

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

Doktori tézisek

Koványi Bence Péter

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlágth 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

1. Bevezetés

A purinerg neurotranszmisszió jelentőségéről számos tanulmány jelent meg, amelyben az ATP, mint idegrendszeri jelátvivő molekula vesz részt. Patofiziológias körülmények között jelentősen megemelkedik az ATP extracelluláris szintje, amely purinerg receptorokon keresztül további szignalizációs folyamatokat aktivál. Az ATP P2X és P2Y purinerg receptorok ligandja, amelyek eltérő szerkezeti és jelátviteli sajátosságokkal rendelkeznek. Ezeket a receptorokat a központi idegrendszer különböző sejtjei egyaránt kifejezik, neuronok, asztrocita és mikroglia sejtek, így aktivációjuknak jelentős szerepe lehet a központi idegrendszerhez köthető kórképekben. Ezen megközelítés alapján a P2X és P2Y receptorok kiemelkedő jelentőséggel bírnak a központi idegrendszert érintő betegségek kezelésére irányuló kutatásokban, mint lehetséges gyógyszer-célpontok. Kutatócsoportunk által két receptor altípus került a figyelem középpontjába. Az egyik a P2Y₁₂ receptor altípus, amely a gyulladásos és neuropátiás fájdalom patomechanizmusában szerepet játszva új terápiás indikációt jelenthet. A másik a P2X₇ receptor, amelyet számos idegrendszeri megbetegedés molekuláris hátterének feltárására irányuló tanulmányban vizsgáltak, mint például a depresszió, epilepszia, Parkinson-kór, ugyanakkor nagyon kevés kutatás irányult szkizofréniában betöltött szerepének tanulmányozására.

A szkizofrénia egy súlyos, krónikus mentális zavar, amelyben a humán populáció mintegy 1%-a szenved. A betegség nem írható le egységes neuropszichiátriai kórképpel, mivel számos tünetegyüttes jellemzi, amely megnehezíti a diagnosztizálását. A betegség azonosítási kritériumait meghatározó irányelveket az Egészségügyi Világszervezet, illetve az Amerikai Pszichiátriai Szövetség által kiadott közlemények tartalmazzák. A szkizofrénia patofiziológiájának kialakulásában heterogén genetikai faktorok, idegfejlődési zavarok és környezeti tényezők is szerepet játszhatnak, amelyek magyarázatot adhatnak arra, hogy a betegség fenotípusa nem egységes. A szkizofrénia patomechanizmusának molekuláris hátterét számos neurotranszmitter rendszer diszfunkciójának hipotéziseivel magyarázzák. Míg korábbi tanulmányok a dopaminerg rendszer lehetséges érintettségéről számolnak be, újabban már úgy vélik a glutamáterg, GABAerg és a purinerg neurotranszmitter rendszerek egyaránt szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. A betegség gyógyszeres kezelése napjainkban sem kielégítő, mivel a leggyakrabban alkalmazott antipszichotikumok számos extrapiramidális

mellékhatással rendelkeznek. Mindezek tükrében kiemelkedő fontosságúak az új gyógyszer célpontok felfedezésére irányuló vizsgálatok a szkizofrénia indikációjában, azzal a céllal, hogy javítsák e betegségben szenvedő emberek életminőségét.

Mindemellett nagy jelentőséggel bírhat, hogy számos neuropszichiátriai rendellenesség háttérében túlzott idegrendszeri gyulladási folyamatok is állhatnak. A purinerg receptorok közül a P2Y₁₂ receptorok feltételezett szerepét egyes tanulmányok kiemelik krónikus gyulladási és neuropátiás fájdalomban egyaránt, mint potenciális gyógyszer-célpont azok kezelésében. Napjainkig nem foglalkoztak a P2Y₁₂ receptorok lehetséges szerepével neuropszichiátriai betegségek háttérét kutató tanulmányok. Ennek ellenére a jövőben érdemes lehet a neuroinflammációs és a szkizofrénia molekuláris háttérében álló folyamatok kapcsolatának tanulmányozása során vizsgálni a P2Y₁₂ receptorok esetleges érintettségét.

2. Célkitűzések

Kutatómunkánk során a purinerg rendszernek a szkizofrénia patomechanizmusában betöltött szerepét vizsgáltuk. Ezen belül vizsgálataink fókuszában a P2X₇ receptornak a szkizofrénia fenciklidin (PCP), mint N-metil D-aszpartáttal (NMDA) aktiválható, NMDA-típusú glutamát receptor antagonistá által indukált állatmodelljében játszott szerepe volt. Továbbá feltételeztük, hogy az idegrendszeri gyulladási folyamatok számos központi idegrendszeri betegség kialakulásának háttérében állhatnak. Ennek okán célunk volt a P2Y₁₂ receptorok szerepének a vizsgálata krónikus gyulladási fájdalomban.

I. A P2X₇ receptor szerepének vizsgálata 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 (prefrontális kéreg) és HPC (hippokampusz) 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 agyszeletekben. 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/vagy 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.

3. Módszerek

3.1. 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). Kísérleti munkáink során túlnyomó részében fiatal felnőtt korú, kb. 2 hónapos, hím C57Bl/6J háttérű P2rx7 gént tekintve homozigóta vad típusú (P2rx7 +/+), illetve génkiütött transzgen (P2rx7 -/-) egereket használtunk, de egyes génexpressziós és

elektrofiziológiai vizsgálatainkban ennél fiatalabb állatok is felhasználásra kerültek. További kísérleteink során 60-70 napos korú C57Bl/6J háttérű egértörzs P2Y₁₂ receptort tekintve vad típusú (P2ry12 +/+) és genetikailag deficiens (P2ry12 -/-) egyedeket alkalmaztunk. Ezeket az egérvonalakat az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében, specifikus, patogénmentes körülmények között tenyésztik.

3.2. Magatartás vizsgálatok

A kísérleti állatokon folytatott magatartás vizsgálatokat az MTA KOKI, Magatartásélettan és Stressz Kutatócsoportjában kerültek elvégzésre, Dr. Haller József irányításával. Két kísérleti elrendezés lett kivitelezve. Az első kísérleti felállásban a két eltérő genotípusú (P2rx7 +/+ és P2rx7 -/-) egereket két különböző dózisban, akut kezelést kaptak PCP-vel (2 illetve 5 mg/kg, Sigma-Aldrich Kft, Budapest), vagy steril fiziológiás sóoldattal (vehikulum, 0.9%-os NaCl intraperitoneálisan (i.p.)). A másik kísérleti felállásban kizárólag P2X7 receptorra nézve vad típusú egerek kerültek felhasználásra, de a PCP (1.5 illetve 5 mg/kg) vagy annak vehikulumával történő kezelést megelőzően 30 perccel az állatok egyik csoportját P2X7 receptorra szelektív antagonistával, JNJ-47965567 (30 mg/kg i.p., Janssen Research és Development, San Diego, USA), a másik csoportját annak oldószerével (30% β -cyclodextrin i.p., Cydex Pharmaceuticals, Lawrence, USA) lettek kezelve. A 10 perces magatartás tesztek, mint a lokomotoros aktivitás, sztereotip viselkedés, az ataxia és a szociális interakció a kezelést követően 45 perccel kezdődtek el. Az egereken végzett viselkedési tesztek egy sötétszürke, kerek, nyílt térben (open-field) zajlottak. Egy időben, a berendezés ellentétes oldalaihoz került behelyezésre két, egymás számára ismeretlen egér. 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 rögzítésre. A különböző kísérleti csoportokat véletlenszerűen kiválasztott 10-12 egér alkotta csoportonként.

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

A [³H]glutamát ([³H]GLU) felszabadulás mérései egér agy PFC szeletekből szövetperfúziós technika segítségével készültek. Kísérleteink során fiatal felnőtt korú, P2X7 receptort tekintve vad típusú és géniütött egerek kerültek felhasználásra, 1 órával i.p. PCP (2 mg/kg) vagy annak vehikulával (0.9%-os NaCl oldat) történő kezelést követően. A PFC szöveteket az izolálásukat követően jéghideg, karbogén gázzal (95% O₂ and 5% CO₂) perfundáltatott Krebs oldatba kerültek. McIlwain-típusú szövetszeletelő 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 közeg karbogén gázzal (95% O₂ and 5% CO₂) volt buborékolatva 32 °C-on. Az inkubáció után a PFC szeleteket karbogén gázzal telített, módosított Krebs oldatban perfundáltuk (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. A vizsgálatok során két féle stimulus hatására kiváltott [³H]GLU felszabadulás mérésére került sor. Az egyik kísérleti elrendezésben 6 perccel az első perfuzátum gyűjtését követően a szövetminták 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 téringerlés következett (EFS (electrical field stimulation), 10 Hz, 1 msec), majd ezután a normál Krebs oldattal perfundálódtak a szeletek a perfuzátum gyűjtési periódus végéig.

3.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Az agyszeleteken folytatott elektrofiziológiai kísérleteket a Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében lettek elkészítve, Dr. Köles László irányítása alatt. Ezek a vizsgálatok fiatal (16-20 napos), hím, P2X7 receptort tekintve vad típusú és géniütött egerek PFC régiójában történtek. Az állatok agya, izolációjukat követően jéghideg, karbogén gázzal telített mesterséges cerebrospinális folyadékba (aCSF) került, 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 (200 µm vastagságú) koronális szeletek egy vibráló pengéjű metszőgép segítségével készültek a mediális PFC prelimbikus részét tartalmazó szövetekből. Egy agyból 6-8 szelet került metszésre, amelyek ezt követően 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 a szeletek legalább 15 percig pihentetve voltak. Szeletenként csak 1 sejt került teljes sejt (whole-cell) patch-clamp mérésre. A PFC V. rétegének piramis sejtjei egy, 40x vízimmerziós objektívvel felszerelt „upright” (egyenes állású) elrendezésű mikroszkóp segítségével lettek megjelenítve (Axioscope FS; Carl Zeiss). A boroszilikát üvegből készült 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 kerültek rögzítésre, a patch-clamp erősítő voltage-clamp üzemmódjában (Axopatch 200B; Molecular Devices). NMDA (1-1000 µM), mint NMDA-típusú glutamát receptor agonista, által kiváltott koncentráció-válasz görbék kerültek felvételre. Az NMDA eltérő koncentrációjú oldatai 1.5 percig voltak perfundálva, növekvő koncentrációban, az eltérő koncentrációk között 10 perces periódusban vegyület-mentes aCSF-el történő perfúziót végeztek. 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).

3.5. Génexpressziós kísérletek

A bazális P2X7 receptor mRNA expressziós szintjeinek mérése négy eltérő korcsoportú (4, 18, 35 és 56 napos), P2X7 receptort tekintve vad típusú egerek PFC és HPC szövetmintáiból (8 állat / korcsoport) történt. A PCP kezelés P2rx7 génexpressziós szintjére gyakorolt hatása akut PCP-vel történő (2 illetve 5 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich Kft, Budapest), illetve a kontroll csoport állatainak vehikulumával (0.9%-os NaCl oldat i.p.) végzett kezeléseket követően került lemérésre. A szkizofrénia patomechanizmusával kapcsolatba hozható gének mRNA szintű expresszió változásainak tanulmányozására az előbbieken említett kezelést kaptak a fiatalok (18 napos) és fiatal felnőtt (56-60 napos) P2X7 receptor vad típusú és géniült állatok (3-6 egér / vizsgálati csoport). A magatartás tesztekben alkalmazott kísérleti felállást követve a PCP vagy steril fiziológiás sóoldat beoltása után körülbelül 1 órával (ekkorra már a PCP kifejti hatását) gyűjtöttük a PFC és HPC szövetmintákat, amelyek további felhasználásig -70°C-os tárolásra kerültek.

A szövetmintákból történő RNS izolálást az RNeasyLipid Tissue Mini Kit (Quiagen, Valencia Ca; kat. szám: 74804) felhasználásával végeztük el a gyártó utasításai alapján. 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. Az RNS minták komplementer DNS-re (cDNS) történő átírását, más néven a reverz transzkripciót Tetro cDNA Synthesis Kit segítségével (Bioline USA Inc, Taunton, MA) készítettük el a gyártó leiratának megfelelően. Az általunk vizsgálni kívánt gének relatív mRNA 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 vizsgálatokhoz 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) használtam. 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) segítségével, melyek tartalmazzák a szekvencia specifikus primer párt és a szekvencia specifikus TaqMan® (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) detekciós próbát

egyaránt. Az egyes gének mRNS expresszós szintjei a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (Gapdh), mint endogén kontroll génexpressziós szintjéhez lettek normalizálva.

3.6. Gyulladásos citokinek multiplex bead array analízise

Az általunk 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°C-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 (27000 g, 15 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. Eredmények

4.1. A P2X7 receptor genetikai deficienciájának és farmakológiai gátlásának hatása a PCP kezelés által kiváltott viselkedési mintázatokra

A PCP kezelés, illetve a P2rx7 gén kiütése illetve farmakológiai blokádja hatására bekövetkező változásokat négyféle magatartási paramétert tekintve vizsgáltuk: ezek a lokomotoros aktivitás, sztereotip viselkedés, ataxia és szociális interakció voltak. A két különböző dózisú PCP kezelés közül a kisebb dózisnak (2 mg/kg i.p.) mind a négy viselkedési formára szignifikáns hatása volt. Fokozta a lokomotoros aktivitást, a sztereotip viselkedést és az ataxiát, illetve csökkentette a szociális interakciót a P2X7 receptorral rendelkező állatokban, a PCP vehikulumával történő kezeléshez képest. Ehhez hasonló, de jelentősebb hatása volt a nagyobb dózisú PCP kezelésnek (5 mg/kg i.p.) a sztereotip viselkedés illetve az ataxia esetében. Ugyanakkor az emelt PCP csökkentette a lokomotoros aktivitást a tesztek során, illetve a szociális interakciót nem befolyásolta. A P2X7 receptor genetikai deléciója nem volt hatással a bazális lokomotoros aktivitásra, illetve a sztereotip viselkedésre a vehikulumot kapott állatokban. Ezzel szemben a P2X7 receptor génhány két magatartási forma esetében a kisebb adag PCP kezelés kiváltotta mintázatokat gátolta, és az eredmény a vehikulummal kezelt állatok szintjének megfelelő volt. Emellett a P2rx7 génkiütés a nagyobb dózisú PCP kezelést követő sztereotip viselkedést is csökkentette, a vad típusú egerekben mért értékekhez képest. A szociális interakciót tekintve, a vehikulummal kezelt egerekben a P2X7 receptor génhány szignifikáns növekedést eredményezett a vad típusú állatokhoz képest. Másrészt, a P2rx7 $-/-$ állatokban, vad típusú alomtársaikhoz hasonlóan a kisebb dózisban adott PCP szignifikánsan csökkentette a szociális interakciós időt, míg a nagyobb dózisú PCP nem. Az ataxiát tekintve ugyanolyan viselkedési mintázat volt megfigyelhető mind a két genotípusú állatcsoportban a PCP kezeléseket követően.

A második kísérleti elrendezésben a P2X7 receptor farmakológiai gátlásának vizsgálata volt a célkitűzés. A P2X7 receptorral rendelkező állatok kétféle dózisú PCP vagy annak vehikulumának adását megelőzően 30 perccel egy P2X7 receptor szelektív, vér-agy gát permeábilis antagonistával (JNJ-47965567) vagy annak vehikulumával lettek előkezelve. A JNJ-vehikulummal előkezelt állatokban megfigyelt viselkedés mintázatok a PCP kezeléseket, illetve a PCP-vehikulumát követően hasonlóak voltak az előző

kísérleti felállásban mértékhez képest. A kisebb dózisú PCP a saját oldószerével történő kezeléshez képest fokozta a lokomotoros aktivitást, sztereotip viselkedést és az ataxiát, illetve csökkentette a szociális interakciós időt a JNJ-vehikulummal előkezelt egerekben. Hasonló, de nagyobb mértékű növekedést váltott ki az emelt dózisú PCP a sztereotip viselkedést és ataxiát tekintve. Ugyanakkor, hasonlóan az előző kísérlethez, az alacsonyabb adag PCP esetében kiváltott hiperlokomóció nem volt megfigyelhető a nagyobb dózisú PCP kezelést követően, ráadásul szignifikánsan kisebb volt az állatok lokomotoros aktivitása a PCP oldószerét kapott egerekhez képest. Mindemellett a két eltérő dózisú PCP kezelést követően mért szociális interakciós idő szignifikánsan kisebb volt a vehikulummal kezelt állatokhoz képest. A P2rx7 genetikai deficienciájához hasonlóan a P2X7 receptor szelektív antagonistával történő előkezelés a bazális szintre csökkentette a lokomotoros aktivitás és sztereotip viselkedés szintjeit a kisebb dózisú PCP-vel kezelt egerekben, azonban az emelt dózisú PCP-t kapott állatokon mért eredményeket nem befolyásolta e két magatartási formát tekintve. Emellett a JNJ-47965567 alkalmazása kiküszöbölte az alacsonyabb dózisú PCP kezelés okozta szociális interakciós időbeli csökkenést. Az ataxia tanulmányozása során, a PCP kezeléseket követően kapott szignifikáns növekedést a P2X7 receptor genetikai deléciójához hasonlóan a receptor farmakológiai gátlása sem befolyásolta.

A P2X7 receptornak tehát mind a genetikai hiánya, mind pedig farmakológiai gátlása hatással volt – bár nem minden esetben és PCP dózisban – a szkizofrénia-szerű viselkedési mintázatokra.

4.2. A P2X7 receptor mRNS expressziós szintjeinek mérése a fejlődés egyes szakaszaiban az egér agy PFC és HPC régiójában

A bazális P2X7 receptor relatív mRNS expressziós szintjeit 4 különböző korcsoportba (4, 18, 35 és 56 napos) osztott egerek PFC és HPC régióiban kerültek tanulmányozásra. Az állatok PFC szövetmintáiban mért P2rx7 génexpressziós szintek szignifikánsan nem tértek el egymástól az eltérő korú állatokban. Ugyanakkor az egerek HPC mintáiban e receptor génkifejeződési szintje szignifikánsan, kb. 30%-al alacsonyabbnak bizonyult a 18 napos korú egerekben, a 4 napos és 56 napos korú állatokhoz képest.

4.3. A PCP kezelés hatása a P2X7 receptor mRNS expressziós szintjeire az egér agy PFC és HPC régiójában

Az alkalmazott két eltérő dózisu PCP kezelés (2 illetve 5 mg/kg i.p.) P2rx7 génextpressziós szintjeire kifejtett hatását vizsgáltuk az egerek PFC és HPC szövetmintáiban. A PFC régióban a P2X7 receptor relatív génkifejeződési szintje a kisebb dózisu PCP kezelést követően, nem szignifikánsan, de kb. 30%-al magasabbnak bizonyult a vehikulummal kezelt állatokhoz viszonyítva. Ezzel szemben a nagyobb dózisu PCP kezelést követően P2rx7 expressziós szintje szignifikáns módon, közel 40%-al alacsonyabb volt a kisebb PCP adagot kapott állatok PFC régiójában mértékhöz képest. A HPC szövetmintákban kapott relatív P2X7 receptor mRNS szintű expressziós mintázat eltérő volt a PFC régióban mértékhöz képest. Az emelt dózisu PCP kezelést követően kb. 60%-al nagyobb expressziós szint volt kimutatható a vehikulumot kapott állatokhoz viszonyítva, ugyanakkor a kisebb dózisu PCP kezelés nem befolyásolta a bazális P2rx7 génkifejeződési szinteket az egér agy HPC régiójában. Összehasonlítva az egér e két szöveti régióját elmondható, hogy a HPC szövetmintákban nagyobb bazális P2X7 receptor expressziós szintek voltak detektálhatóak a PFC régióhoz viszonyítva.

4.4. A PCP kezelés hatása a P2X7 receptor által közvetített [³H]glutamát felszabadulásra az egér agy PFC régiójában

A két eltérő genotípusú (P2rx7 +/+ és P2rx7 -/-) egerek PFC szövetmintáiból mért P2X7 receptor által közvetített [³H]GLU felszabadulás mérését megelőzően az állatok kisebb dózisu PCP kezelésnek lettek kitéve. Kutatócsoportunk korábbi tanulmányai alapján ismert, hogy a P2X7 receptorok aktivációja glutamát felszabadulást vált ki az idegvégződésekből. A P2X7 receptorok aktivációját egyrészt az exogén, P2X7 receptor agonista BzATP-vel, másrészt elektromos téringerlés (EFS) alkalmazásával, endogén receptor aktivációt kiváltva szimuláltunk az akut PFC szeletmintákon. A P2X7 receptort tekintve vad típusú és génkiütött egerekből származó bazális [³H]GLU felszabadulás jelentősen nem tért el egymástól. Egy 3 perces BzATP-vel (100 µM) történő perfúziót követően a P2rx7 +/+ állatokban egy átmeneti, reverzibilis [³H]GLU felszabadulás emelkedés volt megfigyelhető, amely az agonista rendszerből való kimosását követően visszaállt a korábbi alapértékre. Az előzetesen PCP-t kapott egerekből származó PFC

szeletmintákon detektált bazális [³H]GLU felszabadulás nagyobbak bizonyult a PCP vehikulumával kezelt állatokból kivett PFC szeleteken mértekhez képest. Míg a vehikulumot kapott P2X7 +/+ állatokban az alap [³H]GLU kiáramlás $1.58 \pm 0.06\%$ volt, addig az azonos genotípusú, de PCP-vel kezelt állatokban ez az érték $4.49 \pm 0.25\%$ -nak adódott. Ehhez hasonlóan a P2X7 receptorral nem rendelkező egerek PFC régiójában detektált bazális [³H]GLU felszabadulás $1.26 \pm 0.05\%$ volt, míg a PCP-t kapott állatokban ez $2.89 \pm 0.62\%$ -nak bizonyult. Összehasonlítva az eltérő kezelést kapott P2X7 +/+ állatokból származó PFC szövetmintákon mért BzATP által indukált [³H]GLU kiáramlás emelkedést, a PCP-vel előkezelt egerekben nagyobbak bizonyult a vehikulummal kezelt állatokhoz viszonyítva (PCP: $\Delta[{}^3\text{H}]\text{GLU} = 2.8\%$, vehikulum: $\Delta[{}^3\text{H}]\text{GLU} = 1.1\%$). Az előzetesen vehikulumot kapott állatokban, az elektromos téringerlés (EFS) hatására bekövetkező változást nem befolyásolta a P2X7 receptor deficienciája, mindkét genotípusú állatsoportból származó szövetmintákban egyaránt reverzibilis [³H]GLU felszabadulás volt megfigyelhető. A PCP-vel előkezelt állatokban a P2rx7 genetikai deléciója nem befolyásolta az EFS által indukált [³H]GLU kiáramlást.

4.5. A P2X7 receptor genetikai deléciójának és farmakológiai gátlásának hatása az NMDA által indukált áramokra az egér agy PFC régiójában

Az eddig bemutatott kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a PCP kezelésnek csekély mértékben is, de hatása van a P2X7 receptor génkifejeződési szintjére, illetve növeli a receptor funkcionális érzékenységét az egér agy PFC régiójában, emelkedettebb glutamát felszabadulást kiváltva. Teljes sejt patch-clamp kísérletekben vizsgáltuk, hogy emelkedő koncentráció sorban alkalmazott NMDA által kiváltott (1-1000 μM) sejtbe befelé irányuló áramokra milyen hatása van a P2X7 receptor genetikai deficienciájának vagy a receptor JNJ-47965567 általi szelektív gátlásának a PFC V. rétegének piramis sejtjeiben. Alacsony koncentráció tartományban használt NMDA (1-10 μM) alkalmazásakor a mért ionáramok amplitúdója nem tért el az eltérő genotípusú állatokból származó minták között. Ezzel szemben a nagyobb dózistartományban adott NMDA (>30 μM) által kiváltott ionáram amplitúdók között jelentős eltérés volt kimutatható a P2X7 receptort tekintve vad típusú és génkiütött állatok mintáiból mért eredmények között. A P2X7 receptorral nem rendelkező állatok PFC V. rétegének piramis sejtjeiben mért áramok amplitúdója kisebb volt (1343 ± 238 pA), mint

vad típusú alomtársaik azonos mintáiban kapott eredmények esetében (2658 ± 504 pA). Az NMDA-val kiváltott a koncentráció-válasz görbék nagyobb maximális választ (E_{\max}) eredményeztek a vad típusú egerekben (4330 ± 1171 pA) a P2rx7 -/- (3224 ± 693 pA) állatokhoz képest. 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. Mindemellett vizsgálataink tárgyát képezte a P2X7 receptor vad típusú állatokból származó PFC eredetű piramis sejteken mért NMDA koncentráció-válasz összefüggés a P2X7R antagonistá JNJ-47965567 (0.1 μ M) jelenlétében is. Ebben a mérési elrendezésben, a P2X7 receptor genetikai deléciójához hasonló lefutású koncentráció-válasz görbe adódott. A JNJ-47965567 vegyület jelenlétében mért, és ez alapján felvett koncentráció-ionáram összefüggés görbéjének E_{\max} értéke kisebb volt (2831 ± 360 pA), mint a JNJ-47965567 vegyület hiányában, de a sejtek közötti nagy variabilitások miatt ez nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget.

4.6. A P2X7 receptor génhiány hatása a PCP kezelés által kiváltott génkifejeződési változásokra

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a P2X7 receptor génkiütött egerekben számos pszichiátriai kórkép patomechanizmusával kapcsolatba hozható gén mRNS szintű kifejeződése megváltozhat. Génexpressziós vizsgálataink során PCP-vel vagy annak vehikulumával előzetesen kezelt fiatal (18 napos) és fiatal felnőtt (56 napos), naiv és P2X7R génkiütött állatok PFC és HPC szövetmintái kerültek felhasználásra. Az előzőekben bemutatott P2rx7 expressziós szintekre a PFC régióban a kisebb dózisú PCP kezelésnek (2 mg/kg) volt hatása, míg az emelt PCP adag (5 mg/kg) a HPC régióban befolyásolta azt.

Eszerint a PFC régióban vizsgált génexpressziós változásokat az alacsonyabb dózisú PCP kezelést kapott állatokban vizsgáltuk. Fiatalkorú egerek PFC mintáiban az egyes ionotróp, NMDA-típusú glutamát receptor alegységeket kódoló gének (Grin1, Grin2a, Grin2b), és egy metabotróp glutamát receptort kódoló gén (Grm3) mRNS kifejeződési szintjeire nem volt hatással a P2rx7 gén kiütése és az előzetes PCP kezelés sem. Ezzel ellentétben a fiatal felnőtt állatok PFC régióiban mind a P2X7 receptor

genetikai deléciójának, mind a PCP kezelésnek szignifikánsan kimutatható befolyása volt az előbb említett gének expressziós szintjeire. Így a P2rx7 $+/+$ állatok PFC szöveti mintáiban az NR1 receptor alegységet kódoló gén (Grin1) esetében közel 40%-al alacsonyabb szinten fejeződött ki az előzetesen PCP-vel kezelt állatokban a vehikulumot kapott egerekhez képest. Hasonlóan a PCP kezelés hatásához, a vehikulummal kezelt P2rx7 génkiütött egerekben szignifikánsan alulszabályozódott a Grin1 gén expressziós szintje a vad típusú alomtársaikhoz viszonyítva. Érdekes módon a PCP kezelt egerek PFC régiójában a P2X7 receptor genetikai deficienciája további, közel 25%-os, szignifikáns csökkenést eredményezett a Grin1 gén expressziós szintjében. A P2X7 receptor tekintve vad típusú egerek PFC régiójában a PCP kezelés kb. 50%-os, szignifikánsan felülszabályozó hatást eredményezett az NR2A és NR2B receptor alegységeket kódoló gének (Grin2a és Grin2b) mRNS expressziójában a PCP vehikulumával kezelt állatokhoz képest. A Grin2a és Grin2b gének kifejeződési szintjét a P2X7 receptor genetikai deléciója a bazális szintre csökkentette a PCP-vel előzetesen kezelt egerekben. Ugyanakkor önmagában a P2rx7 gén hiányában a Grin2a és Grin2b gének expressziója felülszabályozódott a vehikulumot kapott állatok PFC mintáiban, de ez a Grin2a esetében nem volt szignifikáns. A 3-as altípusú metabotróp glutamát receptort kódoló gén (Grm3) expressziós szintje a fiatal felnőtt egerek PFC régiójában a PCP kezelés hatására szignifikánsan alulszabályozódott a vehikulumot kapott állatokhoz képest mindkét genotípusú állatcsoportban. A Grm3 gén kifejeződési szintjét a PCP kezelt állatokban tehát nem befolyásolta a P2rx7 gén deléciója.

A hippocampális régióban mért génexpressziós vizsgálatok az emelt dózisú PCP-vel (5 mg/kg) kezelt állatokon történtek. Ebben a szöveti régióban kisebb mértékű eltéréseket tapasztaltunk a PFC-ben is vizsgált Grin1, Grin2a, Grin2b és Grm3 gének expressziós szintjeiben a P2X7 receptor génhiany, illetve a PCP kezelés hatására. A Grin1 gén mRNS expressziós szintjeit nem befolyásolta a P2rx7 gén kiütése és a PCP kezelés a fiatal és fiatal felnőtt állatokban sem. Fiatalkorú vehikulumot kapott egerekben a Grin2a gén expressziója szignifikánsan felülszabályozódott (kb. 20%-al) a P2rx7 gén hiányában, a vad típusú állatokhoz képest. A PCP kezelésnek nem volt hatása a Grin2a gén kifejeződésére a P2rx7 $+/+$ állatokban, viszont a P2rx7 génkiütött állatokban a PCP kezelt állatokban szignifikánsan alacsonyabb Grin2a gén expressziós szint volt detektálható a vad típusú alomtársaikban mértékhez képest. Ugyanakkor fiatal felnőtt állatokban

kizárólag a PCP kezelésnek volt szignifikánsan felülszabályozó hatása a Grin2a gén expressziójára, a P2rx7 genetikai deléciója nem befolyásolta azt. A Grin2b gén kifejeződési szintje a P2X7 receptorral nem rendelkező állatokban a PCP kezelést követően szignifikánsan alulszabályozódott a vehikulumot kapott egerekhez viszonyítva, mind a két korcsoportú egerek esetében. A P2X7 receptort tekintve fiatal és fiatal felnőtt vad típusú állatokban nem volt jelentős befolyásoló hatása az előzetes PCP kezelésnek a Grin2b gén expressziós szintjeire. A Grm3 gén expressziós szintjében szignifikáns csökkenés fiatal felnőtt P2rx7 +/+ állatokban volt kimutatható PCP kezelést követően, amely hatás a P2rx7 gén hiányában nem volt megfigyelhető.

További génexpressziós kísérleteinkben az alacsonyabb dózisú PCP kezelésnek, illetve a P2X7 receptor genetikai deléciójának néhány, egyes szkizofrénia patomechanizmusával feltételezhetően kapcsolatban álló gén mRNS expressziós szintjére gyakorolt hatását vizsgáltam az egér agy PFC régiójában. Ezen gének a következő fehérjéket kódolják: D1 és D2 dopamin receptorok (Drd1 és Drd2), katekolamin-O-metiltranszferáz (Comt), neuregulin 1 (Nrg1), metabotróp glutamát receptor 2 és 5 altípusok (Grm2, Grm5), GABA_A receptor α 1 és α 5 alegységek (Gabra1, Gabra5). A P2X7 receptorral rendelkező állatokban az előzetes PCP kezelést követően az Nrg1 gén expressziós szintje szignifikánsan felülszabályozódott, mintegy négyszeresére emelkedett a vehikulummal kezelt állatokban mértekhez képest. Ezzel szemben a P2rx7 -/- egerekben a PCP kezelés nem változtatta meg az Nrg1 gén mRNS expressziós szintjét a vehikulummal kezelt állatokhoz viszonyítva. Érdekes módon a kezelésektől független módon a P2rx7 gén hiányában nagyobb expressziós szintek voltak detektálhatóak az Nrg1 gén kifejeződési szintjében, bár ez nem érte el a szignifikancia küszöbértékét. A Drd2 gén expressziós szintje az állatok előzetes PCP kezelését követően szignifikánsan alulszabályozódott, közel felére csökkentve azt mindkét genotípusú állatcsoportban (P2rx7 +/+ és P2rx7 -/-). A PCP kezelés hatását e gén expressziós szintjében a P2rx7 gén hiánya nem befolyásolta. A P2X7 receptorral rendelkező állatokban Grm2 gén expressziós szintje szignifikánsan, közel 70%-kal alacsonyabbnak bizonyult a PCP-t kapott egerek PFC mintáiban a vehikulumot kapott állatokhoz viszonyítva. A P2X7 receptor tekintve genetikailag deficiens egerekben a PCP kezelés hasonlóan szignifikáns alulszabályozódást eredményezett a Grm2 gén kifejeződési szintjében. Ezen túlmenően a P2rx7 gén kiütése szintén szignifikáns csökkenést váltott ki a Grm2 gén expressziójában

a vehikulummal kezelt állatokat összehasonlítva. A P2rx7 ^{+/+} egerekben a PCP kezelés hatására szintén szignifikánsan alulszabályozódott a Grm5 gén kifejeződési szintje a vehikulumot kapott állatokhoz képest. Az előzetes PCP kezelés nem váltott ki ilyen jellegű hatást a P2rx7 génkiütött állatokban. Viszont a P2rx7 gén hiánya szintén alacsonyabb expressziós szintet eredményezett a Grm5 gén esetében a vehikulummal előzetesen kezelt állatcsoportban, P2X7 receptorral rendelkező egerekhez képest. Emellett a Gabra1 gén expressziójában hasonló szignifikáns alulszabályozódás volt megfigyelhető a PCP kezelést követően a P2X7 recetort tekintve vad típusú állatokban, amely hatás a P2rx7 gén deficiens egerekben nem volt detektálható a PCP kezelést követően a vehikulumot kapott állatokhoz viszonyítva. Érdekes módon a Gabra1 gén mRNS expressziós szintje is szignifikánsan alulszabályozódott a vehikulummal kezelt P2rx7 ^{-/-} állatokban vad típusú alomtársaikhoz képest. További, három vizsgált gén (Drd1, Comt, Gabra5) kifejeződési szintjét nem befolyásolta az egerek előzetes PCP kezelése vagy a P2X7 receptor genetikai deléciója, ezért ezek az eredmények nem kerülnek bemutatásra a disszertációban.

4.7 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-adjuvánssal (CFA) történő kezelést követő 3. és 14. napon az egerek izolált talpmintáiban a vehikulummal történő kezelés adott napokon mért értékeivel történő összevetésben. A P2Y₁₂ receptor genetikai deléciója ellensúlyozta egyes citokinek esetében a CFA kezelés által indukált növekedést mind a két vizsgált időpontban vett minták esetében. A kezelést követő 3. napon a vad típusú állatokhoz képest a CFA adása a TNF- α szintjében hozzávetőlegesen nyolcszoros, a KC szintjében hétszerez szignifikáns növekedést tapasztaltunk, a receptor hiányában ezek szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a CFA kezelést kapott állatokban, a TNF- α szintje 47%-kal, a KC szintje 37%-kal volt alacsonyabb. 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 kb. 55%-kal csökkent a vehikulummal

kezelt állatokhoz képest, azonban a CFA kezelésnek kitett P2ry12 -/- állatokban a detektálási határ alatt volt az IL-1 α szintje. 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. Az IL-1 α szintjére szignifikáns csökkentő hatása volt (kb. 70%-os csökkenés), a CFA kezelésnek a vad típusú állatokban a 14. napon, de ezt a hatás a P2Y₁₂ receptor genetikai deficienciája nem ellensúlyozta. 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 a P2Y₁₂ receptor hiányában hozzávetőlegesen 85%-kal, szignifikánsan kisebb IL-10 szintet mutattunk ki a vad típusú, P2Y₁₂ receptorral rendelkező állatokhoz viszonyítva.

5. Következtetések

Kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy a purinerg neurotranszmisszióknak, és ezen belül is az ionotróp purin receptorok közül a P2X₇ receptornak lehet-e szerepe a szkizofrénia patofiziológiájában. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a fenciklidin (PCP), mint az ionotróp, N-metil D-aszpartát (NMDA)-típusú glutamát receptor antagonistá által indukált állatmodellt használtuk fel, amely a szakirodalom alapján egy általánosan elfogadott szkizofrénias rágcsláló modell.

Az alkalmazott egér magatartás vizsgálatainkban, az egyes viselkedési paraméterekben, a kísérleteket megelőző PCP kezelés által kifejtett hatást a P2X₇ receptor genetikai deléciója és/vagy annak farmakológiai gátlása befolyásolta. Az, hogy a P2X₇ receptor mediált jelátvitel két eltérő módú gátlásán keresztül képes modulálni a PCP kezelés által kifejtett fenotípusos hatást rámutat arra, hogy a P2X₇ receptornak közvetítő szerepe lehet az NMDA receptor gátlás során működő szignalizációs folyamatokban.

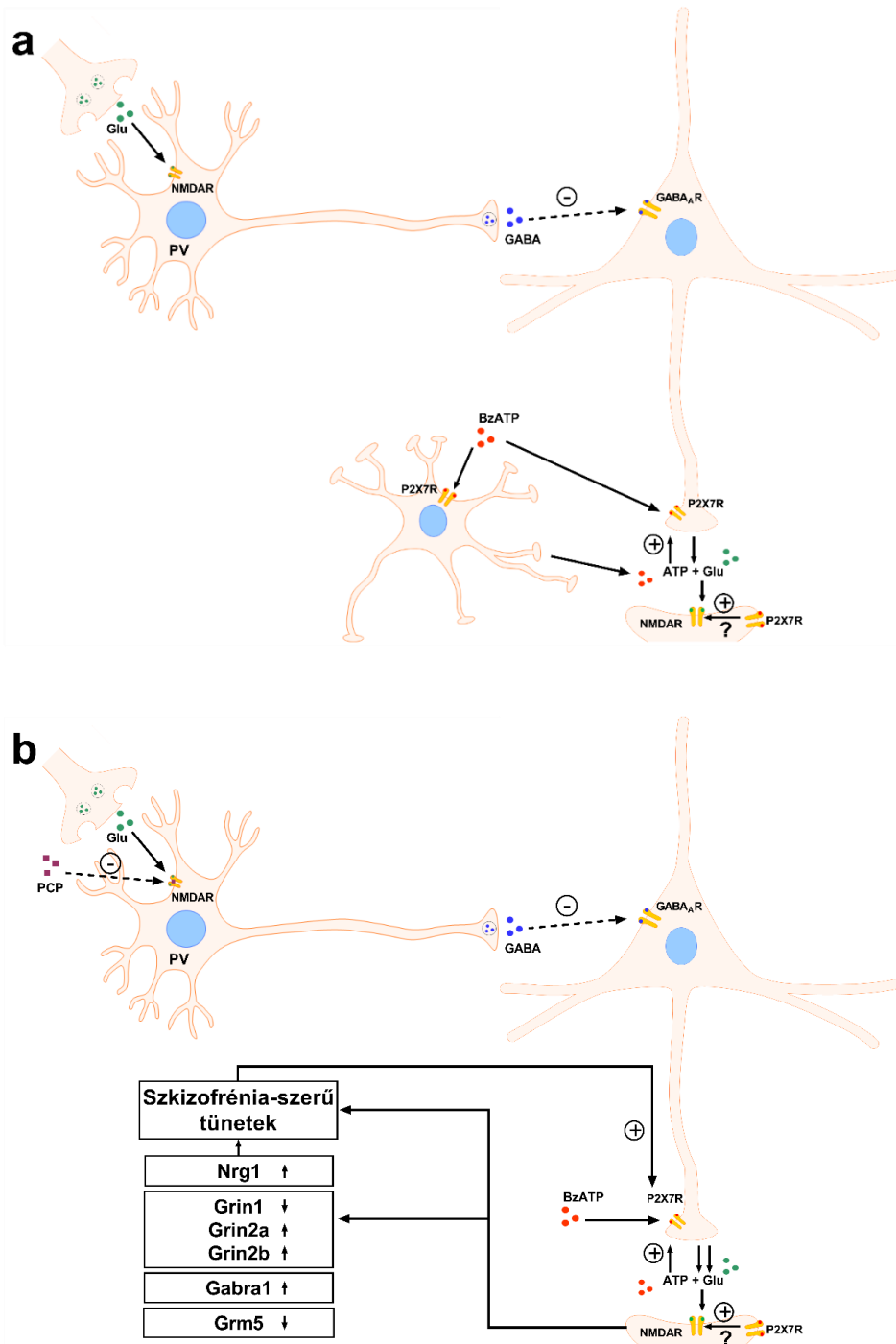
A P2X₇ receptorok feltételezett szerepét az NMDA-típusú glutamát receptorok közvetítette jelátvitelben tovább erősítheti, hogy a P2X₇ receptorok mRNS szintű expressziójára gyakorolt hatását mutattuk ki az állatok PCP kezelését követően az egér agy prefrontokortikális (PFC) és hippokampális (HPC) szövetmintáiban.

Mindemellett további kísérleteinkben vizsgáltuk a P2X7 receptorok prefrontokortikális glutamát felszabadulást befolyásoló hatását. Kimutatásra került, hogy a P2X7 receptorok genetikai deléciója, illetve farmakológiai blokádjá képes befolyásolni az NMDA által kiváltott ionáramok amplitúdóját az egerek PFC V. rétegének piramis sejtjeiben. Ezek az eredmények tovább növelik annak az elképzelésnek a létjogosultságát miszerint a P2X7 receptor által közvetített jelátviteli mechanizmusok szoros kapcsolatban állhatnak az NMDA receptorokon keresztül működő glutamáterg szignalizációval.

Génexpressziós kísérleti munkánk során vizsgáltuk a PCP által kiváltott változásokat, feltételezeten a szkizofrénia patomechanizmusával kapcsolatban hozható, jellemzően neurotranszmissziós folyamatokban szerepet játszó egyes gének kifejeződési szintjében illetve, hogy erre milyen hatása van P2X7 receptor hiányának. A receptor genetikai deléciójának leginkább kifejezett befolyása e gének kifejeződési szintjére az állatok PFC régiójában volt jellemző. Eredményeink alapján elmondható, hogy a P2X7 receptoroknak kulcsszerepük lehet a PCP által közvetlenül befolyásolt, egyes NMDA receptor alegységek (NR1, NR2A, NR2B) mRNS szintű expresszió változásaiban. Ugyanakkor mind a PCP kezelés mind a P2X7 receptor genetikai deficienciája hatással volt az mGluR2 és mGluR5 metabotróp glutamát receptor mRNS expressziójára egér agy PFC régiójában, így a P2X7 receptornak feltételezeten hatása lehet e receptorokon keresztüli glutamáterg jelátviteli folyamatokra. Ezen túlmenően, a P2X7 receptorok GABAerg neurotranszmisszióra való közvetett hatása is feltételezhető, mivel az egerek előzetes PCP kezelése befolyásolta a GABA_A receptor $\alpha 1$ alegység mRNS expressziós szintjét P2X7 receptorral rendelkező állatok PFC régiójában, ugyanakkor ez a PCP általi hatás P2X7 receptor hiányában nem volt detektálható. Mindezek mellett a szkizofrénia egyik kandidáns génjének, a neuregulin 1 fehérjét kódoló Nrg1 génnek kifejeződési szintjére is hatása volt a P2X7 receptor genetikai deléciója, a vad típusú állatokhoz képest. A szakirodalomból ismert, hogy a neuregulin 1 fehérjének számos agyi régióban van feltételezett szabályozó szerepe a neurotranszmisszióban illetve a szinaptikus plaszticitásban egyaránt. Emellett kimutatták, hogy az ErbB4 receptor, amelynek a neuregulin 1 fehérje a ligandja, a glutamáterg szinapszisok posztszinaptikus denzitásában és a GABA-erg neuronok preszinaptikus terminálsaiban is előfordulhat, így befolyásolva a depolarizáció függő GABA felszabadulást.

Kísérleti munkánk során kapott eredmények tükrében feltételezhető, hogy a P2X7 receptoroknak közvetett vagy közvetlen hatása lehet a posztszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorokra. További hipotézisünk, hogy az NMDA receptor antagonistá PCP, a PV-tartalmú, prefrontokortikális piramis neuronokhoz projiciáló GABAerg neuronokon keresztül fejti ki hatását, fokozott glutamát felszabadulást eredményezve. Emellett a BzATP által indukált glutamát kiáramlás fokozódás eredménye alapján valószínűsíthető, hogy a PCP felülszabályozza és fokozza a P2X7 purinerg receptorok funkcionális válaszkészségét (1. ábra).

Vizsgálataink során bemutattuk, hogy a P2Y₁₂ receptorok hiánya befolyással van bizonyos proinflammatorikus citokinek szintjeire, amelyek kiemelkedő fontosságúak lehetnek idegrendszeri gyulladásos folyamatokban. A P2Y₁₂ receptor, mint terápiás célpont figyelemre méltó lehet akut, neuropátiás illetve gyulladásos fájdalomban. A P2Y₁₂ receptorok neuropszichiátriai betegségekkel való kapcsolatát nem vizsgálták napjainkig a szakirodalomban, ugyanakkor, mint lehetséges mikroglia biomarker említésre került. Mindemellett érdekes lehet a neuroinflammációs folyamatok és a szkizofrénia kapcsolatának tanulmányozása során a P2Y₁₂ receptorok esetleges szerepének vizsgálata.



1. ábra: Hipotézis a P2X7 receptorok feltételezett kapcsolatára az NMDA receptorok szabályozásával.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 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. Bekő, 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

6.2 Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent publikációk

1. 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, Otrókocsi 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, Avcı 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