

1. Nemszinaptikus receptorok és szubmikronos Ca^{2+} válaszok: A két-foton lézermikroszkópia felhasználása a farmakológiai vizsgálatokra.

A kutatócsoportunkban Közép Európában elsőként bevezetett két-foton mikroszkópia hasznos új információkat szolgáltatott a nemszinaptikus kölcsönhatások szubmikronos anatómiai struktúrákban kialakított hatásairól. Feltérképeztük a technika felhasználását a különböző szövetpreparátumok esetében. A két-foton gerjesztés felhasználható a drogok akut szeletben történő diffúziójának követésére is. Ebben az esetben a drogadó pipettába fluorescens festéket teszünk, amelyet a szeletre irányítva modellezhetjük a nemszinaptikus módon terjedő molekulák útját is, és lehetséges a „droghók” direkt optikai megfigyelése is. A perfundáló folyadékba alkalmazott drogok esetében kimutattuk, hogy a szelet teljes mélységében nem képesek diffundálni a gyógyszerek. A módszer alkalmazható nemszinaptikus receptor ingerlést követő Ca^{2+} válaszok megfigyelésére is. Ennek egy kitűnő példája a nikotin receptor, amely, mint az a Iskola pályázatunkban is részletesen kifejtettük, nagyon ritkán fordul elő szinapszisban, meghatározóan extraszinaptikus elhelyezkedésű. A kolinerg varikozitások 7%-a létesít szinaptikus kontaktust a hippokampuszban. Ugyanakkor jelentős Ca^{2+} beáramlást indukál a nikotin receptor ingerlés, amely fluorescens két-foton mikroszkópia alkalmazásával, jól követhető. Számos adat támasztja alá, hogy ezek a receptorok fontos szerepet játszanak a memória és a tanulás létrejöttében. A súlyos demenciával járó Alzheimer kórban a nikotin tartalmú tapasz egyértelműen hatékony, és talán a jövő gyógyszeres terápiáját is jelentheti, ha sikerül az addikciót és deszenzitizációt előidéző hatást kiküszöbölni. Két-foton vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a sejtek Ca^{2+} válasza nikotin jelenlétében megnő, de nem minden nyúlvány tuskében! Vagyis a nikotin a Ca^{2+} válaszokat összetett módon képes befolyásolni. Ha ez egyik tuskében fokozott választ tud előidézni, míg a másikban nem, könnyű elképzelni, hogy a működési egységekben, a tuskékben eltárolható bit információ mennyisége megnő. Ez a nikotin sejt szintű hatásmechanizmusait mutatja, és kiegészülve további új adatokkal segíthet azt megérteni, hogy a nikotin milyen módon képes az emberekben a memória serkentésére.

2. Nemszinaptikus droghatások: Az antidepresszánsok Na^+ áramokra gyakorolt hatásának vizsgálata hippokampusz tenyésztésben.

Az antidepresszánsok Na^+ csatornákra gyakorolt hatását tenyésztett hippokampális neuronok natív csatornáin vizsgáltuk, egész sejt elvezetést alkalmazva. A depolarizáló pulzusokat 10 Hz-es sorozatokban alkalmaztuk. A depolarizáció-sorozatok különböző tartófeszültségeken ismételtük először kontroll körülmények között, majd antidepresszáns jelenlétében. A fluoxetin és a desipramin a Na^+ áramokat koncentráció-függő módon gátolta. Az antidepresszánsok által kifejtett gátlás használatfüggő komponensét az egyes depolarizáló sorozatokon belül a kiváltott áramok amplitúdóját összehasonlítva határoztuk meg. Felmerült a kérdés, hogy a markáns feszültségfüggést a lassú inaktívált állapothoz való nagy affinitás okozza-e. A lassú inaktívációt elősegítő depolarizáló prepulzus alkalmazása mellett a desipramin, illetve a fluoxetin kiváltotta gátlás jelentősen nagyobb volt, mint a gyors inaktívációs protokoll mellett. Így bizonyítható, hogy az antidepresszánsok affinitása a Na^+ csatorna lassú inaktívált állapotához jóval magasabb, mint a gyors inaktívált állapothoz. Az antidepresszánsok által kifejtett Na^+ csatorna gátlást eddig elsősorban a mellékhatások, illetve az analgetikus hatással kapcsolatban tanulmányozták. Kísérleteink alapján azonban ezek a gyógyszerek hatnak a neuronális Na^+

csatornákra is, méghozzá a terápiás koncentrációtartományhoz közeli dózisokban, ami felveti azt a kérdést, hogy ez a gátlás nem játszik-e szerepet a terápiás hatás kialakításában is. Elképzelhető, hogy az antidepresszánsok a lassú inaktivált állapot stabilizálásának keresztül a Na⁺ csatorna úgy gátolják, hogy a neuronális információfeldolgozás átalakul, és segíti a depressziós neurális „körök” oldódását.

3. Nemszinaptikus hatások a szinaptikus rendszerben: Nemszinaptikus GABA és glutamát receptorok.

Egy összefoglaló munkánkban azt vizsgáltuk meg, hogy szinaptikus transzmisszió transzmittereinek, a glutamát és a GABA képesek-e nemszinaptikus kölcsönhatásokra. Az irodalmi adatok többsége az utóbbi évtizedben keletkezett, tehát relatíve újnak számít a monoaminerg rendszerek nemszinaptikus működéseinek kutatási területéhez képest. Két fontos kérdéskör mentén foglaltuk össze a nemszinaptikus GABA és glutamát rendszerről kapott ismereteket: 1. Milyen affinitásúak lehetnek a különböző GABA ill. glutamát receptorok (figyelembe véve hogy a minél „nemszinaptikusabb” egy receptor annál magasabb az affinitása), 2. Az orvosi terápiában játszott szerepük szerint (extraszinaptikus receptorok a gyógyszerek preferált célpontjai).

4. P2X₇ receptorok az agyban: nemszinaptikus vonatkozások.

A P2X₇ receptorok ligand vezérelt ion csatornák, amelyek egy homo-oligomér struktúrát alkotnak. A központi és a perifériás idegrendszer számos sejtjében előfordulnak, és elsődleges szerepüknek a védekezési reakciók kialakítását tartották. Azonban az utóbbi idők kutatásai azt támasztják alá, hogy a központi idegrendszerben jelátviteli funkciókban is részt vesznek. Ebben az évben áttekintettük a P2X₇ receptorok farmakológiájáról, sejt specifikus elhelyezkedéséről szerzett ismereteinket. Számos központi idegrendszeri funkcióról tudunk már, amely szerepet játszhat a nemszinaptikus működésekben. Nem utolsó sorban olyan patológiás állapotokban amelyben a nemszinaptikus hatások előtérbe kerülnek, ilyen az ischemia jelensége is, vagy az Alzheimer kór, központi szerepet játszhatnak ezek a receptorok.

2007

1. A fluoxetin közvetlen gátló hatása az NMDA receptorok működésére

A fluoxetin közvetlenül gátolta az egész sejtes NMDA-áramokat. A számított IC₅₀-értékek fluoxetinre 10,51 μM, míg DMI-ra 3,13 μM. Eredményeink értelmezése és jelentősége szempontjából érdekes lehet, hogy az antidepresszáns kezelés során a vegyületek koncentrációja a vérplazmában 1-2 μM, az agyban akkumulálódva még ennél is magasabb koncentrációban fordulhatnak elő. Mindez arra utal, hogy a terápia során kialakuló koncentráció viszonyokban a fluoxetin és a DMI az NMDA receptorok működését hatékonyan gátolhatják. A fluoxetin és DMI hatásában ugyanakkor jelentős különbségeket fedeztünk fel. Az NMDA-áramokat a DMI feszültség-függő módon gátolta, a gátlás mértéke a depolarizációval csökkent. Ezzel szemben a fluoxetin gátlása nem függött jelentős mértékben a feszültségtől.

2. Ca²⁺ válaszok noradrenerg serkentése 5. rétegbeli piramissejtek bazális dendritjein

A β -adrenerg receptorok elsősorban serkentő jelátvitelt indukálnak a sejtszinten. A kisagyban például a NA depolarizálja a kosársejteket és β_2 -adrenerg receptorokon keresztül serkenti a GABA felszabadulását a szinapszisokban. Jelen eredményeink alapján feltehető, hogy β -adrenerg receptorok aktivációja váltotta ki a serkentetőség növekedését a prefrontális kéreg piramissejtjeiben. Az erőteljes Ca²⁺ válaszok kiváltása fontos a szubcelluláris kaszkád mechanizmusok beindítása szempontjából a NA sejtszintű hatásai esetében. Figyelembe véve azt, hogy a prefrontális kéreg fontos szerepet játszik a kognitív folyamatokban és a NA fokozza a serkentetőségét a prefrontális piramissejteknek, valószínűsíthetően a NA a kognitív funkciókra is serkentően hat. Ezért a NA-kiváltotta serkentetőség-növekedés, amely fokozott válaszkészségű dendriteket jelen ebben az esetben, elősegíti a különböző kérgi és kéregalatti bemenet integrációját a bazális dendritekben. Nagyon valószínűnek tűnik, hogy a kísérleteinkben tapasztalt serkentő hatást a β_2 -adrenerg receptorok aktiválásával érte el a NA.

3. Nikotin-által kiváltott tüzelés és dendrit túske Ca²⁺ válaszok piramissejtekben

Ebben a kísérletsorozatban nyomással ejektáltuk nikotint a piramissejtekre nagy koncentrációban (250-500 microM). A nyomás alkalmazása miatt fellépő esetleges műtermékek miatt line-scan helyett itt képsorozatokat készítettünk (XYt). A nikotin nyomás adagolása akciós potenciálok tüzelését és a tuskékben Ca²⁺ szint emelkedés eredményezett, azonban a két folyamat nem korrelált teljes mértékben egymással. A tuskék nyakában és a fejében is eltérő válaszokat mértünk.

4. A Na⁺/Ca²⁺ cserélő (NCX1) specifikus megoszlása hozzájárul a túske-dendrit kompartmentalizációhoz

A dendritek kompartmentalizációs jellegzetességeit a intracelluláris Ca²⁺ szintjén a diffúziós barrierek és a Ca²⁺ eltávolító mechanizmusok aktivitása szabja meg. A különböző Ca²⁺ eltávolító egységek térbeli elhelyezkedése a dendrit tuskék és a törzs vonatkozásában azonban még nem kellően tisztázott. A kvantitatív elektron mikroszkópos analízis meglehetősen egyenletes denzitású NCX1 hosszmenti megoszlást mutatott ki az apikális és bazális dendritekben. A dendrit törzsben megközelítőleg hétszeres mennyiségben volt jelen az NCX1 összehasonlítva a dendrit tuskékkel. Ezzel összhangban a két-foton kísérletek feltárták, hogy az NCX1 gátlása elsősorban a dendrittörzsben befolyásolja a szinaptikus Ca²⁺ transzienseket, és szabályozza a túske-dendrit kapcsolatot.

5. A glutamát felszabadulás purinerg modulációja ischemia-szerű állapotokban a hippocampusban

Egy kísérletsorozatban azt a kérdést tettük fel, hogy az ATP és az adozin módosítja-e a glutamát felszabadulás-többletet amit az ischemia idéz elő patkány hippocampusában. Az oxigén-glukóz elvonás (OGD) egy jelentős Ca²⁺-független glutamát felszabadulást váltott ki, amely tetrodotoxin- és hőmérséklet függőnek bizonyult. A P2 receptor antagonistá PPADS és a szelektív P2X(7) receptor antagonistá Brilliant Blue G csökkentette az OGD-kiváltotta glutamát kiáramlást, ami arra utal, hogy az endogén ATP

elősegíti az ischemia során kialakuló glutamát felszabadulást. A szelektív A1-receptor antagonistá DPCPX és a szelektív A2A receptor antagonistá ZM241385 csökkentette az OGD-kiváltotta glutamát kiáramlást igazolva hogy az adenzin is részt vesz ebben a folyamatban. Az ekto-ATPáz enzim gátlása fokozta a P2 receptor antagonisták hatását. Összességében, ezek az adatok azt mutatják, hogy az A2A és a P2X receptorok által mediált ATP, ill. adenzin-kiváltotta glutamát felszabadulás fokozódás megmarad még hosszabb időtartamú OGD alatt is. Ezért a P2X/A(2A) receptorok gátlása hatékony megközelítés lehet a glutamáterg excitotoxicitás leküzdésében.

6. A katekolamin-citokin egyensúly

A monoaminok biofázis koncentrációja amelyet a felszabadulás és a visszavétel egyensúlya határoz meg, fontos szerepet játszik a depresszió kezelésében míg a gyulladáscsökkentő mediátoroknak ugyancsak lehet szerepük ebben a folyamatban. Megvizsgáltuk a NA szint változásának szerepét az LPS által kiváltott TNF- α és IL-10 válaszban egér plazmában és a hippocampusban. Kimutattuk, hogy az LPS-kiváltotta TNF- α válasz közvetlen korrelációban van a NA biofázis szintjével mivel szignifikánsan magasabb volt amikor a vezikuláris NA felszabadulást meggátoltuk egy depressziós állatmodellben (rezerpin kezelés), és alacsonyabb volt magas NA koncentráció esetén (NET-KO vagy dezipramin kezelés). Eredményeink szerint a depresszió kapcsolatban van a perifériás és hippocampális gyulladáscsökkentő citokinek termelésével és az mindenkori monoamin szintekkel. Mivel számos gyulladáscsökkentő gyógyszernek van antidepressziós hatása, feltételezzük, hogy az antidepresszánsok ugyancsak befolyásolják az LPS-kiváltotta gyulladáscsökkentő választ, amely hozzájárulhat az antidepressziós hatás eléréséhez.

2008

1. A dendritek plasztikus működéseinek megfigyelése két-foton képalkotással

1.1. Az α_2 -adrenerg receptorok plasztikus hatásai a dendritekben prefrontális kéregben

Eredményeik azt mutatják, hogy az α_2 -adrenerg receptorok aktivációja a dendritikus akciós potenciálok kiválthatóságát jelentős mértékben fokozza a prefrontális kéreg piramisneuronjaiban. Így erőteljes Ca^{2+} válaszok alakulnak ki a noradrenalin felszabadulása idején már alacsonyabb frekvenciájú akciós potenciál sorozatok tüzelése esetén is. Ezáltal kisebb ingerek is képesek kiváltani a dendritikus tüskét, aminek szerepe lehet a munkamemória kialakulásakor megfigyelt ún. késleltetett tüzelés fenntartásában. A dendritikus Ca^{2+} válaszok szintjén tehát a noradrenalin pozitív hatású a munkamemóriára nézve, és elősegíti a különböző kérgi és kéregalatti bemenet integrációját a dendritekben.

1.2. Nikotin receptorok hatásai piramisneuron és interneuron dendritek Ca^{2+} dinamikájára a hippocampusban

A nikotin receptorokról ismert hogy erőteljes serkentő hatással bírnak különböző kérgi funkcióra nézve így elősegítik a memória és a tanulás folyamatait különböző agyterületeken. A intracelluláris Ca^{2+} szintjén azonban kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozólag, hogy a nikotin milyen mechanizmussal képes ezeket a funkciókat serkenteni a dendritekben. Egyik kísérletsorozatunkban a nikotin alacsony koncentrációban (1 μ M) képes volt az akciós potenciál sorozatokkal előidézett Ca^{2+} válaszok serkentésére a hippocampus piramisneuron dendrittüskéiben. Magasabb koncentrációban adagolva, a

nikotin önmagában is képes volt akciós potenciál sorozatokat kiváltani, így ehhez csatlakozó Ca^{2+} válaszokat előidézni a dendrittűskékben. Egy másik kísérletsorozat bebizonyította, hogy a hippokampusz interneuronjaiban is kiválthatóak ezek a jelenségek, és itt igazolták azt is, hogy lokális plasztikus változásokhoz csatlakoznak a nikotin receptor ingerléssel kiváltott Ca^{2+} dendritikus válaszok. Ezeket a kísérleteket egy egyedi fejlesztésű, nagy felbontású két-foton mikroszkóp használatával végeztük el.

2. Oxigén szabadgyökök felszabadulásának fluorescens megfigyelése a hippokampuszban ischemiás körülmények között

Az ischemia során fellépő oxigén szabadgyök felszabadulás direkt megfigyelése az agyban egy régi célkitűzést jelent az idegtudományok számára. Ebben a kísérletsorozatban specifikus fluorescens indikátorokat használtunk, amelyek az oxigén szabadgyökök szintjét időben pontosan mutatják meg hippokampusz agyszeletekben *in vitro*. Az oxigén-glukóz elvonás (OGD) egy jelentős oxigén szabadgyök képzést váltott ki, amelyet befolyásolni lehetett a szabadgyök rendszer metabolizmusában részt vevő enzimek farmakológiai modulációjával. Külön érdekesség volt az, hogy az OGD a szabadgyök szintet a hipoxiára amúgy legérzékenyebb CA1 régióban fokozta a legnagyobb mértékben, és nem volt hatása az ellenálló régióként ismert gyrus dentatusban. A hatásmechanizmus vizsgálata kimutatta az NMDA receptor aktiváció és a nitrogén monoxid felszabadulás szerepét a szabadgyök képzés folyamatában. Ez a vizsgálatsor volt az első direkt vizualizálása az oxigén szabadgyökök képzésének és eltüntetésének akut hippokampusz szeletekben, amelyek nagymértékben megerősítették azt az elképzelést hogy a szabadgyökök képzése lehet a CA1 régió irodalomból jól ismert ischemiás sérülékenységének.

3. A dopaminerg neurotranszmisszió modulációja a striatumban diclofenac kezelés során

A diclofenac (DCF) egy széles körben használt nem szteroid gyulladáscsökkentő, amely mint mitokondriális toxin is ismert. Korábbi irodalmi munkákból ismert, hogy a szelektív mitokondriális komplex I gátlás oxidatív stressz mellett a dopaminerg működés romlását okozza a striatumban. Ebben a vizsgálatban arra kerestünk választ, hogy a DCF befolyásolja-e a striatális dopaminerg funkciót. A patkány agyából származó striatum szeleteket radioaktívan jelölt dopaminnal töltöttük fel és *in vivo*, illetve *in vitro* DCF kezelést alkalmaztunk. Az *in vitro* DCF kezelés csökkentette a dopamin-felvételt és az agyszeletek dopamin tartalmát. A H_2O_2 által kiváltott dopamin felszabadulást is fokozta ez a kezelés, míg az oxigén szabadgyökök képzése nem változott. Az *in vivo* DCF kezelés nem okozott változást a striatum dopamin tartalmában a dopamin felvétele a szeletekbe viszont fokozódott. A H_2O_2 -kiváltotta dopamin felszabadulás csökkent az *in vivo* kezelés után. Összességében az *in vivo* illetve az *in vitro* DCF kezelés igen eltérő hatást okoz a striatum dopaminerg funkciójára nézve; az *in vitro* kezelés során az anyag mitokondriális toxin tulajdonságai dominálnak (hasonlóan a rotenon hatásához) míg *in vivo* kezelést követően inkább elősegíti a dopaminerg hatások érvényesülését.

4. A dopamin felszabadulás modulációja a belsőfülben

A belsőfülben felszabaduló dopaminról az utóbbi idők kutatásai egyértelműen igazolták, hogy protektív hatású, a halláskárosodások kivédésében fontos szerepet játszik. Eredményeink szerint a dopamin felszabadulás szerotonin $5\text{-HT}_{6/7}$ antagonistákkal

hatékony módon serkenthető lokálisan. A dopamin szint emelő hatás a gátló GABA bemenetek gátlásával valósul meg, azaz a gátlás gátlása okozza a megfigyelt serkentést. A Dopamin D4 receptorok is segítő szerepet játszanak ebben a hatásban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az 5-HT_{6/7} antagonisták alkalmazása egy potenciális új gyógyszer-célpontot kínál a halláskárosodás gyógyszeres terápiájában. Egy másik kísérletsorozatban a SE Fül-Orr-Gége klinikájával együttműködésben felfedezték, hogy az NMDA receptorok izgatása specifikus agonistákkal szintén jelentős dopamin szint emelkedést okoz a belsőfülben. Ebben a hatásban a helyi nitrogén monoxid termelés is szerepet játszik. Az NMDA receptoron keresztül megvalósuló dopamin felszabadulás minden bizonnyal egy endogén védelmi mechanizmusnak tekinthető, amellyel az ischemiás körülmények között túlzottan nagy mennyiségben felszabaduló glutamát saját toxikus hatásait képes gátolni a védő hatású dopamin mobilizálásán keresztül.

5. Adenozin A2A receptorok neuroimmun hatásai

Az adenozin egy biológiailag aktív molekula, amely metabolikus stressz során keletkezik a szervezetben különböző traumák vagy gyulladásos folyamatok eredményeképpen. Az A2A receptorok hatásait a citokin termelésre, így az IL-10, IL-6 és MIP elválasztásra már korábban leírtuk. A makrofágok fontos szerepet játszanak a patogének eltávolításában és a citokintermelésben szepszis során. Egy kísérletsorozatban az osztály kutatói azt vizsgálták, hogy a makrofág rendszer szerepet játszik-e a bakteriális-terhelés csökkentésében és a citokin produkcióban olyan egerekben amelyekben az A2A receptor inaktíválva van. A szepszisben szenvedő, adenozin A2A receptor génkiütött állatokból származó makrofágokban az IL-10 termelés csökkent. Ezzel szemben az IL-6 és a MIP-2 képzése a szeptikus A2A génhiányos állatokban fokozott volt a vad típusú egérrel való összehasonlításban szepszis során. Mindez arra enged következtetni, hogy nem a peritoneális makrofágok felelősek a csökkent bakteriális terhelésért és a csökkent MIP-2 és IL-6 termelésért amely a szeptikus A2A génkiütött állatokban figyelhető meg. Ezek a makrofágok okozzák viszont az A2A receptorok hatását az IL-10 termelésre szepszis alatt. Az adenozin A2A receptorok a T-sejt aktivációt is képesek gátolni. Egy kísérletsorozatban megvizsgáltuk az A2A receptorok szerepét a T-helper Th1 és Th2 sejt fejlődés és funkció szabályozásában. A receptorok aktiválása csökkentette a T-sejtek átalakulását Th1 és Th2 sejtekké T-sejt receptor-által stimulált módon. Az A2A receptor génhiányos állatokon végzett kísérletek rámutattak arra, hogy az A2A receptor aktiváció gátolja a Th1 és a Th2 sejt fejlődést az proliferáció és az IL-2 termelés gátlásával naiv T-sejtekben. Összességében ezek az adatok rávilágítanak arra, hogy az A2A receptorok határozott gátló hatással rendelkeznek a korai sejtfejlődés során és a Th1 és Th2 sejtek késői funkcionális hatásaiban is fontos szerepet játszanak.