 261-269.
- Le Feuvre, R.A., Brough, D., Iwakura, Y., Takeda, K., Rothwell, N.J. (2002b) Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *The Journal of biological chemistry* 277, 3210-3218.
- Le Feuvre RA, Brough D, Touzani O, Rothwell NJ. (2003) Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23: 381-384.
- Lê KT, Babinski K, Séguéla P. (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci*, 18 (18): 7152-7159.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, 377 (6548): 432-435.
- Li, Y., Dong, J.B., Wu, M.P. (2008) Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice. *European journal of pharmacology* 590, 417-422.
- Loo H, Saiz-Ruiz J, Costa e Silva J. (1999) Efficacy and safety of tianeptine in the treatment of depressive disorders in comparison with fluoxetine. *J Affect Disord* 56:109-18.
- Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG. (2003) Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem*, 278 (7): 4590-4596.

- Lorenzen A and Schwabe R. (2001) P1 receptors. In: Handbook of Experimental pharmacology: Purinergic and pyrimidinerbic signalling, Vol. 151/1, pp 19-47.
- Luthardt J, Borvendeg JS, Sperlágh B, Illes P. (2002) P2Y receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem. Int.* 1238, 1–12.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-257.
- Martinez-Francois, J.R., Morales-Tlalpan, V., Vaca, L. (2002) Characterization of the maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblasts. *The Journal of physiology* 538, 79-86.
- McQuillin A, Bass NJ, Choudhury K, Puri V, Kosmin M, Lawrence J, Curtis D, Gurling HM. (2009) Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders. *Mol Psychiatry*. : (6):614-20.
- Marques F, Sousa JC, Coppola G, Falcao AM, Rodrigues AJ, Geschwind DH, Sousa N, Correia-Neves M, Palha JA. (2009) Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 921–932.
- Marsh B, Stevens SL, Packard AE, Gopalan B, Hunter B, Leung PY, Harrington CA, Stenzel-Poore MP. (2009) Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3. *Journal of Neuroscience* 29, 9839–9849.
- Mastronardi C, Whelan F, Yildiz OA, Hannestad J, Elashoff D, McCann SM, Licinio J, Wong ML. (2007). Caspase 1 deficiency reduces inflammation-induced brain transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 7205–7210.
- Meador-Woodruff JH, Hogg AJ, Smith RE. (2001). Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Brain Research Bulletin* 55, 631–640.
- Mehta VB, Hart J, Wewers MD. (2001) ATP- stimulated Release of Interleukin (IL)-1beta and IL-18 Requires Priming by Lipopolysaccharide and Is Independent of Caspase-1 Cleavage. *J Biol Chem*, 276: 3820-3826.
- Mennini T, Mocaer E, Garattini S. (1987) Tianeptine, a selective enhancer of serotonin uptake

in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:478-82.

- Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. (1999) Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359 (2): 102-109.
- Milusheva E, Doda M, Pasztor E, Lajtha A, Sershen H and Vizi ES. (1992) Regulatory interactions among axon terminals affecting the release of different transmitters from rat striatal slices under hypoxic and hypoglycemic conditions. *Journal of neurochemistry* 59:946-952.
- Milusheva EA, Doda M, Baranyi M and Vizi ES. (1996) Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca²⁺]_o-dependent and independent release of [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neurochemistry international* 28:501-507.
- Milusheva EA. and Baranyi M. (2003b) Implication of ionotropic glutamate receptors in the release of noradrenaline in hippocampal CA1 and CA3 subregions under oxygen and glucose deprivation. *Neurochemistry international* 43:543-550.
- Mingam, R., De Smedt, V., Amedee, T., Bluthe, R.M., Kelley, K.W., Dantzer, R., Laye, S. (2008) In vitro and in vivo evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 beta in the murine brain. *Brain, behavior, and immunity* 22, 234-244.
- Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Giraldez L, Hervas C, Gomez-Villafuertes R, Sen RP, Gualix J, Pintor J. (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res*, 28: 1597–1605.
- Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. (1994) Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. *J Exp Med*, 180 (4): 1499-1509.
- Moran-Jimenez MJ and Matute C. (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain research* 78:50-58.
- Mori M, Heuss C, Gahwiler BH, Gerber U. (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol*, 535, 115-123
- Mosley B, Dower SK, Gillis S, Cosman D. (1987) Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta. *Proc Natl Acad Sci, U. S. A.* 84 (13): 4572-4576.

- Muller M and Somjen GG. (2000) Na(+) and K(+) concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83:735-745.
- Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ. (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature*, 403, 86-89.
- Mundo E, Tharmalingham S, Neves-Pereira M, Dalton EJ, Macciardi F, Parikh SV, Bolonna A, Kerwin RW, Arranz MJ, Makoff AJ, Kennedy JL. (2003). Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Molecular Psychiatry* 8, 241–245.
- Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, Di Virgilio F. (1992) Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J744 mouse macrophages. *J Biochem*, 15: 288 (Pt3): 897-901.
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Ripa M, Di Virgilio F. (1993) Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem*, 268: 8199-8203.
- Nakai T, Milusheva E, Baranyi M, Uchihashi Y, Satoh T and Vizi ES (1999) Excessive release of [3H]noradrenaline and glutamate in response to simulation of ischemic conditions in rat spinal cord slice preparation: effect of NMDA and AMPA receptor antagonists. *European journal of pharmacology* 366:143-150.
- Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. (2005) The cytokine IL-1 beta transiently enhances P2X₇ receptor expression and function in human astrocytes. *Glia*, 49 (2): 245-258.
- Neary JT, Zhu Q, Kang Y, Dash PK. (1996) Extracellular ATP induces formation of AP-1
- Nguyen, K.T., Deak, T., Owens, S.M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F. (1998) Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *The Journal of neuroscience* 18, 2239-2246.
- Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F. (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits. *J Neurochem*, 92 (4): 925-933.
- Nieber K, Poelchen W, Illes P. (1997) Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. *Br J Pharmacol*, 122, 423-430.
- Nolan, E.B., Harrison, L.M., Lahoste, G.J., Ruskin, D.N. (2007) Behavioral synergism between D(1) and D(2) dopamine receptors in mice does not depend on gap junctions. *Synapse* (New York, N.Y 61, 279-287.

- North RA and Surprenant A. (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 563-580.
- North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82:1013-1067.
- Nowak G, Legutko B, Skolnick P, Popik P (1998). Adaptation of cortical NMDA receptors by chronic treatment with specific serotonin reuptake inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 342, 367–370
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24;109(4):E197-205
- Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA. (2001) P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 21: 7135-7142
- Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O. (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 10 (12): 3898-3902.
- Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A. (2002) Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somatosensory cortex. *J Physiol*, 542 (Pt 2): 529-536.
- Papp, L., Balazsa, T., Kofalvi, A., Erdelyi, F., Szabo, G., Vizi, E.S., Sperlagh, B. (2004a) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310, 973-980.
- Papp, L., Vizi, E.S., Sperlagh, B. (2004b) Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor^{-/-} mice. *Neuroreport* 15, 2387-2391.
- Papp, L., Vizi, E.S., Sperlagh, B. (2007) P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications* 355, 568-574.
- Patti L, Raiteri L, Grilli M, M Parodi M, Raiteri M, Marchi M. (2006) P2X(7) receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic alpha7 nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals. *Neuropharmacology* 50,

705–713.

- Pelegriin, P. and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* 25, 5071-5082.
- Pelegriin, P. and Surprenant, A. (2007) Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 282, 2386-2394.
- Perreau M, Bondy SC, Cotman CW, Sharman KG, Sharman EH. (2007) Melatonin treatment in old mice enables a more youthful response to LPS in the brain. *Journal of Neuroimmunology* 182, 22–31.
- Perregaux, D. and Gabel, C.A. (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of biological chemistry* 269, 15195-15203.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Pittaluga A. and Raiteri M. (1992) N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. I. Location on axon terminals and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 232–237.
- Poelchen W, Sieler D, Wirkner K and Illes P. (2001) Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience* 102:593-602.
- Price GD, Robertson SJ, Edwards FA. (2003) Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission induced by activation of presynaptic P2Y receptors in the rat medial habenula nucleus. *Eur J Neurosci*, 17 (4): 844-850.
- Qu Y., Franchi, L., Nunez, G., Dubyak, G.R. (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 179, 1913-1925.
- Quan N., Zhang, Z., Emery, M., Bonsall, R., Weiss, J.M. (1996) Detection of interleukin-1 bioactivity in various brain regions of normal healthy rats. *Neuroimmunomodulation* 3, 47-55.
- Queiroz G, Talaia C and Goncalves J. (2003) ATP modulates noradrenaline release by

activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307:809-815.

Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H. (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in immunology* 27, 24-31.

Ralevic V and Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50:413-492.

Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Suprenant A. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem*, 272: 5482-5486.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagbi F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol*, 59 (6): 663-690. Review.

Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA. (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A₁-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol*, 5, 1037-1048

Resende R.R, Majumder P, Gomes KN, Britto LR, Ulrich H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience* 146, 1169–1181.

Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. (1995) Immunohistochemical detection of A₁ adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res*, 677, 193-203.

Robertson SJ, Ennion SJ, Evans RJ, Edwards FA. (2001) Synaptic P2X receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 11 (3): 378-386.

Roche M., Diamond, M., Kelly, J.P., Finn, D.P. (2006) In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *Journal of neuroimmunology* 181, 57-67.

Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR and Cunha RA. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X₁, P2X_{2/3}, and P2X₃ and inhibitory P2Y₁, P2Y₂, and/or P2Y₄ receptors in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience* 25:6286-6295.

Rogers M, Colquhoun LM, Patrick JW, Dani JA. (1997) Calcium flux through predominantly

independent purinergic ATP and nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurophysiol*, 77, 1407-1417.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321

Rubio M. and Soto F. (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci*, 21, 641-653.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. (2008). Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 426–437.

Sanz JM. and Di Virgilio F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol*, 164: 4893-4898.

Sattler R. and Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78:3-13

Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. (2005) Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:201-17.

Schildkraut JJ. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-22

Schwiebert EM. (2000) Extracellular ATP mediated propagation of Ca(2+) waves. Focus on mechanical strain-induced Ca(2+) waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2): C281-283.

Shigetomi E. and Kato F. (2004) Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci*, 24 (12): 3125-3135.

Simi A., Porsmyr-Palmertz, M., Hjerten, A., Ingelman-Sundberg, M., Tindberg, N. (2002) The neuroprotective agents chlomethiazole and SB203580 inhibit IL-1beta signalling but not its biosynthesis in rat cortical glial cells. *Journal of neurochemistry* 83, 727-737.

Simi A., Tsakiri, N., Wang, P., Rothwell, N.J. (2007) Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochemical Society transactions* 35, 1122-1126.

Simmons DA. and Broderick PA. (2005) Cytokines, stressors, and clinical depression: augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:793-807.

Simon J, Filippov AK, Goransson S, Wong YH, Frelin C, Michel AD, Brown DA and Barnard

- EA. (2002) Characterization and channel coupling of the P2Y(12) nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277:31390-31400.
- Skaper SD, Debetto P, Giusti P. (2009) P2X₇ Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2009: 861324.
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R. (1996). Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 29, 23–26.
- Sluyter R, Dalitz JG, Wiley JS. (2004) P2X₇ receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes Immun*, 5: 588-591.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petron S. (2003) P2X₇ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *Chem*, 278 (10): 8853-8860.
- Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Todorova SM, Westfall DP, Nickel P, Kennedy C. (2000) The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol*, 129, 1089-1094.
- Solle M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *The Journal of biological chemistry* 276, 125-132.
- Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN. (2000) Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature*, 407, 1015-1017.
- Sperlágh (1996) Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Semin. Neorisci.* 8:175-185.
- Sperlágh B, Hasko G, Nemeth Z, Vizi ES. (1998) ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264,7 macrophage cell line via P2Z/P2X₇ receptors. *Neurochem Int*, 33: 209-215.
- Sperlágh B, Erdelyi F, Szabo G and Vizi ES (2000a) Local regulation of [(3)H]-noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P(2X)-receptors located on axon terminals. *British journal of pharmacology* 131:1775-1783.
- Sperlágh B, Doda M, Baranyi M and Hasko G (2000b) Ischemic-like condition releases

norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. *Journal of neuroimmunology* 111:45-54.

Sperlágh B, Kofalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ and Vizi ES (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 81:1196-1211.

Sperlágh B, Szabo G, Erdelyi F, Baranyi M, Vizi ES. (2003) Homo- and hetero-P2X Receptors Regulate Hippocampal Noradrenaline Release exchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system. *Br J Pharmacol*, 139: 623–633.

Sperlágh, B., Vizi, E.S., Wirkner, K., Illes, P. (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology* 78, 327-346.

Sperlágh B, Zsilla G, Baranyi M, Illes P, Vizi ES (2007) Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus. *Neuroscience* 149:99-111

Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intracellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci*, 26 (5): 1378-1385.

Suh BC Kim JS, Namgung U, Ha H, Kim KT. (2001) P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol*, 166: 6754-6763.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272: 735–738.

Suzuki E., Kessler M., Montgomery K. and Arai A. C. (2004) Divergent effects of the purinoceptor antagonists suramin and pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphtylazo-6'nitro-4',8'-disulfonate) (PPNDS) on α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Mol. Pharmacol.* 66, 1738–1747.

Thompson SM, H L Haas HL, Gähwiler BH. (1992) Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol.* 451: 347–36.

Thompson SM, Capogna M, Scanziani M. (1993) Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 16(6):222-7.

Thornberry N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in

monocytes. *Nature* 356, 768-774.

- Tokuyama Y, Hara M, Jones EM, Fan Z and Bell GI. (1995) Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. *Biochemical and biophysical research communications* 211:211-218.
- Tonazzini I, Trincavelli ML, Storm-Mathisen J, Martini C, Bergersen LH. (2007) Co-localization and functional cross-talk between A1 and P2Y1 purine receptors in rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 26, 890–902
- Toro C, Deakin JF. (2005) NMDA receptor subunit NRI and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Schizophrenia Research* 80, 323–330.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM. (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol*, 54, 989-993.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*, 274: 6653–6659.
- Tsutsui S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V.W., Winston, B.W., Warren, K., Power, C. (2004) A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience* 24, 1521-1529.
- Uchihashi Y, Bencsics A, Umeda E, Nakai T, Sato T and Vizi ES. (1998) Na⁺ channel block prevents the ischemia-induced release of norepinephrine from spinal cord slices. *European journal of pharmacology* 346:145-150.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371, 516-519.
- Verderio C. and Matteoli, M. (2001) ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 166, 6383-6391.
- Vereker E., Campbell, V., Roche, E., McEntee, E., Lynch, M.A. (2000) Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. *The Journal of biological chemistry* 275, 26252-26258.
- Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR. (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol*,

170 (11): 5728-5738.

- Vizi ES. (1972) Stimulation, by inhibition of (Na + -K + -Mg²⁺)-activated ATP-ase, of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. *The Journal of physiology* 226:95-117.
- Vizi ES. (2000) Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacological reviews* 52:63-89.
- Volonte C. and Merlo D. (1996) Selected P2 purinoceptor modulators prevent glutamate-evoked cytotoxicity in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*, 45: 183-193.
- Volonte C, Ciotti MT, D'Ambrosi N, Lockhart B. Spedding M. (1999) Neuroprotective effects of modulators of P2 receptors in primary culture of CNS neurones. *Neuropharmacology*, 38: 1335-1342.
- von Kugelgen I, Kurz K and Starke K (1993) Axon terminal P2-purinoceptors in feedback control of sympathetic transmitter release. *Neuroscience*, 56:263-267.
- von Kugelgen I (1994) Purinoceptors modulating the release of noradrenaline. *Journal of autonomic pharmacology* 14:11-12.
- von Kugelgen I, Norenberg W, Koch H, Meyer A, Illes P and Starke K (1999) P2-receptors controlling neurotransmitter release from postganglionic sympathetic neurones. *Progress in brain research* 120:173-182.
- von Kugelgen I and Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schwiedebergs Arch. Pharmacol*, 362 (4-5): 310-323.
- von Kugelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 110:415-432.
- Walter L, Dinh T, Stella N. (2004) ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J Neurosci*, 24: 8068-8074.
- Wang J, Chambers G, Cottrell JE, Kass IS. (2000) Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83:3462-3472.
- Wang CM, Chang YY, Kuo JS, Sun SH. (2002) Activation of P2X (7) receptors induced [(3)H] GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl(-)/HCO(3)(-)-dependent mechanism. *Glia*, 37 (1): 8-18.

- Wang CM, Chang YY, Sun SH. (2003) Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal*, 15: 1129-1137.
- Weight FF, Li C, Peoples RW. (1999) Alcohol action on membrane ion channels gated by extracellular ATP (P2XR_s). *Neurochem Int*, 35 (2): 143-152. Review.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA and Krause GS. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the neurological sciences* 179:1-33.
- Wieraszko A, Goldsmith G, Seyfried TN. (1989) Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slice. *Brain Res*, 485: 244-250.
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Li C, Shemon AN, Gu BJ, Smart ML, Fuller SJ, Barden JA, Petron S, Sluyter R. (2003) An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 278 (19): 17108-17113.
- Wirkner, K., Kofalvi, A., Fischer, W., Gunther, A., Franke, H., Groger-Arndt, H., Norenberg, W., Madarasz, E., Vizi, E.S., Schneider, D., Sperlagh, B., Illes, P. (2005) Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. *Journal of neurochemistry* 95, 1421-1437.
- Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petron S, Wiley JS, Barden JA. (2002) Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X (7) receptor function. *FEBS Lett*, 512 (1-3): 43-46.
- Yoshioka K, Saitoh O and Nakata H. (2001) Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7617-7622.
- Yoshioka K, Saitoh O and Nakata H. (2002) Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells. *FEBS letters* 523:147-151.
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Pizzo P, Di Virgilio F. (1990) Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J Immunol*, 145 (5): 1545-1550.
- Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Fan, J., Cui, J., Deng, X. (2008) Effects of florfenicol on early cytokine responses and survival in murine endotoxemia. *International immunopharmacology* 8, 982-988.
- Zona C, Marchetti C, Volonte C, Mercuri NB, Bernardi G. (2000) Effect of P2 purinoceptor

antagonists on kainate-induced currents in rat cultured neurons. *Brain Res*, 882: 26-35.

12. Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Csölle C, Heinrich A, Kittel A, Sperlagh B.: P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. (2008) J Neurochemistry.: 106:(1) 347-360, IF: 4.500
2. Csölle C, Sperlág B.: Peripheral origin of IL-1beta production in the rodent hippocampus under in vivo systemic bacterial lipopolysaccharide (LPS) challenge and its regulation by P2X(7) receptors. (2010) J Neuroimmunology: 219(1-2):38-46., IF:3.159
3. Csölle C., Andó RD.,Kittel Á., Gölöncsér F., Baranyi M., Soproni K., Zelena D., Haller J., Németh T., Mócsai A., Sperlág B. (2013): The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. Int J Neuropsychopharmacol.: 16(1):213-33, IF:4.578

Egyéb közlemények

1. Sperlág B, Heinrich A, Csölle C.: P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release--an update. (2007) Purinergic Signaling: 3: 269-284
2. Heinrich A, Kittel A, Csölle C, Vizi ES, Sperlagh B.: Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord (2008) Neuropharmacology: 54:(2) 375-386 , IF: 3.383
3. Csölle C, Sperlág B.: Endocannabinergic modulation of IL-1 β level/production in mouse hippocampus under basal conditions and after in vivo systemic LPS stimulation. (2011) Neuroimmunomodulation: (4), 226-231, IF: 2.383
4. Hracskó Zs, Baranyi M, Csölle C, Gölöncsér F, Madarász E, Kittel Á and Sperlág B.: Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease (2011) Mol. Neurodegener.: 6: 28, IF: 5.09
5. Andó RD., Bíró J, Csölle C., Ledent C., Sperlág B.: The inhibitory action of exo-

and endocannabinoids on [3H]GABA release are mediated by both CB1 and CB2 receptors in the mouse hippocampus

(2011) *Neurochem Int.*: 60(2):145-52 Volume , IF: 2.857

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

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetnyilvánításomban első helyen kell megemlítenem témavezetőmet és tudományos mentoromat, Sperlách Beáta professzor Asszonyt, aki felhívta figyelmemet a purinerg neurotranszmisszió és neuromoduláció izgalmas kutatási területére, és már igen hamar lehetőséget adott önálló elképzeléseim megvalósítására. Az általa létrehozott inspiráló légkör nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a fenti kutatási terület számomra gyümölcsöző témának bizonyult.

Hálás köszönettel tartozom a SE Microarray Core facility munkatársainak és Tölgyessy Gergelynek kik a microarray hibridizációt és a biostatistikai értékelést végezték, valamint Likó Istvánnak és a Richter Gedeon Nyrt.-nek akik közreműködésével tudtuk a Taqman validáció kísérletes részét és az adatfeldolgozás megvalósítani.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni közvetlen munkatársaimnak, Heinrich Attilának, Kittel Ágnesnek, Baranyi Máriának és Kőrössi Zsuzsannának, a kísérletekben nyújtott széleskörű támogatásukért, ők azok akik a legfontosabb hozzájárulást nyújtották a kutatásaimhoz.

Ezen kívül köszönettel tartozom a KOKI valamennyi dolgozójának, legfőképpen a Gyógyszerkutatási Osztály dolgozóinak, valamint Selmeczy Zsoltnak.