Purinerg jelátvitel vizsgálata a központi idegrendszerben magas felbontású vizsgálati módszerekkel

Doktori értekezés

Heinrich Attila

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Sperlágh Beáta tudományos tanácsadó, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Köles László egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Ducza Eszter egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva egyetemi tanár, D.Sc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Riba Pál egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Jurányi Zsolt, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
2. BEVEZETÉS 7
2.1. A gerincvelő szerkezete és pályarendszerei 7
2.2. Hippokampusz alapvető felépítése 9
2.3. A purinok szerepe a központi idegrendszerben 10
2.4. Az ATP és az adenozin szintézise és raktározása 11
2.5. Az ATP és az adenozin sejtekből történő felszabadulása és inaktivációja 12
2.6. Az ATP és adenozin receptorai és receptoriális hatásai 13
2.6.1. A P2X receptorok 14
2.6.2. A P2Y receptorok 16
2.6.3. Adenozin receptorok 17
2.7. A P2X és P2Y receptorok vizsgálata patkány gerincvelő szeleteken: irodalmi előzmények 18
2.8. Valós idejű ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata patkány hippokampusz szeleteken: irodalmi előzmények 19
3. CÉLKITŰZÉS 21
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 22
4.1 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) analízis 22
4.2 Tríciált noradrenalin ([^{3}H]NA) és glutamát ([^{3}H]GLUT) felszabadulás mérése patkány gerincvelőből 23
4.2.1 Radioaktivitás mérése 24
4.3 P2Y$_1$-receptor immunhisztokémia 25
4.3.1 Immunfluoreszcens festés 25
4.3.2 Fény- és elektronmikroszkópia 26
4.4 Extracelluláris és bioszenzoros elvezetés 27
4.4.1. Patkány hippokampusz szeletek előkészítése 27
4.4.2. Extracelluláris elvezetés patkány hippokampusz szeletekből 27
4.4.3. ATP, adenozin, inozin és GLUT bioszenzor elvezetés patkány hippokampusz szeletekből 28
4.4.3.1. A bioszenzorok felépítése 28
4.4.3.2 Mikroelektród bioszenzor kísérletek tervezése 29
4.6 Statisztikai analízis 30
5. EREDMÉNYEK 31
5.1 P2X és P2Y receptorok szerepe patkány gerincvelőben 31
5.1.1 Tríciált glutamát felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben 31
5.1.2 Tríciált noradrenalin felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben 38
5.1.3 P2Y receptorok mRNS expressziójának vizsgálata patkány agytörzsben, hátsó-gyöki ganglionban és gerincvelőben 43
5.1.4. P2Y$_1$ receptor immunohisztokémiai vizsgálata 44
5.2 K^+ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás mérése patkány hippokampusz CA1 régiójában mikroelektród bioszenzor segítségével 47
5.2.1. Nyugalmi és K^+ depolarizációra kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás patkány hippokampuszban 47
5.2.2. Honnan származik a K^+ depolarizációra felszabadult adenozin? 51
5.2.3. Az ATP, adenozin és glutamát felszabadulása hogyan függ az extracelluláris Ca^{2+} szinttől? 53

5.2.4. Hogyan befolyásolja a tovaterjedő neuronális aktivitás az ATP, adenozin illetve a glutamát felszabadulást a patkány agyszeletekben? 53
5.2.5. Mely neurális elem vesz részt az ATP, adenozin és glutamát szabadulásában? 55
5.2.6. Milyen mechanizmussal szabadul fel az ATP, adenozin és a glutamát? 57
6. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK 62
6.1. P2X és P2Y purin receptorok szerepének vizsgálata a patkány gerincvelőben ... 62
6.1.1. Gátló P2Y receptorok szerepe a neurotranszmitterek felszabadulásának szabályozásában 62
6.1.2. A serkentő P2X receptorok szerepe a neurotranszmitterek szabályozásásban 65
6.2. K^+ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata 66
7. ÖSSZEFOGLALÁS 74
8. SUMMARY 76
9. IRODALOMJEGYZÉK, HIVATKOZÁSOK 78
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 96
10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk 96
10.2. A disszertációtól független közlemények 96
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 97

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[^{3}H] – tríciált neurotranszmitter

2-MeSADP - 2-methylthioadenosine-5’-diphosphate

2-MeSAMP - 2-methylthioadenosine-5’-monophosphate

2-MeSATP - 2-methylthioadenosine-5’-triphosphate

5-HT- szerotonin

AC - adenilát cikláz

aCSF - artifical CerebroSpinal Fluid (mesterséges cerebrospinális folyadék)

ADO – adenozin bioszenzor

ADP - adenosine 5'-diphosphate

AMP- adenosine 5'-monophosphate

AR-C69931MX - cangrelor

ARL67156 - 6-N,N-Diethyl-β-γ-dibromomethylene-D-adenosine-5′-triphosphate trisodium salt hydrate;

ATP - adenosine 5'-triphosphate

AZ10606120 - N-[2-[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]-5-quinolinyl]-2-tricyclodec-1-ylacetamide dihydrochloride

BBG - Brilliant blue G

BSA - bovine serum albumine

BzATP - 3’-O-(4-benzoyl-benzoyl)adenosine 5’-triphosphate

CBX - carbenoxolone

CGRP- kalcitonin génnel rokon peptid

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

CNT - Na^+ függő koncentratív transzporter

DAG – diacyl-glycerol

D-AP-5 - D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid dipyridamole, 2,6-bis(diethanolamino)-4,8-dipiperidinopyrimido pyrimidine

DNS - dezoxiribonukleinsav

DPCPX – 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine

DRG – Dorsal Root Ganglion (hátsó-gyöki ganglion)

EDTA- etiléndiamin-tetraecetsav

EFS - electrical field stimulation (elektromos téringerlés)

EGTA - ethylene glycol tetraacetic acid

ENT - Na^+ független ekvilibratív transzporter

FAc - Fluoroacetic Acid sodium salt (fluorecetsav)

fEPSP - field excitatory postsynaptic potentials (mező serkentő excitátoros potenciál)

GABA- gamma-amino-vajsav

GLUT - glutamát

H_2O_2 – hidrogén-peroxid

IMP - inozin monofoszfát

INO – inozin

IP_3 – inosine-(1,4,5)-triphosphate

KIR – központi idegrendszer

mGLUR – metabotróp glutamát receptor

MRS1191- 3-ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-(±)-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate

MRS1754 - N-(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H purin-8-yl)phenoxy]-acetamide

MRS2179 - 2’-deoxy-N6-methyladenosine 3’,5’-bisphosphate

NA - noradrenaline

NF449 - 4,4’,4”,4’”-(carbonylbis(imino-5,1,3,-benzenetriylbis(carbonylimino)))tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid

NMDA - N-methyl-D-aspartate

NO- nitrogén-monoxid

NR2A – NMDA receptor 2A alegység

NULL – null bioszenzor

P2X – ionotróp P2 purin receptor

P2Y – metabotróp P2 purin receptor

PBS - phosphate buffer saline

PKC – protein kináz C

PLC - foszfolipáz C

PPADS - pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid

RB2 - reactive blue 2

RT-PCR - reverse-transcription-coupled-polymerase-chain-reaction

S_1, S_2 – első stimulus, második stimulus

SD - spreading depression

SNARE - soluble N-ethylmaleimide–sensitive factor attachment protein receptor

SP- Substance P

TTX - tetrodotoxin

UDP - uridine 5'-diphosphate

UTP - uridine 5'- triphosphate

VGLUT – vezikuláris glutamát transzporter

VNUT - vezikuláris nukleotid transzporter

ZM241385 - 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino] ethyl)phenol

2. BEVEZETÉS

2.1. A gerincvelő szerkezete és pályarendszerei

A gerincvelő a gerinccsatornában, a nyúltvelő folytatásaként helyezkedik el, és az I-II. ágyéki csigolyáig nyúlik. A dorzális gerincvelőnek központi szerepe van a szenzoros és fájdalmi információ feldolgozásában. A különböző ingerek (hő, mechanikus, kémiai inger stb.) által kiváltott fájdalmat vékony velőhüvelyes Aδ- és velőtlen C-rostok szállítják a gerincvelőbe. A C-rostok közel 90 százaléka fájdalmi (főleg termonociceptív, visceralis fájdalmat, Scherrer és mtsai, 2009) impulzust közvetít, míg az Aδ-rostok körülbelül 70 százaléka szállít fájdalominformációt (Fang és mtsai 2005). Ezek a primer afferensek pszeudounipoláris sejtek, melyek sejttesjei az intervertebrális ganglionokban vannak (DRG). Az Aδ-rostok és a C-típusú nociceptív rostok a gerincvelő hátulsó szarvában az azonos oldali I., II.a és V., valamint az ellenoldali V. és X. rétegben végződnek, míg a C-típusú mechanoreceptor rostok zömmel a II.b rétegbe jutnak (1. ábra). A hátsó szarvba belépő primer afferens rostok mind a projekciós neuronokon, mind az interneuronokon végződnek. A végződések lehetnek közvetlenek (direkt szinapszisok), vagy végződhetnek ún. glomerulusokban is. A közvetlen kapcsolat főleg az I., IV., V. és X. rétegben található (1. ábra). A glomerulusok csaknem kizárólag a II. rétegben található speciális struktúrák, melyekben a belépő primer afferens végződését projekciós neuronok és interneuronok dendritjei veszik körül és alkotnak vele szinaptikus kapcsolatokat. A hátsó szarvi interneuronok lehetnek gátlók és serkentők. A serkentő interneuronok az ingerületet projekciós neuronokhoz továbbítják, míg a különböző típusú gátló interneuronok szerepe elsősorban a fájdalom csökkentésében van. A gátló interneuronok főleg GABA-, enkefalin- és dinorfin-tartalmúak.

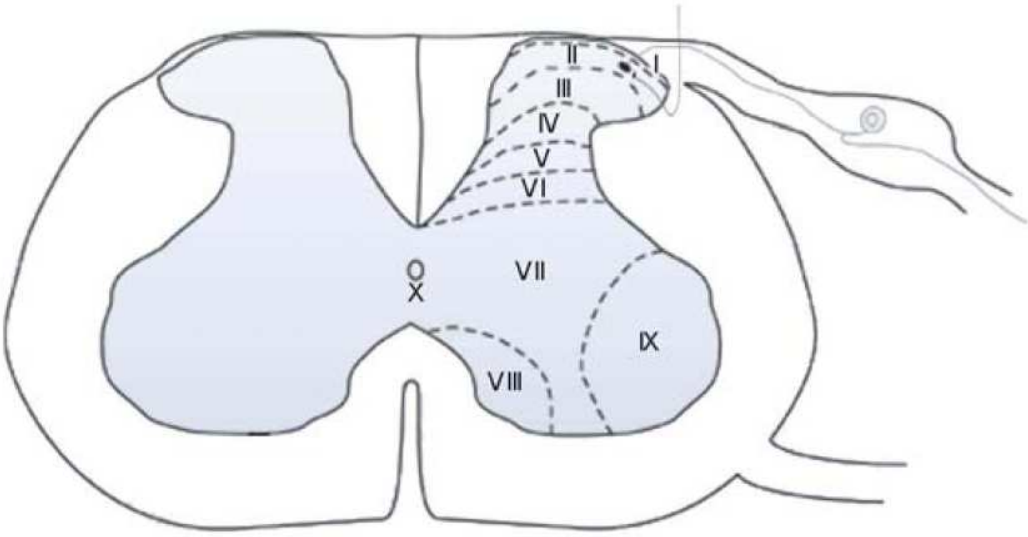
A primer afferens rostok azonban nemcsak funkcionális, hanem neurokémiai szempontból is csoportosíthatók aszerint, milyen fehérjéket fejeznek ki illetve milyen molekulákat ürítenek. A fájdalmi pályák gyors szinaptikus ingerületátvivői, az ún. klasszikus neurotranszmitterek (glutamát, GABA, biogén aminok) mellett, részben velük kolokalizálva, nagy számban találunk neuropeptideket, pl. substance P-t (SP), kalcitonin génnel rokon peptidet (CGRP), szomatosztatint, valamint ATP-t, NO-t,

prosztaglandinokat és neurotrofinokat. Szerepük a fájdalom továbbításában, illetve modulációjában van.

A nociceptív információk a gerincvelő hátsó szarvában átkapcsolódnak a felszálló pályákra, majd közvetlenül és közvetve érik el a thalamust, majd onnan a cortexbe kerülnek (spinothalamikus pálya), így tudatosul a fájdalom.

A központi idegrendszer a fájdalom tudatosulását a szinaptikus átkapcsolódások különböző szintjein tudja befolyásolni. Az egyik ilyen lehetőség a leszálló analgetikus pályák, melyek a periaquaeductalis szürkeállomány, továbbá a thalamus, valamint a capsula interna területeiről erednek. A leszálló monoaminerg (noradrenalin, szerotonin) rendszer rostjai gátlás alól (GABA-erg) felszabadulva 5-HT/SP/TRH-neuronokon keresztül serkentő ingert továbbítanak a hátsó szarv enkefalin-tartalmú gátló interneuronjaihoz (II. lamina). További feltételezések szerint a leszálló 5HT/SP/TRH-rostok képesek preszinaptikusan gátolni a C- és Aδ-rostok által a gerincvelőbe szállított fájdalomérzés áttevődését a hátsó szarv projektáló neuronjaira.

A leszálló rendszer másik komponense a substantia grisea centralis dinorfin-tartalmú sejtjeiből ered. Ezek a sejtek a nyúltvelő elülső részében (A5-katecholamin-sejtcsoport, subcoeruleus area) levő noradrenerg sejteken végződnek (Palkovics 2000). E két terület noradrenerg sejtjeinek axonjai a gerincvelőbe szállnak le és kapcsolatba kerülnek a hátulsó szarv gátló interneuronjaival, azokat aktíválják.



1. ábra: A gerincvelő keresztmetszetének sematikus ábrázolása a szürkeállomány Rexed-féle rétegeinek feltüntetésével. **I**: a hátsó szarv dorzális határrétegét képző marginális zóna; **II**:

substantia gelatinosa Rolandi; **III-IV**: a hátsó szarv önnáló magja (nucleus proprius columnae dorsalis); idegsejtjei főleg az agytörzsbe vetítenek; **V, VI**: a hátsó szarv mély rétegei, a primer afferensek, valamint agytörzsből leszálló rostok itt végződnek; **VII**: szekunder afferens és leszálló rostokat tartalmazó intermedier zóna; **VIII**: elülső szarv heterogén sejtjei; **IX**: motoros sejtcsoportok; **X**: substantia grisea centralis, a canalis centralis környéke (Szentágothai és Réthelyi 1994, Millan 1999, Morris és mtsai 2004 nyomán).

2.2. Hippokampusz alapvető felépítése

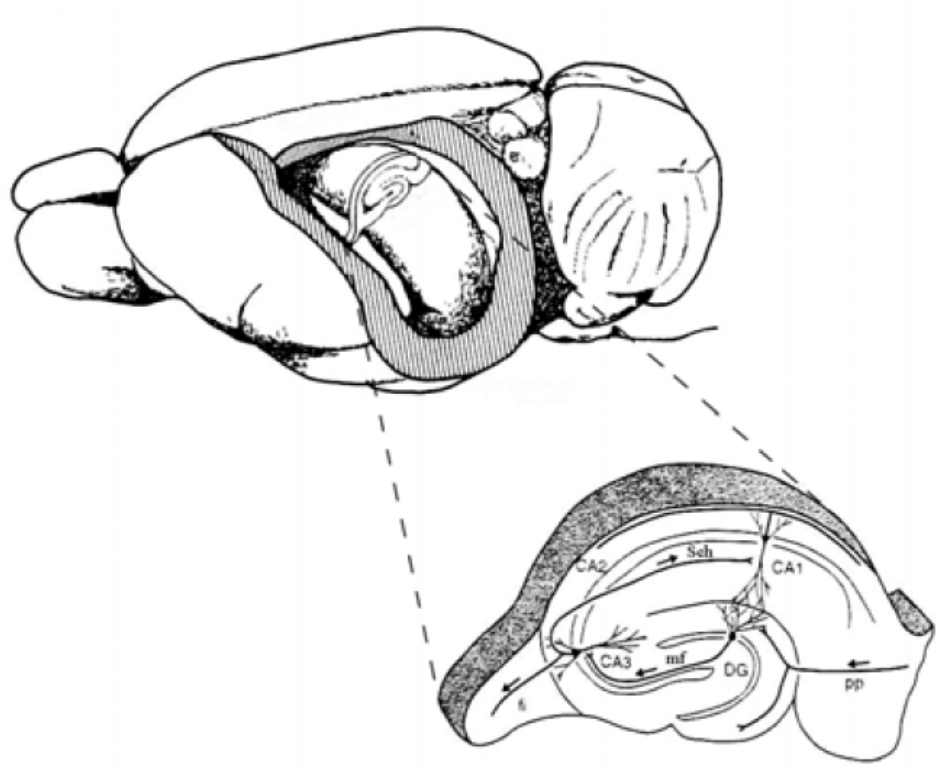
A hippokampusz az endokrin, a viscerális és az emocionális történéseket befolyásolja a hypothalamusz, a szeptális magok és a gyrus cinguli összeköttetésein keresztül. A hippokampusz fontos szerepet járszik a deklaratív tanulás, a memória és az asszociatív tanulás folyamataiban.

A hippokampuszt a sejtjei nagysága és sejtsűrűség alapján négy részre osztjuk: CA1-es mező, mely az kis piramissejteket tartalmazza; CA2-es mező, mely a nagy piramissejteket keskeny csíkban, de nagy sűrűségben tartalmazza; CA3-as mező, mely nagy piramissejteket laza rétegben tartalmazza; CA4-es mező, mely az Ammon-szarv fellazuló része, melyet a gyrus dentatus fog közre (2. ábra).

A hippokampusz legfontosabb bemenetelét a neocortex asszociációs areáitól az entorhinalis cortexen keresztül a gyrus dentátushoz futó pálya alkotja az ún. tractus prefontalis. Az tractus prefrontalis nagyobb része az Ammon-szarvon keresztül lép be a hippokampuszba, míg a kisebb része az alveolusokból származik. Ezek a rostok a granuális sejtek dendridjeivel kapcsolatot teremtenek, a granuláris sejtek axonjai mint moharostok a CA3-as mezőhöz húzódnak és az ottani piramissejteken végződnek. A moharostok csak CA3-as és CA4-es mezőben fordulnak elő. A piramissejtek axonjai a fimbrián keresztül hagyják el a hippokampuszt, ezek a fő efferensek, de egy részük visszakanyarodva kollaterálisokat képez, amelyek a CA1-es mező piramissejtjein végződnek (2. ábra). Ezt a visszakanyarodó pályát nevezzük Schaffer-féle kollaterálisnak. A CA1-es mező piramissejtjeihez futó pályák viszonylag magas frekvenciájú impulzusokkal ingerelhetőek, melyek serkentő posztszinaptikus potenciált (EPSP) váltanak ki. A Schaffer-féle kollaterális fő ingerlő transzmittere a glutamát, amely NMDA és non-NMDA receptorokon keresztül hat.

A hippokampusz rétegződése: a piramissejtek egy rétegben találhatóak a stratum pyramidale-ban, apikális dendritjeik a stratum radiatumban futnak és a stratum

lacunosum-moleculare-ban arborizálnak, bazális dendritjeik a stratum oriens-ben ágaznak el, ahol a multipoláris kosársejtek is találhatók. A kosársejtek gátló neuronok, amelyeket a piramissejtek axonkollaterálisai serkentenek, tehát egy piramissejt kisülése gátolja a szomszédos piramissejteket.



2. ábra: A hippokampusz elhelyezkedése és főbb régiói valamit a köztük lévő legfontosabb kapcsolatok patkányban. Kinagyítva a hippokampusz formáció szepto-temporális metszete látszik. Az entorhinális kéreg II. rétegének neuronjai a perforáns pályán (**pp**) keresztül vetítenek a gyrus dentatus (**DG**) és a hippokampusz CA3 régiójába. A gyrus dentatus szemcsesejteinek a moharostjai (**mf**) a hippokampusz CA3 régiójában végződnek. A hippokampusz CA3 régiójának piramissejtjei a CA1-be a Schaffer-kollaterálisokon (**Sch**) keresztül vetítenek. (Amaral és Lavenex 2007).

2.3. A purinok szerepe a központi idegrendszerben

A neurotranszmitterek és neuromodulátorok a központi idegrendszer (KIR) kommunikációjában fontos szerepet játszanak. A perifériális idegrendszerben elsőként felfedezett „klasszikus” transzmitterek, az acetilkolin és noradrenalin mellett a 60-as és 70-es években újabb típusú jelátvivő anyagokat tudtak azonosítani. Ezek a központi idegrendszerben excitátoros és gátló ingerületátvitelt valósítanak meg. Ilyen fontos

neurotranszmitterek a glutamát, γ-aminovajsav, dopamin, szerotonin és a neuropeptidek. A közelmúltban felismert jelátvivő anyagok közé tartoznak a purinok (ATP, adenozin) is, melyek receptorai (P1, P2X, P2Y) az idegrendszer számos területén expresszálódnak. Mivel a purinok minden metabolikusan aktív sejtben jelen vannak, így az információátviteli funkció nem korlátozódik a neuronális és nem-neuronális idegi elemekre, vagyis az ATP egy univerzális jelátvivő molekula.

Az ATP (adenozin trifoszfát) a sejtek működésében három funkciót tölt be:

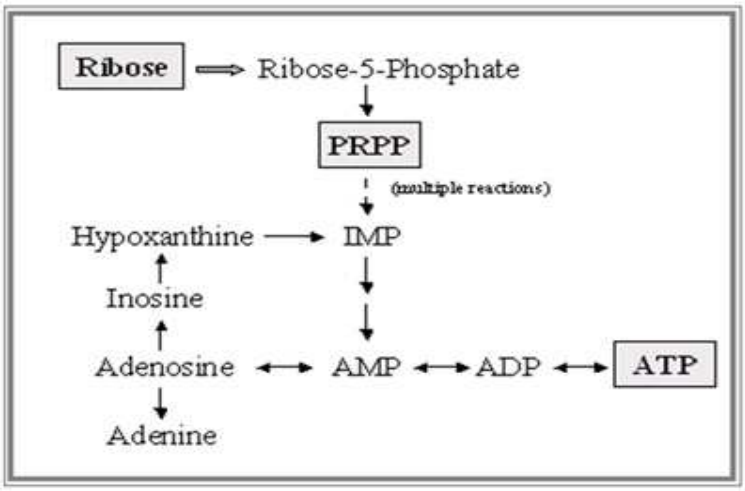
1. az elő sejtek univerzális energiaraktára,
2. a genetikai anyag (DNS) építőeleme,
3. jelátvivő molekula a sejtek közötti információátvitelben, többek között az idegrendszerben.

Munkám során arra törekedtem, hogy a purinerg neurotranszmissziót és neuromodulációt megismerjem a patkány központi idegrendszer különböző területein, így a gerincvelőben és a hippokampuszban.

2.4. Az ATP és az adenozin szintézise és raktározása

Az ATP szintézisére minden metabolikusan aktív sejt képes a mitokondriális oxidatív foszforiláció, glikolízis és a citromsav ciklus során. A szintézis vezérlő molekulája és az ATP közvetlen előanyaga az ADP, melynek a sejten belüli koncentrációja alapján szabályozza a folyamatot. Az ADP a sejten belül két kémiai folyamat segítségével keletkezik. Az egyik szintézis során a foszforibozil pirofoszfát kiinduló molekula bonyolult biokémiai reakciók következtében inozin monofoszfáttá (IMP) alakul (*de novo* purin szintézis 3. ábra). Az IMP transzaminálás következtében előbb adenozin monofoszfáttá alakul (AMP), majd adenilát kináz enzim részvételével ADP keletkezik belőle. Az így keletkezett ADP a fentebb említett mitokondriális oxidatív foszforiláció segítségével ATP-vé alakul. Ez a folyamat nagyon energiaigényes, ezért a sejtek egy másik, „purin-mentő” adenozin kináz ösvényt is használnak ATP szintézisre, melyben az adenozin foszforilációja réven AMP keletkezik, mely ezután a fenti folyamatok révén ATP-vé alakul. Az így keletkezett ATP koncentrációja sejten belül (citoplazma) elérheti a 10 mmol/L-t, míg a sejten kívüli ATP koncentrációk a felszabadulási és lebomlási folyamatok révén nanomoláris és mikromoláris (nmol/L - µmol/L) tartományban vannak (Agteresch és mtsai 1999,

Schwiebert 2000). Az idegsejtekben a fő adenozin forrást az extracelluláris tér irányából történő adenozin felvétel biztosítja, mely a Na^+ függő koncentratív (CNT) illetve a Na^+ független ekvilibratív (ENT) transzportereken keresztül valósul meg. Ezek a transzporterek nagy mennyiségben expresszálódnak a kéregben és a hippokampusz területén (Anderson és mtsai 1999) és specifikus transzporter gátlók segítségével gátolhatók (pl. dipyridamole). A felvett adenozin az adenozin kináz enzim segítségével végső soron ATP-vé alakul. Így a citoplazmatikus adenozin koncentráció szubmikromoláris nagyságrendű (Latini és Pedata 2001). Az így felhalmozott citoplazmatikus ATP szolgálhat a jelátvivő anyagként funkcionáló ATP forrásként is.



3. ábra: A purinok szintézise.

2.5. Az ATP és az adenozin sejtekből történő felszabadulása és inaktivációja

Az ATP poláros molekula révén a következő mechanizmusokkal szabadulhat fel a sejtekből: 1. exocitózissal a szinaptikus vezikulából (pl. idegsejtek) vagy granulumokból (pl. nem idegsejtek) 2. karrier mediált transzmembrán transzport segítségével, mint pl. connexin (Cotrina és mtsai 2000), pannexin vagy anion csatornák részvételével (Abdipranoto és mtsai 2003, Darby és mtsai 2003) 3. citolítikus ATP felszabadulás károsodott sejtmembránon keresztül.

Az ATP felszabadulása kísérletes modellekben a legkülönbözőbb ingerekkel váltható ki.

A legfontosabbak:

- fiziológiás neuronális aktivitást modellező elektromos vagy kémiai depolarizáció;
- pre- és poszt-szinaptikus receptorok közvetlen aktivációja;
- hipoxia, hipoglikémia;
- gyulladásos stimulusok;
- celluláris hipotonia;
- sejthalál.

Az ATP felszabadulás depolarizáció hatására általában követi a klasszikus neurotranszmitterek felszabadulását, azaz $[Ca^{2+}]_o$ és $[Na^+]_o$ függő, de leírtak olyan depolarizációra kiváltott kiáramlást is, mely nem követi ezeket a követelményeket. Az ATP felszabadulással kapcsolatban azt is figyelembe kell vennünk, hogy az ingerlésre felszabadult ATP milyen eredetű, mivel az ATP nemcsak idegi elemekből fel, hanem a nem-neuronális illetve egyéb sejteketből is felszabadulhat. Ilyen a simaizomsejt, mirigyhámsejt, endothelsejt (Vizi és mtsai 1992), gliasejtek vagy immunsejtek. A felszabadult ATP-t az extracelluláris ektonukleotidáz enzimek ADP-re majd AMP-re bontják. Az így keletkezett AMP-ből az ekto-5'nukleotidáz enzim adenozint állít elő, valamint az ingerlés hatására nemcsak ATP, hanem adenozin is felszabadulhat. A kiáramlott adenozin az ATP-től teljesen különböző új, sokszor ellenétes hatást közvetít. A szövetközi adenozin inaktivációja enzimatikus úton, illetve a sejtbe való újrafelvétellel történik. Az adenozint az ekto–adenozin deamináz enzim inozinná alakítja, mely továbbalakul hypoxantinná és xantinná, majd a keringésbe jut.

2.6. Az ATP és adenozin receptorai és receptoriális hatásai

Az ATP hatásait az extracelluláris térben a P2 receptorok közvetítik, melyek ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptor (1.táblázat) családokra oszthatók (Burnstock 2006).

1. táblázat: Purin recetorok felosztása.

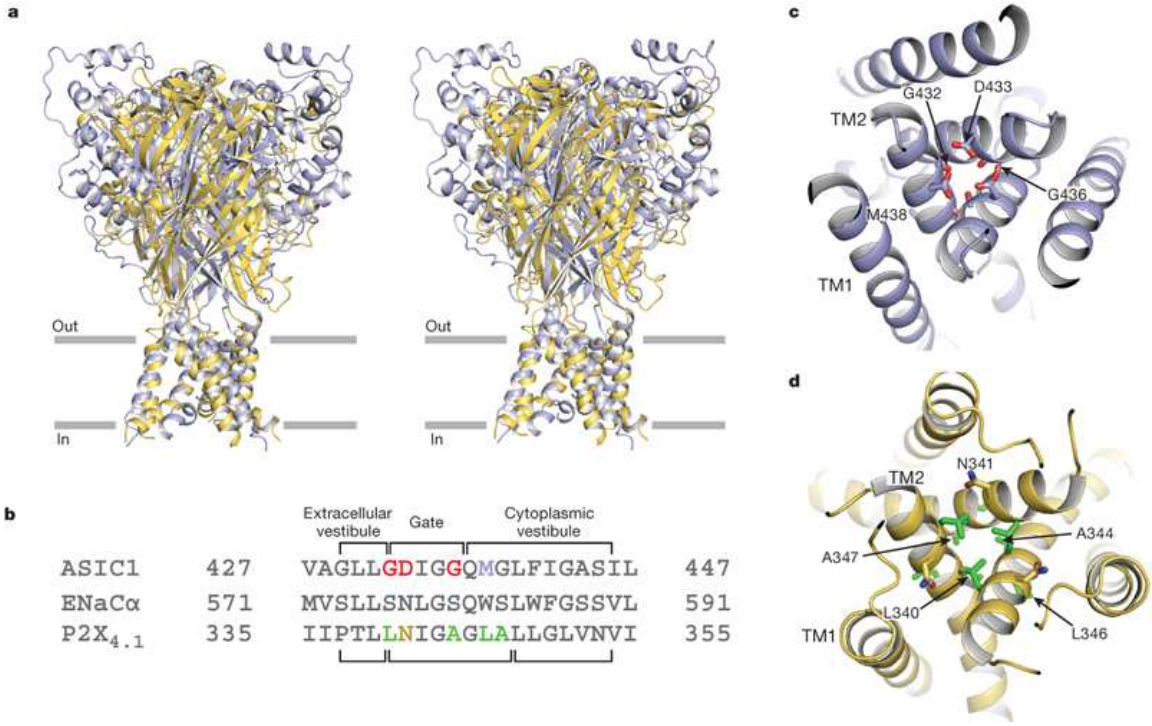
Purin receptorok		
ATP receptorok		**Adenozin receptorok**
ionotróp	metabotróp	Metabotróp
P2X1	$P2Y_1$	A_1
P2X2	$P2Y_2$	A_{2A}
P2X3	$P2Y_4$	A_{2B}
P2X4	$P2Y_6$	A_3
P2X5	$P2Y_{11}$	
P2X6	$P2Y_{12}$	
P2X7	$P2Y_{13}$	
P2X1/P2X2	$P2Y_{14}$	
P2X1/P2X4		
P2X2/P2X3		
P2X2/P2X6		
P2X4/P2X6		
P2X1/P2X5		

2.6.1. A P2X receptorok

A P2X receptorok ligand aktivált, nem szelektív kation csatornákat hoznak létre (4. ábra). Közülük a homomer P2X1-7 (North 2002) és heterooligomer P2X1/2, P2X1/5, P2X2/3, P2X1/4, P2X2/6, P2X4/6 (Roberst és mtsai 2006) alegységek kombinációit jellemezték eddig farmakológiailag, emellett az endogén liganddal szembeni érzékenységük is eltérő. A receptorok két transzmembrán régióval, valamint egy nagy extracelluláris hurokkal rendelkeznek, mely hurok tartalmazza az ATP kötőhelyet illetve az antagonisták és modulátorok kötődési helyeit is. A sejten belül az N- és C-terminálisuk található, mely régiók fontos szerepet játszanak a szabályozásban mind pl. a deszenzitizáció sebességének meghatározásában (Khakh és mtsai 1999). A P2X receptorok egy- és kétértékű kationok számára átjárható csatornák, ezen belül a Ca^{2+} permeabilitásuk viszonylag magas, mely gyors intracelluláris ionkoncentrációt hoz létre, amely sejtmembrán depolarizációt eredményez (Ralevic és Burnstock 1998).

További érdekesség, hogy tartós ATP ingerlés következtében a P2X receptorok permeabilitása megváltozik és nagy molekulasúlyú kationok számára is átjárható lesz (Khakh és mtsai 1999). Az agonisták közül az endogén ATP és ADP, valamint a szintetikusan előállított ligandok közül a 2-methyl-thioATP (2-MeSATP), az α,β-methyleneATP és a benzobenzoylATP (BzATP) szelektíven izgatják a P2X receptorok bizonyos alegységösszetételű kombinációit (Burnstock 2006). Az antagonisták közül a PPADS és suramin gátolja valamennyi P2X receptort, kivéve a P2X4 és P2X6 receptorokat. Egyéb szelektív antagonistákat is ismerünk: az NF449-et, mely a P2X1 receptort gátolja és a Brilliant blue G-t, mely csak a P2X7 receptor altípuson hat.

A P2X receptorok alegységei széles körben expresszálódnak a szervezetben. A P2X receptorok számos idegi válasz közvetítésében vesznek részt az agyban és a perifférián (Illés és mtsai 1996), beleértve a hippokampusz CA1 és CA3 régió (Mori és mtsai 2001, Pankratov és mtsai 1998), a szomatoszenzoros kéreg (Pankratov és mtsai 2002) és a gerincvelő (Bardoni és mtsai 1997) excitátoros szinapszisait. A P2X receptorok a hátsó gyöki ganglionban (Dunn és mtsai 2001, Ruan és mtsai 2005), és a primert afferens neuronok szinapszisaiban is kifejeződnek (Bradbury és mtsai 1998, Petruska és mtsai 2000): a fenti expresszió vizsgálatokból sejthető, hogy a P2X receptorok a fájdalom közvetítésének folyamatában fontos szerepet játszanak.

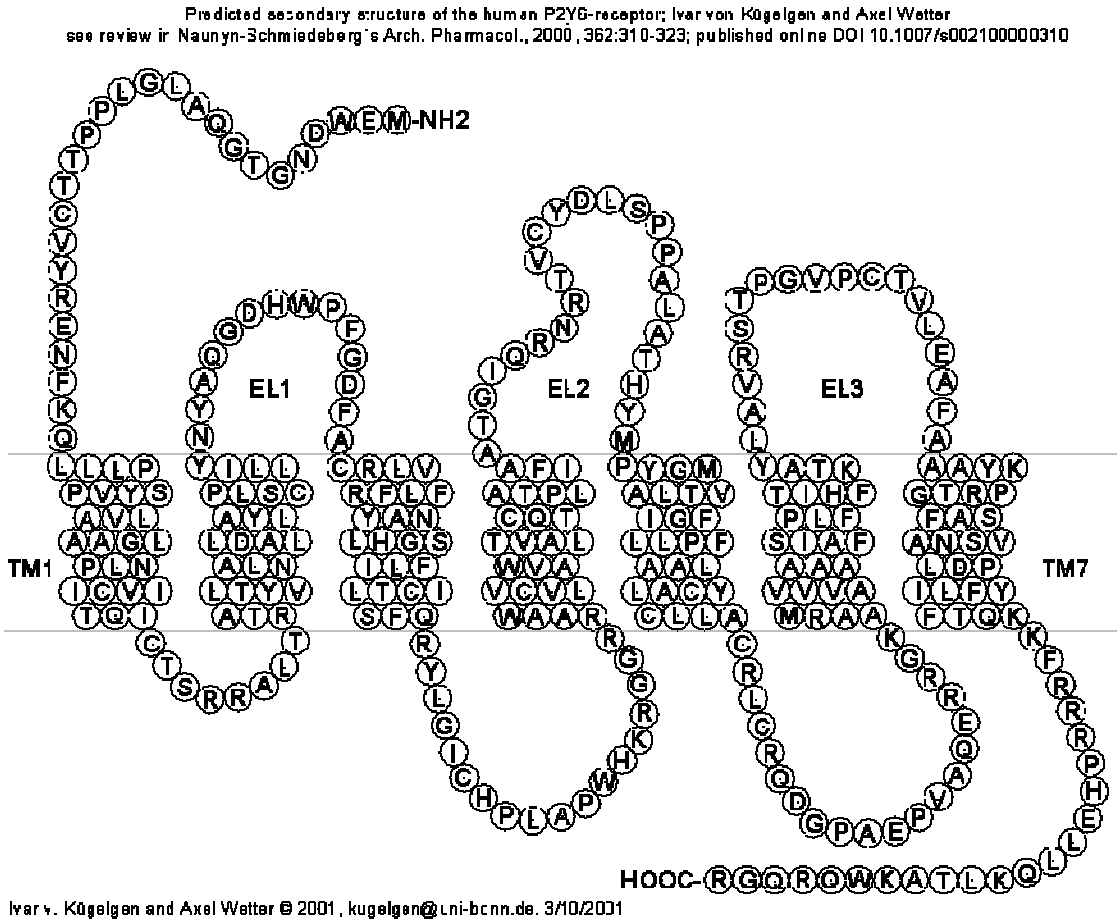


4. ábra: P2X receptor szerkezete. (Eric és mtsai 2009)

2.6.2. A P2Y receptorok

A P2Y receptor család a G proteinekhez kapcsolt, ún. metabotróp receptor nagycsaládba tartozik. Szerkezetükre jellemző az extracellulárisan elhelyezkedő aminoterminális vég, a hét transzmembrán régió és intracellulárisan elhelyezkedő karboxiterminális vég és hurokrendszer (5. ábra). A receptorok leggyakrabban G_q, G_o és G_i fehérjékhez kapcsolódnak, így lassabb, másodperc időtartamú válaszokat közvetítenek a PLC és adenilcikláz transzdukciós útvonalon. A P2Y receptor családnak számos tagját azonosították: a $P2Y_{1,11,12,13}$ receptorok adenin nukleotidokra érzékenyek (Webb és mtsai 1993, Communi és mtsai 1999,2001, von Külgelgen és Wetter 2000, Hollopeter és mtsai 2001), a humán $P2Y_4$ (Chang és mtsai 1995) és $P2Y_6$ receptorok pirimidin nukleotidokra aktiválódnak, viszont a $P2Y_2$ receptornak egyformán endogén ligandjai a purin és pirimidin trifoszfátok (ATP, UDP). A $P2Y_{14}$ receptor az UDP-glukóz és UDP-galaktózra aktiválódik (Burnstock 2006). Az endogén agonistákon kívül érdemes megemlíteni a szintetikus agonista 2-MeSADP-t és 2-MeSATP-t. Antagonisták közül a suramin és a reactive blue 2 széles altípus specificitással rendelkeznek, viszont az MRS2179 csak a $P2Y_1$ receptor altípuson hat. Egy másik, szintetikusan előállított receptor antagonista a 2-methyl-thioAMP (2-MeSAMP), mely specifikusan a $P2Y_{12}$ és $P2Y_{13}$ receptorokon hat (Burnstock 2006).

P2Y receptorok a neuronokon, glia sejteken és az idegrendszer egyéb sejtes elemein (mikroglia) is expresszálódnak, de az eloszlásukról, illetve funkciójukról kevés adat áll rendelkezésre. Annyi bizonyos, hogy $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$ és $P2Y_6$ receptorokat azonosították a szenzoros neuronokon (Hussl és Boehm 2006) illetve, hogy gátolják az N-típusú kalcium csatornákat a hatsó-gyöki ganglionban (Borvendeg és mtsai 2003). A legmeggyőzőbb irodalmi adatatok a P2Y receptorokat a differenciálódási folyamatokkal, a neuro-glia kommunikációval, a pre- és posztszinaptikus neuromodulációval és az idegrendszeri gyulladásos folyamatokkal hozzák összefüggésbe (Burnstock 2006).



5. ábra: P2Y receptor szerkezete.

2.6.3. Adenozin receptorok

Az adenozin receptorok, ugyanúgy mint a P2Y receptorok, a G fehérjéhez kapcsolt receptor nagycsaládba tartoznak. Négy altípusuk ismeretes: az A_1, A_{2A}, A_{2B} és A_3, melyek 36-56% szekvencia azonossággal rendelkeznek (Lornezo and Schwabe 2001). A G fehérjék közül az A_1 és A_3 receptor G_i-hez, az A_1 receptor G_o-hoz, A_{2A} és A_{2B} receptor G_s és G_q-hoz kapcsolódik, mely eredményeként adenilcikláz és foszfolipáz C (PLC) enzimen keresztül serkentik vagy gátolják a K^+ és Ca^{+2} ionáramokat (Burnstock 2006). Az adenozin receptorok nem érzékenyek a nukleotidokra, hanem elsősorban az adenozinra és származékaira érzékenyek, és antagonizálhatók természetes xanthin származékokkal (pl. koffein, teofillin, teobromin). A legismertebb antagonisták a DPCPX (A_1), ZM241385 (A_{2A}), MRS1191 (A_3) és az MRS1754 (A_{2B}).

A_1 és A_3 receptorok nagy sűrűségben expresszálódnak a központi idegrendszer területén (kéreg, hippokampusz, cerebellum, talamusz, agytörzs, gerincvelő), valamint

kisebb sűrűségben a periferiás szövetekben (vas deferens, zsírszövet, szív, lép, mellékvese, gyomor, húgyhólyag). A_{2A} receptor legnagyobb mennyiségben a bazális ganglionban és a limbikus rendszerben mutatható ki, valamint a periferián a vazodilatációban és a trombocita aggregációban van jelentős szerepe. A_{2B} receptor elsősorban a gliasejtekben, emellett a perifiriás szövetekben fejeződik ki.

2.7. A P2X és P2Y receptorok vizsgálata patkány gerincvelő szeleteken: irodalmi előzmények

Először 40 évvel ezelőtt írták le, hogy az ATP szerepet játszik a fájdalom érzés közvetítésében (Collier és mtsai 1966). Későbbi kutatások az találták, hogy az ATP P2X receptorokon keresztül részt vesz a serkentő ingerületátvitelben a gerincvelő hátsó szarvában (Bardoni és mtsai 1997). További vizsgálatok rámutattak arra, hogy a leszálló monoaminerg pályák egy része a gerincvelői hátsó szarv enkefalinerg interneuronjain végződnek, így fokozzák azok működését. Ennek következtében az interneuronokból felszabadult opioid peptidek gátolják a primer afferensből felszabadult neurotranszmittereket (glutamát, P-anyag), és ily módon modulálják az ingerület tovaterjedését a felszálló pályákra (Millan 2002). Laboratóriumunkban (Sperlagh és mtsai 2000) és mások által elvégzett kísérletek (Boehm 1999, Queiroz és mtsai 2003) rámutattak arra, hogy a NA felszabadulása serkenthető a P2X receptorokon keresztül a szimpatikus idegrendszer végződéseiből. Elektrofiziológiai vizsgálatok pedig arra szolgáltattak bizonyítékot, hogy a P2XR-ok aktivációja serkenti a gerincvelő a II. (Li és Perl 1995, Gu és MacDermott 1997, Nakatsuka és Gu 2001, Nakatsuka és mtsai 2003) és V. (Nakatsuka és mtsai 2003) laminában belépő primer afferenesek glutamát felszabadulását. Ez a moduláció P2X3, P2X1/5 és P2X4/6 receptorokon keresztül valósul meg. Kimutatták azt is, hogy a P2Y receptorok gátolják az N-típusú kalcium csatornát a DRG-ben, mely hatás csökkentheti a glutamát felszabadulását a gerincvelő hátsó szarv végződéseiből, így részben ellensúlyozhatja az ATP algogén hatását. (Gerevich és Illes 2004, Gerevich és mtsai 2004).

Ugyanakkor munkánk megkezdése előtt neurokémiai vizsgálatot nem végeztek arra vonatkozóan, hogy a P2 receptorok hogyan befolyásolják a gerincvelő

neurotranszmittereinek, különösképpen a noradrenalin (NA) és a glutamát (GLUT) felszabadulását.

2.8. Valós idejű ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata patkány hippokampusz szeleteken: irodalmi előzmények

ATP és extracelluláris bomlás terméke az adenozin, fontos szerepet játszanak a központi idegrendszer fiziológiás és patológiás működésében. Fiziológiás idegi aktivitást modellező elektromos ingerlés hatására (Wieraszko és mtsai 1989, Cunha és mtsai 1996, Pankratov és mtsai 2006), valamint patológiás körülmények során (oxigén és glukóz megvonás) ATP és adenozin szabadul fel a központi idegrendszerben (Juranyi és mtsai 1999, Frenguelli és mtsai 2007). Az így felszabadult purinok az ionotróp (P2XR) és metabotróp (P2YR) receptorokon keresztül modulálják a szinaptikus aktivitást a központi idegrendszer különböző területein, beleértve a hippokampuszt is (North és Verhratsky 2006, Pankratov és mtsai 2006). Az adenozin, ugyancsak metabotróp adenozin receptorokon (A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3) keresztül, pre- és posztszinaptikusan csökkentik a serkentő neurotranszmissziót fiziológiás és patológiás körülmények között (Cunha 2001). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a P2X receptorok aktivációja glutamát felszabadulást váltott ki az agytörzsben (Jin és mtsai 2004, Kato és mtsai 2001, Khakh és mtsai 1998, Shigetomi és Kato 2004), a hippokampuszban (Rodrigez és mtsai 2005, Sperlagh és mtsai 2002, Khakh és mtsai 2003, Fellin és mtasi 2006, Inoue és mtsai 1992) és kortikális szinaptoszómákban (Patti és mtsai 2006). Ezen hatásokért a következő purin receptor altípusok a felelősek: P2X1 (Rodrigues és mtsai 2005), P2X2 (Khakh és mtsai 2003), P2X3, P2X2/3 (Rodrigues és mtsai 2005) és P2X7 (Sperlagh és mtsai 2002, Shigetimi és Kato 2004, Fellin és mtsai 2006, Patti és mtsai 2006). Emellett megfigyelték azt is, hogy a P2Y receptorok serkentették a glutamát felszabadulást a KIR-ben a $P2Y_4$ (Price és mtsai 2003) és $P2Y_1$ (Domercq és mtsai 2006, Jeftinija 1998) receptorokon keresztül. Más vizsgálatok viszont arra jutottak, hogy az ATP és metabolikusan stabil analógjai gátolták a depolarizáció által kiváltott glutamát felszabadulást agyszeletekben (Bennett és mtsai 2000), valamint a $P2Y_1$, $P2Y_2$ és $P2Y_4$ receptorok aktivációja is gátolta a glutamát felszabadulását a hippokampális piramis sejtekből (Rodrigues és mtsai 2005); továbbá

az ATP extracelluláris bomlásából származó adenozin az A_1 receptoron keresztül ugyanilyen gátló hatást közvetített (Cunha és mtsai 1998, Dunwiddie és mtsai 1997).

Sok tanulmány leírta, hogy a glia sejtek, de leginkább az asztrociták fontos szerepet játszanak a KIR és a környéki indegrendszer kommunikációjában (Araque és mtsai 2001, Haydon 2001, Fellin és Carmignoto 2004). A gliából felszabaduló jelátvivő anyagok közül elsősorban a purinok és a glutamát a glia-neuron és glia-glia kommunikáció fő mediátorai (Nedergaard 1994, Parpura és mtsai 1994, Fields és Burnstock 2006, Halassa és mtsai 2009). Ez a kommunikáció a sejten belül Ca^{2+} raktárak mobilizációjával valósul meg, melyet az asztrociából felszabadult ATP és glutamát triggerelhet (gliotranszmitter), melynek következtében a szomszédos neuronok és az asztrociták között Ca^{2+} hullám generálódik, mely modulálja a szinaptikus transzmissziót és a neurális excitábilitást (Cotrina és mtsai 1998, Fellin és mtsai 2009).

Így pl. a hippokampuszban kimutatták, hogy a Schaffer kollaterálisok elektromos ingerlésének hatására az asztrocitákban aktiválódik az AMPA glutamát receptor, mely ATP felszabadulást okoz, és az így felszabadult ATP és bomlás terméke az adenozin P2Y és A_1 receptorokon (Koizumi és mtsai 2003, Zhang és mtsai 2003, Pascual és mtsai 2005, Serrano és mtsai 2006) keresztül csökkentik a szinaptikus gátlást (Bowser és Khakh 2004).

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ATP és az adenozin legkülönbözőbb patológiás stimulusok hatására szabadulhat fel a hippokampuszból. Jurányi és mtsai 1999-ben, hipoxia és hipoglikémia stimulus hatásásra purinok felszabadulást mértek a patkány hippokampuszban. Az emlős hippokampusz vizsgálatokban ischemia hatására felszabadult ATP és adenozin kiáramlást igazolták (Franguelli és mtsai 2007). Valamint laboratóriumunk korábbi vizsgálata azt bizonyította, hogy interleukin-1 béta hatásásra a patkány hippokampusz szeletekből ATP és adenozin szabadul fel (Sperlagh és mtsai 2004).

Disszertációmban az ATP és egyéb transzmitterek felszabadulását vizsgáltam fiziológiás neuronális aktivitás során, K^+ depolarizáció ingerlésre hatására, egy újonnan bevezetett, a korábban használt módszerekhez képest lényegesen jobb tér-idő felbontású technikával, a mikroleketród bioszenzor módszerrel.

3. CÉLKITŰZÉS

1. A radioizotópos neurotranszmitter felszabadulást tanulmányozó kísérletek segítségével a következő kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

a. A P2-receptorok aktivációja milyen irányban és milyen mértékben befolyásolja a monoamin és aminosav transzmitterek felszabadulását a gerincvelőben?

b. A közvetített hatás milyen mértékben függ az alkalmazott agonisták fajtájától illetve koncentrációjától? (dózishatásgörbe felvétele, agonista profil meghatározása)

c. Milyen P2-receptor altípusokon keresztül közvetítődik a hatás? (szelektív antagonisták használata, receptor altípusok farmakológiai azonosítása)

2. RT-PCR analízis felhasználásával megvizsgáltuk, hogy:

a. Mely P2Y receptor altípusok expresszálódnak a patkány gerincvelő, agytörzs és hátsó-gyöki ganglionban?

3. Real-time bioszenzor technika segítségével választ kerestünk az alábbi kérdésekre:

a. Mi a depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás forrása, mechanizmusa, pontos dinamikája?

b. A K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban milyen P2 és egyéb receptorok (P1, ionotróp glutamát receptor) vesznek részt és milyen receptor-altípusok közvetítik a hatást?

c. Az ATP és a glutamát időben hogyan hatnak egymás felszabadulására?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkben neurofarmakológiai-neurokémiai, anatómiai és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk saját laboratóriumainkban.

Az összes kísérletet a laboratóriumi állatok tartására és használatára vonatkozó NIH útmutatóban vázolt alapelveknek és eljárásoknak megfelelően végeztük, és azokat a Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézeti (KOKI) Munkahelyi Állatetikai Bizottsága hagyta jóvá. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk 12 óra fény és 12 óra sötét ciklusban.

4.1 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) analízis

Hímnemű, 32-40 napos, 140-160 grammos Wistar patkányokat CO_2 belélegeztetéssel érzéstelenítettük, és dekapitáltuk, majd az agyat gyorsan kiemeltük és jéghideg 95% O_2-el és CO_2–dal oxigenizált Krebsoldatba helyeztük. Az agytörzset, hátsó-gyöki gangliont, és a gerincvelőt gyorsan eltávolítottuk, majd folyékony N_2-be gyűjtöttük. A biológiai szövetekből a teljes RNS tartalmat módosított guanilidine isothiocyanate módszerrel végeztük, Trizol izolációs reagenssel segítségével (Invitrogen Life Tehnologies, Rockville, MD, USA). Az RNS mintákat DEPC (diethyl pyrocarbonate) tartamú desztillált vízben oldottuk és a mennyiségét 260 nm-en mért abszorbanciával határoztuk meg. Az RNS-t (1 µg, 2 µL) ReverteAid First Stand cDNA Synthesis Kit-tel (Invitrigen, Carlsbad, CA, USA), random hexamer primereket használva átírtuk cDNS-re. A PCR reakcióban különböző P2Y receptor altípusokra specifikus primereket alkalmaztunk a cDNS-ek amplifikációjára, míg β-aktin primereket a kontroll amplifikációra. A következő primer szekvenciákat használtuk a reakcióban: $P2Y_{12}$ receptor azonosításához: CAGGTTCTCTTCCCATTGCT forward primert és CAGCAATGATGATGAAAACC reverz primert, $P2Y_{13}$ receptor azonosításhoz: GGCATCAACCGTGAAGAAAT forward primert és GGGCAAAGCAGACAAAGAAG reverz primert, míg a β-aktin esetében: ATGGATGACGATATCGCTG forward primert és ATGAGGTAGTCTGTCAGGT reverz primert terveztünk. A GenBank hozzáférési számok a következők voltak: $P2Y_{12}$, NM022800; $P2Y_{13}$, NM001002853 és β-aktin, X03765. Az amplifikáció feltételei a

következők voltak: 5’ kezdeti denaturáció 95°C-on, 5 percig, hot start 80°C-on, majd 94°C-on 1’-ig, 59°C-on 1’-ig és 72°C-on 1’-ig 40 ciklusig, majd végső extenzió 72°C-on, 5’-ig. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel elemeztük.

4.2 Tríciált noradrenalin ([^{3}H]NA) és glutamát ([^{3}H]GLUT) felszabadulás mérése patkány gerincvelőből

A [^{3}H]noradrenalin és [^{3}H]glutamát felszabadulás kísérleteket korábbi munkákban leírtak alapján végeztük el (Sperlagh és mtsai 2002, Papp és mtsai 2004). A kísérletekben hímnemű, 32-40 napos, 140-160 grammos Wistar patkányokat (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, OGR állatház) használtunk fel.

A patkányokat dekapitáltuk, majd a gerincvelőt kiemeltük a gerinccsatornából és jéghideg karbogenizált (95%O_2 + 5% CO_2) Krebs oldatba (összetétele mmol/L-ban: NaCl 113, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $NaHCO_3$ 25, glükóz 11.5, pH 7.4) helyeztük, mely aszkorbinsavat (30 µmol/L) és Na_2EDTA-t (100 µmol/L) tartalmazott. A gerincvelő lumbális szakaszát a környező szövetektől megtisztítottuk, majd McIlwain Tissue Chopper szövetszeletelő segítségével 400 µm-os szeleteket vágtunk. Az így készített szeletek közül a középtájról származó teljesen ép szeleteket használtuk fel a mérésekhez. A gerincvelő szeleteket 30 percen keresztül inkubáltuk 1 mL Krebs oldatban: noradrenalin felszabadulás vizsgálata esetén 37°C-ra melegített oldathoz tríciált noradrenalint adtunk (2.5 µCi/mL, [^{3}H]NA, Amersham), glutamát felszabadulás vizsgálatánál az inkubáció 32°C-on glutamát izotóp (1 µCi/mL, [^{3}H]GLUT, Amersham) jelenlétében történt. Az inkubációt követően a szöveteket 3x6 mL Krebs’ oldattal átmostuk, majd mikroperfúziós kamrákba helyeztük. Ezt követően a preparátumokat folyamatosan 37 ^{o}C-os (noradrenalin), illetve 32 ^{o}C-os (glutamát) karbogenizált Krebs’ oldattal áramoltattunk át 0.65 mL/min sebességgel, ezzel biztosítva a nem specifikusan kötött tríciált noradrenalin és glutamát eltávolítását a rendszerből. Egy 60 perces ekvilibrációs periódust követően a szöveten átfolyó oldatból 3 perces mintákat gyűjtöttünk és meghatároztuk neurotranszmitter (noradrenalin és glutamát) tartalmukat. A mintagyűjtési periódus alatt a 6. illetve 39. percben (S_1, S_2) elektromos téringerlést alkalmaztunk, Grass S88 stimulátor és a perfúziós kamrákba vezetett platinaelektródok segítségével, illetve drogokat a két

ingerlés között a 24. perctől adagoltunk perfúzióban. Az elektromos ingerlési paraméterek a következők voltak: unipoláris négyszögimpulzusok, noradrenalin felszabadulás vizsgálata esetén 40 V, 3 Hz, 1 msec, 2 perc; glutamát felszabadulás vizsgálata esetén 40 V, 15 Hz, 3.5 msec, 1 perc. A kísérletek végeztével a szöveteket 0.5 mL 10% triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 30 perc elteltével a szöveti minták 100 µL aliquotjainak radioaktivitását határoztuk meg. Kísérleteink során felhasznált anyagok a következők voltak: ADP (1 – 30 µmol/L), ATP (10 – 1000 µmol/L), RB2 (30 µmol/L), 2-MeSAMP (10 µmol/L), 2-MeSATP (100 - 300 µmol/L), 2-MeSADP (1 - 30 µmol/L), MRS2179 (10 µmol/L), PPADS (30 µmol/L), NF449 (100 nmol/L), CNQX (10 µmol/L), DPCPX (100 nmol/L), suramin (300 µmol/L). Minden reagenst frissen készítettünk elő. A radioaktivitás mérés és az adatok feldolgozása a „Radioaktivitás mérése” és „Statisztikai analízis” fejezetben leírt módon történt.

4.2.1 Radioaktivitás mérése

A minták radioaktivitását Packard 1900 Tricarb szcintillációs spektrométer (Canberra, Australia) segítségével határoztuk meg. A perfúziós mintákból 0.5 mL aliquotokat, a szöveti mintákból 0.1 mL aliquotokat 2 mL szcintillációs koktélhoz (Packard Ultima Gold) adagoltunk, majd 2 percig mértük a radioaktivitást. A [^{3}H]transzmitter felszabadulást Bq/g-ban, illetve a szövetben aktuálisan jelenlevő radioaktív tartalom százalékában (frakcionális release, %) fejeztük ki. A szöveti trícium felvételt az össz release és a szövetben maradt tartalom összeadásával határoztuk meg. A nyugalmi transzmitter felszabadulást az ingerlést megelőző minta radioaktivitásával fejeztük ki, az elektromos ingerlés által indukált transzmitter felszabadulást (EFS_1, EFS_2,) a görbe alatti terület módszerrel, az ingerlést megelőző minta aktivitásának az ingerlés alatt, illetve az azt követő mintákban mért radioaktivitásaiból való kivonásával számoltuk ki. A vizsgált anyagok hatását az ingerlés által kiváltott [^{3}H]transzmitter felszabadulásra az EFS_2/EFS_1, hányadosokkal fejeztük ki.

4.3 $P2Y_1$-receptor immunhisztokémia

Hímnemű 140-160 grammos Wistar patkányokat használtunk. A kísérleti állatokat dekapitáltuk, a sérülésmentesen eltávolított gerincvelőt a gerinccsatornából, majd fixáló oldatba helyeztük (4% paraformaldehid (Merck, Darmstadt, Germany) 0.1 M foszfát pufferben (PB), pH 7.4). A fixálás aznap szobahőmérsékleten váltott fixáló oldatokkal, éjszaka 4 ºC-on folytatódott. A fixáló oldatot másnap PB-rel kimostuk és a gerincvelőből Leica vibratommal (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 35µm-es keresztmetszeti szeleteket vágtunk. A festések során rázókészüléket alkalmaztunk, hogy a szeletek ne tapadhassanak egymáshoz és az oldatokkal szabadon érintkezhessenek.

4.3.1 Immunfluoreszcens festés

A szeleteket blokkoló oldatban (5% BSA (bovine serum albumin) PBS-ben (phosphate-buffered saline)) tartottuk egy órán át, szobahőmérsékleten, hogy lekössük a nem specifikus kötőhelyeket, majd az első antitestekkel, a VGLUT1 (vesicular glutamate transporter1- vezikuláris glutamate transzporter1, Synaptic Systems, Goettingen, Germany) nyúl poliklonális antitest 1:3000 hígításban, ill. a $P2Y_1$ receptor elleni antitest (nyúl, poliklonális, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) 1:200 hígítású oldatában tartottuk egy éjszakán át hűtőszekrényben, 4ºC-on. A VGLUT1 antitest affinitás kromatográfiával tisztított fehérje volt, amit a patkány VGLUT1 456-560 aminosavrészlete ellen állítottak elő, míg a $P2Y_1$ antitestet a patkány illetve humán $P2Y_1$ receptor 242-258 aminosav-szekvenciája ellen termeltették. Az elsődleges antitestek PBS-sel történt gondos kimosása után a szeleteket Alexa Fluor488 vagy Alexa Fluor594 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kecskében termelt nyúl IgG elleni másodlagos antitest 1:500 hígítású oldatában, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk 2 órán át. Az antitestek desztillált vizes kimosása után a szeleteket tárgylemezre húztuk, VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) segítségével lefedtük és SPOT RT színes digitális kamerával (Diagnostic Instrument Inc. Sterling Heights, MI, USA) felszerelt Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) vizsgáltuk. A készített képeket az Adobe Photoshop 8.0

program (Adobe Systems, Mounted View, CA, USA) segítségével szerkesztettük. Kontroll kísérletekben az első antitest helyett friss blokkoló oldatot alkalmaztunk.

4.3.2 Fény- és elektronmikroszkópia

A szöveti endogén peroxidáz aktivitást 3% H_2O_2 (15 perc, szobahőmérséklet) oldat alkalmazásával megszüntettük, a H_2O_2 nyomait pedig 0.1 M PBS-sel történt mosással távolítottuk el. Ezt követően a Triton X100 kis koncentrációban való alkalmazása (0.1%, 15 perc) segítette az antitesteknek a metszetekbe való bejutását és áthatolását. Gondos mosás után 5% normál kecske szérummal blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket (szobahőmérséklet, 2 óra), majd az elsődleges antitestekkel inkubáltuk a szeleteket: 1:3000 VGLUT1 (Synaptic Systems) vagy 1:200 $P2Y_1$ (Alomone Labs). Ismételt PBS-mosás után biotinilált nyúl IgG elleni általános másodlagos antitestet használtunk (szobahőmérséklet 2 óra) majd a Vector ABC-3,3 diaminobenzidine (DAB) készletet használtuk a gyártó előírása szerint (Vector Laboratories). Az immunreaktivitást mutató helyeken barna csapadék képződött. Azokat a metszeteket, melyeket fénymikroszkóppal akartunk vizsgálni, PBS-sel történt mosás majd tárgylemezre húzás és rászárítás/víztelenítés után Canada balzsammal fedtük le. A mikroszkópos képek Olympus 70D kamerával és DPC Controller programmal (Olympus Ltd., Tokyo, Japan) felszerelt Zeiss Axioplan2 mikroszkóppal készültek. Azokat a metszeteket, melyeket elektronmikroszkópos vizsgálatra szántunk 1% OsO4 (Taab Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, England) oldatban szobahőmérsékleten, 30 percig utófixáltuk, majd felszálló alkoholsorban (50, 70, 90, 96, abszolut alkohol) víztelenítettük. (A 70%-os alkohol 2% uranilacetátot tartalmazott, ami a metszetek elektronmikroszkóppal történt vizsgálatát segíti azzal, hogy a fehérjékhez kötődve a szerkezetet láthatóvá teszi. Az ozmium - ugyancsak nehézfém - a lipidekhez kötődve teszi ezt.) A teljes víztelenítés után a gerincvelő szeleteket Taab 812 epoxigyantába (Taab Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, England) ágyaztuk, 60ºC-on, 12 órán át polimerizáltuk, majd Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 50-70 nm–es metszeteket készítettünk, melyeket a Hitachi 2001 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi, Tokyo, Japan) vizsgáltunk. A kontroll vizsgálatokban az elsődleges antitestek helyett itt is friss blokkoló oldatot használtunk.
Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Kittel Ágnes végezte.

4.4 Extracelluláris és bioszenzoros elvezetés

4.4.1. Patkány hippokampusz szeletek előkészítése

A kísérletekben 4 hetes, 85-110 grammos hím Wistar patkányokat használtunk fel. A patkány dekapitációja után a koponyatetőt a durával együtt eltávolítottuk, az agyat kiemelve azonnal jéghideg módosított aCSF oldatba helyeztük, amely 11 mmol/L Mg^{2+}-t tartalmazott. A hippokampuszokat megtisztítva a környező szövettől 400 µm vastagságú szeleteket készítettünk vibratome segítségével (Microm HM 650 V, Microm International GmbH, Walldorf, Germany). A szeletek előkészítését korábban leírt módszerek (Dale és mtsai 2000, Frenguelli és mtsai 2003) szerint készítettük. Az így elkészített szeleteket 1 órán át inkubáltuk egy szövet szelet tároló kamrában, melyet 95% O_2 és 5% CO_2 tartalmú gázkeverékkel buborékoltattunk át. A szövetszelet tartó kamrában standard aCSF oldatot használtunk, mely összetétele a következő volt: NaCl (127 mmol/L), KCl (1.9 mmol/L), KH_2PO_4 (1.2 mmol/L), $MgSO_4$ (1.3 mmol/L), $CaCl_2$ (2.4 mmol/L), $NaHCO_3$ (26 mmol/L), D-glükóz (10 mmol/L), pH 7.4, az oldat 2 mmol/L glycerolt is tartalmazott. A glycerol jelenléte az oldatban az ATP bioszenzor optimális működéséhez szükséges.

4.4.2. Extracelluláris elvezetés patkány hippokampusz szeletekből

Az előkészített szeleteket áthelyeztük egy perfúziós kamrába, melyben 6 mL/perc sebességgel aCSF oldatot áramoltattunk. A hippokampusz CA1 régió *stratum radiatum* rétegében, a Schaffer kollatérálisok ingerlése (Parallel bipolar elektrodes, FHC Inc, Bowdoin, ME, USA) következtében létrejött mező serkentő posztszinaptikus potenciálokat (fEPSP) aCSF-fel feltöltött üveg mikroelektróda (1B150F-4, < 2 MΩ, Word Precision Instuments Inc, Sarosota, FL, USA) segítségével vezettük el. Az ingerlés paraméterei a következők voltak: 3-7 V, 0.1 ms, 15 másodperc. Az extracelluláris DC elvezetéseket aCSF oldattal feltöltött boroszilikát üveg pipetta (GC120F-10, 4-7 MΩ, Havard Apparatus, Holliston, MA, USA) segítségével végeztük. A fEPSP jeleket AC módban egy ISO-80 bio-amplifier (Word Precision Instuments Inc, Sarosota, FL, USA) készülékkel, míg az extracelluláris DC jeleket Multiclamp 700A

típusú (Molecular Deviced Inc. Sunnyvale, CA, USA) műszerrel felerősítve, pCLAMP 9 szoftver (Molecular Deviced Inc. Sunnyvale, CA, USA) segítségével 10kHz-en rögzítettük. Az elvezetéseket a Femtonics Kft. által fejlesztett szoftver (Curve Analysis) segítségével elemeztük ki.

4.4.3. ATP, adenozin, inozin és GLUT bioszenzor elvezetés patkány hippokampusz szeletekből

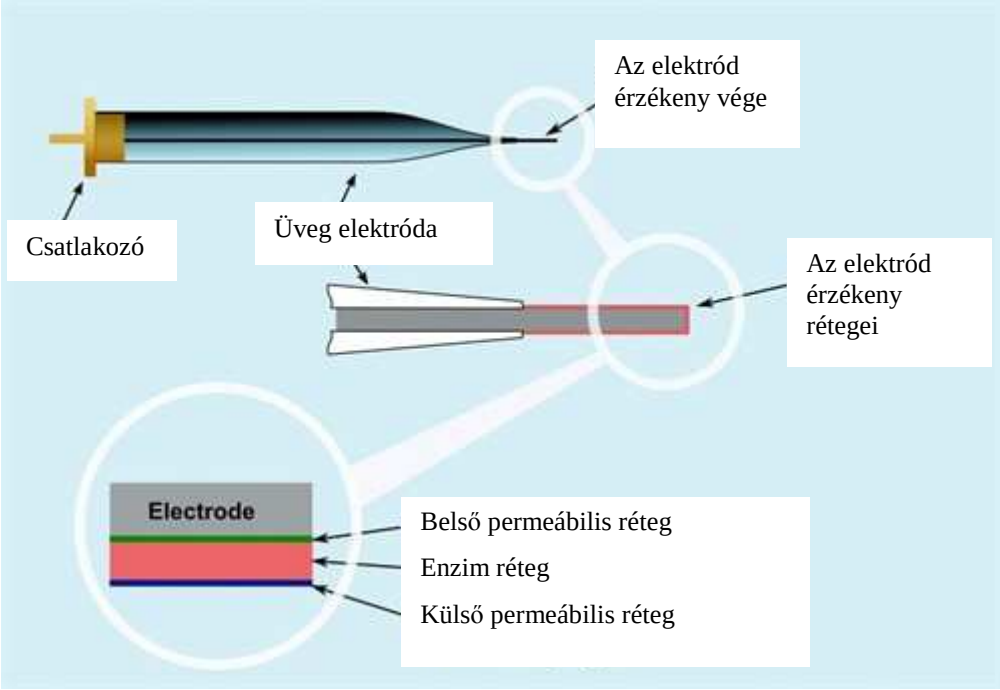
4.4.3.1. A bioszenzorok felépítése

A kontinensen elsőként általunk használt módszert Llaudet és mtsai (2003, 2005) alapján validáltuk és állítottuk be. A munkánk során használt bioszenzorokat a Sarissa Biomedical cégtől (Coventry, UK) szereztük be. A szenzorok 50 µm ámérőjű és 0,5 mm hosszú platina szálai enzimekkel vannak bevonva, melyek ATP, adenozin, inozin, illetve glutamát jelenlétében H_2O_2-t termelnek, amit elektrokémiailag detektálni tudunk (6. ábra). Az ATP szenzort két enzim: a glycerol-kináz (EC 2.7.1.3) és a glycerol-3- foszfát oxidáz (EC 1.1.3.21); az adenozin szenzort (ADO) három enzim: az adenozin-deamináz (EC 3.5.4.4), a nukleozid-foszforiláz (EC 2.4.2) és a xantin-oxidáz (EC 1.1.3.22) (Llaudet és mtsai 2003 és 2005); míg a glutamát szenzort (GLUT) a glutamát-oxidáz (EC 1.4.3.11) enzim építi fel (Tian és mtsai 2009).

A mérés során kettős elvezetést használunk: az ATP és GLUT szenzor esetében párhuzamosan NULL szenzort is alkalmaztunk. A NULL szenzor szerkezetileg megegyezik az ATP és GLUT szenzorral, csak az enzimek a felületén blokkolva vannak, így a szenzorok nem érzékelik az ATP és glutamát jelenlétét a szenzor közvetlen környezetében, így a szenzor alkalmas a háttérzaj regisztrálására: ATP és GLUT szenzor esetében a szenzor által regisztrált jelből kivonjuk a NULL szenzor által regisztrált háttérzajt, így a nettó ATP és nettó glutamát jelet (netATP, netGLUT) kapjuk. Az ADO szenzor a detekciós felülete közelében lévő adenozin és inozin jelenlétére is érzékeny, ezért a méréseket úgy terveztük, hogy az adenozin szenzor jelenlétében párhuzamosan INO szenzort is használunk, így a nettó adenozin (netADO) jelet úgy határozzuk meg, hogy az ADO szenzor jeléből kivonjuk az INO szenzor jelét. Az INO szenzor érzékeny felületén az adenozin-deamináz enzim blokkolva van, ezért a

szenzor csak a környezetében lévő inozinra lesz érzékeny. Ily módon a „netADO” csak az adenozin jelenlétét reprezentálja.

Az amperometriás méréseket perfúziós rendszerben végeztük 34-36 °C-on, 500-700mV (vs. Ag/AgCl) referencia elektród jelenlétében. A mikroelektród-bioszenzorokat behelyeztük a perfúziós kamrába és recirkuláltuk a szenzorokat -0.5 és +0.5 mV-on. Ezt követően aCSF oldatban higított öt különböző koncentrációjú ATP (300 nmol/L – 50 µmol/L), adenozin (300 nmol/L – 50 µmol/L), inozin (300 nmol/L – 50 µmol/L) és glutamát (100 nmol/L – 30 µmol/L) oldatot mostunk be a kamrába, melyre a szenzorok gyors áramleadással válaszoltak. Valós időben folyamatosan 10 kHz-es mintavételezési sebességgel regisztráltuk a szenzorok által leadott áramokat (pCLAMP, Molecular Deviced Inc. Sunnyvale, CA, USA). A standard kalibrációs egyenest a regisztrált görbék maximuma alapján készítettük el.



6. ábra: A mikroelektród bioszenzor sematikus ábrája (Forrás a gyártó honlapja: http://www.sarissa-biomedical.com/products.aspx).

4.4.3.2 Mikroelektród bioszenzor kísérletek tervezése

Minden kísérlet előtt ismert koncentrációjú ATP (10 µmol/L), adenozin (3 µmol/L), inozin (10 µmol/L) és glutamát (10 µmol/L) mérésével ellenőriztük a szenzorok érzékenységét. A következő lépésben a vizsgálni kívánt 400 µm hippokampusz szeleteket belehelyeztük a szuperperfúziós (áramlási sebesség: 6

mL/perc) rendszer kamrájába. A szenzorok érzékeny végét óvatosan belehelyeztük mikromanipulátorok segítségével a hippokampusz szeletek CA1 régiójába, figyelve arra, hogy a bioszenzorok közel legyenek egymáshoz, de ne érjenek össze. 20 perc ekvilibrációs periódus eltelte után a szenzorok elérték a „steady-state" alapvonalat, ezután kezdtük el a mintavételezést. A mérések során általában a következő mérési lépéseket követtük: a mintavétel első percében a patkány hippokampusz szeleteket magas K^+ tartalmú (26.9 mmol/L) aCSF oldattal ingereltük 270 másodpercen keresztül. Mivel az ingerléshez használt oldat magas K^+ tartalma jelentősen megnöveli a pozitív töltésű ionok mennyiségét a módosított aCSF oldatban, ezért az oldat Na^+ ion tartalmát ennek megfelelően csökkentettük (102 mmol/L). Azokban a kísérletekben, melyekben valamilyen gátlószer hatást vizsgáltunk, az antagonistát tartalmazó aCSF oldatot 20 perccel a K^+ depolarizáció előtt juttattuk a hippokampusz szeletre. Ez alól kivételt fluoroacetát (FAc, 1 mmol/L) képezett, amelyet a glia-szelektivitás elérése céljából 10 perccel a K^+ depolarizáció előtt juttattunk a rendszerbe. Kísérleteinkben a következő anyagokat használtuk: anandamide (10 µmol/L), ARL67156 (100 µmol/L), AZ10606120 (0.1 µmol/L), CBX (20 és 100 µmol/L), dipyridamol (50 µmol/L), BBG (0.1 µmol/L), CNQX (10 µmol/L), D-AP-5 (10 µmol/L), ifenprodil (10 µmol/L), probenecid (150 µmol/L), TTX (3 µmol/L). A Ca^{2+} mentes aCSF oldathoz hozzáadtunk 1 mmol/L EGTA-t, mely a maradék extracelluláris Ca^{2+} megkötését segítette. Minden anyagot friss aCSF oldatban oldottunk fel a kísérlet előtt.

4.6 Statisztikai analízis

Az összes adatot *n* számú megfigyelések átlag±S.E.M-ként határoztuk meg. Szignifikáns különbségek kimutatásához egy-szempontú varianciaanalízist (ANOVA) követő Dunnett post hoc tesztet (többszörös összehasonlítás) vagy Student t-tesztet (páros összehasonlítás) végeztünk. A statisztikai hibahatárnak $P < 0.05$ értéket fogadtuk el. A droghatást jellemző kvantitatív farmakológiai paramétereket (IC_{50}) értékeket a Prism görbeillesztő program segítségével (Graph Pad, San Diego, CA) számoltuk ki.

5. EREDMÉNYEK

5.1 P2X és P2Y receptorok szerepe patkány gerincvelőben

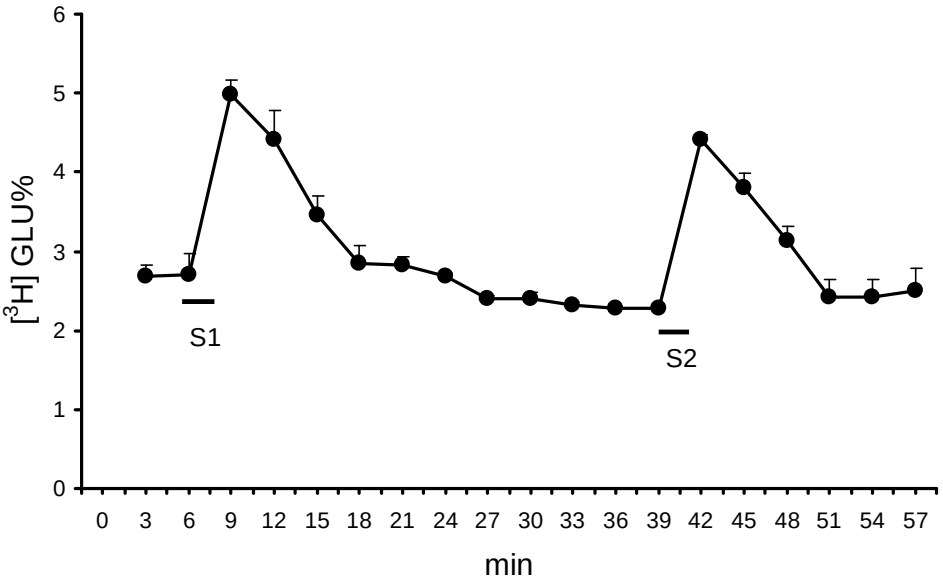
5.1.1 Tríciált glutamát felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben

A purinok különféle P2 receptoron keresztül hatnak, beleértve az ionotróp P2X és G-protein kapcsolt metabotróp P2Y receptor családokat. Kísérleteinkben a P2 receptor altípusok szerepét vizsgáltuk a patkány gerincvelő szeletekből mért tríciált glutamát felszabadulásra. A nyugalmi trícium kiáramlás ezekben a kísérletekben 3.097 ± 0.160 % volt (n=8). Elektromos téringerlés (40 V, 15 Hz, 3.5 msec, 1 perc) jelentős (EFS_1=6.330 ± 0.342%, EFS_2=6.016 ± 0.040%) és jól reprodukálható (EFS_2/EFS_1= 1.01 ± 0.07, n=8) [^{3}H]glutamát felszabadulást idézett elő (2. táblázat, 7. ábra).

2. táblázat: Trítciált neurotranszmitterek szöveti felvétele és kiáramlása az első (EFS_1) illetve a második elektromos téringerlés (EFS_2) alatt, valamint a bazális kiáramlás a patkány gerincvelő szeletekből.

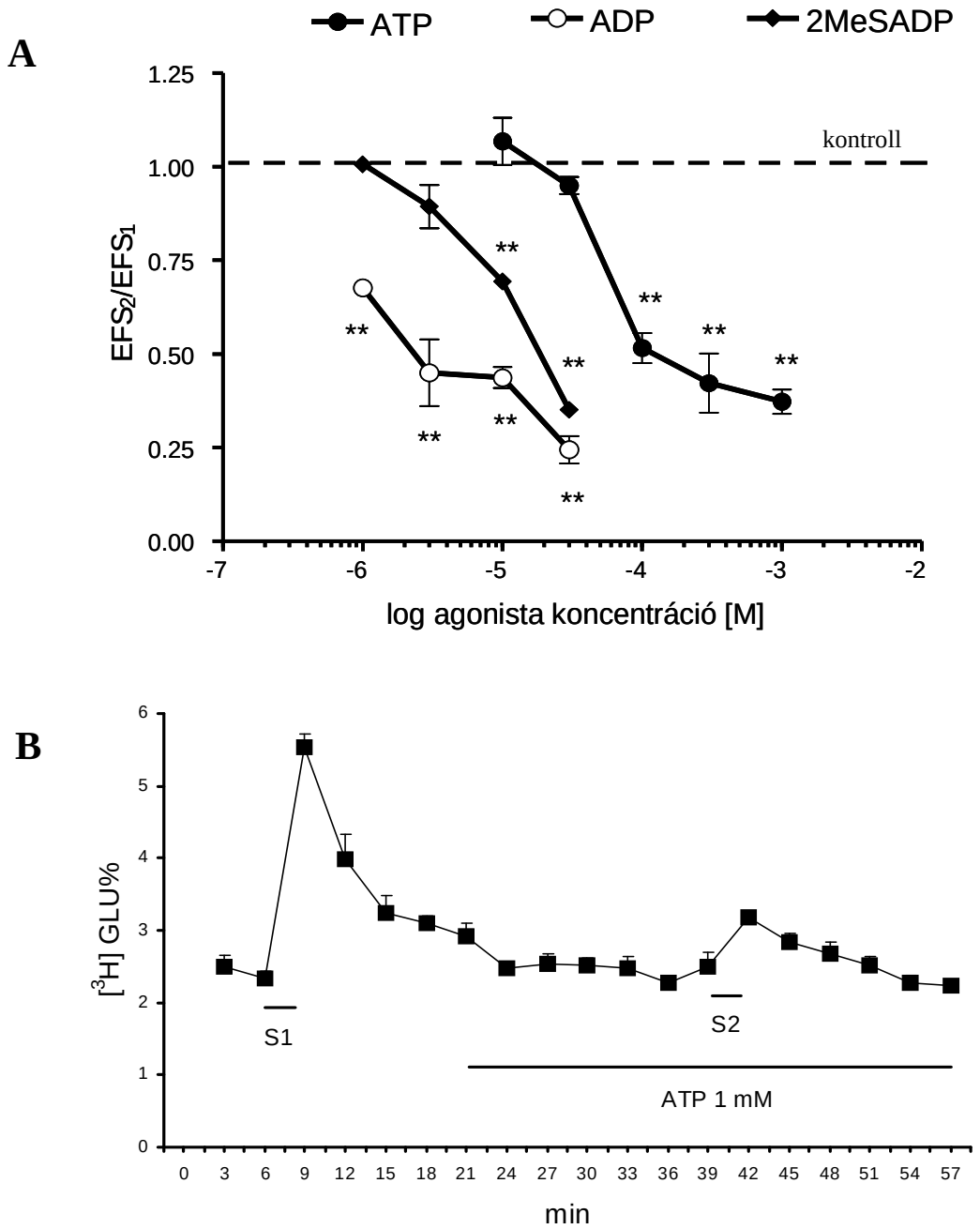
	Szöveti felvétel (Bq/g)	Kiáramlás (%)		Bazális kiáramlás (%)
		EFS_1	EFS_2	
[^{3}H]GLUT	$1.07\pm0.29\times10^5$(n=8)	6.330±0.342(n=8)	6.016±0.040(n=8)	3.097±0.160(n=8)
[^{3}H]NA	$2.55\pm0.56\times10^5$(n=8)	1.363±0.136(n=8)	1.136±0.083(n=8)	0.437±0.015(n=8)

Az elektromos ingerlést (3-ik és 14-ik mintavétel) követően a [^{3}H]GLUT kiáramlás gyorsan visszatért a nyugalmi szintre (7. ábra). A fent leírt kísérletek átlaga a kontroll kísérlet (7. ábra), melyhez a további eredményeket viszonyítottuk.



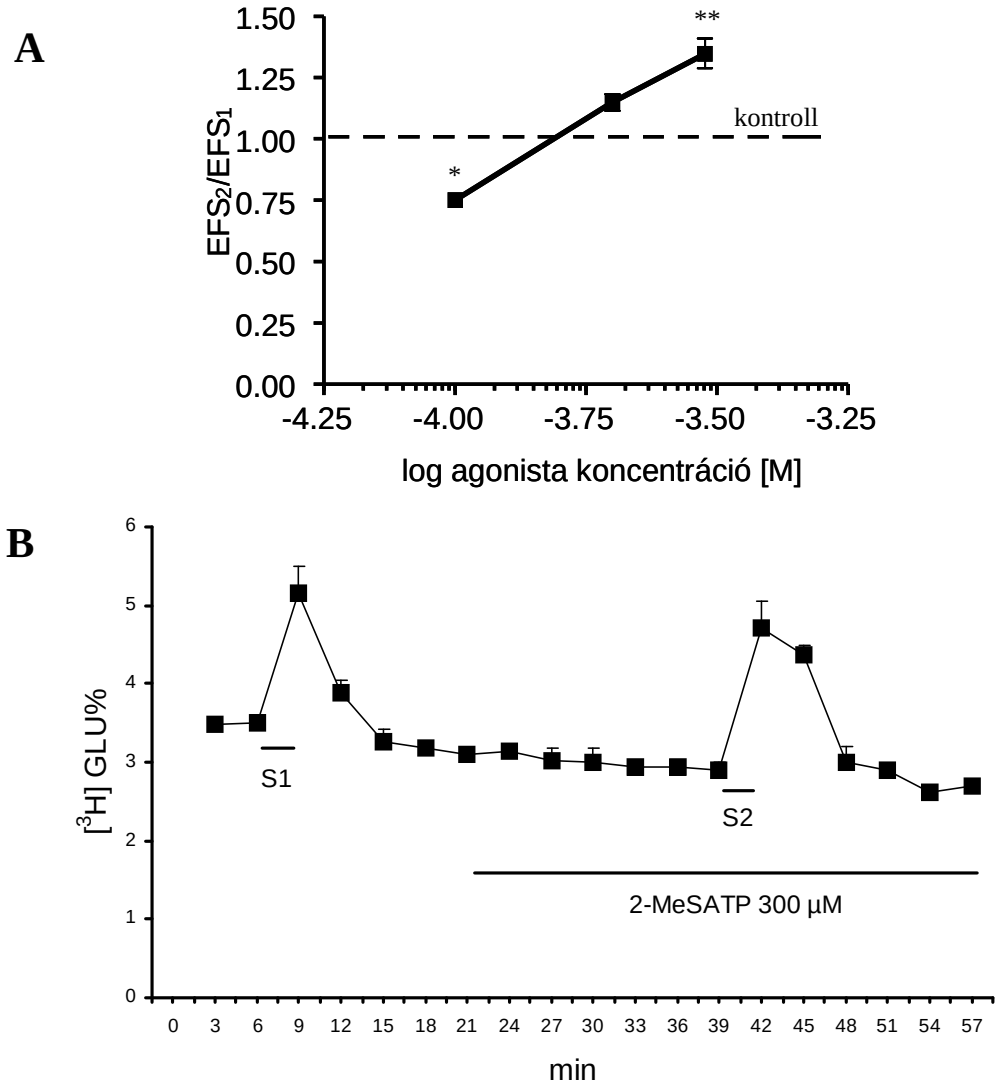
7. ábra: Elektromos téringerlésre (40V, 15 Hz, 3.5ms, 1 perc) kiváltott tríciált glutamát felszabadulás kontroll kísérletben. 60 perces előperfúzió után elektromosan ingereltük (S_1, S_2) a szeleteket. A tríciált glutamát felszabadulást a mintagyűjtés idején, a szövetben aktuálisan jelenlévő radioaktivitás százalékaként fejeztük ki (frakcionális felszabadulás). A görbék 8 egyedi kísérlet átlaga ± S.E.M. értékeit mutatják. Az X tengely az időt percben, az Y tengely a tríciált glutamát frakcionális felszabadulás százalékát mutatja.

Az 1 mmol/L EGTA-val kiegészített Ca^{2+} mentes Krebs' oldat perfúziója esetén az elektromos ingerlés által kiváltott tríciált glutamát felszabadulás 90 százalékkal csökkent. A kísérleteket a P2 receptor agonisták vizsgálatával folytattuk. Az ATP, ADP és 2-MeSADP kezelés koncentráció függően csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [^{3}H]glutamát felszabadulást a következő hatás erősségi sorrendben (8. ábra): ADP > 2-MeSADP > ATP, miközben a bazális trícium felszabadulást nem befolyásolták. A legnagyobb mértékű gátlás ADP jelenlétében volt megfigyelhető (63.15 ± 2.88%), a számolt IC50 érték ez esetben 70.1 µmol/L-nak bizonyult.



8. ábra: A. Különböző P2-receptor agonisták hatása a tríciált glutamát felszabadulásra patkány gerincvelő szeleteken. (A) Az agonisták koncentráció hatás görbéi. Az X tengely a agonisták koncentrációját mutatja logaritmus skálán mólban, az Y tengelyen pedig az EFS_2/EFS_1 hányadosokat ábrázoltuk (l. Anyagok és Módszerek 4.2.1.). A csillagok a kontrollra vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (**$p<0.01$, n=4-8). **(B)** Az ATP (1 mmol/L) hatása. Az X tengely az időt percben, az Y tengely a tríciált glutamát frakcionális felszadadulás százalékát mutatja. A görbe az egyedi mérések átlag ± S.E.M. értékeit mutatja.

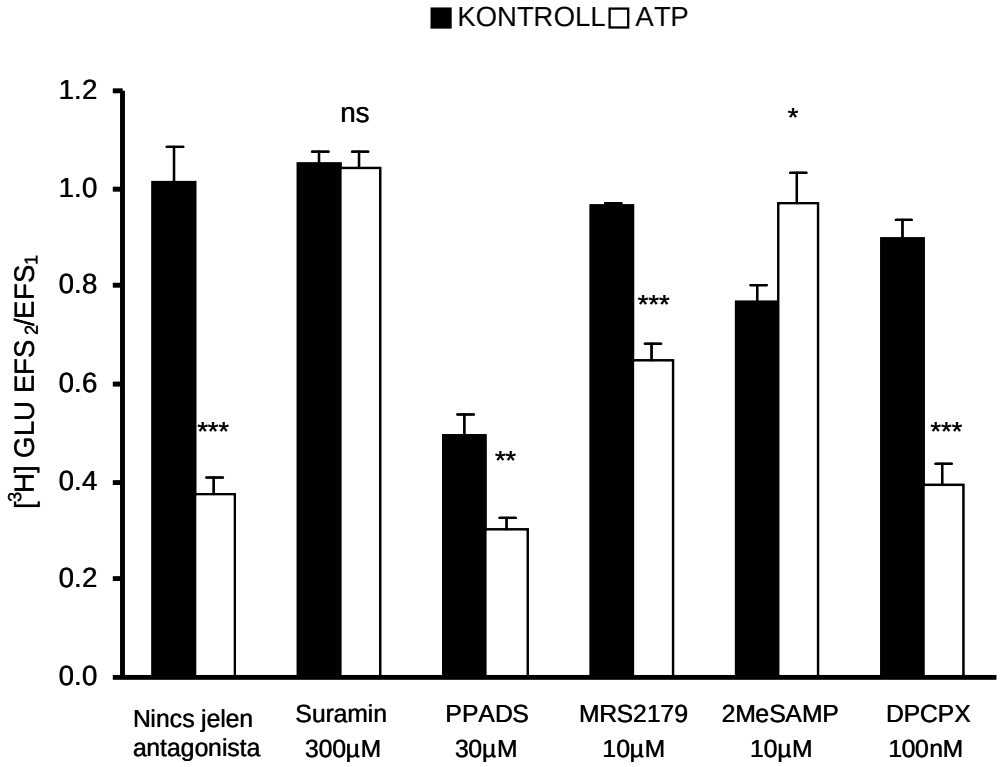
A P2 receptor agonista ATP metabolikusan stabil analógja a 2-MeSATP 100 µmol/L koncentrációban szignifikánsan gátolta, míg magasabb (200 µmol/L - 300 µmol/L) koncentrációban fokozta a patkány gerincvelő szeletekben az ingerlés által kiváltott [^{3}H]GLUT kiáramlást (9. ábra).



9. ábra: 100 – 300 µmol/L 2-MeSATP hatása a tríciált glutamát felszabadulásra patkány gerincvelő szeleteken. (A) Az X tengely a 2-MeSATP koncentrációját mutatja logaritmus skálán mólban, az Y tengelyen pedig az elektromos ingerlések (S_1, S_2) által indukált transzmitter felszabadulás hányadosát ábrázoltuk a 2-MeSATP jelenlétében. A csillagok a kontrollra vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (*$p<0.05$, **$p<0.01$, n=4-8). **(B)** Az X tengely az időt percben, az Y tengely a tríciált glutamát

frakcionális felszabadulás százalékát mutatja. A görbe az egyedi mérések átlag ± S.E.M. értékeit mutatja.

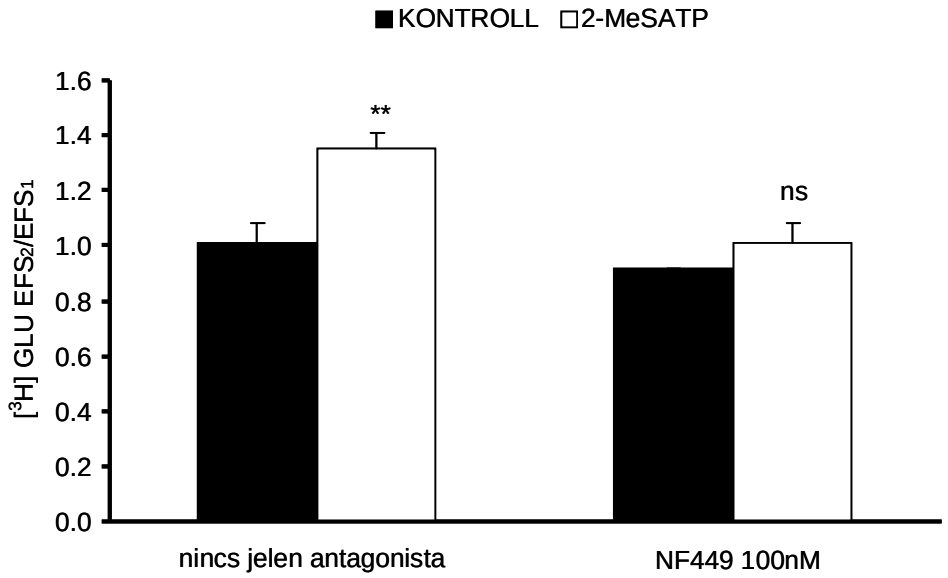
A következőkben az ATP (1 mmol/L) gátló hatásának receptor szintű hátterére voltunk kíváncsiak. A nem-szelektív P2 receptor antagonista suramin (300 µmol/L), illetve a $P2Y_{12,13}$ receptor szelektív antagonista 2-MeSAMP (10 µmol/L) kivédte az 1 mmol/L ATP gátló hatását (10 ábra). Ezekkel az eredményekkel ellentétben a PPADS (30 µmol/L, 38.96 ± 8.1%) és a $P2Y_1$ szelektív antagonista MRS2179 (10 µmol/L, 32.63 ± 1.36%) csak részlegesen ellensúlyozták az ATP gátló hatását. A kísérletben agonistaként használt ATP hidrolízise során jelentős mennyiségű adenozin képződik, melyek különböző adenozin-receptorokon hatva P2 receptoroktól függetlenül is modulálhatják a transzmitter felszabadulást. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára a következő kísérletet végeztük el. A szeleteket P1 (A_1)-adenozin receptor antagonista DPCPX (100 nmol/L) oldattal kezelve nem tapasztaltunk változást az ATP glutamát felszabadulásra gyakorolt gátló hatásában (10. ábra), vagyis ebben a hatásban adenozin receptorok nem vesznek részt.



10. ábra: Az ATP hatása az elektromos ingerlés által kiváltott [^{3}H]glutamát felszabadulásra antagonisták jelenlétében és hiányában patkány gerincvelő szeletekben. Az ATP-t a második elektromos ingerlés (S_2) előtt adtuk 18 perccel, míg az antagonisták az

egész kísérlet alatt folyamatosan jelen voltak. A fekete oszlopok (KONTROLL) az antagonista jelenlétében, a fehér oszlopok (ATP) az agonista és antagonista együttes jelenlétében mért EFS_2/EFS_1 hányadosokat mutatják. A csillagok a kontrollra (KONTROLL) vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001, n=3-8).

A továbbiakban a 2-MeSATP (300 µmol/L) serkentő hatását vettük górcső alá. A szelektív P2X1 receptor antagonista NF449 100 nmol/L koncentrációban szignifikánsan kivédte a 2-MeSATP tríciált glutamátra kifejtett serkentő hatását patkány gerincvelő szeletben (11. ábra).



11. ábra: A 2-MeSATP (300 µmol/L) hatása az elektromos ingerlés által kiváltott [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra NF449 jelenlétében és hiányában patkány gerincvelő szeletekben. A fekete oszlopok (KONTROLL) az antagonista jelenlétében, a fehér oszlopok (2-MeSATP) az agonista és antagonista együttes jelenlétében mért EFS_2/EFS_1 hányadosokat mutatják. A csillagok a kontrollra (KONTROLL) vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (ns>0.05, **P<0.01 n=3-8).

Amennyiben az antagonistákat 18 perccel a második elektromos stimulus (S_2) előtt tettük a perfúziós oldatba, a PPADS és a 2-MeSAMP önmagukban szignifikánsan csökkentették, míg a suramin, az MRS2179 és a NF449 önmagukban nem okoztak szignifikáns változást a elektromosan stimulált tríciált glutamát felszabadulásban patkány gerincvelő szeletekben (3. táblázat).

3. táblázat: Az P2 receptor antagonisták hatása az elektromos téringerlésre kiváltott tríciált noradrenalin és glutamát felszabadulásra. (NA= nem vizsgáltuk)

	[^{3}H]Noradrenalin			[^{3}H]Glutamát		
Hatóagyag (µmol/L)	**EFS_2/EFS_1**	**n**	**Szignifikancia**	**EFS_2/EFS_1**	***n***	**Szignifikancia**
Kontroll	0.92±0.03	8		1.01±0.07	8	
Suramin (300)	1.17±0.02	8	p<0.01	1.19±0.04	4	p>0.05
PPADS (30)	0.74±0.01	4	p<0.05	0.78±0.03	4	p<0.05
MRS 2179 (10)	0.95±0.04	8	p>0.05	0.95±0.04	4	p>0.05
RB2 (30)	1.07±0.05	4	p>0.05	NA	NA	NA
2-MeSAMP (10)	0.93±0.02	4	p>0.05	0.60±0.01	4	p<0.01
NF 449 (0.1)	0.81±0.03	4	p>0.05	0.89±0.02	4	p>0.05

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a P2Y receptorok által mediált gátló hatás a glutamát kiáramlásra a serkentő vagy a gátló transzmisszó közvetítésén keresztül valósul-e meg. Ennek kiderítése végett további kísérleteinkben megvizsgáltuk az excitátoros transzmisszió részvételét az elektromosan kiváltott [^{3}H]glutamát felszabadulásában. A szelektív NMDA receptor blokkoló AP-5 (10 µmol/L) és a nem-NMDA receptor blokkoló CNQX (10 µmol/L) szignifikánsan csökkentették az ingerlés által kivátott [^{3}H]GLUT kiáramlást. A CNQX és AP-5 emellett kivédte az 1 mmol/L -os ATP gátló hatását az elektromos ingerlésre kiváltott [^{3}H]GLUT kiáramlásra (4. táblázat). Ezzel ellentétben a GABA A-receptor antagonista bicuculline (100 µmol/L) nem okozott változást az ATP-nek a tríciált glutamát felszabadulásra gyakorolt gátló hatásában (EFS_2/EFS_1= 0.477± 0.061, n=8).

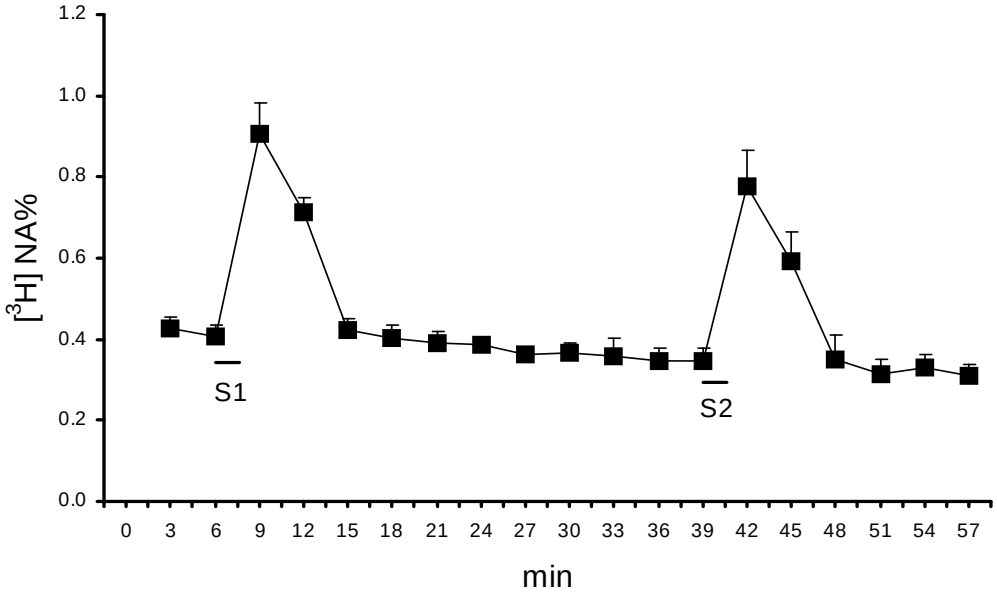
4. táblázat: CNQX és AP-5 hatása a patkány gerincvelő szeletek elektromosan stimulált [^{3}H]glutamát felszabadulására. (a) A CNQX és AP-5-t a második stimuláció előtt 21 perccel adtuk a perfúziós oldatba. **(b)** Az antagonisták mindkét elektromos stimuláció (S_1, S_2) alatt jelen voltak a kísérletben. Az ATP-t mindig a második stimuláció előtt 18 perccel adtuk a perfúziós rendszerbe. A p érték a CNQX+AP-5-el kezelt és kezeletlen kísérletek között számolt szignifikanciát mutatja. A csillagok az ATP-vel indukált és az ATP jelenléte nélkül végzett kísérletek statisztikai eredményeit mutatja (** p<0.001, n=elemszám).

	Kontroll		**+CNQX + AP-5**		
	[^{3}H]GLUT	***n***	**[^{3}H]GLUT**	***n***	**Szignifikancia**
Nyugalmi kiármlás (%)	3.097±0.160	8	2.013±0.062^a	4	p<0.0001
EFS_2 (%)	6.016±0.040	8	0.613±0.050^a	4	p<0.0001
EFS_2/EFS_1					
-	1.013±0.070	8	0.269±0.020^a	4	p<0.0001
			0.613±0.050^b	4	
+ ATP (1 mmol/L)	0.373±0.032**	8	1.377±0.038^b**	4	p<0.0001

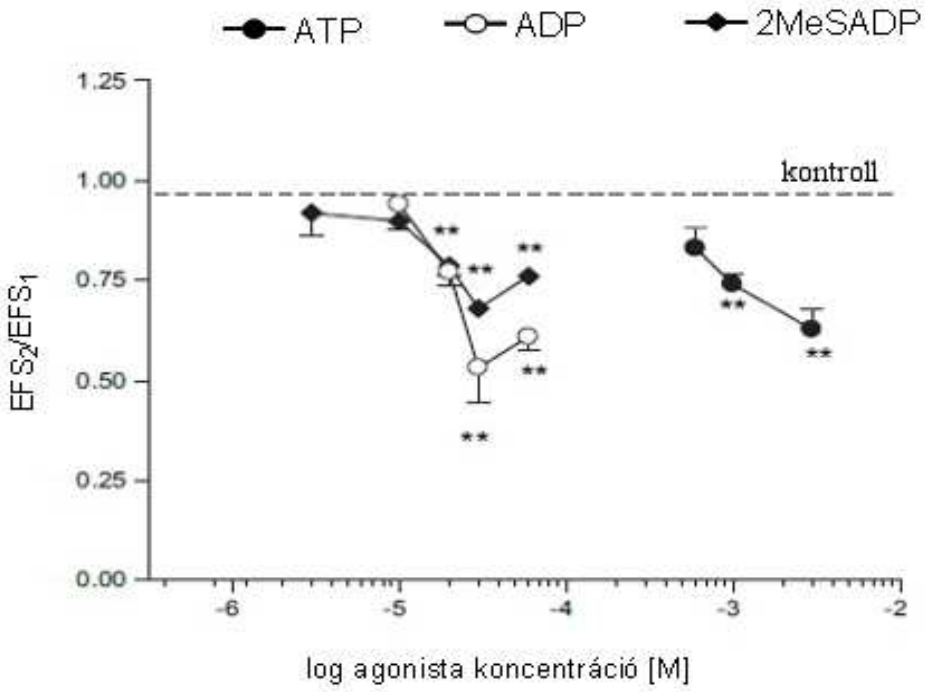
5.1.2 Tríciált noradrenalin felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben

A kutatásaink következő szakaszában a [^{3}H]noradrenalin felszabadulást vizsgáltuk meg a patkány gerincvelő szeletekben. A nyugalmi [^{3}H]transzmitter kiáramlás 0.437 ± 0.015 %-nak adódott (n=8, 2. táblázat). Elektromos stimulus (40V, 2 Hz, 1 ms, 2 perc) hatására 1.363 ± 0.136 % trícium szabadult fel a kontroll kísérletben, a második elektromos ingerlés esetében pedig 1.136 ± 0.083 % (EFS_2/EFS_1=0.93 ± 0.03, n=8) (12. ábra). A stimulus által kiváltott felszabadulást követően a jelölt noradrenalin kiáramlása gyorsan visszatért az alapvonalra. A fenti kísérleti eredmények átlagát vettük kontrollnak, és minden további mérési eredményt ehhez viszonyítottuk.

A P2 receptor agonisták közül mind az ATP, az ADP és a 2-MeSADP szignifikánsan csökkentették az elektromos ingerlésre kiváltott tríciált noradrenalin felszabadulást a gerincvelő szeletekből. Az agonista hatáserősségi sor a következő volt: ADP ≥ 2-MeSADP > ATP (13. ábra). A legnagyobb gátlás a ADP 30 µmol/L koncentrációnál volt mérhető (13. ábra).

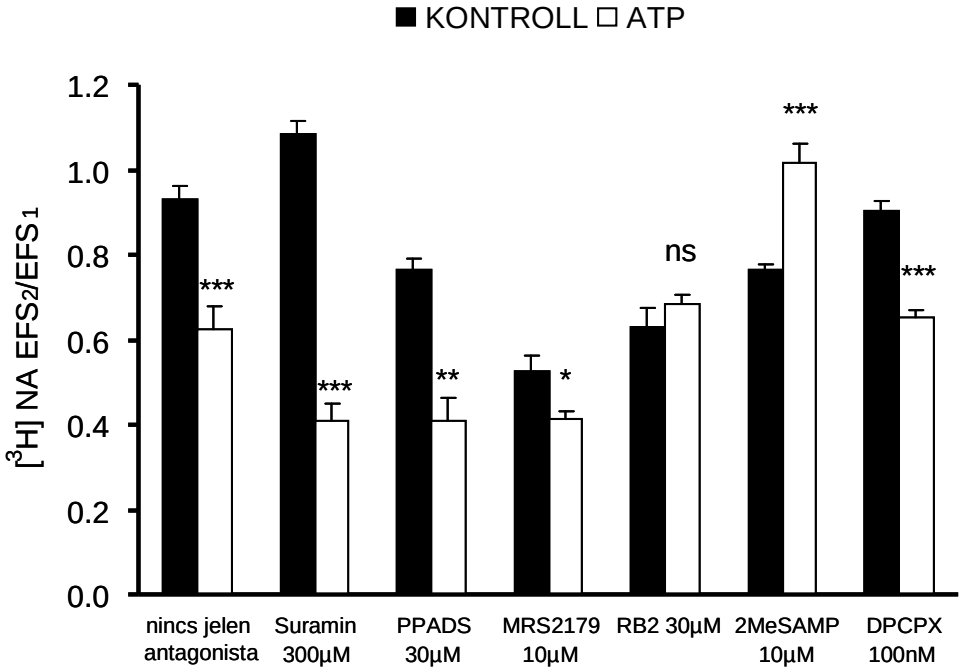


12. ábra: Elektromos téringerlés által (40V, 2Hz, 2 ms, 2 perc) kiváltott [^{3}H]noradrenalin felszabadulás patkány gerincvelő szeletekben. 60 perces előperfúzió után elektromosan ingereltük (S_1, S_2) a szeleteket. A tríciált noradrenalin felszabadulást a mintagyűjtés idején, a szövetben aktuáisan jelenlévő radioaktivitás százalékaként fejeztük ki (frakcionális felszabadulás). A görbe 8 egyedi kísérlet átlag ± S.E.M. értékeit mutatja. Az X tengely az időt percben, az Y tengely a tríciált glutamát frakcionális felszabadulás százalékát mutatja.



13. ábra: Különböző P2-receptor agonisták koncentrációfüggő hatása az elektromos téringerlés által (40V, 2Hz, 2 ms, 2 perc) kiváltott [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra patkány gerincvelő szeletekben. Az X tengely az agonisták koncentrációját mutatja logaritmus skálán mólban, az Y tengelyen pedig az EFS_2/EFS_1 hányadosokat ábrázoltuk (l. Anyagok és Módszerek 4.2.1.). A csillagok a kontrollra (szaggatott vonal) vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (**$p<0.01$, n=4-8).

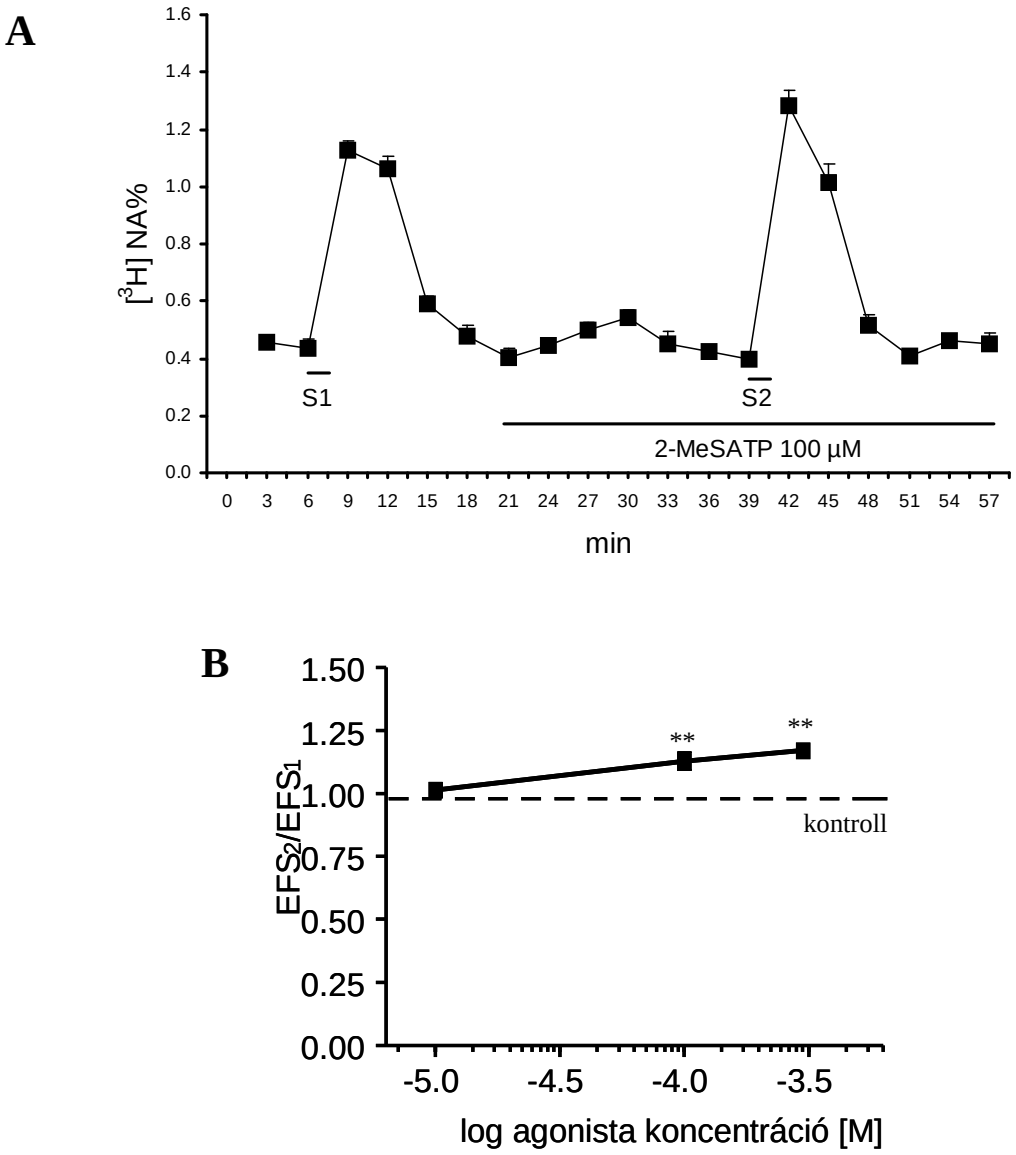
A következő kísérletekben a P1 és P2 receptorok részvételét vizsgáltuk az ATP [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra gyakorolt gátló hatásában (14. ábra). Az ATP 3 mmol/L koncentrációban szignifikánsan csökkentette az elektromos ingerlésre kiváltott tríciált noradrenalin felszabadulást. Ezt a gátló hatást a $P2Y_{12,13}$ -receptor antagonista 2-MeSAMP (10 µmol/L) és a nem szelektív P2Y receptor antagonista RB2 (30 µmol/L) teljesen, míg a $P2Y_1$ receptor antagonista MRS2179 (10 µmol/L) és a P1 receptor antagonista DPCPX (100 nmol/L) részlegesen védte ki. A suramin (300 µmol/L) és a PPADS (30 µmol/L) ugyanakkor nem ellensúlyozta az ATP hatását (14. ábra).



14. ábra: Az ATP hatása az elektromos ingerlés által kiváltott [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra antagonisták jelenlétében és hiányában patkány gerincvelő szeletekben. Az ATP-t a második elektromos ingerlés (S_2) előtt adtuk 18 perccel, míg az antagonisták az egész kísérlet alatt folyamatosan jelen voltak. A fekete oszlopok (KONTROLL) az antagonista jelenlétében, a fehér oszlopok (ATP) az agonista és antagonista együttes jelenlétében mért

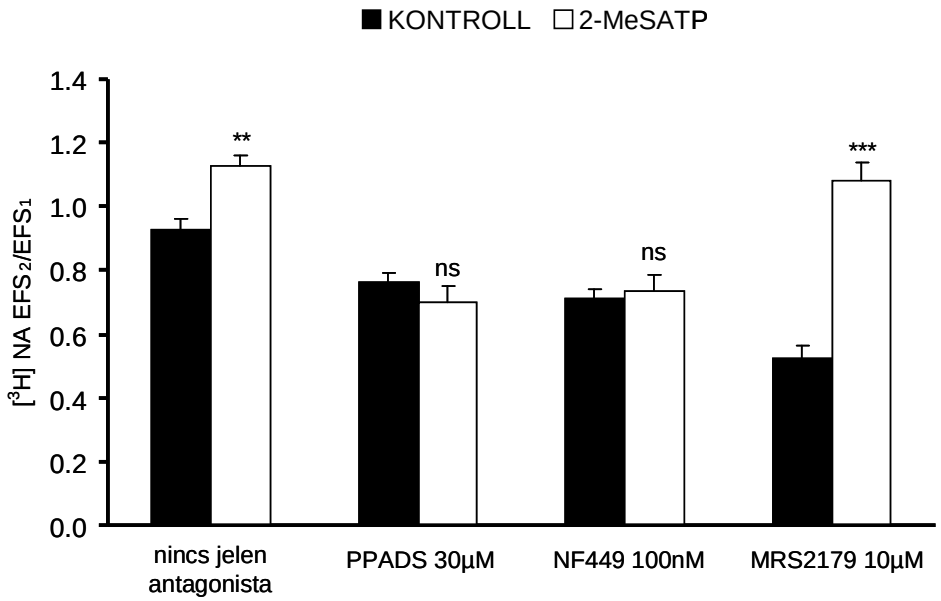
EFS_2/EFS_1 hányadosokat mutatják. A csillagok a kontrollra (KONTROLL) vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (ns $p>0.05$,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$, n=4-8).

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a 2-MeSATP milyen moduláló hatást vált ki az elektromosan indukált [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra. A Krebs' oldatban a második ingerlés (S_2) előtt 18 perccel perfundált 2-MeSATP (100-300 µmol/L) jelentősen megnövelte a kiáramlást a kontrollhoz képest. Ez a hatás a bazális (0.987 ± 0.036%, n=4, p< 0.001, 15 ábra A.) és az elektromos ingerlésre kiváltott trícium felszabadulásban is tapasztalható volt (15 ábra).



15. ábra: 100 – 300 µmol/L 2-MeSATP hatása a tríciált noradrenalin felszabadulásra. (A) Az X tengely az időt percben, az Y tengely a tríciált noradrenalin frakcionális felszabadulás százalékát mutatja. A görbe az egyedi mérések átlag ± S.E.M. értékeit mutatja. **(B)** Az X tengely a 2-MeSATP koncentrációját mutatja logaritmus skálán mólban, az Y tengelyen pedig az EFS_2/EFS_1 hányadosokat ábrázoltuk (l. Anyagok és Módszerek 4.2.1.). A csillagok a kontrollra vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (**p<0.01, n=4-8).

A PPADS (30 µmol/L) és a NF449 (100 nmol/L) kivédte a 2-MeSATP serkentő hatását a [^{3}H]noradrenalin kiáramlásra. A $P2Y_1$ receptor antagonista MRS2179 (10 µmol/L) erre nem volt képes; jelenlétében a 2-MeSATP szignifikánsan emelkedést okozott a kontroll kísérlethez képest (106.63 ± 2.7 %) (16. ábra). Az antagonisták önmagukban nem okoztak szignifikáns változást a [^{3}H]noradrenalin felszabadulásban, kivételt ez alól csak a PPADS és a suramin képezett (3. táblázat).

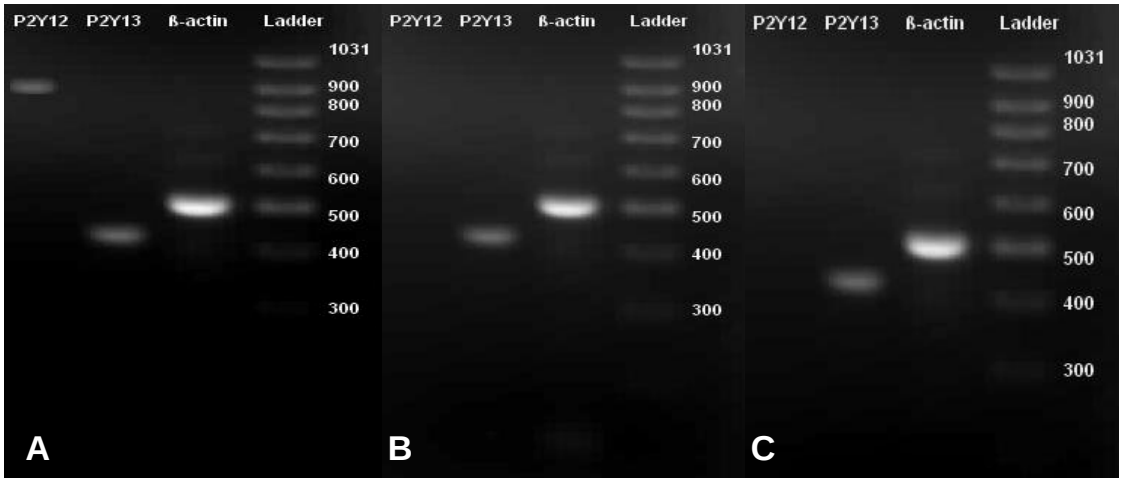


16. ábra: Antagonisták hatása az elektromosan kiváltott [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra a patkány gerincvelő szeletekben. Az antagonisták az egész kísérlet alatt folyamatosan jelen voltak. A fekete oszlopok (KONTROLL) az antagonista hatását, a fehér oszlopok (ATP) az agonista és antagonista jelenlétében felszabadul tríciált glutamát kiáramlást ábrázolja. Az eredményeket EFS_2/EFS_1 arányokban fejeztük ki. A csillagok a kontrollra (KONTROLL) vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (ns p>0.05,**p<0.01,***p<0.001, n=4-8). Az X tengely az agonistákat ábrázolja, az Y tengely

pedig az elektromos ingerlések (S_1, S_2) által indukált [^{3}H]NA transzmitter felszabadulás hányadosát mutatja.

5.1.3 P2Y receptorok mRNS expressziójának vizsgálata patkány agytörzsben, hátsó-gyöki ganglionban és gerincvelőben

A farmakológiai vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a P2 receptorok moduláló hatást fejtenek ki a [^{3}H]glutamát és [^{3}H]noradrenalin felszabadulásra a patkány gerincvelőben és a gátló hatás közvetítésében feltehetően a $P2Y_{12}$ és $P2Y_{13}$ receptor altípusok vesznek részt. A célból, hogy megerősítsük ezt a feltételezést, tanulmányoztuk a fenti P2Y receptor alegységeket kódoló mRNS-ek expresszióját az agytörzsben, gerincvelőben és a hátsó-gyöki ganglionban (DRG). A három különböző biológiai mintából származó teljes RNS tartalmat reverz transzkriptcióval átírtuk, majd a P2Y receptor altípusokra specifikus primereket használva PCR reakcióban felerősítettük. Az RT-PCR reakció során a patkány gerincvelőben, agytörzsben és DRG-ben a $P2Y_{13}$ receptor altípust kódoló mRNS kifejeződött, míg a $P2Y_{12}$ receptor altípus mRNS-e csak az agytörzsben volt kimutatható (17 ábra).



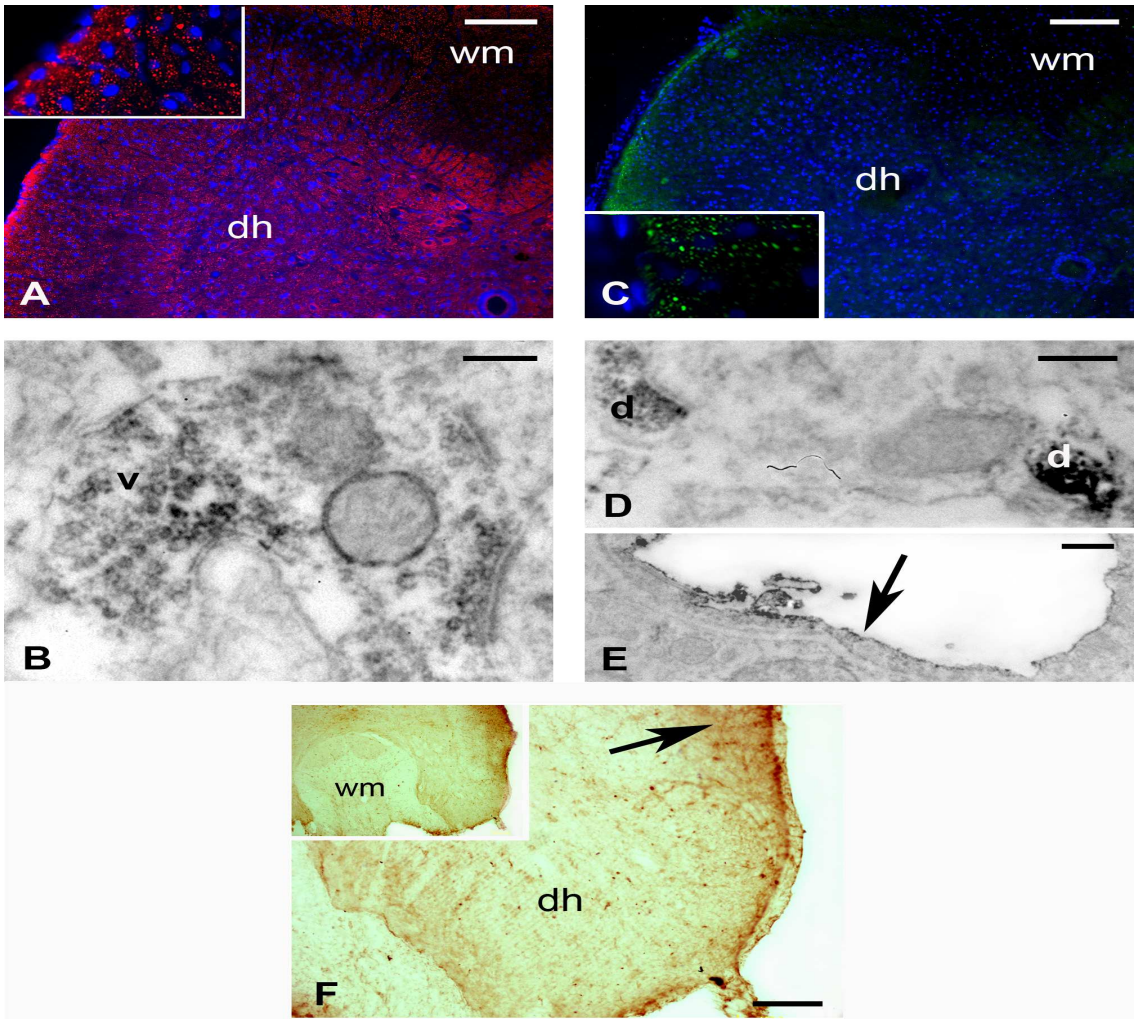
17. ábra Purinoceptor altípusok PT-PCR elemzése a patkány agytörzsben (A), hátsó-gyöki ganglionban (B) és gerincvelőben (C). A P2Y receptorokat kódoló mRNS méretét 100 bp-os

létra (Ladder) segítségével azonosítottuk. Belső kontrollnak a béta-aktint (β-actin) használtuk. A gél (1.5% agaróz) legalább három független kísérlet eredményét reprezentálja.

5.1.4. $P2Y_1$ receptor immunohisztokémiai vizsgálata

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat azért végeztük el, hogy megbizonyosodhassunk arról, vajon azok a P2 receptor fehérjék, melyek a tríciált glutamát felszabadulás módosulásáért, megváltozásáért felelősek, jelen vannak-e a primer afferens idegi végződéseken vagy interneuronokon. A P2 receptorok közül a $P2Y_1$ illetve $P2Y_{13}$ jelenlétét vizsgáltuk az ellenük előállított specifikus antitestek segítségével, de előtte VGLUT1 jelöléssel azonosítottuk a gerincvelőben a glutamaterg idegi végkészülékeket. Eredményeink igazolták Persson és munkatársai megfigyelését, miszerint a VGLUT1 jelölés egyenlőtlen sűrűségben, de gyakorlatilag a teljes gerincvelői hátsó szarvban, az I-VI rétegben jelen van (Person és mtsai 2006). Az elektronmikroszkópos ábra immun-DAB festéssel mutatja a VGLUT1–re utaló immunreaktivitást glutamaterg idegvégződés elektronmikroszkóposan "üresnek" látszó hólyagocskáinak membránján. A $P2Y_1$ receptorra végzett immunfestés a VGLUT1 jelöléstől eltérő képet mutatott a gerincvelő nyaki szakaszának keresztmetszeti szeletén (18. ábra). A legerőteljesebb festődést az I-II rétegekben kaptuk, és a festés erőssége a hátsó szarvi metszet közepe felé haladva gyengült. Elektronmikroszkópos szinten $P2Y_1$ receptor jelenlétére utaló festődést csak dendritekben találtunk, szinapszisokban nem. Korábbi vizsgálatainkkal megegyező módon figyeltünk meg $P2Y_1$ immunpozitivitásra utaló DAB csapadékot endotélsejtek luminális oldalán (vérpálya felőli oldal), ahol valószínűleg az itt előforduló kaveolákban található (18. ábra).

Igen ritkán találtunk idegsejtet, annál több gliális elemet a gerincvelő fehér- és szürkeállományában, amely $P2Y_{13}$ immunpoztivitást mutatott. A legerőteljesebb festődés a háti (dorzális) spinocerebelláris traktusban volt megfigyelhető, azonban a jelölődés egészére vonatkozóan az mondható el, hogy az a hátsó szarvban erőteljesebb volt, mint a fehérállományban. Kontroll festéseknél, mikor a $P2Y_{13}$ antitest helyett normál szérumot alkalmaztunk, nem találtunk különbséget a fehér- és szürkeállomány színe között, az egész metszet fehér/áttetsző maradt (ezt nem mutatjuk be).



18. ábra: VGLUT1, $P2Y_1$ és $P2Y_{13}$ receptorok kimutatása patkány gerincvelőben. (A) VGLUT1 immunfluoreszcens festés a gerincvelő nyaki szakaszának keresztmetszeti szeletén. Az Alexa594 (piros) festékkel jelölt glutamaterg idegvégződések az I-VI rétegben egyaránt megfigyelhetők. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék). **(B)** VGLUT1 kimutatása elektronmikroszkópos szinten, ABC-DAB festéssel. Jelölt hólyagocskák (vezikulák) egy hátsó szarvi glutamaterg idegvégződésben. **(C)** Immunfestés $P2Y_1$ receptor kimutatására a gerincvelőben. Immuncsapadékot főképp az I-II rétegben találtunk. A $P2Y_1$ receptor jelenlétére a nyúl IgG ellen termelt Alexa 488 (zöld) festés utal, sejtmagok (Dapi kék). **(D)** ABC-DAB festés azonosítja a $P2Y_1$-et kifejező dendriteket a gerincvelő nyaki szakaszának keresztmetszeti szeletén. **(E)** $P2Y_1$ jelenlétére utaló festődés (DAB csapadék) egy endotélsejt luminális membránján. **(F)** $P2Y_{13}$ ellen termelt antitest által jelölt gliasejtek a gerincvelőben mind a fehér- mind a szürkeállományban (kivágás). A festődés erőteljesebb a hátsó szarvban mint a fehérállományban, de a legerőteljesebb festődés a háti spinocerebellaris traktusban található. A

hátsó szarv néhány azonosítatlan idegsejtjének citoplazmája szintén festődött. wm: fehérállomány, dh: gerincvelő hátsó szarv, bar: 5 μm.

5.2 K^+ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás mérése patkány hippokampusz CA1 régiójában mikroelektród bioszenzor segítségével

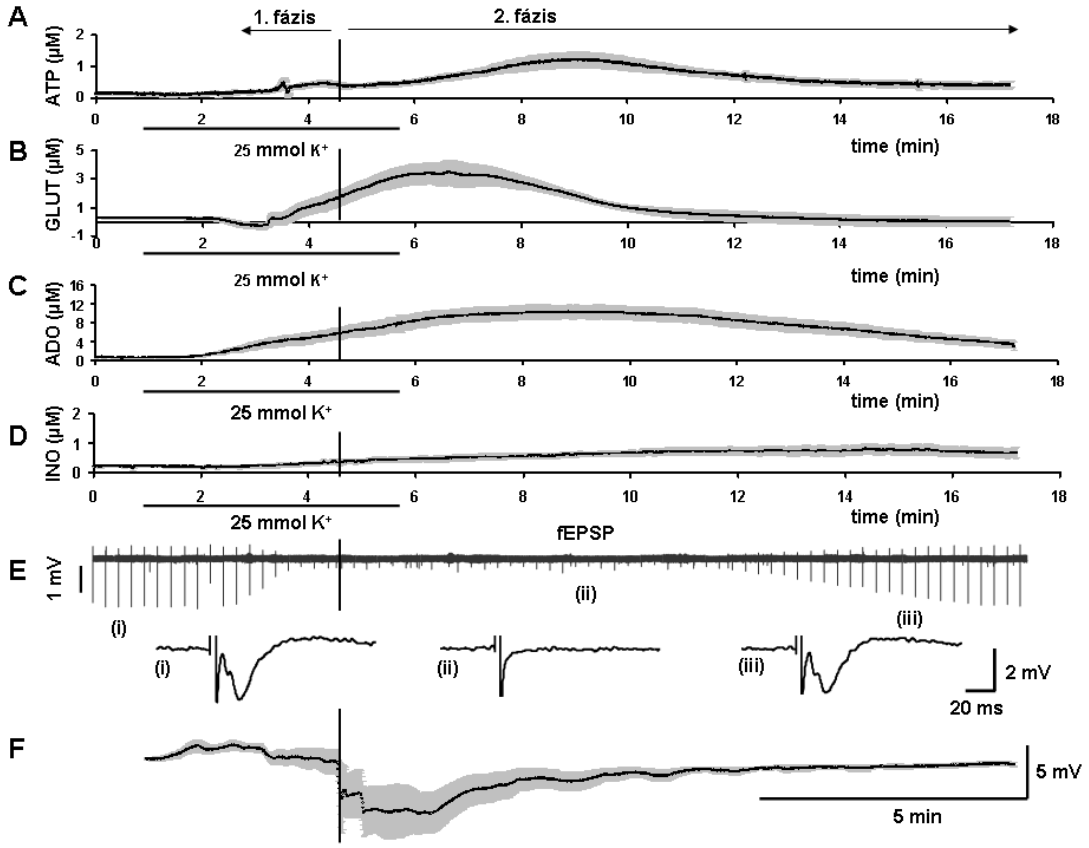
Kutatásaink második szakaszában purinerg és glutamáterg rendszerek szerepét vizsgáltuk kálium depolarizáció (25 mmol/L, 270 sec) hatására patkány hippokampusz szeletekben. E célból az izolált, 400 µm vastagságú patkány hippokampusz szeleteket az *in vitro* szuperfúziós rendszerbe helyeztük és valós idejű mikroelektród-bioszenzor technika segítségével vizsgáltuk.

5.2.1. Nyugalmi és K^+ depolarizációra kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás patkány hippokampuszban

Először a hippokampusz szeletek nyugalmi ATP, adenozin és glutamát felszabadulására voltunk kíváncsiak. Az első lépésben a szenzorokat belehelyeztük a szövet-szelet kamrába és megvártuk, hogy a szenzorok elérjék az ekvilibrum állapotot (általában 20 perc). Majd ezt követően a patkány hippokampusz szeletekbe óvatosan beleszúrtuk a bioszenzorokat. Az ily módon elért nyugalmi helyzet beállta után kapott jel, illetve a szelet nélkül mért bioszenzor jel különbsége, - levonva abból a referencia szenzor jelét - mutatja a bazális ATP, adenozin és glutamát felszabadulást, amely néhány nmol/L nagyságrendűnek bizonyult (ATP: 4.1 ± 0.8 pA, n=10; ADO: 5.4 ± 0.7 pA, n=10; GLUT: 6.4 ± 0.8 pA, n=10). Pontos koncentráció érékeket nem tudtuk meghatározni, mivel ezek az értékek a detekeció határának közelébe és ezáltal a kalibrációs görbe lineáris tartományán (300 nmol/L és 50 µmol/L koncentráció tartomány) kívül estek. A következőkben a hippokampusz szeleteket 25 mmol/L-os kálium (270 sec) tartalmú aCSF oldattal perfundáltuk, mely hatására gyors, ugyanakkor reverzibilis ATP, adenozin és glutamát szignál emelkedést regisztráltunk (19. ábra). A kísérletek egy részében egyidejűleg regisztrált DC elvezetésben a K^+ depolarizáció hatására a *„spreading depression”* (SD) jelenség megjelenését észleltük, ahogy azt korábbi irodalmi adatok is leírták (Schock és mtsai 2007) (n=5, 19F. ábra). Az ATP két fázisban szabadult fel, az első fázis végét az SD megjelenése determinálta, mely a K^+ depolarizáció adást követően a 3.81 ± 0.2 percben jelent meg (n=5, 19F. ábra). Az adenozin kiáramlás K^+ stimulus kezdete után a 0.79 ± 0.01 percben volt detektálható

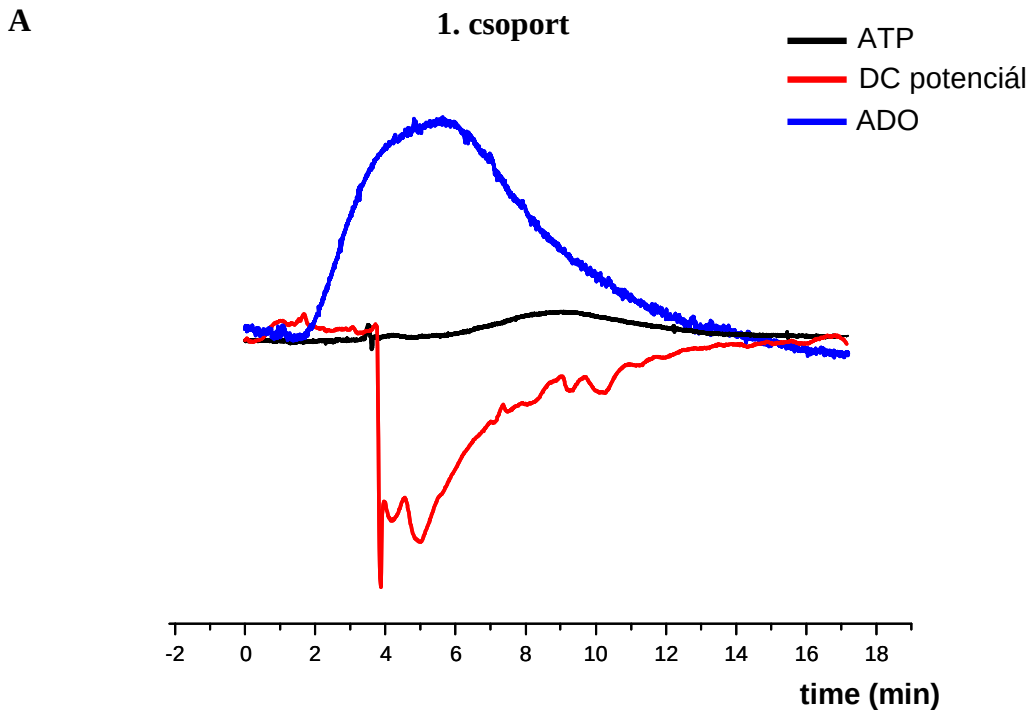
(0.48 ± 0.16 µmol/L), míg a maximumát 10.28 ± 1.41 µmol/L koncentrációnál érte el (7.31 ± 0.01 perc, n=8, 19C. ábra). A glutamát felszabadulást a kontroll kísérletben a 2.68 ± 0.04 percben regisztráltuk és a legnagyobb koncentrációt a 5.62 ± 0.06 percben (3.49 ± 0.84 µmol/L, n=8, 19B. ábra) érte el a K^+ depolarizációt követően. Az ATP a 2.56 ± 0.05 percben volt először detektálható a 25 mmol/L kálium stimulust követően. Az első fázisban az ATP szignál csúcsa a SD kialakulása előtt már regisztrálható volt (0.48 ± 0.16 µmol/L), mely egybeesett a glutamát felszabadulásával. A második fázisban 1.23 ± 0.023 µmol/L-os maximum ATP koncentrációt mértünk (8.08 ± 0.01 perc, n=8, 19A. ábra). A NULL szenzor az alapvonalon fluktuált.

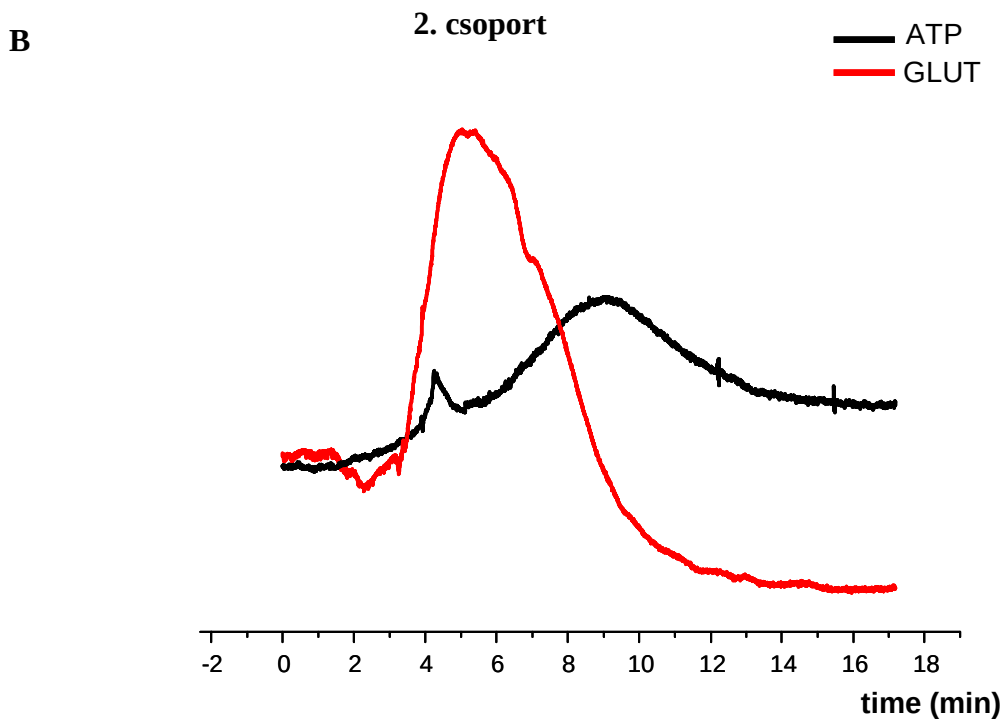
Az ATP szenzorral egy időben a *stratum radiatum*-ból elvezetett mező-serkentő posztszinaptikus potenciálokat (fEPSP) regisztráltunk. A hippokampusz szeletek magas K^+ okozta SD alatt elveszítik az elektrofiziológiai aktivitásukat, amelyet ugyanakkor a kimosási fázisban teljes mértékben visszanyertek (19E. ábra), igazolván a szelet megtartott életképességét.



19. ábra: Valós idejű ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata K^+ depolarizáció hatására a patkány hippokampusz szeletekben. (A) Magas K^+ hatására az ATP felszabadulásban két fázis volt megfigyelhető (függőleges vonal választja el a két fázist). **(B)** A K^+ depolarizáció hatására gyors glutamát kiáramlás látható. **(C)** Az ADO bioszenzor hosszú lefutású adenozin felszabadulást regisztrált, mely időben előbb jelent meg, mint a glutamát és ATP szignál. **(D)** Az ADO szenzor az érzékeny felülete közelében lévő adenozin és inozin jelenlétére is érzékeny, ezért a méréseket úgy terveztük, hogy az adenozin szenzor mellett INO szenzort is használunk, így a nettó adenozin (netADO) jelet úgy határoztuk meg, hogy ADO szenzor jeléből kivonjuk az INO szenzor jelét. Az ábra az inozin jelenlétét regisztrálja. **(E)** Mező-serkentő posztszinaptikus potenciál elvezetés (**i**) a K^+ stimulus előtt (**ii**), alatt és (**iii**) a kimosási fázisban. **(F)** Az ATP szenzorral egyidejűleg regisztrált extracelluláris DC potenciál elvezetések átlaga. Az X tengely a időt percben, az Y tengely (A-D ábra) a koncentrációt az E és F ábrán a feszültséget ábrázolja. A görbék átlagait feketével, a szórásait szürkével jelöltük (n=6-8).

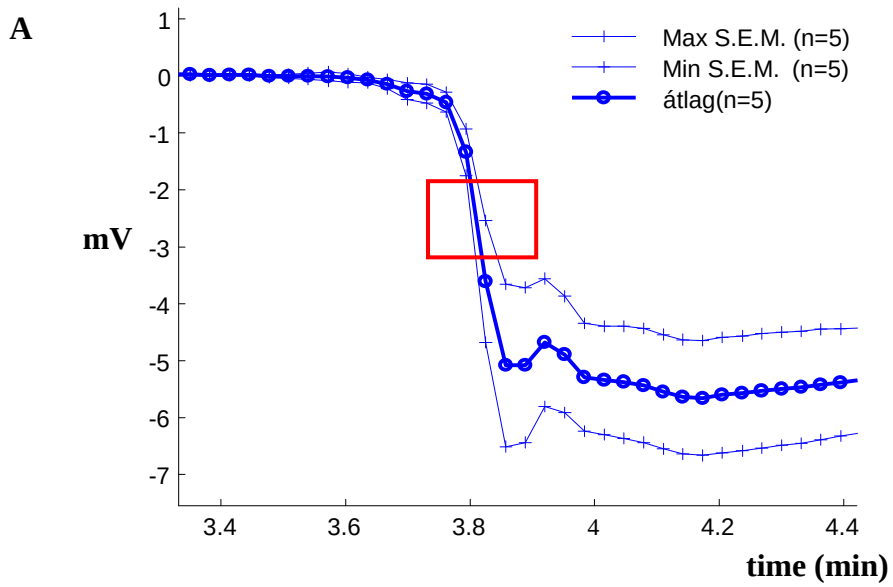
A szimultán méréseket két független méréscsoportban (ATP-DC potenciál-ADO, ATP-GLUT) tudtuk elvégezni (20. ábra), ezért a különböző csoportokból származó ATP regisztrátumokat egymásra helyeztünk az idő függvényében és kiszámoltuk az időbeni eltéréseiket. Ez az idő ablak 0.145 ± 0.131 perc volt, mely nem tért el szignifikánsan ($p>0.05$, n=4, t-teszt) a 0 értéktől (egyidejűség).



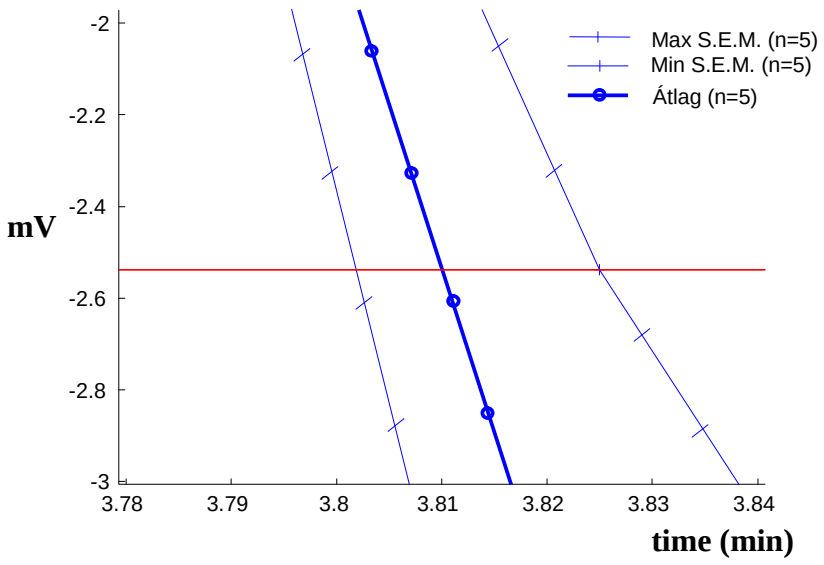


20. ábra: Egyidejűség vizsgálata. (A) 1. csoport az ATP, adenozin és SD szimultán mérés. **(B)** 2. csoport az ATP és glutamát szimultán mérése. X tengely az időt mutatja percben.

Megvizsgáltuk a K^+ depolarizáció hatására regisztrált SD időbeli megjelenését is a nem szimultán kisérletekben. Az eltérés éréke 3.81 ± 0.2 perc volt.



B

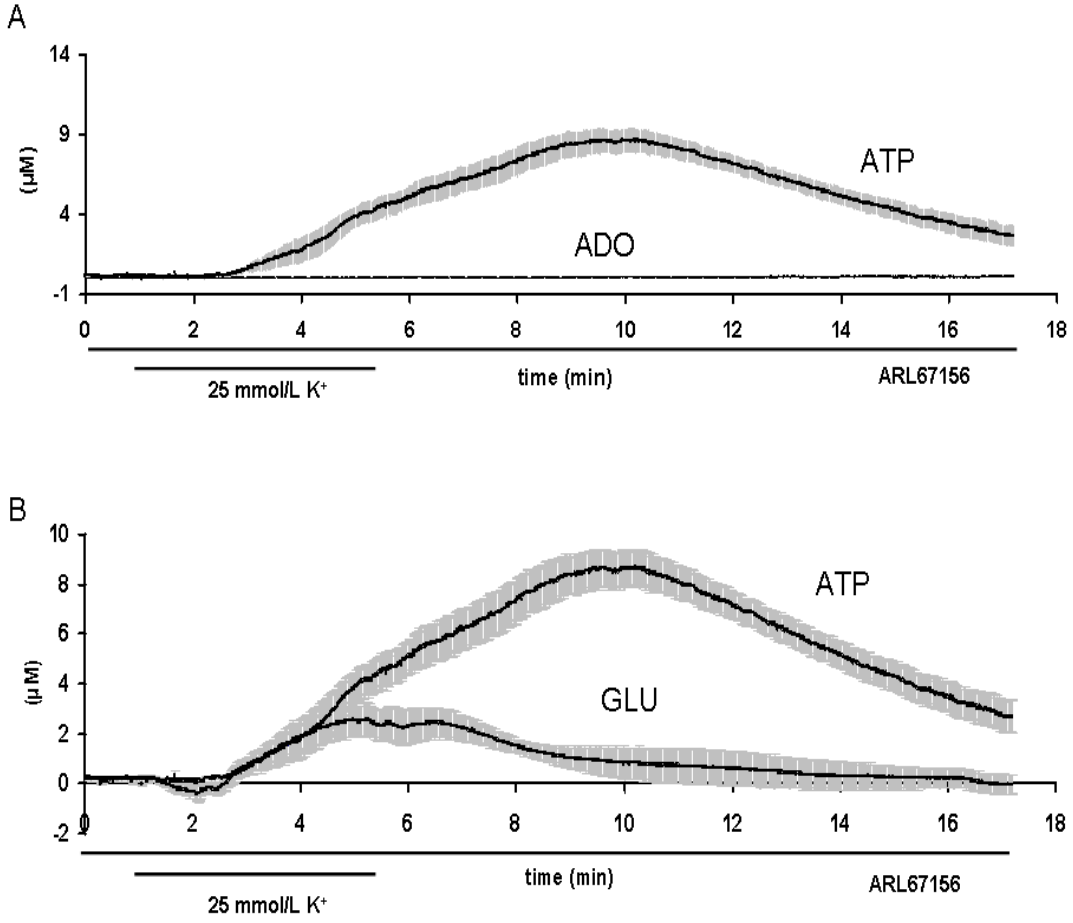


21. ábra: A SD megjelenésének időbeli vizsgálata K^+ depolarizáció hatásásra. (A) A regisztrált SD átlaga, minimum és maximum értékei. (**B)** A piros négyzettel jelölt rész kinagyítása. Az eredmények öt független mérés eredménye (n=5). Az X tengely az időt mutatja percben, az Y tengely a SD mV-os változását mutatja.

5.2.2. Honnan származik a K^+ depolarizációra felszabadult adenozin?

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a hippokampuszban jelen vannak az ectonukleotidáz (ektoATPáz) enzimek (Goding és mtsai 2003, Zimmermann 2000). Mivel az ATP nagy mennyiségben szabadul fel a K^+ depolarizációra, felmerül annak a lehetősége, hogy az ATP felszabadulását követően az exrtacelluláris térben ektoATPáz enzim jelenlétében adenozinná bomlik. Ennek a kérdésnek a tisztázása céljából a mások által is használt (Frenguelli és mtsai 2007, Sperlagh és mtsai 2007) ekto-ATPáz inhibitor ARL67156-t (100 µmol/L) használtunk, mely az alkalmazott koncentrációban az extracelluláris ATP lebomlását bár nem teljes mértékben, de jelentősen gátolja. Az ARL67156 hatására szignifikánsan megemelkedett a K^+ depolarizáció által előidézett ATP felszabadulás (8.62 ± 0.76 µmol/L, n=8, $p<0.01$; 5. táblázat), valamint az ATP szint emelkedése már hamarabb, a K^+ stimulus utáni 1.69 ± 0.012 percben detektálható volt. Ezzel ellentétben azt tapasztaltuk, hogy az adenozin felszabadulás jelentősen csökkent (0.15 ± 0.04 µmol/L, n=6) a gátlószer jelenlétében, miközben a glutamát kiáramlás mennyiségét nem változtatta meg (22. ábra). A következő kísérletben az

ARL67156 (100 µmol/L) és adenozin transzporter gátló dipiridamol (50 µmol/L) együttes hatását vizsgáltuk. Ebben az adenozin kiáramlása a hippokampusz szeletekből magasabb értéket mutatott, mint csak az ektoATPáz inhibitor jelenlétében (2.71 ± 0.23 µmol/L, n=5, $p<0.01$; 5. táblázat). Ezek az eredmények alapján arra következtettünk, hogy az ADO szenzor egyrészt az ATP extracelluláris bomlásából származó adenozint érzékeli, valamint direkt adenozin felszabadulást is detektál.



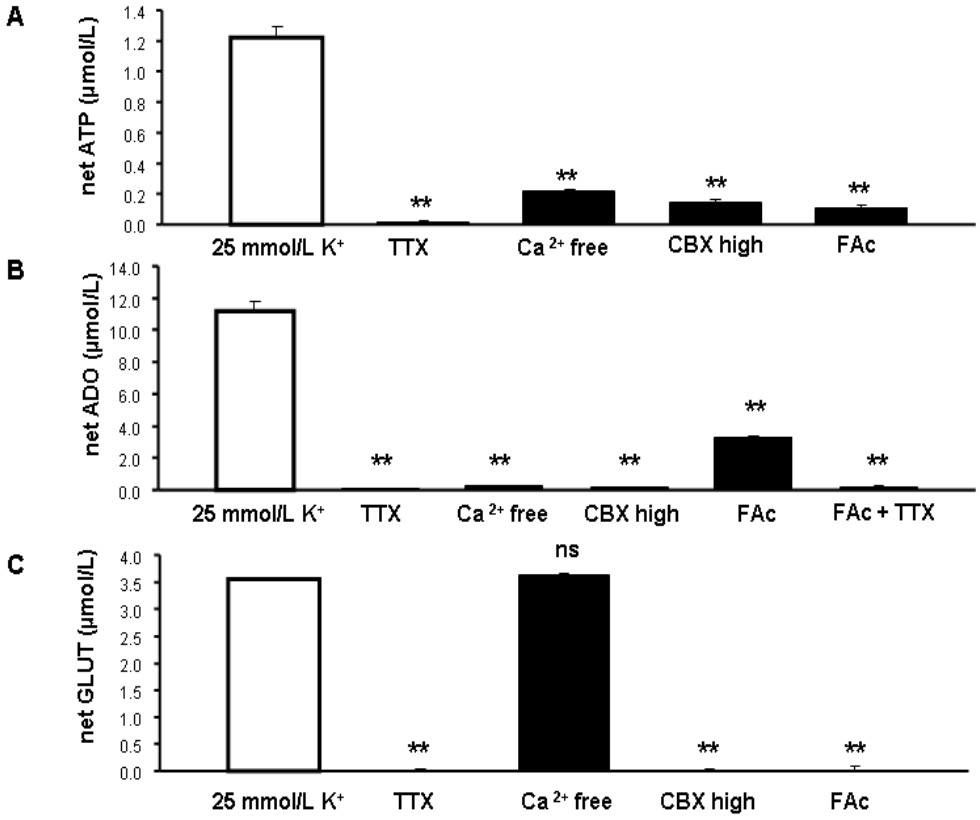
22. ábra: Az extracelluláris ATP metabolizmust gátló ARL67156 hatása az ATP, adenozin és glutamát felszabadulására patkány hippokampusz szeletekben. (A) Az ARL67156 kezelés hatására a szeletekben szignifikánsan megemelkedett az ATP kiáramlás. Ezzel ellentétben adenozin felszabadulás nem volt detektálható. **(B)** Az ARL67156 nem okozott szignifikáns változást a glutamát kiáramlásában. A szeleteket 25 mmol/L K^+ oldattal ingereltük 270 sec-ig (vízszintes vonal). Az X tengelyen az időt percben, az Y tengelyen az ATP, adenozin és glutamát koncentrációját ábrázoltuk. A görbék átlagait feketével, a szórásait szürkével jelöltük (n=6).

5.2.3. Az ATP, adenozin és glutamát felszabadulása hogyan függ az extracelluláris Ca^{2+} szinttől?

Mivel a vezikuláris transzmitter felszabadulás $[Ca^{2+}]_o$ függő, és korábbi munkákban az ATP felszabadulást is $[Ca^{2+}]_o$ _függőnek találták (Sperlagh és Vizi 2000, Pankratov és mtsai 2006), megvizsgáltuk, hogy a depolarizáció által kiváltott ATP felszabadulást a mi kísérleteinkben is az extracelluláris Ca^{2+}-ion beáramlása váltja-e ki. Ennek ellenőrzésére a következő kísérletet végeztük el: a kísérletben használt aCSF oldatot Ca^{2+}-mentes és Ca^{2+}-kelátor EGTA (1 mmol/L)-t tartalmazó oldatra cseréltük. Az így elvégzett mérésben az ATP (0.21 ± 0.01 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 13. ábra) és az adenozin (0.22 ± 0.02 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 12 ábra) 25 mmol/L K^+ hatására felszabadult mennyisége szignifikánsan csökkent, ugyanakkor a glutamát kiáramlása nem változott (3.64 ± 0.15 µmol/L, n=6, $p>0.05$, 23. ábra) a patkány hippokampusz szeletekben.

5.2.4. Hogyan befolyásolja a tovaterjedő neuronális aktivitás az ATP, adenozin illetve a glutamát felszabadulását a patkány agyszeletekben?

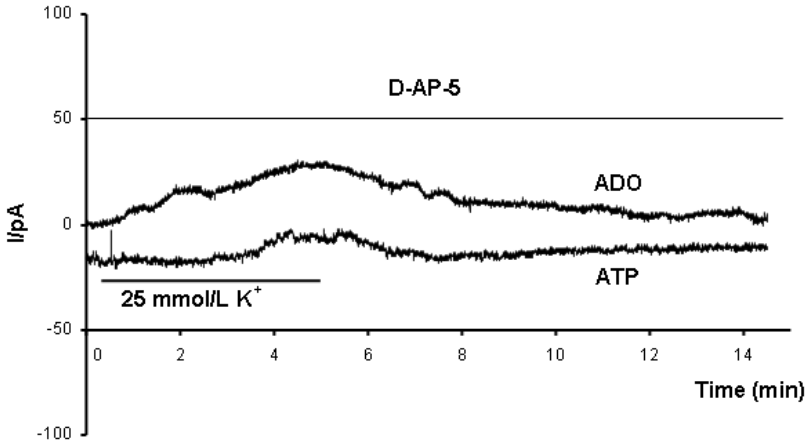
A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az akciós potenciál gátlása milyen hatással van az ATP, adenozin és glutamát K^+ depolarizáció által kiváltott kiáramlására. A szeleteket feszültségfüggő Na^+- csatorna blokkolóval, tetrodotoxinnal (TTX, 3 µmol/L) kezelve szignifikáns gátlást kaptunk a kontroll kísérlethez képest (ATP: 0.07 ± 0.05 µmol/L, ADO: 0.08 ± 0.04 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 13. ábra, 5. táblázat). Ugyanez volt megfigyelhető a glutamát felszabadulás esetében is (0.12 ± 0.03 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 23. ábra, 5. táblázat). A Na^+- csatorna blokkoló emellett a várakozásnak megfelelően gátolta a fEPSP aktivitást is. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a tovaterjedő akciós potenciálnak szerepe van a K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban.



23. ábra: Farmakológiai kezelések hatása a K^+ depolarizáció által kiváltott ATP (A), adenozin (B) és glutamát (C) felszabadulásra. A feszültségfüggő Na^+ csatorna blokkoló TTX gátolta az ATP **(A)**, adenozin **(B)** és glutamát **(C)** felszabadulást. A transzmitterek nettó felszabadulása esetében a K^+ depolarizációt követő bioszenzor jel emelkedésének maximális értékét vettük figyelemebe, és az értékeket µmol/L-ben fejeztük ki. A csillagok a kontrollra vonatkoztatott szignifikancia szinteket jelzik, ANOVA-t követő Dunnett' tesztben (ns $p>0.05$, $^{**}p<0.01$, n=5-6).

A következő kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a glutamáterg excitátoros transmisszió, hogyan befolyásolja a K^+ depolarizáció által kiváltott felszabadulást. A szeleteket először a non-NMDA receptor gátló CNQX (10 µmol/L) jelenlétében perfundáltuk, melynek hatására a glutamát felszabadulás szignifikánsan csökkent (0.09 ± 0.06 µmol/L, n=5, $p<0.01$, 5. táblázat). Ezzel a hatással ellentétben az ATP és adenozin esetében nem regisztráltunk változást a kontroll kísérlethez képest (ATP:1.17

± 0.12 µmol/L, n=5, p>0.05; ADO: 8.43 ± 0.53 µmol/L, n=5, p>0.05, 5. táblázat). A továbbiakban a K^+ depolarizáció hatását megvizsgáltuk az NMDA receptor antagonista D-AP-5 (10 µmol/L) és a NR2B szelektív NMDA receptor antagonista ifenprodil (10 µmol/L) jelenlétében. Mindkét anyag szignifikánsan csökkentette az ATP és adenozin kiáramlást: (D-AP-5, ATP: 0.11 ± 0.03 µmol/L, n=5, p>0.01; ADO: 0.11 ± 0.01 µmol/L, n=5, p<0.01, 24. ábra), (ifenprodil, ATP: 0.13 ± 0.06 µmol/L, n=5, p<0.01; ADO: 0.11 ± µmol/L, n=5, p>0.01, 5. táblázat).

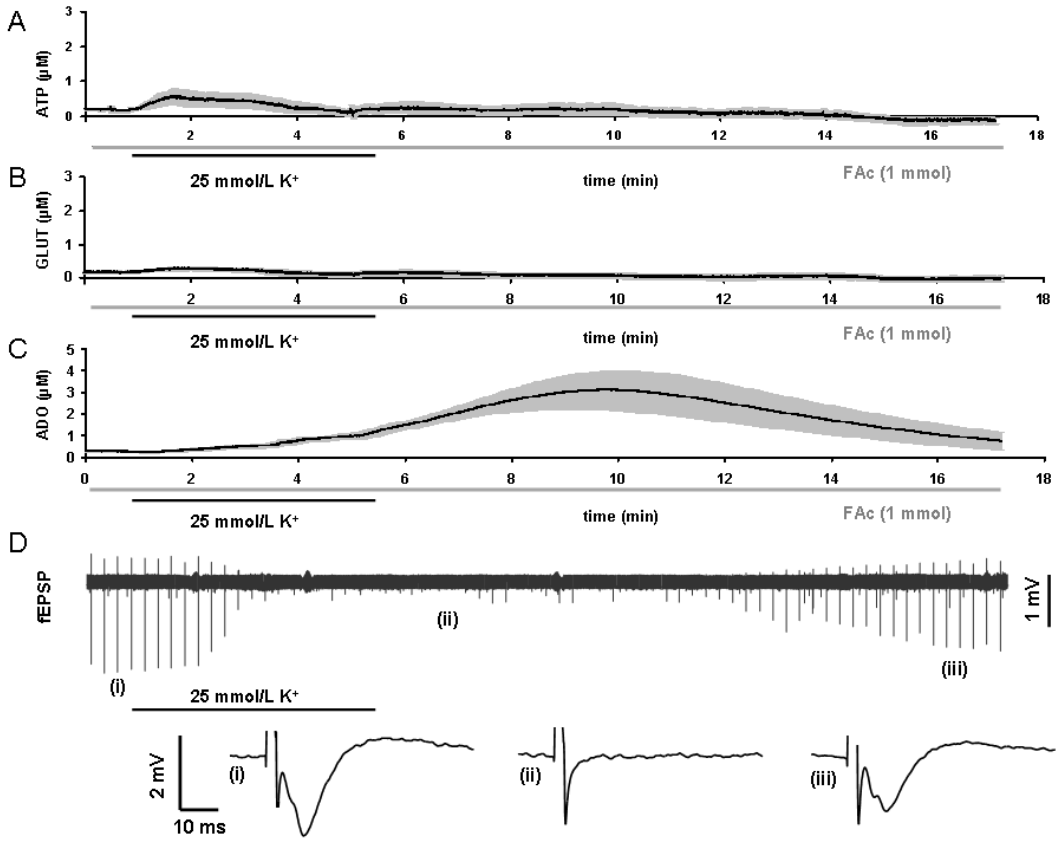


24. ábra Az NMDA receptor antagonista D-AP-5 hatása a K^+ depolarizáció indukált adenozin és az ATP felszabadulásra. Az X tengely az időt percben, az Y tengely az ATP és adenozin szenzor normailzált jelét ábrázolja (pA). Az ábrán egy egyedi regisztrátumot mutatunk be az öt független mérésből.

5.2.5. Mely neurális elem vesz részt az ATP, adenozin és glutamát szabadulásában?

A következő kísérletsorozatunkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a magas K^+ hatására felszabadult ATP, adenozin illetve glutamát neuronból vagy gliából származik. Ennek a kérdésnek az eldöntésére a patkány hippokampusz szeleteket fluoroacetát (FAc, 1 mmol/L) jelenlétében vizsgáltuk. A FAc 1 mmol/L-os koncentrációban szelektíven gátolja a glia sejtekben az acetát transzportereket és ezáltal a glia oxidatív metabolizmusát. A mitokondriális gliatoxint (Clark 1991, Canals és mtsai 2008) 10 perccel az ingerlés előtt adtuk a perfúziós rendszerbe, mivel ilyen rövid

ideig adva az anyag glia szelektív hatással bír (Hájos Norbert, személyes közlés). A FAc hatására az ATP felszabadulás jelentősen csökkent a második fázisban (ATP: 0.21 ± 0.14 µmol/L, n=8, 25. ábra), ezzel ellentétben az első fázisban nem volt hatása (FAc nélkül: 0.48 ± 0.16 µmol/L, n=8; FAc jelenlétében: 0.54 ± 0.16 µmol/L, n=8, p>0.05, 25. ábra). A glutamát felszabadulását is gátolta a fluoroacetát (GLUT: 0.11 ± 0.07 µmol/L, n=7; p<0.01, 25. ábra). Az adenozin kiáramlásban jelentős, bár nem teljes csökkenést (3.08 ± 0.89 µmol/L, n=8, p<0.01, 25 ábra) okozott önmagában a FAc kezelés. A TTX (3 µmol/L) és a FAc (1 mmol/L) együttes adásával teljes gátló hatást regisztráltunk (0.22 ± 0.1 µmol/L, n=6, P<0.01, 23. ábra). Az elektromos ingerlés által kiváltott fEPSP a fluoroacetát jelenlétében is detektálható volt, ami arra utal, hogy ilyen kísérleti feltételek mellett a FAc kezelés nem gátolta a neuronok működését (15. ábra).



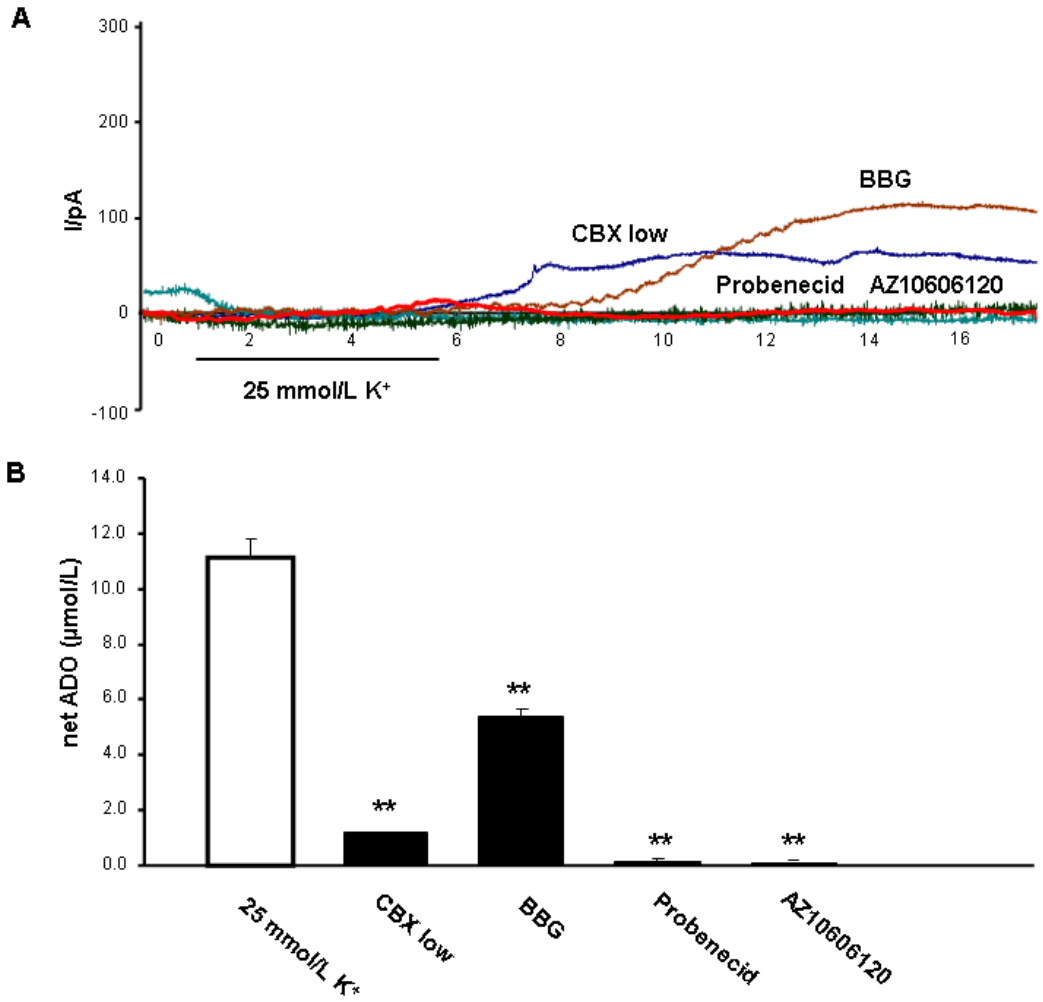
25. ábra: A mitokondriális gliatoxin (FAc) hatása az (A) ATP, (C) adenozin és (B) glutamát felszabadulására patkány hippokampusz szeletekben. D. Mező-serkentő posztszinaptikus potenciál elvezetés (**i**) K^+ stimulus előtti (**ii**) alatti és (**iii**) a kimosási fázisban. Az X tengelyen az időt percben, az Y tengelyen az ATP, adenozin és glutamát koncentrációját ábrázoltuk. A görbék átlagait feketével, a szórásait szürkével jelöltük (n=7-8).

5.2.6. Milyen mechanizmussal szabadul fel az ATP, adenozin és a glutamát?

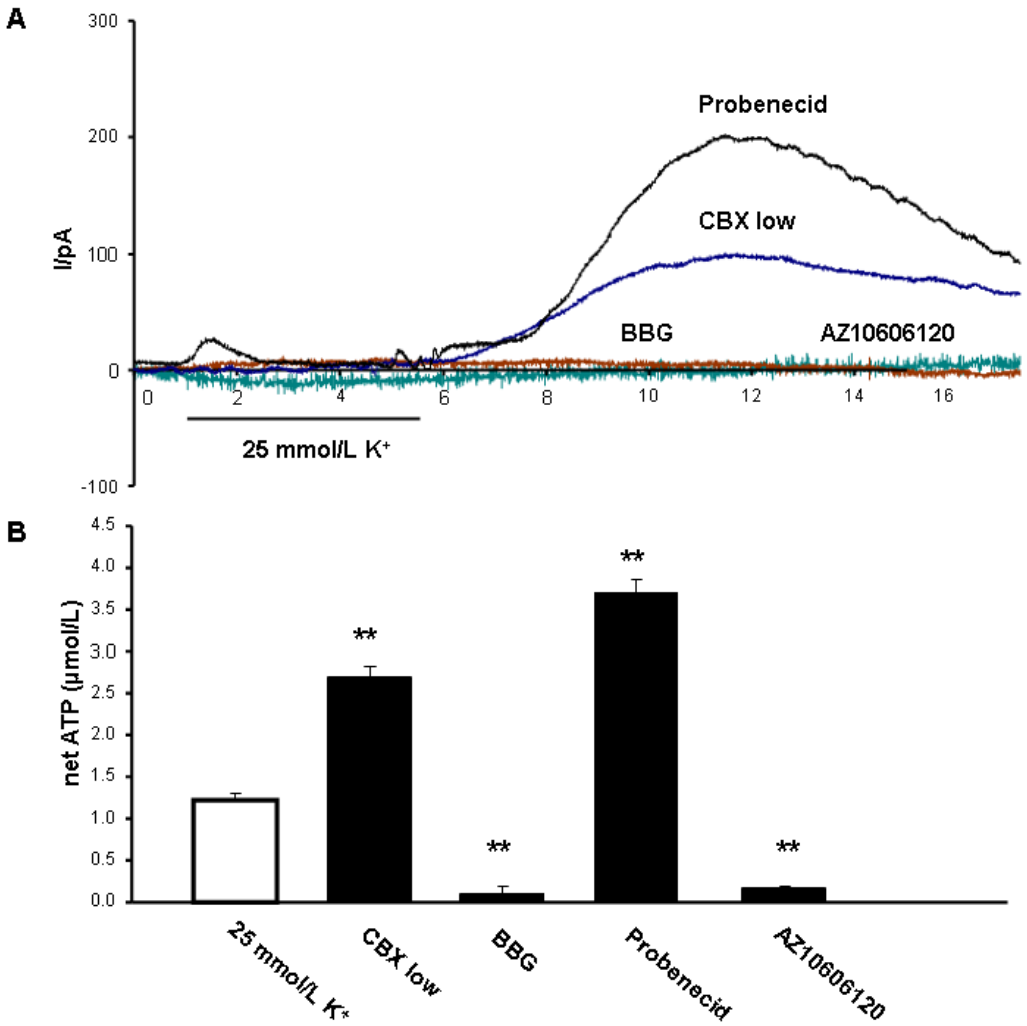
A továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy az ATP és a glutamát milyen mechanizmussal szabadul fel a patkány hippokampusz szeletekből.

A P2X7 purin receptor ion csatornaként működik (Pellegatti és mtsai 2005, Anselmi és mtasi 2008) és expresszálódik a hippokampusz területén (Sperlagh és mtasi 2002), aktivációja glutamát és ATP felszabaduláshoz vezet az idegvégződésekben (Alloisio és mtsai 2008, Marcoli és mtsai 2008) és az asztrocita sejtkultúrákban (Ballerini és mtsai 1996, Duan és mtsai 2003). Ezért elsőként a P2X7 receptor szerepét vizsgáltuk meg a K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban. A hippokampusz szeleteket a szelektív P2X7 receptor antagonista BBG (0.1 µmol/L) és AZ10606120 (0.1 µmol/L) jelenlétében perfundáltuk. Mind a két antagonista csökkentette a felszabadult ATP mennyiségét (BBG: 0.11 ± 0.14 µmol/L, n=5, $p<0.01$; AZ10606120: 0.17 ± 0.02 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 26. ábra). Ezzel ellentétben az adenozin felszabadulását a BBG részlegesen (4.60 ± 0.74 µmol/L, n=5, $p<0.01$, 26. ábra), ugyanakkor az AZ10606120 teljesen gátolta (0.12 ± 0.05 µmol/L, n=6, $p<0.01$, 26. ábra). Ugyanez volt megfigyelhető a 25 mmol/L K^+ stimuláció által kiváltott glutamát kiáramlás vizsgálatánál (0.029 ± 0.06 µmol/L, n=5, $p<0.01$, 5. táblázat) is. A következőkben a carbenoxolon (CBX) hatását vettük górcső alá. A CBX egyrészt gátolja a P2X7 receptorokat (Suadicani és mtsai 2006), másrészt széles spektrumú gap junction félcsatorna inhibitorként is ismert (Bruzzone és mtsai 2005); ez utóbbi struktúrák ugyancsak képesek ATP–t áteresztení magukon. Magas koncentrációban a CBX (100 µmol/L) gátolta a K^+ depolarizációra adott ATP, adenozin és glutamát bioszenzor választ a patkány hippokampusz szeletekben (ATP: 0.21 ± 0.02 µmol/L , n=6, $p<0.01$; ADO: 0.22 ± 0.02 µmol/L , n=6, $p<0.01$; GLUT: 0.013 ± 0.02 µmol/L , n=6, $p<0.01$, 23. ábra). Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CBX alacsonyabb koncentrációban (20 µmol/L) csak a Panx1 csatornán hat (Pelegrin és Suprenant 2006), valamint immunohisztokémiai vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a P2X7 purin receptor és a Panx 1 csatorna kapcsoltan helyezkednek el (Pelegrin és Suprenant 2006). Ezért megvizsgáltuk K^+ stimulusra adott purin és glutamát felszabadulást 20 µmol/L-os CBX jelenlétében is. Ez a kezelés gátolta az adenozin felszabadulást (1.02 ± 0.26 µmol/L, n=5, $p<0.01$, 26. ábra), de ezzel ellentétben az ATP felszabadulás

szignifikánsan fokozódott (2.22 ± 0.37 µmol/L, n=5, p<0.01, 27. ábra) az agyszeletekben. Egy másik pannexin csatorna blokkolóval (probenecid, 150 µmol/L) is hasonló eredményeket kaptunk (ADO: 0.2 ± 0.01 µmol/L, n=7, p<0.01, 26. ábra; ATP: 2.70 ± 0.11 µmol/L, n=7, p<0.01, 27. ábra).



26. ábra: Adenozin felszabadulás vizsgálata P2X7 receptor antagonisták és gap junction félcsatorna gátlók jelenlétében. (A) Egyedi mérési eredmények a különböző gátló szerek jelenlétében. X tengely az időt, az Y tengely a regisztrált áramot mutatja. **(B)** X tengely az antagonistákat az Y tengely a felszabadult adenozin koncentrációját mutatja. Az adenozin nettó felszabadulása esetében a K^+ depolarizációt követő bioszenzor jel emelkedésének maximális értékét vettük figyelemebe, és az értékeket µmol/L-ben fejeztük ki.



27. ábra: ATP kiáramlás mechanizmusának vizsgálata P2X7 receptor antagonisták és gap junction félcsatorna gátlók jelenlétében. (A) Egyedi mérési eredmények a különböző gátló szerek jelenlétében. X tengely az időt az Y tengely a regisztrált áramot mutatja. **(B)** X tengely az antagonistákat az Y tengely a felszabadult ATP koncentrációját mutatja. Az ATP nettó felszabadulása esetében a K^+ depolarizációt követő bioszenzor jel emelkedésének maximális értékét vettük figyelemebe, és az értékeket µmol/L-ben fejeztük ki.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az adenozin egy része a pannexin csatornákon keresztül szabadul fel kálium (25 mmol/L) depolarizáció hatására. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a 25 mmol/L K^+ stimulus hatására az adenozin időben előbb szabadul fel mint az ATP (19. ábra). Az adenozin másik része valószínűleg a felszabadult extracelluláris ATP bomlásából származik (22. ábra).

Az ATP ezzel ellentétben a P2X7 receptoron keresztül szabadul fel, mielőtt gyorsan adenozinná bomlik.

Mivel a glutamát felszabadulás nem volt $[Ca^{2+}]_o$ függő, ezért a neuronon és a glián is megtalálható exciátoros aminosav transzporterre (EAAT1-5) terelődött a figyelmünk, mint lehetséges mechanizmus a glutamát felszabadulás kiváltásában. Az EAAT1-5 széles spektrumú glutamát transzporter gátló L-trans-2,4-PDC (300 µmol/L) jelenlétében a glutamát kiáramlás szignifikánsan csökkent a patkány hippokampusz szeletekben a kontroll kísérlethez képest (1.24 ± 0.6 µmol/L, n=7, $p<0.05$, 5. táblázat).

5. táblázat: K^+ (25 mmol/L) depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata patkány hippokampusz szeletekben.

Kezelés (µmol/L)	Net ATP µmol/L	n	Net Adenozin µmol/L	n	Net Glutamát µmol/L	n
Kontroll	1.23 ± 0.23	8	10.28 ± 1.41	8	3.49 ± 0.84	8
Ca^{2+} free and EGTA	0.21 ± 0.01 p<0.01	6	0.22 ± 0.02 p<0.01	6	3.64 ± 0.15 p>0.05	6
TTX (3)	0.07 ± 0.05 p<0.01	6	0.08 ± 0.04 p<0.01	6	0.12 ± 0.03 p<0.01	6
FAc (1000)	0.21 ± 0.14 p<0.01	8	3.08 ± 0.89 p<0.01	8	0.11 ± 0.07 p<0.01	7
Carbenoxolone (100)	0.21 ± 0.02 p<0.01	6	0.22 ± 0.02 p<0.01	6	0.013 ± 0.02 p<0.01	6
Carbenoxolone (20)	2.22 ± 0.37 p<0.05	5	1.02 ± 0.26 p<0.01	5	-	-
BBG (0.1)	0.11 ± 0.14 p<0.01	5	4.60 ± 0.74 p<0.01	5	0.029 ± 0.06 p<0.01	7
Probenecid (150)	2.70 ± 0.11 p<0.05	7	0.22 ± 0.01 p<0.01	7	-	-
ARL67156 (100)	8.62 ± 0.76 p<0.01	6	0.15 ± 0.04 p<0.01	6	2.43 ± 0.63 p>0.05	6
D-AP-5 (10)	0.21 ± 0.03 p<0.01	5	0.15 ± 0.01 p<0.01	5	-	-
Ifenprodil (10)	0.13 ± 0.06 P<0.01	5	0.11 ± 0.02 P<0.01	5	-	-
CNQX (10)	1.17 ± 0.12 p>0.05	5	8.43 ± 0.53 p>0.05	5	0.09 ± 0.06 p<0.01	5
AZ10606120 (0.1)	0.17 ± 0.02 p<0.01	6	0.12 ± 0.05 p<0.01	6	-	-
Dipyridamole (50) + ARL67156(100)	-	-	2.71 ± 0.23 p<0.01	5	-	-
FAc (1000) + TTX (3)	-	-	0.22 ± 0.1 p<0.01	6	-	-
L-trans-2,4-PDC (300)	-		-		1.24 ± 0.66 p < 0.05	7

6. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. P2X és P2Y purin receptorok szerepének vizsgálata a patkány gerincvelőben

6.1.1. Gátló P2Y receptorok szerepe a neurotranszmitterek felszabadulásának szabályozásában

A korábbi publikált eredmények azt mutatták, hogy a hippokampuszból történő glutamát felszabadulás modulációjáért a $P2Y_1$ receptorok a felelősek (Rodrigues és mtsai 2005), valamint a $P2Y_{12}$ és/vagy $P2Y_{13}$ receptorok (Queiroz és mtsai 2003, Lechner és mtsai 2004) szabályozzák a szimpatikus idegekből felszabadult noradrenalin mennyiségét. Ez a szabályozás úgy valósul meg, hogy a P2Y receptorok aktivációja gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+}-beáramlást a sejtbe, így korlátozza a Ca^{2+}-függő vezikuláris exocitózist, mely következtében csökken a noradrenalin felszabadulás az extracelluláris térbe (Powell és mtsai 2000, Lechner és mtsai 2004). Hasonló, P2Y receptor által közvetített neurotranszmitter felszabadulást gátló modulációról számoltak be az agykérget és a hippokampuszt ellátó központi katekolaminerg pályákon is (von Kügelgen és mtsai 1994, Koch és mtsai 1997), bár a résztvevő receptor altípust ezen vizsgálatok során még nem azonosították.

A P2Y receptorokat a purinokkal és/vagy pirimidinekkel szembeni érzékenységük szerint osztályozzuk illetve azonosítjuk: a $P2Y_{1,12}$ és $P2Y_{13}$ receptorok az adenin nukleotidokat részesítik előnyben; a $P2Y_6$-ot az uridin nukleotidok preferálják; a $P2Y_{2,4}$ és $P2Y_{11}$ pedig vegyes preferenciájú receptorok; míg a $P2Y_{14}$ receptort kizárólag az UDP-glükóz és az UDP-galaktóz aktiválja (Abbracchio és mtsai 2006). Kísérleteinkben az ATP, ADP és az ADP szintetikus analógja a 2-MeSADP hatékonyan gátolták az elektromos ingerlés által kiváltott [^{3}H]GLUT felszabadulást a patkány gerincvelő szeletekből, mely során az agonista hatáserősségi sorrend a következőképpen alakult: ADP > 2-MeSADP >ATP. Ezzel ellentétben a 2-MeSATP szignifikánsan serkentette az elektromos ingerlés által kiváltott [^{3}H]GLUT kiáramlást. A farmakológiai vizsgálataink és a hatáserrőségi sorrend alapján ($P2Y_1$: 2-MeSADP = 2-MeSATP > ADP > ATP, $P2Y_{12}$: 2-MeSADP > ADP > ATP és $P2Y_{13}$: ADP > 2-MeSADP >> ATP; von Kügelgen és mtsai 2006) az elektromos stimulusra kiváltott jelölt glutamát felszabadulás modulációjában valószínűleg a $P2Y_{13}$ receptorok

játszanak szerepet. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy az ATP gátló hatását antagonizálta a 2-MeSAMP kezelés, mivel a 2-MeSAMP elsősorban a $P2Y_{12}$ és $P2Y_{13}$ receptorok szelektív antagonistája (von Kügelgen 2006). A továbbiakban azt is megfigyeltük, hogy a szelektív $P2Y_1$ receptor antagonista MRS2179 – mely az alkalmazott koncentrációban szelektív a $P2Y_1$ receptor altípusra (von Kügelgen, 2006) - részben antagonizálta az ATP által közvetített gátló hatást. Az eredményeink alapján valószínű, hogy a $P2Y_1$ receptorok szintén részt vesznek a glutamát kiáramlás gátló modulációjában. A széles spektrumú P2 receptor antagonista suramin (300 µmol/L) jelenlétében az ATP gátló hatása a glutamát felszabadulásra teljesen felfüggesztődött, ami ugyancsak a $P2Y_1$ és $P2Y_{13}$ receptorok aktív részvételére utal. Mivel az irodalomból tudjuk, hogy felszabadult ATP az extracelluláris térben gyorsan adenozinná bomlik, feltételeztük, hogy esetleg az adenozin is vesz részt a hatás közvetítésében. Ezért az ATP gátló hatását a [^{3}H]GLUT kiáramlásra a szelektív A_1-adenozin receptor antagonista DPCPX jelenlétében vizsgáltuk meg és azt tapasztaltuk, hogy a drog nem okozott szignifikáns változást az ATP hatásában. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy az ATP bomlásásból keletkezett adenozin, illetve receptora (A_1) nem vesz rész a glutamát felszabadulás ATP általi gátló szabályozásában, illetve kevéssé valószínű a $P2Y_1/A_1$ heteromer receptorok részvétele is (Yoshioka és mtsai 2002).

A további kísétleteinkben a tríciált noradrenalin felszabadulás modulációjában részt vevő P2 receptor farmakológiai azonosításával foglalkoztunk. A P2 receptor agonisták közül az ATP, ADP és 2-MeSADP mindegyike csökkentette az elektromos ingerlésre kiváltott tríciált NA kiáramlást, de az agonisták hatáserősségi sorrendje valamelyest másképpen alakult, mint a glutamát felszabadulás vizsgálatánál: ADP $\geq$ 2-MeSADP > ATP. A hatáserősségi sorrend kiértékelés alapján elsődlegesen a $P2Y_{13}$ receptor altípust tettük felelőssé a gátló hatás közvetítéséért, de ezen kívül $P2Y_1$ és $P2Y_{12}$ receptor altípusok szerepét sem zárhatjuk ki. Ezt a feltevésünket támasztja alá az is, hogy a $P2Y_1$ és $P2Y_{13}$ receptor antagonista PPADS jelenlétében nem változott meg szignifikánsan a tríciált NA felszabadulás a kontroll kísérlethez képest, valamint a $P2Y_{12}$ receptorokat is gátló MRS2179 is részlegesen kivédte az ATP gátló hatását. Érdekes módon ezekben a kísérletekben a suramin az ATP gátló hatását nem tudta visszafordítani. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a suramin a P2Y receporok közül elsősorban a $P2Y_2$, $P2Y_4$ és $P2Y_{11}$ receptorokon hat (Burnstock 2006), ezért részvételük

kevéssé valószínű az elektromos ingerlésre kiváltott noradrenalin felszabadulás gátló szabályozásában. A fent említett receptor altípusok közül a $P2Y_{11}$ receptor részvétele emllett azért is teljességgel kizárható, mivel ez a receptor altípus a rágcsálókban nem expresszálódik. Az ATP gátló hatása a tríciált noradrenalin felszabadulásra részben érzékeny volt a DPCPX-re, mely valószínűsítheti az A_1 receptor vagy a $A_1/P2Y_1$ heteromer receptor részvételét is a szabályozásban. Ugyanakkor mivel ismert, hogy az $A_1/P2Y_1$ heteromer és A_1 adenozin receptorok nem érzékenyek azokra a drogokra, melyek teljesen vagy részben antagonizálták az ATP gátló hatását (MRS2179, 2-MeSAMP), kizárólagos részvételük a szabályozó mechanizmusban nem tűnik valószínűnek (Yoshioka és mtsai 2001). Végül, a $P2Y_{12}$ és $P2Y_{13}$ receptor antagonista 2-MeSAMP teljes mértékben kivédte az ATP hatását, mely azt bizonyítja, hogy valamelyik receptor altípus vagy mindkettő részt vesz/vehet az elektromos ingerlésre indukált [^{3}H]NA felszabadulás gátló modulációjában. Azonban nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy a P2Y receptorok egy ismeretlen altípusának vagy különböző P2Y receptorok csoportjának heteromer asszociációja felelős a jelölt noradrenalin kiáramlás gátlásáért.

A farmakológiai adatokból levont következtetéseinket erősítette meg az RT-PCR analízis is. Az elemezés során a patkány agytörzsben, ahol a gerincvelőbe vetítő leszálló noradrenerg pálya sejttestjei vannak, mind a $P2Y_{12}$ mind a $P2Y_{13}$ receptorokat kódoló mRNS-t kimutattuk. Ez az eredmény összhangban van Laitinen és munkatársai (2001) munkájával, ahol funkcionális $P2Y_{12}$ receptort azonosítottak az agytörzs katekolaminerg magjaiban. Ezzel ellentékben a DRG-ben, ahol a glutamáterg neuronok sejttestjei találhatóak, illeve a gerincvelőben csak $P2Y_{13}$ receptort (de $P2Y_{12}$ receptort nem) kódoló mRNS-t tudtuk azonosítani. A korábbi vizsgálatokban $P2Y_1$ receptor mRNS-t és fehérjét mutattak ki az agytörzsben (Moran-Jimenez és Matute 2000, Moore és mtsai 2001, Papp és mtsai 2004) a gerincvelőben (Kobayashi és mtsai 2006), valamint a hátsó-gyöki ganglionban (Xiao és mtsai 2002, Ruan és Burnstock 2003, Kobayashi és mtsai 2006) is. Más tanulmányok rávilágítottak arra is, hogy a $P2Y_1$ receptor fehérjéje jelen van az izolált (Ruan és Burnstock, 2003) és kultúrában növesztett (Gerevich és mtsai 2004) hátsó-gyöki neuronokban. Mindezen adatok ellenére immunohisztokémiai kísérleteinkban képtelenek voltunk $P2Y_1$ receptor fehérjét kimutatni a gerincvelő axonvégződéseiben, függetlenül attól, hogy fénymikroszkóppal, vagy

elektromikroszkóppal vizsgálódtunk. Ezzel ellentétben sikerült a $P2Y_1$ receptor altípust azonosítani a patkány gerincvelő hátsó szarvában elhelyezkedő dendriteken, melyek VGLUT1 immunoreaktivitást mutató axonvégződésekkel szinaptizálnak, ami a glutamaterg idegvégződések sajátja. Mindezekből kiderül, hogy a $P2Y_1$ receptorok, amelyek felelősek lehetnek a glutamát kiáramlás szabályozásáért, a gerincvelő interneuronjaihoz kötődnek. Alátámasztotta ezt a feltevést, hogy amikor glutamát receptor antagonista jelenlétében blokkoltuk az excitátoros neurotrszmissziót, megszűnt az ATP gátló hatása a glutamát kiáramlására. Kutatásaink eredményei összecsengenek azzal a megfigyeléssel, hogy az ADP-β-S a $P2Y_{1,12,13}$ receptor agonistája blokkolja a poliszinaptikus EPSP-t a gerincvelőben, valamint antinociceptiv hatást fejt ki a "tail flick" teszt során (Gerevich és mtsai 2004), bár ez utóbbi tanulmányban az ADP-β-S hatását nem függesztette fel sem a PPADS sem pedig a $PY_{12/13}$ antagonista AR-C69931MX (cangrelor).

6.1.2. A serkentő P2X receptorok szerepe a neurotranszmitterek szabályozásásban

Érdekes módon a 2-MeSATP magas mikromoláris tartományban fokozta a glutamát és noradrenalin felszabadulását a patkány gerincvelő szeletekben. Ez a megfigyelés nem támasztja alá azt az elképzelést, miszerint a $P2Y_1$ receptor lenne az elsődleges gátló receptor a glutamát és a noradrenalin felszabadulás szabályozásában, mivel a 2-MeSATP hatékony agonistája a $P2Y_1$ receptornak, viszont csak részleges agonistája a $P2Y_{13}$ receptornak (Marteau és mtsai 2003, von Kügelgen 2006). A 2-MeSATP serkentő hatása mind a bazális, mind az ingerlés által kiváltott neurotranszmitter felszabadulásra ionotrop (P2X) receptor részvételére utalt. Az a megfigyelés, hogy a 2-MeSATP hatását fokozta az MRS2179, valamint, hogy az ATP a 2-MeSAMP jelenlétében serkentő hatást mutatott, arra engednek következtetni, hogy ezek az agonisták ko-aktiválják a P2Y és serkentő receptorokat (P2X), illetve, hogy az ATP P2Y receptorokra kifejtett hatása domináns a serkentő receptorok aktiválásával szemben. A 2-MeSATP a glutamát és noradrenalin felszabadulására gyakorolt stimuláló hatását gátolta a P2X1 receptorok szelektív antagonistája az NF449, így ezeket a hatásokat feltehetően a P2X1 receptor közvetíti. Az elektromos ingerlésre által kiváltott noradrenalin kiáramlást emellett gátolta a PPADS, de az MRS2179 viszont nem, ami a

serkentő P2X1 receptorok endogén aktivációjára utal. Összességében véve, a fenti eredmények összeegyeztethetőek a P2X1 receptor részvételével, vagy akár egy olyan heteromer receptoréval, ami tartalmaz P2X1 alegységet (például a P2X1/5) (Gu és MacDermott 1997, Nakatsuka és Gu 2001, Nakatsuka és mtsai 2003). Mivel az NF449 mikromoláris koncentrációban gátolja a P2X3 receptort is (Braun és mtsai 2001), a P2X3 receptorok szerepe sem zárható ki teljes egészében a 2-MeSATP által kiváltott glutamát felszabadulás közvetítésében.

Összefoglalva eredményeinket arra a következtetésre jutottunk, hogy a P2 receptorok agonisták kettős és egymással ellentétes szabályozást fejtenek ki az elektromos ingerlés által kiváltott glutamát és noradrenalin felszabadulásra a patkány gerincvelőben. Az ATP gátló hatását a glutamát felszabadulására a $P2Y_{13}$ és/vagy a $P2Y_1$ receptorok közvetítik, ezzel szemben a noradrenalin felszabadulást a $P2Y_{13}$ és/vagy a $P2Y_1$ valamint a $P2Y_{12}$ receptorok együttesen szabályozzák gátló irányba. Mind a glutamát, mind a noradrenalin felszabadulás serkentése a P2X1-szerű receptorokon keresztül valósulhat meg. Összességében az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a P2X és P2Y receptorok fontos szerepet játszanak az információ feldolgozás szabályozásában, mind a glutamáterg mind a noradrenerg végződéseken, mely új távlatokat nyithat meg a fájdalomcsillapító vegyületek fejlesztése területén (Burnstock 2006).

6.2. K^+ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás vizsgálata

Kísérleteink során a kontinensen először alkalmazott valós idejű, amperometriás bioszenzoros módszer segítségével választ kerestünk a K^+ depolarizáció hatására kiváltott extracelluláris purin- és glutamát felszabadulás mechanizmusára patkány hippokampusz szeletekben.

Fiziológiás (nem stimulált) körülmények között alacsony bazális ATP, adenozi- és glutamát szint volt mérhető, mely megegyezik a korábbi munkákban publikált adatokkal a hippokampuszban (Frenguelli és mtsai 2007) és a kisagyban (Wall és mtsai 2007, Wall és Dale 2007).

A 25 mmol/L-os K^+ depolarizációt korábbi munkákban széles körben alkalmazták depolarizáló ingerként a purin, adenozin és glutamát felszabadulás mechanizmusának tanulmányozására (Latini és Pedata 2001). Bár a magas $[K^+]_o$ szint fiziológiai jelentősége ma is vita tárgya, patológiás körülmények között - úgymint a hypoxiaban és az iszkémiaban (Olsen és Sontheimer 2008) – megfigyelhető az extracelluláris K^+ tartós növekedése. Kísérleteinkben 25 mmol/L-os kálium (270 sec) tartalmú aCSF oldat hatására gyors és ismételhető ATP, adenozin és glutamát emelkedés volt tapasztalható (19. ábra). A mikroelektród bioszenzoros méréssel egyidejűleg a patkány hippokampusz szeletekből fEPSP-t is elvezettünk, mely érzékeny volt a feszültségfüggő nátrium-csatorna gátlására. Mivel az asztrociták és a glia sejtek általánosságban nem érzékenyek a TTX hatására, levonhatjuk azt a következtetést, hogy az elsődleges jel - mely az ATP, adenozin és glutamát extracelluláris felgyülemléséhez vezet - legnagyobb valószínűség szerint az axonális neuronális aktivitás következménye.

Az irodalmi adatok alapján jól ismert az is, hogy a magas extracelluláris kálium szint tovaterjedő depolarizációt („*spreading depression*” vagy „*SD*”) vált ki, mely jelenség fontos szerepet játszik a migrén, a szívinfarktus és a traumatikus agysérülés patogenezisében is (Lauritzen és mtsai 2011). Mivel az SD önmagában is ATP felszabadulást idézhet elő az agyban (Frenguelli és mtsai 2007, Schock és mtsai 2007), így a vizsgálatunk során mért ATP kiáramlás egyik lehetséges kiváltója az SD is lehet. A fenti kísérletekben magas K^+ depolarizációt követően kezdeti ATP emelkedést tudtunk regisztrálni, majd az ATP felszabadulást követöen az extracelluláris DC elvezetésen az SD kialakulása volt megfigyelhető (19F. ábra). Így megállapíthatjuk azt, hogy az ATP két fázisban szabadul fel, az első fázis végét a „*spreading depression”* (SD) kialakulása determinálja, mely a K^+ depolarizáció adást követően a 3.81 ± 0.2 percben jelent meg (19F. ábra). Ezen eredményekből arra következtetünk, hogy az ATP emelkedés első, korai fázisa szinte teljes mértékben független az SD keletkezésétől, míg a második fázisa, mely nagyobb mértékű ATP emelkedést okoz, a „*spreading depression*”-el állhat kapcsolatban. Szintén ezt a megfigyelést támasztja alá az is, hogy azok a kezelések (pl. TTX, NMDA receptor antagonisták), melyek gátolták az ATP kiáramlás második fázisát, az SD kialakulását is akadályozták vagy késleltették (Somjen 2001).

Korábbi tanulmányok leírták, hogy az ATP különböző mechanizmusokon keresztül juthat az extracelluláris térbe, ilyen mechanizmusok a szinaptikus vezikulák (Gualix és mtsai 1999, Sperlagh és Vizi, 2000, Pankratov és mtsai 2006), és asztrocita lizoszómák exocitózisa (Zhang és mtsai 2007), ahova az ATP speciális vezikuláris nukleotid transzporterek (VNUT) segítségével vevődik fel (Sawada és mtsai 2008). Mivel a kísérleteink során a Ca^{2+}-mentes aCSF perfúziós oldat mind az ATP, mind a adenozin felszabadulásást gátolta a patkány hippokampuszban, az ATP vagy vezikuláris exocitózissal szabadul fel vagy egy vezikuláris exocitózissal felszabadult anyag hatására kerül az extracelluláris térbe. Már korábban megfigyelték, hogy a depolarizáció a hippokampuszban Ca^{2+}-függő ATP kiáramlást okoz (Cunha és mtsai 1996), valamint az extracelluláris ATP szint emelkedésében a P2 receptorok is fontos szerepet játszanak (Pankratov és mtsai 1998 és 2006, Mori és mtsai 2001, Sperlagh és mtsai 2002, Rodrigues és mtsai 2005).

A korábbi vizsgálatok megállapították, hogy az elektromos stimuláció során az adenozin felszabadulás függhet az extracelluláris Ca^{2+} jelenlététől (Latini és mtsai 1997, Wall és mtsai 2007, Wall és Dale 2007), míg más ingerek – úgymint a kombinált oxigén-glükóz megvonás (Frenguelli és mtsai 2007) – Ca^{2+}-független felszabadulást eredményeznek. Az is közismert, hogy a glutamát, mely a KIR fő serkentő transzmittere, Ca^{2+}-függő módon, vezikuláris exocitózissal szabadulhat fel. Mégis, a neurokémiai vizsgálatokban a K^+ depolarizáció hatására felszabadult glutamát Ca^{2+}-függetlennek bizonyult a vizsgálatok jelentős részében (Bernath 1992).

Érdekes módon, a kísérleteinkben azonos stimulációs paraméterek mellett a depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás nem volt egyforma lefutású (19. ábra). Mivel mind a három szenzor egyformán gyorsan reagált a kalibráció során alkalmazott vegyületekre (ismert koncentrációjú ATP-re, adenozinra és glutamátra, lásd. Módszerek fejezet), a lefutásbeli különbségek magyarázata nem a szenzorok eltérő reakcióidejében keresendő. Ehelyett a magyarázatot inkább a purinok és a glutamát egymásra hatásában kell keresni. Így a kísérleteink során felszabadult adenozin lehet az ATP kiáramlás eredménye. Ezt támasztja alá az is, hogy az ATP felszabadulás időben korábban volt detektálható az ATP bioszenzoron, valamint az ekto-ATPáz gátló ARL67156 jelenlétében az extracelluláris ATP szint jelentősen megnövekedett a patkány hippokampusz szeletekben. Ez az eredmény összhangban van

egyéb publikációk feltételezéseivel, miszerint az extracelluláris ATP a hippokampuszban gyorsan adenozinná bomlik (Dunwiddie és mtsai 1997, Cunha és mtsai 1998, Frenguelli és mtsai 2007). Ugyanakkor az ARL67156 láthatóan gátolta a K^+ depolarizációt követő az adenozin akkumulációját is, mely azt bizonyíthatja, hogy az adenozin bioszenzor környezetében észlelt adenozin felhalmozódás többségében az extracelluláris ATP bomlásából keletkezik. Ezzel a megfigyeléssel ellentétben, Frenguelli és munkatársai (2007) arról számoltak be, hogy iszkémiához hasonló állapotban az ARL67156 nem befolyásolja adenozin felszabadulást a hippokampuszban. Azonban a K^+ depolarizáció és a kombinált oxigén-glükóz megvonás valószínűleg különböző neuronális készletekből szabadít fel purinokat, valamint ezek az ingerlések az ektonukleotidázok tevékenységét is befolyásolhatjak. Ezért úgy tűnik, hogy a felszabadított ATP extracelluláris metabolizmusa és annak hozzájárulása az adenozin kiáramláshoz az alkalmazott stimuláció függvényében változik (Cunha és mtsai 1996, Latini és Pedata 2001). Eredményeink azonban további közvetlen adenozin felszabadulásra is rámutattak, mely független az ATP extracelluláris metabolizmusától. Ezt az adenozin felszabadulást akkor észleltük, mikor az ATP lebomlását az ARL67156 alkalmazásával megakadályoztuk, miközben az adenozin újrafelvételét dipiridamollal gátoltuk. Azt is feltételeznünk kell azonban, hogy az ekto-ATPázok ARL67156 általi részleges gátlásának köszönhetően a felszabadult ATP-ből eredő kismértékű adenozin keletkezés szintén hozzájárul ehhez a többletemelkedéshez. Másrészről viszont kevésbé valószínűsíthető, hogy az ATP kiáramlás a bioszenzor által kimutatott glutamát kiáramlás következménye, mivel az utóbbit a CNQX - a nem NMDA receptorok blokkolója - teljes mértékben gátolta de az ATP felszabadulást nem befolyásolta. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a magas K^+ által kiváltott GLUT felszabadulást megelőzően, korai adenozin emelkedése volt regisztrálható.

Eredményeinkből feltételezhető, hogy az ATP és az adenozin felszabadulás szoros összefüggésben áll egymással, mivel az NMDA-típusú glutamát receptor blokkoló D-AP-5, illetve az ifenprodil gátolta mindkét vegyület felszabadulását. Az ifenprodil gátló hatása arra is utalhat, hogy az ATP felszabadulásáshoz az NMDA receptor NR2B alegységek aktivációja szükséges. Ezt a „trigger” glutamát kiáramlást ugyanakkor nem tudtuk a módszer jelenlegi felbontása mellett részleteiben elemezni. A NMDA receptor aktivációjáról leírták, hogy purinokat szabadít fel, beleértve az ATP-t

agyszeletekből (Pedata és mtsai 1991, Craig és White 1993) és asztrocita kultúrákból (Queiroz és mtsai 1997). Lee és munkatársai (2010) azt is kimutatták, hogy az NMDA receptorokat alkotó NR2B alegységek jelen vannak az asztrocitákon és a neuronokon is. Ezért a 25 mmol/L kálium stimulusra felszabaduló ATP forrásaként mind a neuronokat, mind az asztrocitákat figyelembe kell vennünk.

A K^+ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás forrásának további azonosítása érdekében a széles körben használt glia szelektív FAc toxint használtuk (Szerb és Issekutz 1987, Berg-Johnsen és mtsai 1993). A glia szelektivitás biztosítása érdekében viszonylag rövid perfúziós időt alkalmaztunk, mely gátolta az ATP és glutamát kiáramlást, míg az fEPSP tevékenységet nagyrészt fenntartotta. A bioszenzorok által észlelt ATP és a glutamát felhalmozódás legnagyobb része így tehát a glia sejtekből származhat, bár nem zárhatjuk ki azt sem, hogy a Fac-nak minimális hatása lehet a neuronokra is. Bár ennek megfelelően a bioszenzor által érzékelt ATP és glutamát felszabadulás nem egyezhet meg az fEPSP tevékenységért felelős szinaptikus neurotranszmitter felszabadulással, de hozzájárulhat annak modulációjához, mivel az fEPSP elvezetés a FAc jelenlétében kis mértékben csökkent. Amint azt már a fentiekben részleteztük, az adenozin korai felszabadulása valószínűleg az ATP extracelluláris bomlásából ered, melyet a FAc teljesen meggátolt. Másrészről az adenozin jel késői emelkedése a gliotoxin jelenlétében is kimutatható volt, mely elsődleges neuronális adenozin kiáramlásra utalhat. Ezt a feltételezést erősíti az is, hogy a FAc jelenlétében az adenozin kiáramlása teljes mértékben érzékeny volt a tetradotoxinra (TTX).

Az ATP felszabadulás lehetséges mechanizmusai a következők lehetnek: (1) exocitotikus felszabadulás, mely neuronokból (Sperlagh és Vizi 2000, Pankratov és mtsai 2006) és asztrocitákból (Coco és mtsai 2003, Pangrsic és mtsai 2007, Zhang és mtsai 2007) egyaránt végbemehet; (2) P2X7 receptorokon keresztül (Ballerini és mtsai 1996, Suadicani és mtsai 2006); (3) connexin (Cotrina és mtsai 1998, Stout és mtsai 2002), illetve (4) pannexin által közvetített felszabadulás (Bao és mtsai 2004, Huang és mtsai 2007), melyeket elsősorban nem neuronális sejtek esetében jegyeztek fel, beleértve az asztrocitákat is; és (5) anion-csatornán keresztül történő felszabadulás (Darby és mtsai 2003, Okada és mtsai 2004), melyet szintén nem neuronális sejtekben azonosítottak; valamint végül, de nem utolsó sorban a (6) citolitikus felszabadulás.

Mivel a K^+ depolarizáció alatt felszabadult ATP, és adenozin kiáramlás Ca^{2+}-függő és TTX érzékeny volt, ezért az ATP és adenozin kiáramlás citolitikus eredete nem tűnik valószínűnek. Valószínűtlenek tűnik továbbá az anion-csatornák szerepe is a K^+ depolarizáció által kiváltott ATP felszabadulásban, mivel ezek a csatornák elsősorban hipoozmotikus feltételek (pl. sejthalált megelőző sejtduzzadás) mellett aktiválódnak és ez a feltétel a mi vizsgálatainkban nem valósult meg. Ehelyett a P2X7 receptorokra terelődött a gyanúnk, mivel ezek a receptorok jelen vannak a hippokampuszban (Sperlagh és mtsai 2002), valamint szerepet játszhatnak az ATP (Ballerini és mtsai 1996) és a glutamát (Sperlagh és mtsai 2002, Marcoli és mtsai 2008) felszabadulásában. Vizsgálainkban a szelektív P2X7 receptor antagonista BBG (Jiang és mtsai 2000) és AZ10606120 jelenléte - az alkalmazott koncentrációban - majdnem teljes mértékben gátolta az depolarizáció által kiváltott ATP és glutamát kiáramlást a patkány hippokampusz szeletekből. Ezzel ellentétben a BBG az adenozin felszabadulását csak részlegesen gátolta. Ezek a mérési eredmények arra utalhatnak, hogy a P2X7 receptorok depolarizáció hatására szintén aktiválódtak és részt vesznek/vehetnek az ATP és a glutamát felszabadulás kiváltásában.

Másrészről a gap-junction félcsatornákat és egyúttal P2X7 receptorokat is gátló carbenoxolon (Suadicani és mtsai 2006) magas koncentrációban jelentősen csökkentette az ATP, adenozin és glutamát felszabadulást az extracelluláris térbe, amely alapján arra következtethetünk, hogy a gap-junction félcsatornák is részt vehetnek a felszabadulás mechanizmusában. Mégis, mindezek figyelemvételével is mi azt a magyarázatot részesítjük előnyben, mely szerint a carbenoxolon a P2X7 receptorokra gyakorolt gátló hatása révén gátolta a neurotranszmitter kiáramlást. Bár a connexinek félcsatorna formában funkcionálisak lehetnek (Stout és mtsai 2004), és leírtak már a connexineken történő ATP és glutamát kiáramlást az asztrocitákból (Stout és mtsai 2002, Ye és mtsai 2003, Iglesias és mtsai 2009), aktiválásukhoz nagyon alacsony $[Ca^{2+}]_o$ szint szükséges (Pfahnl és Dahl 1999, Valiunas és Weingart 2000), mely feltétel a jelen vizsgálati körülmények mellett nem valósult meg.

További kísérleti eredményeink, melyek pannexin szelektív hatóanyagok felhasználásával készültek (alacsony koncentrációjú CBX (Davidson és Baumgarten, 1988, Bruzzone és mtsai 2005) és probenecid (Silverman és mtsai 2008)), arra mutatnak, hogy az ATP kiáramlással ellentétben az adenozin felszabadulása a pannexin-

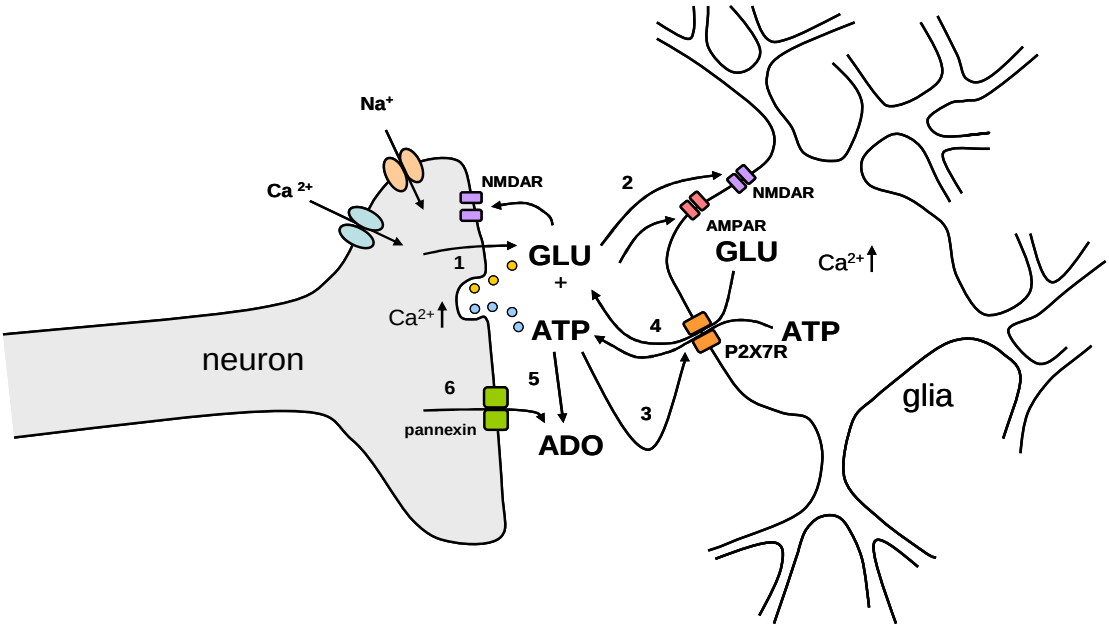
szelektív gátlókra is érzékeny. Másképp kifejezve az extracelluláris adenozin eredete heterogén, és felszabadulása részben a pannexinek keresztül történik. A pannexinek fiziológiás kalcium koncentráció mellett is aktiválódnak (Bruzzone és mtsai 2003), illetve olyan feltételek mellett, melyekről tudjuk, hogy adenozin felszabadulást váltanak ki, úgymint az epileptiform tevékenység (Thompson és mtasai 2008), a metabolikus stressz és az iszkémia (Latini és Pedata 2001, Thompson és MacVicar 2008). Bár az adenozin koncentrációja az axonterminálisokban viszonylag akacsony, mikromoláris szinten van, erős depolarizáló ingert alkalmazva megnövekedhet az ATP felhasználás, mely eredményeként az intraterminális adenozin szint is megemelkedhet. Ez a megemelkedett adenozin szint pedig hajtóerőt jelenthet a pannexin csatornán keresztül történő felszabaduláshoz. Mivel a pannexinek mind a neuronokban, mind a KIR-ben található gliában jelen vannak (Thompson és MacVicar 2008), ezen felszabadulás forrása neuronális vagy gliális egyaránt lehet. Ezzel a felvetéssel összhangban van azon eredményünk is, ahol a FAc részlegesen gátolta az adenozin kiáramlást (25. ábra).

Egy további lehetőség, hogy a pannexin1-csatornák kapuját P2X7 receptorok képezik (Pelegrin és Surprenant 2006), így mindkét fehérje részt vesz a felszabadulás mechanizmusában. Meg kell jegyeznünk azt is, hogy a pannexin-csatornák gátlói sajnos nem eléggé szelektívek, ezért más magyarázatokat sem zárhatunk ki teljesen. Érdekes módon, egy nemrégiben végzett kutatásban a pannexin gátlók jelenlétében megnövekedett ATP kiáramlást figyeltek meg a hippokampusz CA3-as régiójában (Kawamura és mtsai 2010). Azonban Kawamura és munkatársai vizsgálatában egy másfajta ingert, enyhe hipoglikémiát használtak a pannexin által közvetített ATP felszabadulás aktivációjához. A kísérleteinkben pannexin gátlók jelenlétében megnövekedő ATP kiáramlás egy lehetséges magyarázata az adenozin kiáramlás csökkenése és a feltételezett adenozinerg gátló neuromoduláció gyengülése.

Ami a kísérleteink során észlelt glutamát kiáramlást illeti, az teljes mértékben Ca^{2+}-független volt, ugyankkor érzékenynek bizonyult az L-trans-2,4-PDC EAAT gátló jelenlétére, mely az excitatorikus aminosav transzporterek fordított működésére utal a felszabadulás mechanizmusában.

Összefoglalva eredményeinket arra a következtetésre jutottunk, hogy 25 mmol/L-os kálium depolarizáció hatására gyors, ugyanakkor reverzibilis ATP, adenozin és glutamát kiáramlást regisztráltunk patkány hippokampus szeletekben. A stimulus

aktiválja a nátrium-csatornákat az axonterminálisokon, mely hatására feltehetően glutamát vagy ATP szabadul fel Ca^{2+} -függő módon. A felszabadult glutamát a glia sejt felszínén izgatja a NMDA/AMPA receptorokat, mely hatására a glia sejttekből glutamát és ATP szabadul fel az extracelluláris térbe. A gliából felszabaduló ATP és glutamát valószínűleg a P2X7 receptorok részvételével jut az extracelluláris térbe. A P2X7 receptorokat a neuronokból felszabadult ATP aktiválja. Mindkét forrásból felszabadult ATP gyorsan adenozinná metabolizálódik az ektonukleotidáz enzimeken keresztül. Így az extracelluláris térben lévő adenozin egy része az ektonukleotidáz enzimek aktivációja, míg a másik része valószínűleg a pannexin csatornákon keresztül halmozodik fel (28. ábra).



28. ábra: A gliális eredetű ATP, adenozin és glutamát felszabadulást kimutató kísérleti eredményeink összefoglaló sematikus ábrája. A K^+ depolarizáció aktiválja a nátrium-csatornákat az axonterminálisokon, mely hatására egy elsődleges szignál, feltehetően glutamát vagy ATP szabadul fel Ca^{2+}-függő módon **(1)**. A felszabadult glutamát a glia sejt felszínén izgatja a NMDA/AMPA receptorokat **(2)**, mely hatására glutamát és ATP szabadul fel az extracelluláris térbe **(4)**. A gliából felszabaduló ATP és glutamát valószínűleg a P2X7 receptorok részvételével jut az extracelluláris térbe, mely receptorokat a neuronokból felszabadult ATP aktiválja **(3)**. Mindkét forrásból felszabadult ATP gyorsan adenozinná metabolizálódik az ektonukleotidázokon keresztül **(5)**. Az extracelluláris adenozin felhalmozódás egy része független az extracelluláris ATP bomlástól, és valószínűleg a pannexin csatornákon keresztül szabadul fel **(6)**.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációm első részében a P2 receptor altípusok szerepét vizsgáltuk a patkány gerincvelő szeletekből kiáramló tríciált glutamát és tríciált noradrenalin felszabadulásra. Az ATP, ADP és 2-MeSADP kezelés koncentráció függően csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [^{3}H]glutamát felszabadulást a következő hatás erősségi sorrendben: ADP > 2-MeSADP > ATP. A nem-szelektív P2 receptor antagonista suramin (300 µmol/L), illetve a $P2Y_{12,13}$ receptor szelektív antagonista 2-MeSAMP (10 µmol/L) kivédte az 1 mmol/L ATP gátló hatását. Ezekkel az eredményekkel ellentétben a PPADS (30 µmol/L) és a $P2Y_1$ szelektív antagonista MRS2179 (10 µmol/L) csak részlegesen ellensúlyozták az ATP gátló hatását. A P2 receptor agonisták közül mind az ATP, az ADP és a 2-MeSADP szignifikánsan csökkentették az elektromos ingerlésre kiváltott tríciált noradrenalin felszabadulást a gerincvelő szeletekből. Az agonista hatáserősségi sor a következő volt: ADP ≥ 2-MeSADP > ATP. Ezt a gátló hatást a $P2Y_{12,13}$ -receptor antagonista 2-MeSAMP (10 µmol/L) teljesen, míg a $P2Y_1$ receptor antagonista MRS2179 (10 µmol/L) részlegesen védte ki. Ezzel ellentétben a P2 receptor agonista ATP metabolikusan stabil analógja a 2-MeSATP 100-300 µmol/L koncentrációban fokozta a patkány gerincvelő szeletekben az ingerlés által kiváltott [^{3}H]glutamát és [^{3}H]noradrenalin kiáramlást. A 2-MeSATP serkentő hatását (NF449) 100 nmol/L kivédte. Az RT-PCR reakció során a patkány gerincvelőben, agytörzsben és DRG-ben a $P2Y_{13}$ receptor altípust kódoló mRNS kifejeződött, míg a $P2Y_{12}$ receptor altípus mRNS-e csak az agytörzsben volt kimutatható. A $P2Y_1$ receptor altípus expresszió szintén kimutatható volt a patkány gerincvelőben. Összességében az eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ATP gátló hatását a glutamát felszabadulására a $P2Y_{13}$ és/vagy a $P2Y_1$ receptorok közvetítik, ezzel szemben a noradrenalin felszabadulást a $P2Y_{13}$ és/vagy a $P2Y_1$ valamint a $P2Y_{12}$ receptorok együttesen szabályozzák gátló irányba. Mind a glutamát, mind a noradrenalin felszabadulás serkentése a P2X1-szerű receptorokon keresztül valósulhat meg.

Kutatásaink második szakaszában purinerg és glutamáterg rendszerek szerepét vizsgáltuk kálium depolarizáció (25 mmol/L, 270 sec) hatására patkány hippokampusz szeletekben. A kontinensen elsőként mikroelektród bioszenzor és extracelluláris

elektrofiziológiai technika segítségével valós időben vizsgáltuk az ATP, adenozin és glutamát felszabadulásást patkány hippokampusz szeletekben. A hippokampusz szeleteket 25 mmol/L-os kálium tartalmú aCSF oldattal perfundáltuk, mely hatására gyors, ugyanakkor reverzibilis ATP, adenozin és glutamát szignál emelkedést regisztráltunk. Az ARL67156 hatására szignifikánsan megemelkedett az K^+ depolarizáció által előidézett ATP felszabadulás, valamint az ATP szint emelkedése már hamarabb, a K^+ stimulus utáni detektálható volt. A szeleteket feszültségfüggő Na^+-csatorna blokkolóval, tetrodotoxinnal (TTX, 3 µmol/L) kezelve szignifikáns gátlást kaptunk a kontroll kísérlethez képest. A Ca^{2+}-mentes aCSF oldatra hatására az ATP és az adenozin mennyisége szignifikánsan csökkent. A non-NMDA receptor gátló CNQX jelenlétében a glutamát felszabadulás szignifikánsan csökkent, de az ATP és adenozin felszabadulás nem gátolta. A gliatoxin fluoroacetát és P2X7 receptor antagonista carbenoxolon hatására az ATP, adenozin és glutamát felszabadulás jelentősen csökkent. Ezzel ellentétbe az alacsony koncentrációjú CBX és probenecid emelte az adenozin felszabadulását. Az eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a felszabadult glutamát a glia sejt felszínén izgatja a NMDA/AMPA receptorokat, mely hatására glutamát és ATP szabadul fel az extracelluláris térben. A gliából felszabaduló ATP és glutamát valószínűleg a P2X7 receptorok részvételével jut az extracelluláris térbe, mely receptorokat a neuronokból felszabadult ATP aktiválja. Az extracelluláris adenozin felhalmozódás egy része független az extracelluláris ATP bomlástól, és valószínűleg a pannexin csatornákon keresztül szabadul fel.

8. SUMMARY

In the first study, the P2 receptor-mediated modulation of [^{3}H]glutamate and [^{3}H]noradrenaline release were examined in rat spinal cord slices. Adenosine 5'-triphosphate (ATP), Adenosine 5'-diphosphate (ADP), and 2-methylthioadenosine 5'-diphosphate (2-MeSADP) decreased the electrical stimulation-evoked [^{3}H]glutamate efflux with the following order of potency: ADP>2-MeSADP>ATP. The effect of ATP was antagonized by suramin (300 µmol/L), the $P2Y_{12/13}$ receptor antagonist 2-methylthioadenosine 5'-monophosphate (2-MeSAMP, 10 µmol/L), and partly by 4-[[4-Formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonooxy)methyl]-2-pyridinyl]azo]-1,3-benzenedisulfonic acid (PPADS, 30 µmol/L) and the $P2Y_1$ receptor antagonist 2′-deoxy-N6-methyladenosine 3′,5′-diphosphate (MRS2179, 10 µmol/L). ATP, ADP, and 2-MeSADP also decreased evoked [^{3}H]noradrenaline outflow; the order of agonist potency was ADP>2-MeSADP>ATP. The effect of ATP was reversed by 2-MeSAMP (10 µmol/L), and partly by MRS2179 (10 µmol/L). By contrast, 2-methylthioadenosine-5'-triphosphate (2-MeSATP, 100–300 µmol/L) increased resting and electrically evoked [^{3}H]glutamate and [^{3}H]noradrenaline efflux, and this effect was prevented by the P2X1 receptor selective antagonist 4,4′,4″,4‴-[carbonylbis[imino-5,1,3-benzenetriyl bis (carbonyl-imino)]] tetrakis (benzene-1,3-disulfonic acid) octasodium salt (NF449, 100 nmol/L). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that mRNAs encoding $P2Y_{12}$ and $P2Y_{13}$ receptors are expressed in the brainstem, whereas $P2Y_{13}$ but not $P2Y_{12}$ receptor mRNA is present in the dorsal root ganglion and spinal cord. $P2Y_1$ receptor expression in the spinal cord is also demonstrated at the protein level. In conclusion, inhibitory P2Y and facilitatory P2X1-like receptors, involved in the regulation of glutamate ($P2Y_{13}$ and/or $P2Y_1$) and noradrenaline ($P2Y_{13}$ and/or $P2Y_1$, $P2Y_{12}$) release have been identified, which provide novel target sites for analgesics acting at the spinal cord level.

The second study was undertaken to characterize the K^+ depolarization-evoked ATP, adenosine and glutamate outflow in the in vitro rat hippocampal slice. We utilised the microelectrode biosensor technique and extracellular electrophysiological recording for the real-time monitoring of the efflux of ATP, adenosine and glutamate. ATP, adenosine and glutamate sensors exhibited transient and reversible current during 25

mmol/L K^+ depolarization, with distinct kinetics. The ecto-ATPase inhibitor diethyl-β-γ-dibromomethylene-D-adenosine-5′-triphosphate trisodium salt hydrate (ARL67156) enhanced the extracellular level of ATP and inhibited the prolonged adenosine efflux suggesting that generation of adenosine may arise from the extracellular breakdown of ATP. Stimulation-evoked ATP, adenosine and glutamate efflux was inhibited by tetrodotoxin, while Ca^{2+}-free medium abolished ATP and adenosine efflux. Extracellular elevation of ATP and adenosine were decreased in the presence of NMDA receptor antagonists D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP-5) and ifenprodil, whereas non-NMDA receptor blockade by CNQX inhibited glutamate but not ATP and adenosine efflux. The gliotoxin fluoroacetate and P2X7 receptor antagonists inhibited the K^+-evoked ATP, adenosine and glutamate efflux, while carbenoxolone in low concentration and probenecid decreased only the adenosine efflux. Our results demonstrate activity-dependent gliotransmitter release in the hippocampus in response to ongoing neuronal activity. ATP and glutamate is released by P2X7 receptor activation into extracellular space. Although the efflux of adenosine did arise from released ATP, it might also be released directly via pannexin hemichannels.

9. IRODALOMJEGYZÉK, HIVATKOZÁSOK

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight,GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. (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.

Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL, Bennett MR. (2003) Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. Neuroreport, 14 (17):2177-2181

Agteresdh HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. (1999) Adenosine triphosphate: establishes and potential clinical applications. Drugs, 58 (2): 211-232.

Alloisio S, Cervetto C, Passalacqua M, Barbieri R, Maura G, Nobile M. (2008) Functional evidence for presynaptic P2X7 receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. FEBS Lett , 582: 3948-3953.

Amaral D, Lavenex P. (2007) Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (szerk). The hippocampus Book. Oxford University Press. New York USA 37-114.

Anderson CM, Xiong W, Geiger JD, Young JD, Cass CE, Baldwin SA, Parkinson FE. (1999) Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. J Neurochem 73:867-873.

Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD. (2008) ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear. Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 18770-18775.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. Annu Rev Physiol, 63: 795-813.

Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q. (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. Proc Natl Acad Sci U S A ,99: 9840-9845.

Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I . (1996) Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. Neuroreport, 7: 2533-2537.

Bao L, Locovei S, Dahl G. (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett, 72: 65-68.

Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu J, MacDermott AB. (1997) ATP mediates synaptic transmission in rat spinal cord lamina II (substantia gelatinosa). Pflugers Arch, 434:76-76.

Bennett GC, Boarder MR. (2000) The effect of nucleotides and adenosine on stimulus-evoked glutamate release from rat brain cortical slices. BR J Pharmacol, 131 (3):617-623.

Berg-Johnsen J, Paulsen RE, Fonnum F, Langmoen IA. (1993) Changes in evoked potentials and amino acid content during fluorocitrate action studied in rat hippocampal cortex. Exp Brain Res, 96: 241-246.

Bernath S. (1992) Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? Prog Neurobiol, 38: 57-91.

Boehm S. (1999) ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. J Neurosci, 19(2):737-746.

Borvendeg SJ, Gerevich Z, Gillen C, Illes P. (2003) P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-dependent Ca2+ channels in rat dorsal root ganglion neurons. Synapse, 47:159-161.

Bowser DN, Khakh BS. (2004) ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. J Neurosci, 24: 8606-8620.

Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB. (1998) The expression of P2X(3) purinoreceptors in sensory neurons: Effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. Mol. Cell. Neurosci, 12: 256-268.

Braun K, Rettinger J, Ganso M, Kassack M, Hildebrandt C, Ullmann H, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G. (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol, 364: 285-90.

Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. (2005) Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. J Neurochem, 92: 1033-1043.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 13644-13649.

Burnstock G. (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacol. Rev, 58:58-86.

Burnstock G. (2006) Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. Pharmacol. Ther, 110: 433-454.

Canals S, Larrosa B, Pintor J, Mena MA, Herreras O. (2008) Metabolic challenge to glia activates an adenosine-mediated safety mechanism that promotes neuronal survival by delaying the onset of spreading depression waves. J Cereb Blood Flow Metab- 28: 1835-1844.

Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y. (1995) Molecular cloning and functional analysis of novel P2 nuvleotide receptor. J Biol Chem, 270:26152-26158.

Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P. (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. J Biol Chem, 278: 1354-1362.

Collier HO, James GW, Schneider C. (1966) Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate. Nature, 212. 411-412.

Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brézillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). J Biol Chem, 276 (44):41479-41485.

Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. (1999) Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. Br J Pharmacol, 128 (6):1199-1206.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H. (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 15735-15740.

Cotrina ML, Lin JH, López-Garcia JC, Naus CC, Nedergoard. (2000) ATP-mediates glia signaling. J. Neurosci. 20 (8): 2835-2844

Craig CG, White TD. (1993) N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. J Neurochem, 60: 1073-1080.

Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. J Neurosci, 18: 1987-1995.

Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM. (1996) Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. J Neurochem, 67: 2180-2187.

Cunha RA. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. Neurochem Int, 38: 107-125.

Dale N, Hatz S, Tian F, Llaudet E (2005). Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals. Trends Biotechnol 23: 420-428.

Dale N, Pearson T, Frenguelli BG. (2000) Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the CA1 region of the rat hippocampal slice. J Physiol, 526 Pt 1: 143-155.

Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. (2003) ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. J Neurophysiol, 89: 1870-1877.

Davidson JS, Baumgarten IM. (1988) Glycyrrhetinic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. J Pharmacol Exp Ther, 246: 1104-7.

Domercq M, BrambilleL, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P. (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. J Biol Chem , 281 (41):30684-30696.

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Swanson, RA. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. The Journal of Neuroscience, 23: 1320-8.

Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. (2001) P2X receptors in peripheral neurons. Prog. Neurobiol, 65: 107-134.

Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. J Neurosci, 17: 7673-7682.

Eric B. Gonzales, Toshimitsu Kawate and Eric Gouaux. (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. Nature, 460, 599-604

Fang X, Mc Mullan S, Lawson SN, Djouhrui L. (2005) Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones int he rat in vivo. J. Physiol, 565:927-943.

Fellin T, Carmignoto G. (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. J Physiol, 559: 3-15.

Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M. (2009) Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 15037-15042.

Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. J Biol Chem, 281 (7):4274-4284.

Fields RD, Burnstock G. (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. Nat Rev Neurosci, 7: 423-436.

Frenguelli BG, Llaudet E, Dale N. (2003) High-resolution real-time recording with microelectrode biosensors reveals novel aspects of adenosine release during hypoxia in rat hippocampal slices. J Neurochem, 86: 1506-1515.

Frenguelli BG, Wigmore G, Llaudet E, Dale N. (2007) Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. J Neurochem, 101: 1400-1413.

Gerevich Z, Borvendeg SJ, Schroder W, Franke H, Wirkner K, Norenberg W, Furst S, Gillen C, Illes P. (2004) Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. J. Neurosci, 24: 797-807.

Gerevich Z, Illes P. (2004) P2Y receptor and pain transmission. Purinergic Signalling, 1: 3-10.

Goding JW, Grobben B, Slegers H. (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim Biophys Acta, 1638: 1-19.

Gu JG, MacDermott AB. (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. Nature 389: 749-753.

Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT. (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. J Neurochem, 73: 1098-1104.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. J Neurosci, 19: 520-528.

Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG. (2009) Astrocytic modulation of sleep home-ostasis and cognitive consequences of sleep loss. Neuron, 61:213-219.

Haydon PG. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci, 2: 185-193.

Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. (2007) The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 6436-6441.

Hussl S, Boehm S. (2006) Functions of neuronal P2Y receptors. Pflugers Arch 452:538-551.

Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E. (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. Am J Physiol Cell Physiol 295:C752–C760

Iglesias R, Spray DC, Scemes E. (2009). Mefloquine blockade of Pannexin1 currents: resolution of a conflict. Cell Commun Adhes. 5-6:131-7.

Illes P, Nieber K, Nörenberg W. (1996) Electrophysiological effects of ATP on brain neurones. J Auton Pharmacol, 16 (6):407-411. Review.

Inoue K, Nakazawa K, Fujimori K, Watano T, Takanaka A. (1992) Extracellular adenosine 5’-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons. Neurosci Lett, 134 (2):215-218.

Jeftinija SD, Jeftinija KV. (1998) ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cell. Neurosci. 82 (39):927-934.

Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. Mol Pharmacol, 58: 82-88.

Jin YH, Bailey TW, Andersen MC. (2004) Cranial afferent glutamate heterosynaptically modulates GABA release onto second-order neurons via distinctly segregated metabotropic glutamate receptors. J Neurosci, 24(42):9332-9340.

Juranyi Z, Sperlagh B, Vizi ES. (1999) Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. Brain Res, 823: 183-190.

Kato F, Shigetomi E. (2001) Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. J Physiol, 530(Pf3):469-486.

Kawamura M Jr, Ruskin DN, Masino SA. (2010) Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and KATP channels. J Neurosci, 30: 3886-95.

Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. Nat Neurosci, 2:322-330.

Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A. (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. J Neurosci, 23: 7436-7437.

Khakh BS, Henderson G. (1998) ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. Mol Pharmacol, 54:372-378.

Kittel A, Csapo Z, Csizmadia E, Jackson SW, Robson SC. (2004) Co-localization of P2Y1 receptor and NTPDase1/CD39 within caveolae in human placenta. Eu. J. Histochem, 48: 253-259.

Kobayashi K, Fukuoka T, Lyamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K. (2006) Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. J. Comp. Neurol, 498: 443-454.

Koch H, von Kugelgen I, Starke K. (1997) P2-receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the rat hippocampus. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 355, 707-715.

Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K. (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 11023-11028.

Laitinen JT, Uri A, Raidaru G, Miettinen R. (2001) [(35)S]GTPgammaS autoradiography reveals a wide distribution of G(i/o)-linked ADP receptors in the nervous system: close similarities with the platelet P2Y(ADP) receptor. J. Neurochem, 77: 505-518.

Latini S, Pedata F, Pepeu G. (1997) The contribution of different types of calcium channels to electrically-evoked adenosine release from rat hippocampal slices. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 355: 250-5.

Latini S, Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J Neurochem, 79: 463-484.

Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. (2011) Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab, 31:17-35.

Lechner, S.G., Dorostkar, M.M., Mayer, M., Edelbauer, H., Pankevych, H., Boehm, S., 2004 Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y12 receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca2+ channels. Eur. J. Neurosci. 20, 2917-2928.

Lee MC, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemin G. (2010) Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. PLoS One, 5:e14123.

Li C, Peoples RW, Lanthorn TH, Li ZW, Weight FF. (1999) Distinct ATP-activated currents in different types of neurons dissociated from rat dorsal root ganglion. Neurosci. Lett, 263: 57-60.

Li J, Perl ER. (1995) ATP modulation of synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa. J. Neurosci, 15:3357-3365.

Llaudet E, Botting NP, Crayston JA, Dale N. (2003) A three-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system. Biosens Bioelectron, 18: 43-52.

Llaudet E, Hatz S, Droniou M, Dale N. (2005) Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue. Anal Chem, 77: 3267-3273.

Lorenzen A, Schwabe R. (2001) P1 receptors. In: Handbook of Experimental pharmacology: Purinergic and pyrimidinergic signalling, Vol. 151/1, MP Williams, Abbracchio, M. eds. Springer, Berlin. pp 19-47.

Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, Guarnieri S, Alloisio S, Thellung S, Nobile M, Maura G. (2008) P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. J Neurochem. 105: 2330-42.

Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS. (2003) Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. Mol Pharmacol, 64(1):104-12.

Millan MJ. (1999) The induction os pain: an integrative review. Prog Neurobiol, 57:1-164

Millan MJ. (2002) Descending control of pain. Prog. Neurobiol, 66:355-474.

Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan .B, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR. (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: A quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. Biochim. Biophys. Acta, 1521: 107-119.

Moran-Jimenez MJ, Matute C. (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. Mol. Brain Res, 78: 50-58.

Mori M, Heuss C, Gahwiler BH, Gerber U. (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. J Physiol, 535: 115-123.

Morris R, Cheusuang O, Stewort A, Maxwell D. (2004) Spinal dorsal horn neurone targets for nociceptive primary afferens: do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive intormation in processed at the spinal level. Brain Res Rev, 46:173-190

Nakatsuka T, Gu JG. (2001) ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. J. Neurosci, 21: 6522-6531.

Nakatsuka T, Tsuzuki K, Ling JX, Sonobe H, Gu JG. (2003) Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. J.Neurophysiol, 89: 3243-3252.

Nedergaard M. (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science, 263: 1768-1771.

North RA, Verkhratsky A. (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. Pflugers Arch, 452: 479-485.

Okada SF, O'Neal WK, Huang P, Nicholas RA, Ostrowski LE, Craigen WJ. (2004) Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. J Gen Physiol, 124: 513-526.

Olsen ML, Sontheimer H. (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K+ buffering to cell differentiation. J Neurochem, 107: 589-601.

Palkovits Miklós. (2000) Az agy és a fájdalom: az érzékelés és a válasz agypályái és transzmitterei. Orvosi Hetilap 141. évfolyam 41. szám.

Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A. (2007) Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. J Biol Chem, 282: 28749-28758.

Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O. (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. Eur J Neurosci, 10: 3898-3902.

Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky. (2002) A Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. J Physiol, 542: 529-536.

Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RAm (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. Pflugers Arch, 452: 589-597.

Papp L, Balazsa T, Kofalvi A, Erdelyi F, Szabo G, Vizi, ES, Sperlagh B. (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. J. Pharmacol. Exp. Ther, 310: 973-980.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature, 369: 744-747.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY. (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science, 310: 113-116.

Patti L, Raiteri L, Grilli M, Parodi M, Raiteri M, Marchi M. (2006) P2X (7) receptors exert a permissive role ont he activation of release-enhancing presynaptic alpha7 nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamtergic terminals. Neuropharmacology, 50(6):705-713.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. Neuron, 46: 731-744.

Pedata F, Pazzagli M, Pepeu G. (1991) Endogenous adenosine release from hippocampal slices: excitatory amino acid agonists stimulate release, antagonists reduce the electrically-evoked release. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 344: 538-543.

Pelegrin P, Surprenant A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. Embo J, 25: 5071-5082.

Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. Mol Biol Cell, 16: 3659-3665.

Persson S, Boulland JL, Aspling M, Larsson M, Fremeau RT, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Broman J. (2006) Distribution of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat spinal cord, with a note on the spinocervical tract. J.Comp. Neurol, 497:683-701.

Petruska JC, Cooper BY, Gu JG, Rau KK, Johnson RD. (2000) Distribution of P2X1, P2X2, and P2X3 receptor subunits in rat primary afferents: Relation to population markers and specific cell types. J. Chem. Neuroanat, 20:141-162.

Pfahnl A, Dahl G. (1999) Gating of cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage. Pflugers Arch, 437: 345-353.

Powell AD, Taschemacher AG, Seward E P. (2000) P2Y purinoceptors inhibit exocytosis in adrenal chromaffin cells via modulation of voltage-operated calcium channels. J. Neurosci, 20: 606-16.

Price GD, Robertson SJ, Edwards FA. (2003) Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission inducerd by activation of presynaptic P2Y receptors in the rat medial habenula nucleus. Eur. J Neurosci, 17 (4):844-850.

Queiroz G, Gebicke-Haerter PJ, Schobert A, Starke K, von Kugelgen I. (1997) Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. Neuroscience, 78: 1203-1208.

Queiroz G, Talaia C, Goncalves J. (2003) ATP modulates noradrenaline release by activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. J. Pharmacol Exp. Ther, 307: 809-815.

Ralevic V, Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, 50:413-492.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. (2006) Molecular properties of P2X receptors. Pflügers Arch, 452: 486-500.

Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and

P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. J Neurosci, 25: 6286-6295.

Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. J. Neurosci, 25: 6286-95

Ruan HZ, Birder LA, de Groat WC, Tai C, Roppolo J, Buffington CA, Burnstock G. (2005) Localization of P2X and P2Y receptors in dorsal root ganglia of the cat. J.Histochem. Cytochem, 53: 1273-1282.

Ruan HZ, Burnstock G. (2003) Localization of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. Histochem. Cell Biol. 120, 415-426.

Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 5683-5686.

Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Memichen F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI. (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. Cell, 137:1148-1159.

Schock SC, Munyao N, Yakubchyk Y, Sabourin LA, Hakim AM, Ventureyra EC. (2007) Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. Brain Res, 1168: 129-38.

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

Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R. (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. J Neurosci, 26: 5370-5382.

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

Silverman W, Locovei S, Dahl G. (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. Am J Physiol Cell Physiol, 295: C761-767.

Somjen GG. (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. Physiol Rev, 81:1065-96.

Sperlagh B, ATP mediated signaling in the nervous system. In Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology, 3rd Edition, Vol 2. Neurotransmitter Systems (Vizi ES, Hamon M, szerk). Heidelberg, Springer-Verlag (in press)

Sperlagh B, Baranyi M, Hasko G, Vizi ES. (2004) Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. J Neuroimmunol. 151:33-9.

Sperlagh B, Kofalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ. (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. J Neurochem, 81: 1196-1211.

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

Sperlagh B, Vizi ES. (2000) Regulation of purine release, In Handbook of Experimental Pharmacology, (Abbracchio MP és Williams M szerk), pp. 179-209. Springer, Berlin.

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

Stout C, Goodenough DA, Paul DL, (2004) Connexins: functions without junctions. Curr Opin Cell Biol. 16: 507-512.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. J Biol Chem, 277: 10482-10488.

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

Sul JY, Orosz G, Givens RS, Haydon PG. (2004) Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. Neuron Glia Biol, 1: 3-11.

Szentághotai J és Réthelyi M. (1994) Funkcionális anatómia. Semmelweis Kiadó, Budapest

Szerb JC, Issekutz B. (1987) Increase in the stimulation-induced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. Brain Res, 410: 116-120.

Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA. (2008) Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. Science, 322: 1555-1559.

Thompson RJ, Macvicar BA. (2008) Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. Channels (Austin) 2:81-6

Tian F, Gourine AV, Huckstepp RT, Dale N. (2009) A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. Anal Chim Acta, 645: 86-91.

Uchihashi Y, Bencsics A, Umeda E, Nakai T, Sato T, Vizi ES. (1998) Na+ channel block prevents the ischemia-induced release of norepinephrine from spinal cord slices. Eur. J. Pharmacol, 346: 145-50.

Valiunas V, Weingart R. (2000) Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. Pflugers Arch, 440: 366-379.

Vizi ES, Sperlagh B, Baranyi M. (1992) Evidence that ATP released from the postsynaptic site by noradrenaline, is involved in mechanical responses of guinea-pig vas deferens: cascade transmission. Neuroscience, 50:455-465.

von Kügelgen I, Spath L, Starke K. (1994) Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex. Br. J. Pharmacol, 113: 815-822.

von Kügelgen I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. Pharmacol. Ther, 110:415-432.

Von KülgelgenI, Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn Schwiedebergs Arch. Pharmacol, 362 (4-5):310-323.

Wall M, Dale N. (2008) Activity-dependent release of adenosine: a critical re-evaluation of mechanism. Curr Neuropharmacol, 6: 329-337.

Wall MJ, Atterbury A, Dale N. (2007) Control of basal extracellular adenosine concentration in rat cerebellum. J Physiol, 582: 137-151.

Wall MJ, Dale N. (2007) Auto-inhibition of rat parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity-dependent adenosine release. J Physiol, 581: 553-565.

Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barbard EA. (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. FEBS Lett, 324 (2):219-225.

Wieraszko A, Goldsmith G, Seyfried TN. (1989) Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. Brain Res, 485: 244-250.

Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu, SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG, Zhang X. (2002) Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 99: 8360-8365.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. J Neurosci 23:3588-3596.

Yoshida K, Nakagawa T, Kaneko S, Akaike A, Satoh M. (2002) Adenosine 5'-triphosphate inhibits slow depolarization induced by repetitive dorsal root stimulation via P2Y purinoceptors in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord slices with the dorsal root attached. Neurosci. Lett, 320:121-124

Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H. (2001) Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 98: 7617-7622.

Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL. (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. Neuron, 40: 971-982.

Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q. (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. Nat Cell Biol, 9: 945-953.

Zimmermann H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 362: 299-309.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Heinrich A, Kittel A, Csölle C, Sylvester Vizi E, Sperlagh B. (2008) Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord. Neuropharmacology, 54(2):375-86.

Heinrich A, Andó RD, Túri G, Rózsa B, Sperlágh B. (2012) K^+ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. Br J Pharmacol, 167(5):1003-20.

Sperlagh B, Heinrich A, Csölle C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. Purinergic Signal, 3(4):269-84.

10.2. A disszertációtól független közlemények

Csölle C, Heinrich A, Kittel A, Sperlágh B. (2008) P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. J Neurochem, 106(1):347-60.

Rubini P, Milosevic J, Engelhardt J, Al-Khrasani M, Franke H, Heinrich A, Sperlagh B, Schwarz SC, Schwarz J, Nörenberg W, Illes P. (2009) Increase of intracellular Ca^{2+} by adenine and uracil nucleotides in human midbrain-derived neuronal progenitor cells. Cell Calcium, 45(5):485-98.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Rácz Károly Professzor úrnak, hogy megértéssel fogadta és jóváhagyta a halasztási kérvényemet lehetőséget teremtve a Ph. D. fokozatszerzésemre.

Köszönettel tartozom Dr. Réthelyi Miklós és Dr. Bereczki Dániel Professzor uraknak nagylelkű támogatásukért, mellyel biztosították, hogy az Elméleti Idegtudományok szakterületén, a Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola keretein belül végezhessem tudományos kutatásomat.

Köszönettel és hálával tartozom Dr. Vizi E. Szilveszter Professzor úrnak, tudományos szemléletéért, mellyel kellően rávilágítva, bizalmat fektetett belém, hogy a Funkcionális Idegtudományok Programjában választhassak aktuális és időtálló kutatási témát.

Köszönet illeti Dr. Sperlágh Beátát témavezetéséért, és szakmai karrierem elindításáért illetve kutatási témám anyagi támogatásáért.

Köszönettel tartozom a KOKI valamennyi dolgozójának, legfőképpen közvetlen munkatársaimnak, Andó Rómeó Dénesnek, Balázsa Tamásnak, Baranyi Máriának, Csölle Cecíliának, Dr. Kittel Ágnesnek, és Kőrössi Zsuzsannának valamint Dr. Rózsa Balázsnak és Dr. Túri Gergőnek, a kísérleteimben nyújtott széles körű támogatásukért.

Végezetül szívből köszönöm kisfiamnak, kislányomnak, feleségemnek, édesanyámnak, édesapámnak, testvéremnek, ismerőseimnek azt a töretlen hitet és mindenre kiterjedő figyelmet, mellyel biztattak abban, hogy a kutatói pályán megtaláljam a helyem.