

Purinerger receptorok patofiziológiája: A P2X7 és a P2Y₁₂ receptor szerepének vizsgálata állatkísérletes modellekben

Doktori értekezés

Koványi Bence Péter

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlággh Beáta, az MTA levelező tagja, címzetes egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Zádori Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Détári László, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Riba Pál, Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tímár Júlia, Ph.D., egyetemi docens
Világi Ildikó, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1 A szkizofrénia.....	6
2.1.1. A szkizofrénia strukturális kórtana	8
2.1.2. A szkizofrénia patomechanizmusának kialakulása: neurotranszmitter diszfunkció és idegfejlődési hipotézisek	9
2.1.3. A szkizofrénia állatmodelljei	11
2.1.4. A szkizofrénia jelenlegi terápiája.....	12
2.2. Purinerg jelátvitel a központi idegrendszerben	14
2.2.1. Az adenzin-5'-trifoszfát (ATP), mint idegrendszeri jelátvivő molekula.....	14
2.2.2. Purinerg receptorok altípusai és a purinerg jelátvitel.....	15
2.2.2.1. Adenzin receptorok.....	16
2.2.2.2. P2 purinerg receptorok.....	16
2.2.2.2.1. P2X receptorok	16
2.2.2.2.2. P2Y receptorok	24
2.2.3. A P2X7 purinerg receptor	24
2.2.3.1. A P2X7 receptor molekuláris jellemzői.....	24
2.2.3.2. A P2X7 receptor farmakológiája	30
2.2.3.3. A P2X7 receptorok szöveti és sejtípus specifikus megoszlása a központi idegrendszerben	35
2.2.3.4. A P2X7 receptor funkciója a központi idegrendszerben.....	36
2.2.4. A P2X7 receptor és a szkizofrénia	40
2.2.5. A P2Y ₁₂ purinerg receptor	44
2.2.6. Idegrendszeri gyulladási folyamatok pszichiátriai zavarok és neuropátiás fájdalom hátterében	45
3. CÉLKITŰZÉSEK	48
4. MÓDSZEREK	50
4.1. Kísérleti állatok	50
4.2. Magatartás vizsgálatok	51
4.3. <i>In vitro</i> [³ H]glutamát felszabadulás mérése.....	52
4.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok.....	53
4.4.1. Agyszelet preparálás	53
4.4.2. Teljes sejt (whole-cell) patch-clamp felvételek agyszeletekben	54
4.5. Génexpressziós kísérletek.....	54
4.5.1. Teljes RNS izolálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés	55
4.5.2. Reverz transzkripció.....	55
4.5.3. Real-time PCR (Taqman [®] próba detekciós alapú).....	56
4.6. Gyulladási citokinek multiplex bead array analízise	58
4.7. Statisztikai analízis	58

5. EREDMÉNYEK	60
5.1. A P2X7 receptor genetikai deléciójának és farmakológiai gátlásának hatása a PCP kiváltotta viselkedési változásokra	60
5.2. Eltérések a P2rx7 mRNS expressziójában a fejlődés egyes szakaszaiban az egér agy prefrontális kéreg és hippokampusz régiójában	66
5.3. Fenciklidin kezelés hatása a P2rx7 mRNS expressziójára az egér agy prefrontális kéreg és hippokampusz régiójában.....	68
5.4. Fenciklidin adás befolyása a P2X7 receptor által közvetített [³ H]glutamát felszabadulásra az egér agy prefrontális kérgében	69
5.5. A P2X7 receptor génkiütésének, illetve farmakológiai gátlásának hatása az NMDA által indukált áramokra az egér agy prefrontális kérgében.....	72
5.6. A P2X7 receptor genetikai deléciója által okozott régióspecifikus génkifejeződési eltérések	74
5.7. A P2Y ₁₂ receptor genetikai deficienciájának hatása gyulladáshoz köthető mediátorok fehérje szintjeire	85
6. MEGBESZÉLÉS	90
6.1. <i>In vivo</i> magatartás vizsgálatok: a P2X7 receptor genetikai deficienciájának és farmakológiai blokádjának hatása a PCP kiváltotta viselkedési változásokra	91
6.2. Fenciklidin kezelés hatása a P2X7 receptor által közvetített [³ H]glutamát felszabadulásra, illetve P2X7R genetikai deficienciájának, illetve farmakológiai gátlásának hatása az NMDA által indukált áramokra az egér agy prefrontális kérgében.....	92
6.3. Génexpressziós vizsgálatok: A P2X7 receptor genetikai deléciójának hatása a PCP kiváltotta génkifejeződési változásokra.....	93
6.4. Gyulladáshoz köthető mediátorok fehérje szintjeinek vizsgálata a P2Y ₁₂ receptor genetikai delécióját, illetve CFA-kezelést követően	95
7. KÖVETKEZTETÉSEK	96
8. ÖSSZEFOGLALÁS	99
9. SUMMARY	100
10. IRODALOMJEGYZÉK	101
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	112
11.1 Az értekezés témájában megjelent publikációk.....	112
11.2 Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent publikációk.....	112
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-MeSATP:	2-metil-tio-ATP
5-HT:	szerotonin, 5-hidroxitriptamin
ACh:	acetilkolin
aCSF:	mesterséges cerebrospinális folyadék (angol kifejezés: artificial cerebrospinal fluid)
$\alpha\beta$ -meATP:	α,β -metilén ATP
AMP/ADP/ATP:	adenozin-5'-mono- / di- / trifoszfát
AMPA:	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propionsav
AR:	adenozin receptor
AS:	aminosav
ATP γ S:	adenozin-5'-O-(3-tio)-trifoszfát
BBG:	Brilliant Blue G
BDNF:	agyi eredetű neurotróf faktor (angol kifejezés: Brain-derived neurotrophic factor)
BzATP:	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP
cAMP:	ciklikus adenzin-5'-monofoszfát
cDNS:	komplementer dezoxiribonukleinsav
COMT:	humán katekolamin-O-metil-transzferáz kódoló gén (<i>Mus musculus</i> esetében: Comt)
Ct:	áttörési ciklusszám (angol kifejezés: threshold cycle)
Cys:	cisztein
DA:	dopamin
DSM:	Mentális rendellenességek kórmeghatározó és statisztikai kézikönyve (angol kifejezés: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)
GABA:	gamma-amino-vajsav (angol kifejezés: gamma-aminobutyric acid)
GLU:	glutamát
Grin1/2a/2b:	NR1/2A/2B N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor alegységeket kódoló gének (<i>Mus musculus</i>)
Grm3:	metabotróp glutamát receptor 3 altípust kódoló gén (<i>Mus musculus</i>)
HPC:	hippokampusz (angol kifejezés: hippocampus)

i.p.:	intraperitoneális
ICD:	Betegségek nemzetközi osztályozása (angol kifejezés: International Classification of Diseases)
IL-1 α /1 β /6/10:	interleukin-1 α /1 β /6/10
KC (CXCL1):	kemokin C (angol kifejezés: chemokine C)
KIR:	központi idegrendszer
KN-62:	1-[N,O-bisz(5-izokinolinszulfonil)-N-metil-1-tirozil]-4-fenilpiperazin
LPS:	lipopoliszacharid
LTP/LTD:	hosszú idejű potenciáció és depresszió (angol kifejezések: long-term potentiation / depression)
MAPK:	mitogén-aktivált protein kináz
mRNS:	hírvivő (angol kifejezés: messenger) ribonukleinsav
NA:	noradrenalin
nAChR:	nikotinos acetilkolin receptor
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NRG1:	humán neuregulin 1 fehérjét kódoló gén (<i>Mus musculus</i> esetében: Nrg1)
oATP:	perjodáttal oxidált ATP
P2RX7:	humán P2X7 receptor alegységet kódoló gén (<i>Mus musculus</i> esetében: P2rx7)
P2ry12:	P2Y ₁₂ receptor altípust kódoló gén (<i>Mus musculus</i>)
P2X7R:	P2X7 receptor
PV:	parvalbumin
PCP:	fenciklidin
PFC:	prefrontális kéreg (angol kifejezés: prefrontal cortex)
PKC:	protein kináz C
PPADS:	piridoxálfoszfát-6-azofenil-2-4-diszulfonsav
SNP:	egy pontos nukleotid polimorfizmus (angol kifejezés: single nucleotide polymorphism)
TNF- α :	tumor nekrozis faktor α
UDP/UTP:	uridin-di- / trifoszfát
VTA:	ventrális tegmentális área

2. BEVEZETÉS

2.1 A szkizofrénia

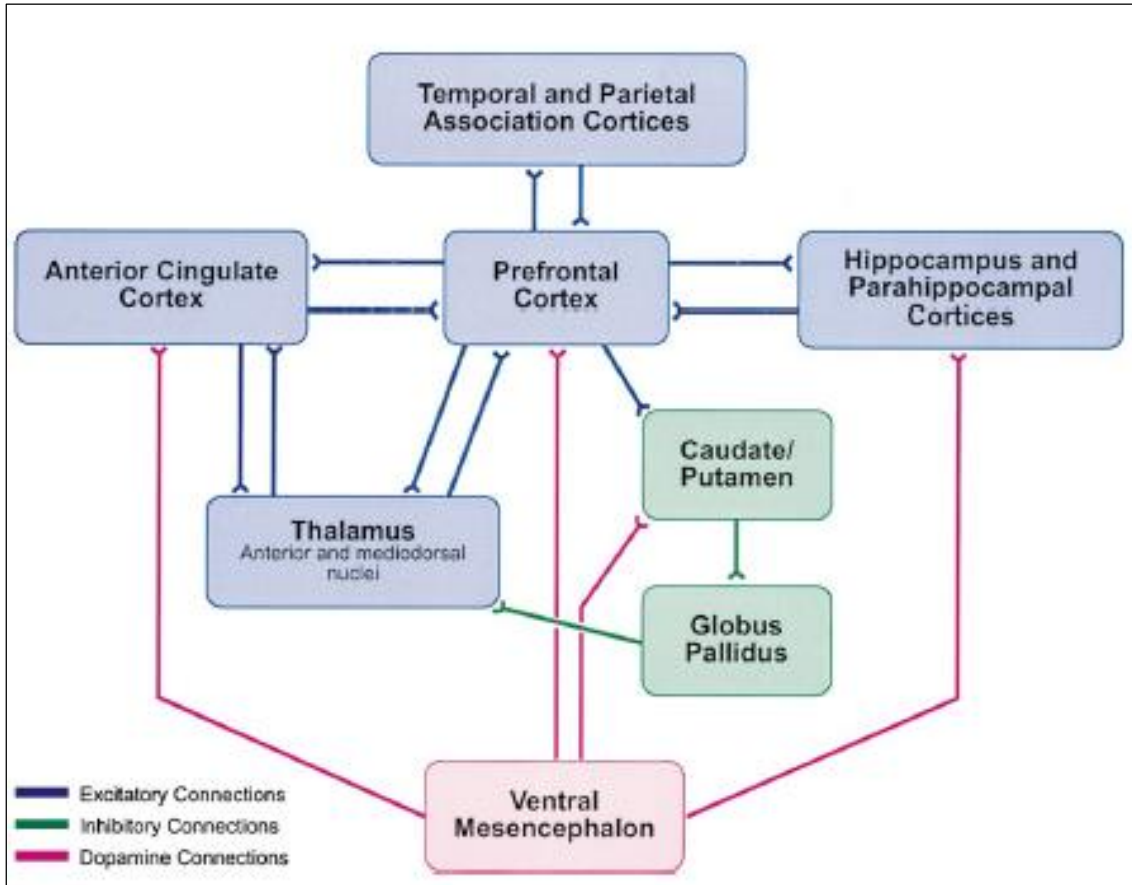
A szkizofrénia egy krónikus pszichiátriai rendellenesség, heterogén genetikai és neurobiológiai háttérrel, amelyek befolyásolják a korai agyi fejlődést¹. A szkizofrénia kifejezést Eugen Bleuler, svájci pszichiáter alkotta a *schizein* (hasadni) és a *phrenos* (mint lélek) görög szavakból². A humán populációban a betegség átlagos élettartam-prevalenciája éppen csak 1% alatt van. Ugyanakkor nagy regionális eltérések mutatkoznak az előfordulási gyakoriság mértékében, nyilvánvalóan a városiasodottságnak és a bevándorlási mintázatoknak köszönhetően. A szkizofrénias emberek átlagos élettartama rövidebb, mint a populáció többi részének, amelynek fő okai az öngyilkosság, illetve a kardiovaszkuláris betegségek. Különbő befolyásolható és nem befolyásolható rizikó faktorok hatással vannak a betegség kialakulására. Ezen tényezők közé tartoznak a prenatális, illetve a születés körüli események, amelyek feltételezhetően hatással lehetnek a fejlődő agy neurális kapcsolataira. Ilyenek például a terhesség alatti komplikációk, abnormális magzati növekedés, továbbá a maternális légzési fertőzések vagy alultápláltság, ideértve a folsav vagy D-vitamin hiányt, különösen a téli hónapokban, mind növelhetik a szkizofrénia kialakulásának valószínűségét. Ezen túlmenően, bár pszichológiai vagy biológiai faktorok még nem tisztázottak, de az idősebb férfiak utódainál nagyobb eséllyel alakulhat ki a betegség, mint fiatal apák gyermekeinek esetében. Férfiak körében valamelyest nagyobb a valószínűsége a szkizofrénia kialakulásának, és általában korábban (20-24 évesen) alakulhat ki, mint a nőknél (25-29 évesen). Mindezek mellett hozzájárulhat a szkizofrénia kifejlődéséhez a városi környezet, a migrációs állapot, drog-használat, illetve a szociális csapások (pl.: gyermekkori bántalmazás)¹. A tünetek megjelenése jellemzően késő serdülőkorban vagy fiatal felnőttkorban kezdődik, azonban ezt megelőző korban fejlődési zavarok, premorbid deficitek figyelhetők meg³.

A betegség azonosítási kritériumai, amelyeket az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által kiadott legújabb, ICD-11 (International Classification of Diseases) közleményükben megjelent, hasonlóak az Amerikai Pszichiátriai Szövetség (American Psychiatric Association) által kiadott DSM-5

(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) közleményben publikáltakhoz. A szkizofréniának összesen hat diagnosztikai kritériuma (A-F) van. Az „A” kritérium tartalmazza az öt legjellegzetesebb tünetet, amelyek közül legalább kettőnek jelen kell lennie 1 hónapos periódus alatt, ezek a téveszmék, hallucinációk, dezorganizált beszéd, nagymértékben rendezetlen vagy katatóniás viselkedés, negatív tünetek (pl.: csökkent érzelmi kifejeződés vagy akarathiány). Az első három tünet mutatja az ún. pozitív tünetek (egészséges emberekre nem jellemző) magját. Habár nem került be az első kritériumok közé, mert nem kellően elkülöníthető a szkizofrénia más „határ” betegségektől, de a kognitív deficitek kiemelkedő szempontjai a szkizofrénia pszichopatológiájának. A „B” kritérium a szociális / foglalkozási zavarokat (munkában, személyek közti kapcsolatokban) tartalmazza. A „C” kritérium szerint az előbbi kritériumokban említett zavaroknak legalább 6 hónapos periódusban jelen kell lenniük. A „D” kritérium a szkizoaffektív és major hangulati zavarok, az „E” kritérium az anyag (drog-használat) illetve általános hangulati körülmény diagnózisból való kizárását tartalmazza. Az „F” kritérium a teljes fejlődésbeli elmaradással vagy az autizmus spektrumzavarral való kapcsolatára tér ki. Míg korábban (DSM-IV) különböző klinikai altípusokat különböztettek meg (dezorganizált, kataton, paranoid és reziduális szkizofrénia), addig a DSM-5 a szkizofrénia klinikai altípusainak használata helyett, pszichopatológiai dimenziókat használ, amely lényegesen javítja a betegség heterogenitásának leírását. Hasonló módosítást hajtottak végre az ICD-11-ben az ICD-10-hez képest⁴, de a DSM-mel ellentétben kódolt kikötéseket vezettek be. Eszerint vannak tüneti minősítők, beleértve a pozitív, negatív, depresszív, mániás és pszichomotoros tüneteket. A betegség lefolyása szerinti minősítők különbséget tesznek az első és többszöri epizódú esetek között, az akut epizód és a teljes vagy részleges remisszió között, illetve az akut és az alattomosan fellépő (első) pszichotikus epizódok között, az eltérő előrejelző következtetések miatt. Egy kognitív minősítő a diagnosztikai és a terápiás szempontok figyelembevételét szolgálja a kognitív problémák funkcionális kimenetelére vonatkozóan⁵. A DSM és az ICD azonosítási kritériumaiban megmaradt az eltérés a tekintetben, hogy meddig kell jelen lenniük a korábban említett tüneteknek, amely az ICD esetében 1 hónapos periódust ír elő, továbbá a beilleszkedési zavar, a DSM kritériumok között szerepel az ICD-vel ellentétben⁴.

2.1.1. A szkizofrénia strukturális kórtana

Strukturális agyi rendellenességeket alaposan dokumentáltak szkizofréniaiban szenvedő egyéneknél. Ezek magukba foglalják az oldalsó és harmadik agykamrák növekedését, illetve a kortikális szürkeállomány és az ahhoz kapcsolódó struktúrák térfogatának csökkenését. Ez utóbbi változások nem mutatnak egységes abnormalitást, hanem inkább elsődlegesen bizonyos kapcsolódó kérgi részekre van hatásuk, ideértve a superior temporális gyrust, a dorzális prefrontális kérget (PFC), és a limbikus területet, mint a hippokampusz (HPC) és az anterior cinguláris kéreg (1. ábra). Ezen szerkezeti rendellenességek közül számos egyértelműen észlelhető a nem-kezelt szkizofrénias betegek első epizódjában, és megjelenhetnek már a betegség klinikai megjelenése előtt. Eszerint ezek az abnormalitások tükrözhetik egy elsődleges betegség folyamatát, és nem egy másodlagos következménye a betegségnek vagy a kezelésének. Ezen túlmenően, longitudinális képalkotó vizsgálatokban látszólagos neuropatológiai előrehaladását mutatták ki a szürkeállomány térfogati csökkenésének, és a folyadékammera növekedésének a betegség folyamán. A patofiziológiai változások természete úgy tűnik eltérő az egyes régiókban: a neuronok számának csökkenése a talamusz néhány magjában, csökkenések szinaptikus kapcsolati markerekben a PFC-ben és a HPC-ban. Továbbá bizonyított a dopamin (DA) neurotranszmisszió funkcionális túlsúlya a striátumban és deficitje a PFC-ben⁶. *Post mortem* szöveti vizsgálatok még ezidáig nem vezettek a betegség egy specifikus patológiájához, vagy egy kizárólagos agyterülethez, ahol a patológia bekövetkezik, de a HPC és a PFC agyi régiók rendellenességével kapcsolatos tanulmányok vannak túlsúlyban⁷. A strukturális elváltozások hátterében a neuronok és gliasejtek deficitje, a szinaptikus diszfunkció, illetve a sejtszerkezet felbomlása állhat. Korábbi *post mortem* tanulmányok eredményei a PFC vastagságának csökkenése mellett, emelkedett sejtsűrűségről, egyes idegsejttípusok (agykérgi piramis neuronok) sejttest méretének csökkenéséről számoltak be, azonban a teljes sejtszámban nem tapasztaltak változást. Ez összefüggésben állhat az axonterminálisok, a disztális dendritok és dendrittüskék csökkent számával. Egyes vizsgálatok szerint az idegsejtek normálistól eltérő szerveződése és fejlődése állhat a később kialakult strukturális abnormalitás hátterében, ezek összefüggésbe hozhatóak a korai és kései fejlődési zavarokkal⁸.



1. ábra. A szkizofréniában leginkább érintett agyterületek⁶. Az angol kifejezések magyar fordítása: temporális és parietális asszociációs kéreg; anterior cinguláris kéreg; prefrontális kéreg; hippokampusz és parahippokampális kéreg; talamusz (anterior és mediodorzális magok); ventrális középagy; kék vonalak: serkentő kapcsolatok, zöld vonalak: gátló kapcsolatok; rózsaszín vonalak: dopamin kapcsolatok.

2.1.2. A szkizofréria patomechanizmusának kialakulása: neurotranszmitter diszfunkció és idegfejlődési hipotézisek

Korábban a leginkább elfogadott teória a betegség tüneteinek kialakulására az ún. dopamin hipotézis volt, mely szerint a mezolimbikus DA neuronok túlműködése okozza a pszichózis pozitív tüneteit. Ezzel együtt a frontális kéregbe vetülő mezokortikális DA neuronok alulműködése a szkizofréria negatív, kognitív és affektív tüneteinek létrejöttéhez járul hozzá. A dopamin teória azon a megfigyelésen alapult, hogy az amfetamin és a kokain, amelyek fokozzák a DA felszabadulást az idegvégződésekből pszichotikus tüneteket okoznak, míg az első generációs antipszichotikumok, melyek a D2

dopamin receptorokat antagonizálják elsősorban, csökkentik a DA felszabadulást és a pszichotikus tüneteket enyhítették. Későbbiekben arra a feltételezésre jutottak, hogy a DA hiperaktivitás vagy csak egy része a szkizofrénia etiológiájának és megjelenésének, vagy feltételezhető egy végső közös útvonal, amelyben több más neurotranszmitter, receptor, neuronális pálya veszélybe kerülése konvergál a mezolimbikus rendszerhez, ami a DA hiperaktivitást teszi lehetővé⁹. Ily módon, az eddigi teóriák kiegészültek a szkizofrénia glutamát (GLU) hipotézisével, pontosabban az NMDA (N-metil D-aszpartát) receptor hipofunkció hipotézisével. Ennek indirekt bizonyítékául *post mortem* és genetikai tanulmányok, illetve NMDA receptor antagonisták alkalmazása szolgált. A szkizofrénia NMDA receptor diszfunkciójának elméletének felmerülése azon a megfigyelésen alapult, hogy a nem-kompetitív NMDA receptor antagonisták használata, mint a fenciklidin (PCP), a dizocilpin (MK-801) és a ketamin azonnali pszichés hatásokhoz vezetnek, amelyek nagyon hasonlítanak a szkizofrénia tünetekéhez, magába foglalva mind a pozitív és negatív tüneteket egyaránt¹⁰. A gamma-amino-vajsav (GABA) interneuronokon található NMDA receptorok hibás működése végül lehetővé teszi a túlzott mezolimbikus DA aktivitás kialakulását, amelyet az eredeti dopamin hipotézis is felvázol. Ezáltal nő az etiológiai komplexitás tekintettel a szkizofrénia tüneteinek kialakulására, a GLU, GABA és DA neurotranszmitterek kölcsönhatása révén⁹.

Fiziológiásan a PFC felől érkező, leszálló glutamáterg kortikális piramis neuronok, a ventrális tegmentális área (VTA) GABA-erg interneuronjainak közvetítésével tónusosan gátolják a mezolimbikus DA felszabadulást. Amennyiben a gátlás valamilyen oknál fogva deficitet szenved az a mezolimbikus DA útvonal hiperaktivitását eredményezi, elősegítve a szkizofrénia pozitív tüneteinek kialakulását. Ugyanakkor, a prefrontális kérget beidegző, mezokortikális dopaminerg neuronokat a leszálló glutamáterg kortikális piramis sejtek közvetlenül innerválják, így ennek az útvonalnak a sérülése a mezokortikális DA útvonal hipofunkcióját okozza, amely szkizofrénia negatív, kognitív és affektív tüneteinek megjelenéséhez járulhat hozzá¹¹.

Az idegfejlődési deficit létrejötté komplex folyamat, melynek háttérben álló molekuláris tényezők feltérképezése, összefüggések feltárása még várat magára. Ugyanakkor számos tanulmányban foglalkoztak, illetve napjainkban is foglalkoznak az ún. szkizofrénával összefüggésbe hozható kandidáns génekkel. Ilyen gén az NRG1,

amelyről átíródó neuregulin 1 fehérje termék szerepet játszik a neuronális migrációban, túlélésben és a szinaptikus plaszticitásban egyaránt¹². A neuregulin 1 fehérje ligandja egy tirozin-kináz receptornak, az ErbB4-nek, amely a poszt-szinaptikus denzitás fehérjéken keresztül fizikai kapcsolatot létesít az NMDA receptorok NR2 alegységével. Ezáltal hatással van az ErbB4 receptor stimulációja az NMDA receptorok csatorna tulajdonságaira, illetve az alegység specifikus foszforilációjára, így befolyásolva az NMDA receptor-függő neurotranszmissziót¹³. Humán *post mortem* vizsgálatokban az NRG1 és ErbB4 megnövekedett mRNS, illetve fehérje expressziójáról számoltak be szkizofréniás betegek PFC régióiból származó mintáiban¹⁴.

A betegség egy másik kandidáns génje a katekolamin-O-metil-transzferáz (COMT) génje, melynek fehérje terméke egy katabolikus enzim, a katekolaminok, mint a DA lebontásában játszik szerepet. A COMT génje a 22. kromoszómán található (22q11), ennek deléciója egy komplex szindrómát eredményez, amelyek pszichiátriai megnyilvánulásai közé tartozik a szkizofrénia és egyéb pszichózisok. Ez alapján feltételezhető, hogy a DA lebontási mechanizmusa, amennyiben kárt szenved, a megemelkedett DA szint a PFC-ben a szkizofrénia pozitív tüneteinek kialakulásához járulhat hozzá¹⁵.

2.1.3. A szkizofrénia állatmodelljei

Komplex pszichiátriai rendellenességek, mint a szkizofrénia megbízható, prediktív állatmodelljeinek alkalmazása elengedhetetlen a betegség neurobiológiai hátterének feltárására, illetve újonnan kifejlesztett gyógyszerek terápiás tesztelésére. Az elérhető szkizofréniás állatmodellek négy kategóriába sorolhatók: farmakológiai, fejlődési, léziós vagy genetikai manipulációs. A legtöbb rágcsló modell a szkizofrénia pozitív tüneteit modellezi az arra hasonló viselkedésbeli fenotípusok megváltoztatásával. Néhány modell azonban a szociális interakció módosulásával, illetve a tanulási folyamatok és a memória romlásával a szkizofrénia negatív és kognitív tüneteit kívánja modellezni¹⁶.

A farmakológiai modellek jellemzően azon a megfigyelésen alapszanak, miszerint egyes vegyületek emberekben és állatokban egyaránt olyan tüneteket váltanak ki, mint a szkizofrén betegek esetében megfigyelhető pszichózisos tünetek. Ezek a vegyületek

hatással vannak egyes agyi neurotranszmitter rendszerekre, mint a dopaminerg, glutamaterg, szerotonerg, cannabinoid, GABAerg, kolinerg és kappa opioid rendszerek¹⁷. A mezolimbikus dopaminerg rendszer túlműködését jellemzően pszichostimulánsokkal váltják ki, mint az amfetamin vagy a kokain^{18,19}. Az NMDA receptorok hipofunkciójának hipotézise egy alternatív, szkizofrénia modell a betegség dopamin hipotézise mellett. Ennek kiváltására NMDA receptorok nem kompetitív antagonistáit alkalmazzák, mint a ketamin, PCP vagy a dizocilpin. Mindemellett kevésbé tanulmányozott, de bizonyított a szerotonerg neurotranszmitter rendszer érintettsége pszichotikus tünetek kialakulásának hátterében. Ezeket a tüneteket hallucinogén vegyületek, mint a psilocybin és a lizergsav-dietilamid (LSD) alkalmazásával képesek kiváltani, amelyek 5-HT_{2A} receptor agonisták¹⁷.

Az idegi fejlődési modellek azon a feltételezésen alapulnak, miszerint a terhesség során vagy a perinatális időszakban bekövetkező káros környezeti hatások növelik a szkizofrénia kialakulásának kockázatát. Ilyen környezeti hatások lehetnek az anyai stressz, alultápláltság, fertőzés, immunaktiváció vagy szülészeti komplikációk, mint például hipoxiás állapot, amelyeket rágcslókon lehet modellezni¹⁶.

Újszülött korú patkányokon végzett ventrális hippocampális lézió eredményeként a pubertás korra abnormális viselkedési fenotípust váltott ki és negatívan befolyásolja a fejlődő mediális PFC és nukleusz akkumbensz szerkezeti integritását²⁰.

A szkizofrénia genetikai modelljei egyes szkizofrénia kandidáns gének, mint a disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC-1), Neuregulin1 (NRG1) és receptora az ErbB4, dysbindin vagy a reelin deléciójával létrehozott egértörzsek¹⁶.

Összességében elmondható, hogy a szakirodalomban a szkizofrénia farmakológiai állatmodelljei vannak túlsúlyban, feltételezhetően annak köszönhetően, hogy azok kivitelezhetősége egyszerűbb és rövidebb idő alatt előállíthatóak, mint a többi kategóriába tartozó modellek.

2.1.4. A szkizofrénia jelenlegi terápiája

A szkizofrénia kezelésére ún. antipszichotikus hatású vegyületeket, más néven antipszichotikumokat alkalmaznak. Klinikai jellemzőik alapján, hatékonyság és mellékhatásokat tekintve megkülönböztetnek típusus (első generációs), illetve atípusos

(második generációs) antipszichotikumokat. A hagyományos, típusos gyógyszerek közös jellemző hatása, hogy a szkizofrénia pozitív tüneteit csökkentik, ugyanakkor a negatív, illetve kognitív tüneteket nem befolyásolják. Közös jellemzőjük, hogy elsősorban a dopamin rendszeren fejtik ki hatásukat, főként a D2 dopamin receptor gátló hatása révén. Ilyen antipszichotikum például a haloperidol vagy klórpromazin.

A szkizofrénia negatív tüneteire az atípusos antipszichotikumokat alkalmazzák, továbbá egyesek javíthatják a kognitív deficitet egyaránt. Ezeknek a vegyületeknek a hatásmechanizmusa eltérhet. Egyes gyógyszerek kevert (szerotonin (5-HT)/DA) antagonistá hatást fejtenek ki, mint például a clozapin, quetiapin, mások szelektíven D2, D3 receptorokon hatnak. Nemrégiben forgalomba hoztak már olyan készítményt, mint a dopaminerg transzmitter rendszeren keresztül ható magyar fejlesztésű cariprazine, amely a szkizofrénia több tünettípusára is kedvező hatással bír^{21,22}. Ugyanakkor vannak olyan gyógyszerek, melyek parciális agonista hatásuk révén befolyásolják a betegség egyes tüneteit, mint az aripiprazol, amely a D2 dopamin receptor parciális agonistája.

A szkizofréniaában szenvedők 25-30%-a rezisztens az első generációs antipszichotikumok terápiájával szemben. Számos mellékhatással rendelkeznek azáltal, hogy nem szelektív a hatásuk. Ilyenek az extrapiramidális tünetek kialakulása, mint az akut disztónia, akatízia, periorális tremor vagy a tardív diszkinézia, amely főként a striatális D2 DA receptorok gátlásának következménye. Emellett a tuberoinfundibuláris D2 DA receptorok gátlása hiperprolaktinémiához vezet.

A második generációs antipszichotikumok terápiás előnye, hogy kisebb mértékben alakulnak ki extrapiramidális mellékhatások az alkalmazásuk során, illetve kevésbé befolyásolják a prolaktin szintet. Továbbá hatással vannak egyes gyógyszerek a betegség negatív és kognitív tüneteire is. Egyes vegyületek antidepresszív hatásuk révén, csökkentik az öngyilkosságra való hajlamot.

Mindezek ellenére a betegség kielégítő gyógyszeres terápiája sajnos napjainkban sem megoldott. Újabban új gyógyszer-célpontok irányában történnek kutatások, amelyek más transzmitter rendszer befolyásolása révén hathatnak, mint a glutamát vagy a glicin neurotranszmitter rendszereken keresztül. Napjainkban még nincsenek ilyen jellegű gyógyszerek forgalomban. Az előbbieken említett mellékhatások kiküszöbölésére nagy jelentőséggel bírnak az új targetek azonosítására irányuló kutatások²³.

2.2. Purinerg jelátvitel a központi idegrendszerben

2.2.1. Az adenosin-5'-trifoszfát (ATP), mint idegrendszeri jelátvivő molekula

Az ATP a sejtek számára nélkülözhetetlen, mint intracelluláris energiatároló molekula járul hozzá a sejten belüli kémiai energiát igénylő folyamatokhoz: térben elkülönülő metabolikus reakciók lejátsszódásához; makromolekulák (beleértve a DNS és az RNS molekulákat) és fehérjék szintéziséhez; a sejtek fiziológiai működéséhez elengedhetetlen, sejtmembránon keresztül történő aktív transzport folyamatokhoz szintén szükségesek (Na^+K^+ -ATP-áz, Ca^{2+} -ATP-áz transzporterek működéséhez). További kiemelkedő funkciója van az intra- és extracelluláris jelátviteli folyamatokban egyaránt. Az intracelluláris szignalizációban, mint foszfát-csoport donor vesz részt a kinázok által mediált foszforilációs reakciókban, illetve a ciklikus adenosin-5'-monofoszfát (cAMP), mint másodlagos jelátvivő molekula szintéziséért felelős enzim, az adenilát cikláz szubsztrátja. Az idegsejtek közötti, illetve neuronok és nem idegi sejtek közötti kommunikáció kémiai ingerületátvitel útján valósul meg neurotranszmitterek segítségével²⁴⁻²⁵. Már 1970-ben Burnstock és munkacsoportja publikálta kísérletes bizonyítékát annak, hogy a bélben a nem-adrenerg gátló idegekből ATP vagy azzal összefüggésben lévő nukleotid (AMP, ADP és valószínűleg más purin nukleotidok is), mint transzmitter anyag szabadul fel, teljesíti a neurotranszmitterekre vonatkozó mind az öt kritériumot. Ezek a kritériumok a következők: az idegvégződésben szintetizálódik, tárolódik, felszabadulása ingerlésfüggő, hat a posztzinaptikus receptoron, inaktívulódik²⁶. A következő évben Burnstock javaslatot tett az ilyen idegek „purinerg” elnevezésére, hasonló okokra hivatkozva, mint Dale 1933-ban az „adrenerg” és „kolinerg” idegek megnevezésére²⁷. A neurotranszmitterek raktározása szinaptikus vezikulákban történik, melyek membránjában úgynevezett V-típusú ATP-áz található. Ez a protontranszlokáló enzim, melynek működéséhez az ATP hidrolízisével nyert energia szükséges, teszi lehetővé az idegsejtek citoplazmájában szintetizálódott neurotranszmitterek vezikulákba történő felvételét pH-gradiens (pl. acetilkolin (ACh), katekolaminok (noradrenalin (NA), adrenalin, DA)), vagy a membránpotenciál-komponens (pl. GLU), vagy mindkettő terhére (pl. GABA)²⁸. Későbbiekben felismerték, hogy az ATP, mint kotranszmitter van jelen mind a perifériális, mind a központi

idegrendszer (KIR) idegsejtjeiben²⁹. Egyes neurotranszmitterek (ACh, katekolaminok) szinaptikus vezikuláiban fordul elő az ingerületátvivő molekulák mellett, így azok extracelluláris térbe történő ürülésükkor azokkal együtt szabadul fel²⁸. Az ATP molekula töltése (erősen poláris) és mérete miatt nem képes önálló membrántranszportra. Sejten belülről az extracelluláris térbe történő felszabadulása többféleképpen mehet végbe. Fiziológias körülmények között, stimulus hatására az idegsejtek terminálisából vagy néhány nem neuronális sejtől képes vezikulákból felszabadulni exocitózis révén. Az ATP másik lehetséges felszabadulása ATP-kötő kazetta transzporterek (ABC (ATP-binding cassette) transzportek) aktiválásán keresztül mehet végbe³⁰. Az ATP további lehetséges transzportja az extracelluláris térbe mechanoszenzitív ATP-permeábilis anioncsatornákon át is történhet³¹. Ilyen transzmembrán transzport folyamatok révén képes az ATP átjutni az intakt sejtmembránon. Emellett az ATP patofiziológias mechanizmusok következtében képes felszabadulni a sérült sejtekből a károsodott sejtmembrán résein keresztül vagy sejthalált követően³⁰. Az extracelluláris térben az ekto-ATP-áz enzimek hatására az ATP részben lebomlik adenzinná, amelynek következtében az ATP koncentrációk tartományai jelentős eltérést mutatnak sejten belül és kívül. Intracellulárisan millimoláris (mM), míg az extracelluláris térben nanomoláris-mikromoláris (nM- μ M) tartományban van az ATP koncentrációja, annak felszabadulási és lebomlási folyamatainak egyensúlyától függően³¹. Az ATP, illetve a belőle keletkező adenzin, mint modulátor anyagokat felismerő specifikus receptorok megtalálhatóak az idegrendszerben és számos más, idegrendszeren kívüli sejtben egyaránt (pl. immunsejtek). Az ATP tehát alapvető intracelluláris funkciói mellett jelentős szereppel rendelkezik, mint extracelluláris szignál²⁸.

2.2.2. Purinerg receptorok altípusai és a purinerg jelátvitel

A purinerg neurotranszmisszió felfedezése, valamint az ATP transzmitter szerepének feltárása a nem-adrenerg és nem-kolinerg gátló idegekben Geoffrey Burnstock nevéhez fűződik. Későbbiekben bebizonyították, hogy az ATP kotranszmitterként jelen van a szimpatikus és paraszimpatikus idegekben. Napjainkban már ismert, hogy az ATP kotranszmitter szerepet tölt be a perifériás és központi idegrendszerben egyaránt. 1978-ban azonosították, hogy az adenzin és az ATP eltérő

receptorokon fejtik ki hatásukat. Az adenzinnal aktiválható receptorokat P1 (más néven: AR), valamint a különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválható receptorokat P2 receptoroknak nevezték el²⁹.

2.2.2.1. Adenzin receptorok

Az adenzin receptorok (AR) a G-fehérje kapcsolt receptorok szupercsaládjába tartoznak, melyek négy altípusát határozták meg (A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 AR) eltérő farmakológiai tulajdonságaik, szöveti / celluláris eloszlásuk és másodlagos effektor kapcsolódásuk szerint. Az A_1 és A_3 AR-k úgynevezett G_{α_i} -fehérjékhez kapcsolódnak, vagyis a receptor aktiválását követően az adenilát-cikláz enzim gátlása következik be, így csökkentve az intracelluláris cAMP szinteket. Ezzel ellentétben az A_{2A} , A_{2B} AR altípusok G_{α_s} -fehérje kapcsolt receptorok stimulációját követően az adenilát-cikláz enzim aktiválódása történik, ennek hatására növelve az intracelluláris cAMP szinteket. Szöveti lokalizációjukat tekintve az A_1 és A_{2A} AR-k főként a KIR-ben találhatóak, míg az A_{2B} és A_3 AR-k jellemzően a perifériás szövetekben játszanak kiemelkedő szerepet a gyulladási folyamatokban és az immunválaszokban³².

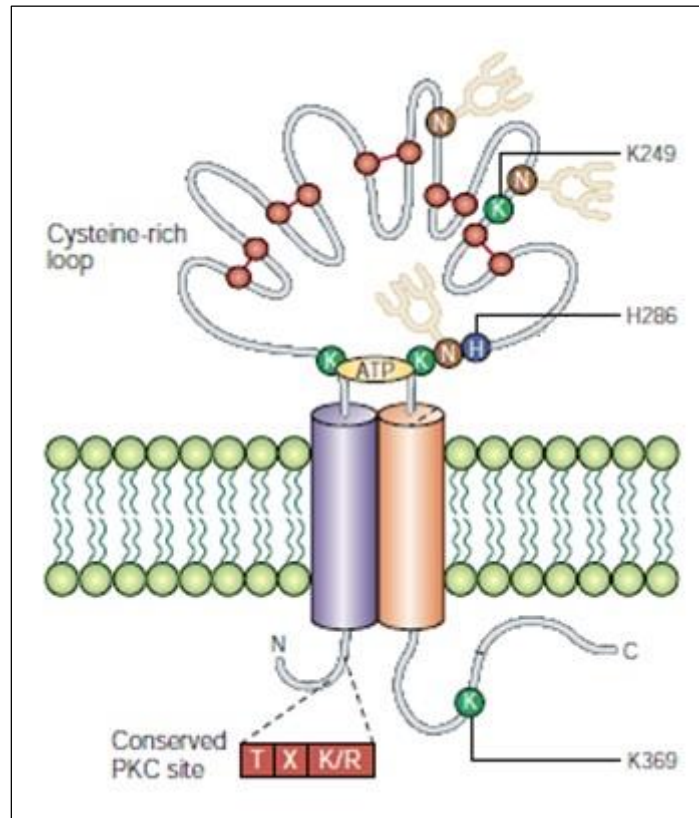
2.2.2.2. P2 purinerg receptorok

A különböző purin és pirimidin nukleotidok hatásait az extracelluláris térben a P2 receptorok közvetítik, melyeket ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptorcsaládokra osztották farmakológiai és szerkezeti tulajdonságaik szerint. Napjainkban a jelenleg ismert humán P2X receptorok közül 7 féle alegységet (P2X₁₋₇), míg a humán P2Y receptorok között 8 altípust (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) különböztetik meg²⁹.

2.2.2.2.1. P2X receptorok

Az előzőekben jellemzett különböző G-fehérje kapcsolt receptor típusokkal ellentétben, az ionotróp P2X receptorok ATP által aktivált, nem szelektív kationcsatornák. Receptor aktiváció hatására egyaránt átjárhatóak Na⁺ és K⁺ ionok

számára, továbbá jelentős Ca^{2+} ion permeabilitással is bírnak³³. Ahogyan az korábban említésre került, a P2X receptoroknak 7 alegysége ismert, amelyek közül a P2X1-6 alegységek 379-472 aminosavból (AS) állnak, míg a P2X7 alegység 595 AS-ból épül fel a jelentősen hosszabb C-terminálisának köszönhetően. Az egyes alegységek két hidrofób transzmembrán régióval rendelkeznek, a C- és N-terminális végek intracellulárisan helyezkednek el, továbbá 280-300 AS-ból álló peptid szakasz egy extracelluláris hurkot formáz. Az N-terminális végződés mindegyik alegység esetében meglehetősen rövid (20-30 AS), illetve tartalmaz egy konszenzus foszforilációs helyet, amelyet a protein kináz C (PKC) képes foszforilálni. Ennek a foszforilációs helynek kiemelkedő szerepe lehet a P2X receptorok mediálta ionáramok kinetikájának szabályozásában. Mind a 7 alegységre jellemző, hogy az extracelluláris hurok tartalmaz konzervált, N-kapcsolt glikolizációs oldalakat (alegységenként eltérő), továbbá 10 konzervált ciszteint (Cys), amelyek feltehetően kölcsönhatásban vannak azáltal, hogy az egyes Cys-eket diszulfid-hidak kötik össze. Az egyes alegységek közti különbségek a C-terminális szekvenciájában és hosszában (pl.: P2X6: 28 AS; P2X7: 242 AS) mutatkoznak meg. A C-terminális hossza és összetétele befolyásolja a receptorok közvetítette ionáramok kinetikáját, a receptor deszenzitizációjának sebességét és a pórusformáló tulajdonságukat egyaránt³³ (2. ábra).



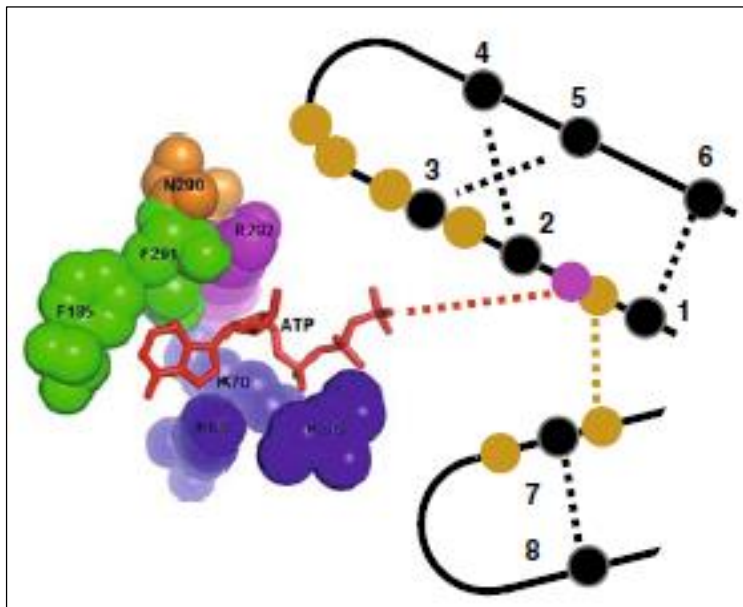
2. ábra. Egy P2X receptor alegység sematikus rajza³⁴. Az extracelluláris hurok az összes P2X alegység esetében tartalmaz 10 konzervált Cys-t (piros kör), továbbá 3 glikozilált aszparagint (barna körben „N”). A kék körben „H” a hisztidint, a zöld körben „K” pedig a lizint jelöli. Angol kifejezések magyar fordítása: cisztein-gazdag hurok, konzervált PKC (protein kináz C) kötőhely.

A P2X receptorok csatornáját három alegységből álló trimerek alkotják, homooligomerekként (kivéve a P2X6 alegységet) és heterooligomerekként (kivéve a P2X7 alegységet) is funkcionálnak (1. táblázat).

1. táblázat. A P2X receptor alegységek receptor heteromerizációja³⁵.

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	+	+	+	-	+	+	-
P2X ₂		+	+	-	+	+	-
P2X ₃			+	-	+	-	-
P2X ₄				+	+	+	-
P2X ₅					+	+	-
P2X ₆						-	-
P2X ₇							+

Azóta későbbi tanulmányokban úgy találták, hogy a P2X1/4 és a P2X4/7 heteromerizáció is alkothat funkcionálisan aktív konformációt³⁶. Egy P2X receptor agonista meghosszabbodott expozíciója a receptor deszenzitizációjához és a receptor pórus bezáródásához vezet. A deszenzitizáció ideje szerint a P2X receptorok lassan (P2X2, P2X4, P2X5, P2X7), több mint 20 másodperc alatt, és gyorsan (P2X1 és P2X3), kevesebb mint 1 másodperc alatt deszenzitizálódó receptorokra csoportosíthatóak³⁷. A P2X receptor pórusnyitásához három molekula ATP egyidejű bekötődése szükséges. Az ATP molekula kötőhelyét két szomszédos alegység közötti, az extracelluláris oldalon a két transzmembrán régió végeihez közeli AS-k alkotják, amely azt jelenti, hogy egy ATP molekula két alegységhez kötődik egyszerre. A szerkezeti modell szerint az ATP kötőhely nem a receptor pórus közelében van, hanem azt feltételezik, hogy van egy ún. linker régió a kötőhely és a pórus között, amely az agonista kötődését párosítja a pórusnyitással³³. Mutagenézis tanulmányok szerint az ATP molekula negatívan töltött foszfát-csoportja koordinációs kötést alakít ki a pozitívan töltött lizin aminosavakkal (pozíció: K68, K70, K309), továbbá az adenin gyűrűt két aromás régió (F185T186 és N290F291R292) fogja közre (3. ábra)³⁸. Az aminosavak egy betűs rövidítését a ³⁹ referencia tartalmazza.



3. ábra. Az ortosztérikus és a Cys gazdag allostérikus kötőhelyek közelségének modellje a P2X receptoroknál³⁸. A lehetséges ortosztérikus ATP kötőhely magába foglalja a következő AS-kat: K68, K70, F185, N290, F291, R292 és K309. Feltételezhető, hogy az egyik szomszédos alegység K68 és K70 AS-jai járulnak hozzá az alegységek

közti kötőhelyhez. A Cys-eket fekete körök, illetve az azokat összekötő diszulfid-hidakat fekete pontozott vonalak jelölik. A Cys gazdag régiók 1-6 és 7-8 a szomszédos P2X receptor alegységekben vannak, amelyeket diszulfid-hidak kötnek össze (barna pontozott vonal). A lehetséges mutációs helyeket, amelyek hatással vannak az allosztérikus szabályozásra barna körök jelölik. A lila színű kör arginint jelöl, amely a P2X7 receptor esetében ADP ribozilált lehet, és ez a csatorna aktivációjához vezethet, a piros pontozott vonal a közelségét jelöli az ATP kötőhelyhez.

Az ortosztérikus agonista kötőhely mellett további allosztérikus kötőhelyek szabályozhatják a receptor aktivációját. A P2X receptorok esetében ilyen például a cink ion (Zn^{2+}), amely kis koncentrációban, mint allosztérikus modulátor fokozza a pórus nyitási frekvenciát és időtartamát. Más tanulmányok szerint a P2X receptor mediálta áramok, más ion fajtákkal is szabályozhatóak, beleértve a réz iont (Cu^{2+}) és a protont (H^+) egyaránt³⁸.

A P2X receptorok szöveti eloszlása igen széleskörű. Eredendően a P2X receptorokról az a feltételezés terjedt el, hogy főként a periférián expresszálódnak. Azonban napjainkban már ismert, hogy az emlősök összes vizsgált szövete közül az emlős agyban a legmagasabb a purinok szintje és a legtöbb féle purinerg receptor itt fejeződik ki (2. táblázat). A központi idegrendszerben a receptor aktivációja Ca^{2+} -ionok beáramlását teszi lehetővé a neuronokba. Az ingerlékeny sejtekben ezt a citoszolikus Ca^{2+} -ionok koncentráció növekedést két eltérő mechanizmus okozhatja: membrán depolarizáció eredményeként a létrejövő feszültség-függő Ca^{2+} -ion és magán a P2X receptoron keresztüli Ca^{2+} -ionok beáramlása⁴⁰. Ez a folyamat egy lassabb neuromodulációs választ válthat ki, mint a glutamát receptorok célzott intracelluláris, axonális (dendritikus) transzportját (*trafficking*: intracelluláris fehérje transzport). Ez a válasz ún. NMDA (N-metil-D-aszpartát)-típusú glutamát receptorok esetében létrejön, de ezzel ellentétben az AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propionsav)-típusú glutamát receptor axonális transzportjának gátlását idézi elő a Ca^{2+} -ionok beáramlása. További hasonló összefüggéseket mutattak ki kísérletesen más ligandkapuzott ioncsatornák (pl.: nAChR (nikotinos acetilkolin receptor), 5-HT₃AR) és a P2X receptorok között. A primer afferens idegekben a P2X receptoroknak kritikus szerepük van az akciós potenciál inicializálásában, a szenzoros sejtekből (mint például az

ízlelőbimbók, kemoreceptorok vagy az urotélium) felszabadult ATP kiváltotta válaszok során⁴¹.

A P2X receptor aktiváció következménye több annál, mint egy egyszerű membránon keresztüli tranziens áram. Amennyiben nagy a sejt Ca^{2+} -ion permeabilitása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedését és a sejtmembrán depolarizációját eredményezheti, ezt követően feszültség-függő Ca^{2+} -csatornák aktiválását egyaránt. Ennek következtében, a citoplazmában akkumulálódott kalcium ionok számos intracelluláris kináz, mint például PKC, mitogén-aktivált protein kinázok (MAPKs) vagy Ca^{2+} - / kalmodulin-függő protein kináz II (CAMKII) aktivációjához vezet. Továbbá néhány P2X receptor (különösen a P2X7, de bizonyos körülmények között, rekombináns P2X2, P2X2/3, P2X4 és néhány natív neuronális P2X receptor), egyedinek tűnik egy nagy konduktanciájú pórust kialakító képességét tekintve, amely lehetővé teszi szerves kationok (pl.: N-metil-D-glukamin) és fluoreszcens festékek átjutását a sejtmembránon hosszan tartó agonista expozíciót követően. A pórus kialakítás és a permeabilitás változás előfordulása eltérő lehet különböző sejtípusokban és néhány részletben eltérhetnek a különféle receptorok⁴².

2. táblázat. A P2X receptorok szöveti eloszlása³³.

<i>Neuronal</i>	
Sympathetic neurons	P2X1–7
Parasympathetic neurons	P2X2, P2X3, P2X4, P2X5
Sensory neurons	P2X1–7, predominantly P2X3, and P2X2/3
Enteric neurons	P2X2, P2X3, P2X4, P2X7
Central nervous system	P2X2, P2X4, and P2X6 (including heteromultimers) and P2X7
Retinal neurons	P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7
<i>Muscle cells</i>	
Smooth muscle	P2X1–7, predominantly P2X1
Skeletal muscle	
Developing	P2X2, P2X5, P2X6
Adult	P2X1–7
Cardiac muscle	P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6
<i>Nonneuronal</i>	
Osteoblasts	P2X1, P2X2, P2X5, P2X7
Osteoclasts	P2X1, P2X2, P2X4, P2X7
Cartilage	P2X2
Keratinocytes	P2X2, P2X3, P2X5, P2X7
Fibroblasts	P2X7
Adipocytes	P2X1
Epithelial cells (lung, kidney, trachea, uterus, cornea)	P2X4, P2X5, P2X6, P2X7
Astrocytes	P2X1–7
Oligodendrocytes	P2X1
Microglia	P2X4, P2X7
Müller cells	P2X3, P2X4, P2X5, P2X7
Enteric glial cells	P2X7
Sperm	P2X2, P2X7
Endothelial cells	P2X1, P2X2, P2X3, predominately P2X4
Erythrocytes	P2X2, P2X4, P2X7
Platelets	P2X1
Immune cells (thymocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, lymphocytes, mast cells, dendritic cells)	P2X4 and predominately P2X7, but some P2X1, P2X2, P2X5
Exocrine secretory cells	P2X1, P2X4, P2X7
Endocrine secretory cells (pituitary, pancreas, adrenal, thyroid, testis)	P2X1–7, predominately P2X2/6
Cholangiocytes	P2X2, P2X3, P2X4, P2X6
Interstitial cells of Cajal	P2X2, P2X5
Kupffer cells	P2X1, P2X4, P2X7
<i>Special senses</i>	
Inner ear	P2X1, P2X2, P2X3, P2X7
Eye	P2X2, P2X7
Tongue	P2X2, P2X3
Olfactory organ	P2X2, P2X4
Cochlea hair cells	P2X1, P2X2, P2X7

Az eltérő P2X receptorok egyazon neuronon belüli, a sejt szómája és idegterminálisa közötti eloszlásuk különböző lehet⁴³. Az agy számos területén igazolták a P2X receptorok jelenlétét, így a kortexben, a hippokampuszban, kisagyban, bazális ganglionokban, középgyban és a habenuában egyaránt⁴⁴. Az idegsejtek mellett további, nem neurális eredetű sejtek, mint az asztrocita és a mikroglia sejtek is expresszálnak P2X receptorokat⁴⁵. Míg az ATP a neuronokból kotranszmitterként szabadul fel más neurotranszmitterekkel együtt^{46,47}, addig a glia sejtekből történő ATP felszabadulás mechanikai vagy elektromos stimuláció hatására jön létre⁴⁸. A P2X receptorok extracelluláris ATP általi stimulációjának számos fiziológias következménye van az idegrendszerben. A receptor aktivációja fokozza a neuronális ingerelhetőséget, gyors szinaptikus transzmissziót közvetít mind a perifériális és központi idegrendszer egyes szinapszisaiban, és hozzájárul a hosszú idejű szinaptikus hatékonyság fokozódáshoz (long-term potentiation; LTP). Az extracelluláris ATP, mint trofikus faktor szerepet játszhat az axon növekedésben a fejlődés során, továbbá domináns jelátvivő funkciója van a neuron és glia sejtek közötti kommunikációban⁴⁰. A központi idegrendszeren kívül, az immunsejtekben a P2X receptor aktiváció fokozza a pro-inflammatorikus citokinek felszabadulását (pl.: interleukin 1 β , (IL-1 β))⁴¹.

A hosszú idejű potenciáció (LTP) és depresszió (long term depression; LTD) a szinaptikus plaszticitás formái, és lehetséges mechanizmusok a memória kialakulására és a tanulásra. A P2 receptorok aktivációja szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás szabályozásában, beleértve az LTP és LTD kontrollját különböző agyi régiókban, de az irodalomban közölt adatok egyelőre ellentmondásosak arról, hogy a P2X receptor aktivációja egy adott agyrégióban elősegíti, gátolja vagy nincs hatással az LTP-re. Ezeket a diszkrepanciákat az LTP indukciójának és/vagy fenntartásának molekulárisan komplex természete okozhatja. Számos neurológiai és pszichiátriai betegség etiológiájában játszanak szerepet a P2 receptorok úgy, mint a neuropátiás fájdalom, migrén, iszkémia/sztrók, neurodegeneratív betegségek (Alzheimer- és Parkinson-kór, amiotrófiás laterálszklerózis), epilepszia, gyógyszerfüggőség, hangulati zavarok (depresszió, szkizofrénia). Érdekesség, hogy ugyanannak a receptornak (pl.: P2X7R) kettős funkciója lehet, egy iszkémiás sérülés korai fázisában apoptotikus/nekrotikus hatása van, míg a késői fázisban elősegítheti a neuroregenerációt⁴².

2.2.2.2. P2Y receptorok

A P2Y receptorok az AR-okhoz hasonlóan G-fehérje kapcsolt receptorok szupercsaládjának tagjai, amelyek két alcsoportba oszthatóak G-fehérje kapcsolódásuk szerint. Ezek alapján megkülönböztetünk úgynevezett $G\alpha_q$ -kapcsolt receptorokat (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁), melyek stimulációjára a foszfolipáz C- β enzim / inozitol-trifoszfát jelátviteli útvonal aktivációja révén az endoplazmatikus retikulumból Ca²⁺-ion felszabadulás következik be, amely megnövekedett intracelluláris Ca²⁺-ion szintet eredményez. A másik alcsoport képviselői $G\alpha_i$ -kapcsolt receptorok (P2Y₁₂, P2Y₁₃, and P2Y₁₄), amelyek az előbbieken említett A₁ és A₃ AR-khoz hasonlóan a receptor aktivációjának hatására az adenilát-cikláz enzim gátlása megy végbe. A P2Y receptor altípusok agonista-kötő profiljukban is eltérnek egymástól, eszerint négyféle csoportba oszthatóak. Az egyik csoportba azok a P2Y receptorok tartoznak amelyek, adenin nukleotidokra (ADP és/vagy ATP) specifikusak (P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃), emellett vannak olyan P2Y receptorok, amelynek endogén ligandja csak az uridin nukleotidok (UDP és UTP) (P2Y₆ és humán P2Y₄). Továbbá egyes P2Y receptorokat adenin és uridin nukleotidok egyaránt aktiválhatják (P2Y₂, P2Y₁₁ és rágcsáló P2Y₄), illetve létezik olyan receptor, amelynek endogén ligandja az UDP-glükóz (P2Y₁₄). Az összes ismert P2Y receptor altípus a KIR különböző sejtjeiben (neuronok, asztrocita, mikroglia, oligodendrocita sejtek) expresszálódik. Ezek a receptorok patológiás körülmények között aktiválódnak, kiemelt szerepük van az idegi gyulladási folyamatokban^{49,50}.

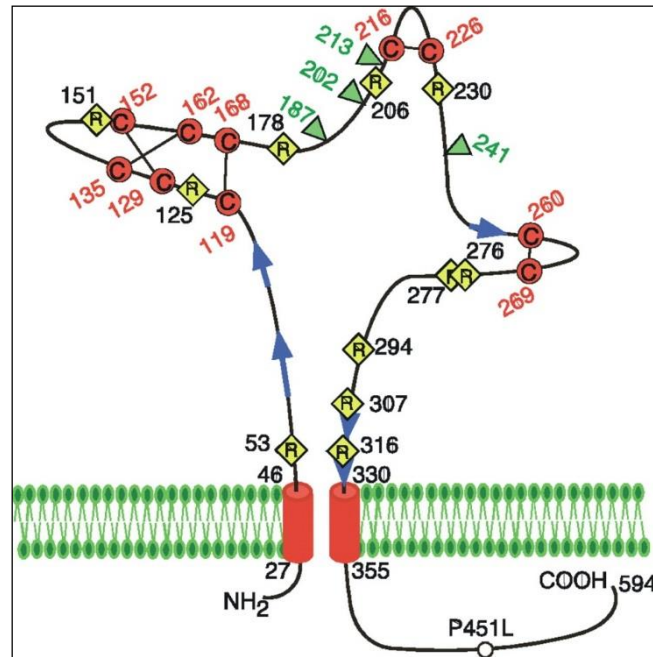
2.2.3. A P2X7 purinerg receptor

2.2.3.1. A P2X7 receptor molekuláris jellemzői

Az ionotróp P2X receptor család tagjai közül, a napjainkban használatos nevezéktan szerint P2X7-nek nevezett receptort (P2X7R), kezdetben eltérő alcsoportba sorolták és P2Z receptornak nevezték el, annak molekuláris szintű meghatározásáig. Elsőként Buisman és munkatársai⁵¹ írták le ezt a receptort 1988-ban, majd 1995-ben Di Virgilio⁵² elnevezte P2Z receptornak, amely számos immunsejt és inflammatorikus sejt plazmamembránjában expresszálódik. Korábban, mint „sejthalál receptor” tartották

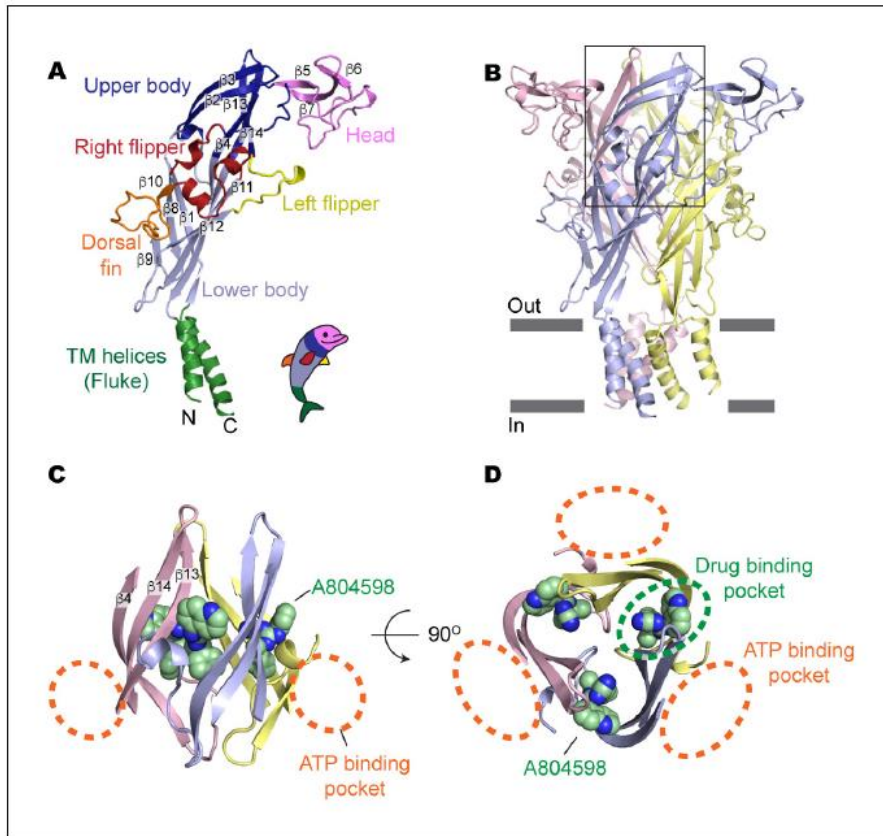
számon. A receptor meghosszabbított aktivációja egy transzmembrán pórus nyitását eredményezi, amelynek következtében a sejtmembrán permeábilis lesz nagy molekulású molekulák számára (akár 800 Da), amely végül citolízishez vezet⁵³.

A P2X7R-t patkány agy, felső nyaki idegdúcából és a mediális habenulájából izolálták, a receptor teljes hosszúságú cDNS-ét (komplementer dezoxiribonukleinsav) első alkalommal egy patkány agyi cDNS könyvtárból klónozták. A P2X7R alegység 595 AS-ból áll, amelynek szekvenciája 35-40%-ban homológ a P2X receptor család másik hat tagjával. Hasonlóan a többi P2X receptor alegység szerkezetéhez, a P2X7 két transzmembrán régióval, egy rövid intracelluláris N-terminális doménnel és egy nagy extracelluláris hurokkal rendelkezik. A P2X7R alegység intracelluláris C-terminális régiója eltérő hosszúságú a P2X1-6 receptor alegységek C-terminálisához képest. A P2X7 receptor alegység intracelluláris C-terminálisa lényegesen hosszabb (239 AS) (4. ábra), mint a receptor család további hat tagja esetében (27-129 AS). A receptor C-terminálisa hozzájárul a P2X7 receptor pórus-formáló tulajdonságához. A P2X7R karboxi-terminális régiójának közelében azonosítottak egy lipopoliszacharid (LPS) kötőhelyet, miáltal a receptor képes inflammatorikus szignál jelátvitelére. Továbbá génpolimorfizmus tanulmányok azt mutatták, hogy a receptor e régióján belül az 551-581 AS-k között van egy úgynevezett *trafficking* domén, amely a receptor sejt felszíni expressziójához szükséges⁵³.



4. ábra. A P2X7 receptor alegység sematikus szerkezete⁵⁴. Sárga négyzet: konzervált arginin, piros kör: konzervált cisztein, melyeket diszulfid hidak kötnek össze, zöld háromszög: lehetséges glikozilációs helyek, kék nyíl: valószínűsíthető β -redők elhelyezkedése.

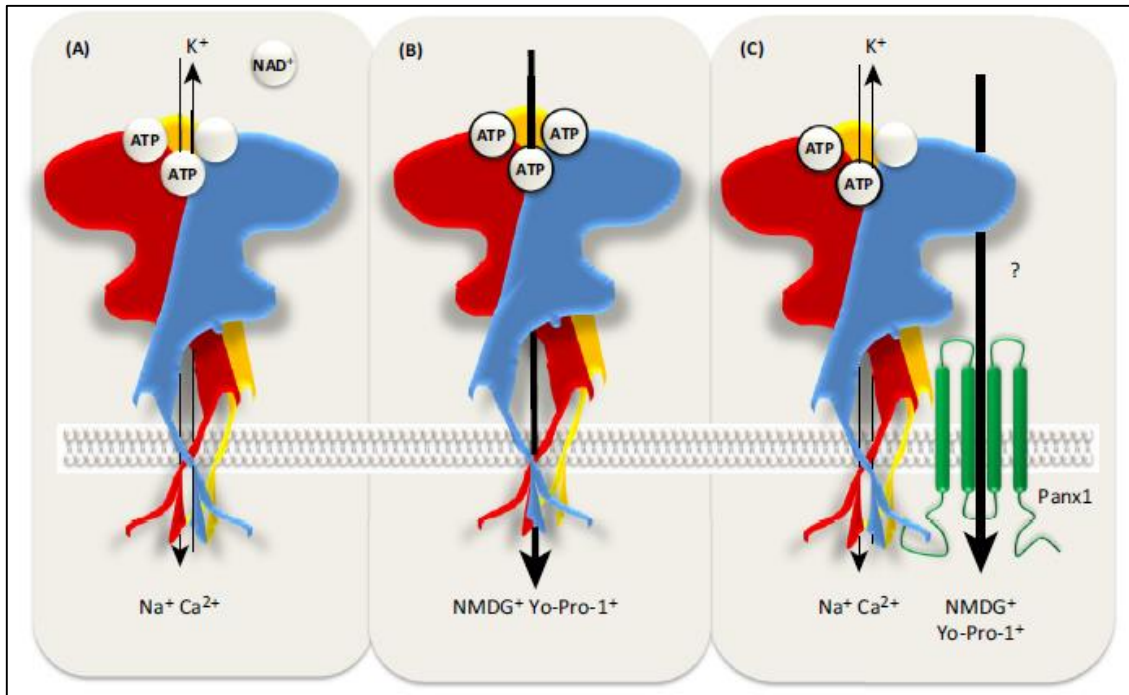
Natív szövetekben a P2X7R alegységek jellemzően homotrimer struktúrát alkotnak⁵⁵, habár bebizonyították, hogy a P2X7R alegység a P2X4R alegységgel heteromer szerkezetet is alkothat. Ez az interakció feltételezhetően nagy jelentőséggel bír a purinerg receptor-mediált fájdalom szignalizációjában⁵⁶. A P2X7R agonista kötőhelyei, így az endogén ligandok, mint az ATP kötőhelyei a receptor két szomszédos alegység között találhatóak, a többi P2X receptorhoz hasonlóan. Mindazonáltal, hogy a receptor trimer struktúrát alkot, három agonista kötőhellyel rendelkezik (5. ábra). Elektrofiziológiai tanulmányok és a receptor aktiváció és deaktiváció kinetikájának matematikai modellezése alapján arra a következtetésre jutottak, hogy már két ATP molekula elegendő az ioncsatorna nyitásához, míg a három kötőhely elfoglalása a pórus tágulását teszi lehetővé³⁶.



5. ábra. A P2X7 receptor molekula-kötő zsebe⁵⁷. (A) Az apo pdP2X7 (óriáspanda (*Ailuropoda melanoleuca*) P2X7 receptor) struktúra egyetlen alegységének delfin-szerű rajza (Head: feji rész, Upper body: felső test, right and left flipper: jobb és baloldali uszonyok, Dorsal fin: hátuszony, Lower body: alsó test, TM helices: transzmembrán hélixek). 14 β -redő struktúra (jelölés: β 1-14). (B) A trimer pdP2X7 szerkezet oldalnézetből való ábrázolása. A fekete keret a felső testi rész doménjeinek körülbelüli elhelyezkedését jelöli ki, amely a C és D ábrákon látható. (C) A felső test domének oldalnézete, demonstrálva egy allosztérikus, nem-kompetitív inhibitor (A804598) kötőhelyeit az ATP-kötő zsebek (ATP-binding pocket) vonatkozásában (narancssárga szaggatott vonal jelöli). (D) Az apo pdP2X7 struktúra felülnézete az ATP-kötőhelyekre (narancssárga szaggatott vonal jelöli) és egy molekula-kötő zsebre (Drug binding pocket) vonatkozóan.

A P2X7 receptorok nem-szelektív kationcsatornák. Az agonista kötődése különböző biológiai válaszreakciókhoz vezet, amely az agonista koncentrációjától, illetve annak expozíciós idejétől függ. Egy egyszeri, rövid agonista expozíció egy nem-szelektív kationcsatorna nyitását eredményezi, így Na^+ - és Ca^{2+} -ionok sejtbe történő beáramlását,

illetve K^+ -ionok kiáramlását a sejtből. Hosszabb ideig tartó vagy ismételt, agonista által kiváltott P2X7 receptor aktiváció nagy pórus kialakulását eredményezi a sejtmembránban, amely végül hólyag képződéséhez vezet a membránban, továbbá citokin felszabadulást, illetve sejthalált eredményez. Ez a pórus permeábilissá teszi a membránt molekula tömegüket tekintve 900 Da-ig terjedő molekulák számára, mint amilyen a Lucifer yellow (457 Da), Propidium (414 Da), Ethidium (314 Da) és az N-metil-D-glukamin (NMDG⁺) (190 Da). A citolitikus pórusképződésnek két teóriája ismert. Az egyik hipotézis szerint a nagy pórus kialakulása magának a kationcsatorna tágulásának köszönhető. E teória szerint a P2X7R fehérje C-terminális és TM2 doménje esszenciális a pórus kialakulását tekintve⁵⁸. Emellett egyes tanulmányok arról számolnak be, miszerint a P2X7R nyitott állapotú konformációja lehetővé teszi negatívan töltött fluoreszcens festék molekulák átáramlását, akár 1.4 nm-es átmérőig⁵⁹. Továbbá a receptoron egy vagy két agonista kötőhely foglaltsága a deszenzitizált állapotnak kedvez, míg ha mind a három kötőhely foglalt, a szenzitizált vagy kitágult állapothoz járul hozzá. A másik hipotézis alapja, hogy egy további pórusformáló fehérje, az ún. pannexin-1 csatorna felépülése játszik szerepet a pórus kialakításában. Ennek bizonyítéka, hogy farmakológiai gátlása vagy a pannexin-1 génkiütése jelentősen gátolja egyes nagy molekulák felvételét, amely alapján ez a fehérje elengedhetetlen a pórusképződés kialakulásához. A jelenlegi feltételezések szerint a P2X7 receptor aktivációhoz szorosan kapcsolódó későbbi szignalizációs esemény része a pannexin csatorna felépülése^{58,60} (6. ábra).



6. ábra. A P2X7 receptor sematikus szerkezete nyitott állapotban (A) és a pórus kialakulásakor (B és C)⁵⁸. (A) A P2X7R homo-trimerként egy keheyszerű szerkezetet formál, míg az egyedi P2X7 alegység egy ugró delfin alakot. Az agonista kötőhelyek az egyes alegyék között találhatóak, a csatornanyitáshoz két kötőhely elfoglalása szükséges (ATP EC₅₀: ~100-200 μM (patkány), ~700-1000 μM (humán, egér))⁶¹. A feltételezett endogén agonista ATP mellett, az egér P2X7R nikotinamid adenin dinukleotiddal (NAD⁺) is aktiválható ADP-ribosziláción keresztül. A receptor ioncsatorna aktivációja, a sejtbe befelé, illetve kifelé irányuló kation áramhoz vezet. (B és C) A meghosszabbított és/vagy ismételt P2X7R aktiváció, és a harmadik agonista kötőhely elfoglalása permeábilissá teszi a membránt nagy molekulásúlyú szerves kationok és festékek számára, mint az NMDG⁺ és a Yo-ProTM-1. (B) Egy lehetséges mechanizmusa a pórus kialakulásának, ahogy a P2X7R-mediálta csatorna pórussá tágul. (C) Egy másik lehetséges mechanizmus szerint, az előbb említett nagy molekulásúlyú szerves kationok és festékek sejtbe jutása a receptor mellett felépülő, pórust formáló fehérjén (mint a pannexin-1) keresztül mehet végbe.

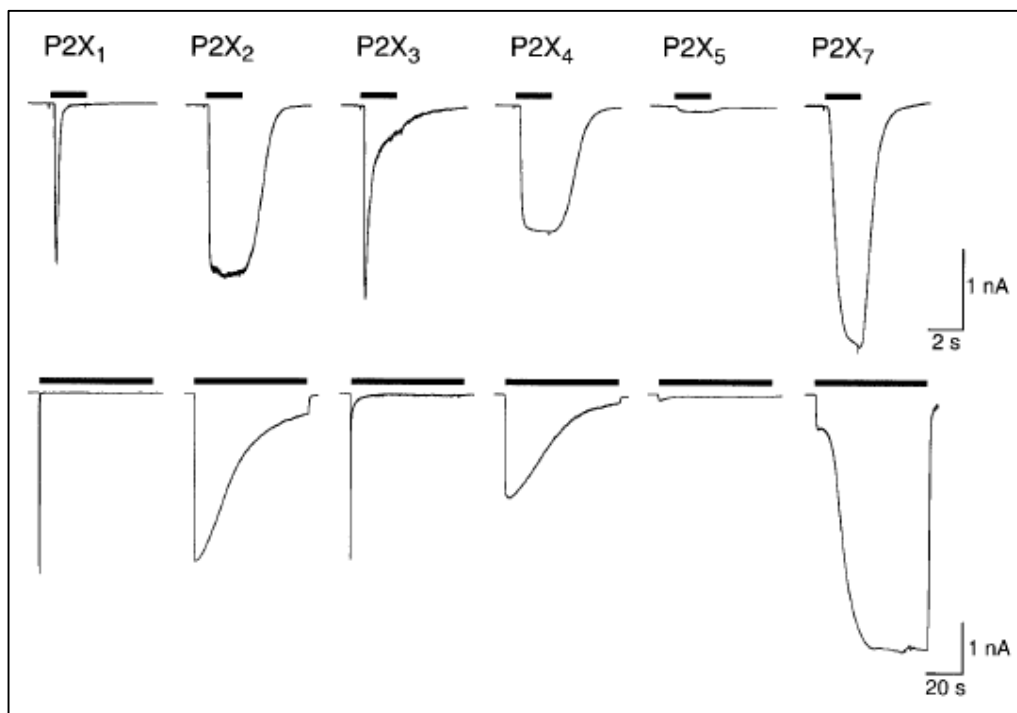
Fiziológiás körülmények között a P2X7R aktivitása alacsony szinten tartható extracellulárisan jelenlévő divalens kationokkal (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ és Cu²⁺), protonokkal (vagyis alacsony pH-n), illetve különböző szerves, illetve szervesetlen anionokkal. Ennek

megfelelően a csökkent extracelluláris Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ion koncentráció esetén a P2X7 receptorok lehetséges funkcionális választ mutatnak⁶⁰.

2.2.3.2. A P2X7 receptor farmakológiája

A homomer P2X receptorok agonista farmakológiáját tekintve az ATP EC_{50} (fél-maximális választ adó hatásos koncentráció) értéke a P2X7 receptor patkány és egér izoformáiban 0,1-1 mM-os tartományba esik, míg ez az érték a többi P2X receptor esetében szubmikromoláris, illetve alacsony, mikromoláris tartományban van³⁶. Tehát a P2X7 receptorok esetében nagyobb ATP koncentráció szükséges a biológiai válasz létrejöttéhez, ellentétben a receptor család többi tagjával.

A homomer P2X7R egyedülálló az agonista expozíciót követő deszenzitizáció tekintetében. Vannak gyorsan, milliszekundumok alatt deszenzitizálódó (P2X1 és P2X3 receptorok) és lassan, 100-1000-szer lassabban (P2X2 és P2X4 receptorok) deszenzitizálódó homomer P2X receptorok. A P2X7R esetében az ATP által kiváltott sejtbe befelé irányuló áram nem mutat deszenzitizációt tartós (2 perc) ATP alkalmazás során (7. ábra)³⁵, ezáltal engedve egy folyamatos sejtbe befelé irányuló Ca^{2+} áramot, amely tükrözi a receptor nem-deszenzitizálódó képességét⁶⁰.



7. ábra. Homomer, patkány P2X receptorok deszenzitizációjának összehasonlítása³⁵. A felső és alsó sorban 10-szeres különbség van az időskálán. Gyors deszenzitizációt a P2X₁R és P2X₃R esetén figyeltek meg, rövid (2 másodperc) ATP kezelést (30 μ M; a P2X₇R esetében pedig 1 mM) követően. Lassú deszenzitizációt tapasztaltak P2X₂ és P2X₄ receptorok hosszabb (20 másodperc) ATP kezelését (30 μ M, valamint a P2X₇R esetében 1 mM) követően. A kísérletek elvégzését megelőzően HEK293 sejteket (humán embrionális veséből származó sejtvonal) az adott P2X fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó plazmiddal transzfektálták. A P2X₇R kivételével a többi rekombináns receptort expresszáló sejt esetében az első ATP kezelésre adott válasz látható. A P2X₇R-t kifejező sejt esetében az ábrán látható ATP kezelést egy 2 perces ATP előkezelés előzte meg.

Az ezidáig megismert P2X receptor agonisták nukleotid analógok. Ezek közül az ATP γ S (adenozin-5'-O-(3-tio)-trifoszfát) és az $\alpha\beta$ -meATP (α,β -metilén ATP) a metabolikusan legstabilabbak, s ezeket széleskörűen használják ATP-kapuzott csatornák vizsgálatára natív szövetekben. Továbbá a 2-MeSATP (2-metil-tio-ATP), diadenozin polifoszfátok, és más nukleozid trifoszfátokat is használják, mint P2X agonistákat³⁶. A leghatásosabb P2X₇R agonista a BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP), amely a Ca²⁺-ionok sejtbe történő beáramlását, pórus kialakulását és interleukin-1 β (IL-1 β)

felszabadulást vált ki receptor aktivációt követően egér, patkány és humán P2X7 receptoron egyaránt. A BzATP-t széles körben alkalmazzák kutatási célra, mint P2X7R agonistát, habár nem teljesen specifikus a P2X7R-ra, mivel képes bekötődni és aktiválni a P2X1 és P2X2 receptorokat is, azonban kisebb hatékonysággal. A BzATP kb. 10-30-szor hatékonyabb, mint az ATP a P2X7R-t aktiváló képességét tekintve. A P2X7 receptoron az ATP-nél kisebb agonista hatékonysággal rendelkeznek a 2-MeSATP, ATP γ S, ADP. Azonban egyes P2X receptorok agonistái, mint az $\alpha\beta$ -meATP, $\beta\gamma$ -meATP, ADP és UTP hatástalannak bizonyultak a P2X7 receptorokon⁶⁰. A humán és rágcsáló P2X7 receptor között van néhány farmakológiai különbség, mint pl. az eltérő ATP és BzATP EC₅₀ értékek (10-25-ször nagyobb a humán P2X7R-n), illetve más vegyületek iránti érzékenységük. További különbséget mutattak ki a humán és patkány eredetű P2X7R elektrofiziológiai profiljában a gyorsabb deaktiváció ATP vagy BzATP általi aktiválást követően. Humán P2X7 receptoron a következő agonista hatáserelességi sorrend állítható fel: BzATP >> ATP > 2MeSATP > ATP γ S >> ADP⁶². A P2X receptorok agonista érzékenységét a 3. táblázat foglalja össze⁶¹.

3. táblázat: Klónozott P2X receptorok agonista érzékenysége⁶¹.

Receptor	ATP	ADP	$\alpha\beta$ meATP	$\beta\gamma$ meATP	2meSATP	BzATP
P2X ₁	1	30	1-3	10	1	3
		80%	100%	40%	100%	60%
P2X ₂	10	≈300	>100	>300	3	30
		100%	<5%	<10%	100%	60%
P2X ₃	1	≈50	1	>300	0.3	—
		>80%	100%	—	100%	—
P2X ₄	10	>>100	>>100	—	10–100	—
		—	<10%	—	30–80%	—
P2X ₅	10	≈300	>>100	—	10	>500
		>80%	—	—	—	—
P2X ₇	100	>>300	>>300	>100	10	3
		—	—	—	80%	300%

Az egyes receptorokhoz tartozó EC₅₀ értékek (μ M) a felső sorokban találhatóak, az alsó sorokban olvasható „%”-os értékek a maximális agonista válaszokat jelentik.

Kereskedelmi forgalomban számos P2X7 receptor antagonistá elérhető, amelyek eltérést mutatnak kémiai szerkezetüket, az antagonizmus módját, specificitásukat illetve fajselektivitásukat tekintve. Az első generációs vegyületek, amelyek képesek antagonizálni a P2X7 receptorokat, általánosan nem target specifikusak, képesek gátolni

más P2X és bizonyos esetekben P2Y receptorokat. Az ilyen, korai antagonisták közé tartozik a Reactive Blue 2, amelyet az 1970-es években használtak először, a suramin és a Brilliant Blue G (BBG). Emellett a piridoxálfoszfát-6-azofenil-2-4-diszulfonsav (PPADS), a perjodáttal oxidált ATP (oATP) és az 1-[N,O-bisz(5-izokinolinszulfonil)-N-metil-l-tirozil]-4-fenilpiperazin (KN-62) vegyületeket az 1990-es években kezdték alkalmazni, továbbá fejlesztettek ezekre a struktúrákra épülő vegyületeket tulajdonság és specificitás javítás érdekében. A korai vegyületek közül a BBG bizonyult a leghasználhatóbbnak. Ezt a vegyületet egy specifikus P2X7R antagonistaként tartják számon, amely nanomoláris koncentráció tartományban képes gátolni a patkány P2X7 receptorát, a többi patkány P2X receptort pedig csak mikromoláris koncentráció tartományban vagy egyáltalán nem. Újabban arról számoltak be, hogy a BBG szintén blokkolja a pannexin-1 fehérjét, így bonyolítja a használhatóságát, mint szelektív P2X7R antagonistá. Az oATP-t szintén széles körben alkalmazzák, de más P2X receptort (P2X2R, P2X3R) is gátol, illetve gyengíti a P2 receptor független proinflammatorikus jelátviteli mechanizmusokat. Továbbá az oATP irreverzibilisen kötődik a P2X7 receptorhoz, annak kovalens módosítása révén. Hasonlóan az oATP-hez a PPADS is irreverzibilisen kötődik a P2X receptorokhoz⁶².

Az elmúlt két évtizedben specifikusabb antagonisták második generációját fejlesztették. Míg az első generációs antagonistákat általánosan *in vitro* kísérletekre tervezték, addig az újabb gyógyszereszerű antagonistákat inkább terápiás céllal⁶². Ezek közül a kutatócsoportunk elektrofiziológiai és egér viselkedés farmakológiai vizsgálatokban alkalmazott JNJ-47965567 antagonistá alkalmazása részben reprodukálta a P2X7 receptor génkiütés hatását⁶³. Ez az antagonistá szelektív a P2X7 receptorra és jól penetrál a vér-agy gáton is⁶⁴. Annak ellenére, hogy újabb P2X7R antagonisták érhetőek el, sok *in vivo* vizsgálatokban még mindig az első generációs antagonistákat alkalmazzák. A P2X7R farmakológiai tanulmányok esetében zavart okozhat az, hogy eltérő az antagonisták aktivitása a receptoron különböző fajokban (klónozott emlős P2X7 receptorokon végzett vizsgálatokban) (4. táblázat)⁶².

4. táblázat. Az emlős P2X7 receptorok antagonistá profiljai⁶².

Species	IC ₅₀								
	PPADS	BBG	Reactive Blue	KN-62	A438079	A740003	AZ10606120	AZ11645373	JNJ-47965567
	μM								
Human	1.2	1.9	5.4	0.2	0.9	0.09	0.003	0.05	0.005
Rhesus macaque	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	0.3	N.D.	0.004	0.02	0.003
Dog	N.D.	0.05	N.D.	0.01	3.9	N.D.	0.06	0.04	0.005
Rat	1.2	0.6	2.8	>100	0.1	0.1	0.03	>20	0.063
Mouse (BALB/c)	4.9	0.2	21	0.2	0.6	0.7	0.6 ^a	1.6 ^a	0.03 ^a
Mouse (C57BL/6)	40	0.5	18	0.6	0.6	1.7	0.6 ^a	1.6 ^a	0.03 ^a
Guinea pig	0.2	0.02	N.D.	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	1.2	N.D.

A táblázatban az egyes vegyületek IC₅₀ (fél-maximális választ adó gátló koncentráció) értékei (μM) a P2X7 receptoron, egyes fajonkénti megoszlása látható (humán, rhesus majom, kutya, patkány, egér (BALB/c és C57BL/6), tengerimalac). (N.D.; nem meghatározott); ^anem határozták meg az egértörzset).

A kémiai vegyületek mellett a P2X7R számos kationnal gátlható. Különösen a kétértékű kationok, mint a Ca²⁺- és Mg²⁺-ionok *in vivo* mért koncentrációi, *in vitro* körülmények között is gátolják a P2X7 receptor aktivációját. A kétértékű kation P2X7R aktivációt gyengítő képességét az ATP szabad sav formájával (vagy ATP⁴⁻) történő kelátképző képességének tulajdonítják. Habár egyes tanulmányok azt bizonyítják, hogy az előbb említett, és más kétértékű kationok allosztérikus moduláló hatásuk révén csökkentik a P2X7R aktivációját⁶². Az 5. táblázatban a P2X receptorok ion érzékenysége található⁶¹.

5. táblázat: Klónozott P2X receptorok ion szenzitivitása⁶¹.

Receptor	Calcium	Magnesium	Zinc	Copper	Hydrogen
P2X ₁	No effect >100 mM	—	—	—	Decrease pK _a ≈6.3
P2X ₂	Decrease 5 mM	—	Increase 20 μM	Increase 16 μM	Increase pK _a ≈7.3
P2X ₃	Decrease 90 mM	—	—	—	Decrease pK _a ≈6.0
P2X ₄	—	—	Increase 2 μM	No effect to 50 μM	Decrease pK _a ≈7.0
P2X ₇	Decrease 3 mM	Decrease 500 μM	Decrease 10 μM	Decrease 0.5 μM	Decrease pK _a ≈6.1

A táblázatban található koncentráció értékek: az egyes ionok (kalcium-, magnézium-, cink-, réz-, hidrogén-ionok) ATP-által kiváltott válasz értékét milyen koncentrációban csökkentik, illetve növelik 50%-al (kivéve a hidrogén-ionok esetében pK_a értékek vannak feltüntetve). (No effect: nem volt hatása; Decrease: csökkentett; Increase: növelt).

2.2.3.3. A P2X7 receptorok szöveti és sejttípus specifikus megoszlása a központi idegrendszerben

Korábban Northern blot vizsgálatok során erős P2X7 receptort kódoló mRNS kifejeződést fedeztek fel az immunrendszer egyes szerveiben (csecsemőmirigy, lép), de más szervekben is, mint például az agyban, a gerincvelőben, a vázizomzatban, a tüdőben és a placentában egyaránt⁵³. A P2X7 receptorokat számos sejttípus expresszálja, beleértve a vérképző sejteket (limfocita és monocita sejtek, makrofágok), valamint az idegrendszer sejtjeit (neuronok, asztrocita, oligodendrocita, mikroglia és a Schwann sejtek). Autoradiográfias kísérleti módszerekkel tárták fel a P2X7R kötőhelyeit, és sűrű P2X7R kötődést találtak az agy egészében és a gerincvelőben, amely magába foglalja a hipotalamikus és talamikus magvakat, a hippocampuszt, a spinális trigeminális magvat és traktust, a kortikális régiókat, a kisagyat, a *nucleus caudatus*-t és a *putamen*-t. Mindemelllett a P2X7 receptorok sejttípus specifikus lokalizációja a KIR-ben régóta vita tárgyát képezi. A rendelkezésre álló antitestek a P2X7 receptorokon kívül azok splice variánsaihoz is kötődnek, ezért az immunhisztokémiai kísérletek eredményei megkérdőjelezhetőek⁵⁸. Egyelőre az elektrofiziológiai és neurokémiai vizsgálatok eredményei is ellentmondásosak, míg neurokémiai kísérletekben egyértelműen

kimutatható a P2X7 receptor aktiváció idegvégződésekre kifejtett közvetlen hatása (pl.: cerebrokortikális⁶⁵, kaudális agytörzsi⁶⁶, embrionális gerincvelői⁶⁷, kortikális⁶⁸ eredetű neuronokra), elektrofiziológiai kísérletekben megszólaltatható P2X7 receptort az ezzel foglalkozó kutatócsoportok inkább asztrocita eredetűnek tartják^{69,70}. Egyes tanulmányok aktivitás-függő P2X7R expressziós mintázatról számolnak be, amely egy inzultust követően indukálódott vagy felülszabályozódott, mint egy agyvérzés, iszkémia, alváshiány, alultápláltság. Mindazonáltal a hozzáférhető bizonyítékok a funkcionális P2X7 receptorok jelenlétéről a KIR különböző sejttypusain meggyőzőek. Funkcionális kísérleti módszerekkel (pl.: neurokémia, Ca²⁺ fluorimetria, Patch-clamp elektrofiziológia) igazolták, hogy P2X7 receptorok jelen vannak neuronokon, asztrocita és mikroglia sejteken egyaránt. A leginkább elfogadható magyarázata az egymásnak ellentmondó tanulmányoknak, hogy a P2X7R kifejeződése dinamikusan változik az egyes kísérleti változók függvényében, mint a kor vagy az eltérő szintű stressz stimulusok a mintagyűjtést megelőzően (pl.: frissen preparált agyszelet a fixált agyszelettel szemben)⁵⁸.

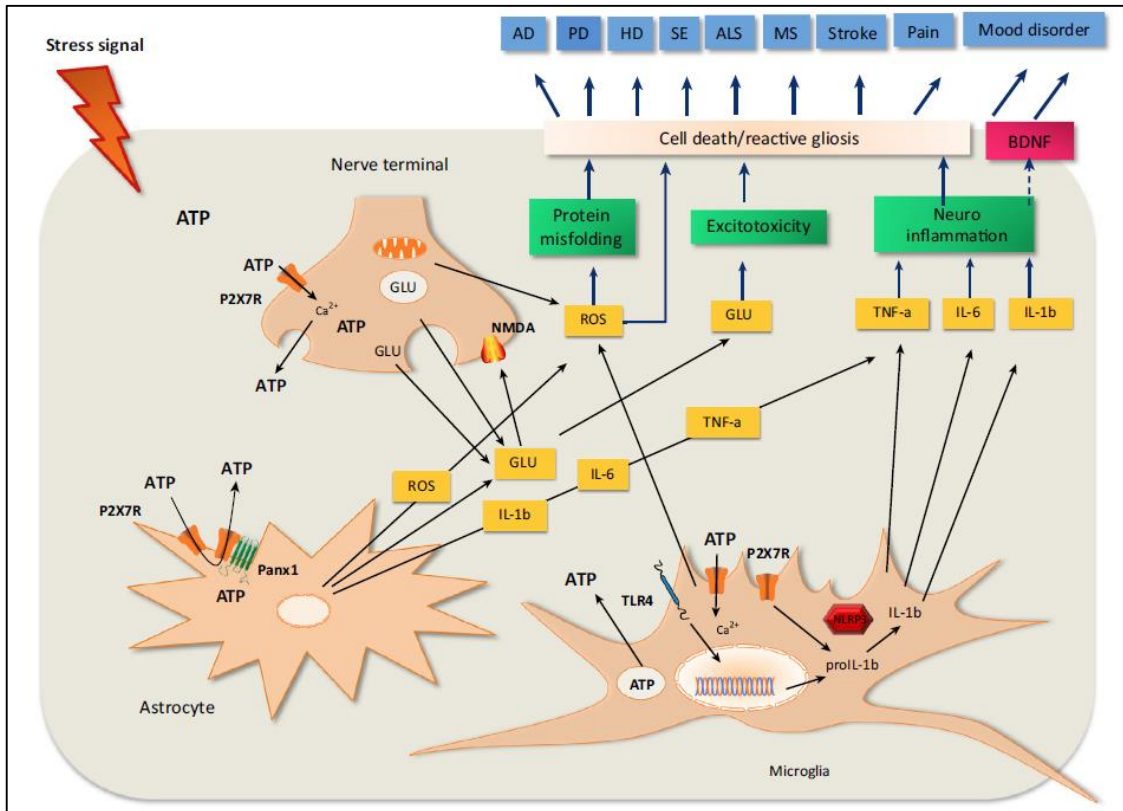
2.2.3.4. A P2X7 receptor funkciója a központi idegrendszerben

A purinerg jelátviteli folyamatok az idegi fejlődésben és patofiziológiás folyamatokban egyaránt érintettek, mint például a sejtosztódás, sejt differenciáció, neuron-glia interakció és neuronális gyulladás. A P2 receptorok szoros kapcsolatban állnak az embrionális idegi fejlődéssel. A P2 receptorok közvetítette szignalizációs utak, amennyiben zavart szenvednek, hozzájárulhatnak pszichiátriai betegségek kialakulásához. A pszichiátriai kórképek indikációjában főként a dopamin, glutamát és GABA neurotranszmitter rendszerek, mint gyógyszer-célpontok irányába folynak leginkább gyógyszerfejlesztések⁷¹.

A központi idegrendszerben a P2X7R stimuláció leginkább jellemzett következménye a neurotranszmitterek felszabadulása, különösképpen a GLU kiáramlása az extracelluláris térbe. Ez a hatás kiváltható szinaptoszómákból és asztrocita sejtekből egyaránt. Az idegvégződéseken illetve rekombináns P2X7 receptort expresszáló sejt vonalakban történő kísérletekben megfigyelték, hogy a P2X7R közvetítette GLU felszabadulás végbemehet exocitózissal és nem-exocitotikus módon is⁵⁸. Asztrocita

sejtekben a P2X7R stimuláció mediálta GLU felszabadulás lassú, sejtbe befelé irányuló áramokat vált ki. Ezzel szemben egy P2X7 receptorhoz hasonló tulajdonságú receptor aktivációja hosszantartó GLU kiáramlást eredményez, amely tónusos áramot generál a hippocampusz CA1 neuronjaiban, amelynek patofiziológiai következményei lehetnek az agyban^{60,72}. Kutatócsoportunk publikációiban a P2X7 receptor mediált GLU felszabadulásról számolt be, egér agy hippocampális és prefrontokortikális szövetmintáiban^{63,73}. Mindamelllett, hogy a P2X7R aktivációja a hippocampuszt innerváló serkentő idegvégződéseken szabályozza a GLU kiáramlást, a gátló interneuronokon található P2X7 receptorok serkentése a GABA felszabadulást befolyásolhatja⁷⁴.

Fiziológiás körülmények között az ATP koncentrációja nem éri el a P2X7 receptorok aktivációjához szükséges, 0.1-1 mM szintet. A receptor széleskörűbb stimulációja patológiás körülmények között várható, amikor szöveti sérülés, trauma vagy más patológiás szignálok hatására nő az extracelluláris környezetben az ATP szintje, amely az extraszinaptikus és extraneuronális P2X7 receptorok aktivációját eredményezheti. Az idegvégződésekből, továbbá az asztrocita sejtekből a P2X7 receptorok aktivációjának hatására bekövetkező nem szelektív kationáram következményeként nagy mennyiségben felszabaduló GLU neuronális excitotoxicitáshoz vezethet (8. ábra)⁵⁸. Emellett a P2X7R stimulációja fontos szerepet játszik egyes pro-inflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-18, tumor nekrozis faktor α (TNF- α)) érési folyamatainak szabályozásában és azok felszabadulásában⁷³. Ezek a citokinek felszabadulhatnak asztrocita és mikroglia sejtekből egyaránt, amelyeknek idegi gyulladáshoz vezető szerepük van⁵⁸. Az ATP által közvetített P2X7R aktiváció következményeként felszabaduló IL-1 β mikroglialis aktivációhoz és idegyulladásához vezet. Ezek a folyamatok ok-okozati kapcsolatba hozhatóak neuropszichiátriai zavarok patofiziológiájával, ezáltal nagy jelentőségű terápiás célponttá teszik a P2X7 receptort ilyen betegségek kezelésére irányuló kutatásokban. Napjainkban is klinikai fázisban van számos, vér-agy gáton penetráló, P2X7 receptor antagonistá neuropszichiátriai betegségek indikációjában⁷⁵.



8. ábra. Eltérő etiológiájú KIR-i betegségekben a P2X7R-mediálta útvonalak közös mechanizmusa⁵⁸. Az angol kifejezések magyar fordítása: stress signal (stressz jel), nerve terminal (idegvégződés), astrocyte (asztrocita sejt), microglia (mikroglia sejt), protein misfolding (hibás fehérje feltekeredés), excitotoxicity (excitotoxicitás), neuroinflammation (idegi gyulladás), cell death/reactive gliosis (sejthalál/reaktív gliózis), mood disorder (hangulati zavarok). AD: Alzheimer-kór, PD: Parkinson-kór, HD: Huntington-kór, SE: státusz epileptikus, ALS: amiotrófiás laterálszklerózis, MS: szklerózis multiplex.

Továbbá a P2X7R aktivációja közvetett vagy közvetlen módon hatással van az agyi eredetű neurotróf faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) fehérje szintjeire. A BDNF-nek kulcsfontosságú szerepe van a neuronális eredetű sejtek fejlődésében, differenciációjában és túlélésében⁷³. A BDNF csökkent szintjének kritikus szerepe lehet hangulati zavarokkal kapcsolatos neurodegeneratív betegségekben⁷⁶. Mindemellett a P2X7 receptor aktiváció hatására fokozódik a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése, amelyeknek szintén jelentős hatása lehet számos neurodegeneratív betegség fejlődésében⁷⁷.

Korai embrionális fázisban ezek a receptorok szintén fontos szerepet játszanak a fejlődésben mikroglia proliferáció szabályozása által az emlősök gerincvelőjében. Egér embrióban megfigyelték, hogy a mikroglia proliferáció a fejlődés során bekövetkező motoros neuronok sejthalálakor, illetve a szinaptogenezis során történik meg. Továbbá embrionális gerincvelői eredetű mikroglia sejtek proliferációja szinte teljesen a P2X7 receptoroktól függ, de nem azok aktiváltsági állapota. A receptor emelkedett szintje és stimulációja akármilyen sejtet érő inzultus hiányában is tenyésztett mikroglia sejtek aktivációjához és proliferációjához vezet. Ez a megfigyelés arra hívja fel a figyelmet, hogy a P2X7R pórus kialakulásnak trofikus szerepe lehet az agyban. Azonban a P2X7R mediált mikrogliális sejtsztódást és azok aktivációját figyelték meg számos neurológiai és idegi gyulladásos betegségben⁷⁸.

Rendszerint a P2X7R pórust formáló aktivitása szükséges a sejtnövekedéshez, azonban receptor hosszantartó stimulációja csökkent mitokondriális membránpotenciálhoz, nagymértékű mitokondriális Ca^{2+} -ion szint emelkedéséhez, és sejthalálhoz vezet⁷⁹. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy egy pro-apoptotikus P2X7R szignál, mint egy növekedést elősegítő faktorként is működik, ez a kettős szerep a receptor stimuláció időtartamától függ. Egy bakteriális fertőzés alatt, a P2X7R aktiválása neutrofil sejtek apoptózisát előzi meg, ami mint egy gazda védelmi mechanizmus játszik szerepet. Ez a protektív funkció nagyon jól megalapozott agyi sérülés és gyulladás során⁶⁰. Kimutatták, hogy a mikrogliális P2X7R aktivációja, stimulálja a Toll-szerű receptor-4-et (Toll-like receptor 4), amely segít a sejtörmelék eltávolításában, elősegítve a regenerációt az axonális növekedés fokozódásával. Ez a tanulmány a P2X7R agyi sérülést követő javító mechanizmusban betöltött szerepére ad bizonyítékot⁸⁰.

A sérült sejtekből felszabaduló ATP, mint egy veszélyt jelző szignál viselkedik. A P2X7R meghosszabbított stimulációja citoszkeletális átrendeződést, membrán kitüremkedést, IL-1 β felszabadulást, és kaszpáz-3 aktivációt eredményez, amely végül sejthalálhoz vezet. Az intracelluláris Ca^{2+} -ion szint emelkedésre és a mitokondriális diszfunkcióra adott válaszként apoptózist mediál különböző sejtípusokban, beleértve a humán leukémia sejteket, neuronokat, neurális progenitor sejteket és a retinális ganglion sejteket egyaránt. A P2X7R szerepe az apoptózis közvetítésében egy fő terápiás célponttá teszi neuroprotekciónban⁶⁰.

2.2.4. A P2X7 receptor és a szkizofrénia

Az elmúlt évtizedben a technológiai fejlődéssel paradigmaváltás történt a terápiás fejlesztésben. Jelenleg számos új utat vizsgálnak az idegtudomány területén⁶⁰. Pszichiátriai rendellenességeket különféle mentális vagy viselkedési mintázatokkal írnak le, amelyek az életminőség romlásához vezetnek. Multifaktoriális folyamatok járulnak hozzá ezek kifejlődéséhez és előrehaladásához. Az agyi purinerg neurotranszmisszió és neuromoduláció iránt növekvő terápiás igény mutatkozik a pszichiátria területén. A purinerg mechanizmusok és specifikus receptor altípusok bizonyítottan kapcsolatban állnak a viselkedés és a hangulat számos aspektusának szabályozásával, illetve szabályozási zavarával az agyműködés kóros folyamataiban⁸¹. A purinerg receptor altípusok közül a P2X7 receptor túlzott aktivációja központi szerepet tölthet be súlyos neurodegeneratív betegségekben⁶⁰.

A hangulati zavarok genetikai, fejlődési és környezeti tényezők komplex kölcsönhatásaiból származnak. Genetikai kapcsoltsági tanulmányok szerint egyes kandidáns géneket tartalmazó 12q24.31 kromoszóma régió variációit összefüggésbe lehet hozni major depresszív, bipoláris és szorongásos zavarokkal⁵⁸. Korábban a szkizofréniát és a bipoláris zavart hagyományosan két eltérő klinikai entitásként tartották számon, azonban ezt a feltételezést már vitatják⁸². Az újabb nézőpont szerint a szkizofrénia és a bipoláris zavar egyazon pszichiátriai spektrum eltérő részeinek tekinthető, habár a DSM-5-ben még megtartották a határokat a bipoláris zavar és a szkizofrénia között⁸³. Ezt különféle független tanulmányok támasztják alá. Mindkét betegségben nagyfokú genetikai öröklődés mutatható ki. Család- és ikervizsgálati eredmények szerint az öröklődés átfed a két rendellenesség között. Genetikai kapcsoltsági térkép vizsgálatok szerint bizonyos hajlamosító markerek génjei ugyanazon a kromoszómákon találhatóak mindkét betegség esetében. Emellett a bipoláris zavar és a szkizofrénia hasonlóságot mutat a neurotranszmitter működési zavart illetően. További indirekt bizonyítékul szolgál a két betegség közti kapcsolatra, hogy számos újabb, szkizofrénia kezelése során alkalmazott atípusos antipszichotikum hasznosnak bizonyult bipoláris zavar kezelésében is⁸².

A P2X7 receptort kódoló gén a szkizofrénia és a bipoláris zavar egyik fő kapcsolódási pontjában található a 12q21-33 kromoszóma régióban⁸⁴. A receptor

bipoláris zavarban való érintettségét számos kutatócsoport vizsgálja. A Semmelweis Egyetem, Kútvölgyi Klinikai Tömbjének egy kutatócsoportja genetikai asszociációs vizsgálatban a P2RX7 gén kapcsoltóságát mutatta ki a depressziós tünetek súlyosságával, bipoláris zavarral küzdő páciensekben⁸⁵. Ezzel szemben kevés tanulmány foglalkozik a P2X7R és a szkizofrénia kapcsoltóságával. Hansen és munkatársai 2008-ban publikált vizsgálatában, szkizofréniaival diagnosztizált betegek vérmintáinak genotipizálását végezték, előzetesen funkcionálisan karakterizált, a P2RX7 gén 9-féle kiválasztott egy pontos nukleotid polimorfizmusaira (single nucleotide polymorphism, SNP) nézve. Ebben a tanulmányban nem találtak bizonyítékot a P2X7 receptort kódoló gén és a szkizofrénia kapcsolatára. Ennek ellenére nem zárható ki a receptor és a betegség közti kapcsolat illetve, hogy más SNP szkizofrénia kialakulásának kockázatát hordozza magában. Mivel néhány, vizsgált SNP-nek relatív alacsony frekvenciája volt, ezért általános következtetések levonására nem alkalmas a tanulmány⁸⁴. Emellett kimutatták, hogy az előzetesen, hangulati zavarokkal asszociált betegségekben meghatározott P2RX7 génben bekövetkező egyes SNP-k a P2X7 receptor funkcionális tulajdonságait (ATP-indukálta ionáramok, pórus kialakítás) jelentősen befolyásolják⁸⁶.

A szkizofrénias és hangulati zavarokkal küzdő betegek között nagymértékű az öngyilkosság prevalenciája. Mikroglialis aktiváció, mint egy lehetséges következménye lehet az öngyilkosságot megelőző stressznek. Korábban szkizofréniaival és depresszióval diagnosztizált, öngyilkosságot elkövető betegek *post mortem* agyszövet mintáiban fokozott mikroglia denzitásról számoltak be. Stressz alatt a mikroglia sejtek morfológiája megváltozik. Az aktivált mikroglia sejteken felülszabályozódnak egyes antigénprezentáló molekulák. Továbbá a mikroglia sejtekből proinflammatorikus citokinek (pl.: IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α), valamint reaktív oxigén és nitrogén gyökök szabadulnak fel, amelyek befolyásolják a monoaminerg és szerotonerg neurotranszmissziót⁸⁷. Mindemellett öngyilkossági kísérletet elkövető egyének vérplazmájában megemelkedett nitrogén-oxid metabolit szinteket mutáltak ki⁸⁸. Eszerint ezek a mechanizmusok fontosak lehetnek az öngyilkosságot megelőzően⁸⁷. A P2X7 receptorok aktivációja a mikroglia sejteken, úgy tűnik, hogy elengedhetetlen a mikroglialis sejt-mediált idegsejt károsodások kialakulásához⁸⁹. Fontos megjegyezni, hogy a mikroglialis aktiváció számos neuropszichiátriai betegséghez kapcsolódik, mint a depresszió, szkizofrénia, autizmus és az obszesszív-kompulzív zavar⁹⁰.

A humán P2X7 receptor lehetséges gyógyszeres modulációjának megállapítására, amelyeket szkizofrénia, hangulati zavarok vagy neuropátiás fájdalom kezelésére alkalmaznak, összesen 123 gyógyszert profilírozott Hempel és munkacsoportja, amelyek főként a KIR-ben fejtik ki hatásukat. Ezek között voltak olyan gyógyszerek, amelyek csökkentették vagy gátolták a P2X7 receptoron keresztül, ATP által indukált Ca^{2+} -ion beáramlást a sejtekbe 20 μM alatti koncentrációban. Eredményeik alapján a perazin-típusú antipszichotikumként alkalmazott vegyületek (mint a proklórperazin és a trifluoperazin), hatásos, de faj-szelektív modulátorai a humán P2X7 receptornak⁹¹.

Kutatócsoportunk a P2X7R aktivációját követő molekuláris mechanizmusok tanulmányozása során növekedett p38 MAPK enzim expressziót mutatott ki egér agy hippokampuszában⁹². A neuronális MAPK kaszkádok fontos szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitásban és a memória kialakításában. A P2X7R stimulációt követő p38 MAPK foszforiláció kritikus szerepet játszhat a receptor aktivációt követő glutamát felszabadulásban számos fiziológiai és patofiziológiai állapotban, mint például a szinaptikus plaszticitás, neurodegeneráció és az idegi gyulladás⁹². Emellett a P2X7 receptor ATP általi aktivációját követő GABA és GLU felszabadulást mutattak ki egér hippokampális agyseleleteiből. Ezek a neurotranszmitter kiáramlások gátolhatóak voltak P2X7R antagonistákkal, továbbá P2rx7 génkiütött állatokban sem volt kimutatható egyik neurotranszmitter felszabadulása sem⁹³. Marcoli és munkatársai patkány cerebrokortikális idegvégződéseiben bizonyították a P2X7R jelenlétét. A glutamáterg idegvégződéseken lokalizálódnak, ahol szerepet játszhatnak az ATP által kiváltott GLU felszabadulásban, amely magába foglalja a Ca^{2+} -függő vezikuláris felszabadulást. Továbbá maga a P2X7R is képes, egy jelentős Ca^{2+} -független módot kialakítani a GLU kiáramlására⁶⁵.

Kutatólaboratóriumunk egy korábbi publikációjában bemutatta, hogy a P2rx7 gén deléciója egérben antidepresszáns fenotípust eredményez⁷³. A P2X7 receptor stimulációja koncentráció-függő módon GLU felszabadulást váltott ki az egér agy hippokampuszában, ugyanakkor a P2rx7 deficiens állatokban ez nem volt megfigyelhető. Érdekes módon a P2rx7 génkiütött állatokban emelkedett ionotróp NMDA-típusú glutamát receptor, NR2B alegységének emelkedett expresszióját mutatták ki mRNS és fehérje szinten egyaránt az egér agy hippokampuszában, natív egerekhez viszonyítva. A megemelkedett GLU kiáramlás hangulatváltozáshoz vezető egyik lehetséges útvonala az

a neurotróf faktorok szintjében bekövetkező változás lehet. Ezek közül BDNF, a leginkább elterjedt neurotrofin a KIR-ben, amely szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban és a neuronális túlélésben. A BDNF fehérje expressziója jelentősen csökken patofiziológiás körülmények között különféle neurológiai és pszichitáriai betegségekben. Kutatócsoportunk ezen tanulmányában, a hippocampális BzATP-általi P2X7R aktiváció következtében csökkent BDNF fehérje szintet mutatott ki, amely nem volt detektálható receptor génkiütött állatokban, illetve P2X7R antagonistával történő együttes kezelés során megemelkedett a BDNF expressziója. Ez alapján azt feltételezik, hogy a BDNF szintek szabályozása a hippocampusban, a P2X7R lokális szabályozó hatása alatt áll. Ugyanakkor a BzATP BDNF szintjét csökkentő hatása megfordítható NR2B receptor szelektív antagonistával, illetve más glutamát receptor antagonistával is, amely a nem-NMDA-típusú és NMDA receptorok szerepére hívja fel a figyelmet a P2X7R mediált BDNF expressziós szintet szabályozó folyamatokban. Érdekes módon, az LPS-kezelés szignifikáns emelkedést váltott ki a szerotonin expresszióját tekintve natív egerek hippocampusában, ugyanakkor ez a hatás teljesen hiányzott P2rx7 deficiens állatokban. Ennek következtében a közvetlen vagy közvetett szerotonerg transzmisszió modulációja egy lehetséges mechanizmus, amelynek a háttérében a P2X7R hatása állhat, a stressz indukálta változások szabályozásában hangulat-kapcsolt viselkedésben⁷³. Újabban kimutatták, hogy a gerincvelői szubsztancia gelatinosa asztrocita sejtjein P2X7 receptorok kifejeződnek, amelyek aktivációja GLU felszabaduláshoz vezet. A felszabadult GLU a szomszédos sejtekben kation áramot indukál az NMDA és AMPA receptorok stimulációján keresztül. Fiziológiásan alacsony a P2X7R sűrűsége, azonban ezek a receptorok funkcionálisan felülszabályozódnak patofiziológiás körülmények között⁹⁴.

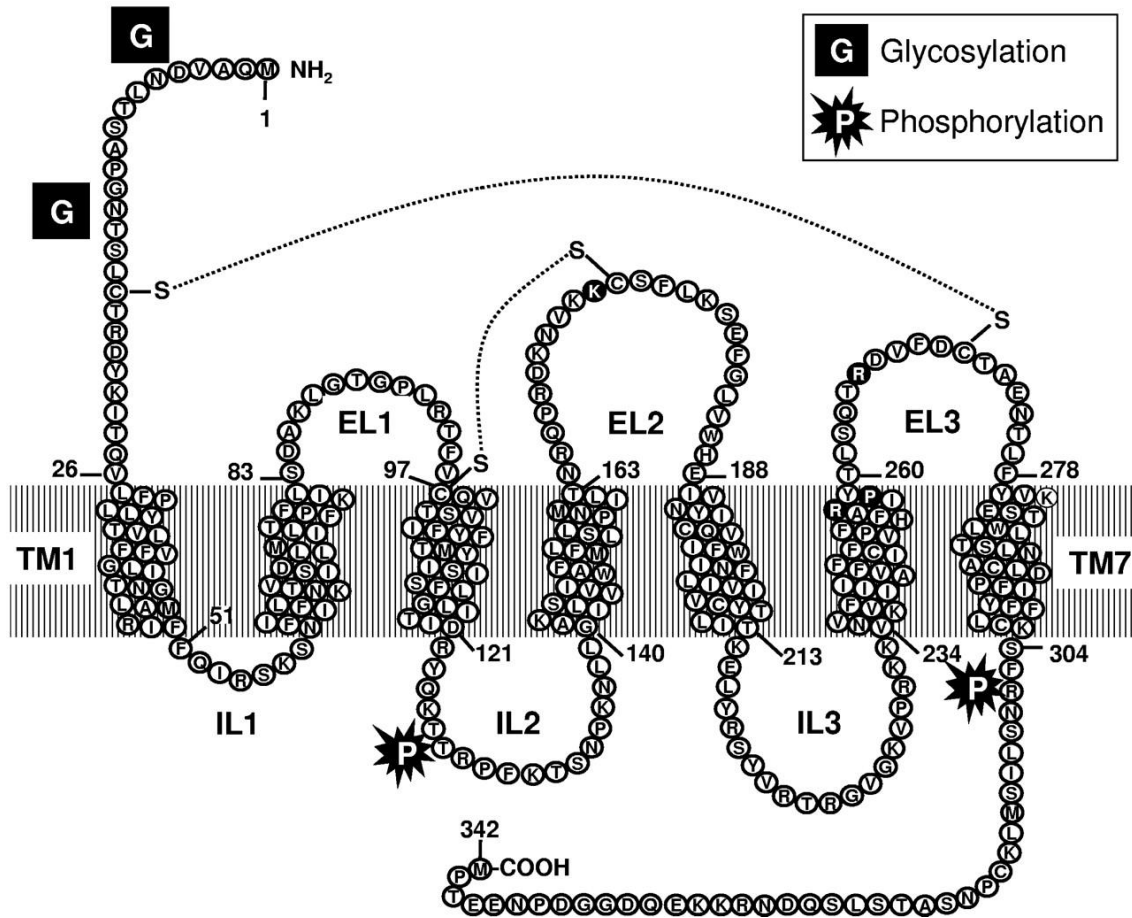
Korábban képkalkotó, neurokémiai és terápiás kutatások alapján úgy vélték, hogy két fő neurotransmitter rendszer játszik szerepet szkizofréniában, a dopaminerg és a glutamáterg rendszerek. A GABAerg rendszert, mint a fő gátló neurotransmitter rendszer a KIR-ben, régebben nem vizsgálták még tüzetesen, mint egy lehetséges kulcsszereplő a szkizofrénia patomechanizmusában. A parvalbumin (PV)-pozitív, gyors-tüzelésű GABAerg interneuronok időszakosan gátolják a kortikális-limbikus piramis neuronokat, amelyek érzékenyek az NMDA receptorok alulműködésére. A kortikális GABAerg rendszer az egyik leginkább érintett az agy érése során, például pszichoaktív

szerek expozíciója esetén, úgy vélik, mint egy kulcs mediátor játszhat szerepet, amely szükséges a szkizofrénia kialakulásához. Mindezek mellett az adenzin neuromodulációs rendszer szkizofréniaiban való érintettségére hívják fel a figyelmet, amely kapcsolatban áll a dopaminerg és glutamaterg rendszerekkel egyaránt. Továbbá egyes adenzin receptorok gliális sejteken is expresszálódnak, például az asztrocita GLU transzport szabályozásában az $A_{2A}R$ vesz részt, illetve az adenzin szerepet játszik az agy fejlődésében egyaránt⁹⁵.

Figyelembe véve a P2X7 receptor kapcsolatát az előbbieken említett, a szkizofréniaiban érintett neurotranszmitter rendszerekkel, munkacsoportunk egy nemrég közzétett publikációjában, amely a doktori disszertációm alapjául szolgál, a P2X7 receptor szkizofrénia fenciklidin (PCP) által indukált állatmodelljében vizsgálta annak szerepét, és hívja fel a figyelmet arra, hogy mint lehetséges gyógyszercélpont szóba kerülhet a szkizofrénia terápiás kezelésében⁶³.

2.2.5. A P2Y₁₂ purinerg receptor

2001-ben azonosították és karakterizálták mind a humán, a patkány és az egér P2Y₁₂ purinerg receptorokat. Az ADP-vel aktiválható G_{ai}-kapcsolt receptorok jellegzetes képviselője a P2Y₁₂ receptorok. A többi G-protein kapcsolt receptorhoz hasonlóan hét transzmembrán régióval, három-három intra- és extracelluláris hurokkal rendelkeznek (9. ábra). A receptor N-terminálisa intracelluláris, míg a C-terminálisa extracelluláris elhelyezkedésű. G_{ai}-protein kapcsoltáguk révén, a receptor aktivációja adenilát cikláz enzim gátlásához vezet, melynek az a következménye, hogy csökken a cAMP, másodlagos jelátvivő intracelluláris koncentrációja. Funkcionális P2Y₁₂ receptorok előfordulását leírták a központi idegrendszer egyes sejtjein, mint a mikroglia sejteken, Schwann sejteken és az oligodendrocita sejteken egyaránt, továbbá kifejeződnek a vérlemezkéken, ahol a vérlemezke aggregációjában van fontos szerepük⁹⁶. Így a ma széles körben használt vérlemezke aggregáció gátlók, mint a clopidogrel és a ticagrelor molekuláris támadáspontja a P2Y₁₂ receptor.



9. ábra. A P2Y₁₂ receptor altípus sematikus szerkezete⁹⁷. Az ábrán a rövidítések jelentése: G - glikozilációs helyek, P – foszforilációs helyek, EL1-3 – extracelluláris hurkok, IL1-3 – intracelluláris hurkok, TM1-7 – transzmembrán régiók.

2.2.6. Idegrendszeri gyulladásoz folyamatok pszichiátriai zavarok és neuropátiás fájdalom hátterében

Az idegrendszeri gyulladásoz folyamatok szerepet játszhatnak számos központi idegrendszeri betegség kialakulásának hátterében, mint például a depresszió, a szorongás, a szkizofrénia és a fájdalom. Különböféle stresszhatások hatására (pl.: fiatalkori csapások, pszichoszociális stressz és a fertözések) úgy tűnik, hogy a mikroglia sejtek proinflammatorikus fenotípusú sejtekké alakulnak. Az ezt követő gyulladásoz folyamatok túlzott idegrendszeri gyulladásoz válaszhoz vezetnek, mint a gyulladáskeltő mediátorok felülszabályozódása, amelyek kapcsolatba hozhatóak a központi idegrendszer diszfunkciójával⁹⁸.

Előzetesen említésre került a 2.1.2. fejezetben, hogy a szkizofrénia patomechanizmusának háttérében szerepe lehet az NMDA receptorok által mediált glutamáterg neurotranszmisszió deficitjének. Fiziológias körülmények között a glutamáterg szinapszisok plaszticitásában szerepe van a nem-receptor protein tirozin-kináz Src fehérjének, amely felülszabályozza az NMDA receptorok működését. Krónikus gyulladással és neuropátiás fájdalom modellekben az NMDA receptorok nem-receptor protein tirozin-kináz Src általi felülszabályozódás tovább fokozódik. Ezzel ellentétben, a hippocampusban és a prefrontális kéregben ez a felülszabályozódás gátlást szenved a NRG1 – ErbB4 szignalizáció által, amely a szkizofrénia pozitív tüneteinek genetikai háttérében állhat⁹⁹. Mindemellett az elmúlt két évtizedben a metabotróp glutamát receptorokat, mint lehetséges terápiás célpontokat vizsgálták különböző központi idegrendszert érintő betegségekben, mint például a szorongás, depresszió vagy a szkizofrénia. Ugyanakkor feltételezik, hogy a metabotróp glutamát receptorok a krónikus fájdalom patofiziológiájának háttérében állhatnak¹⁰⁰.

Kisagyi szemcsesejtekben szintetizálódó reelin, amely egy extracelluláris mátrix fehérje, jelentős szerepet játszik a kisagy fejlődése során a Purkinje sejtek megfelelő elhelyezkedésében, illetve a felnőttkori szinaptikus funkciók szabályozásában. Jelentős expressziós csökkenéséről számolnak be a reelin fehérjének szkizofréniaiban és bipoláris zavarban szenvedő betegek kisagyi *post mortem* szövetmintáiban¹⁰¹, amely felhívja a figyelmet a kisagy érintettségére a szkizofrénia strukturális kórtanát tekintve. Továbbá a szakirodalomban a funkcionális P2X és P2Y receptorok koexpressziójáról számolnak be a kisagyi szemcsesejtekben¹⁰².

Jelenlegi ismereteink szerint a P2Y receptorok közül a neuropátiás fájdalom kialakulásában elsősorban a P2Y₁₂ receptor altípus játszik szerepet. A P2Y₁₂ receptorok szerepet játszanak a fájdalom különböző formáinak a szabályozásában. Kimutatták mRNS expressziós szinten P2Y₁₂ receptorok felülszabályozódását mikroglia sejteken illetve, hogy a receptor genetikai deléciója vagy farmakológiai blokádjá gátolja az allodíniát neuropátiás fájdalom és akut gyulladással fájdalom ráégsáló modelljeiben¹⁰³. Kutatócsoportunk ráégsáló modellben tanulmányozta a P2Y₁₂ receptor altípus gyulladással fájdalomban betöltött szerepét. A P2Y₁₂ receptor altípus antagonizmus anti-hiperalgézias hatása centrális és perifériás gyulladással citokinek termelésének gátlásán keresztül mehet végbe. Ennek alapján, a P2Y₁₂ receptorok potenciális terápiás célpontok

lehetnek a gyulladós és neuropátiás fájdalom kezelésében¹⁰⁴. További vizsgálatainkban a CFA (Complete Freund's adjuváns) által kiváltott krónikus gyulladós fájdalom egér modellben, a P2Y₁₂ receptorok hiperalgéziás állapotban és lokális gyulladós válaszban betöltött szabályozó szerepét vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a P2Y₁₂ receptorok gátlása a vérlemezkéken hozzájárulhat a mechanikai hiperalgézia és gyulladós válasz enyhítéséhez, így a P2Y₁₂ receptorok a krónikus gyulladós fájdalomban is lehetséges terápiás megközelítések lehetnek¹⁰³.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A szkizofrénia gyógyszeres kezelése kapcsán a kielégítetlen orvosi igény továbbra is fennáll napjainkban. Így nagy jelentőséggel bírnak az új gyógyszer-célpontok felderítésére illetve a szkizofrénia molekuláris hátterének feltárására irányuló vizsgálatok. A purinerg neurotranszmisszió és ezen belül is kiemelten a P2X7 receptorok szerepét számos pszichiátriai kórkép patomechanizmusának feltárására irányuló kísérletekben vizsgálták, ugyanakkor a szkizofrénia molekuláris hátterét feltáró tanulmányok során még nem. Kísérleti munkánk során a purinerg jelátviteli rendszer, és ezen belül is a P2X7 receptor szkizofrénia patomechanizmusában betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Továbbá feltételeztük, hogy az idegrendszeri gyulladási folyamatok számos központi idegrendszeri betegség kialakulásának hátterében állhatnak. Ennek okán célunk volt a P2Y₁₂ receptorok szerepének a vizsgálata krónikus gyulladási fájdalomban.

I. A P2X7 receptor szerepének feltárása a szkizofrénia fenciklidin (PCP) állatmodelljében.

- Egereken végzett magatartás vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy van-e hatása a P2X7 receptor genetikai deléciójának és farmakológiai gátlásának az egerek szkizofrénia-szerű viselkedési mintázataira?
- Génexpressziós vizsgálataink során célunk volt, hogy megvizsgáljuk vajon az egyedfejlődés során változik-e a P2X7 receptorok mRNS expressziója az egér agy PFC és HPC régióiban?
- További génexpressziós vizsgálatok során célunk volt meghatározni vajon van-e a befolyásoló hatása a PCP kezelésnek fiatal felnőtt egerek PFC és HPC régióbeli P2X7 receptor mRNS kifejeződési szintjeire?
- Korábbi kísérleti eredmények alapján bizonyításra került, hogy a P2X7 receptor aktiváció hatással van a glutamát felszabadulásra HPC agyseletekben. Ezek alapján célul tűztük ki a PCP kezelés hatásának vizsgálatát a P2X7 receptor mediált glutamát felszabadulásra az egér agy PFC régiójában.
- Célunk volt a P2X7 és NMDA-típusú glutamát receptorok kapcsolatának további tanulmányozása, melynek érdekében vizsgáltuk a P2X7 receptor genetikai

deléciójának és farmakológiai gátlásának hatását az NMDA indukálta ionáramokra, az egér agy PFC régiójában.

- További célunk volt megvizsgálni vajon a P2rx7 gén kiütésének és PCP kezelésnek van-e hatása a szkizofréniában érintett egyes neurotranszmitter receptorok és szignalizációs fehérjék mRNS szintű expressziós változásaira az egér agy PFC és HPC régióiban?

II: A P2Y₁₂ receptor szerepének vizsgálata a komplett Freund-adjuváns (CFA) által indukált krónikus gyulladással járó fájdalom állatmodelljében.

- Célunk volt meghatározni, hogy a P2Y₁₂ receptorok genetikai deficienciája milyen hatással van különböző gyulladással járó mediátorok fehérje szintjeire a CFA által kiváltott krónikus gyulladást követően.

4. MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

A kísérleti állatok fenntartása és kísérleteinkhez való alkalmazása az NIH (National Institutes of Health) Guide for the Care and Use of Experimental Animals irányelvei szerint történtek az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (MTA KOKI) Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával (Budapest, Ref. Szám: PEI/001/778-6/2015). A kísérleti állatokat fény- (12 óra sötét és 12 óra világos) és hőmérséklet-kontrollált szobákban helyeztük el, etetésük és itatásuk *ad libitum* történt. A vizsgálatok legnagyobb részében felhasznált állatok fiatal felnőtt korú, kb. 2 hónapos, hím egyedek voltak. Egyes génexpressziós vizsgálatainkban ennél fiatalabb állatokat is alkalmaztunk, ennek részletezése a későbbiekben olvasható.

Kísérleteink egy részében C57Bl/6J háttérű egértörzs egyedeit, továbbá P2rx7 gént tekintve homozigóta vad típusú (P2rx7 +/+), illetve génkiütött transzgén (P2rx7 -/-) egereket használtunk. A transzgénikus egerek eredeti tenyészpárja Christopher Gabel (Pfizer Inc., Groton CT, USA) felajánlásával került az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részleg (OGR) állatházába. A P2X7 receptort kódoló gén kiütéséért felelős DNS konstruktum a következő volt: P2X7-F1 (5'-CGGCGTGCCTTTTGACATCCT-3') és P2X7-R2 (5'-AGGGCCCTGCGGTTCTC-3'). A P2X7 -/- egérvonal alapját képező génkonstrukcióban a receptort kódoló gén egy szakaszát egy neomycin rezisztenciát kódoló génszakasszal helyettesítették. Így a létrejövő homozigótákban a P2X7 receptort kódoló gén nem íródik át, amelynek következménye a P2X7 receptor fehérje hiánya. A transzgén egerek genotípusának ellenőrzése rendszeres farok genotipizálás mellett zajlik génspecifikus primerek segítségével az OGR Genotipizáló laborjában. A P2rx7 deficiens egerekben a neomycin rezisztenciát kódoló gén, míg a vad típusú egerekben a P2X7 receptort kódoló gén szelektív expressziója detektálható.

További kísérleteink során 60-70 napos korú C57Bl/6J háttérű egértörzs P2Y₁₂ receptort tekintve vad típusú (P2ry12 +/+) és genetikailag deficiens (P2ry12 -/-) egyedeit alkalmaztuk. A transzgénikus egerek (B6;129-P2ry12^{tm1Dgen}/H) a Deltagen vállalattól származnak (San Mateo, CA, USA). Ezekben az állatokban a P2Y₁₂ receptort kódoló

génbe LacZ-t és neomycint kódoló gének lettek inzertálva. Rederivációt követően a transzgenikus állatok C57/Bl6/J állatokkal lettek keresztezve az MTA KOKI OGR egységében. Heterozigóta tenyészpárok összerakásával lettek létrehozva a homozigóta genetikailag deficiens egerek és azok vad típusú alomtársai. A P2Y₁₂ receptor deficiens transzgen egerek genotípusának ellenőrzése rendszeres farok genotipizálás mellett zajlik génspecifikus primerek segítségével.

Összességében elmondható, hogy egyik transzgenikus egértörzs (P2rx7 ^{-/-} és P2ry12 ^{-/-}) egyedei sem különböznek számottevően vad típusú alomtársaiktól termékenység, méret, életképesség, alapvető viselkedés jegyek, hosszúság, súly tekintetében. Ezeket az egérvonalakat az MTA KOKI OGR részlegében, specifikus, patogénmentes körülmények között tenyésztik.

4.2. Magatartás vizsgálatok

A kísérleti állatokon folytatott magatartás vizsgálatok az MTA KOKI, Magatartásélettan és Stressz Kutatócsoportjában kerültek elvégzésre, Dr. Haller József irányításával. Az előző pontban leírt, eltérő genotípusú (P2rx7 ^{+/+} és P2rx7 ^{-/-}) egerek az első vizsgálatokban két különböző dózisban, akut kezelést kaptak fenciklidinnel (2 illetve 5 mg/kg PCP, Sigma-Aldrich Kft, Budapest), vagy steril fiziológiás sóoldattal (vehikulum, 0.9%-os NaCl) intraperitoneálisan (i.p.). A második kísérleti felállásban a P2rx7 vad típusú egerek P2X7 receptorra szelektív antagonistával, JNJ-47965567 (30 mg/kg i.p., Janssen Research és Development, San Diego, USA), vagy annak oldószerével (30% β -cyclodextrin, Cydex Pharmaceuticals, Lawrence, USA) voltak kezelve 30 perccel a PCP-vel (1.5 illetve 5 mg/kg) vagy annak vehikulumával (0.9%-os NaCl) történő i.p. injektálás előtt. A 10 perces magatartás tesztek mérése (a lokomotoros aktivitás, sztereotip viselkedés, az ataxia és a szociális interakció) a kezelést követően 45 perccel kezdődött el Sams-Dodd kísérletei szerint^{105,106}. Az egereken végzett viselkedési tesztek egy sötétszürke, kerek, nyílt térben (open-field) zajlottak. Egy időben, a berendezés ellentétes oldalaihoz került behelyezésre két egér, amelyek korábban nem ismerték egymást. Ezek az állatok ugyanazt a farmakológiai kezelést kapták. A videokamera a nyílt tér fölött volt rögzítve, egy adott felvétel ideje 10 perc volt. A szociális vizsgálat során az egymás irányába történő szaglászás (amikor az orruk összeért

vagy nagyon közel volt egymáshoz) volt szociális interakciónak tekinthető. A vonalátlépések és a szociális interakciók a teszt egésze ideje alatt egy számítógépes eseményfelvevő segítségével kerültek rögzítésre⁶³. A különböző kísérleti csoportokat véletlenszerűen kiválasztott 10-12 egér alkotta csoportonként.

4.3. *In vitro* [³H]glutamát felszabadulás mérése

A [³H]glutamát ([³H]GLU) felszabadulás vizsgálatokat egér agy prefrontális kéreg (PFC) szeletekből szövetperfúziós technika segítségével végeztük el. Kísérleteink fiatal felnőtt korú, P2X7 receptort tekintve vad típusú és génkiütött egereken zajlottak, 1 órával i.p. steril fiziológiás sóoldattal (0.9%-os NaCl) vagy PCP (2 mg/kg)-vel történő kezelést követően. A [³H]GLU felszabadulás mérések kutatócsoportunk által korábban publikált módszer szerint történtek⁷³. Az állatokat enyhe CO₂ inhalációval altattuk el, majd ezt követően dekapitáltuk. A PFC szöveteket az izolálásukat követően jéghideg, karbogén gázzal (95% O₂ and 5% CO₂) perfundáltatott Krebs oldatba kerültek. McIlwain-típusú szövetvágó segítségével 400 µm vastag szeletek készültek, melyeket 45 percen keresztül 1 ml módosított Krebs oldatban (113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₃, and 11.5 mM glükóz, pH 7.4) inkubáltuk 5 µCi/ml [³H]GLU (ARC, Saint Louis, MO, USA) jelenlétében. Ez idő alatt a közeget karbogén gázzal (95% O₂ and 5% CO₂) volt buborékolatva 32 °C-on. Az inkubáció után a PFC szeletek karbogén gázzal telített, módosított Krebs oldatban perfundálódtak (áramlási sebesség: 0.7 ml/perc). 90 perces mosási periódust (a felesleges radioaktív anyag eltávolítása céljából) követően a szeleteken átfolyt, 3 percenként gyűjtött perfuzátumok trícium tartalma került meghatározásra. Az egyik kísérleti elrendezésben 6 perccel az első perfuzátum gyűjtését követően a szövetmintákat 3 perces P2X7 receptor agonistával (BzATP, 100 µM, Sigma) voltak perfundálva Mg²⁺-mentes körülmények között. A másik kísérleti elrendezésben a 6 perces periódust követően egy 3 perces elektromos téringertés következett (EFS (electrical field stimulation), 10 Hz, 1 msec), majd ezután a normál Krebs oldattal perfundálódtak a szeletek a perfuzátum gyűjtési periódus végéig. A PFC szeletek radioaktivitásának mérése Packard 1900 Tricarb szcintillációs spektrométer (Canberra, Australia) segítségével történt, Ultima Gold szcintillációs koktél használatával. A felszabaduló trícium tartalmát, mint az egyes

perfuzátum minták radioaktivitás-tartalma kerül kifejezésre a mintavétel időpontjában kalkulált szöveti tartalom százalékában (frakcionált felszabadulás, FR%). A szövetekbe felvett trícium az összes felszabadult és a szövetekben maradt trícium összegeként került megállapításra a kísérleteket követően, és Bq/g-ban kifejezve. A bazális trícium kiáramlás meghatározása két, egymást követő 3 perces perfuzátumból történt gyógyszermentes körülmények figyelembevételével. A BzATP- vagy EFS-indukált [³H]GLU kiáramlás, mint a megfelelő stimulus hatására bekövetkezett nettó felszabadulásként került kiszámításra a stimuláció után és előtt mért felszabadulás különbségeként. Kutatócsoportunk korábbi tanulmányában⁷³ kimutatta HPLC analízissel, hogy a P2X7 receptor aktiválásával kiváltott trícium felszabadulás többsége [³H]GLU-t reprezentál.

4.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Az agyszeleteken folytatott elektrofiziológiai kísérleteket a Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében kerültek elvégzésre, Dr. Köles László irányítása alatt.

4.4.1. Agyszelet preparálás

Fiatal P2rx7 ^{+/+} és P2rx7 ^{-/-} egereket (16-20 napos) dekapitáltuk, majd az agyuk gyors kivételét követően jéghideg, karbogén gázzal telített mesterséges cerebrospinális folyadékba (aCSF) kerültek, amelynek az összetétele a következő volt: NaCl 126 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgCl₂ 1.3 mM, NaHCO₃ 25 mM és glükóz 11 mM; pH 7.4. A vékony koronális szeletek (200 µm vastagságú) kivágása a mediális PFC prelimbikus részét tartalmazó szövetekből történt, egy vibráló pengéjű metszőgép segítségével. A metszéseket követően egy agyból 6-8 szelet készült, amelyek egy tartó kamrába kerültek, ahol 1 órán át oxigenizált aCSF-ben, 36°C-on inkubálódtak, majd ezt követően szobahőmérsékleten. Az egyedi szeletek felhasználásuk előtt, áthelyezésre kerültek egy felvevő kamrába (300-400 µl térfogatú), ahol folyamatosan oxigenizált aCSF-el (Mg²⁺-mentes) voltak perfundálva (3 ml/perc), szobahőmérsékleten. Az egyedi mérések előtt legalább 15 percig a szeletek pihentetve voltak. Szeletenként csak 1 sejt került teljes sejt (whole-cell) patch-clamp mérésre.

4.4.2. Teljes sejt (whole-cell) patch-clamp felvételek agyszeletekben

A PFC V. rétegének piramis sejtei egy, x40 vízimmerziós objektívvel felszerelt „upright” (egyenes állású) elrendezésű mikroszkóp segítségével lettek megjelenítve (Axioscope FS; Carl Zeiss). A boroszilikát üvegből készült kapillárisok a következő összetételű intracelluláris oldattal voltak töltve: kálium-glükonát 140 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, EGTA 11 mM, Mg-ATP 1.5 mM, Li-GTP 0.3 mM; KOH oldattal beállított pH 7.3. A pipetta ellenállások 5-7 MΩ közötti tartományban voltak. A teljes sejt hozzáférés létrehozása után, 5-10 percig magára lett hagyva a rendszer, hogy beálljon a diffúziós egyensúly a patch pipetta és a sejt belseje között. Az áramok -70 mV-on tartott potenciál mellett került rögzítésre, a patch-clamp erősítő voltage-clamp üzemmódjában (Axopatch 200B; Molecular Devices). Koncentráció-válasz görbék létrehozására NMDA (1-1000 μM), mint agonista került felhasználásra. Az NMDA különböző koncentrációjú oldatait 1,5 percig voltak perfundáltatva, növekvő koncentrációban, az eltérő koncentrációk között pedig 10 perces periódusban vegyületmentes aCSF. A P2X7 receptor antagonistá hatásának vizsgálatakor, az jelen volt a perfundáló közegben az egész kísérlet során. A kapott adatokat 2 kHz-nél szűrték a patch-clamp erősítőbe (Axopatch 200B; Molecular Devices) beépített szűrő segítségével, 5 kHz-nél kerültek digitalizálásra, az adatok számítógépen DigiData 1200 interfész és pClamp 10.0 szoftverrel kerültek feldolgozásra (Molecular Devices).

4.5. Génexpressziós kísérletek

Génexpressziós méréseink során vizsgálatra kerültek a P2X7 receptor mRNS expressziós szintjei 4, 18, 35 és 56 napos, P2X7 receptor vad típusú egerek PFC és HPC szövetmintáiban (8 állat / korcsoport). A PCP kezelés P2rx7 génexpressziós szintjére gyakorolt hatásának mérésére fiatal felnőtt állatokat akut kezeltük két különböző dózisban PCP-vel (2 illetve 5 mg/kg, Sigma-Aldrich Kft, Budapest), illetve a kontroll csoport állatait steril fiziológiás sóoldattal (0.9%-os NaCl) intraperitoneálisan (i.p.). Szkizofrénia patomechanizmusára jellemző gének expresszióváltozásainak tanulmányozására az előbbieken említett kezelést kaptak a fiatakorú (18 napos) és fiatal

felnőtt (56-60 napos) P2X7 receptor vad típusú és génkiütött állatok (3-6 egér / vizsgálati csoport). A magatartás tesztekben alkalmazott kísérleti felállást követve a PCP vagy steril fiziológias sóoldat beoltása után körülbelül 1 órával (ekkorra már a PCP kifejti hatását) gyűjtöttük a PFC és HPC szövetmintákat, amelyeket további felhasználásig -70°C -os tárolásra kerültek.

4.5.1. Teljes RNS izolálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés

A PFC és HPC mintákból történő RNS izolálást az RNeasyLipid Tissue Mini Kit (Quiagen, Valencia Ca; kat. szám: 74804) felhasználásával végeztük el a gyártó utasításai alapján. A PFC és HPC szövetekből származó totál RNS mintákat további felhasználásig -70°C -os tárolásra kerültek.

A kinyert RNS koncentrációjának meghatározását, továbbá annak minőségének (integritásának) ellenőrzését a Lab-on-a-chip technológián alapuló Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) készülék segítségével, RNA6000 Nano LabChip Kit-tel (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) végeztük el.

A kapott koncentrációeredményeket, illetve a totál RNS minőségét jellemző értékeket, az úgynevezett RNS integritás számot (RNA integrity number, RIN) az Agilent Technologies 2100 Expert Software (Verziószám: B.02.02.SI238) program szolgáltatta.

4.5.2. Reverz transzkripció

Az RNS minták komplementer cDNS-re (cDNS) történő átírását, más néven a reverz transzkripciót Tetro cDNA Sythesis Kit segítségével (Bioline USA Inc, Taunton, MA), AB GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, CA, USA) készülékkel végeztük el. A gyártó ajánlásával összhangban $1\ \mu\text{g}$ -nyi RNS-t tartalmazó mintából szintetizáltuk a komplementer cDNS templátot. A reverz transzkripció a következők szerint zajlott: az RNS minták random hexamer primer jelenlétében 70°C -on 5 percig inkubálódtak. Ezután további 25°C -on 5 percig inkubálódtak úgynevezett reverz transzkripció keverékkel (reverz transzkripció puffer, RNáz, dNTP molekulák) együtt, majd a reverz transzkriptáz enzim hozzáadását követően, a következő inkubációkat alkalmaztuk: 25°C 10 percen keresztül, 42°C 60 percen keresztül (ekkor megy végbe a reverz transzkripció reakció),

majd a reakció leállítása 70°C-on 10 percig tartott. Az átírt, 1 µg cDNS templátot tartalmazó mintákat további felhasználásig –20°C-on tároltuk.

4.5.3. Real-time PCR (Taqman® próba detekciós alapú)

Az általunk vizsgálni kívánt gének relatív mRNS expressziós szintjeinek meghatározását, az átírt egyszálú cDNS templátokból végeztük el kvantitatív real-time PCR módszerrel, ViiA™ 7 Real-Time PCR System típusú készülék segítségével (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). A gyártó által javasolt reakció mixet, a TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG-t és a MicroAmp™ Fast Optical 96 lyukú reakciós plate-t (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) használtuk. A mérések kivitelezése a gyártó standard protokollja alapján történt, a vizsgált génekhez tartozó TaqMan® Gene Expression Assay-k (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) (6. táblázat) segítségével, melyek tartalmazzák a szekvencia specifikus primer párt és a szekvencia specifikus TaqMan® (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) detekciós próbát egyaránt. A génextpressziós mérések során kapott eredmények analízisét az úgynevezett komparatív Ct (áttörési ciklusszám; threshold cycle) metodika szerint végeztük el. A Ct érték azt a ciklus számot jelenti, ahol a minden egyes PCR ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan emelkedni kezd. Az egyes gének mRNS expressziós szintjeit a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (Gapdh), mint endogén kontroll génextpressziós szintjéhez normalizáltuk. A P2X7 receptor különböző korú egerek PFC, illetve HPC régióiban mért normalizált, relatív mRNS expressziós szintjeinek összehasonlításához, a 4 napos állatokban mért génextpressziós szinteket lettek 100%-nak tekintve. A két eltérő dózisban alkalmazott PCP (2 vagy 5 mg/kg) P2X7 receptor génextpresszióra gyakorolt hatásának tanulmányozásakor a fiziológiás sóoldattal kezelt egerek, PFC mintákban mért, normalizált P2rx7 mRNS expressziós szinteket 100%-nak véve értékeltük ki. Továbbiakban a PCP kezelést követően vizsgáltuk három ionotróp glutamát receptor alegység (Grin1 (NR1), Grin2a (NR2A) és Grin2b (NR2B)) és egy metabotróp glutamát receptor altípus (Grm3 (mGluR3)) mRNS expressziós szintjeit fiatalkorú és fiatal felnőtt P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek PFC (PCP dózis: 2 mg / kg) és HPC (PCP dózis: 5 mg / kg) szöveti mintáiban. Ezekben a kísérletekben a fiatal,

fiziológiás sóoldattal kezelt, P2rx7 +/+ állatokban mért normalizált mRNS kifejeződési szinteket tekintettük 100%-nak. Ezeken felül tanulmányoztuk a kisebb dózisú PCP kezelés (2 mg/kg) hatására további néhány, a szkizofrénia patomechanizmusával kapcsolatba hozható gén (Comt, Drd1, Drd2, Gabra1 és Gabra5, Grm2, Grm5, Nrg1) mRNS expressziós szintjeiben bekövetkező változást fiatal felnőtt, P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek PFC mintáiban. Ezekben a vizsgálatokban a fiziológiás sóoldattal kezelt, P2rx7-re nézve vad típusú állatokban mért, normalizált génexpressziós szinteket 100%-nak véve hasonlítottuk össze az eltérő kezelésű és genotípusú csoportokat.

6. táblázat. Génexpressziós méréseink során vizsgált gének neve és TaqMan® génexpressziós azonosítói (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA):

Gén név (<i>Mus musculus</i>)	TaqMan® Gene Expression Assay azonosító
Comt	Mm00514377_m1
Drd1	Mm02620146_s1
Drd2	Mm00438545_m1
Gabra1	Mm00439046_m1
Gabra5	Mm00621092_m1
Gapdh	Mm99999915_g1
Grin1	Mm00433790_m1
Grin2a	Mm00433802_m1
Grin2b	Mm00433820_m1
Grm2	Mm01235831_m1
Grm3	Mm00725298_m1
Grm5	Mm00690332_m1
Nrg1	Mm01212130_m1
P2rx7	Mm01199500_m1

4.6. Gyulladásos citokinek multiplex bead array analízise

Az átlatlunk vizsgálni kívánt gyulladásos citokinek méréséhez P2Y₁₂ receptort tekintve vad típusú és genetikailag deficiens állatok hátsó talp mintái lettek felhasználva. A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe, a kezeléseket megelőzően frissen elkészített komplett Freund-adjuvánst (CFA, Sigma-Aldrich), vagy annak vehikulumát (0.9%-os NaCl oldat) injektáltunk. A talp minták gyűjtését a kezeléseket megelőzően illetve a kezelést követő 3. és 14. napokon végeztük. A mintákat a további feldolgozásig -80°-on tároltuk. A minták homogenizálását a következő összetételű pufferben végeztük el: 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1% Triton X, Protease Inhibitor Cocktail Set I (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), pH 7.4. A homogenizált és centrifugált (17000 g, 30 perc) minták felülúszóit gyűjtöttük. Az általunk vizsgálni kívánt gyulladásos mediátorok (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α és CXCL1 (KC)) koncentrációinak meghatározásárát BD Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets (BD Biosciences, New Jersey, USA) segítségével végeztük el BD FACS Verse (BD Biosciences, New Jersey, USA) áramlási citométer készülék felhasználásával. A mérés során nyert adatokat FCAP Array v5 szoftver (Soft Flow, USA) segítségével elemeztük. A minták teljes fehérje koncentrációját Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) segítségével határoztuk meg, az abszorbanciát 560 nm hullámhosszon mértük egy Perkin Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) készülék felhasználásával. A kapott citokin koncentrációkat a szövetminták teljes fehérjetartalmára normalizáltuk.

4.7. Statisztikai analízis

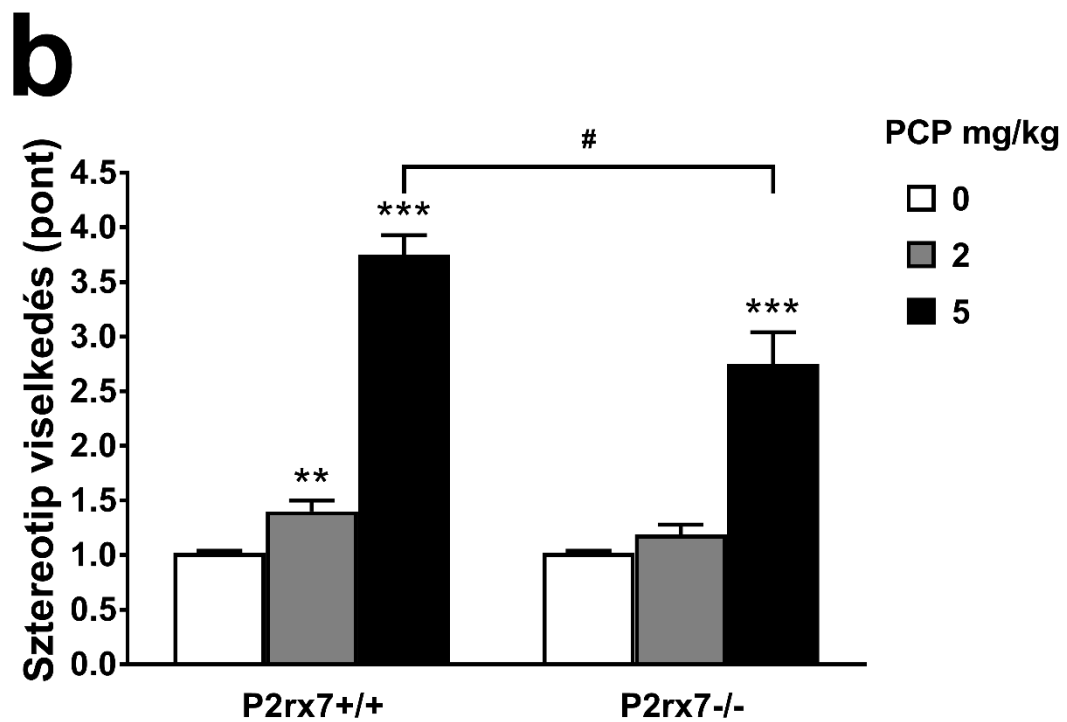
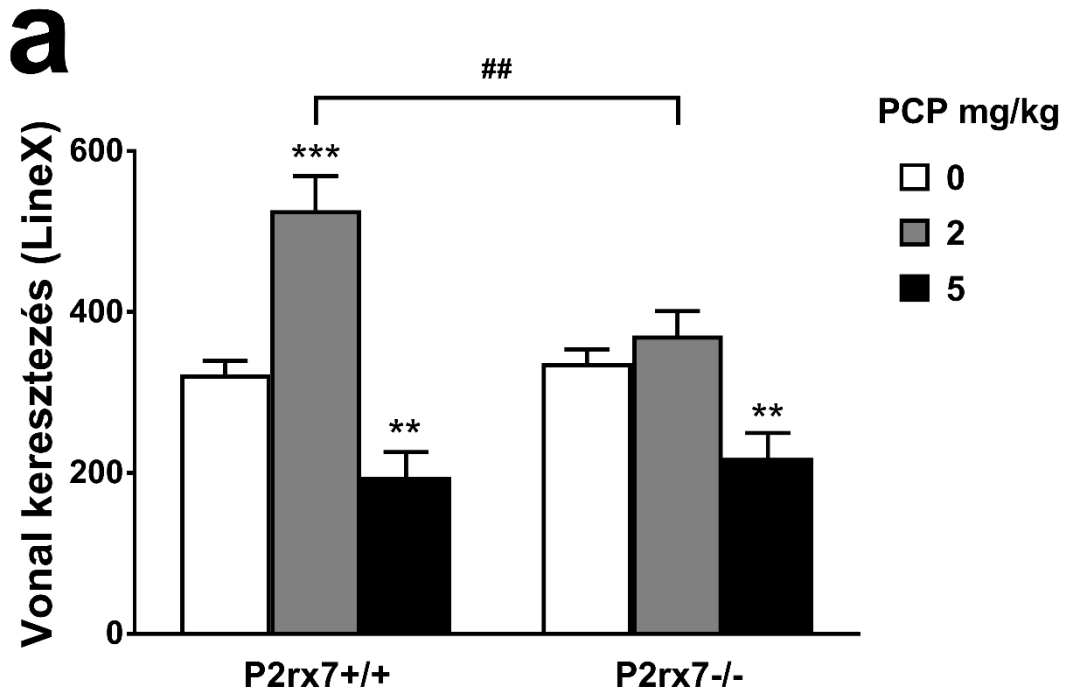
A magatartás vizsgálatok, a génexpressziós kísérletek és az *in vitro* [³H]GLU felszabadulás mérések eredményeinek statisztikai elemzését STATISTICA 64 szoftver (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA) segítségével történtek. A viselkedés tesztek eredményeinek összehasonlítására Kruskal–Wallis varianciaanalízist (ANOVA), míg a normalizált génexpressziós adatok, illetve az áramlási citometriás mérések statisztikai analízisére kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc teszt került felhasználásra. Az *in vitro* [³H]GLU felszabadulás mérés során nyert adatok statisztikai

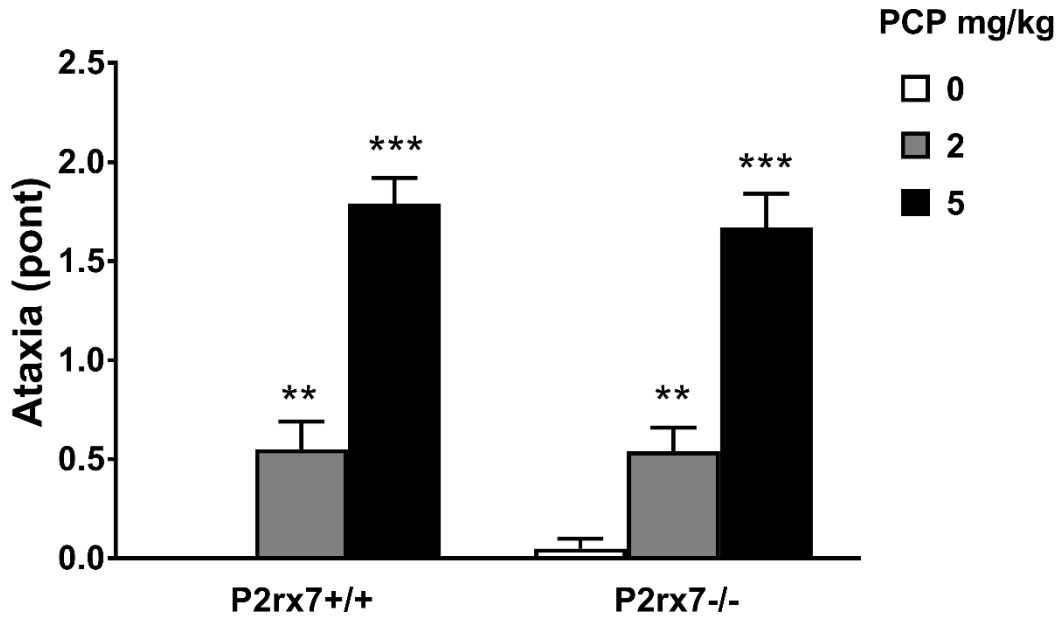
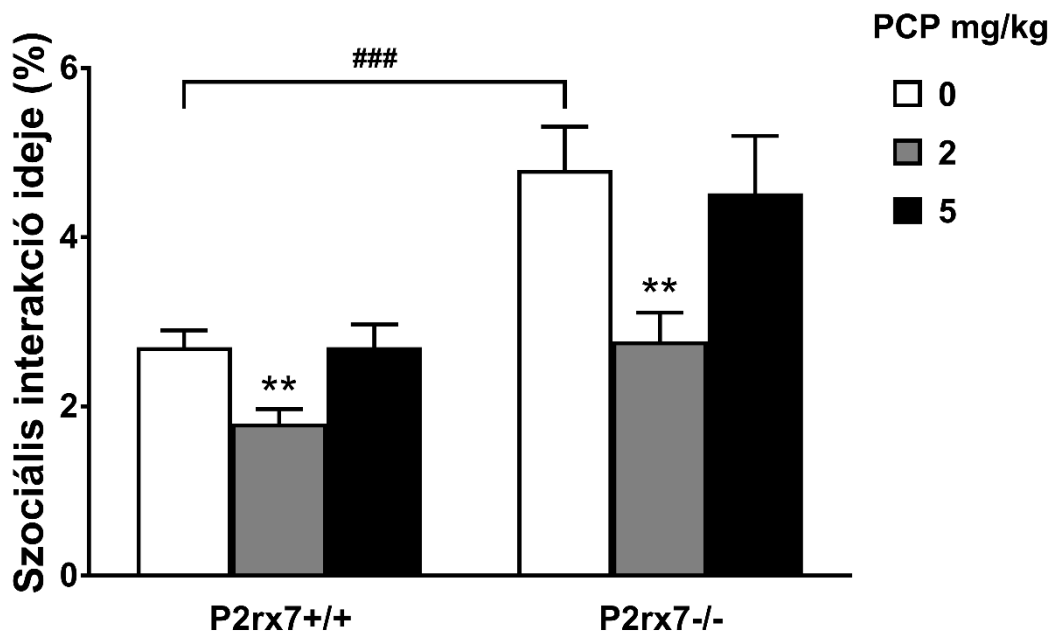
vizsgálatát egyutas ANOVA-t követően Tukey-féle teszttel végeztük el. Az elektrofiziológias kísérleti adatok elemzésére pClamp 10.0 software-t (Molecular Devices) került felhasználásra. Az NMDA koncentráció – válasz görbék illesztésére a SigmaPlot (Systat) logisztikai funkcióját alkalmaztuk, a statisztikai analízist kétutas ANOVA-val végeztük el. Minden adatot átlag \pm S.E.M. formájában fejeztük ki (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), a $p < 0.05$ értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintve.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A P2X7 receptor genetikai deléciójának és farmakológiai gátlásának hatása a PCP kiváltotta viselkedési változásokra

Első kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a P2rx7 gén deléciója milyen hatással van a PCP indukálta magatartásbeli változásokra (10. ábra). Négy eltérő viselkedéstípus vizsgálata zajlott: bazális lokomotoros aktivitás, sztereotip viselkedés, ataxia és szociális visszahúzódás. A kisebb dózisú PCP kezelés (2 mg/kg i.p.) mind a négy vizsgált viselkedési mintázat esetében szignifikáns változást eredményezett, fokozta a lokomotoros aktivitást, sztereotip viselkedést és az ataxiát, illetve csökkentette a szociális interakciót a P2rx7 génre nézve vad típusú állatokban a vehikulummal kezelt egerekhez viszonyítva. A nagyobb dózisú PCP adagolás (5 mg/kg i.p.), nagyobb mértékű növekedést eredményezett a sztereotip viselkedést és az ataxiát tekintve, viszont ellenkező hatása volt a lokomotoros aktivitás tesztek során. Ebből következően, a PCP a hiperlokomóció és a szociális visszahúzódás tekintetében az alacsonyabb dózisban, míg a sztereotip viselkedés és az ataxia vonatkozásában mindkét dózisban szkizofrénia-szerű magatartást váltott ki a vad típusú kísérleti állatokban. A P2rx7 gén kiütése nem volt hatással a bazális szintekre a vehikulummal (fiziológias sóoldat) kezelt kontrollokkal történő összevetésben a lokomotoros aktivitás (10a. ábra), sztereotip viselkedés (10b. ábra), ataxia tesztekben (10c. ábra), viszont a szociális interakciós idő (10d. ábra) szignifikánsan nagyobbak bizonyult a P2rx7 $-/-$ állatokban a vad típusú társaikhoz képest. A P2rx7 genetikai deléciója, a kisebb dózisú PCP-vel kezelt állatokban kisebb lokomotoros aktivitást váltott ki, mint az ugyanilyen dózisú PCP-t kapott vad típusú egerekben. Emellett hasonló eredményt kaptunk a sztereotip viselkedés tesztben a nagyobb dózisú PCP-vel kezelt állatokban, a génkiütés csökkentő hatású volt ebben a viselkedési vizsgálatban.

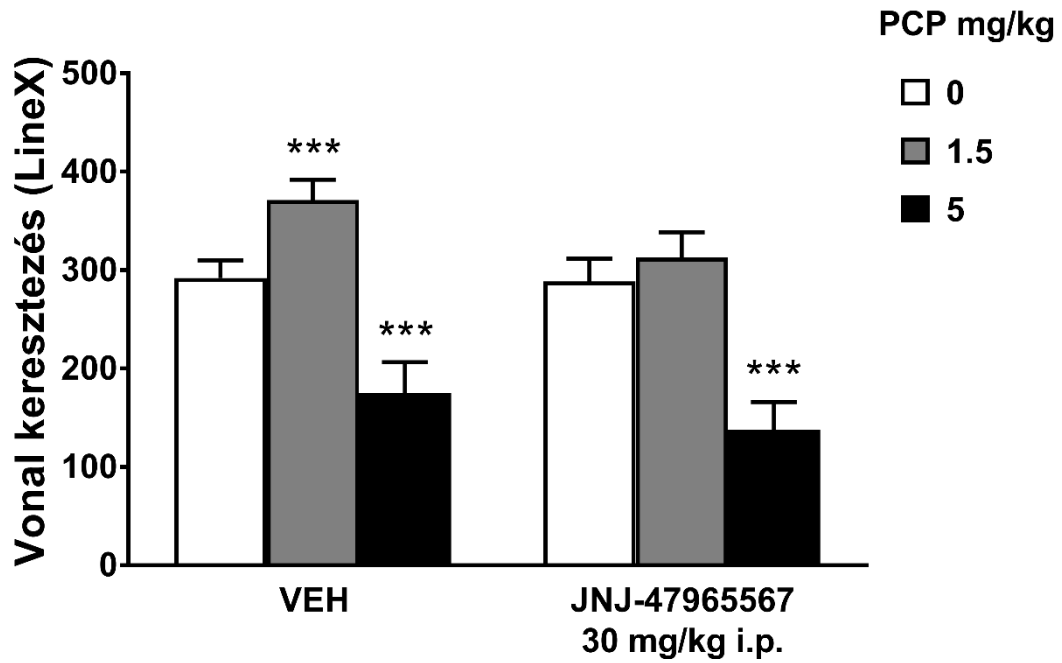
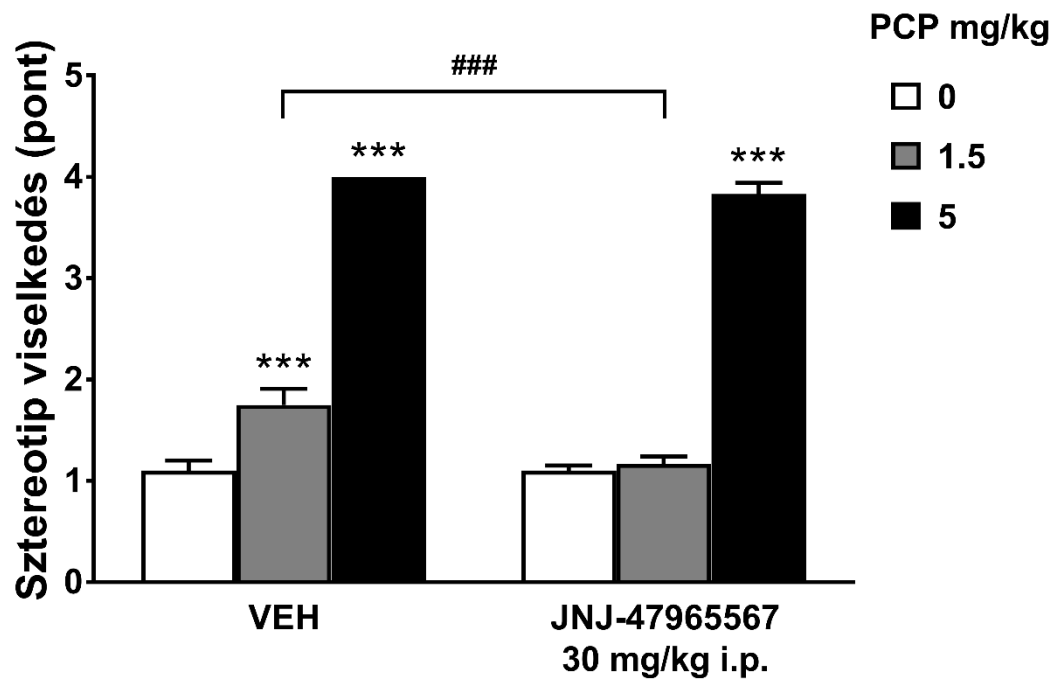


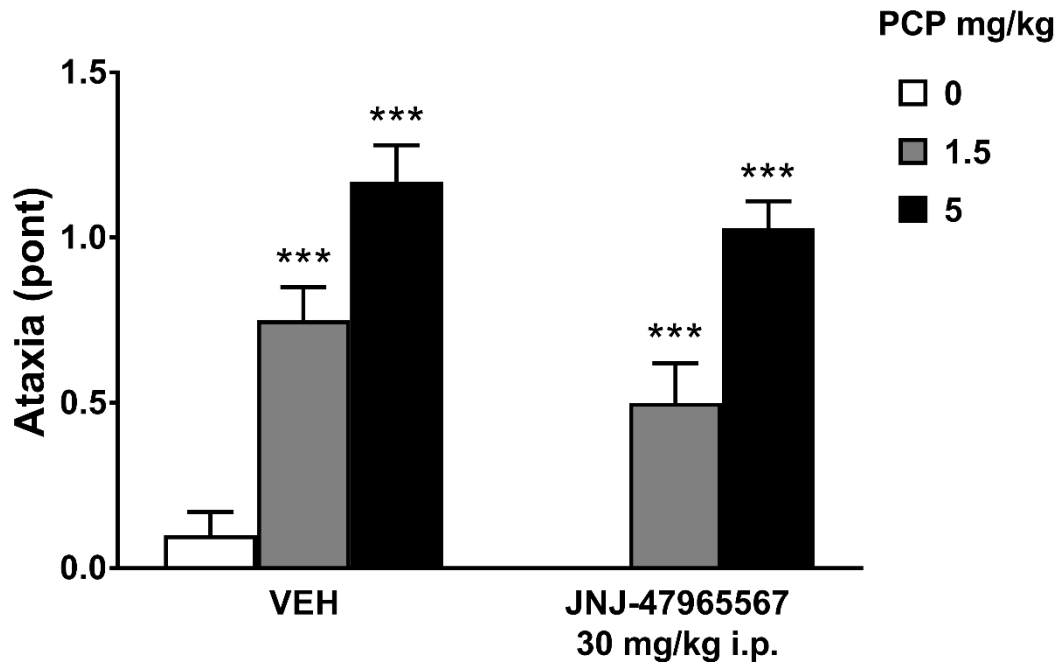
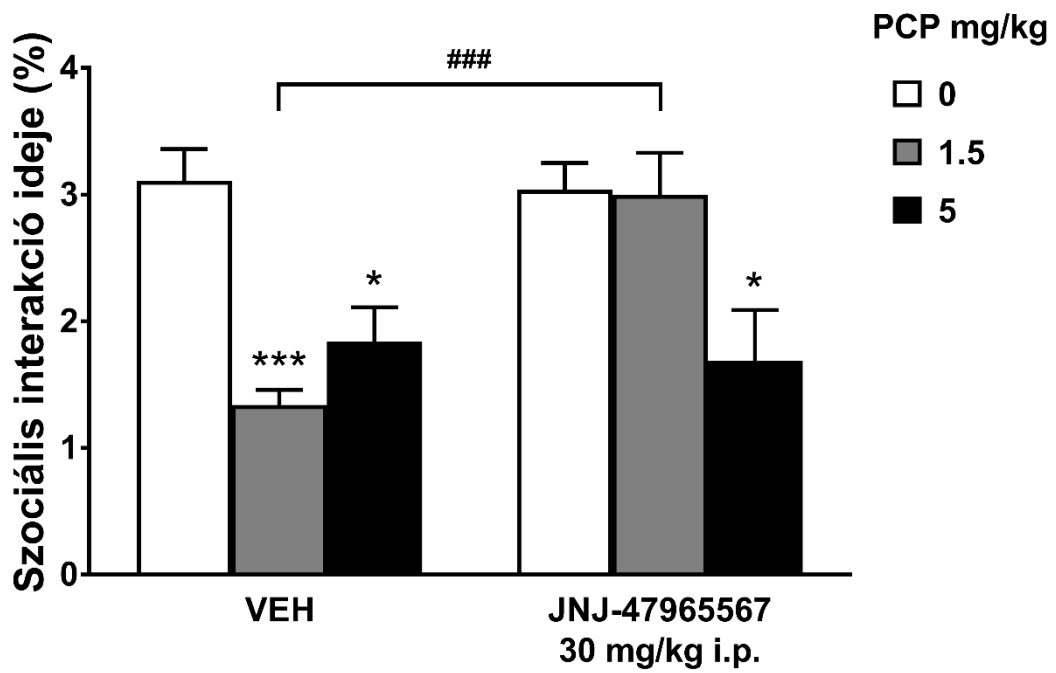
C**d**

10. ábra. A P2rx7 gén deficienciájának hatása a PCP által kiváltott viselkedési változásokra. A 10 perces magatartás vizsgálatok naív C57Bl/6J P2rx7 $+/+$ és P2rx7 $-/-$ egereken, PCP (2 vagy 5 mg/kg i.p.) vagy fiziológiás sóoldattal (0.9%-os NaCl) való kezelésüket követően 45 perccel később kezdődtek. A PCP indukált viselkedési eltéréseket különböző nézőpont, mint **(a)** lokomotoros aktivitás, **(b)** sztereotip viselkedés, **(c)** ataxia és **(d)** szociális interakció ideje szerint kvantifikáltuk a viselkedés tesztekét követően (offline). A mérési eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 10-14 állat került felhasználásra. A statisztikai elemzés Kruskal-Wallis ANOVA-val történt, a # $p < 0.05$; **, ## $p < 0.01$; ***, ### $p < 0.001$ szignifikanciaszintet jelöl.

A P2X7 receptor farmakológiai gátlásának tanulmányozására az előbb említett viselkedési tesztek alkalmaztuk (11. ábra). Ennek vizsgálatára, egy szelektív P2X7R antagonistá, a JNJ-47965567 került felhasználásra, amely képes áthatolni a vér-agy gáton⁶⁴. Az antagonistá, illetve annak vehikulumával való kezelés 30 perccel megelőzte a PCP-vel vagy steril fiziológiás sóoldattal történő i.p. injektálást. Az antagonistá vehikulumának nem volt hatása a PCP indukálta magatartásbeli változásokra. Hasonló eredményeket kaptunk az előző kísérleti felállásban (10. ábra), a P2rx7-re nézve vad típusú PCP-vel kezelt állatokon mértekhez képest. A JNJ-47965567 anyaggal történő kezelésnek önmagában nem volt hatása egyik viselkedési tesztben sem. Az antagonistá előkezelés a kisebb dózisú PCP kezelés hatását gátolta a lokomotoros aktivitási (11a. ábra), sztereotip (11b. ábra), és szociális interakciós (11d. ábra) viselkedési tesztekben, az ataxiára viszont nem volt hatással (11c. ábra). Ezzel ellentétben a JNJ-47965567 előkezelés nem volt hatással a nagyobb dózisú PCP által kiváltott viselkedési mintázatokra.

A P2X7 receptornak tehát mind a genetikai deficienciája, mind pedig farmakológiai gátlása csökkentette – bár nem minden tesztben és PCP dózisban – a szkizofrénia-szerű magatartási változásokat.

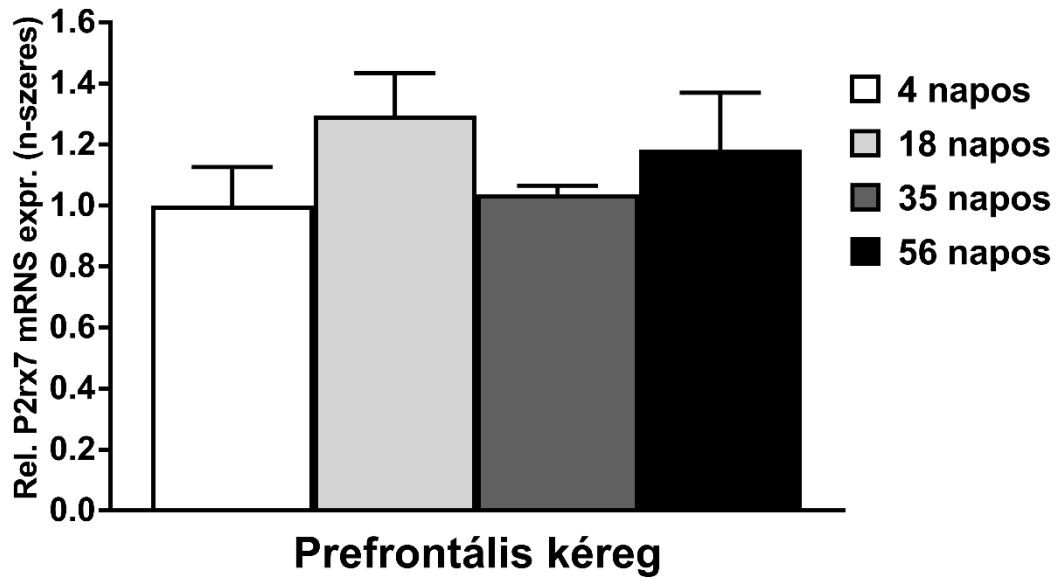
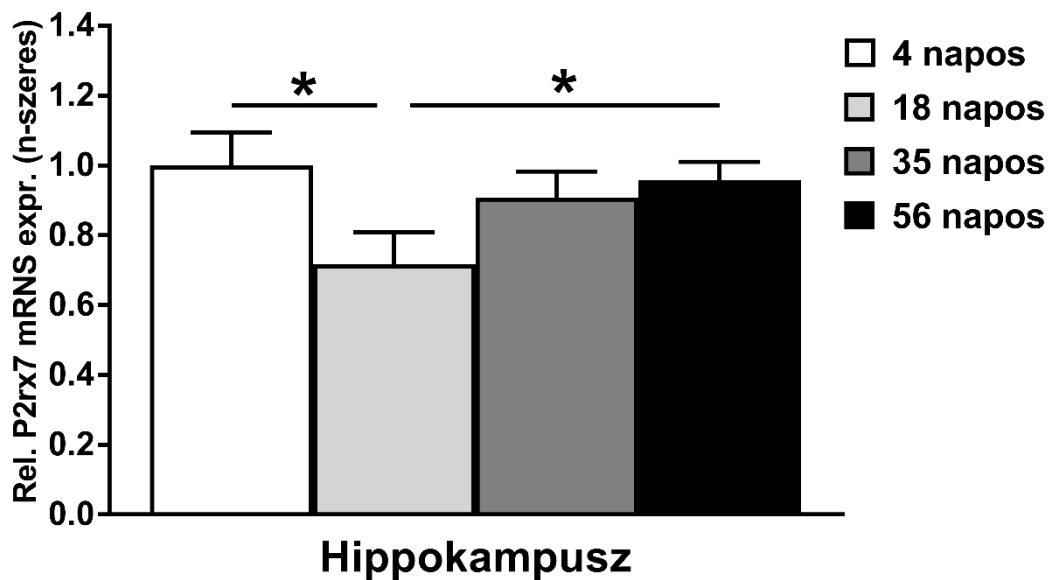
a**b**

c**d**

11. ábra. A szelektív P2X7 receptor antagonistá JNJ-47965567 hatása a PCP által kiváltott viselkedési változásokra. A naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ egereket P2X7 receptor antagonistá JNJ-47965567 (30 mg/kg) vegyülettel vagy annak oldószerével (VEH) kezeltük i.p., majd ezt követően 30 perccel később PCP (1.5 vagy 5 mg/kg i.p.) vagy fiziológiás sóoldatos (0.9%-os NaCl) injekciót kaptak. A 10 perces magatartás vizsgálatok a kezelésüket követően 45 perccel később kezdődtek. A PCP indukált viselkedési eltéréseket különböző nézőpont, mint **(a)** lokomotoros aktivitás, **(b)** sztereotip viselkedés, **(c)** ataxia és **(d)** szociális interakció ideje szerint kvantifikáltuk a viselkedés tesztekét követően (offline). A mérési eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 10-12 állat került felhasználásra. A statisztikai elemzést Kruskal-Wallis ANOVA-val történt, * $p < 0.05$; ***, ### $p < 0.001$ szignifikanciaszintet jelöl.

5.2. Eltérések a P2rx7 mRNS expressziójában a fejlődés egyes szakaszaiban az egér agy prefrontális kéreg és hippocampusz régiójában

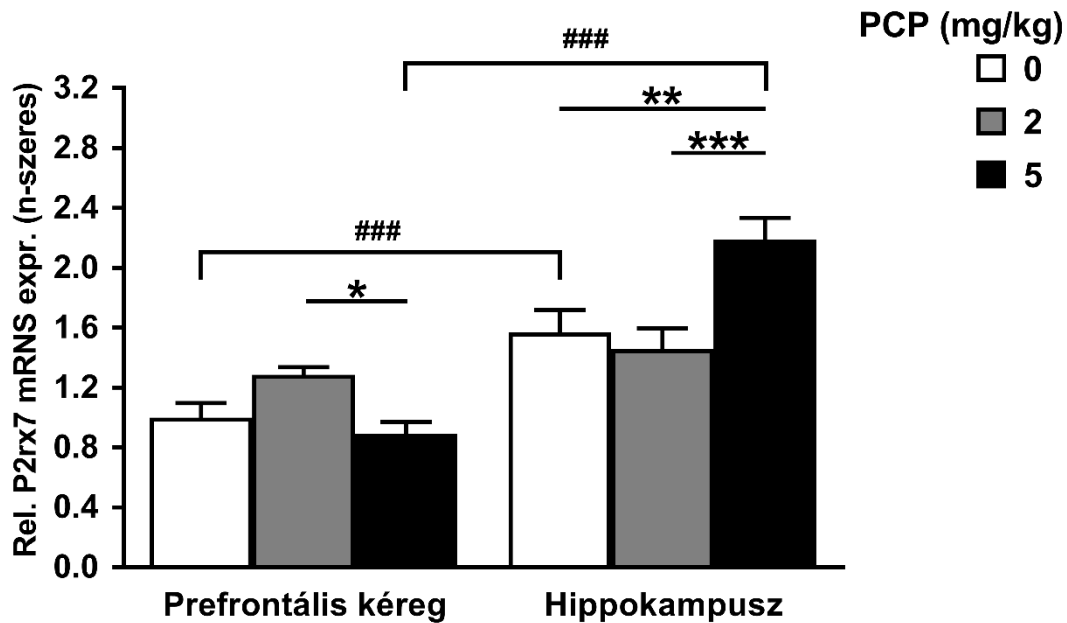
A P2X7 receptor relatív mRNS expressziós szintjeit 4 eltérő korcsoportú (4, 18, 35 és 56 napos) egerek PFC és HPC régióiban vizsgáltuk (12. ábra). A PFC szövetmintákban mért P2rx7 génexpressziós szintek nem tértek el szignifikánsan egymástól az egyes korcsoportú állatokban (12a. ábra). Ezzel ellentétben a P2X7R relatív mRNS kifejeződési szintek szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a 18 napos egerek HPC mintáiban (0.72 ± 0.09) a 4 napos (1.00 ± 0.09) és 56 napos (0.96 ± 0.05) állatokban mértékhez viszonyítva (12b. ábra).

a**b**

12. ábra. A P2rx7 mRNS expressziójának életkorfüggése az egér agy prefrontális kérgi és hippocampális régióiban. A relatív P2rx7 mRNS expressziós szintek eltérése különböző korcsoportú (4, 18, 35 és 56 napos) naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ egerek **(a)** prefrontális kéreg és **(b)** hippocampusz régiójában. A P2rx7 gén expressziós szintjeit a Gapdh gén, mint endogén kontroll mRNS expressziós szintjeire lettek normalizálva. A 4 napos egerekben mért, normalizált P2rx7 mRNS expressziós szinteket tekintettük 100%-nak, ehhez voltak viszonyítva a többi korcsoportban mért, normalizált P2rx7 génexpressziós szintek. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 6-8 állat került felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$ szignifikanciaszintet jelöl.

5.3. Fenciklidin kezelés hatása a P2rx7 mRNS expressziójára az egér agy prefrontális kéreg és hippocampusz régiójában

A következő RNS szintű génexpressziós kísérletekben a PCP P2X7 receptor mRNS expressziós szintjeire kifejtett hatását vizsgáltuk az egerek PFC és HPC szöveti mintáiban (13. ábra). A bazális P2rx7 mRNS expressziós szint a HPC régióban szignifikánsan nagyobbak bizonyult a PFC mintákban mérthez képest. A relatív P2rx7 géneszpressziós szintekben az egyes agyi régiókban eltérő PCP dózisfüggő mintázat volt megfigyelhető. Míg a PFC régióban a kisebb dózisú PCP csekély, nem szignifikáns mértékben növelte (1.29 ± 0.05), P2rx7 mRNS expressziós szintet, addig a nagyobb dózisú PCP kezelésnek nem volt hatása erre (0.89 ± 0.08). Ezzel ellentétben a HPC régióban mért P2rx7 génexpressziós szintekre a nagyobb dózisú PCP (2.19 ± 0.1) kezelésnek szignifikáns hatása volt, a vehikulummal kezelt állatokhoz képest (1.57 ± 0.15).

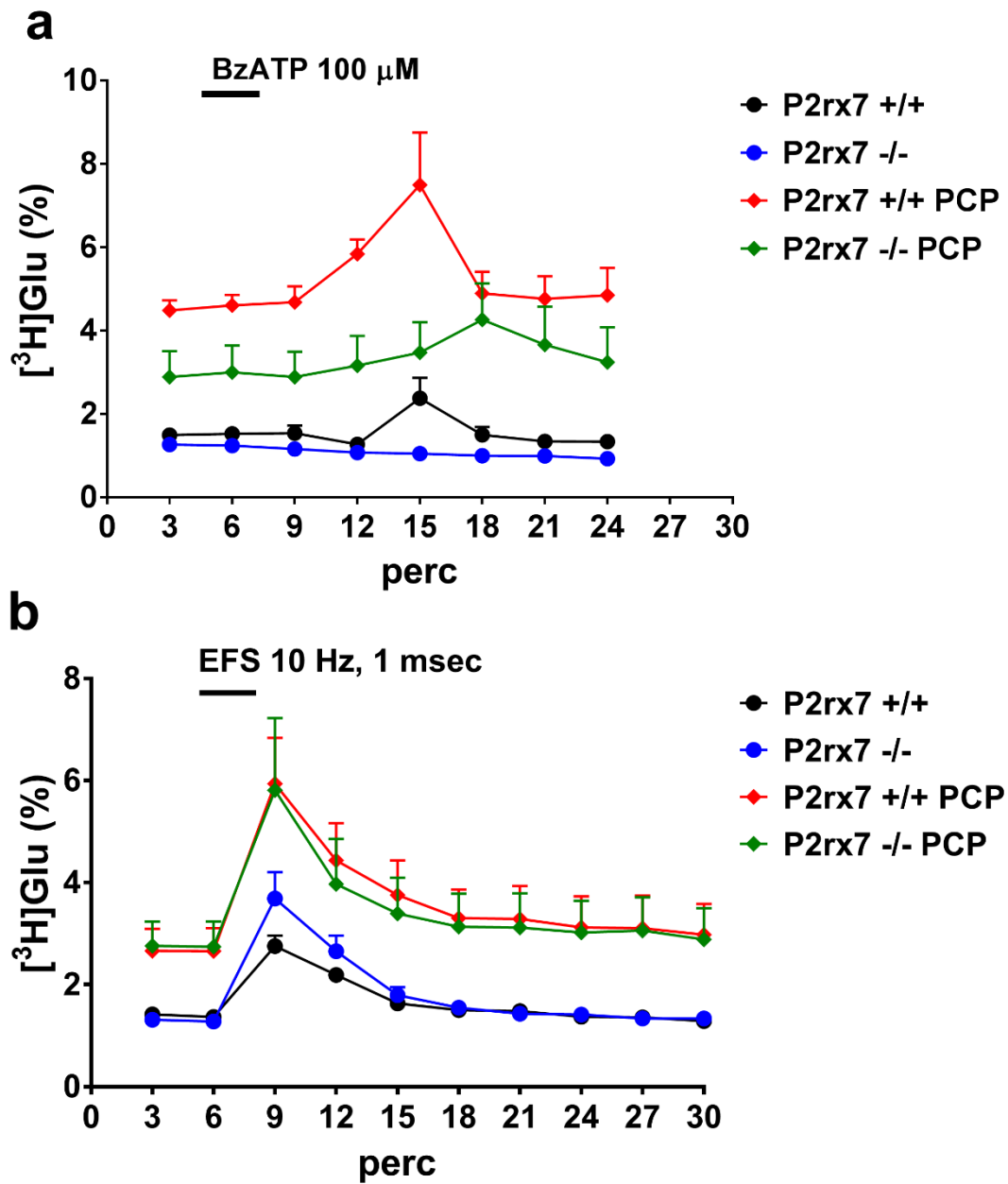


13. ábra. A PCP hatása a P2rx7 mRNA expressziójára az egér agy prefrontális kérgi és hippokampális régióiban. A relatív P2rx7 mRNA expressziós szintek eltérése fiatal felnőtt (56 napos) naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ egerek prefrontális kéreg és hippokampusz mintáiban PCP (2 vagy 5 mg/kg i.p.) vagy fiziológiás sóoldattal (0.9%-os NaCl) történő kezelésüket követően. A P2rx7 gén expressziós szintjeit a Gapdh gén, mint endogén kontroll mRNA expressziós szintjeire lettek normalizálva. A fiziológiás sóoldattal kezelt állatok prefrontális kéreg mintáiban mért normalizált P2rx7 mRNA expressziós szinteket tekintettük 100%-nak, ehhez voltak viszonyítva a többi csoportban mért, normalizált P2rx7 génextpressziós szintek. A kapott eredmények átlag ± S.E.M. formájában lettek ábrázolva. Csoportonként 3-6 állat került felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***, ### $p < 0.001$ szignifikanciaszintet jelöl.

5.4. Fenciklidin adás befolyása a P2X7 receptor által közvetített [³H]glutamát felszabadulásra az egér agy prefrontális kérgében

Ismert, hogy a P2X7 receptorok aktivációja glutamát felszabadulást vált ki az idegvégződésekből⁵⁸. Kísérleteink során 2 mg/kg dózisú PCP-vel, vagy annak vehikulumával kezelt P2rx7 génkiütött (P2rx7 -/-), illetve vad típusú (P2rx7 +/+) egerekből származó, akut PFC szeleteken a P2X7R mediálta GLU kiáramlás méréséhez

P2X7R agonista BzATP-t továbbá elektromos téringerlést (EFS) használtunk fel (14. ábra). A prefrontokortikális szeletek [³H]glutamáttal való töltésüket és a 90 perc előperfúziót követően a radioaktív anyag felvétel 513.9 ± 28.9 kBq/g ($n = 8$) volt a fiziológias sóoldattal kezelt P2rx7^{+/+} egerekben, míg 857.9 ± 10.06 kBq/g ($n = 12$, $p < 0.05$) volt P2rx7^{-/-} állatokban. A bazális [³H]GLU kiáramlás a P2X7 receptorra nézve vad típusú egerekben $1.58 \pm 0.06\%$ ($n = 8$) volt, a P2rx7^{-/-} egerekben pedig $1.26 \pm 0.05\%$ ($n = 12$, $p > 0.05$), ezek az értékek szignifikánsan nem különböztek egymástól. Egy 3 perces BzATP-vel (100 μ M) történő perfúziót követően a P2rx7^{+/+} állatokban egy átmeneti, reverzibilis [³H]GLU felszabadulás emelkedés (2.38 ± 0.49 %) volt megfigyelhető. A [³H]GLU kiáramlás a P2X7R agonista mosását követően visszaállt a korábbi alapértékre. Ezzel ellentétben a P2rx7^{-/-} állatokban a BzATP nem okozott változást a [³H]GLU felszabadulásban (14a. ábra). Fokozottabb volt a bazális [³H]GLU kiáramlás az előzetesen PCP-vel kezelt, vad típusú (4.49 ± 0.25 %) és P2rx7^{-/-} (2.89 ± 0.62 %) egerek PFC szeleteiben egyaránt a vehikulummal kezelt állatok mintáiban mértékhez képest. Viszont a PCP-vel injektált P2rx7^{-/-} állatokban mért alap [³H]GLU felszabadulás, kisebb volt vad típusú egerekben kapott eredményekhez viszonyítva (14a. ábra). A PCP kezelésnek nem volt jelentős hatása a radioaktív anyag szövetekbe történő felvételére. A P2rx7^{+/+} állatokból származó PFC szeletekben, a BzATP indukálta [³H]GLU kiáramlás emelkedés mértéke nagyobb volt a PCP-vel előzetesen kezelt (Δ [³H]GLU = 2.8 %), mint a vehikulumot kapott (Δ [³H]GLU = 1.1 %) egerekben (13a. ábra). Az elektromos téringerlés (EFS) hatására a vad típusú és P2rx7^{-/-} állatok PFC mintáiban egyaránt reverzibilis [³H]GLU felszabadulás volt megfigyelhető. Az EFS által indukált [³H]GLU kiáramlás nem változott az előzetesen PCP-vel kezelt egerekben, egyik genotípusban sem (14b. ábra).



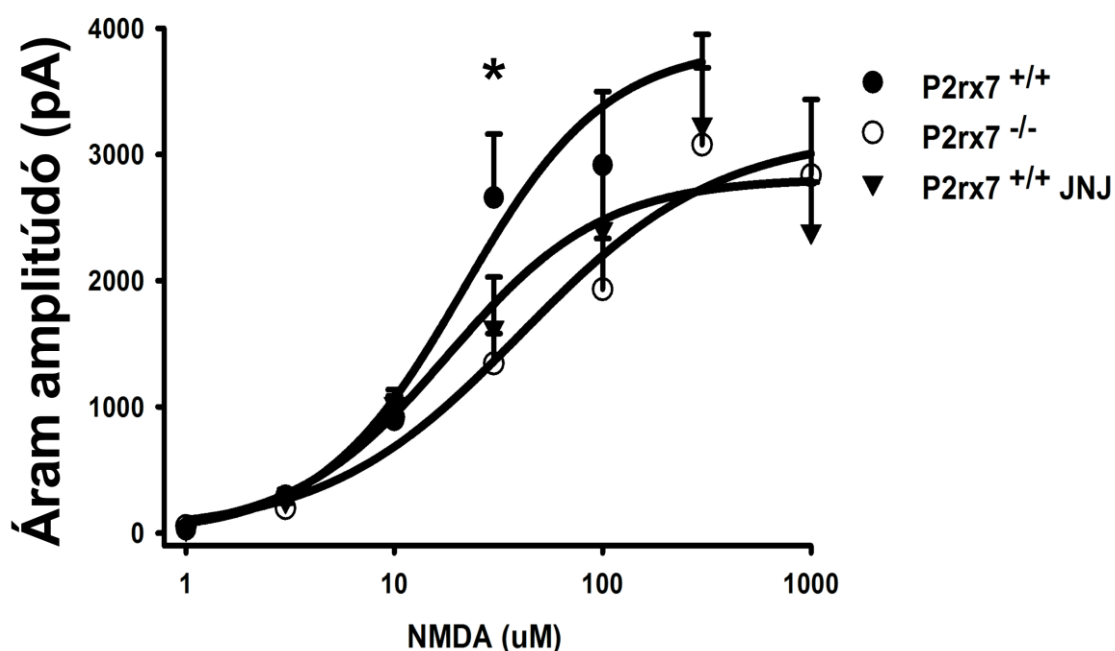
14. ábra. A glutamáterg transzmisszió P2X7 receptorokon keresztüli befolyásolása az egér prefrontális kérgében: $[^3\text{H}]\text{glutamát}$ felszabadulás mérése. A PCP kezelés (2 mg/kg i.p.) hatása (a) a P2X7 receptoron keresztül közvetített és (b) az elektromos téringerléssel (EFS) kiváltott $[^3\text{H}]\text{GLU}$ felszabadulásra *ex vivo* akut PFC szelet mintákon. A naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek PCP (2 mg/kg i.p.) vagy fiziológiás sóoldattal (0.9% NaCl) történő kezelést követően 60 perccel történt az akut PFC szeletek készítése, majd azok $[^3\text{H}]\text{glutamáttal}$ inkubálódtak. A mintagyűjtési periódus alatt a PFC

szeleteken P2X7 receptor agonista BzATP-vel (100 μ M) vagy elektromos téringerléssel stimulálódtak, az ábrákon ezeket vízszintes vonalak jelzik. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 8-12 állat került felhasználásra.

5.5. A P2X7 receptor génkiütésének, illetve farmakológiai gátlásának hatása az NMDA által indukált áramokra az egér agy prefrontális kérgében

Az előzőekben bemutatott kísérletek eredményeként tisztázódott, hogy a PCP kezelés csekély mértékben is, de felülszabályozza a P2X7R mRNS szintű kifejeződését, és fokozza a receptor funkcionális érzékenységét a PFC-ben, fokozottabb GLU kiáramlást eredményezve. A következőekben arra kerestük a választ, hogy vajon az endogén P2X7R aktivációja megváltoztatja-e a prefrontokortikális NMDA-típusú glutamát receptorok érzékenységét. Ezekben a kísérletekben, ún. teljes sejt patch-clamp technikát alkalmaztunk. Különböző koncentrációban alkalmazott NMDA (1-1000 μ M) sejtbe befelé irányuló áramokat indukált a PFC V. rétegének piramis sejtjeiben, mindkét genotípusú állatcsoportban (P2rx7 $+/+$ és P2rx7 $-/-$). A piramis sejtek többnyire nagy biológiai variabilitást mutattak az NMDA érzékenységük szempontjából, megnehezítve a statisztikai analízisüket. Kis NMDA koncentráció tartományban (1-10 μ M) jelentős különbség nem volt tapasztalható az NMDA-ra adott sejtválaszokban az eltérő genotípusú állatokból származó minták között. Ezzel ellentétben nagyobb dózisu NMDA alkalmazásakor (30 μ M), jelentős eltérés volt az NMDA indukálta áramok amplitúdójában. A P2X7R génkiütött egerek prefrontokortikális piramis sejtjeiben kisebb amplitúdójú ionáramokat mértünk (1343 ± 238 pA), mint a P2X7 receptorral rendelkező állatokban (2658 ± 504 pA). A koncentráció-válasz görbék hasonló tendenciát mutatnak még nagyobb NMDA koncentrációk esetében, nagyobb maximális választ (E_{max}) eredményezve a vad típusú egerekben (4330 ± 1171 pA) a P2rx7 $-/-$ állatokhoz képest (3224 ± 693 pA). A koncentráció-válasz görbék további fő paramétereiben, mint az EC_{50} értékek (24.98 ± 0.27 μ M (P2rx7 $+/+$) és 41.78 ± 0.26 μ M (P2rx7 $-/-$)) és a Hill koefficiens értékek (0.91 ± 0.58 (P2rx7 $+/+$) és 0.85 ± 0.57 (P2rx7 $-/-$)) között nem voltak szignifikáns különbségek az eltérő genotípusú egerekben (15. ábra). Mindemellett vizsgáltuk az NMDA koncentráció-válasz összefüggést P2X7 receptorra nézve vad típusú állatokból származó PFC V. rétegének piramis sejtjeiben, P2X7R antagonistá JNJ-47965567 (0.1 μ M)

jelenlétében is. A P2X7 receptorok farmakológiai gátlása hasonló hatással volt az NMDA által kiváltott koncentráció-válasz görbékre, mint a receptor génkiütése. A P2X7R antagonistája jelenlétében a kapott görbe E_{max} értéke kisebb volt (2831 ± 360 pA), mint a JNJ-47965567 vegyület hiányában mért esetében, de a sejtek közötti nagy variabilitások miatt ez nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget (15. ábra).

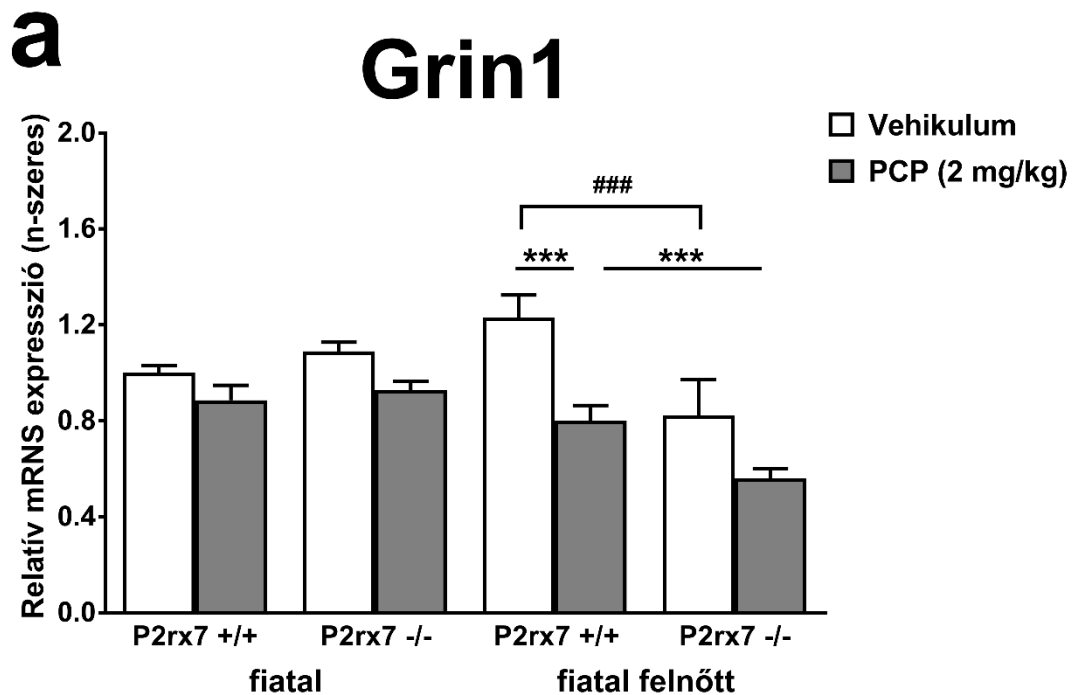


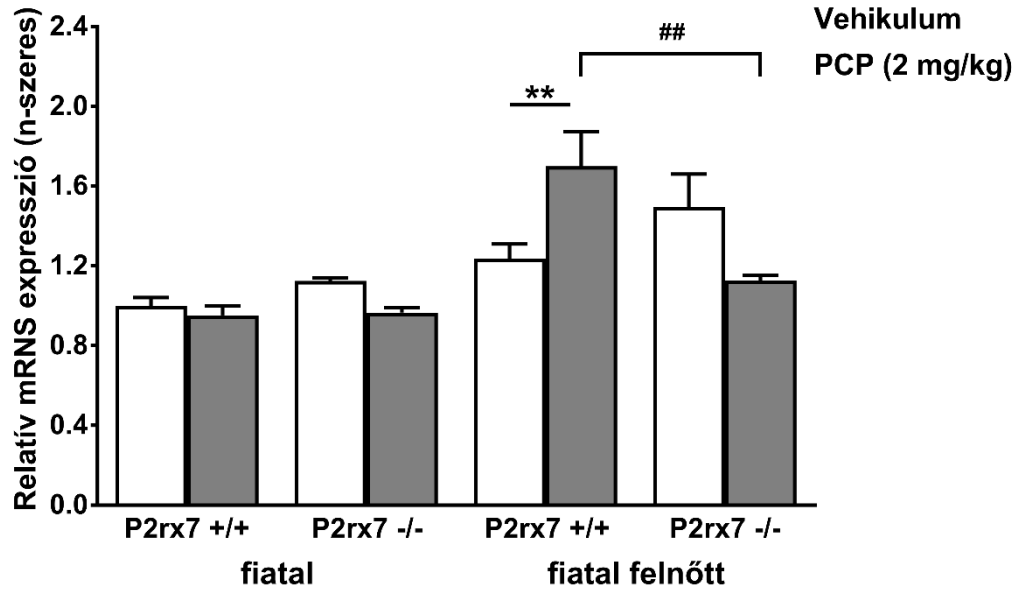
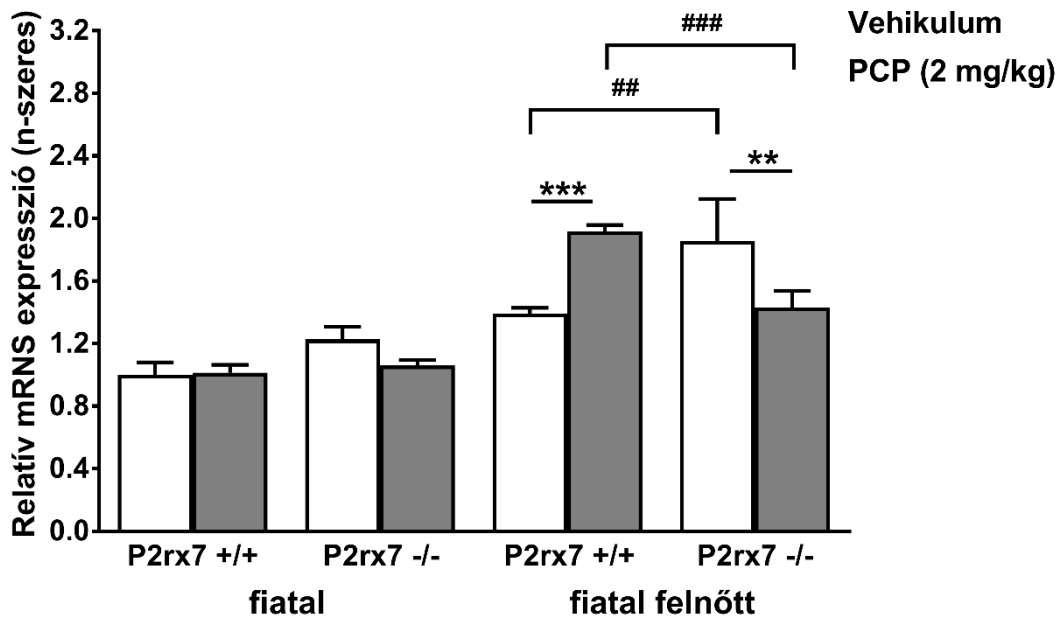
15. ábra. A glutamáterg transzmisszió P2X7 receptorokon keresztüli befolyásolása az egér agy prefrontális kérgében: NMDA által kiváltott ionáramok mérése. A naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ állatokban P2X7 receptor antagonistája JNJ-47965567 (100 nM, JNJ) jelenlétében és hiányában, illetve P2rx7 -/- egerekben az NMDA koncentráció-válasz görbéi. Az NMDA-t emelkedő koncentrációban (1-1000 µM) alkalmazva, az NMDA által kiváltott ionáramok amplitúdói kerültek rögzítésre a kortikális szeletek V. rétegének piramis neuronjaiból. Az NMDA koncentráció-válasz görbéit a SigmaPlot (Systat) logisztikus függvényét felhasználva illesztette. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában lettek ábrázolva, $n=5-16$ sejt / különböző NMDA koncentráció (* $p < 0.05$; P2rx7 -/- vs. P2rx7 +/+; kétutas ANOVA).

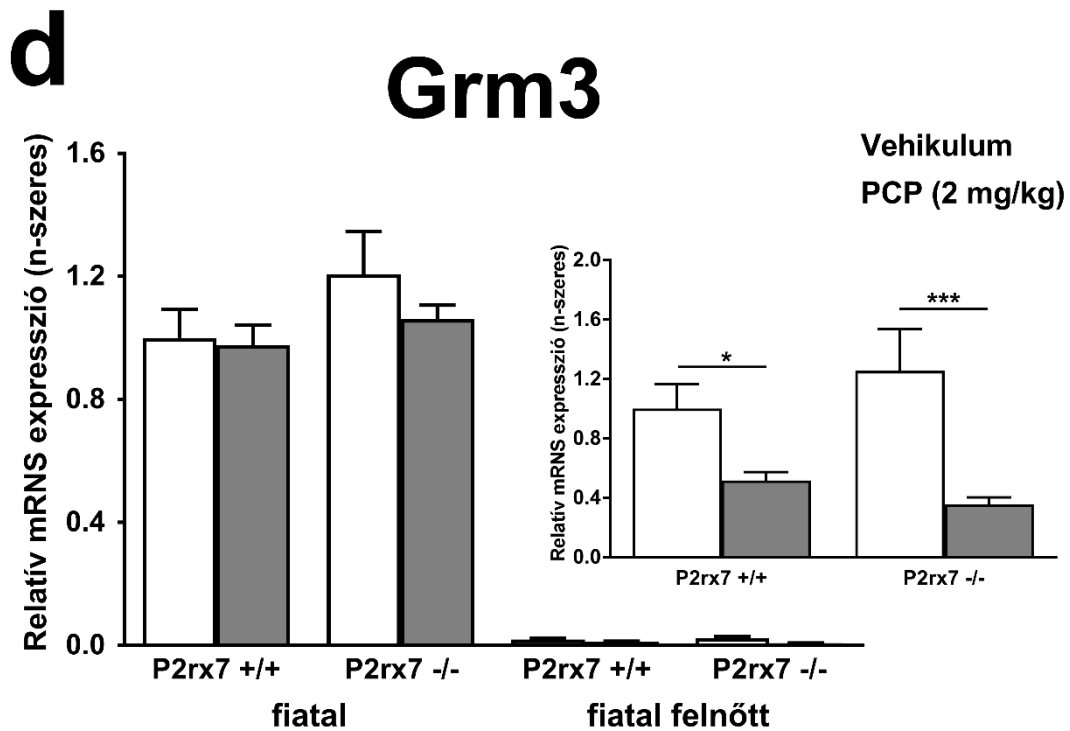
5.6. A P2X7 receptor genetikai deléciója által okozott régióspecifikus génkifejeződési eltérések

A génextpressziós szintekben bekövetkező módosulások közvetíthetnek hosszútávú adaptív viselkedésbeli változásokat. Továbbá korábbi tanulmányokból ismert, hogy a P2X7R genetikai deficienciájának jelentős hatása van számos gén mRNS szintű kifejeződésére, amelyek számos pszichiátriai kórkép hátterében állhatnak¹⁰⁷. Génextpressziós kísérleteink során elsőként, a PCP (2 mg/kg) egyes ionotróp, NMDA-típusú glutamát receptor alegységeket kódoló gének (Grin1, Grin2a, Grin2b), és egy metabotróp glutamát receptor 3-as altípusát kódoló gén (Grm3) mRNS kifejeződési szintjeire kifejtett hatását vizsgáltuk fiatal (18 napos) és fiatal felnőtt (56 napos), naív és P2X7R génkiütött állatok PFC mintáiban (16. ábra). Fiatal állatokban sem a P2rx7 génkiütés, sem a PCP kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az említett gének expressziós szintjeit. Ezzel szemben, fiatal felnőtt egerekben eltérő módon, de szignifikáns hatással volt, mind a P2rx7 gén deficienciája, mind az előzetes PCP adás. Az NMDA receptor alegységek közül az NR1 alegységet kódoló, Grin1 gén mRNS expressziós szintje szignifikánsan kisebb volt a P2X7 receptorral rendelkező egerekben PCP kezelés hatására (0.8 ± 0.06), mint a vehikulummal kezelt egerekben (1.23 ± 0.09) (16a. ábra). Hasonló, szignifikáns csökkentő hatást eredményezett önmagában (vehikulumot kapott egerekben) a P2rx7 génkiütés a Grin1 gén expressziós szintjében (0.82 ± 0.15). Ezzel szemben, a P2rx7 $-/-$ állatokban a PCP nem csökkentette szignifikánsan a Grin1 gén expressziós szintjét a vehikulummal történő összevetésben (0.56 ± 0.04). A P2X7 receptorral rendelkező állatokban a PCP kezelés az NR2A és NR2B receptor alegységet kódoló gének (Grin2a és Grin2b) mRNS expressziójára gyakorolt hatása ellenkező irányú volt, mint a Grin1 gén esetében (16b. és 16c. ábra). A Grin2a és Grin2b génextpressziós szintje szignifikánsan nagyobbak bizonyult (Grin2a: 1.7 ± 0.17 ; Grin2b: 1.92 ± 0.04) a vad típusú, vehikulummal kezelt egerekhez viszonyítva (Grin2a: 1.23 ± 0.08 ; Grin2b: 1.39 ± 0.04). Érdekes módon vehikulummal kezelt állatokban a P2rx7 genetikai deléciója emelkedett Grin2a (1.49 ± 0.17) és Grin2b (1.86 ± 0.27) mRNS expressziós szintekhez vezetett a vad típusú egerekhez képest, de ez a növekedés a Grin2a gén esetében nem érte el a szignifikancia küszöbértékét. Hasonlóan a Grin1-hez, a P2rx7 gén kiütése esetében a PCP kezelés hatástalannak bizonyult a vehikulumhoz képest a Grin2a esetében (Grin2a:

1.13 ± 0.03), míg a Grin2b esetében ellentétes hatást, vagyis csökkenést eredményezett (Grin2b: 1.43 ± 0.1). A Grm3 relatív mRNS expressziós szintjei a fiatal felnőtt állatokban a detekciós küszöb alatt voltak a fiatal állatokban mért génkifejeződési szintekhez képest (16. ábra). Ennek következtében a fiatal felnőtt egerekben kapott Grm3 génexpressziós eredményeket önmagukban is kiértékeljük, ez esetben a fiziológiás sóoldattal kezelt, fiatal felnőtt, P2rx7 +/+ állatok PFC mintáiban mért expressziós szinteket tekintve 100%-nak. Így értékelve, a PCP kezelés mindkét genotípusú egérben csökkent relatív mRNS expressziós szinteket eredményezett a vehikulummal kezelt állatokban mértékhöz hasonlítva.

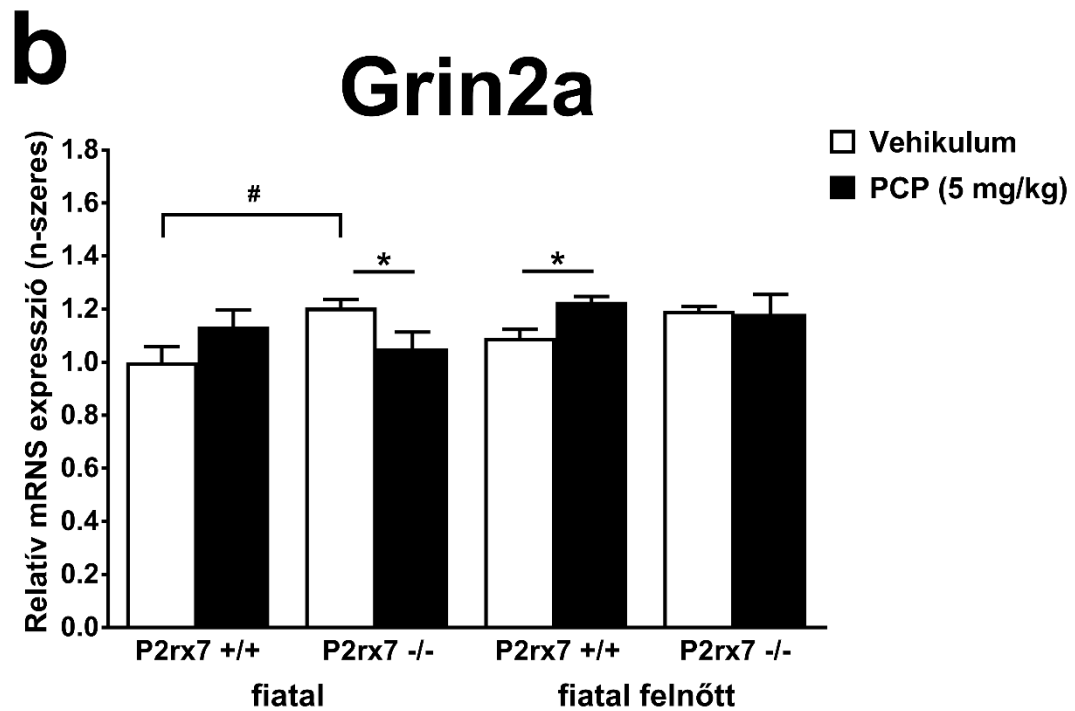
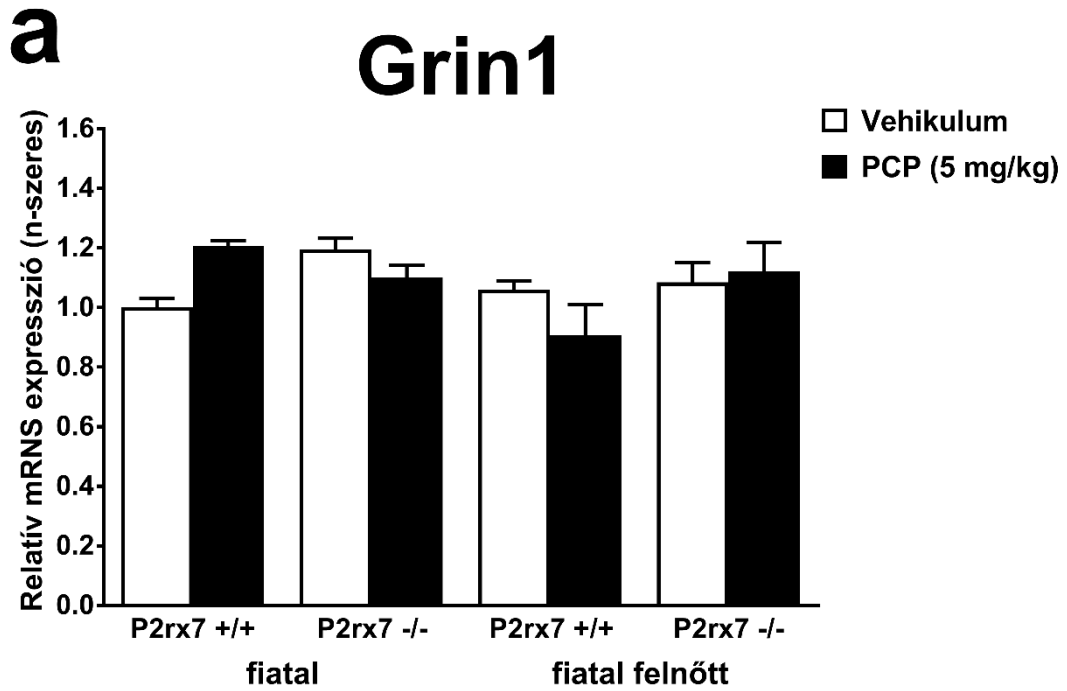


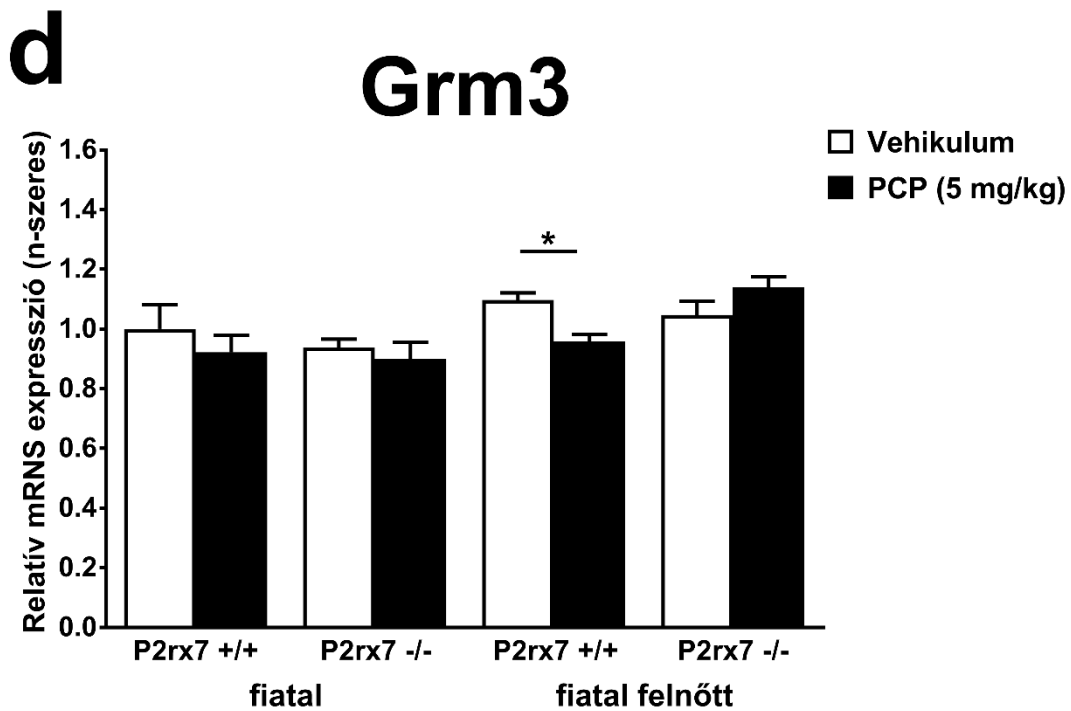
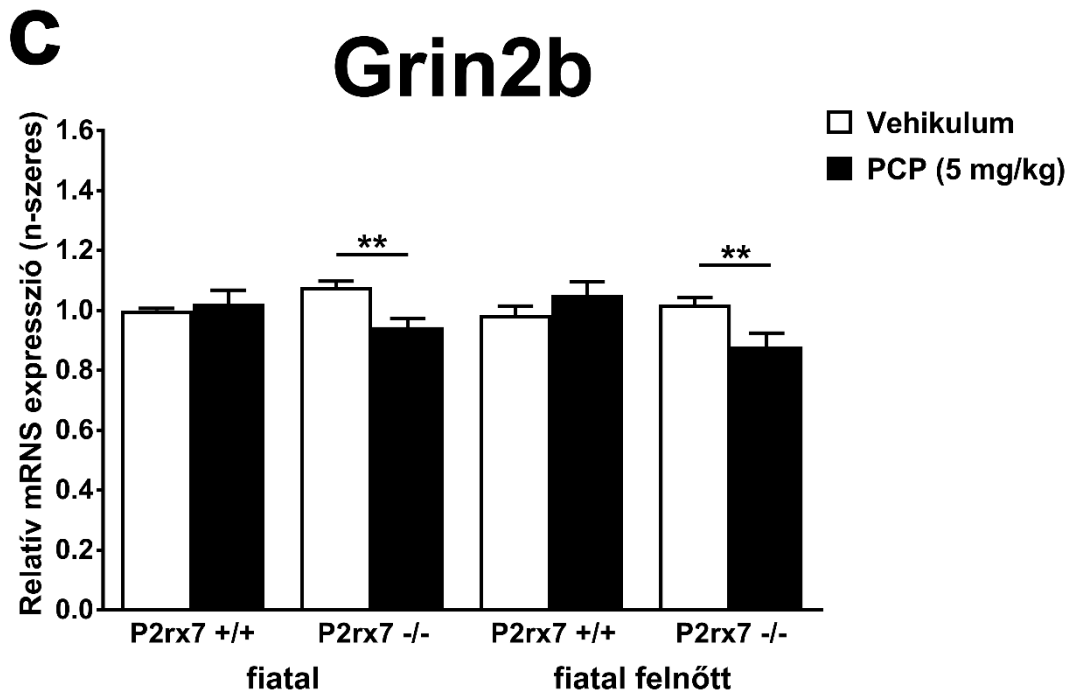
b**Grin2a****c****Grin2b**



16. ábra: A kisebb dózisú PCP kezelés (2 mg/kg) hatása ionotróp NMDA receptor alegységek, (a) *Grin1*, (b) *Grin2a*, (c) *Grin2b* és egy metabotróp glutamát receptor, (d) *Grm3* relatív mRNS expressziós szintjeire. A gének relatív mRNS expressziós szintjeinek meghatározását fiatal (18 napos) és fiatal felnőtt (56 napos), naív C57Bl/6J *P2rx7 +/+* és *P2rx7 -/-* egerek prefrontális kéreg mintáiban végeztük el. Az egyes gének expressziós szintjei a *Gapdh* gén, mint endogén kontroll mRNS expressziós szintjeire lettek normalizálva. A fiziológias sóoldattal kezelt, fiatal, *P2rx7 +/+* állatok, prefrontális kéreg mintáiban mért normalizált mRNS expressziós szinteket tekintve 100%-nak, ehhez lettek viszonyítva a többi csoportban mért, normalizált génexpressziós szintek. (d, beszúrt ábra) A *Grm3* relatív mRNS expressziós szintjei fiatal felnőtt, *P2rx7 +/+* és *P2rx7 -/-* egerek prefrontális kéreg mintáiban, amely expressziós szinteket szintén a *Gapdh* gén, mint endogén kontroll mRNS expressziós szintjeire lettek normalizálva. A fiziológias sóoldattal kezelt, *P2rx7 +/+* egerekben mért normalizált mRNS expressziós szintek lettek 100%-nak tekintve. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 3-6 állat kerültek felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$; **, ## $p < 0.01$; ***, ### $p < 0.001$ szignifikanciaszintet jelöl.

A korábbiakban mért kísérleti eredmények alapján a hippokampális régióban mért géneexpressziós vizsgálataink során a PCP nagyobb dózisa (5 mg/kg) került felhasználásra, mert ennek a dózisu PCP kezelésnek volt szignifikáns hatása a P2X7 receptor mRNS expressziójára ebben az agyi régióban (17. ábra). Összességében elmondható, hogy a HPC mintákban mért géneexpressziós szintekben kisebb mértékű eltéréseket tapasztaltunk, mint a PFC régióban is mért, az előző bekezdésben tárgyalt gének esetében. A Grin1 gén mRNS expressziójában nem mutattunk ki szignifikáns eltérést az eltérő genotípusú, és különböző kezelést kapott állatok egyik korcsoportjában sem (17a. ábra). Fiatal korú egerekben mért Grin2a génkifejeződési szintekre szignifikáns, növelő hatása volt a P2rx7 genetikai deléciójának a vehikulummal kezelt állatokban, a vad típusú egerek csoportjához képest (P2rx7 +/+ : 1.00 ± 0.03 ; P2rx7 -/- : 1.2 ± 0.04). A PCP kezelésnek ezekben az egerekben azonban nem volt hatása a vad típusú állatokban, míg a P2rx7 génkiütött állatokban szignifikánsan kisebb géneexpressziós szinteket mutattunk ki a PCP kezelés hatására (1.05 ± 0.06), a vehikulumot kapott egerekhez viszonyítva. Fiatal felnőtt, a P2X7 receptorral rendelkező állatokban a PCP kezelés szignifikáns növekedést (1.23 ± 0.02) okozott a Grin2a mRNS expressziójában a vehikulummal kezelt egerekhez képest (1.09 ± 0.04), ez a hatás a P2rx7 génkiütött egerekben nem volt tapasztalható ebben a korcsoportban (17b. ábra). Az eltérő korcsoportú, génkiütött állatokban hasonló, csökkenő tendencia volt megfigyelhető a Grin2b géneexpressziós szintekben a PCP kezelést követően (fiatal egerek: 0.94 ± 0.03 ; fiatal felnőtt egerek: 0.88 ± 0.05) a vehikulumot kapott állatokhoz viszonyítva (fiatal egerek: 1.08 ± 0.02 ; fiatal felnőtt egerek: 1.02 ± 0.02), míg vad típusú egerekben ilyen hatást nem volt tapasztalható. A P2X7 receptor genetikai deléciója önmagában nem okozott szignifikáns változást a Grin2b mRNS expressziós szintjeiben, egyik korcsoportban sem (17c. ábra). A fiatal felnőtt, vad típusú egerekben a Grm3 géneexpressziójának mértéke szignifikánsan kisebb volt a PCP kezelt állatokban (0.96 ± 0.02) a vehikulummal kezeltékhez (1.1 ± 0.02) képest, ugyanakkor ez a hatás nem volt megfigyelhető a P2rx7 génkiütött állatokban (17d. ábra).



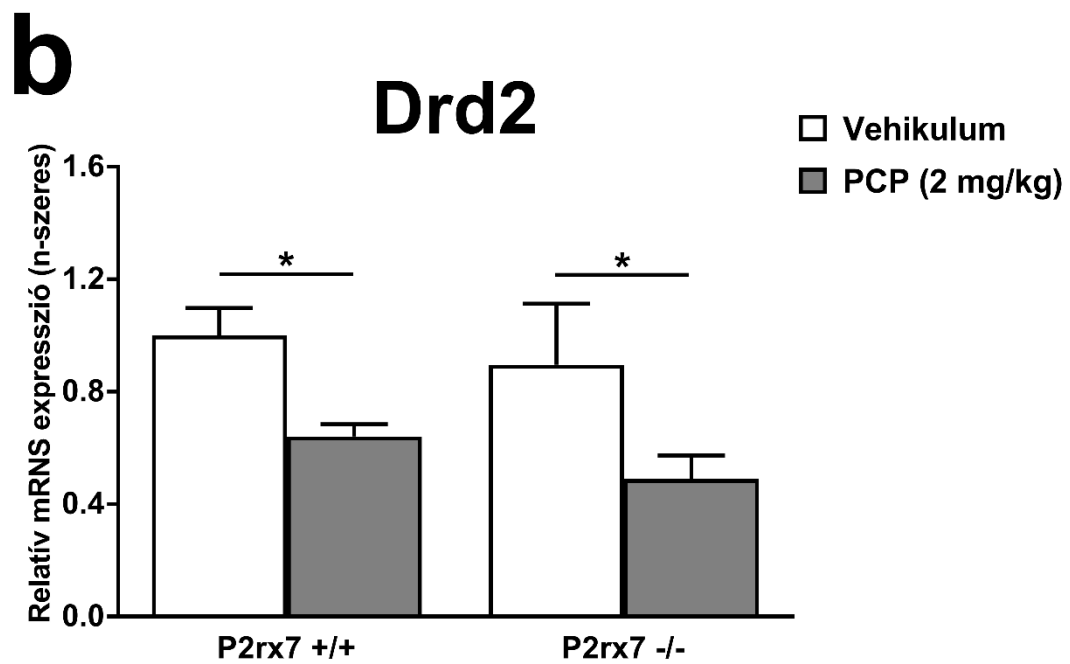
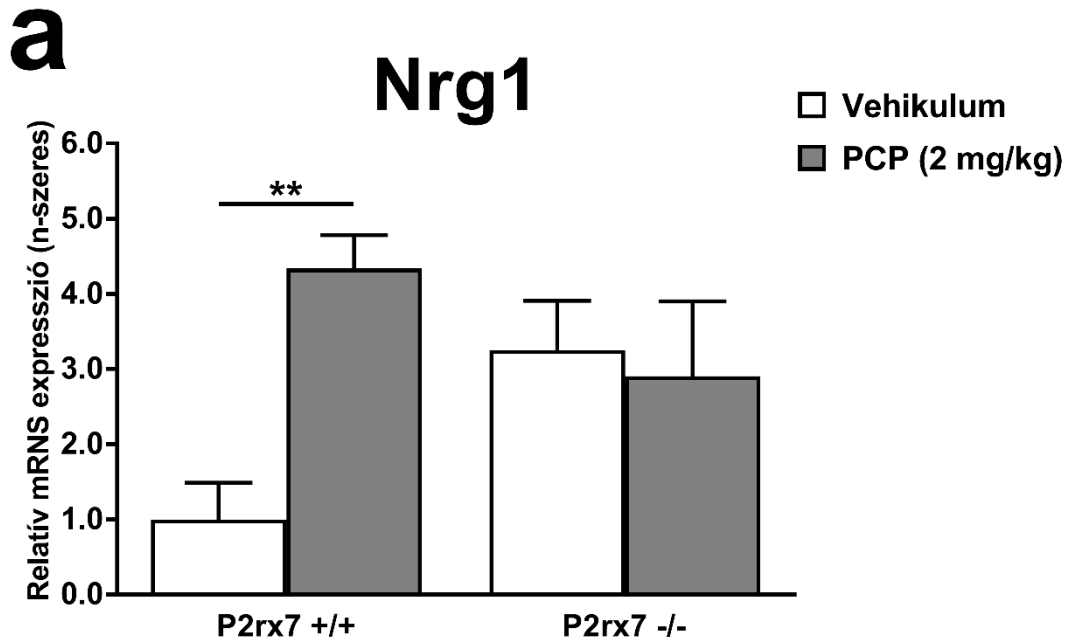


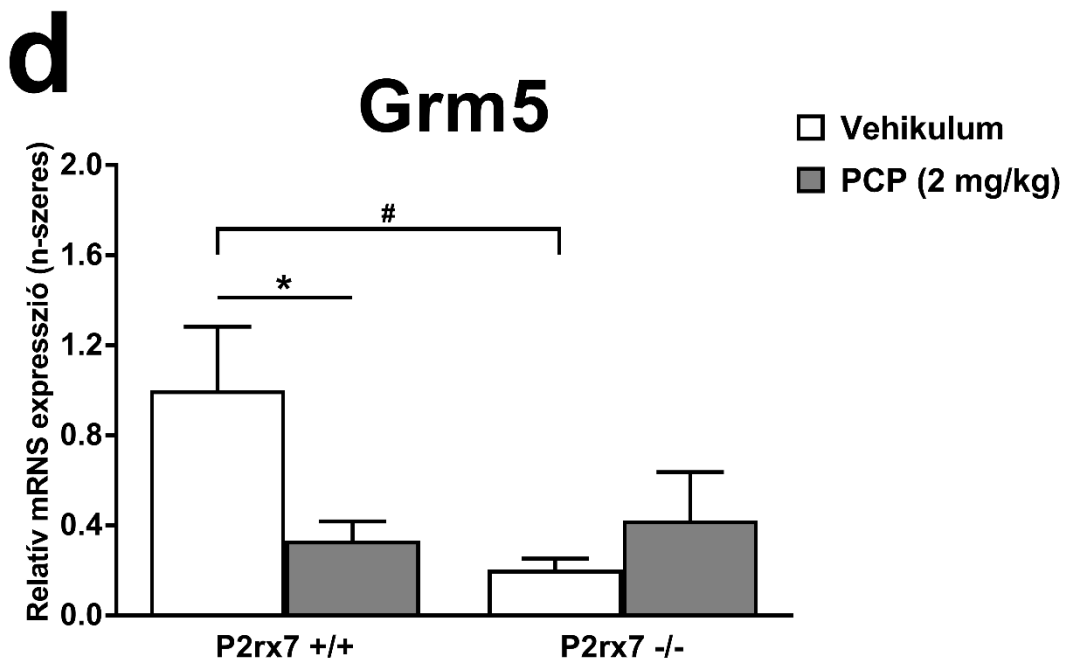
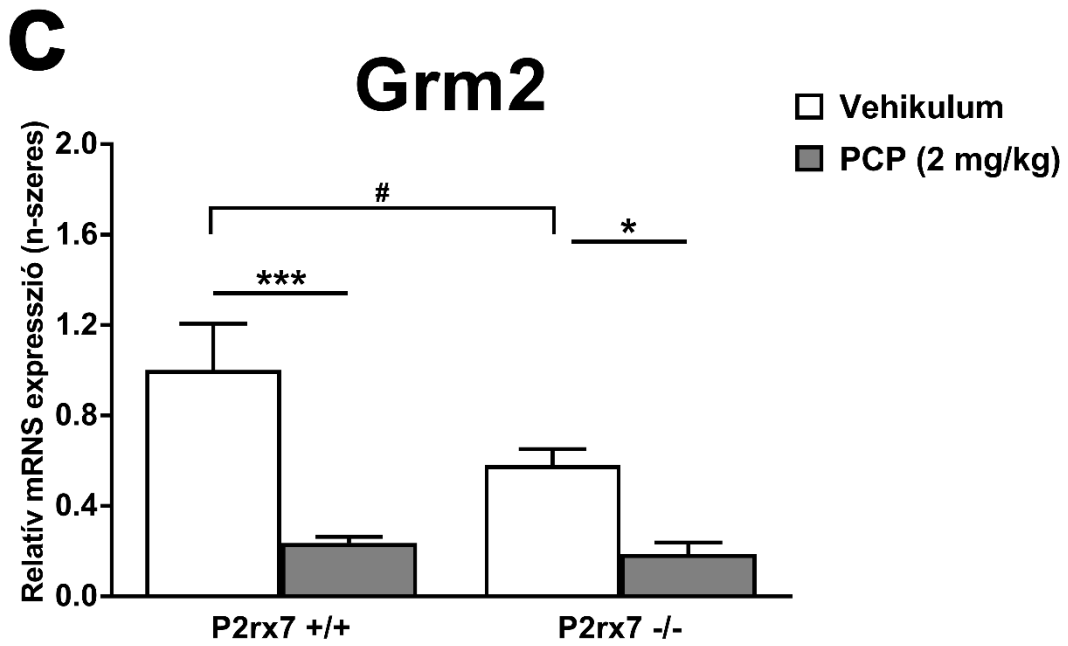
17. ábra: A nagyobb dózisú PCP kezelés (5 mg/kg) hatása ionotróp NMDA receptor alegységek, (a) Grin1, (b) Grin2a, (c) Grin2b és a metabotróp glutamát receptor 3-as altípus, (d) Grm3 relatív mRNS expressziós szintjeire. A gének relatív mRNS

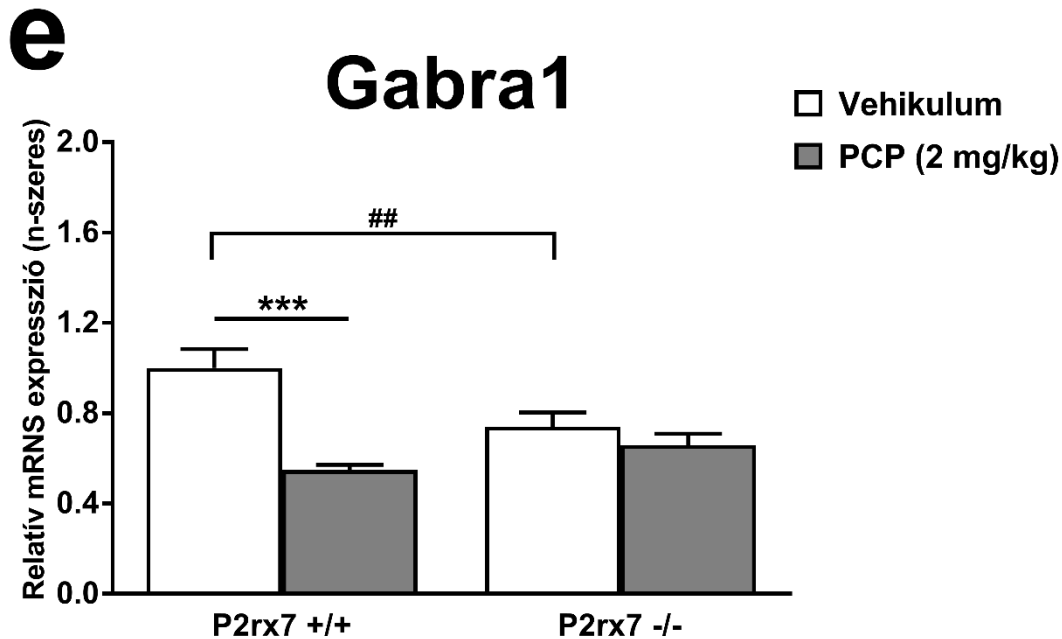
expressziós színjeinek meghatározását fiatal (18 napos) és fiatal felnőtt (56 napos), naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek hippocampusz mintáiban végeztük el. Az egyes gének expressziós szintjeit a Gapdh gén, mint endogén kontroll mRNS expressziós szintjeire lettek normalizálva. A fiziológias sóoldattal kezelt, fiatal, P2rx7 +/+ állatok, prefrontális kéreg mintáiban mért normalizált mRNS expressziós szinteket tekintettük 100%-nak, ehhez lettek viszonyítva a többi csoportban mért, normalizált génexpressziós szintek. A kapott eredményeket átlag \pm S.E.M. formájában lettek ábrázolva. Csoportonként 3-4 állat került felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztuk, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$ szignifikanciaszintet jelöl.

További génkifejeződési kísérleteink során, az előbbieken bemutatott géneken kívül, egyes szkizofrénia patomechanizmusával feltételezhetően kapcsolatban álló gének mRNS expressziós szintű változásait is vizsgáltuk. Ezek a gének a következő fehérjéket kódolják: D1 és D2 dopamin receptorok (Drd1 és Drd2), katekolamin-O-metiltransferáz (Comt), neuregulin 1 (Nrg1), metabotrop glutamát receptor 2 és 5 altípusok (Grm2, Grm5), GABA_A receptor $\alpha 1$ és $\alpha 5$ alegységek (Gabra1, Gabra5) (18. ábra). Korábbi kísérleteink alapján elmondható, hogy a PCP kezelésnek és a P2X7 receptor genetikai deléciójának a hatása a génexpressziós változásokra a fiatal felnőtt egerek PFC régiójában a leginkább kifejezett. Ennek következtében ebből az állatcsoportból izolált PFC régióban analizáltuk a P2rx7 géniütés és a PCP adás (2 mg/kg) hatásait. Szignifikáns növekedést volt kimutatható az Nrg1 gén mRNS expressziójában a vad típusú állatokban, a PCP kezelés hatására (4.34 ± 0.44) annak vehikulumával kezelt (1.00 ± 0.49) állatokhoz képest, de ez a jelentős különbség nem volt megfigyelhető P2rx7 deficiens állatokban (vehikulum: 3.25 ± 0.66 , PCP: 2.9 ± 0.99) (17a. ábra). A Drd2 génexpressziós szintjei szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a PCP kezelés következtében mind a P2X7 +/+ (vehikulum: 1.00 ± 0.1 , PCP: 0.52 ± 0.04), mind a P2X7 -/- (vehikulum: 0.89 ± 0.22 , PCP: 0.49 ± 0.08) egerekben, de a genetikai deficiencia nem befolyásolta e gén expressziós szintjét a vad típusú állatokhoz képest (18b. ábra). A Grm2 gén kifejeződési szintjeiben hasonló, jelentős csökkenést mutattunk ki a PCP kezelés hatására mindkét genotípusú állatokban (P2rx7 +/+, vehikulum: 1.00 ± 0.21 , PCP: 0.24 ± 0.03 ; P2rx7 -/-, vehikulum: 0.58 ± 0.07 , PCP: 0.19 ± 0.05). Emellett szignifikánsan kisebb volt a Grm2

mRNS expressziós szintje a vehikulumot kapott, P2X7 receptor génkiütött egerekben a vad típusú alomtársaikhoz képest (18c. ábra). A másik vizsgált metabotróp glutamát receptor (Grm5) gén expressziós szintjében az előbb említett Grm2 génhez hasonlóan szignifikáns alulszabályozódás tapasztalható a P2X7 receptorral rendelkező állatokban PCP kezelés hatására (0.33 ± 0.09) a vehikulummal kezelt (1.00 ± 0.28) egerekhez képest, azonban a P2rx7^{-/-} egerekben nem volt eltérés a Grm5 mRNS expressziós szintjében a PCP-t (0.2 ± 0.05) és annak vehikulumát kapott (0.42 ± 0.21) állatok között. A Grm2 expressziós szintjeihez hasonlóan, önmagában a P2X7R génkiütés szignifikáns hatással volt a Grm5 gén kifejeződési szintjére a vehikulummal kezelt állatokban (18d. ábra). A GABA_A receptor $\alpha 1$ (Gabra1) gén mRNS expressziós szintje a P2X7 receptor vad típusú állatokban szignifikánsan kisebb volt a PCP kezelés hatására (vehikulum: 1.00 ± 0.08 ; PCP: 0.55 ± 0.02), de ez a befolyás eltűnt a P2rx7 genetikai deficiencia hatására (18e. ábra). Érdekes módon az előbbieken említett két metabotróp glutamát receptorhoz hasonlóan a vehikulummal kezelt P2rx7^{-/-} állatokban a Gabra1 mRNS expressziós szintje is szignifikánsan alulszabályozódott (0.74 ± 0.06) a P2X7 receptorral rendelkező egerekhez képest. További három gén mRNS expressziós szintjét vizsgálva (Drd1, Comt, Gabra5) nem volt kimutatható szignifikáns változás sem a PCP kezelés, sem a P2X7 receptor genetikai deficiencia hatására, ezek az eredmények nem kerülnek bemutatásra a disszertációban.





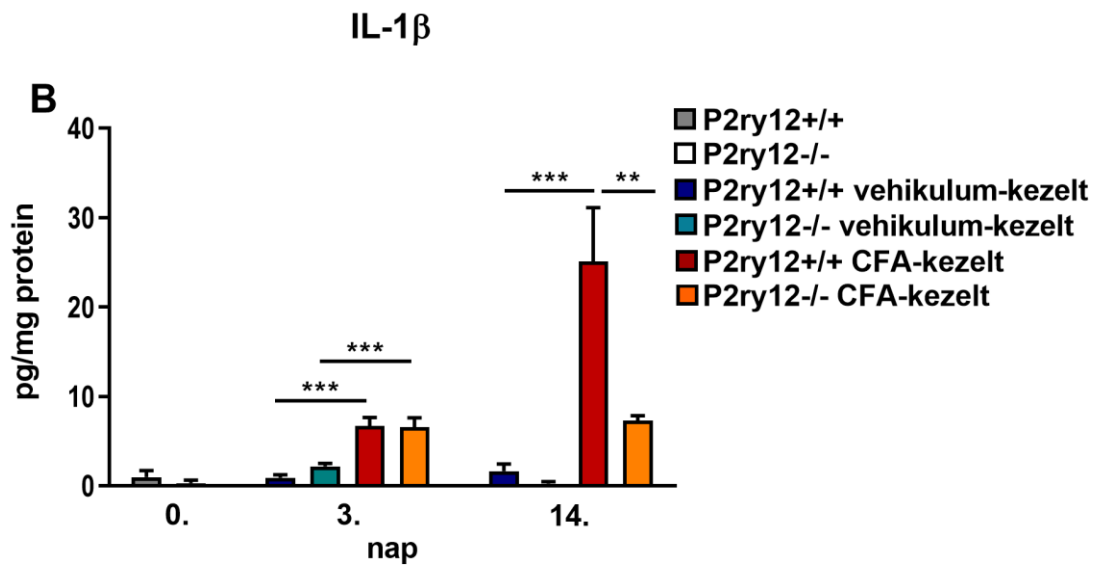
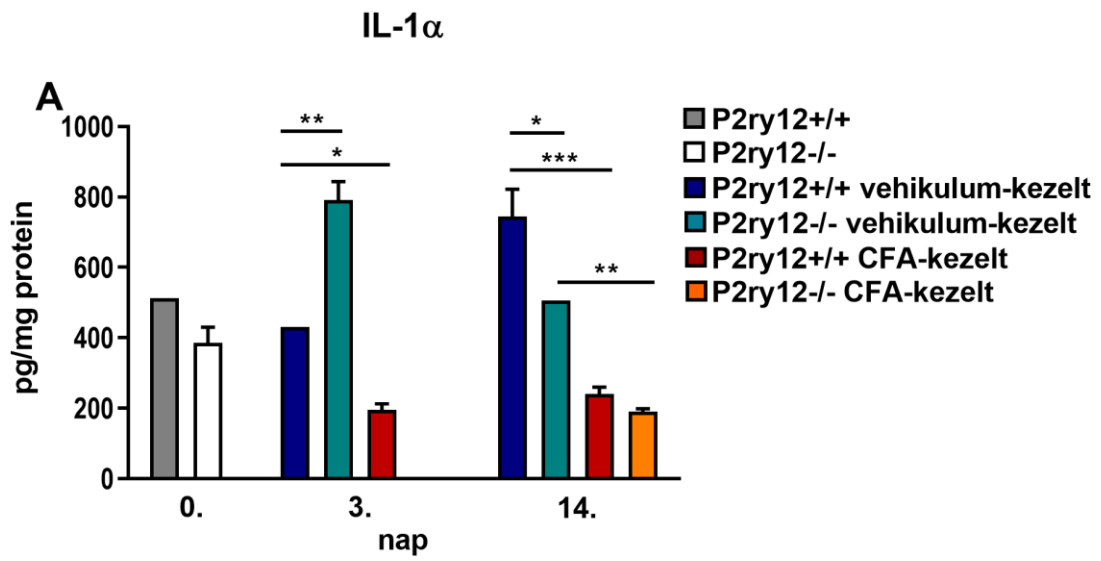


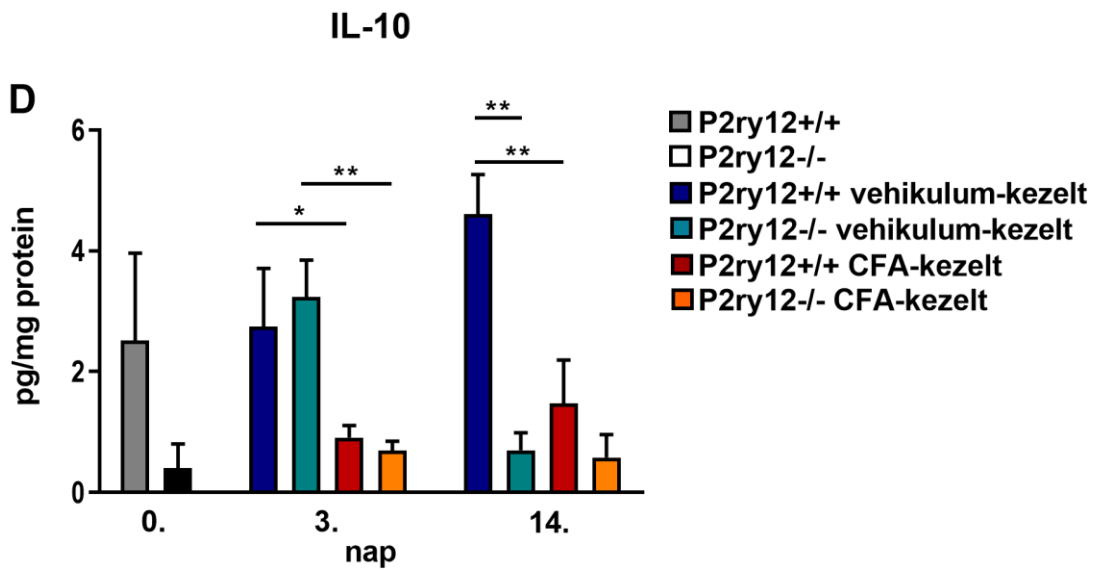
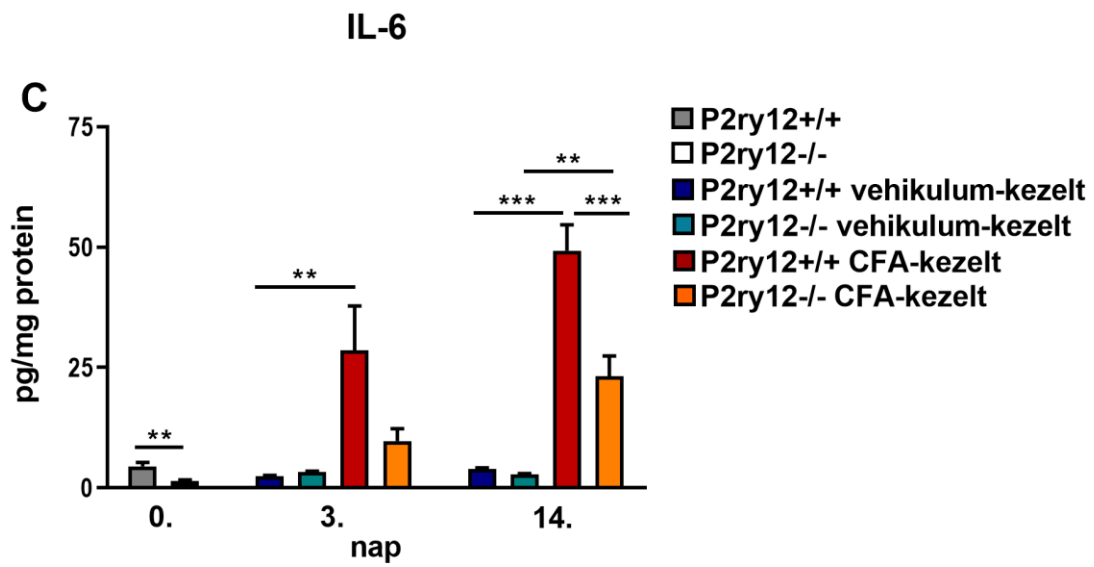
18. ábra: A kisebb dózisu PCP kezelés (2 mg/kg) hatása válogatott, a szkizofréniához köthető gének relatív mRNS expressziós szintjeire, (a) *Nrg1*, (b) *Drd2*, (c) *Grm2*, (d) *Grm5*, (e) *Gabra1*. A gének relatív mRNS expressziós szintjeinek meghatározását fiatal felnőtt (56 napos), naív C57Bl/6J P2rx7 +/+ és P2rx7 -/- egerek prefrontális kéreg mintáiban végeztük el. Az egyes gének expressziós szintjeit a *Gapdh* gén, mint endogén kontroll mRNS expressziós szintjeire lettek normalizálva. A fiziológias sóoldattal kezelt, P2rx7 +/+ állatokban mért normalizált mRNS expressziós szinteket tekintettük 100%-nak, ehhez lettek viszonyítva a többi csoportban mért, normalizált génexpressziós szintek. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 3-6 állat került felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ szignifikanciaszintet jelöl.

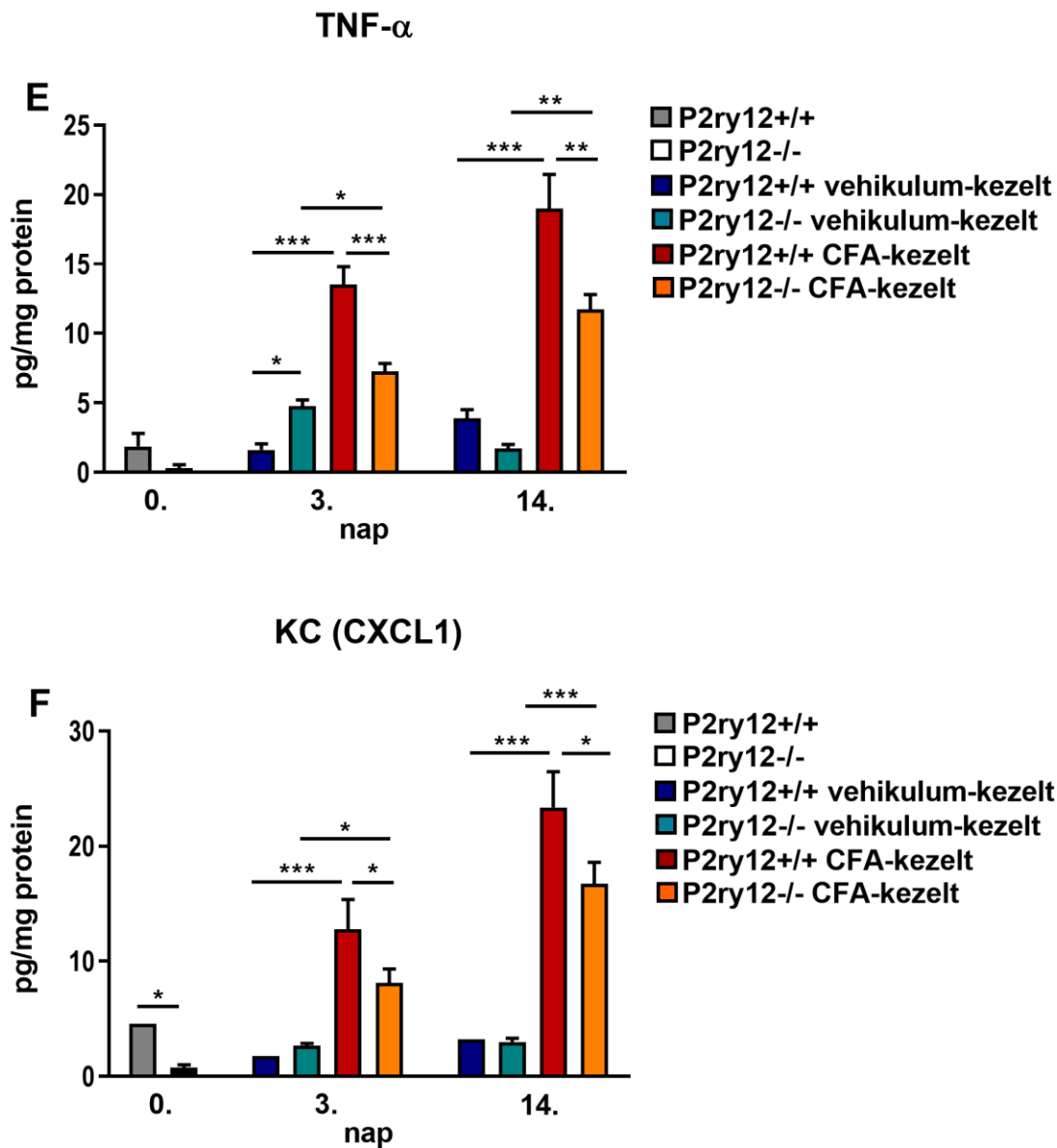
5.7. A P2Y₁₂ receptor genetikai deficienciájának hatása gyulladáso mediátorok fehérje szintjeire

A P2Y₁₂ receptorral rendelkező állatokban az általunk vizsgált proinflammatorikus citokinek és egy kemokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α , KC) szintjében

jelentős növekedést mutattunk ki a komplett Freund-adjuvánszal (CFA) történő kezelést követő 3. és 14. napon az egerek izolált talpmintáiban a vehikulummal történő kezelés adott napokon mért értékeivel történő összevetésben (19b, c, e, f. ábrák). A P2Y₁₂ receptor genetikai deléciója ellensúlyozta egyes citokinek esetében a CFA kezelés által indukált növekedést mind a két vizsgált időpontban vett minták esetében. A 3. napon a vad típusú állatokban a CFA által kiváltott szignifikáns növekedést a TNF- α (vehikulum: 1.61 pg/mg protein, CFA: 13.54 pg/mg protein) és KC (vehikulum: 1.77 pg/mg protein, CFA: 12.78 pg/mg protein) szintjeiben a receptor genetikai deléciója szignifikánsan csökkentette (P2ry12 $-/-$, CFA-kezelt: TNF- α (7.26 pg/mg protein); KC (8.14 pg/mg protein)) (19e, f. ábrák). Hasonló irányú tendenciát mutattunk ki az IL-6 esetében is, de ez nem érte el a szignifikancia küszöbértékét. Ugyanezen a napon vett mintákban a P2Y₁₂ receptorral rendelkező egerekben a CFA kezelést követően az IL-1 α szintje szignifikánsan csökkent (195.4 pg/mg protein) a vehikulummal kezelt állatokhoz képest (431.7 pg/mg protein), azonban a CFA kezelésnek kitett P2ry12 $-/-$ állatokban a detektálási határ alatt volt az IL-1 α szintje (19a. ábra). A 14. napon izolált vad típusú állatok talpmintáiban az előzetesen CFA-val való kezelés szignifikáns növekedést váltott ki az IL-1 β , IL-6, TNF- α , KC szintjeiben, ugyanakkor a P2Y₁₂ receptorral nem rendelkező állatokban ezek a szintek szignifikánsan kisebbnek bizonyultak (19b, c, e, f. ábrák). Az IL-1 α szintjére szignifikáns csökkentő hatása volt a CFA kezelésnek a vad típusú állatokban a 14. napon (vehikulum: 744.6 pg/mg protein, CFA: 240.8 pg/mg protein), de ezt a hatást a P2Y₁₂ receptor genetikai deficienciája nem ellensúlyozta (190.7 pg/mg protein) (19a. ábra). Mindemellett a gyulladásgátló IL-10 szintjeit szignifikánsan alulszabályozta a CFA kezelés a vad típusú állatokban a 3. és 14. napon egyaránt, azonban erre nem volt hatása a P2Y₁₂ receptor genetikai deléciójának. Ugyanakkor a 14. napon a vehikulummal kezelt állatokban szignifikánsan kisebb IL-10 szintet mutattunk ki a P2Y₁₂ receptor génkiütött egerekben (P2ry12 $+/+$: 4.6 pg/mg protein, P2ry12 $-/-$: 0.7 pg/mg protein) (19d. ábra).







19. ábra: A P2Y₁₂ receptor genetikai deléciójának hatása a pro- és anti-inflammatorikus citokin szintekre, (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) IL-10, (E) TNF- α , (F) KC (CXCL1). Az egyes citokin szintek P2ry12 +/+ és P2ry12 -/- naív, komplett Freund-adjuvánszal (CFA), illetve annak vehikulumával kezelt állatok hátsó talp mintáiból származnak. A mért citokin koncentrációk a minták teljes fehérje tartalmára lettek normalizálva. A kapott eredmények átlag \pm S.E.M. formájában láthatóak. Csoportonként 6 állat került felhasználásra. A statisztikai analízisre kétutas ANOVA-t követően a Fisher-féle LSD post hoc tesztet alkalmaztunk, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, szignifikanciaszintet jelöl.

6. MEGBESZÉLÉS

A szkizofrénia komplex neuropszichiátriai zavar, amelynek kialakulásában számos neurotranszmitter és jelátviteli út játszhat szerepet, ezáltal sokféle tünetegyüttes (pozitív, negatív, kognitív) manifesztálódhat. Míg korábban a betegség patomechanizmusának hátterének kutatása főként a dopaminerg, glutamaterg és GABAerg neurotranszmitter rendszerek vizsgálatára irányultak, újabban felmerült a purinerg jelátviteli rendszer érintettsége is. Számos tanulmány foglalkozik a purinerg szignalizáció szerepének vizsgálatával pszichiátriai betegségek patofiziológiájában, ideértve a szkizofréniát, bipoláris zavart, depressziót is. A P2 purinoreceptorok expressziós és aktivációs mintázata a neurogenesis egyes szakaszaiban különböző lehet, így a sejtproliferáció, migráció és meghatározott neuronális fenotípusú differenciáció során. Eszerint a P2X7 receptorok például nagyobb mértékben fejeződnek ki nem differenciálódott embrionális sejtekben, mint neuronális irányba differenciálódott sejtekben. Továbbá már korábban megállapították, hogy a hippocampális BDNF kifejeződési szintje a P2X7 receptorok szabályozó hatása alatt áll, illetve egyes antidepresszánsok képesek emelkedett BDNF szintek kiváltására a hippocampusban, a ventrális tegmentális areában és nukleusz akkumbenszben. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy a major depresszív zavarral küzdő betegekben megfigyelt anatómiai változások a fejlődés során megkezdődnek, amelyekben a P2X7R aktivitásnak fontos szerepe lehet. Ilyen anatómiai változás például a szürkeállomány térfogatának csökkenése az emocionális szabályozásért felelős agyrégiókban. Szkizofréniában szenvedő betegekben csökkent szürkeállomány térfogatot és agykamra növekedést figyeltek meg, amely patofiziológiai következményekhez a P2X7 receptorok hiperaktivitása, és csökkent A2A adenzin receptor aktivitás járulhat hozzá. Továbbá az is lehetséges, hogy a szkizofrénia a cerebrális kéreg fejlődése alatt károsodott sejtmigráció eredménye az agyi sejt szerkezeti és a neuronális migrációban szerepet játszó fehérjék kifejeződési szintjeinek megváltozásának következtében. Mindazonáltal úgy tűnik, hogy számos pszichiátriai zavar idegfejlődésbeli eredettel bír, de további vizsgálatok szükségesek a P2 receptorok funkcióinak feltárására ezekben a betegségekben⁷¹.

Főként az adenzin receptorok érintettségével foglalkozó kutatásokat végeztek, ezzel megalapozva a szkizofrénia újabban leírt, adenzin hipotézisét¹⁰⁸. A közelmúltban

már viszont a P2 receptorok érintettségét is vizsgálják pszichiátriai kórképekben. Az általunk is vizsgált P2X7 receptorok szerepének tanulmányozását a szkizofrénia patomechanizmusával kapcsolatban a mi kutatócsoportunk publikációján kívül egy tanulmány jelent meg, amelyben a P2X7 receptorok⁸⁴ és pannexin-1 csatornák¹⁰⁹ részvételére hívják fel a figyelmet a betegség molekuláris szintű hátterében^{81,110}. Ugyanakkor valószínűsíthető a P2X7 receptorok memória kontrollban betöltött szerepe, amely tovább erősítheti a P2X7 receptorok feltételezett részvételét a szkizofrénia tüneteinek modulálásában⁷¹.

Mindemellett kiemelkedő fontosságú, hogy számos gyógyszerceg foglalkozik P2X7 receptor antagonisták fejlesztésével különböző pszichiátriai betegségek kezelésére irányuló területen. Így például a Janssen gyógyszeripari vállalat által fejlesztett egyes P2X7 receptor antagonisták már klinikai, fázis I. vizsgálatban neuroinflammáció és anhedónia¹¹¹, illetve fázis II. vizsgálatban vannak a depresszió kezelésére, amely perspektívát jelenthet más központi idegrendszeri betegségek indikációjában egyaránt⁷⁵.

A disszertációban bemutatott PCP-indukálta szkizofrénia állatmodellben *in vivo* és *in vitro* kísérletek eredményei igazolják, hogy a purinerg rendszernek, és ezen belül is a P2X7 receptorok mediálta jelátvitelnek szerepe lehet a szkizofrénia patofiziológiájában.

6.1. *In vivo* magatartás vizsgálatok: a P2X7 receptor genetikai deficienciájának és farmakológiai blokádjának hatása a PCP kiváltotta viselkedési változásokra

A PCP, mint NMDA-típusú glutamát receptor antagonistá szkizofrénia-szerű tüneteket produkál az emberekben¹³, használata, mint szkizofrénia-rágcsáló modell széleskörűen elfogadott és alkalmazott¹¹². A PCP által indukált szkizofrénia modell a betegség pozitív és negatív tüneteit egyaránt reprezentálja. E paradigma alapján alkalmazott magatartási vizsgálataink eredményei részben reprodukálódtak egy korábbi tanulmányhoz viszonyítva. Az eltérések oka lehet, hogy a két tanulmányban eltérő egértörzsek kerültek felhasználásra¹¹³. Eredményeink alapján elmondható, hogy egyes vizsgált magatartási paraméterben mind a P2rx7 genetikai deléciója, mind a receptor farmakológiai blokádjá (JNJ-47965567) képes volt befolyásolni a PCP által kiváltott viselkedési mintázatokat. Így például a P2X7 receptorral rendelkező egerek lokomotoros aktivitása kisebb dózisú PCP kezelés hatására növekedett a vehikulummal kezelt

állatokhoz képest, de ez a különbség megszűnt a receptor génkiütésének, illetve az előzetes JNJ-47965567 adás hatására. Hasonló hatás volt megfigyelhető a sztereotip magatartásban. A szociális viselkedési tesztben, a P2X7R farmakológiai gátlása szintén befolyásolta a PCP szociális visszahúzóást okozó hatását, de hasonló összefüggést nem tapasztaltunk a P2rx7 +/- állatokban. Ez feltételezhetően annak köszönhető, hogy a vehikulummal kezelt P2X7 receptor génkiütött állatok szociálisan aktívabbak voltak vad típusú alomtársaikhoz képest. Az ataxia vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy sem a P2X7R genetikai deléciónja, sem annak farmakológiai blokádja nem változtatta meg a PCP kezelések által kiváltott ataxiát. Viselkedési tesztjeink során kapott eredményeinket összehasonlítva egy korábbi tanulmánnyal, a szociális interakció és szociális preferencia magatartási paramétereket tekintve eltérő eredményekről számoltak be egy másik P2X7 receptor antagonistá (JNJ-42253432) használatát követően patkányon végzett kísérletekben¹¹⁴. Ennek a diszkrépanciának lehetséges okai az eltérő kísérleti elrendezés, illetve hogy más fajon végezték a vizsgálatokat. További feltételezhető oka lehet az eltéréseknek, hogy a kétféle P2X7 receptor antagonistának különböző az affinitása a P2rx7 hasítási variánsainak fehérje termékeihez, amely részben felelős lehet az eltérésekért^{115,116}.

6.2. Fenciklidin kezelés hatása a P2X7 receptor által közvetített [³H]glutamát felszabadulásra, illetve P2X7R genetikai deficienciájának, illetve farmakológiai gátlásának hatása az NMDA által indukált áramokra az egér agy prefrontális kérgében

Kutatócsoportunk korábbi tanulmányaiban kimutatta, hogy a P2X7 receptoroknak szabályozó szerepe lehet a glutamát, mint neurotranszmitter felszabadulásában, egérből és patkányból izolált hippokampális agyszeletekben^{73,117,118}. Viszont egér prefrontális kérgi mintákon nem történtek ilyen irányú kísérletek. Eredményeink alapján elmondható, hogy a P2X7 receptor aktiváció hatására fokozódott a GLU felszabadulás mind a PCP-vel, illetve annak vehikulumával kezelt állatok PFC mintáiban. A PCP-t kapott állatokból származó szövetmintákban nagyobb bazális GLU kiáramlást tapasztaltunk, amely bizonyos mértékben csökkent a P2rx7 génkiütés következtében. Mindazonáltal, hogy sértetlen neuron-glia hálózattal rendelkező, akut agyszeletek kerültek felhasználásra

ezáltal nem ismert, hogy a P2X7R mediált GLU felszabadulás neuronális eredetű, vagy szomszédos asztrocita sejtekből származik. Hasonlóan P2X7 receptorok által közvetített megnövekedett GLU felszabadulásról számoltak be patkány agy cerebrokortikális mintáiból neuropátiás állatmodellben¹¹⁹.

Teljes sejt patch-clamp kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a P2X7 receptor genetikai deléciója, továbbá a receptor farmakológiai gátlása hasonlóan képes befolyásolni az NMDA által kiváltott, glutamát receptorokon keresztüli áram amplitúdókat a PFC V. rétegének piramis sejtjeiben. Az NMDA által indukált áramok elsődlegesen a posztszinaptikus glutamát receptorok közvetlen aktiválásának következménye. Eredményeink szerint az feltételezhető, hogy a prefrontokortikális NMDA-típusú glutamát receptorok a P2X7 receptorok szabályozása alatt állhatnak. Ezekben a vizsgálatokban a piramis neuronok nem voltak szinaptikusan izolálva, így annak a megállapítására nem kaptunk választ, hogy pre- vagy posztszinaptikus befolyásolás eredményeként csökken, még ha csekély mértékben is, az NMDA-indukálta, sejtekbe befelé irányuló áram mind a P2X7 receptor genetikai deléciójának, illetve farmakológiai gátlásának következményeként.

6.3. Génexpressziós vizsgálatok: A P2X7 receptor genetikai deléciójának hatása a PCP kiváltotta génkifejeződési változásokra

Génexpressziós kísérleteinkben vizsgált, szkizofrénia patofiziológiájával kapcsolatba hozható gének közül, szignifikánsan nagyobb Grin2b (NR2B) mRNS expressziós szintet mértünk fiatal felnőtt, vad típusú egerek PFC régiójában a PCP kezelés hatására a vehikulummal kezelt állatokhoz képest. Ez az összefüggés kizárólag ebben a korcsoportú állatokban, és agyrégióban volt megfigyelhető kísérleti eredményeink alapján. Hasonló tendenciájú változást már leírtak az irodalomban, akut PCP kezelést követően patkány agy frontális kérgében¹²⁰. Egy korábbi tanulmány humán szkizofrén betegek post mortem temporális kérgi szövetmintáiban NR2B-tartalmú NMDA receptorok felülszabályozódásáról számolt be¹²¹. Emellett állatmagatartás tesztekben arról számoltak be, hogy az NR2B receptor alegység specifikus antagonistái szkizofrénia-szerű tüneteket váltanak ki¹²². Ezek alapján lehetséges, hogy ez az NMDA receptor alegység meghatározó szerepet tölt be a szkizofrénia-szerű tünetek

kialakulásában. Ugyanakkor érdekes módon a P2X7 receptor deficiens egerek PFC mintáiban, a PCP-kezelést követően szignifikánsan kisebb mRNA expressziós szintet detektáltunk a vehikulumot kapott állatokhoz viszonyítva. Emelett alacsonyabb Grin2b génextpressziós szintet mértünk a P2rx7 géniütés hatására a PCP-kezelt állatokban, a vad típusú egerekhez képest. Hasonló génkifejeződési különbségeket tapasztaltunk a Grin2a mRNA expressziós szintjében, fiatal felnőtt állatok PFC régiójában. Eredményeink szerint feltételezhető, hogy a PCP-indukálta változások az említett két NMDA receptor alegység génextpressziós szintjében befolyásolhatóak P2X7 receptorokon keresztül. Az általunk vizsgált metabotróp glutamát receptorok közül az Grm5 (mGluR5) mRNA expressziós szintjére volt hatása a P2rx7 géniütésnek, miszerint a PCP által kifejtett csökkentő tendenciájú befolyást, amit a vad típusú állatok PFC régióiban mértünk, nem tapasztaltunk a P2X7 receptorral nem rendelkező állatokban.

Nagymértékű génkifejeződési szint növekedést mutattunk ki az Nrg1, szkizofréria kandidáns gén mRNA expressziós szintjében, PCP kezelést követően fiatal felnőtt egerek PFC mintáiban. Eredményeink korrelálnak post mortem szkizofrén betegek prefrontális kéreg mintákból kapott protein expressziós adatokkal, neuregulin 1 és annak receptorának, az ErbB4 receptornak emelkedett fehérje kifejeződéséről számoltak be¹⁴. Ezzel ellentétben, a P2X7 receptor géniütött állatokban nem volt kimutatható mRNA expressziós szintbeli különbség a PCP és annak vehikulumával kezelt egerek között, amely felhívja a figyelmet, a P2X7 receptor szerepére a neuregulin 1 szignalizációban, amely kapcsolatban állhat a glutamáterg transzmisszióval egyaránt¹²³. Mindemellett az NMDA receptorok NR2 alegységeinek és az ErbB4 receptor posztszinaptikus denzitás fehérjéin keresztüli kapcsolatáról számoltak be. Az NMDA receptor és NRG1 között reciprok kapcsolatot feltételeznek, ezért az NMDA receptoron keresztüli jelátvitelben bekövetkező diszfunkció hatással lehet az NRG1 közvetítette szignalizációra¹²⁴.

Az általunk vizsgált GABA_A receptor alegységek közül a GABA_A receptor α 1 mRNA expressziójában PCP kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb szintet detektáltunk a vehikulummal kezelt állatokhoz képest a P2X7 receptorral rendelkező egerekben. Eredményeinkkel összhangban patkány egyes kortikális régióiban, illetve hippocampusában hasonló tendenciájú változást mutattak ki a GABA_A receptor α 1 alegység génextpressziós szintjében akut PCP kezelés hatására¹²⁵. Érdekes módon ezzel a megfigyeléssel szemben ez az expressziós szintbeli különbség eltűnt a P2X7 receptor

génkiütött állatokban. Mindemellett jól korrelál vizsgálati eredményeinkkel, hogy humán szkizofrén post mortem PFC régiójában szelektív csökkenést mutattak ki PV-tartalmú piramis neuronok GABA_A receptor $\alpha 1$ alegység mRNS expressziós szintjében¹²⁶.

Végezetül elmondható, hogy a glutamáterg szignalizációval elletében a PCP indukálta D2 dopamin receptor alulszabályozódás az egér agy PFC régiójában, nem áll a P2X7 receptorok szabályozó hatása alatt.

6.4. Gyulladásos mediátorok fehérje szintjeinek vizsgálata a P2Y₁₂ receptor genetikai delécióját, illetve CFA-kezelést követően

Korábbi kutatások kimutatták, hogy a mikroglia sejteken expresszálódó P2Y₁₂ receptoroknak jelentős szerepük lehet az idegrendszeri gyulladásos folyamatokban¹²⁷. Kutatócsoportunk két publikációban is beszámolt a P2Y₁₂ receptorok gyulladásos és neuropátiás fájdalomban betöltött szerepéről^{104,128}. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a komplett Freund-adjuváns (CFA), gyulladáskeltő vegyület már a kezelést követő 3. napon szignifikáns növekedést váltott ki az általunk vizsgált proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF- α) és kemokin C (KC) szintjeiben az egerek talpmintáiban. A CFA-által kiváltott emelkedés mértéke tovább fokozódott a 14. napon. Ugyanakkor mind a 3. és 14. napon, az IL-1 α , illetve a gyulladásgátló citokin, IL-10 szintje szignifikánsan kisebbnek bizonyult a CFA-kezelt állatokban a vehikulummal kezelt állatokban mértékhez képest. Ezek a gyulladáskeltő citokinek a központi idegrendszerben gyulladásos folyamatokat képesek mediálni, amelyek hozzájárulhatnak nemcsak pszichiátriai rendellenességek kialakulásához, mint például a szkizofrénia¹²⁹, hanem a gyulladásos fájdalom kialakulásában is fontos szerepük van. A P2Y₁₂ receptorok genetikai deléciója szignifikánsan csökkentette a 3. és 14. napon mért TNF- α és KC szinteket, illetve a 14. napon mért IL-1 β , IL-6 szinteket. Ezzel ellentétben az IL-1 α és IL-10 szintjét nem befolyásolta a P2Y₁₂ receptor hiánya a CFA-val kezelt állatokban. Az így kapott eredmények P2Y₁₂ magyarázatot szolgáltatnak a P2Y₁₂ receptor gátlás antihyperalgéziás hatására a CFA által indukált gyulladásos fájdalom krónikus modelljében, illetve alátámasztják a P2Y₁₂ receptorok szerepét, mint lehetséges új fájdalomcsillapító-gyulladásgátló terápiás célpont.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az alkalmazott egér magatartás vizsgálatokban, melynek során P2X7 receptorral rendelkező és P2X7 receptor génkiütött állatokon, továbbá P2X7 receptor szelektív antagonistá JNJ-47965567-vel való kezelést követően teszteltük a fenciklidin által kifejtett hatást. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az általánosan elfogadott szkizofréniás rágszáló modellben fenotípust befolyásoló hatása volt a P2X7 receptor két formájában történő gátlásának egyaránt, amely rámutat arra, hogy ennek a receptornak valamilyen közvetítő szerepe lehet az NMDA receptor gátlás során működő szignalizációs folyamatokban.

Továbbá kísérleteink során a P2X7 receptor hatását vizsgáltuk a prefrontokortikális glutamát felszabadulásra, illetve a receptor genetikai deléciójának és farmakológiai gátlásának hatását tanulmányoztuk az NMDA indukálta ionáramokra. Az így kapott vizsgálati eredményeink tovább erősíthetik azt a feltételezést, miszerint a P2X7 receptor által közvetített jelátviteli mechanizmusok szoros kapcsolatban állhatnak az NMDA receptorokon keresztül működő glutamáterg szignalizációval.

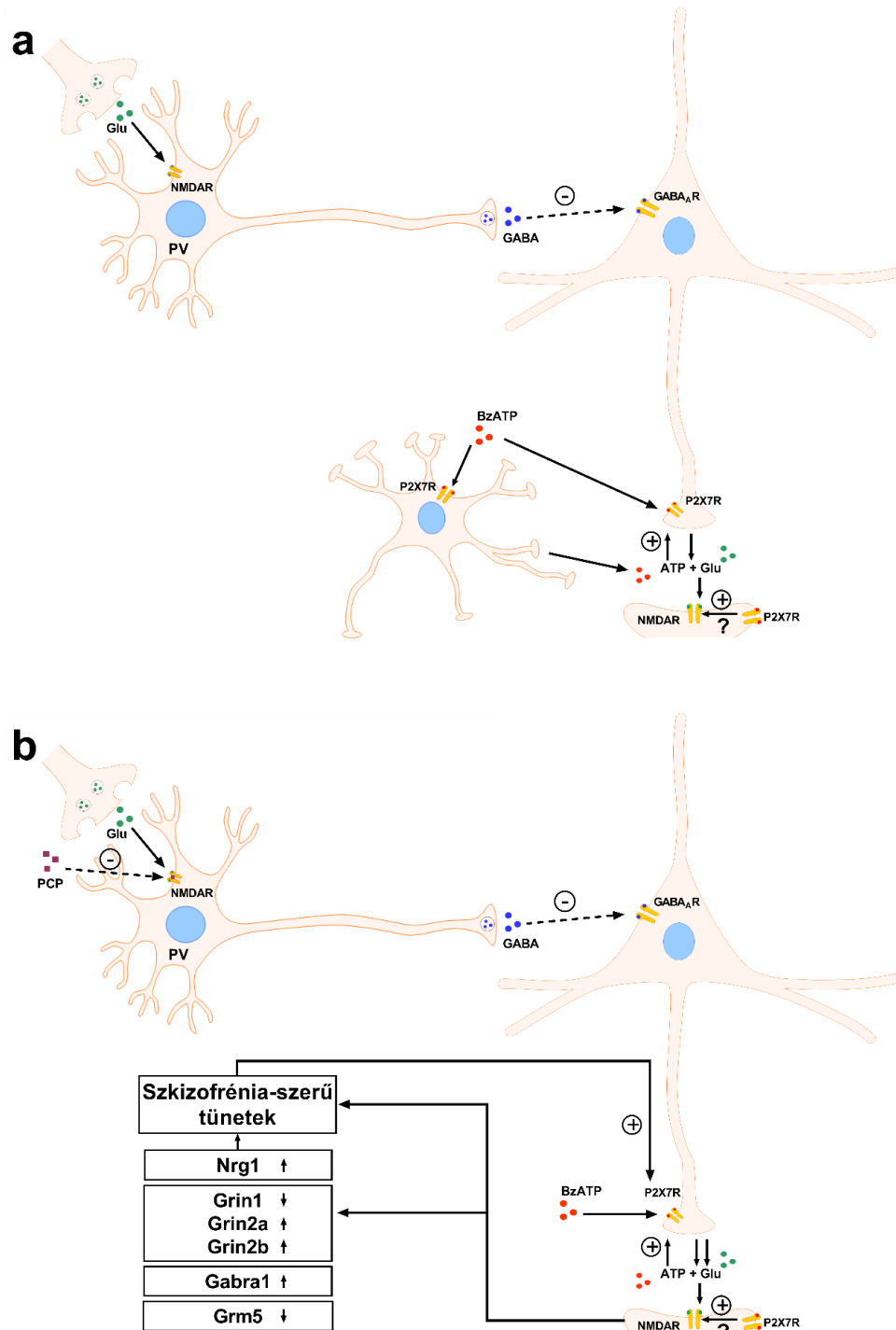
Génexpressziós vizsgálataink során arra a kérdésfeltevésre kerestük a választ, hogy milyen, a feltételezetten szkizofréniá patomechanizmusával kapcsolatban álló, jellemzően neurotranszmissziós folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződési szintjére van hatással a P2X7 receptor genetikai deléciója az előzetesen eltérő kezelést (PCP illetve annak vehikuluma) kapott egerek prefrontális kérgi és hippocampális régióiban. Eredményeink tükrében arra a következtetésre jutottunk, hogy a P2X7 receptoroknak kulcsszerepük lehet a PCP által közvetlenül befolyásolt, egyes NMDA receptor alegységek mRNS szintű expressziójában, így az NMDA receptorok által mediált glutamát neurotranszmisszóban. Továbbá a metabotróp glutamát receptor, mGluR5 mRNS expressziójában tapasztalt, P2X7 receptor megléte illetve hiánya által befolyásolt génkifejeződési szintek arra mutathatnak rá, hogy ezen a receptoron keresztüli glutamát szignalizációra is hatása van a P2X7 receptornak. Korábban kimutatták, hogy az mGluR5 receptor nagymértékben expresszálódik a cortex piramis sejtjeinek és interneuronok posztszinaptikus oldalán, ugyanakkor beszámoltak már lehetséges preszinaptikus megjelenéséről is. Továbbá azt feltételezik, hogy különböző posztszinaptikus állványfehérjéken keresztül kapcsolatban állnak a posztszinaptikusan

elhelyezkedő NMDA-típusú glutamát receptorokkal¹³⁰. Hasonló irányultságú mRNS expresszióbeli eltéréseket mutattunk a GABA_A receptor $\alpha 1$ alegység génkifejeződési szintjében. Eszerint a P2X7 receptor közvetett módon hatással lehet a GABAerg neurotranszmisszióra egyaránt. Mindemellett a neuregulin 1 fehérjét kódoló gén, amelyet a szkizofrénia egyik kandidáns génjének tekintenek, az Nrg1 mRNS expressziós szintjére is hatással volt a P2X7 receptor genetikai deléciója. A neuregulin 1-ről ismert, hogy számos agyi régióban tölt be neurotranszmissziót és szinaptikus plaszticitást szabályozó szerepet. Továbbá a neuregulin 1 receptorának, az ErbB4-nek kimutatták a lokalizációját glutamaterg szinapszisok posztzinaptikus denzitásánál, illetve GABA-erg neuronok preszinaptikus terminálsaiban, amelyen keresztül a neuregulin 1 fokozza a depolarizációfüggő GABA felszabadulást¹³¹.

Eredményeink tükrében arra a hipotézisre jutottunk miszerint a P2X7 receptorok aktivációja fokozhatja a prefrontális kéregben a glutamát felszabadulást, amely idegi terminális vagy asztrocita eredetű is lehet. A glutamát felszabadulása, illetve az NMDA receptor-mediált áram csökkent a P2X7 receptor hiányában vagy farmakológiai gátlása során. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a posztzinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorokra közvetett vagy közvetlen hatása van P2X7 receptoroknak (20a. ábra). További hipotézisünk, hogy az NMDA receptor antagonistá fenciklidin (PCP), a PV-tartalmú, prefrontokortikális piramis neuronokhoz projíciáló GABAerg neuronokon keresztül fejtik ki hatásukat, fokozott glutamát felszabadulást eredményezve (20b. ábra). A viselkedésbeli változásokkal párhuzamosan, az előbbieken említett mRNS expressziós szintű változások a P2X7 receptorok alulszabályozó hatása alatt állhatnak. Ezzel ellentétben a BzATP-indukálta glutamát kiáramlás növekedés (14a. ábra) eredménye alapján, a PCP kezelés felülszabályozza és fokozza a P2X7 receptorok funkcionális válaszkészségét (20. ábra)⁶³.

Vizsgálataink során bemutattuk, hogy a P2Y₁₂ receptorok hiánya befolyással van bizonyos proinflammatorikus citokinek szintjeire, amelyek kiemelkedő fontosságúak lehetnek idegrendszeri gyulladási folyamatok hátterében. A P2Y₁₂ receptorok szerepét számos kutatócsoport vizsgálta neuropátiás és gyulladási fájdalom modellekben, továbbá figyelemre méltó lehet a P2Y₁₂ receptor, mint terápiás célpont akut, neuropátiás illetve gyulladási fájdalomban^{104,132,133,134}. A P2Y₁₂ receptorok neuropszichiátriai betegségekkel való kapcsolatát nem vizsgálták napjainkig a szakirodalomban,

ugyanakkor, mint lehetséges mikroglia biomarker említésre került¹³⁵. Mindemellett a neuroinflammációs folyamatok és a szkizofrénia kapcsolatának tanulmányozása során érdekes lehet a P2Y₁₂ receptorok esetleges szerepének vizsgálata.



20. ábra: Hipotézis a P2X7 receptorok feltételezett kapcsolatára az NMDA receptorok szabályozásával⁶³.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A szkizofrénia egy súlyos, krónikus pszichiátriai betegség, melynek gyógyszeres terápiája napjainkban sem kellőképpen megoldott. Az extrapiramidális mellékhatások kiküszöbölésére nagy jelentőséggel bírnak az új targetek azonosítását célzó kutatások²³. A purinerg neurotranszmisszió és ezen belül is kiemelten a P2X7 receptorok szerepét számos neurodegeneratív kórkép patomechanizmusának feltárására irányuló kísérletekben vizsgálták¹¹⁰, ugyanakkor kevés tanulmány foglalkozik a P2X7 receptor lehetséges szerepével a szkizofrénia molekuláris hátterének vizsgálataiban. Fenciklidin (PCP), mint N-metil D-aszpartát (NMDA)-típusú glutamát receptor antagonistá által indukált szkizofrénia állatmodellben vizsgáltuk a P2X7 receptorok szerepét. A PCP által kiváltott egyes magatartásbeli változásokat a P2X7 receptor genetikai deléciója visszafordította, melyet részben reprodukálta a P2X7 receptor szelektív antagonistával (JNJ-47965567) történő farmakológiai gátlása. Fiatal felnőtt egerek prefrontális kéreg (PFC) akut szövetmintáiban a PCP kezelés fokozta a P2X7 receptor aktiválását követő glutamát felszabadulást. A PFC V. rétegének piramis neuronjaiban mind a P2rx7 gén kiütése, mind pedig a P2X7 receptor farmakológia blokája ugyan csekély mértékben is, de csökkentette az NMDA által kiváltott áramok amplitúdóját. A P2X7 receptor genetikai deléciója hatással volt a PCP kezelés által kiváltott, a szkizofrénia patofiziológiájával kapcsolatba hozható egyes gének mRNS expressziós szintű változására az egér agy PFC régiójában. Mindezek alapján a P2X7 receptor, mint új, potenciális gyógyszer-célpont figyelemre méltó lehet a szkizofrénia terápiás kezelésére használt gyógyszerek fejlesztése céljából. Számos neuropszichiátriai rendellenesség hátterében idegrendszeri gyulladási folyamatok is állhatnak. A purinerg receptorok közül a P2Y₁₂ receptorok feltételezett szerepét egyes tanulmányok kiemelik krónikus gyulladási és neuropátiás fájdalommal egyaránt, mint potenciális gyógyszer-célpont azok kezelésében^{104,128}. Eredményeink alapján a P2Y₁₂ receptoroknak szerepe lehet a gyulladáskeltő mediátorok felszabadulásának szabályozásában. Ezidáig nem foglalkoztak a P2Y₁₂ receptorok lehetséges szerepével neuropszichiátriai betegségek hátterét kutató tanulmányok. Ennek ellenére a jövőben érdemes lehet a neuroinflammációs és a szkizofrénia molekuláris hátterében álló folyamatok kapcsolatának tanulmányozása során vizsgálni a P2Y₁₂ receptorok esetleges érintettségét egyaránt.

9. SUMMARY

The schizophrenia is a severe, chronic psychiatric disorder whose medical therapy has not been solved perfectly. Most of the antipsychotic drugs have extrapyramidal adverse effects. Studies have great importance to find new targets for the treatment of schizophrenia, with much less extrapyramidal side effects²³. The act of the purinergic neurotransmitter system, especially P2X7 receptors (P2X7R) was researched in numerous studies of neurodegenerative disorders¹¹⁰, but only a few studies investigated the potential role of P2X7R in the exploration of the molecular background of schizophrenia. In our laboratory the role of P2X7R was investigated in the animal model of schizophrenia induced by phencyclidine (PCP), as an ionotropic N-Methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptor antagonist. Each PCP mediated behavioral alteration was reversed by genetic deletion of the P2XR, which was reproduced partially by the selective antagonism (JNJ-47965567) of the receptor. Interestingly, the PCP treatment increased the glutamate release followed by P2X7R activation from acute prefrontocortical (PFC) slices of the mouse brain. From the PFC layer V pyramidal neurons the rate of NMDA-mediated currents were reduced a bit by genetic deficiency of P2X7R and by the pharmacological inhibition as well. The genetic deletion of P2X7R effected on the PCP treatment caused alterations in each mRNA expression level of genes are associated with the pathophysiology of schizophrenia in the PFC region of mice. Based on our results the P2X7 receptor, as a new, potential therapeutic target can be remarkable to drug development for the medication of schizophrenia. In addition, inflammatory processes may also underlie several neuropsychiatric diseases. Among purinergic receptors, the role of P2Y₁₂ receptors was highlighted as a possible target in the treatment of chronic inflammatory and neuropathic pain^{104,128}. According to our results, P2Y₁₂ receptors may have importance in the regulation of the release of proinflammatory mediators. So far, the potential role of P2Y₁₂ receptors has not been studied in the background of neuropsychiatric disorders. Nonetheless, it would be worthwhile to investigate the potential involvement of P2Y₁₂ receptors in neuroinflammatory processes underlying pathophysiology of schizophrenia.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., O'Donovan, M., Correll, C. U., Kane, J. M., van Os, J. and Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1: 15067.
2. Rethelyi, J. (2011). A szkizofrénia diagnózisa Bleulertől a DSM-V-ig. *Neuropsychopharmacol. Hungarica* 13: 193–203.
3. Lieberman, J. A. (1999). Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biological Psychiatry* 46: 729–739.
4. Tandon, R., Gaebel, W., Barch, D. M., Bustillo, J., Gur, R. E., Heckers, S., Malaspina, D., Owen, M. J., Schultz, S., Tsuang, M., Van Os, J. and Carpenter, W. (2013). Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophrenia Research* 150: 3–10.
5. Gaebel, W. (2012). Status of psychotic disorders in ICD-11. *Schizophrenia Bulletin* 38: 895–898.
6. Lewis, D. and Lieberman, J. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325–334.
7. Tamminga, C. A. and Holcomb, H. H. (2005). Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry* 10: 27–39.
8. Keshavan, M. S., Gilbert, A. R. and Diwadkar, V. A. Neurodevelopmentális elméletek. In: Lieberman, J. A. (szerk.), *The American Psychiatric Publishing: A szkizofrénia tankönyve*. American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, 2006: 69–83.
9. Schwartz, T. L., Sachdeva, S. and Stahl, S. M. (2012). Glutamate neurocircuitry: Theoretical underpinnings in: *Schizophrenia*. *Front. Pharmacol.* 3: 195.
10. Howes, O., McCutcheon, R. and Stone, J. (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. *J. Psychopharmacol.* 29: 97–115.
11. Stahl, S. M. (2007). Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS Spectrums* 12: 265–268.
12. Olaya, J. C., Heusner, C. L., Matsumoto, M., Sinclair, D., Kondo, M. A., Karl, T. and Shannon Weickert, C. (2017). Overexpression of Neuregulin 1 Type III Confers Hippocampal mRNA Alterations and Schizophrenia-Like Behaviors in Mice. *Schizophr. Bull.* 44: 865–875.
13. Geddes, A. E., Huang, X. F. and Newell, K. A. (2011). Reciprocal signalling between NR2 subunits of the NMDA receptor and neuregulin1 and their role in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35: 896–904.

14. Chong, V. Z., Thompson, M., Beltaifa, S., Webster, M. J., Law, A. J. and Weickert, C. S. (2008). Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 100: 270–280.
15. Williams, H. J., Owen, M. J. and O'Donovan, M. C. (2007). Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin* 33: 635–641.
16. Jones, C. A., Watson, D. J. G. and Fone, K. C. F. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164: 1162–1194.
17. Steeds, H., Carhart-Harris, R. L. and Stone, J. M. (2015). Drug models of schizophrenia. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 5: 43–58.
18. Bramness, J. G., Gundersen, Ø. H., Guterstam, J., Rognli, E. B., Konstenius, M., Løberg, E. M., Medhus, S., Tanum, L. and Franck, J. (2012). Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry* 12: 221.
19. Farren, C. K., Hameedi, F. A., Rosen, M. A., Woods, S., Jatlow, P. and Kosten, T. R. (2000). Significant interaction between clozapine and cocaine in cocaine addicts. *Drug Alcohol Depend.* 59: 153–163.
20. Tseng, K. Y., Chambers, R. A. and Lipska, B. K. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 204: 295–305.
21. Garnock-Jones, K. P. (2017). Cariprazine: A Review in Schizophrenia. *CNS Drugs* 31: 513–525.
22. Neill, J. C., Grayson, B., Kiss, B., Gyertyán, I., Ferguson, P. and Adham, N. (2016). Effects of cariprazine, a novel antipsychotic, on cognitive deficit and negative symptoms in a rodent model of schizophrenia symptomatology. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26: 3–14.
23. Tímár, J. A központi idegrendszer gyógyszerterana (Antipszichotikumok). In: Gyires, K., Fürst, Z., Ferdinándy, P., Pintér, E., Szilvássy, Z. & Varró, A. (szerk.), *Farmakológia és klinikai farmakológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2017: 447–455.
24. Mandl, J. Bioenergetika. Energiatermelés és –raktározás az anyagcsere során. In: Ádám, V., Dux, L., Faragó, A., Fésüs, L., Machovich, R., Mandl, J. & Sümegi, B. (szerk.), *Orvosi biokémia*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002: 55–91.
25. Ádám, V. and Faragó, A. Plazmamembrán-receptorok és jelátviteli mechanizmusok. In: Ádám, V., Dux, L., Faragó, A., Fésüs, L., Machovich, R., Mandl, J. & Sümegi, B. (szerk.), *Orvosi biokémia*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002: 449–486.
26. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40: 668–688.

27. Burnstock, G. (1971). Neural Nomenclature. *Nature* 229: 22.
28. Ádám, V. A kémiai ingerült átvitel (neurotranszmisszió) molekuláris alapjai. In: In: Ádám, V., Dux, L., Faragó, A., Fésüs, L., Machovich, R., Mandl, J. & Sümegi, B. (szerk.), *Orvosi biokémia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002: 525–547.*
29. Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 575–590.
30. Bodin, P. and Burnstock, G. (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* 26: 959–969.
31. Schwiebert, E. M. (2000). Extracellular ATP-mediated propagation of Ca²⁺waves. Focus on “Mechanical strain-induced Ca²⁺ waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation”. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 279: C281-283.
32. Lane, J. R., Jaakola, V. P. and IJzerman, A. P. (2011). The Structure of the Adenosine Receptors. Implications for Drug Discovery. *Advances in Pharmacology* 61: 1–40.
33. Burnstock, G. and Kennedy, C. (2011). P2X Receptors in Health and Disease. *Adv. Pharmacol.* 61: 333–372.
34. Khakh, B. S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 165–174.
35. North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013–1067.
36. Saul, A., Hausmann, R., Kless, A. and Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front. Cell. Neurosci.* 7: 250.
37. Khakh, B. S. and North, R. A. (2012). Neuromodulation by Extracellular ATP and P2X Receptors in the CNS. *Neuron* 76: 51–69.
38. Evans, R. J. (2009). Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. *European Biophysics Journal* 38: 319–327.
39. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. (1972). International Union of Biochemistry a One-Letter Notation for Amino Acid Sequences (Definitive Rules) a One-Letter Notation for Amino Acid. *Pure Appl. Chem.* 31: 639–646.
40. Zemková, H., Balík, A., Jindrichová, M. and Vávra, V. (2008). Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary. *Physiol. Res.* 57: S23-38.
41. North, R. A. (2016). P2X receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 371:
42. Köles, L., Leichsenring, A., Rubini, P. and Illes, P. (2011). P2 Receptor Signaling in Neurons and Glial Cells of the Central Nervous System. *Adv. Pharmacol.* 61:

441–493.

43. Dunn, P. M., Zhong, Y. and Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Progress in Neurobiology* 65: 107–134.
44. Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659–797.
45. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32: 19–29.
46. Robertson, S. J., Ennion, S. J., Evans, R. J. and Edwards, F. A. (2001). Synaptic P2X receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 378–386.
47. Sokolova, E., Nistri, A. and Giniatullin, R. (2018). Negative Cross Talk between Anionic GABA A and Cationic P2X Ionotropic Receptors of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurosci.* 21: 4958–4968.
48. Newman, E. A. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* 23: 1659–1666.
49. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A. and Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 281–341.
50. Beamer, E., Göllöncsér, F., Horváth, G., Beko, K., Otrókocsi, L., Koványi, B. and Sperlágh, B. (2016). Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 104: 94–104.
51. Buisman, H. P., Steinberg, T. H., Fischbarg, J., Silverstein, S. C., Vogelzang, S. a, Ince, C., Ypey, D. L. and Leijh, P. C. (1988). Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7988–7992.
52. Di Virgilio, F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today* 16: 524–528.
53. Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. and Illes, P. (2006). P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 78: 327–346.
54. Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2008). ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J.* 22: 861–9.
55. Nicke, A. (2008). Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 803–808.
56. Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. and Murrell-Lagnado, R. D. (2007). Evidence

- for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* 72: 1447–1456.
57. Karasawa, A. and Kawate, T. (2016). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* 5: e22153.
 58. Sperlagh, B. and Illes, P. (2014). P2X7 receptor: An emerging target in central nervous system diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 35: 537–547.
 59. Browne, L. E., Compan, V., Bragg, L. and North, R. A. (2013). P2X7 Receptor Channels Allow Direct Permeation of Nanometer-Sized Dyes. *J. Neurosci.* 33: 3557–3566.
 60. Tewari, M. and Seth, P. (2015). Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing Research Reviews* 24: 328–342.
 61. North, R. a and Surprenant, a. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 563–580.
 62. Bartlett, R., Stokes, L. and Sluyter, R. (2014). The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol. Rev.* 66: 638–675.
 63. Koványi, B., Csölle, C., Calovi, S., Hanuska, A., Kató, E., Köles, L., Bhattacharya, A., Haller, J. and Sperlágh, B. (2016). The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. *Sci. Rep.* 6: 36680.
 64. Bhattacharya, A., Wang, Q., Ao, H., Shoblock, J. R., Lord, B., Aluisio, L., Fraser, I., Nepomuceno, D., Neff, R. A., Welty, N., Lovenberg, T. W., Bonaventure, P., Wickenden, A. D. and Letavic, M. A. (2013). Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br. J. Pharmacol.* 170: 624–640.
 65. Marcoli, M., Cervetto, C., Paluzzi, P., Guarnieri, S., Alloisio, S., Thellung, S., Nobile, M. and Maura, G. (2008). P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: A role in ATP-induced glutamate release. *J. Neurochem.* 105: 2330–2342.
 66. D’Amico, M., Samengo, I., Navarra, P., Tagliatela, M. and Martire, M. (2010). AMPA- and P2X7-receptor-mediated facilitation of [3H]d-aspartate release from nerve terminals isolated from the rat caudal brainstem. *Neurochem. Int.* 57: 623–628.
 67. Gandelman, M., Levy, M., Cassina, P., Barbeito, L. and Beckman, J. S. (2013). P2X7 receptor-induced death of motor neurons by a peroxynitrite/FAS- dependent pathway. *J. Neurochem.* 126: 382–388.
 68. Nishida, K., Nakatani, T., Ohishi, A., Okuda, H., Higashi, Y., Matsuo, T., Fujimoto, S. and Nagasawa, K. (2012). Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death. *J. Neurochem.* 122: 1118–1128.
 69. Oliveira, J. F., Riedel, T., Leichsenring, A., Heine, C., Franke, H., Krügel, U.,

- Nörenberg, W. and Illes, P. (2011). Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X7 receptors sensing pathologically high ATP concentrations. *Cereb. Cortex* 21: 806–820.
70. Nörenberg, W., Schunk, J., Fischer, W., Sobottka, H., Riedel, T., Oliveira, J., Franke, H. and Illes, P. (2010). Electrophysiological classification of P2X7 receptors in rat cultured neocortical astroglia. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1941–1952.
 71. Cheffer, A., Castillo, A. R. G., Corrêa-Velloso, J., Gonçalves, M. C. B., Naaldijk, Y., Nascimento, I. C., Burnstock, G. and Ulrich, H. (2018). Purinergic system in psychiatric diseases. *Molecular Psychiatry* 23: 94–106.
 72. Fellin, T., Pozzan, T. and Carmignoto, G. (2006). Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 281: 4274–4284.
 73. Csölle, C., Baranyi, M., Zsilla, G., Kittel, A., Gölöncsér, F., Illes, P., Papp, E., Vizi, E. S. and Sperlág, B. (2013). Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One* 8: e66547.
 74. Sperlág, B., Köfalvi, A., Deuchars, J., Atkinson, L., Milligan, C., Buckley, N. and Vizi, E. (2002). Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 81: 1196–1211.
 75. Bhattacharya, A. (2018). Recent advances in CNS P2X7 physiology and pharmacology: Focus on neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Pharmacology* 9: 30.
 76. Castrén, E. and Kojima, M. (2017). Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology of Disease* 97: 119–126.
 77. Munoz, F. M., Gao, R., Tian, Y., Henstenburg, B. A., Barrett, J. E. and Hu, H. (2017). Neuronal P2X7 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in mice. *Sci. Rep.* 7: 3539.
 78. Rigato, C., Swinnen, N., Buckinx, R., Coullin, I., Mangin, J. M., Rigo, J. M., Legendre, P. and Le Corronc, H. (2012). Microglia Proliferation Is Controlled by P2X7 Receptors in a Pannexin-1-Independent Manner during Early Embryonic Spinal Cord Invasion. *J. Neurosci.* 32: 11559–11573.
 79. Adinolfi, E., Callegari, M. G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M. R., Pinton, P., Rizzuto, R. and Di Virgilio, F. (2005). Basal Activation of the P2X7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-independent Growth. *Mol. Biol. Cell* 16: 3260–3272.
 80. Rajbhandari, L., Tegenge, M. A., Shrestha, S., Ganesh Kumar, N., Malik, A., Mithal, A., Hosmane, S. and Venkatesan, A. (2014). Toll-like receptor 4 deficiency impairs microglial phagocytosis of degenerating axons. *Glia* 62: 1982–1991.

81. Krügel, U. (2016). Purinergic receptors in psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 104: 212–225.
82. Möller, H. J. (2003). Bipolar disorder and schizophrenia: Distinct illnesses or a continuum? *J. Clin. Psychiatry* 64: 23–27.
83. Kuswanto, C. N., Sum, M. Y. and Sim, K. (2013). Neurocognitive functioning in schizophrenia and bipolar disorder: Clarifying concepts of diagnostic dichotomy vs. continuum. *Front. Psychiatry* 4: 162.
84. Hansen, T., Jakobsen, K. D., Fenger, M., Nielsen, J., Krane, K., Fink-Jensen, A., Lublin, H., Ullum, H., Timm, S., Wang, A. G., Jørgensen, N. R. and Werge, T. (2008). Variation in the purinergic P2RX7 receptor gene and schizophrenia. *Schizophr. Res.* 104: 146–152.
85. Halmai, Z., Dome, P., Vereczkei, A., Abdul-Rahman, O., Szekely, A., Gonda, X., Faludi, G., Sasvari-Szekely, M. and Nemoda, Z. (2013). Associations between depression severity and purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms. *J. Affect. Disord.* 150: 104–109.
86. Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., Surprenant, A. and Jiang, L. H. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J. Psychiatr. Res.* 44: 347–355.
87. Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H. G. and Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: Elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J. Psychiatr. Res.* 42: 151–157.
88. Kim, Y. K., Paik, J. W., Lee, S. W., Yoon, D., Han, C. and Lee, B. H. (2006). Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 30: 1091–1096.
89. Skaper, S. D., Debetto, P. and Giusti, P. (2010). The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24: 337–345.
90. Lindberg, D., Shan, D., Ayers-Ringler, J., Oliveros, A., Benitez, J., Prieto, M., McCullumsmith, R. and Choi, D. S. (2015). Purinergic signaling and energy homeostasis in psychiatric disorders. *Curr. Mol. Med.* 15: 275–95.
91. Hempel, C., Nörenberg, W., Sobottka, H., Urban, N., Nicke, A., Fischer, W. and Schaefer, M. (2013). The phenothiazine-class antipsychotic drugs prochlorperazine and trifluoperazine are potent allosteric modulators of the human P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 75: 365–379.
92. Papp, L., Vizi, E. S. and Sperlágh, B. (2007). P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 568–574.
93. Papp, L., Vizi, E. S. and Sperlágh, B. (2004). Lack of ATP-evoked GABA and

- glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor^{-/-} mice. *Neuroreport* 15: 2387–2391.
94. Ficker, C., Rozmer, K., Kató, E., Andó, R. D., Schumann, L., Krügel, U., Franke, H., Sperlágh, B., Riedel, T. and Illes, P. (2014). Astrocyte-neuron interaction in the substantia gelatinosa of the spinal cord dorsal horn via P2X7 receptor-mediated release of glutamate and reactive oxygen species. *Glia* 62: 1671–1686.
 95. Rial, D., Lara, D. R. and Cunha, R. A. (2014). The adenosine neuromodulation system in schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 119: 395–449.
 96. Abbracchio, M. P. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 281–341.
 97. Cattaneo, M. (2011). The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: Congenital and drug-induced defects. *Blood* 117: 2102–2112.
 98. Lurie, D. I. (2018). An integrative approach to neuroinflammation in psychiatric disorders and neuropathic pain. *J. Exp. Neurosci.* 12: 1179069518793639.
 99. Salter, M. W. and Pitcher, G. M. (2012). Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: A common link in chronic pain and schizophrenia. *FEBS J.* 279: 2–11.
 100. Chiechio, S. and Nicoletti, F. (2012). Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12: 28–34.
 101. Maloku, E., Covelo, I. R., Hanbauer, I., Guidotti, A., Kadriu, B., Hu, Q., Davis, J. M. and Costa, E. (2010). Lower number of cerebellar Purkinje neurons in psychosis is associated with reduced reelin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 4407–4411.
 102. Hervás, C., Pérez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2003). Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 73: 384–399.
 103. Bekő, K., Koványi, B., Göllöncsér, F., Horváth, G., Dénes, Környei, Z., Botz, B., Helyes, Z., Müller, C. E. and Sperlágh, B. (2017). Contribution of platelet P2Y₁₂ receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J. Thromb. Haemost.* 15: 1223–1235.
 104. Horváth, G., Göllöncsér, F., Csölle, C., Király, K., Andó, R. D., Baranyi, M., Koványi, B., Máté, Z., Hoffmann, K., Algaier, I., Baqi, Y., Müller, C. E., Von Kügelgen, I. and Sperlágh, B. (2014). Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol. Dis.* 70: 162–178.
 105. Sams-Dodd, F. (1995). Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *J. Neurosci. Methods* 59: 157–167.

106. Sams-Dodd, F. (1998). Effects of diazepam, citalopram, methadone and naloxone on PCP-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 287–293.
107. Csölle, C., Andó, R. D., Kittel, Á., Gölöncsér, F., Baranyi, M., Soproni, K., Zelena, D., Haller, J., Németh, T., Mócsai, A. and 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: 213–33.
108. Hirota, T. and Kishi, T. (2013). Adenosine hypothesis in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial of adjuvant purinergic modulators. *Schizophr. Res.* 149: 88–95.
109. Avendano, B. C., Montero, T. D., Chavez, C. E., Rommy, V. B. and Orellana, J. A. (2015). Prenatal Exposure to Inflammatory Conditions Increases Cx43 and Panx1 Unopposed Channel Opening and Activation of Astrocytes in the Offspring Effect on Neuronal Survival. *Glia* 63: 2058–2072.
110. Burnstock, G. (2017). Purinergic Signalling and Neurological Diseases: An Update. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 16: 257–265.
111. Bhattacharya, A., Lord, B., Grigoleit, J. S., He, Y., Fraser, I., Campbell, S. N., Taylor, N., Aluisio, L., O'Connor, J. C., Papp, M., Chrovian, C., Carruthers, N., Lovenberg, T. W. and Letavic, M. A. (2018). Neuropsychopharmacology of JNJ-55308942: evaluation of a clinical candidate targeting P2X7 ion channels in animal models of neuroinflammation and anhedonia. *Neuropsychopharmacology* 43: 2586–2596.
112. Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T. and Nabeshima, T. (2007). Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochemistry International* 51: 173–184.
113. Haller, J., Szirmai, M., Varga, B., Ledent, C. and Freund, T. F. (2005). Cannabinoid CB1 receptor dependent effects of the NMDA antagonist phencyclidine in the social withdrawal model of schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 16: 415–422.
114. Lord, B., Aluisio, L., Shoblock, J. R., Neff, R. A., Varlinskaya, E. I., Ceusters, M., Lovenberg, T. W., Carruthers, N., Bonaventure, P., Letavic, M. A., Deak, T., Drinkenburg, W. and Bhattacharya, A. (2014). Pharmacology of a Novel Central Nervous System-Penetrant P2X7 Antagonist JNJ-42253432. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351: 628–641.
115. Nicke, A., Kuan, Y. H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Górecki, D. C., Murrell-Lagnado, R. D. and Soto, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 284: 25813–25822.
116. Masin, M., Young, C., Lim, K., Barnes, S. J., Xu, X. J., Marschall, V., Brutkowski,

- W., Mooney, E. R., Gorecki, D. C. and Murrell-Lagnado, R. (2012). Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: Re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br. J. Pharmacol.* 165: 978–993.
117. Papp, L., Vizi, E. S. and Sperlagh, B. (2004). Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor^{-/-} mice. *Neuroreport* 15: 2387–91.
 118. Sperlagh, B., Kofalvi, A., Deuchars, J., Atkinson, L., Milligan, C. J., Buckley, N. J. and Vizi, E. S. (2002). Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem* 81: 1196–1211.
 119. Mannelli, L., Marcoli, M., Micheli, L., Zanardelli, M., Maura, G., Ghelardini, C. and Cervetto, C. (2015). Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin 1. *Neuropharmacology* 97: 133–141.
 120. Anastasio, N. C. and Johnson, K. M. (2008). Differential regulation of the NMDA receptor by acute and sub-chronic phencyclidine administration in the developing rat. *J. Neurochem.* 104: 1210–1218.
 121. Grimwood, S., Slater, P., Deakin, J. F. W. and Hutson, P. H. (1999). NR2B-containing NMDA receptors are upregulated in temporal cortex in schizophrenia. *Neuroreport* 10: 461–465.
 122. Chaperon, F., Muller, W., Auberson, Y. P., Tricklebank, M. D., Neijt, H. C., Muller, W., Auberson, Y. P., Tricklebank, M. D. and Neijt, H. C. (2003). Substitution for PCP, disruption of prepulse inhibition and hyperactivity induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: preferential involvement of the NR2B rather than NR2A subunit. *Behav Pharmacol* 14: 477–487.
 123. Banerjee, A., MacDonald, M. L., Borgmann-Winter, K. E. and Hahn, C. G. (2010). Neuregulin 1-erbB4 pathway in schizophrenia: From genes to an interactome. *Brain Res. Bull.* 83: 132–139.
 124. Geddes, A. E., Huang, X. F. and Newell, K. A. (2011). Reciprocal signalling between NR2 subunits of the NMDA receptor and neuregulin1 and their role in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35: 896–904.
 125. Abe, S., Suzuki, T., Ito, T., Baba, a, Hori, T., Kurita, H., Yamaguchi, M. and Shiraishi, H. (2000). Differential expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs and ligand binding sites in rat brain following phencyclidine administration. *Synapse* 38: 51–60.
 126. Lewis, D. A. (2014). Inhibitory neurons in human cortical circuits: Substrate for cognitive dysfunction in schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* 26: 22–26.
 127. Mattei, D. and Notter, T. (2019). Basic Concept of Microglia Biology and Neuroinflammation in Relation to Psychiatry. in doi:10.1007/7854_2018_83

128. Bekő, K., Koványi, B., Gölöncsér, F., Horváth, G., Dénes, Á., Környei, Z., Müller, C. E. and Sperlág, B. (2017). Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J. Thromb. Haemost.* 15: 1223–1235.
129. Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B. and Schwarz, M. J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Front. Neurosci.* 9: 372.
130. Matosin, N. and Newell, K. A. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 in the pathology and treatment of schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37: 256–268.
131. Mei, L. and Xiong, W. C. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 437–452.
132. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008). P2Y12 Receptor Upregulation in Activated Microglia Is a Gateway of p38 Signaling and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* 28: 2892–2902.
133. Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Miyata, H., Ueda, K., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2008). P2Y12 Receptors in Spinal Microglia Are Required for Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* 28: 4949–4956.
134. Andó, R. D., Mész, B., Gyires, K., Illes, P. and Sperlág, B. (2010). A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.* 159: 1106–1117.
135. Mildner, A., Huang, H., Radke, J., Stenzel, W. and Priller, J. (2017). P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65: 375–387.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **Koványi, B.** Csolle C, Calovi S, Hanuska A, Kato E, Koles L, Bhattacharya A, Haller J, Sperlagh B. The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. *Sci. Rep.* 6, 36680 (2016).

IF: 4.259

2. Bekó, K, **Kovanyi B**, Goloncser F, Horvath G, Denes A, Kornyei Z, Botz B, Helyes Z, Muller CE, Sperlagh B. Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J. Thromb. Haemost.* (2017).

IF: 4.899

11.2 Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent publikációk

1. Horváth, G. Goloncser F, Csolle C, Kiraly K, Ando RD, Baranyi M, **Kovanyi B**, Mate Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Muller CE, Von Kugelgen I, Sperlagh B. Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol. Dis.* 70, 162–178 (2014).

IF: 5.078

2. Beamer, E. Goloncser F, Horvath G, Beko K, Otrókoci L, **Kovanyi B**, Sperlagh B. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 104, 94–104 (2016). (Összefoglaló cikk)

IF: 5.012

3. Nagy J, Kobolák J, Berzsenyi S, Ábrahám Z, Avci HX, Bock I, Bekes Z, Hodoscsek B, Chandrasekaran A, Téglási A, Dezső P, **Koványi B**, Vörös ET, Fodor L, Szél T, Németh K, Balázs A, Dinnyés A, Lendvai B, Lévy G, Román V. Altered neurite morphology and cholinergic function of induced pluripotent stem cell-derived neurons from a patient with Kleefstra syndrome and autism. *Transl Psychiatry.* 7(7):e1179 (2017).

IF: 4.691

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Sperlág Beáta professzorasszonynak, hogy lehetővé tette számomra, hogy szakmai irányítása alatt végezhettem el a doktori disszertációhoz kapcsolódó kutatómunkáimat az MTA KOKI, Molekuláris Farmakológia Kutatócsoportjánál.

Szeretnék köszönetet mondani állat magatartás vizsgálatok elkészítéséért Dr. Haller Józsefnek és irányítása alatt dolgozó kollégáknak az MTA KOKI, Magatartásélettan és Stressz Kutatócsoportjában; elektrofiziológiai kísérletek elvégzéséért Dr. Köles Lászlónak és irányítása alatt dolgozó munkatársainak a Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében.

Köszönet illeti a disszertációm munkahelyi bírálatának elkészítéséért Dr. Környei Zsuzsannát az MTA KOKI, Neuroimmunológiai Kutatócsoportjából.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani szakmai segítségükért, az MTA KOKI-Molekuláris Farmakológia Kutatócsoportjában jelenlegi és volt munkatársaimnak: Göloncsér Flórának, Otrókosi Lillának, Baranyi Máriának, Stefano Calovi-nak, Horváth Gergelynek, Bekő Katinkának, Edward Beamer-nek, Csölle Cecéliának.

Köszönöm Anindya Bhattacharya-nak a Janssen Research and Development, LLC vállalattól (Neuroscience TA, San Diego, CA 92121, USA), hogy rendelkezésünkre bocsátotta az általuk fejlesztett P2X7 receptor antagonistát, a JNJ-47965567 vegyületet.

Köszönet illeti Dr. Dezső Pétert a dolgozat szakmai áttekintéséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm segítőkész hozzáállását feleségemnek, illetve támogatását kedves szüleimnek.