

Az ATP és az adenozin részvétele az idegsejtek közötti kommunikációban

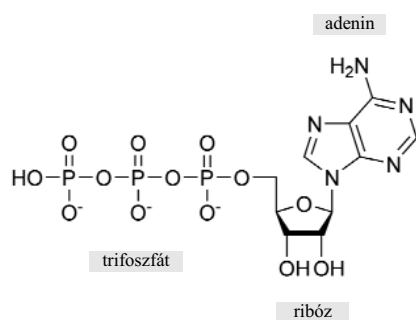
Az idegrendszer működésében alapvető kommunikációs forma a kémiai kommunikáció, mely a neuronokból felszabaduló információátvivő anyagok, *neurotranszmitterek* és *neuro-modulátorok* útján valósul meg. A természet e téren is lenyűgöző szervezetséget és egyben változékonyságot mutat, hiszen az idegrendszer számos különböző anyagot hasznosít kémiai kommunikáció céljaira. A neurotranszmitterek felfedezési folyamata az ún. „klasszikus” ingerületátvivő anyagok, a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer ingerületátvitelében főszerepet játszó acetilkolin és a noradrenalin felfedezésével kezdődött közel egy évszázada, de máig sem zárult le teljesen. Az ismert neurotranszmitterek fő csoportjai a kolinészterek (acetilkolin), a monoaminok (noradrenalin, dopamin, szerotonin), a serkentő és gátló aminosavak (GABA, glutamát, glicin), a peptidok (pl. kolecisztoxinin, tachykininok, neuropeptid Y), a lipidok (pl. kannabinoidok, prosztaglandinok), a purinok (ATP, ADP, UTP, adenozin) és a diffúzibilis mediátorok (NO, H₂O₂, CO₂), melyeket speciális feltételeknek, az ún. neurotranszmitter kritériumoknak (lásd alább) történő megfelelés alapján azonosítottak az elmúlt évtizedekben. Az intenzív

kutatás ellenére még mindig vannak olyan átkapcsolódási helyek a központi idegrendszerben, amelyeknél nem ismert a neurotranszmitter kiléte, másrészt a genom megismerésével nyilvánvalóvá vált, hogy számos olyan anyagot szintetizál agyunk, amelyeknek feltehetően jelátvivő szerepük is van, funkciójuk azonban még ismeretlen. Az új neurotranszmitterek és neuro-modulátorok azonosítását célzó kutatások egyúttal számos új kommunikációs formát is napvilágra hoztak (nem-szinaptikus transzmisszió, retrográd ingerületátvitel, preszinaptikus moduláció), mely a hagyományos, szinaptikus transzmisszió mellett jelentősen árnyalja és gazdagítja az információkódolás lehetőségeit a neuronok közötti párbeszédben, illetve olyan anyagok felfedezéséhez is elvezetett, amelyek már nehezen feleltethetőek meg a klasszikus neurotranszmitter kritériumoknak (pl. nitrógén monoxid, kannabinoidok, peptidok). A közelmúltban felismert nem konvencionális ingerületátvivő anyagok közé tartoznak a purinok is, elsősorban az ATP és az adenozin, melyek nemcsak kémiai szerkezetük, hanem számos egyedi sajátosságuk révén is az információátvitelnek egy érdekes, a hagyományostól eltérő típusát valószínűsítják meg.

nezte, mondván, hogy az ATP túl értékes anyag a sejt számára, hogy információátvitelre fecsérelje. Ez már csak azért sem igaz, mivel az információátvitelre használt ATP-mennyiség csak töredéke a sejtek ATP-készletének. Érdekesség, hogy a nukleotidok és nukleozidok információátviteli funkcióját először éppen Szent-Györgyi Albert sejtette meg: 1929-ben, ma már klasszikussá vált munkájában az ATP és metabolitja, az adenozin szívműködésre és keringésre kifejtett hatásait írta le [1], eredményei azonban hosszú időre feledésbe merültek. A teória a hetvenes évek elején éledt újjá, amikor Geoffrey Burnstock felállította az ún. „purinerg neuron hipotézist”, és ezáltal újra az érdeklődés homlokerébe állította a purinok jelátviteli szerepét. E szerep igazolásában meghatározóan fontos szerepet játszott Vizi E. Szilveszter és tanítványai is.

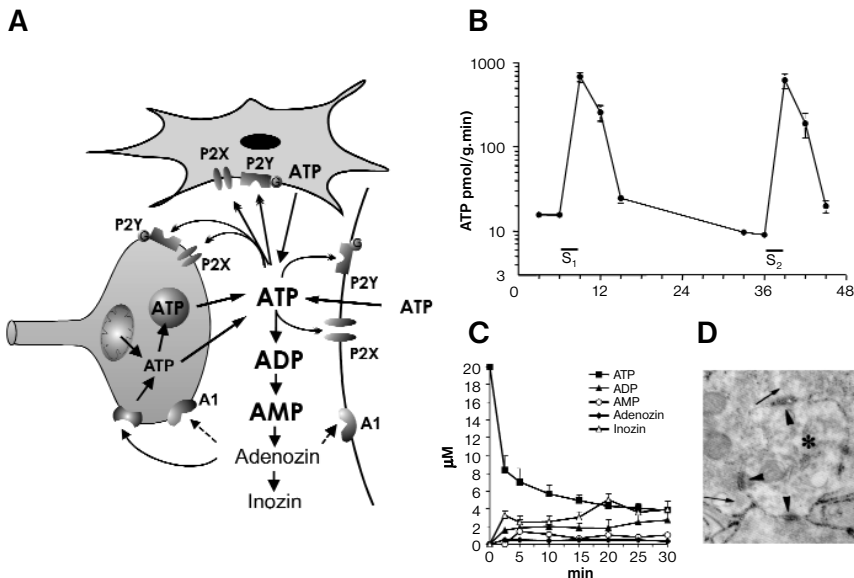
Egy molekula aktív jelátviteli szerepének igazolásához számos észleletet ki kell mutatni az azt vizsgáló kutatóknak; ezek az ún. „klasszikus” neurotranszmitter kritériumok: (1) szintézis-, illetve raktározódás az idegvégződésben, (2) ingerlésfüggő felszabadulás a sejtekből idegi aktivitás során, (3) specifikus hatás a posztzinaptikus receptorok; ez magában foglalja, hogy az illető anyagot felismerő specifikus fehérjék, *receptorok* fejeződjenek ki a posztzinaptikus membránon; az illető anyag utánozza az ideg ingerlés hatását; és mind az anyag hatása, mind az ideg ingerlésre létrejövő válasz gátlható legyen az illető receptorra specifikus gátlószerral, vagyis antagonistával, (4) inaktivációs mechanizmus a sejt közötti térben. Itt kell megjegyezni, hogy mindezen kritériumok közül a 3., vagyis az ingerület közvetítő hatás meglétét tekintik perdöntő kritériumnak. Így pl. sok olyan anyagot ismerünk, amely szintetizálódik az idegvégződésben, sőt akár fel is szabadul ideg ingerlés alkalmával. Ha azonban az ideg ingerlés hatására létrejövő posztzinaptikus válasz nem gátlható e neurotranszmitter jelölt anyag antagonistájával, az azt jelenti, hogy az illető anyag nem vesz

1. ábra Az adenozin 5'-trifoszfát (ATP) molekula szerkezeti képlete. Az ATP-molekula 3 szerkezeti aleggységből épül fel: az adenin gyűrűből, ribózból és a trifoszfát láncból



A purinerg jelátvitel felfedezése

Az adenozin trifoszfát (ATP) (1. ábra) az élővilág egyik legsokoldalúbb molekulája. Mint az élő sejtek energiaváltozója, központi szerepet játszik minden élő sejt anyagcseréjében, emellett építőköve a genetikai anyagnak, és részt vesz mind a sejt belüli, mind a sejtek közötti információátvitelben. Az ATP az élővilágban tehát egyedi példa arra, hogy egy sejt mindhárom alapvető életműködésre (önfenntartás, reprodukció, információátvitel) egyazon molekulát is fel tud használni. Ezt a ma már egyértelműen beigazolódtott feltevést azonban a tudományos közvélemény csak nehezen fogadta be, sőt sokáig elle-



2. ábra. A purinerg jelátvitel fő jellegzetességei. A. Az idegvégződésekből az ATP tartalom legnagyobb része a mitokondriumokban szintetizálódik, majd ezt követően a citoplazmában raktározódik, illetve felvevődik a szinaptikus vezikulákba. Onnan ideg ingerlés alkalmával szabadul fel, de az extracelluláris térbe kerülhet ATP a nem-idegi sejtekből is, így a gliából vagy a posztzinaptikus célsejtéből. Az ATP hatásait jelfelismerő molekulái, a P2X és P2Y receptorok közvetítik, amelyek ugyancsak kifejeződnek idegi és nem idegi sejteken egyaránt. Így az ATP-nek fontos szerepe van az idegsejtek és a nem idegi sejtek közötti párbeszédben. Felszabadulását követően az ATP-t a szövetközi térben egy enzimlánc inaktiválja, melynek segítségével, ADP, AMP, majd adenosin keletkezik, ez utóbbi már egy új extracelluláris szignál, amely az adenosin (A1) receptorokon hat. Hatásának kifejtését követően az adenosin inozinná alakulhat, vagy visszavevődhet az idegvégzőkészlékbe egy transzporteren keresztül, majd visszaépül az ATP raktárakba. B. Ingerléstől függő ATP felszabadulás elektromos téringerlés hatására agyszövetben. Az S1 és S2 a téringerléseket jelzi. Az ATP felszabadulást luciferin-luciferáz technikával mértük. C. Az ATP metabolizmusa a szövetközi térben. A szövethez ATP-t adva, mennyisége a szövetközi folyadékban hamar lecsökken és megjelennek metabolitjai, az ADP, AMP, az adenosin és az inozin. D. EktoATPáz enzimhisztokémia a köztiagyban. Az enzimre jellemző csapadék a szinapszisokban lokalizálódik (nyílhegyek)

rész az idegi eredetű ingerület *átvitelében*, vagyis nem tekinthető transzmitternek. Azokat az anyagokat, amelyek az ingerület átvitelében nem vesznek részt, de módosítják tova terjedését pre- vagy posztzinaptikus, neuromodulátorként kvalifikálhatjuk. Tekintsük át, hogy mennyire alkalmazhatóak e kritériumok az ATP-molekulára!

Az ATP szintézise és raktározása

(1) Az első kritériumnak az ATP könnyedén eleget tesz, hiszen ATP szintézisére minden metabolikusan aktív sejt, így az idegsejtek végződése is képesek. Az idegsejtek ATP-készleteinek legnagyobb része a mitokondriumokban szintetizálódik, mely normál energiatöltöttségi állapotban igen magas, 10 mmol/l koncentrációjú ATP-szintet eredményez a citoplazmában (2A. ábra). Ennek az ATP-készletnek a legnagyobb része azonban az energiaigényes elemi idegi működésekre használódik fel, így pl. a nyugalmi membránpotenciált fenntartó ionpumpák ellátására, vagy a

szignál transzdukcióban résztvevő fehérjék szintézisére. A sejtek ATP-készlete ugyanakkor forrása a jelátvitelben résztvevő ATP-nek is. Így az ATP felvevődik és becsomagolódik a neurotranszmittereket tároló és idegi aktivitás során azokat kiürítő hólyagcsákba, a szinaptikus vezikulákba is, illetve a citoplazmában levő ATP is felszabadulhat bizonyos körülmények között. Fontos, egyedi jellegzetessége azonban a purinerg jelátvitelnek, hogy a jelátvitelben résztvevő ATP nem csak az idegsejtekből származhat: mivel az ATP ubikviter anyag, a nem idegi sejtekben, így a gliasejtekben, vagy a posztzinaptikus célsejtben is szintetizálódik és raktározódik, így forrásul szolgálhat az információátvitelben szerepet játszó ATP-nek is (2A. ábra).

Az ATP felszabadulása a szövetközi térbe

(2) Ma már az is egyértelműen igazolódott, hogy idegi aktivitás során jelentős mennyiségű ATP kerül az extracelluláris térbe. Az

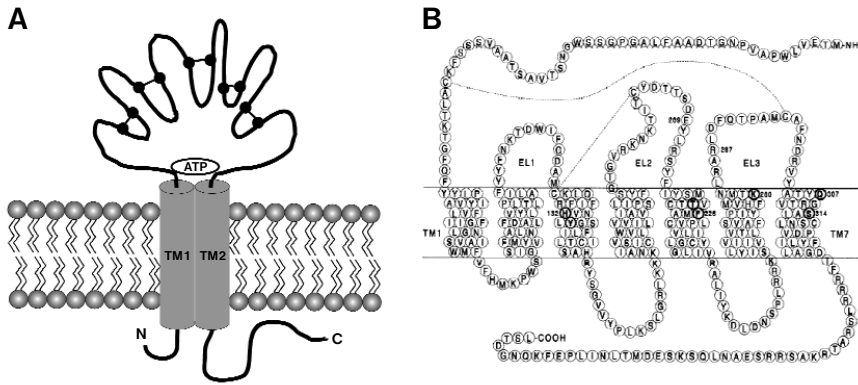
ATP-sejtekből történő felszabadulása olyan magas érzékenységu neurokémiai vizsgálómódszerekkel követhető, amelyek ATP-t szubsztrátként felhasználó kémiai reakciókat használnak fel. Ilyen a szentjánosbogár fénykibocsátásának alapjául szolgáló luciferin-luciferáz reakció is, amelynek során a luciferin nevű anyag a luciferáz enzim segítségével oxiluciferinné oxidálódik, és a felhasznált ATP mennyiségével arányos fénykibocsátás jön létre, amit luminométerrel mérhetünk. E módszer segítségével Vizi és munkatársai a központi idegrendszer számos területéről mutattak ki ATP- felszabadulást ideg ingerlés hatására (2B. ábra). Az ATP-felszabadulást napjainkban valós tér-idő-felbontással rendelkező bioszenzorokkal is követni tudjuk, amelyek hasonló, ATP-re specifikus enzimreakciókat használnak fel, és amelyek segítségével akár egyetlen sejt-ből is meghatározható a felszabadult ATP mennyisége. Az ATP felszabadulásával kapcsolatban mindmáig legizgalmasabb és részben megoldatlan kérdés a felszabaduló ATP eredete, amely, lévén az ATP ubikviter anyag, nem magától értetődően neuronális. Vizi E. Szilveszter munkássága erre is kiterjedt: a központi és perifériás idegrendszer számos szinapszisában igazolta, hogy az ingerületátvitelben résztvevő ATP egy része nem idegi eredetű, hanem a posztzinaptikus célsejtéből retrográd úton szabadul fel [2].

Az ATP hatásai és az azokat közvetítő P2-receptorok

(3) Az ATP biológiai hatásait specifikus jelfelfogó fehérjéin, a P2-receptorok családján keresztül fejti ki, amelyek gyors válaszokat közvetítő ioncsatorna-szerű (ionotróp) P2X-receptorok, illetve lassúbb válaszokat közvetítő (metabotróp) P2Y-receptorok alcsaládjaira oszthatóak (3A. ábra, 1. táblázat). A P2X-receptorok há-

Táblázat. A klónozott purin receptorok felosztása

Purin receptorok		
ATP receptorok		Adenosin receptorok
ionotróp	metabotróp	metabotróp
P2X ₁	P2Y ₁	A ₁
P2X ₂	P2Y ₂	A _{2A}
P2X ₃	P2Y ₄	A _{2B}
P2X ₄	P2Y ₆	A ₃
P2X ₅	P2Y ₁₁	
P2X ₅	P2Y ₁₂	
P2X ₇	P2Y ₁₃	
	P2Y ₁₄	



3. ábra. Noradrenalin-ATP ko-transzmisszió. A szimpatikus idegrendszerben az ATP a noradrenalinval ko-transzmitterként egy kétfázisú simaizom összehúzódást hoz létre. A kontrakciót létrehozó ATP egy része retrográd úton, a simaizomból származik, az idegkéből felszabaduló transzmitterek hatásának eredményeképpen [2].

rom vagy négy receptoralegység összekapcsolódásával létrejött ioncsatornák, amelyek egy- és kétértékű kationokat egyaránt áteresztenek magukon. Ezek a receptor alegységek két transzmembrán szegmessel és egy nagy extracelluláris hurokkal rendelkeznek, az ATP kötőhelye pedig ennek membránközeli régióiban található. Ma hét ilyen, molekulárisan különböző P2X-receptor alegységet ismerünk (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7), amelyek önmagukkal és egymással alkotott kombinációi elméletileg számtalan lehetséges kombinációt eredményeznek. Ezek közül azonban nem az összes, hanem csak 16 ismert kombináció eredményez funkcionális receptor-ioncsatornát. A receptorok aktivációja befelé irányú kationáramot idéz elő, amely helyileg depolarizálja a membránt, az azt követő válasz azonban már annak függvényében jön létre, hogy hol fejeződik ki a P2X-receptor. Így, ha a szinapszis posztzinaptikus membránján található, akkor részt vehet az ingerület továbbításában, vagyis a szinaptikus transzmisszióban, illetve további szignál transzdukciós lépéseket indíthat el, mint pl. jelátviteli fehérjék (pl. MAP-kinázok) átíródása. Ha a P2X-receptor a preszinaptikus idegvégződésen fejeződik ki, a P2X receptorokon beáramló Ca^{2+} neurotranszmitter felszabadulást eredményezhet, akár megelőző akciós potenciál nélkül is.

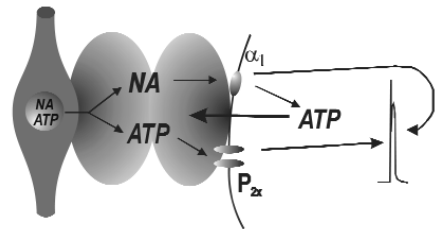
Az ATP-receptorok másik családja a P2Y-receptorok G-fehérjéhez kapcsolt metabotróp receptorok, melyeknek 7 transzmembrán szegmensük van, ligandkötő régiójuk pedig a membránba beágyazva található (3B. ábra). A P2Y-receptorok aktivációja ugyancsak vezethet sejten belüli Ca^{2+} -szint emelkedéshez, de ebben az esetben a Ca^{2+} nem egy ioncsatornán keresztül áramlik be a sejtbe, hanem a sejten belüli Ca^{2+} -raktárakból szabadul fel. A P2Y-receptorok azonban, az

egyéb G-proteinhez kapcsolt receptorokra jellemző módon, lassúbb, másodperc-perc időskálán lejátszódó változásokat közvetítenek, mindazonáltal ugyancsak részt vehetnek a szinaptikus transzmisszióban, a neurotranszmitter-ürítés szabályozásában és befolyásolhatják a szignál transzdukcióban résztvevő gének átíródását is. A P2Y-receptorokból eddig 8 különböző izoformát azonosítottak (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14), ezek viszont – szemben a P2X-receptorokkal –, önmagukban funkcionálnak.

A receptorok eloszlását vizsgáló kutatások alapján nyilvánvalóvá vált, hogy mind a P2X-, mind a P2Y-receptorok különböző altípusai a szervezet szinte minden szövetében kifejeződnek, az idegektől kezdve az immunrendszeren át a csontokig és a reproduktív rendszerig, tehát mindkét receptor családra jellemző, hogy nemcsak az idegelemekben, hanem a nem idegi sejteken is jelen vannak és jelátvivő szerepük van. Mindezt megismerve nagyon valószínűnek tűnik, hogy az ATP nemcsak egy hagyományos értelemben vett neurotranszmitter, hanem sokkal inkább egy univerzálisan jelenlevő jelátvivő anyag, amelynek speciális szerepe éppen abban rejlik, hogy az idegi és nem idegi sejtek közötti kommunikációt közvetíti. Az ATP által közvetített funkciók pontos megismerése csak a közelmúltban kezdődött meg és távolról sem tisztázott minden részletében. De mi az, amit már tudunk?

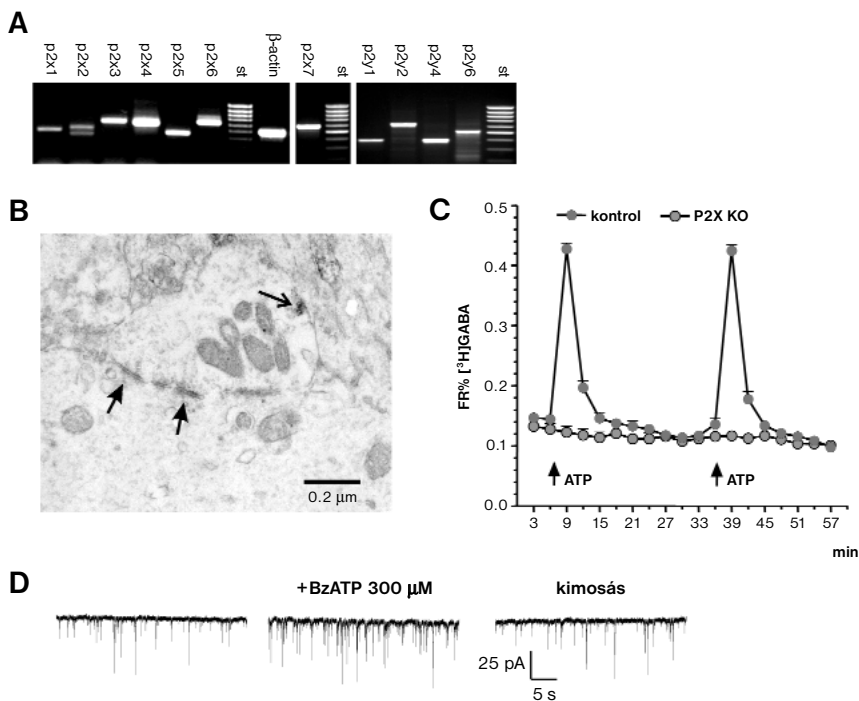
(a) Az ATP először is számos ingerületátviteli helyen a hagyományos neurotranszmitter funkciót is betölti: így pl. a szimpatikus és paraszimpatikus idegek által beidegezett ideg-simaizom-kapcsolatokban. Ilyen a reprodukciós rendszerhez tartozó ondóvezeték (*vas deferens*), a hólyag és bizonyos erek simaizma, vagy a bélsimaizom egyes szakaszai, ahol általában az ATP nem egyedül, hanem ko-transzmitter partnerével, a noradrenalinval vagy az

acetilkolinnal együtt váltja ki az idegingerlés hatására létrejövő simaizom-összehúzódást (4. ábra). A központi idegrendszerben is vannak olyan szinaptikus kapcsolatok, ahol az ATP két idegsejt közötti információátadásért felelős, ilyen szinapszisok vannak az agykéregben, a köztiagyban, a gerincvelőben és az agytörzs egyes területein. Az ATP ezen transzmitter-szerű hatásainak legnagyobb részét a P2X-receptorok közvetítik. Az ATP tehát a glutamát, az acetilkolin és a szerotonin mellett az agy negyedik gyors neurotranszmittere, bár azt is meg kell jegyezni, hogy az azonosított purinerg szinapszisok száma a központi idegrendszerben viszonylag szerény, legalábbis a fő serkentő transzmitter, a glutamát szinapszisaival való összevetésben. Az agyban található P2X- és P2Y-receptoroknak tehát feltehetőleg egyéb funkciója is van.



4. ábra. A P2X (A) és a P2Y (B) receptorok sémás szerkezete. Bővebb magyarázat a szövegben

(b) Ezek közül a legkézenfekvőbb, hogy nemcsak átviszi az egyik neuronról a másikra az ingerületet, hanem modulálja is azt pre- vagy posztzinaptikusan, a felszabaduló neurotranszmitterek mennyiségének, vagy a posztzinaptikus receptorok érzékenységének befolyásolásával. A P2X-receptor, ahogy azt már említettük, magas Ca^{2+} -áteresztőképessége révén képes arra, hogy önmagában is neurotranszmitter-felszabadulást váltson ki, ha az idegvégződés aktív zónái közelében van, vagy fokozza az akciós potenciál hatására létrejövő transzmitter-felszabadulást. Vizi és munkatársai már 1991-ben, még a P2-receptorok molekuláris szerkezetének megismerése előtt, elsőként írtak le egy ilyen neurotranszmitter-felszabadulást fokozó P2-receptorhatást a tengerimalacileumban, ahol a P2-receptorok stimulációja fokozza az acetilkolin felszabadulását és ennek hatására a simaizom-összehúzódást is [3]. Azóta ezeket az adatokat más módszerekkel is megerősítették és hasonló hatásokat írtak le számos egyéb ingerületátviteli helyen, így a szimpatikus idegrendszerben, a gerincvelőben és az agyban is. A rendelkezésre álló módszertani fegyvertár ma már lehetővé teszi, hogy azt is azonosítani tudjuk, hogy a



5. ábra. A. A P2X- és P2Y-receptorokat kódoló mRNA expressziója a hippokampuszban. RT-PCR technika. B. A P2X7 receptor immunreaktivitás a ugyanezen az agyterületen a serkentő idegvégződések membránját festi meg (nyilak). Elektronmikroszkópos kép. C. Az ATP GABA felszabadulást vált ki patkány hippokampusz szeletekből (kontrol). Az ATP perfúziót nyilakkal jelöltük. Ez a hatás eltűnik a P2X7-receptor génkiűtött egerekben (P2X7 KO). D. Az ATP analóg BzATP hatására fokozódik a gátló szinaptikus miniáramok frekvenciája patkány agykéregből izolált idegsejteken

P2X-receptorok mely altípusai lehetnek felelősek ezekért a hatásokért. A P2X-receptorok funkcionális feltérképezését az agyban komplex módszertani megközelítéssel tanulmányozzuk, felhasználva a legkorszerűbb molekuláris biológiai, fiziológiai és farmakológiai vizsgálómódszereket. Így egyrészt megvizsgáljuk a receptort kódoló mRNA és a receptorfehérje eloszlását egy adott agyterület sejtfeleiségeiben génextpressziós és/vagy immunocémiai módszerekkel, másrészt az ATP-receptorokon kifejtett hatásait is azonosítjuk, neurokémiai és elektro-fiziológiai módszerekkel vagy fluoreszcens képalkotó eljárásokkal. Emellett az ATP felszabadulását és szövetközi metabolizmusát is követni tudjuk hasonló metodikákkal. A résztvevő receptort egyrészt farmakológiai analízissel, vagyis a receptort kötő ligandok hatásvizsgálatával tudjuk azonosítani, másrészt vannak olyan genetikailag módosított állatok, amelyekben a kérdéses receptort kódoló DNS törlésre került (Knockout-egérvonalak). Az így kapott összetett kép alapján már viszonylag nagy biztonsággal tudjuk körülírni a purinerg jelátvitelt az agy különböző területein. Így pl. a rövid távú memória kialakulásáért felelős agyterületen, a hippokampuszban, számos P2X- és P2Y-

receptor altípust kódoló mRNA fejeződik ki, melyek közül az egyik, a P2X7-receptorfehérje a serkentő idegvégződések, de emellett gliasejtek membránjába is beépül (**5A–B. ábra**). Az ATP a P2X7-receptorok aktivációja révén a serkentő transzmitter glutamát és a gátló GABA felszabadulását idézi elő, amelyet egyrészt az agyszeleten átáramló folyadékban radiokémiai analízissel tudunk kimérni (**5C. ábra**), másrészt ez a hatás megnyilvánul a spontán szinaptikus transzmissziót reprezentáló ionáramok frekvenciájának fokozódásában (**5D. ábra**). A neurotransmitter-felszabadulást kiváltó hatás eltűnik a P2X7-receptor génkiűtött egerekben, így tehát ezt a hatást a P2X7-receptorok közvetítik (**5C. ábra**). A transzmitterürülést fokozó P2X7-receptoroknak fontos szerepük lehet a neuronok ingerlékenységi állapotának beállításában, de az agy kóros állapotaiban is, amikor is a vérellátás zavara, agysérülés, oxigénhiány vagy egyéb ok folytán létrejövő energiakriszis és azt követő sejthalás során a citoplazma millimoláris koncentrációjú ATP-raktárai ömlenek az extracelluláris térbe és ingerelhetik a P2X7-receptorokat [4]. Legutóbbi vizsgálatainkban azt állapítottuk meg, hogy a P2X7-receptorok válaszkészsége fokozódik ilyen körülmények között, és

több transzmittert szabadítanak fel, ami hozzájárulhat a szövetközi térben megjelenő neurotranszmitter szint és ezáltal a serkentésgátlás egyensúlyának felborulásához. Emellett a neurotranszmitter-felszabadulás szabályozásában egyéb P2X- és P2Y-receptorok is részt vesznek, de míg a P2X-receptorok aktivációja általában fokozza a neurotranszmitter-felszabadulást, a P2Y-receptorok aktivációja gátolja azt. Sőt, a P2Y-receptorok mellett posztzinaptikus hatásmóddal is részt vehetnek a szinaptikus transzmisszió szabályozásában. Így Illés és munkatársai mutatták ki, hogy a P2Y1-receptorok aktivációja gátolja a glutamát NMDA receptorain keresztül átfolyó ionáramokat, illetve az akciós potenciált követően a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon beáramló Ca^{2+} mennyiségét – mindezen hatásoknak a szinaptikus ingerületátvitel finom hangolásában lehet szerepe [5].

(c) A P2X- és P2Y-receptorok egyes típusai emellett a gliasejteken is kifejeződhetnek és az ATP ezeknek a receptoroknak a közvetítésével is részt vehet az ingerületátviteli folyamatokban és azok szabályozásában. Míg korábban úgy gondolták, hogy a gliasejtek csak egyszerű támasztóelemek, amelyek az idegsejteket körbeölelve térkitöltő funkciót látnak el, ma már világossá vált, hogy sokkal aktívabb szerepük van az információátvitelben, és nemcsak az idegsejtekből felszabaduló neurotranszmitterek tudnak a glián kifejeződő receptorokra hatni, hanem fordítva is: a gliából felszabaduló anyagok is beleszólhatnak az idegsejt működésébe és befolyásolni képesek a szinaptikus ingerületátvitelt. Sőt a gliasejtek egymással is kommunikálnak, egyfajta információs hálózatot alkotva, amely lehetővé teszi, hogy koordináltan tudjanak válaszolni az külső környezetükből érkező ingerekre. Az egyik legfontosabb ilyen *gliotranszmitter* maga az ATP, amely P2X és P2Y receptorok közvetítésével fontos szerepet játszik egyrészt a gliahálózatok belső kommunikációjában, másrészt annak a neuronokra való átvitelében. A glia hálózatokat sokféle stimulus, így pl. egyszerű mechanikus stimulus, vagy sejt felszíni receptoraik ingerlése is aktiválhatja, melyek hatására Ca^{2+} -hullám keletkezik a sejtben belül. Ez a Ca^{2+} -hullám részben elektromos szinapszisokon keresztül (gap junction) részben az ATP segítségével terjed át a szomszédos, majd a távolabbi gliasejtekre, P2Y-receptorok közvetítésével. Amennyiben a gliasejt neuronok közelében található, a gliából felszabaduló ATP elérheti az idegsejt membránján található P2X- vagy P2Y-receptort és fokozhatja, vagy gátolhatja az azon keresztüli ingerületátvitelt.

(d) Az adenin nukleotidok által közvetített jelátvitel nemcsak az idegrendszer,

hanem az immunrendszer, illetve a vér sejtjei elemeinek jelátvitelében is fontos szerepet játszik. Az immunkompetens sejtek (limfociták, monociták, makrofágok), köztük az immunrendszer központi idegrendszerbe kihelyezett sejtjei, a mikroglia sejtjei a P2X- és P2Y-receptorok csaknem valamennyi típusát kifejezik, amelyek részt vesznek az immunválasz számos aspektusában. Így szerepük van az immunsejtek proliferációjában, a kemotaxisban, az humorális immunválasz összehangolásában elsődleges szerepet játszó citokinek (pl. Interleukin-1β, Interleukin-6, TNFα) és egyéb gyulladási mediátorok (növekedési faktorok, nitrogén monoxid, kannabinoidok stb.) termelésének szabályozásában és a sejt immunválaszt végrehajtó funkciókban (fagocitózis, a célsejtek elpusztítása). Hasonló szerepet töltenek be a purinerg jelátvivő rendszerek az agyi immunválaszban is, melynek fő végrehajtó sejtjei az asztrocita és mikroglia sejtjei. Ismert ugyanis, hogy az agy – annak ellenére, hogy a vér agy gát által viszonylag védettségben van – maga is immunválasszal reagál az őt érő, akután vagy krónikusan jelentkező kóros stimulusokra, mégpedig egy meglehetősen uniformis reakcióval, melyet mikroglia aktivációnak nevezünk. A mikroglia aktiváció során az addig proliferációban levő mikroglia sejtjei növekedése megáll, ugyanakkor formájukat megváltoztatják és a nyugalmi elágazott formájukból amöboid formát vesznek fel. Ezzel párhuzamosan az aktiválódott mikroglia sejtjei a perifériás immunsejtekkel analóg módon gyulladási mediátorokat kezdenek el termelni, amelyek ugyan a szövet védekező reakciójának is tekinthetők, de maguk is hozzájárulhatnak a gyulladáshoz és az azt követő, sejtelhalásba torkolló kóros eseményshoz.

Ezzel rokon értelmű folyamat az asztrocita aktiváció is, amelynek során az elhalt sejtek helyét asztrociták foglalják el és burjánzásnak indulnak, ez utóbbi folyamat azonban már a kóros stimulust elszennvedett agyterület szöveti újraépülését is szolgálja. A fentiekben már említett P2X7-receptor a mikroglia és asztrocita aktivációban is kitüntetetten fontos szerepet játszik, hiszen a mikroglia és asztrocita sejtjei által termelt gyulladási mediátorok termelésének egyik fő szabályozója, emellett a mikroglia sejtjei proliferációját és túlélését is szabályozza. A mikroglia aktiváció és a reaktív asztrocitózis fontos szerepet játszik az idegi sejtelhalással járó neurodegeneratív betegségek kialakulásában (pl. Sclerosis multiplex, Alzheimer kór), így a P2-receptorok és ezáltal a mikroglia aktiváció befolyásolásával a neuronális sejtek túlélésére is hatást tudunk gyakorolni.

(e) A P2X-receptorok egyes típusai, amennyiben tartósan aktiválódnak, emel-

lett sejtthálát okozva közvetlenül is befolyásolhatják a sejtek túlélését. Ez a hatás az ún. pörustágulás jelenségével függ össze, tudniillik megfigyelhető, hogyha a P2X-receptorokat az ATP tartósan aktiválja, a receptor ionszatórnak megváltoztatják permeabilitásukat és áteresztő képessé válnak nagy molekulású, akár több száz Da-os kationok számára is. Ezt a permeabilizáló hatást, amely végső soron a receptort kifejező sejt elhalásához vezet, először a P2X7-receptorot hordozó immunkompetens sejteken figyeltek meg, de neuronokon is észlelték a pörustágulás jelenségét.

Felmerül a kérdés, hogy ezek a sejt szinten már azonosított sokszínű hatások hogyan jelennek meg az idegrendszer által kivitelezett komplexebb működésekben, mint pl. az érző-mozgató rendszer, a tanulási folyamatok, vagy a magatartás. Ezekről ma még kevesebbet tudunk, de a folyamatok feltárása már elkezdődött. Így az ingerületátvitelt szabályozó P2-receptoroknak agyterülettől függően fontos szerepe lehet a magasabb idegi funkciókban is, így az agykéregben lévő P2-receptorok a kognitív funkciókban és a tanulás-memória folyamatokban vehetnek részt, a gerincvelőben és az agytörzsben kifejeződő receptorok az érzőműködések, többek között a fájdalomérzés kivitelezésében játszhatnak szerepet. Így a közelmúlt kutatási eredményei számoltak be arról, hogy az agytörzsben lévő légzésszabályozó központban a levegő CO₂-szintjét érzékelő, és a légzőközpont aktivitását ennek megfelelően vezérlő neuronok ATP-t használnak ingerületátvivő anyagként, és hasonló kitüntetett szerepe lehet az ATP-nek a fájdalomérzés közvetítésében is. Az ugyan már régóta ismert volt, hogy ATP egy fájdalomkiváltó, vagyis algogén anyag, melynek bőrbe vagy nyálkahártyára fecskendezésével fájdalmat lehet kiváltani, a jelenség hátterében álló molekuláris mechanizmusokra csak az utóbbi időben derült fény. Az ATP fájdalomkeltő hatását egyrészt a bőrben és nyálkahártyákon található szabad idegvégződéseken kifejeződő P2X3-receptorok közvetítik, amelyek ingerlése a gerincvelőbe juttatja az ingerületet. A gerincvelőben az érzőingerület feldolgozása is megkezdődik, és ebben fontos szerepet játszanak a preszinaptikus P2X3- és P2Y1-receptorok is, amelyek által a fájdalomingerület felerősödése, illetve diszkriminációja valósulhat meg. Míg a P2X3-receptorok ingerlése glutamátot szabadít fel a gerincvelőbe befutó érzőidegek végződéseiből és ezáltal felerősítheti az ingerület tovaterjedését, a P2Y-receptorok gátolják ugyanezen idegekben az impulzusok továbbterjedését [6]. Mivel az ADP erősebben hat a P2Y-receptorokon, mint maga az ATP, az ATP szövetközi lebomlása során keletkező ADP ellensúlyozhatja az ATP algogén hatását. A fájdalomérzés közvetítésében emellett szerepet játsz-

hatnak a P2X7-receptorok is, amelyek ugyanakkor valószínűleg nem elsősorban a fiziológiai védekező reflexként működő nocicepciót, hanem a kóros, pl. gyulladási, vagy idegbántalmak során keletkező fájdalomérzést befolyásolják.

Az ATP inaktivációja a szövetközi térben

(4) A negyedik jelátviteli kritérium a transzmitter hatását megszüntető inaktivációs mechanizmus jelenléte, amely általában vagy valamilyen újrafelvevő rendszer vagy metabolikus inaktiváció, vagy mindkettő által testesül meg. Az ATP ennek a negyedik kritériumnak is eleget tesz, hiszen felszabadulását és hatásainak kifejtését követően nem marad tartósan az extracelluláris térben: eltakarításáról az ektokleotidáz enzimrendszer gondoskodik, amely foszfátcsoportjait hidrolizálva először ADP-t és AMP-t, majd ezt követően a foszfátcsoporttal már nem rendelkező nukleozidot, az adenzint hasítja le az adenzin trifoszfát molekulából (2. ábra A, C). Az ektokleotidáz enzimrendszer, mely több különböző enzimesaládból, az ATP-t és ADP-t is bontó ekto nukleotid difoszfahidrolázokból (e-NTPDáz), ektokleotid pirofoszfátokból (e-NPPáz), és alkalis foszfátokból, valamint az AMP-t adenzinná hidrolizáló ekto 5' nukleotidáz enzimből áll, amelyek valamennyien membránhoz kötött enzimfehérjék és hasonlóan az ATP receptoraihoz, testszerte megtalálhatóak, beleértve természetesen az idegrendszer szinapszisait is (2. ábra D). Ez az inaktivációs mechanizmus ugyanakkor megint csak egyedi abból a szempontból, hogy az AMP-adenozin átalakulással egy új extracelluláris szignál keletkezik, mely a receptorok szintjén teljesen független az ATP által közvetített jelátviteltől és merőben eltérő, sőt gyakran ellentétes hatásokat közvetít. Az adenzin hatásának végül vagy az adenzin deamináz nevű enzim vet véget, amely az adenzint a már inaktív inozinná alakítja, vagy a sejtek újrafelhasználják: egy ekvibratív elven, két irányban működő transzporter segítségével újrafelvévődik az idegvégződésbe és visszaépül az ATP raktárakba (2. ábra A).

Az adenzin hatásai és az ezt közvetítő receptorok

Az adenzin tehát saját jelfelismerő molekuláit, az adenzin receptorokat használja jeltovábbításra. Az adenzin receptoroknak négyféle típusa ismert (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) ezek valamennyien G-proteinhez kapcsolt metabotrop receptorok, P2Y-receptorokhoz hasonló struktúrával, ezek a re-

ceptorok azonban nukleotidokat, így ATP-t vagy ADP-t nem kötnek, fő endogén aktivátoruk az adenzin. Az adenzin receptorok, hasonlóan a nukleotid receptorokhoz, számos szövetben fejeződnek ki és a hatások széles skáláját közvetítik az idegrendszeren belül, és azon kívül is. Az A₁ receptorok talán legismertebb funkciója, hogy preszinaptikusan gátolja a legtöbb neurotranszmitter, így a glutamát, az acetilkolin, a noradrenalin, a szerotonin, és a dopamin felszabadulását a központi idegrendszerben és a periférián, míg az A_{2A} receptorok ingerlése fokozza a neurotranszmitterfelszabadulást. Vizi E. Szilveszter ezen a területen is úttörő munkát alkotott: 1976-ban elsőként írta le az adenzin neurotranszmitter-felszabadulást gátló hatását a vegetatív idegrendszerben [7]. Emellett az A₁ receptorok ingerlése a posztzinaptikus membránt is hiperpolarizálja és gátolja ezáltal a neuronális kislülést. Az adenzin, az A₁ receptorok közvetítésével a központi idegrendszerben tehát elsősorban gátló neuromodulátorként funkcionál, melynek többek között fontos szerepe van az alvás-ébredés szabályozásában is. Erről magunk is könnyen meggyőződhetünk, ha elfogyasztunk egy csésze kávé, teát, vagy csokoládét hiszen ezen élénkítő hatású italok hatóanyagai, a metilxantinok fő hatása az agyban az adenzin receptorok gátlása és ezáltal az endogén adenzin gátló tónusának felfüggesztése. A közelmúltban figyelték meg ugyanakkor, hogy az agyban az endogén adenzin szint elsősorban alvás megvonás során fokozódik, tehát az adenzin nem az egyszerű esti elalváshoz kell, hanem ahhoz, hogy megakadályozza a tartós ébredést. Ezen kívül az adenzinnak állatkísérletekben jól mérhető szorongásgátló, görcsgátló, motoros aktivitást gátló és neuroprotektív, idegvédő hatása is van.

Ez utóbbi protektív hatásnak többek között az agy energiahiányos állapotában lehet szerepe, amikor igen nagy mennyiségű adenzinkiramlás tapasztalható az extracelluláris térben. A citoplazmában ugyanis a szabad adenzinszint az ATP-vel ellentétben normál körülmények között alacsony, csak mikromoláris szintű és csak az energiaigény/ellátás arányának felborulásakor szaporodik fel, vagyis amikor a sejt több ATP-t használ fel, mint amennyit termel. Ez történik pl. akkor, ha érelzáródás következtében az agyszövet vér és energiaellátása leáll, a citoplazmában felszaporodó adenzin ilyenkor érzékeny szenzora a sejt energiatöltöttségi állapotának, és a nukleotid transzporternek keresztül a szövetközi térbe is kiáramlik (6. ábra). Az így felszabaduló adenzin endogén neuroprotektív mechanizmusként védi az agyat a fokozott neuronális kislülés káros hatásától, illetve egy rákövetkező energiakrízis káros következményeitől is – ezt prekondicionáló hatásnak nevezzük. Hasonló protektív hatást fejt ki az adenzin a szívben is, csökkenti a szívfrekvenciát, lassítja az ingerület átvezetését a pitvarról a kamrára és csökkenti a szívizom-összehúzódások erejét, emellett tágítja a koronáriákat és erős vényomáscsökkentő hatása is van (ez utóbbi hatásokat írta le Szent-Györgyi 1929-ben). Fontos szerepe van még az adenzinnak a vese véráramlásának, a zsírsanyagcsere és a hörgők tágasságának szabályozásában, és az immunválaszban is.

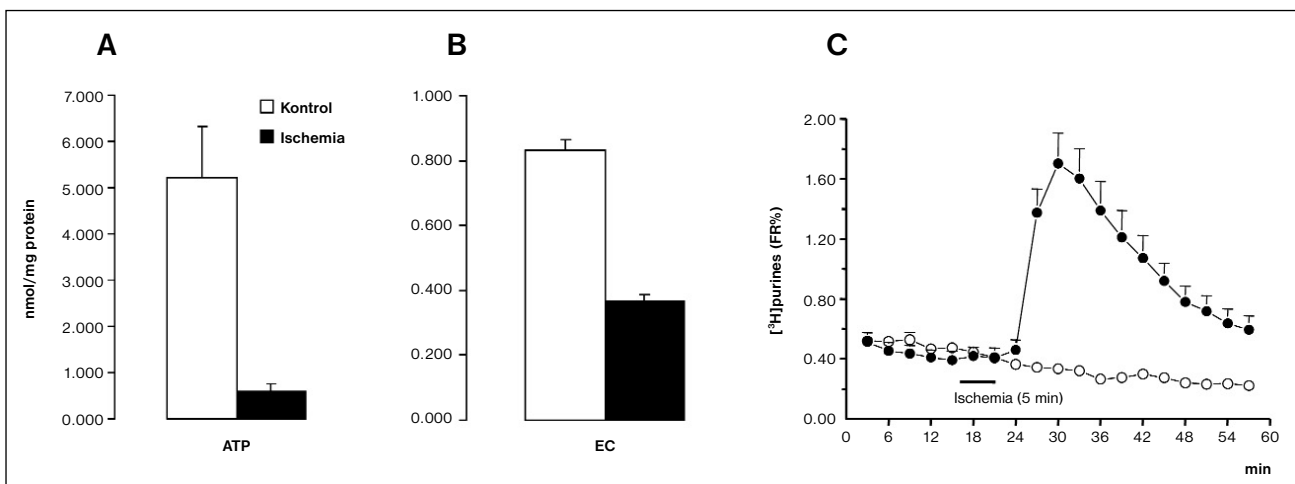
Az ATP és az adenzin, mint meglévő és új gyógyszerek támadáspontja

A fentiekben nagy vonalakban felvázolt purinerg jelátviteli rendszer, valamint az ATP és adenzin receptorainak nagy szá-

ma és az általuk okozott sokszínű hatások elvileg számos támadáspontot kínálnak gyógyszeres befolyásolás céljaira idegrendszeri és nem idegrendszeri betegségekben egyaránt. Így befolyásolhatjuk a purinok felszabadulását, szövetközi metabolizmusát, újrafelvételét és természetesen a receptorokon okozott hatásokat is. Az elvi lehetőségek tárházából azonban eddig még csak néhányat használt fel a klinikai gyakorlat, a purinerg jelátvitel lényegében még kiaknázatlan, de annál ígéretesebb terület a gyógyszerfejlesztés számára.

A terápiába már bevezetett gyógyszerek közül a nukleotiderg rendszeren hatnak a ticlopidin és clopidogrel nevű véralvadásgátló gyógyszerek, amelyeket a kardiológiai gyakorlatban, elsősorban infarktust és műtéteket követően adagolnak a betegeknek a trombózis kialakulásának megakadályozása céljából. A ticlopidin és a clopidogrel a P2Y₁₂ receptorok specifikus antagonistája, és az ADP-nek a vérelemezke aggregációt kiváltó hatását gátolja és ezáltal csökkenti a vér alvadákonyságát – érdekes módon azonban e hatásmechanizmus azonosítására csak utólag, a gyógyszerek terápiába történt bevezetését követően került sor. Emellett a potenciális gyógyszeres befolyásolási lehetőségek az ATP jelátviteli rendszerén rendkívül gazdagok, amelyből csak néhányat tudunk e helyütt kiemelni, elsősorban az idegrendszeri betegségek közül. A P2X₇-receptorokon ható antagonistáknak komoly perspektívája van az idegrendszer sejtpusztulással járó állapotokban, vagyis a neurodegeneratív betegségekben, kezdve a traumás agy- és gerincvelő-sérüléstől a krónikus leépülést okozó agyér-elmesezésedésig. Az ATP receptor antagonisták ígéretes fájdalomcsillapító gyógyszerek lehetnek gyulladáscsökkentő és neuropátiás fájdalommal, ezek olyan fájdalomtípusok, ame-

6. ábra. Glükóz és oxigénmegvonás (ischemia) hatására az agyseletek ATP-tartalma (A) és az energiatöltöttséget jelző hányados (EC)(B) drasztikusan lecsökken. Ugyanennek a kezelésnek a hatására a purinok, köztük az adenzin kiáramlása nagymértékben fokozódik (C)



lyekre jelenleg vagy egyáltalán nincs terápiás szer, vagy ami van, azok sok mellékhatással rendelkeznek vagy hozzászokást eredményeznek (nem szteroid gyulladásgátlók, opiátok). Az ATP sejtelhalást okozó hatása esetleg kihasználható a daganatok terápiájában, a daganatsejtek elpusztítására, illetve az ATP-receptorokat izgató vegyületektől várható hatás pl. a csökkent hólyagösszehúzóddással járó urológiai betegségekben is.

Az adenozinerg gyógyszerek közül – leszámítva az élvezeti szerként fogyasztott természetes adenzin antagonistákat – elsősorban maga az adenzin említendő, amelyet jelenleg gyermekkori ritmuszavarok terápiájára, elsősorban a sürgősségi orvoslásban alkalmaznak. Régebben ATP-t is használtak ugyanilyen célra (Atriphos), de mivel az ATP a keringésben igen gyorsan elbomlik, a valódi hatóanyag ebben az esetben is adenzin volt. Sajnos új adenozinerg szer azóta sem került a terápiás gyakorlatba, a fő hátráltató tényező az adenzin erős vérnyomáscsökkentő hatása, amely kellemetlen mellékhatás lehet krónikus alkalmazás során. Mindezek ellenére ígéretes perspektívája van az adenzin hatását befolyásoló szereknek számos központi idegrendszeri betegségben, így Parkinson-kórban, Alzheimer-kórban, epilepsziában vagy alvászavarokban, ahol elsősorban nem közvetlenül a receptorokat izgató vagy gátló szerektől, hanem az endogén adenzinszintet, vagy a receptorok érzékenységét közvetetten befolyásoló szerektől várhatunk eredményt a jövőben. A jövő kutatásainak feladata, hogy egyrészt még pontosabban megismerjük az ATP és az adenzin élettani és kórállapotokban bekövetkezett hatásait, másrészt a gyógyszerfejlesztés kellően hatékony és szelektív vegyületeket találjon ezeknek a folyamatoknak a befolyásolására.

IRODALOM

- [1] Drury A. N., Szent-Györgyi A. (1929) The physiological action of adenine compounds with especial reference to their action on the mammalian heart. *J. Physiol. (Lond)*. 68, 214–237.
- [2] Vizi E. S., Sperlách B. (1999) Receptor- and carrier-mediated release of ATP of postsynaptic origin: cascade transmission *Progr. in Brain Res.* 120: 160–169.
- [3] Sperlách B., Vizi E. S. (1991) Effect of presynaptic P2 receptor stimulation on transmitter release. *J Neurochem* 56, 1466–70.
- [4] Sperlách B., Vizi E. S., Wirkner K., Illes P. P2X7 receptors in the nervous system. *Progr. in Neurobiol.* (in press)
- [5] Luthardt J., Borvendeg J.S., Sperlách B., Illes P. (2002) P2Y receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochemistry Int.* 1238:1–12.
- [6] Gerevich Z., Borvendeg S. J., 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.
- [7] Vizi E. S., Knoll J. The inhibitory effect of adenosine and related nucleotides on the release of acetylcholine. *Neuroscience.* 1976;1:391–8.

HÁRSING LÁSZLÓ GÁBOR–JURÁNYI ZSOLT

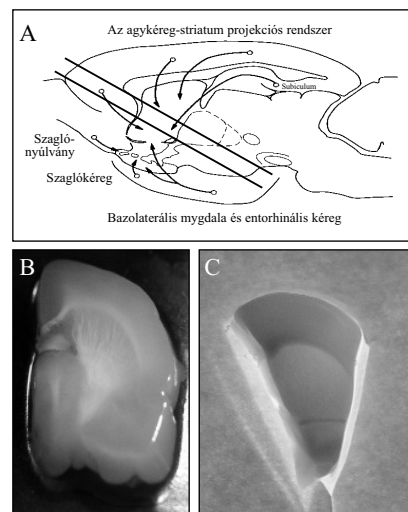
Neurotranszmitter-felszabadulás vizsgálata komplex agyszelet-készítményben

Vizi E. Szilveszterrel 1975-ben kezdtünk agyszeleteket vizsgálni a Semmelweis (akkor még Budapesti) Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézetében. Elsődleges célunk az acetilkolin-felszabadulás dinamikájának vizsgálata volt patkány-striatum-szeletben 6-OH-dopaminnal kiváltott kísérletes Parkinson-kór modellben (Vizi és mtsai., 1977). A striatum-szeletet Popov és mtsai. (1973) módszere szerint metszettük ki patkány agyából. Ez az eljárás eltért az akkor már ugyancsak általánosan alkalmazott Glowinski–Iversen-féle módszertől (1966). Az alapvető különbség az volt, hogy a Popov-féle striatum-szelet a corpus caudatuson kívül a globus pallidust is tartalmazta, az ahhoz futó striatopallidális efferens pályával együtt. Ezzel szemben a Glowinski-féle készítmény a corpus caudatus szövetből származott. Így olyan agyszelet-készítményeket kaptunk, amelyek a bazális ganglionok legnagyobb magját izoláltan, vagy annak több magját is komplex módon tartalmazták. Későbbi vizsgálatainkban azt találtuk, hogy az acetilkolin-felszabadulás szabályozása a kétféle striatum-készítményben különböző, feltehetően az eltérő receptorpopuláció miatt.

Annak alapján, hogy egy agyszelet az interneuronokon kívül afferens és efferens pályák részeit (sejttest, dendritállomány, axonterminális) vagy egy afferens vagy efferens pálya teljes egészét tartalmazza-e, beszélünk konvencionális vagy komplex agyszelet-készítményekről. Konvencionális agyszeletnek tekinthető a neurotranszmitter-felszabadulás mérésére kiterjedten alkalmazott agykéreg-, hippocampus-, substantia nigra-, vagy raphe magszeletek. Komplex agyszelet-készítmény tartalmazhatja a corpus caudatus és a globus pallidus, a nucleus subthalamicus és a substantia nigra, a thalamocorticalis neurális

hurkot tartalmazó thalamus–agykéreg-készítményt vagy a cortex és striatum szövetet. A komplex agyszelet készítése azért jelent nehézséget, mert az agyból történő kimetszéshez ismerni kell a kérdéses neuronális pálya lefutását, és a kimetszés ennek figyelembevételével kell, hogy történjen. Ezeket a készítményeket elsősorban elektrofiziológiai kísérletekben alkalmazzák, a neurotranszmitter-felszabadulást tudomásunk szerint nem tanulmányozták. Célunk az volt, hogy egy olyan, a corti-

1. ábra. A: Patkány agyban a corticostriatalis projekció és a metszési sík, ahol a komplex agykéreg-striatum-szeletet kimetszük (Paxinos, G.: The Rat Nervous System). B: Az egyik agyféltekéből kivágott szelet. Felül látható a prefrontális kéregállomány, alatta a corpus callosum vékony fehér csíkja. Ez alatt húzódnak a kéregállományból a kéreg alatti területekre tartó idegrostok, amelyek jellegzetes „csíkozást” adnak a szövetnek (striák). C: A végleges corticostriatalis wedge preparátum

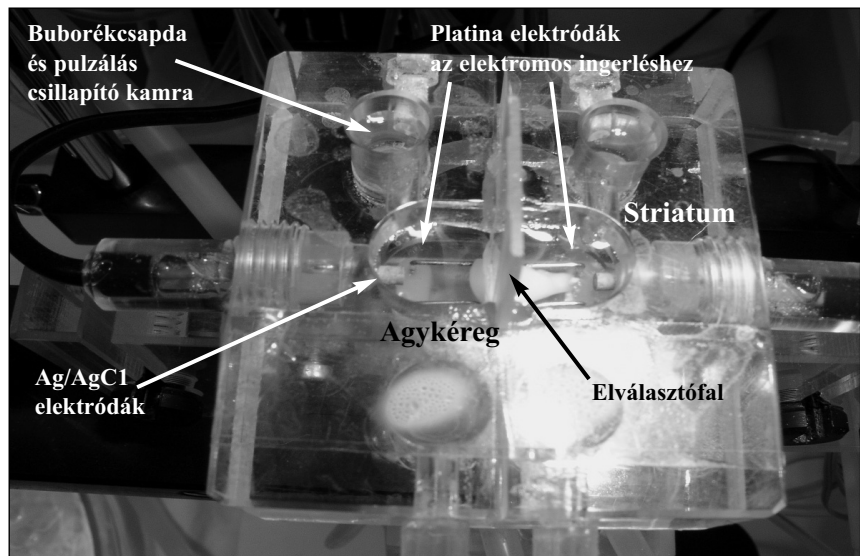


costriatalis glutamaterg pályát tartalmazó agykéreg–striatum-készítményt alakítottunk ki, amely neurotranszmitter kölcsönhatásmérésre alkalmas. Első lépésben sikerült hozzájutnunk az eredeti Harrison és Simmonds (1985) két kompartmentes, nyitott szervedényéhez az MRC Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, The School of Pharmacy (London) műhelyéből. Ennek módosításával építettük meg az Experimetria Kft.-vel együttműködve az első, kétterű, nyitott agyszelet-szervedényünket az 1977-ben elnyert Egészségügyi Tudományos Tanács kutatási támogatás finanszírozásával. Elgondolásunk az volt, hogy kéreg–striatumszeletet úgy helyezünk el a két-terű szervedényben, hogy a két agyterület egymástól függetlenül perfundálható és ingerelhető legyen, közöttük az összeköttetést a corticostrialis glutamaterg pálya biztosítsa. Az ilyen agyszeletek kimetszésében Palkovits Miklós akadémikus tanácsait követtük. Az elgondolás annyira újszerű volt, hogy 1999-ben kutatási támogatást nyertünk a National Science Foundation-tól és a kísérletes munkát Michael J. Zigmond laboratóriumában (Department of Neurology, University of Pittsburgh) kezdtük meg. Írásunkban azokat a kísérleteket mutatjuk be, amelyeket a kéreg–striatumkomplex felhasználásával végeztünk.

³H]Dopamin-felszabadulás mérése patkány agykéreg–striatumszeletben nyitott perfúziós rendszerben

Számos idegrendszeri megbetegedés az agy egyik kéreg alatti területén, a striatumban bekövetkező anatómiai és/vagy neurokémiai elváltozások nyomán alakul ki. A normális és kóros működés tanulmányozásának klasszikus módja az, hogy a striatum egy részét kimetszük az agyból és *in vitro* technikával vizsgáljuk a [³H]dopamin felszabadulását. Az ilyen kísérletek hátránya, hogy a szövetselet kimetszésével megszakítjuk az agykéreg és a striatum közötti pályarendszert. A komplexitás megőrzése céljából tehát olyan szeletre van szükségünk, amelyben megőrzött a kéreg és striatum közötti pályarendszer épsége.

Harrison és Simmonds (1985), majd Burton és mtsai. (1987) nyitott, kétterű perfúziós kamrában vizsgálták az agykéregi glutamát-receptor-aktiváció hatására a fehérállományban éledő elektromos aktivitást. A vizsgálatokat ún. cortical wedge preparátumban végezték, amely tartalmazta az agykéreg és a corpus callosum egy-egy részét, de ők a striatumot levágták a szeletről. Mi viszont olyan szeletpreparátumot akartunk létrehozni, amelyben megőrizzük az agykéregből induló és a



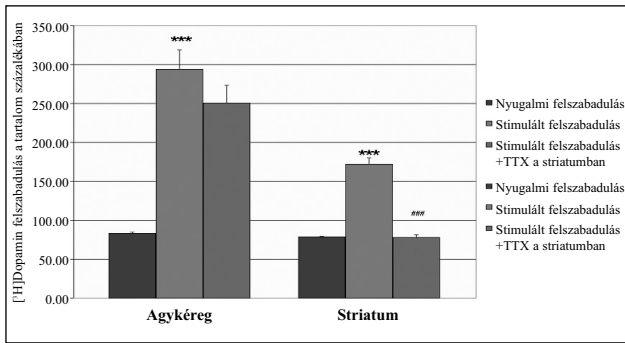
2. ábra. Két-terű, nyitott agyszelet kamra (Experimetria Kft., Budapest). A kamrában egy agykéreg–striatum preparátum látható. A corpus callosum területén elválasztó falat illesztünk a kamrába. Az elválasztó fal alján található rés útján az anatómiai kapcsolat megőrzött a szelet két része között. A kamra lehetővé teszi az agykéreg vagy a striatum szelektív elektromos ingerlését. Ugyancsak módunk van vizsgálni a kívánt vegyületeknek kizárólag az agykéregben vagy a striatumon át történő perfúziójára vagy különböző hatású farmakonok egyidejű perfúziójára a két szöveti területen át

striatumban végződő corticostrialis pályát, amelyen keresztül érvényesülhet az agykéregnek striatumra gyakorolt szabályozó hatása. Ilyen szeletben lehetőségünk nyílik vizsgálni az agykéregi befolyást a striatumra. Az első problémát az agykéreg–striatumszelet preparálásának kidolgozása jelentette, hiszen oly módon kell azt az agyféltekéből kivágnunk, hogy közben a kéregből induló és a striatumban végződő pálya lehetőleg minél kevésbé sérüljön. Az irodalom áttanulmányozása után Kawaguchi és mtsai. (1989) által használt preparálási technikát választottuk (1. ábra).

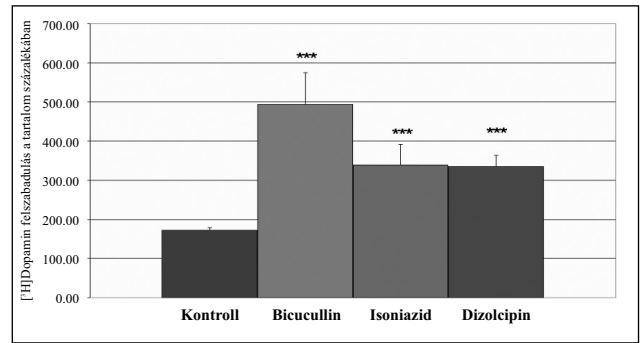
Az *in vitro* szeletkísérletekben általánosan használt és egyébként jól bevált agyszelet-kamra nem volt megfelelő a tervezett kísérleti metodikához, ezért egy speciális, erre a célra tervezett és gyártott szövetkamrát fejlesztettünk ki (Jurányi és Hársing, 2004). Ez a módszer egyedülálló módon kombinálja a komplex agyszelet és radioaktív neurotranszmitter-felszabadulási technikákat (Jurányi és mtsai, 2002, 2003; Hársing és mtsai., 2003). A 0,4 mm vastag szeletet hím patkányok agyából preparáljuk, majd a szövetet [³H]dopamin jelenlétében inkubáljuk, amely során a radioaktív neurotranszmitter beépül a neuronális dopamin-raktárakba. Az agyszeletkamra két részből áll, egyik felében az agykéreg, másik felében a striatum található, a kettő közé egy elválasztó lemez illeszthető, amelyben nyílás található a szövet számára (1. ábra). Az elválasztó falat

és a behelyezett szövetet szilikonzsírral vesszük körül (grease gap metodika), így a két kompartment között folyadékátfolyás nem történik, de a szöveti kapcsolat megőrzött (2. ábra). Mindkét kompartmentbe platina elektródákat építettünk, amelyen keresztül elektromos ingerléssel a fokozott agykéregi aktivitást szimuláljuk. Az idegszövet működése közben fellépő elektromos aktivitásváltozás az oldalfalakba épített Ag/AgCl elektródákon keresztül mérhető. Az agyszelet elektromos ingerlését (40 V, 20 Hz, 2 msec, 3 perc) telepese ingerlővel (Experimetria Kft.) végeztük a cortex és a striatum között ébredő egyenlenszámú zavarmentes regisztrálhatóságára.

Az agykéreg elektromos ingerlésének hatására fokozódik a corticostrialis pályarendszer aktivitása, amely jól mérhető növekedést okozott a [³H]dopamin-felszabadulásban a striatum területén (3. ábra). Bár az agykéregben a striatumhoz képest jóval alacsonyabb a dopaminerg sejtek száma és ez által a [³H]dopaminfelvétel is, a közvetlen elektromos ingerlés [³H]dopamin-felszabaduláshoz vezet az agykéregben is. Felmerülhet a kérdés: honnan tudjuk, hogy a striatum effluensében mért fokozott [³H]dopamin-aktivitás valóban az ottani idegsejtekből szabadult fel és nem egyszerűen csak átfolyt az agykéregi kamrarészből? Ezt több módon vizsgálható; egyik lehetőség a farmakológiai bizonyítás. Abban az esetben, ha a striatumot tartalmazó kamrarészen (és



3. ábra. Az agykéreg elektromos ingerlésének hatására fokozódik a [³H]dopamin felszabadulás a striatumban. Az ingerlés hatására keletkező tovaterjedő akciós potenciál kialakulását meggátolhatjuk a feszültségfüggő Na⁺-csatorna blokkoló tetrodotoxin (1 M) idegméreg segítségével. Jelenlétében az agykéregi elektromos ingerlés ellenére sem nőtt meg a [³H]dopamin felszabadulás a striatumban a nyugalmi szinthez képest. Mindez bizonyítja, hogy az agykéreg fokozott aktivitása a kéregből indul és a striatumban végződő corticostriatalis pálya útján befolyásolja a dopamin felszabadulást a striatumban (átlag ± SEM, n = 4–18, *: p < 0.05)



4. ábra. Az agykéreg elektromos ingerlésének hatására [³H]dopamin szabadul fel a striatumban. A [³H]dopamin felszabadulás ugyanakkor folyamatos gátlás alatt áll a GABA, gátló neurotranszmitter révén. A GABAA receptorok gátlása (bikukullin, 0.3 mM), a GABA szintézis csökkentése (izoniazid) illetve a GABA felszabadulását elősegítő NMDA receptor gátlás (dizolcipin, 10 M) fokozta a [³H]dopamin felszabadulást (átlag ± SEM, n = 4–18, *: p < 0.05)

csak ott szelektíven) a feszültségfüggő Na⁺-csatorna- gátló tetrodotoxint (Fugu poison) tartalmazó oldatot perfundálunk át az elektromos ingerlést megelőzően és alatt, meggátoljuk a tovaterjedő akciós potenciálok létrejöttét a corticostriatalis pályában. Ennek következtében a [³H]dopamin-felszabadulás nem növekszik a striatumban az agykéregi ingerlés ellenére sem (3. ábra). Mindazonáltal, a két kompartment közötti folyadékátjutás kizárását – az agyszelet behelyezését követően – mindig ellenőrizni szükséges. Patkány corticostriatalis agyszeletben a dopaminerg neurokémiai transzmissziót jellemző értéket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A glutamát–dopamin kölcsönhatás kísérletes schizophrenia modellben

A schizophrenia klasszikus kórtana szerint a betegség hátterében a központi idegrendszerben, azon belül is elsősorban a limbikus agyterületen és a striatumban létrejövő hiperdopaminerg elváltozás áll (Carlsson és Carlsson, 1990). Ezt támasztja alá, hogy a terápiában használatos antipszichotikumok mindegyikének dopamin-D2-receptorgátló hatása van. Az elmúlt évtizedben egyre erősödik ugyanakkor az a nézet, hogy a hiperdopaminerg állapot kísérője az agykéreg kéreg alatti te-

rületekre serkentő hatást gyakorló glutamaterg rendszerének hipoaktivitása (Javitt, 2004). A schizophren betegek jellemző anatómiai és funkcionális hipofrontális csökkent corticostriatalis glutamatergaktivitást vált ki, amely az extrapiramidális rendszerben a dopaminergaktivitás fokozódásával társulhat. Ez az eltolt glutamát–dopaminerg egyensúlyi állapot vizsgálhatónak bizonyult agykéreg–striatumszelet preparátumokban.

A glutamaterg NMDA-receptorok blokkolása, például fenciklidin (PCP, Angyalpor) adásakor, egészséges emberben olyan magartási és kognitív zavarokat vált ki, ami a schizophrenia tüneteit utánozhatja. Ezen állapotot kísérleteinkben dizolcipin (MK-801) adásával hoztuk létre: a nem-kompetitív NMDA-receptor-antagonista megnövelte corticostriatalis agyszelet striatalis részében az agykéregi elektromos ingerléssel kiváltott [³H]dopamin-felszabadulást (4. ábra). Az NMDA-receptor blokkolását követően a megnövekedett dopamin-felszabadulás arra utal, hogy a glutamát gátló hatást gyakorol a striatalis dopamin-felszabadulásra. Az általánosan elfogadott felfogás szerint azonban az agykéregből származó glutamaterg afferentáció fokozza a dopamin felszabadulását a striatumban (Krebs és mtsai., 1991). Ugyanakkor a közelmúlt számos kísérleti eredményét csak úgy lehetett magyarázni, ha feltételezzük a glutamát kettős, serkentő és gátló hatását is dopamin-felszabadulásra (Leviel és mtsai., 1990; Wu és mtsai., 2000). Kísérleteinkben feltételeztük, hogy az NMDA-receptorok gátlásával felfüggesztettünk a striatum neuron-hálózatában egy gátlókör működését és ez vezetett a dopamin-felszabadulás fokozódásához. A striatumban a

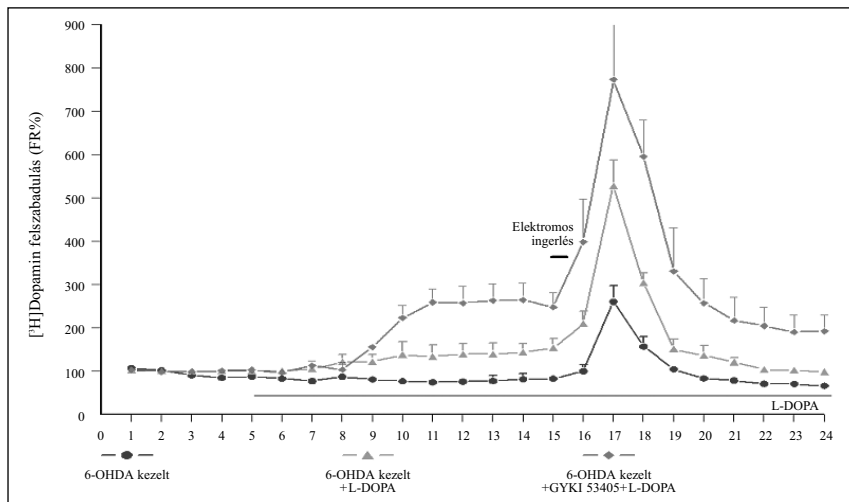
1. táblázat. [³H]jelzett és endogén dopamin felszabadulás és tartalom értékek patkány corticostriatalis agyszeletben

	Az agykéreg-striatumszelet agykéregi része	Az agykéreg-striatumszelet striatum része
Nyugalmi [³H]dopamin felszabadulás		
•kBq/g/ 3 perc	1.71±0.23	3.80±0.51
•Szöveti tartalom% (FR%)	0.27±0.06	0.18±0.04
Elektromosan stimulált [³H]dopamin felszabadulás		
•kBq/g/ 3 perc	18.75±3.41	10.58±1.66
•Szöveti tartalom% (FR%)	2.88±0.54	0.41±0.08
•Szöveti tartalom(kBq/g)	837±81	3207±437
Endogén dopamin és metabolit tartalom		
Dopamin turnover (DOPAC+HVA/DA)	23.±4.2	1.09±0.14
Szöveti dopamin tartalom (nmol/g)	0.1±0.03	25.2±2.7
Szöveti DOPAC tartalom (nmol/g)	1.63±0.06	20.9±2.1
Szöveti HVA tartalom (nmol/g)	0.17±0.02	4.9±0.7

A dopamin, DOPAC és HVA meghatározás HPLC/elektrokémiai módszerrel történt (Nagy Katalin mérése).

Elemzés: [³H]dopamin felszabadulás esetén: n=19

Endogén DA, DOPAC, HVA mérés esetén: n=6



5. ábra. Az L-DOPA és a GYKI-53405 hatása a $[^3\text{H}]$ dopamin felszabadulásra az agykéreg-striatum-agyszelet striatum részében a 6-OH-dopamin előkezelt patkányokban. Az agykéreg-striatum-szeletet 6-OH-dopamin előkezelt patkányból preparáltuk $[^3\text{H}]$ dopamin felvételt követően az agykéregi és striatalis részt kettérű perfúziós kamrában elkülönítve perfundáltuk. Az agykéregi részt elektromosan ingereltük (40 V, 20 Hz, 2 msec ingerszélesség, 3 perc) a 16. frakció alatt. Az L-DOPA-t (10 M) a 6. frakciótól kezdődően perfundáltuk a striatumon át, a GYKI-53405 (10 M) vegyület perfúzióját a mintagyűjtést megelőzően 45 perccel korábban megkezdtük. A nigrostriatalis dopaminerg neuronok elpusztítására 8 g 6-OH-dopamint injektáltunk a jobb oldali előagyi kötegbe a kísérleteket megelőzően 10 nappal. A dopamin prekursor az L-DOPA fokozta a $[^3\text{H}]$ dopamin felszabadulást, az AMPA-receptor gátló GYKI-53405 jelű vegyület és az L-DOPA jelenlétében a $[^3\text{H}]$ dopamin felszabadulás tovább növekedett

dopamin-felszabadulás folyamatos, tónusos gátlás alatt áll GABAerg neurotranszmisszió révén. Ez a hatás felfüggeszthető a GABAA-receptorgátló bikukullinnal, illetve az ioniaziddal kiváltott GABA-szintézis csökkentésével (Jurányi és mtsai., 2004). Kísérleteinkben bikukullin hatására, illetve ioniazid előkezelés után megemelkedett $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulást tapasztaltunk (4. ábra).

A $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulás gátlásáért felelős NMDA-receptorok feltételezhetően gátló idegsejteken helyezkednek el, és azok működésének serkentésével fokozzák a GABA felszabadulását, amely azután csökkenti a $[^3\text{H}]$ dopamin-kiáramlást a dopaminerg idegvégződésekből. A prefrontális kéregből származó corticostriatalis pálya szinaptikus kapcsolatot létesít a striatum GABAerg projekciós neuronok dendritikusákkal és nem-szinaptikus kapcsolatot alakít ki a nigrostriatalis dopaminerg idegvégződésekkel. Normális körülmények között ezen indirekt és direkt NMDA-receptorok által mediált glutamaterg behatás közül a glutamát-GABA kölcsönhatás dominál, és ez határozza meg a dopamin-felszabadulás gátlását. A dopamin-felszabaduláson érvényesülő indirekt glutamaterg-gátlás morfológiai szubsztrátja a GABAerg-neuronok axon kollaterálisai lehetnek, amelyek gátolják a dopaminerg axonterminálisok működését.

A kéregállomány elektromos ingerlésével kiváltott striatalis $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulás dizolcipinnel történő gátlása antipszichotikus hatású glicintranszporter-1-gátló vegyületekkel felfüggeszthető (Jurányi és mtsai., 2005; Hársing és Jurányi, 2006). Ez arra utalhat, hogy az antipszichotikus vegyületek az eltolt glutamát-dopamin egyensúlyt a striatumban normalizálhatják, ami több neuronos pályarendszeren keresztül a thalamicusfilter normális működését állíthatja helyre.

A Parkinson-kór kísérletes modellje corticostriatalis agyszeletben

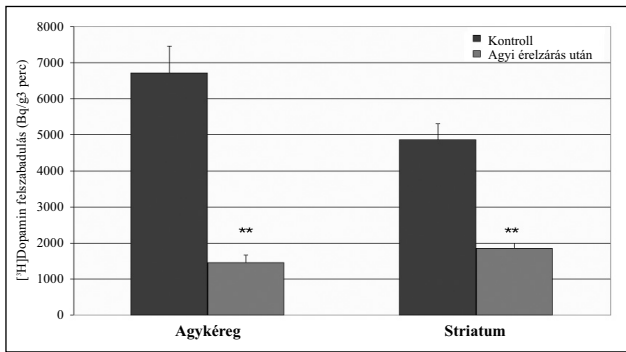
Egészséges szervezetben a striatumban igen nagy mennyiségű dopamin található, ami a mozgáskoordináció normális folyamatában nélkülözhetetlen szerepet játszik. Parkinson-kóros betegekben a dopamin mennyisége egészen alacsony szintre süllyed az extrapiramidális rendszerben. Ugyanakkor a dopamin-felszabadulás hosszú ideig nem változik, sőt még meg is növekszik a kompenzációs mechanizmusok érvényesülésével. A betegség progressziója során azonban eljutunk ahhoz az állapothoz, amikor szükségessé válik a dopamin pótlása. Erre a célra évtizedek óta az L-DOPA használatos, ami drámai javulást eredményez a tünetekben, de nem

gyógyítja meg a betegséget, hanem fokozza annak progresszióját. Napjainkban az egyik fő célkitűzés a gyógyszerkutatókban olyan vegyületek kifejlesztése, amelyek használatával csökkenteni lehet az L-DOPA dózist.

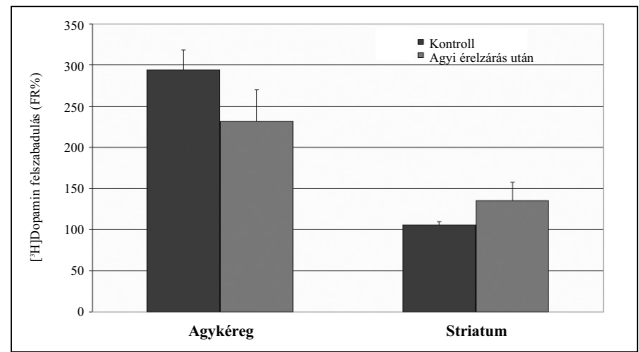
A glutamát-receptor AMPA típusának gátlásával elérhető a dopamin-felszabadulás fokozódása (Szénási és Hársing, 2004). Vizsgálatainkban arra kerestünk választ, vajon hogyan változik a $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulás a striatumban egy AMPA-receptor gátlószerének jelenlétében az agykéreg szelektív elektromos ingerlésének hatására. A méréseket olyan szeletpreparátumokban végeztük, amelyeket kísérletes, a Parkinson-kórhoz hasonló állapotban lévő patkányokból metszettek ki. Ilyen állapotot úgy alakíthatunk ki, hogy a dopamint tartalmazó idegelemeket a 6-OH-dopamint a mediális előagyi kötegbe injektáljuk (Hársing és Zsigmond, 1996). Az L-DOPA a várakozásnak megfelelően jelentősen fokozta a $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulást a nigrostriatalis pálya kémiai roncsolását követően (5. ábra). Ez az emelkedés meghaladta a kontroll állatokból származó értéket (Jurányi és mtsai., 2004). A terápiában tapasztalt mozgásképtesség fluktuációnak (on-off jelenség) éppen ez az egyik oka. A cél tehát a normálhoz hasonló mértékű dopaminkiráramlás biztosítása a betegekben is L-DOPA adását követően. Az AMPA-receptorgátló GYKI-53405 jelű vegyület (amelyet a Gyógyszerkutató Intézetben fejlesztettek ki) és az L-DOPA együttes jelenlétében az agykéregi ingerléssel a striatumban kiváltott $[^3\text{H}]$ dopamin-felszabadulás tovább növekedett, amely azt jelenti, hogy a kompenzációs dopamin-felszabadulás növekedése kevesebb L-DOPA adásával érhető el (5. ábra). Az AMPA-receptor-antagonista és az L-DOPA kölcsönhatását a striatum GABAerg projekciós neuronjain, elsősorban az indirekt pályán képzeljük el (Meyeri és mtsai., 2004).

Stroke vizsgálata corticostriatalis agyszeletben

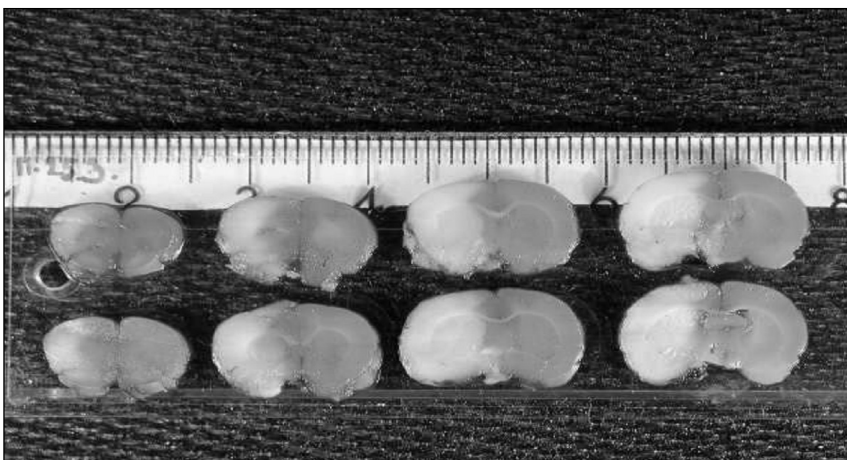
A központi idegrendszerben keletkező vérellátási zavar (stroke) az egyik leggyakoribb és általában végzetes kimenetelű kóros állapot az időskori populációban. A gyógyszerkutatók egyik célkitűzése a stroke alatt és után kialakuló, gyakran visszafordíthatatlan sejtkárosodások gátlása. Stroke kiváltásához patkányban kísérletes agyi érelzáródást hoztunk létre az arteria cerebri media átmeneti, 60 perces elzárásával, amely akut agyi infarktust hoz létre a kérgi és kérges alatti állomány területén (Matucz és mtsai, 2004). Az érelzárás 60 perc múlva megszüntetve megindul a károsodott agyterület reper-



6. ábra. Az agyi érzézés után a [³H]dopamin felszabadulás radikálisan csökkent a striatumban (átlag ± SEM, n = 10-18, *: p < 0.05)



7. ábra. Az agyi érzézés után a felszabadult [³H]dopamin relatív mennyisége (a felszabadult [³H]dopamin a szövetben tároltéhoz képest) megnőtt a striatumban (átlag ± SEM, n = 10-18, *: p < 0.05)



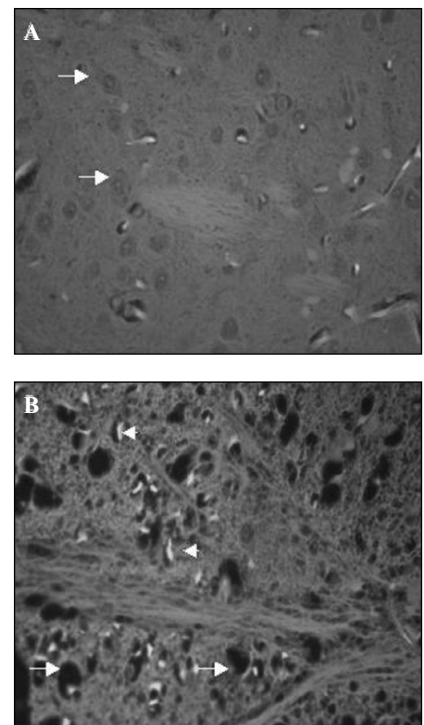
8. ábra. Agyi érzézés után trifeniletiazolium klorid (TTC) festési eljárással láthatóvá tehetjük az ép (piros) és a károsodott illetve elhalt (fehér) agyterületeket. Amint látható az arteria cerebri media átmeneti elzáródása hatalmas kiterjedésű agyszöveti károsodást hozott létre. Ez a kép magyarázza a stroke következtében kialakuló mozgás, beszéd és kogníciós zavarokat emberben

fúziója. Ezzel a módszerrel a humán agyi stroke kialakulását és lefolyását modellezzük. Patkányagyból kivágott agykéreg–striatumszeletben vizsgálható a kéreg és striatum kapcsolatrendszer működése stroke-folyamat kialakulását követően, amennyiben mérjük a korábban leírtak értelmében az agykérgi aktivitás hatására a striatumban történő neurotransmitter-felszabadulást (Benedek és mtsai., 2005).

Méréseink szerint az egészséges állatokhoz képest stroke után jelentősen csökken a [³H]dopamin-felszabadulás (6. ábra). Ez a kifejezési mód azonban csak azt mutatja, hogy a szövetből mennyi volt a felszabadult [³H]dopamin abszolút mennyisége: a várakozásnak megfelelően az ép szövethez képest alacsony értéket találtunk. Ugyanakkor, ha azt vizsgáljuk, hogy mennyi volt a felszabadulás a szöveti tartalomhoz képest (fractional release számítása), azt találjuk, hogy az a kontrollhoz képest megnövekedett (7. ábra). Ez a fo-

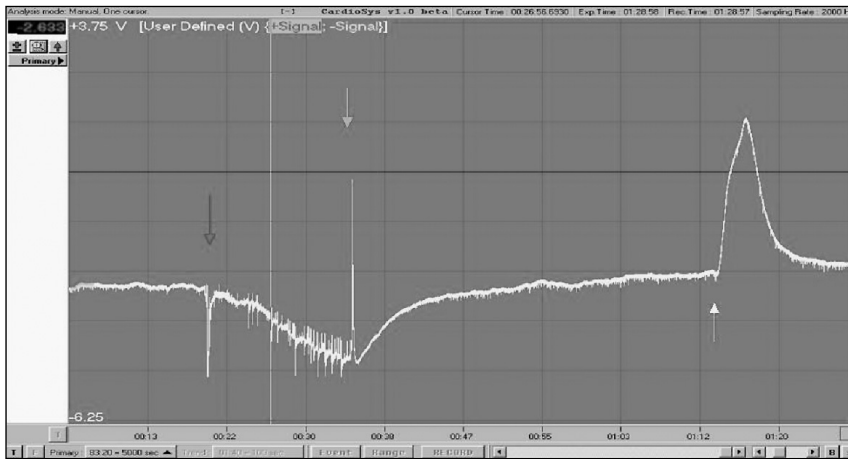
lyamat a striatumban kompenzációs mechanizmusra utal, amely révén a szervezet megkísérli biztosítani a szükséges mértékű dopamin-felszabadulást a még életképes idegsejtekből.

A neurokémiai eredményeinket morfológiai vizsgálatokkal kiegészítve (Benedek és mtsai, 2005) megerősíthető, mely agyterületeket érint leginkább az arteria cerebri media okklúziója következtében létrejövő glükóz- és oxigénhiány (8. és 9. ábra). Mindez az állapot *in vitro* is létrehozható, ha szimuláljuk az agyszelet-kamrában az *in vivo* érzézés után fel lépő oxigén- és glükózhányt. Erre a célra a kamrába helyezett szövet körül olyan módosított élettani oldatot áramoltatunk, amelyben nincs glükóz, és azt oxigén–széndioxid helyett nitrogén–széndioxid gázkeverékkel telítjük. A rendszer felépítése lehetővé teszi, hogy a szövetben keletkező elektromos aktivitásváltozásokat is regisztrálni tudjunk. A kísérlet szerint az agyszelet két oldala között jelentős



9. ábra. Neuron pusztulás hipoxias corticostriatalis agyszelet striatum részében. Hipoxiát az arteria cerebri media 60 perces elzárásával váltottuk ki, amelyet 24 órás reperfüzió követett. Ezt követően corticostriatalis szeletet készítettünk, és a szövetet Fluoro Jade festéssel vizsgáltuk. A: Kontroll striatum szövet, nyíllal jelöltük az ép neuronokat, amelyek fluoreszcens festéket nem vettek fel. B: Hipoxias striatumszelet. Nyíllal jelöltük az agyi infarktuszban zölden fluoreszkáló károsodott idegsejteket. Fluoro Jade festés, nagyítás 450x, Dr. Albert Mihály és Benedek Angéla felvétele

mértékű feszültségváltozás lép fel szimulált ischemia hatására, és a kóros állapot megszűntét követően a normális elektromos aktivitás rövid időn belül helyreáll (10. ábra).



10. ábra. Ischemia hatására bekövetkező feszültségváltozás agykéreg-striatumszelvényben *in vitro*. A szelvet körül glükózmentes és oxigén helyett nitrogén-széndioxidral dúsított Krebs-bikarbonát puffert kezdünk áramoltatni (piros nyíl). A nyugalmi feszültségértékben látható tüskék idegsejtek együttes kisülésének eredője. Amint visszacseréljük az oldatot az élettanira (narancssárga nyíl) az idegszöveti aktivitás normalizálódik. A kísérlet végén ellenőrizzük a szövet életképességét (sárga nyíl: idegszöveti elektromos válaszreakció 40 mM KCl hatására). SPEL Haemosys, Experimetria Kft.

Összefoglalás

A központi idegrendszert érintő betegségek kutatása és megértése már a mai tudomány nagy kihívása. A lakosság folyamatos öregedésével párhuzamosan egyre nagyobb problémát jelentő idegrendszeri megbetegedések esetén sokszor még mindig csak tüneti kezelést alkalmazhatunk. Az agyszövet rendkívüli komplexitása miatt különösen igaz az, hogy a sejt, illetve szöveti elváltozások sohasem lokalizáltak, hanem rendszerszintű betegségeket és tüneteket idézhetnek elő. Ennél fogva egyes, a teljes egészségből kiragadott agyterületek vizsgálata helyett célravezetőbb az agy különböző régiói közötti funkcionális kapcsolatokat tanulmányozni mind egészséges, mind kóros körülmények között. Az írásunkban bemutatott komplex agyszelvény-készítmény, mint módszer is ezt a célt szolgálja, segítségével gyorsabban, hatékonyabb gyógyszer-molekulák kifejlesztését reméljük.

IRODALOM

Benedek, A., Mórincz, K., Jurányi, Zs., Albert, M., Gígler, G., Hársing, L. G., Mátyus, P., Szénási, G.:

Evaluation of early brain damage by TTC staining and histology after transient focal cerebral ischaemia in rats. *Cerebrovascular Diseases*, 2005, 19 (Suppl. 2).

Burton, N. R., Smith, D. A. S., Stone, T. W.: The mouse neocortical slice: preparation and responses to excitatory amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1987, 88C, 47–55.

Carlsson, M., Carlsson, A.: Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia, implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *TINS*, 1990, 13, 272–276.

Glowinski, J., Iversen, L. L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 655–669.

Harrison, N. L., Simmonds, M. A.: Quantitative studies on some antagonists of N-methyl-D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br. J. Pharmacol.*, 1985, 84, 381–391.

Hársing, L. G., Jr., Zsigmond, M. J.: Dopaminergic inhibition of striatal GABA release after 6-hydroxydopamine. *Brain Res.*, 1996, 738, 142–145.

Hársing, L. G., Jr., Jurányi, Zs., Zsigmond, M. J.: Cortical stimulation influences striatal dopamine release via GABAergic neurons in corticostriatal slices of the rat. *Soc. Neurosci.*, 2003, Abstr. 705.8

Hársing, L. G., Jr., Jurányi, Z.: Dual effect of the glycine transporter type-1 inhibitor Org-24461 on MK-801-induced [³H]dopamine release in rat corticostriatal slices. *Proc. Austr. Neurosci. Soc.*, 2006, 17, 79.

Javitt, D. C.: Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 2004, 9, 984–997.

Jurányi, Zs., Hársing, L. G. Jr., Zsigmond, M. J.: [³H]Dopamine release in rat striatum evoked by electric field stimulation of cortex in complex cor-

ticostriatal slice preparation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 137, 128P.

Jurányi, Zs., Zsigmond, M. J., Hársing, L. G., Jr.: [³H]Dopamine release in striatum in response to cortical stimulation in a corticostriatal slice preparation. *J. Neurosci. Methods*, 2003, 126, 57–67.

Jurányi, Zs., Sziray, N., Levay, G., Hársing, L. G., Jr.: AMPA receptor blockade potentiates the stimulatory effect of L-dopa on dopamine release in dopamine-deficient corticostriatal slice preparation. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 2004, 16, 129–139.

Jurányi, Zs., Hársing, L. G. Jr.: Brain slice chambers designed for *in vitro* experiments with nervous tissue. In: *Monoamine Oxidase Inhibitors*, eds: Torok, T. L., Klebovich, I., Medicina, Budapest, 2004, 281–308.

Jurányi, Zs., Markó, B., Hársing, L. G., Jr.: Depletion of GABA decreased the evoked [³H]dopamine release in striatum in the presence of NMDA receptor blockade in corticostriatal slices. *Clin. Neurosci.*, 2004, 57, 27.

Jurányi, Zs., Egyed, A., Hársing, L. G.: Amelioration MK-801-enhanced [³H]dopamine release in rat corticostriatal slices by Org-24461, a glycine transporter-1 inhibitor. *J. Neurochem.*, 2005, 94, Suppl. 2, P363.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C.: Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J. Neurophysiol.*, 1989, 62, 1052–1068.

Krebs, M. O., Desce, J. M., Kemel, M. L., Gauchy, C., Godeheu, G., Cheramy, A., Glowinski, J.: Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J. Neurochem.*, 1991, 56, 81–85.

Leviel, V., Gobert, A., Guibert, B.: The glutamate mediated release of dopamine in the rat striatum: further characterization of the dual excitatory-inhibitory function. *Neuroscience*, 1990, 39, 305–312.

Matucz, E., Mórincz, K., Gígler, G., Simó, A., Barkóczy, J., Lévy, G., Hársing, L. G., Jr., Szénási, G.: Reduction of cerebral infarct size by non-competitive AMPA antagonists in rats subjected to permanent and transient focal ischemia. *Brain Res.*, 2004, 1019, 210–216.

Megyeri, K., Markó, B., Sziray, N., Levay, G., Hársing, L. G.: Blockade of striatal AMPA receptors leads to levodopa sparing in dopamine-deficient basal ganglia of the rat. *Soc. Neurosci.*, 2004, Abstr. 678.14

Popov, N., Pohle, W., Lossner, B., Schulzeck, S., Schmidt, S., Ott, T., Matthies, H.: Regional distribution of RNA and protein radioactivity in the rat brain after intraventricular application of labeled precursors. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1973, 31, 51–62.

Szenasi, G., Hársing, L. G.: Pharmacology and prospective therapeutic usefulness of negative allosteric modulators of AMPA receptors. *Drug Discover. Today*, 2004, 1, 69–76.

Vizi, E.S., Ronai, A., Hársing, L. G., Jr., Knoll, J.: Inhibitory effect of dopamine on acetylcholine release from caudate nucleus. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1977, 29, 201–211.

Wu, Y., Pearl, S. M., Zsigmond, M. J., Michael, A. C.: Inhibitory glutamatergic regulation of evoked dopamine release in striatum. *Neuroscience*, 2000, 96, 65–72.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A közlemény az OTKA T-43511 és az ETT-482/2003. kutatási támogatásával készült. A szerzők köszönetet mondanak Puskás Judit szerkesztői munkájáért.

Ide valamilyen szöveg még kellene.
Legyen OTKA-logó?