

A purinerg P2Y receptorcsalád szerepe a perifériás kemoreceptor működésben

37. OTDK Biológia szekció

készítette:

GÁL ZSUZSANNA TAMARA

Biológus MSc I. félév

témavezetők:

DR. IRING ANDRÁS MD, PhD

tudományos főmunkatárs

HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Molekuláris Farmakológia Kutatócsoport

DR. VITÉZ-CSERVENÁK MELINDA, PhD

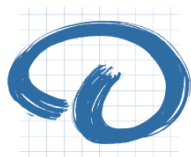
egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Élettani és Neurobiológiai

Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

Biológiai Intézet



HUN-REN MAGYAR KUTATÁSI HÁLÓZAT
KÍSÉRLETI ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZET

Budapest, 2025

Tartalomjegyzék:

1. Rövidítésjegyzék.....	3
2. Bevezető	4
3. Célkitűzés.....	8
4. Anyagok és módszerek	9
4.1. Állatok	9
4.2. Felhasznált anyagok.....	9
4.3. A glomus caroticum izolálása	10
4.4. A glomus sejtek izolálása	10
4.5. Kontrollált <i>in vitro</i> hipoxia és hiperkapnia	11
4.6. Kalcium mérés	11
4.7. Immunhisztokémiai analízis	11
4.8. Statisztikai analízis	12
5. Eredmények.....	13
6. Diskusszió.....	19
7. Köszönetnyilvánítás	20
8. Irodalom.....	21

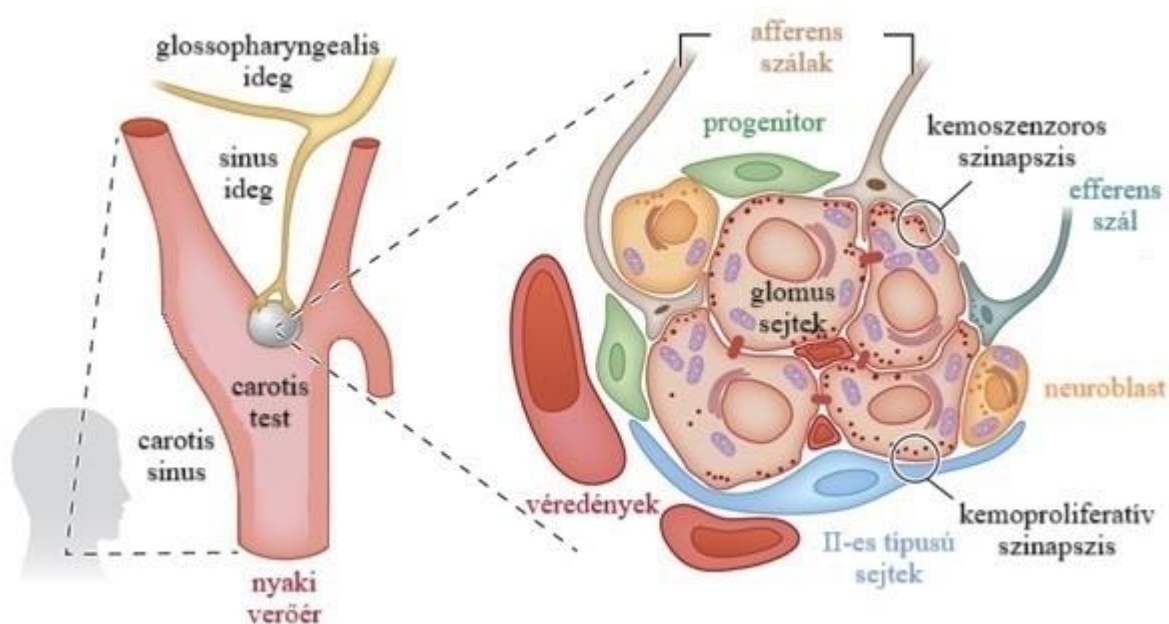
1. Rövidítésjegyzék

ADA	adenozin deamináz
ADO	adenozin
ADORA	adenozin receptor
ADP	adenozin-monofoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CD39	ekto-apiráz
CD73	5'-ektonukleotidáz
FCS	magzati borjúsérum
GABA	γ -aminovajsav
GC	glomus caroticum
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
H/H	hipoxia és hiperkapnia
KO	knock-out
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
P2Y ₁₂ R	P2Y ₁₂ -receptor
PaCO ₂	artériás szén-dioxid parciális nyomása
PaO ₂	artériás oxigén parciális nyomása
PBS	foszfátpufferelt-sóoldat
PFA	paraformaldehid
pH	hidrogénpotenciál
SEM	az átlag standard hibája
TH	tirozin-hidroxiláz

2. Bevezető

Napjainkban ismert, hogy az autonóm idegrendszer egyensúlyának zavara szoros összefüggésben áll a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásával, mely emelkedett halálozási kockázattal társul (van Bilsen et al., 2017). Az összetett, többretegű rendszer működésének pontos, alaposabb megértése, illetve az egymástól függő neurális hálózatokon keresztül zajló élettani folyamatok és azok szabályozásának felderítése klinikai relevanciával járnak (Ardell et al., 2016).

Az autonóm idegrendszer, mely szimpatikus, paraszimpatikus és enterális idegrendszerből áll, egyik alapvető funkciójának a vér oxigén ellátottságának gyors és pontos monitorozása tekinthető. Egy kis kétoldali szervre fókuszálva, a carotis testre (glomus caroticum, GC), mely az artéria carotis communis bifurkációjában helyezkedik el és a szív- és légzőrendszer szabályozásában alapvető funkciót lát el, érthetjük meg igazán az autonóm idegrendszer monitorozó szerepét (1. ábra).



1. ábra. A carotis test (carotid body) elhelyezkedése a carotis bifurkációjában, valamint a sejtes elemek közötti kölcsönhatások. A carotis test I-es típusú glomus sejtekből, II-es típusú támasztósejtekből, erekből, illetve afferens és efferens idegvégződésekből épül fel, melyek anatómiailag funkcionális egységekké szerveződnek és chemoszenzoros szinapszisokat létesítenek, hogy információt továbbítsanak a Sinus-idegen keresztül a nyúltvelői légzőközpontokhoz (Iturriaga et al., 2021).

A carotis test anatómiáját tekintve kapillárisokat, afferens és efferens idegvégződéseket, valamint két specializált sejttípust tartalmaz: az I-es típusú sejteket, melyeket glomus sejteknek nevezünk, és a II-es típusú (támasztó) sejteket. Az I-es típusú sejtek olyan kemoreceptor elemek, amelyek neurotranszmittereket és peptid neuromodulátorokat termelnek; míg a II-es típusú sejtek az I-es típusú sejtek klasztereit borítják (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2020). Az I-es típusú sejtekből kemoreflex aktiváció során felszabaduló neurotranszmitterek és modulátorok első sorban ATP-ből, adenozinból, acetilkolinból, dopaminból, noradrenalinból, szerotoninból, GABA-ból és hisztaminból állnak (Ichikawa, 2002; Kato et al., 2013; Montoro et al., 1996; Nurse & Piskuric, 2013; Varas et al., 2003). Ezen kívül kimutatták, hogy az I-es típusú sejteken és a carotis test idegkötegein dopamin D2 receptorok találhatóak (Wakai et al., 2015).

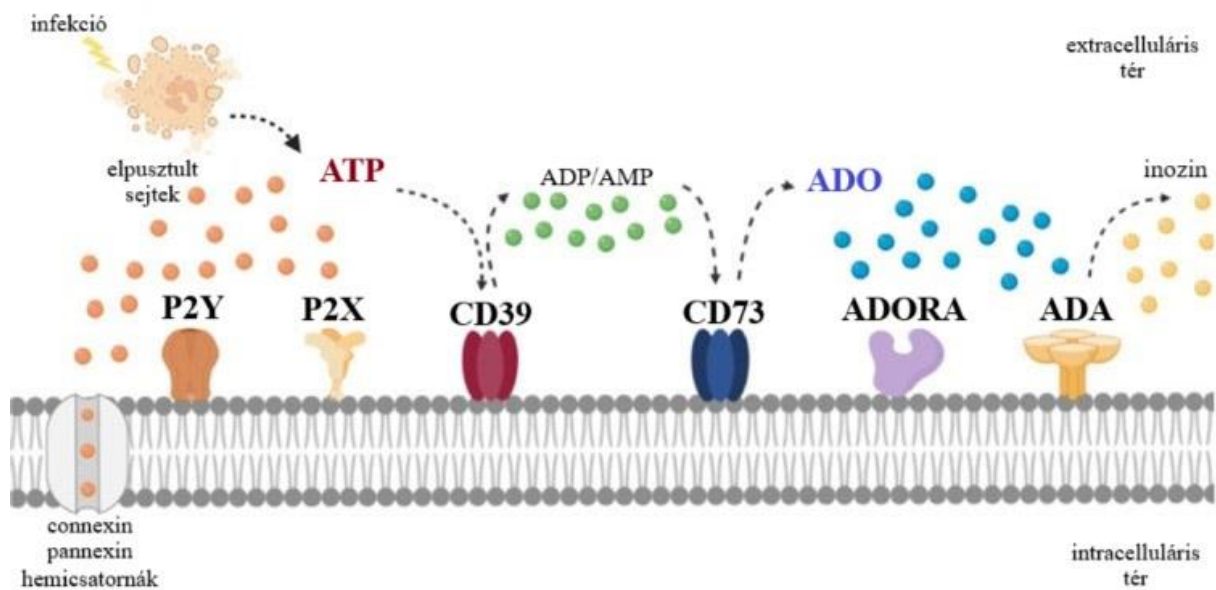
A GC folyamatosan észleli és felméri az artériás vér összetételének változását, például az artériás oxigén (PaO_2), a szén-dioxid (PaCO_2) parciális nyomását, továbbá a vér pH-ját, valamint a glükóz koncentrációját is (Gao et al., 2014). A vér O_2 tenziójának változása, amely a hipoxia egyik elsődleges jele, további változásokat idéz elő a mitokondriális membránpotenciál és a NADH szintjének esetében is, valamint sejtmembrán depolarizációt és extracelluláris kalcium sejtbe történő beáramlását okozza (Wyatt & Buckler, 2004). Ezekre a változásokra válaszul a felszabaduló neurotranszmitterek akciók potenciált váltanak ki a Sinus-ideg afferens rostjain keresztül (Hering-ideg) (Shoja et al., 2019), mely a glossopharyngealis ideg (n. IX) egyik ága és információt továbbít a központi idegrendszer nyúltvelői részén elhelyezkedő légzőközpontokhoz. Ez az alapvető funkció járul hozzá, hogy a ventilációt a tüdőperfúzióhoz igazítsa és kielégítse a szövetek oxigénigényét, illetve a kardiorespiratorikus kompenzációs folyamatok elindításáért stresszes körülmények között, mint hipoxia esetében. Azonban a kemotranszdukcióban részt vevő receptorok természete és jelátviteli mechanizmusa nagyrészt ismeretlen.

A glomus sejtek valójában multimodális érzékelőknek tekinthetők a bennük expresszálandó G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) miatt (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2020). A GPCR-ek hét transzmembrán doménnel rendelkeznek és extracelluláris molekulák kötődése esetén különböző intracelluláris jelátviteli útvonalakat aktiválnak. A jelenleg klinikailag jóváhagyott gyógyszerek 34%-a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokat célozza meg (Sriram & Insel, 2018), ugyanis egyes GPCR-ek ligandum specificitása és szövetekben való egyedi expressziós mintázata alapján ideális jelöltek farmakológiai beavatkozásokhoz.

Fiatal, egészséges egér GC sejtek transzkriptóm analízise során számos GPCR-t azonosítottak, többek között a purinerg receptorcsaládhoz tartozó P2Y12 receptort (P2Y12R) (Zhou et al., 2016).

A purinerg jelátvitel jelentős szerepet tölt be a szervezet immunválaszának modulációjában és különböző effektor mechanizmusok kiváltásában. A jelátvitelt extracelluláris nukleotidok teszik lehetővé, ahol ATP aktiválja a purinerg receptorokat és elindítja a purinerg jelátviteli kaszkádot (2. ábra). Az extracelluláris ATP kétféle P2 receptor működését aktiválja (Junger, 2011). Az egyik csoport, a P2X receptorok olyan plazmamembrán csatornák, amelyek különböző kationok transzmembrán mozgását közvetítik (Burnstock, 2006). A P2Y receptorok a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába sorolhatóak (Eberhardt et al., 2022), ahol nyolcféle altípust különítünk el (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 és P2Y14). Ezek a receptorok széles körben expresszálódnak, illetve a különböző altípusok ligand érzékenysége és a G-fehérje alegységen történő intracelluláris jelátviteli módja nagymértékű varianciát mutat, így ezen receptorok rendkívül eltérő biológiai folyamatokat közvetítenek (von Kügelgen & Hoffmann, 2016). Többek között a P2Y12 receptorok nélkülözhetetlenek a vérlemezke működésben, a vérzéscsillapításban és a trombózisban is, mely folyamatban a P2Y1 receptorok közvetítésével beáramló intracelluláris kalcium koncentrációt szabályozzák (Kauffenstein et al., 2001). A P2Y12R-t gátló gyógyszerek jól tolerálható antitrombotikus szerek, többek között ilyen a klinikai környezetben szélesebb körben használt klopidoegrél is. Továbbá, a központi idegrendszer rezidens immunkompetens sejtjei, a mikroglia jelentős mértékben fejezi ki a P2Y12 receptorokat, melyek a sejtek aktivációjához és migrációjához szükségesek (Haynes et al., 2006).

Mivel a periférián a GC-ban feltételezhető a P2Y12R jelenléte, valamint a receptor-inhibitorok klinikai jelentősége és feltételezhető negatív hatása a légzésválasz kialakulásában, ezért irányította a kutatócsoport figyelmét a purinerg jelátvitelben elengedhetetlen szerepet játszó P2Y12R szabályozásának vizsgálatára. Dolgozatomban ennek a receptornak jelenlétét és lokalizációját mutattam ki, alapjául szolgálva annak, hogy jobban megérthessük a perifériás kemoreceptor működést.



2. ábra. A purinerg jelátvitel útvonalainak főbb összetevői. Az extracelluláris ATP származhat pusztuló sejtekből, illetve a sejtek autokrin vagy parakrin módon, connexin és pannexin csatornákon keresztül történő ATP felszabadulással szabályozhatják saját és környezetük működését. A metabolizmus során az ATP hidrolízisének kétlépcsős folyamatát purinerg ektoenzimek határozzák meg (CD39 és CD73), a végtermék az adenzin, melyet az ADA enzim hatástalanít. Az extracelluláris térben az ATP és bomlástermékei P2X- vagy P2Y-receptorokat, valamint az ADORA receptorokat aktiválják. ADO: adenzin; ADORA: adenzin receptor; ADA: adenzin deamináz; CD39: ekto-apiráz; CD73: 5'-ektonukleotidáz (Eberhardt et al., 2022).

3. Célkitűzés

Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. A purinerg P2Y₁₂-receptor jelenlétének igazolása és lokalizációjának kimutatása vad típusú (C57/BL6N) és genetikailag módosított knock-out egerekből izolált glomus caroticum szeleteken.
2. A TH és P2Y₁₂R fehérjék kolokalizációjának vizsgálata a glomus caroticumban.
3. A hipoxia hatásának *in vitro* tanulmányozása a glomus caroticumból izolált I-es típusú sejteken.
4. A kombinált hipoxia és hiperkapnia hatásának *in vitro* tanulmányozása a glomus caroticumból izolált I-es típusú sejteken

4. Anyagok és módszerek

4.1. Állatok

A vizsgálatainkhoz vad típusú (C57/BL6N) és *P2ry12* génhiányos (*P2ry12^{-/-}*, P2Y12R-KO) vegyes nemű, 8-14 hetes egereket használtunk. Átlagos tömegük 30 ± 4.0 gramm.

A *P2ry12^{-/-}* knock-out egerek eredeti tenyész párjait, B6;129-*P2ry12^{tm1Dgen}/H* a Deltagen Inc.-től (San Matteo, CA, USA) szerezte be a kutatócsoport. A klónozási és tenyésztési stratégiát, valamint a genotipizálási protokollt már korábbi tanulmányok ismertették (Horváth et al., 2014).

A génmódosított egértörzset időszakosan visszakereszteltünk C57BL/6N háttérre, és a knock-out törzset tartalmazó kísérletekben vad-típusú alomtársakat használtunk kontrollként. Az állatokat 12 órás világos-sötét ciklus alatt tartottuk egy hőmérséklet ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) és páratartalomszabályozott helyiségben ($60 \pm 10\%$) és *ad libitum* jutottak élelemhez, illetve vízhez. Az *in vivo* vizsgálatot a világos ciklusban végeztem el. Az állatgondozás, a kezelési eljárások és a kísérleti vizsgálatok az Intézményi Etikai Kódex és a Magyar Állatgondozási és Kísérleti Törvény irányelvei szerint történtek (40/2013, II.14), amelyek összhangban állnak az Európai Közösségek Tanácsának 2010. szeptember 22-i irányelvével (2010/63/EU). A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatgondozói és Kísérleti Bizottsága, valamint a Budapesti Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrző Állomás is minden kísérletet jóváhagyott (PEI/001/776-6/2015). A kísérleti állatokkal humánusan bántunk és minden erőfeszítést megtettünk az állatok szenvedésének minimalizálása és a kísérleti állatok számának csökkenése érdekében. Az állatkísérleteket az ARRIVE irányelveinek megfelelően jelentettük (McGrath & Lilley, 2015).

4.2. Felhasznált anyagok

Adenozin-5'-difoszfát (Cat. No. A2754), fiziológiás sóoldat (NaCl, 0,9%), szarvasmarha szérum albumin (Cat. No. A2153), kalcium-ionofór A-23187 (Cat. No. C7522), *Clostridium histolyticum* kollagenáz (Cat. No. C0130), tripszin (Cat. No. T9935), sertés hasnyálmirigyből származó elasztáz (Cat. No. 45125), inzulin oldat szarvasmarha hasnyálmirigyből (Cat. No. I0516), penicillin-streptomycin (Cat. No. P4333), DMEM/F-12 HEPES-el L-glutamin-nal (Cat. No. DF-041), kalcium-klorid-dihidrát (Cat. No. C3306), Oregon Green 488 BAPTA-1- AM (OGB-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. No. O6807) az Invitrogen-től

származnak (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Az egér trombociták elleni antitestek a BD Biosciences-től (Franklin Lakes, NJ, USA (Purified Rat Anti-Mouse CD41, Cat. No. 553847)), a tirozin-hidroxiláz elleni a Sigma-Aldrich cégtől származik (Cat. No. AB152; Lot. No. 3256647), a P2Y₁₂ receptor elleni az AnaSpec-től (Fermont, CA, USA (Cat. No. AS 55043A; Lot. No. UB1701)) szereztük be. Másodlagos antitestek: AlexaFluor-488 és AlexaFluor-564 (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; 1:200), valamint Hoechst-33342 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; 1:10000) a Thermo Fischer Scientific-től származnak.

4.3. A glomus caroticum izolálása

A kísérleti állatokat izoflurán felhasználásával túlaltattuk, majd a glomus caroticum bifurkációját mindkét oldalon izoláltuk. A szövetek perfúziójához 4 °C-os foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) használtunk. Az izolált sejteket 20 percig szobahőmérsékleten 4%-os PFA-val fixáltuk. Fixálás után az izolált mintákat *en bloc* fagyvédelemmel láttuk el izopentán-szárazjég szuszpenzió alkalmazásával (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA). A mintákat -20 °C-on, fedett bemérőcsónakban egy éjszakán át állni hagytuk.

4.4. A glomus sejtek izolálása

A kísérleti egerekből izolált glomus sejtek izolálását Ortega-Sáenz és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján végeztük el (Ortega-Sáenz et al., 2010). Röviden, az állatokat túlaltattuk, majd a nyaki bifurkációt mindkét oldalon begyűjtöttük (enzimatis reakciónként kettőt). Az izolált szöveteket 1 ml PBS-be helyeztük, majd 0,6 mg kollagenáz II-t, 0,3 mg tripszint, 10 IU/ml sertés elasztázt és 50 µM CaCl₂-ot adtunk az oldathoz, melyet 37 °C-on 20 percig állni hagytunk. Ezt követően a szövetmintákat mechanikusan disszociáltuk és további 5 percig inkubáltuk. A disszociált sejteket poli-L-lizinnel bevont Petri-csészébe helyeztük és (DMEM/F-12 [Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalaj] 10 % magzati szarvasmarha szérum, 1 % penicillin/sztreptomycin, 1 % L-glutamin és 84 µU/ml inzulin) tápoldatot adtunk hozzá. A sejteket 24 órán keresztül hagytuk az edény alján megtapadni, és hét napig hagytuk növekedni tápoldatukat naponta cserélve.

4.5. Kontrollált *in vitro* hipoxia és hiperkapnia

Az O₂ / CO₂ gázszabályozókkal felszerelt Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) készüléket használtuk enyhe (12% O₂ / 5% CO₂ / 83% N₂), mérsékelt (6% O₂ / 10% CO₂ / 84% N₂) és súlyos (1% O₂ / 15% CO₂ / 84% N₂) hipoxia vagy hiperkapnia előidézésére 37 ° C-on. A glomus sejteket egy 24 lyukú lemezen tenyésztettük, majd 60 percre a műszer olvasókamrájába helyeztük lefedve, hogy minimalizáljuk a tápközeg párolgását. Minden hipoxia/hiperkapnia kiváltásakor felülűszó mintát vettünk a sejtekből, majd a kivett mintát ugyanannyi mennyiségű, 37° C-on előmelegített friss tápfolyadékkal helyettesítettük. Végül az A-23187 (1 µM, 1 perc) kalcium-ionofórt adtuk a tápoldathoz, hogy értékeljük a glomus sejtekben lévő vezikulákban tárolt fennmaradó monoamin transzmitterek felszabadulását igazolva a sejtek életképességét a kísérleti protokoll végén. A kísérlet végén a sejteket jéghideg 0,01 M perklórsavas oldatban lizáltuk, fehérjeméréshez összegyűjtöttük (Császár et al., 2022).

4.6. Kalcium mérés

A glomus sejtek aktivitásának funkcionális vizsgálatához a primer sejteket 30 percig inkubáltuk 1 µM Pluronsavval (F-127 P3000MP, Sigma-Aldrich, Cat. No. P2443, előmelegítve 37°C-ra), 1:1 arányban hígítva 5 µM Oregon Green 488 BAPTA-1-gyel (OGB-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. No. O6807) 2 ml tápoldatban (DMEM/F-12 (Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat), 10% magzati szarvasmarha szérum, 1% penicillin/sztreptomycin, 1% L-glutamin és 84 µU/ml inzulin). Az inkubálást követően friss tápfolyadékot cseréltünk, ezt további 20 percig tartó inkubálás követte. A sejtek spontán aktivitását 5 percen keresztül rögzítettük az N-STORM Super-Resolution System segítségével, a lézererősség 38%-os, 30 ms/Hz, 12 bit (binning nélkül) beállításokkal, a képkockák közötti késleltetés nélkül, 20×-os nagyítással. Az alaptevékenység regisztrálását követően a sejteket adenzin-5'-difoszfát (ADP, 10µM) kezeltük, és a fluoreszcencia-változást ($\Delta F/F$) minden egyes sejtre kiszámítottuk.

4.7. Immunhisztokémiai analízis

Kriosztát mikrotómmal (Thermo Shandon Cryotome, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 16 µm vastag metszeteket vágunk, majd ezeket zselatinnal bevont tárgylemezre helyeztük. A mintákat egy éjszakán át -20 °C-on tároltuk. A felhasználás napján

a mintákat háromszor mostuk PBS-sel, és 2% FCS-t, 1% BSA-t és 0,2% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 2 órán keresztül. A mintákat genotípus szerint csoportokra osztottuk, és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk ugyanabban a pufferben, amely anti-tirozin-hidroxiláz antitestet (1:400), valamint anti-P2Y12R antitestet (1:1000) tartalmazott. Az anti-P2Y12-receptor antitest specificitását korábban vad típusú kontroll és P2Y12R-KO egerekből származó mintákban validáltuk (Iring et al., 2022). Egy éjszakán át tartó inkubálás után a mintákat PBS-ben mostuk, és a megfelelő AlexaFluor-564 konjugált antitesttel és AlexaFluor-488 konjugált másodlagos antitesttel (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; 1:200), valamint Hoechst 33342-vel szobahőmérsékleten inkubáltuk (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; 1:10000) 1 órán át, fénytől védve. A mintákat ProLong™ Gold Antifade Mountant-ba (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) helyeztük és szobahőn, egy éjszakán át inkubáltuk. Az immunfluoreszcens jelfeldolgozás Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal (Nikon Instruments Europe B.V; Amszterdam, Hollandia) és C2 lézeres konfokális rendszerrel történt. Az immunfluoreszcens jel intenzitásának elemzését Shihan és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján értékeltük (Shihan et al., 2021). A képfelvétel során a „gain”, az „offset” és a lézerezősség paramétereikhez azonos lézerbeállításokat használtunk. A képeket az ImageJ Fiji programban dolgoztuk fel, ahol az összes csatorna háttérét kivontuk (görbületi sugár: 50 pixel), majd ezt a lépést követte az egyes csatornák átlagos fluoreszcens intenzitásának automatizált mérése. Az immunfestés kvantitatív analízisét legalább három, véletlenszerűen kiválasztott mezőn végeztük el minden minta esetében a kívánt régióban. Minden állatból három független mintát elemeztünk.

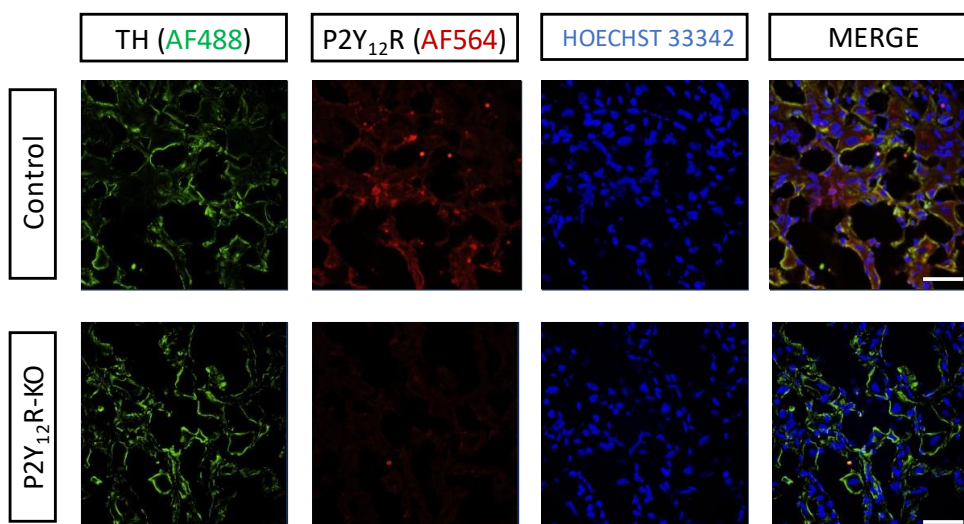
4.8. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést a GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA) GraphPad Prism v.6.07 szoftverével végeztük. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formátumban ábrázoltuk, n pedig a független kísérletek számát jelenti. Valamennyi folytonos valószínűségi változó valószínűségi eloszlását elvégeztük. A két csoport közötti statisztikai elemzést párosítatlan Student-féle kétmintás t-próbával végeztük, több kísérleti csoport vagy változó esetében kétutas ANOVA-t használtunk, Bonferroni *post-hoc* teszttel. A 0,05-nél kisebb p értéket a vizsgálat során statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

5. Eredmények

A nyaki artéria bifurkációjánál elhelyezkedő glomus sejtek felelősek az emlősök véroxigénjének monitorozásáért. Fiatal, egészséges egér egyetlen glomus caroticum sejtől végzett mRNS transzkriptóm analízisének eredménye felvetette bizonyos G-fehérje kapcsolt receptor jelenlétét, amelyek közül a kutatócsoport figyelme a P2Y₁₂ purinerg receptor felé irányult (Zhou et al., 2016).

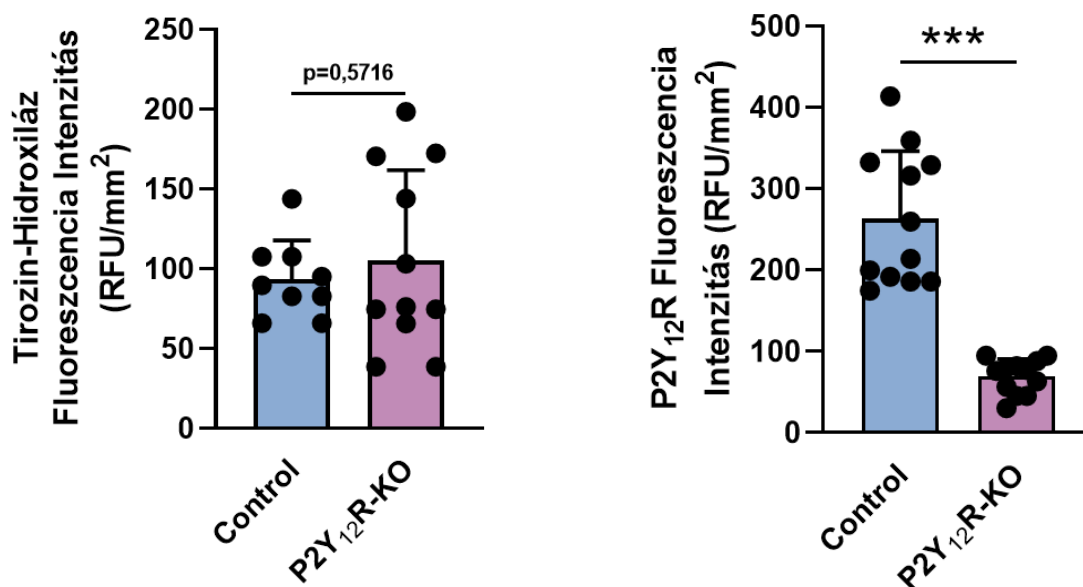
Kísérletünkben a fiatal, egészséges kontroll egerekből izolált glomus caroticum metszetről készült immunhisztokémiai felvételeken jól látható, hogy a P2Y₁₂R fehérje a glomus caroticum sejtselemein jelen van, míg a P2Y₁₂R-KO állatokból származó metszeten hiányzik, igazolva, hogy az általunk használt antitest specifikus a P2Y₁₂R epitópra (3. ábra és 4. ábra, *jobb panel*).



3. ábra. Reprezentatív immunhisztokémia képek vad-típusú (Control) és P2Y₁₂R géndeficiens (P2Y₁₂R-KO) egerekből izolált glomus caroticum metszetekről, melyeket anti-tirozin-hidroxiláz (TH, AlexaFluor-488, zöld) és anti-P2Y₁₂R (AlexaFluor-564, piros) antitestekkel inkubáltunk; továbbá sejtmagfestést alkalmaztunk (Hoechst 33342, kék). Az utolsó kép a különböző lézercsatornák rétegelt, szummációs képe (merge). Lépték: 50 μ m.

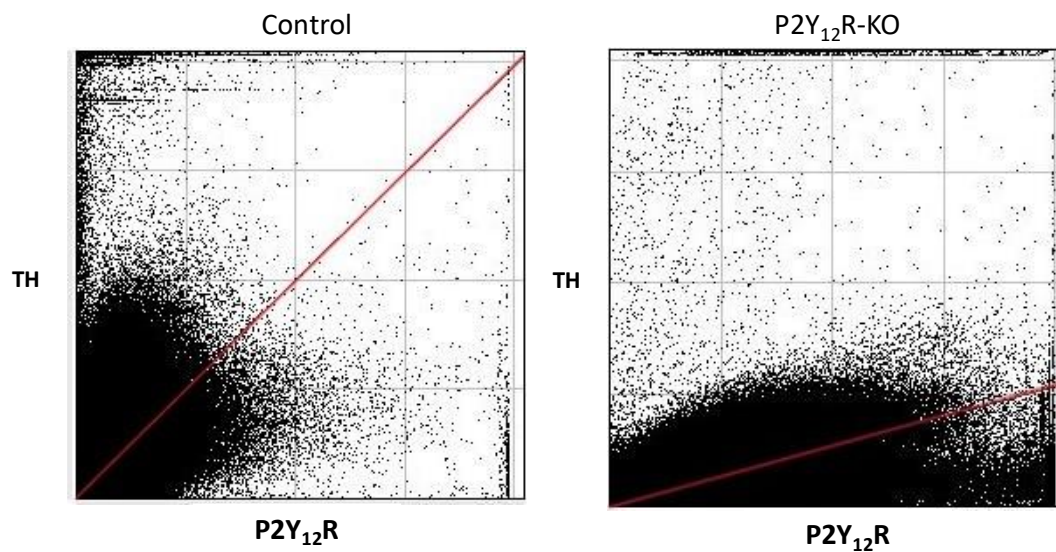
A glomus caroticum kemotranszdukcióért felelős, I-es típusú sejt sajátos funkciója a dopamin neurotransmitter molekula szintézise és felszabadulása. Ez a folyamat a tirozin-hidroxiláz (TH) enzim jelenlétét igényli (Zhang et al., 2018). Az oszlopdiagramokon látható, hogy a TH immunfluoreszcens jelölés intenzitása mind a vad típusú, mind a receptor hiányos

(KO) egerekből izolált metszeteken azonos mértékben van jelen (4. ábra, *bal panel*). A glomus caroticum metszeteken található TH és P2Y₁₂R térbeli elhelyezkedése immunfluoreszcens jelölés során felvetette a két molekula azonos sejtben történő expressziójának lehetőségét (3. ábra).

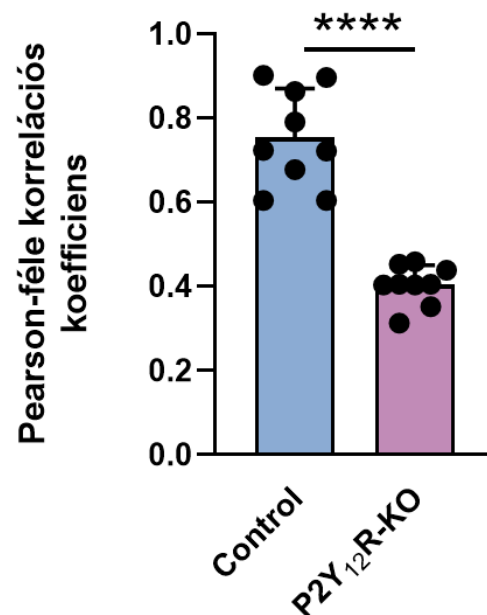


4. ábra. A P2Y₁₂R (jobbra) és tirozin-hidroxiláz (balra) kvantifikált fluoreszcencia intenzitás értékeinek ábrázolása vad-típusú és P2Y₁₂R knock-out glomus caroticum metszetekről. Az oszlopdiagram a középérték ± standard hiba szórását ábrázolja, $n=9-11$ statisztika Student-féle párosítatlan kétmintás t -próba, a $p \leq 0,001$.

Az izolált primer GC metszeteken a TH és P2Y₁₂R fehérjék kolokalizációs valószínűségét vizsgálva megállapítható, hogy a TH és a P2Y₁₂R közötti kolokalizációs érték magas volt a vad típusú egerekből izolált metszeteken ($0,75 \pm 0,12$); míg a KO állatoknál ennek értéke alacsonyabb ($0,4 \pm 0,05$) (5. és 6. ábra).



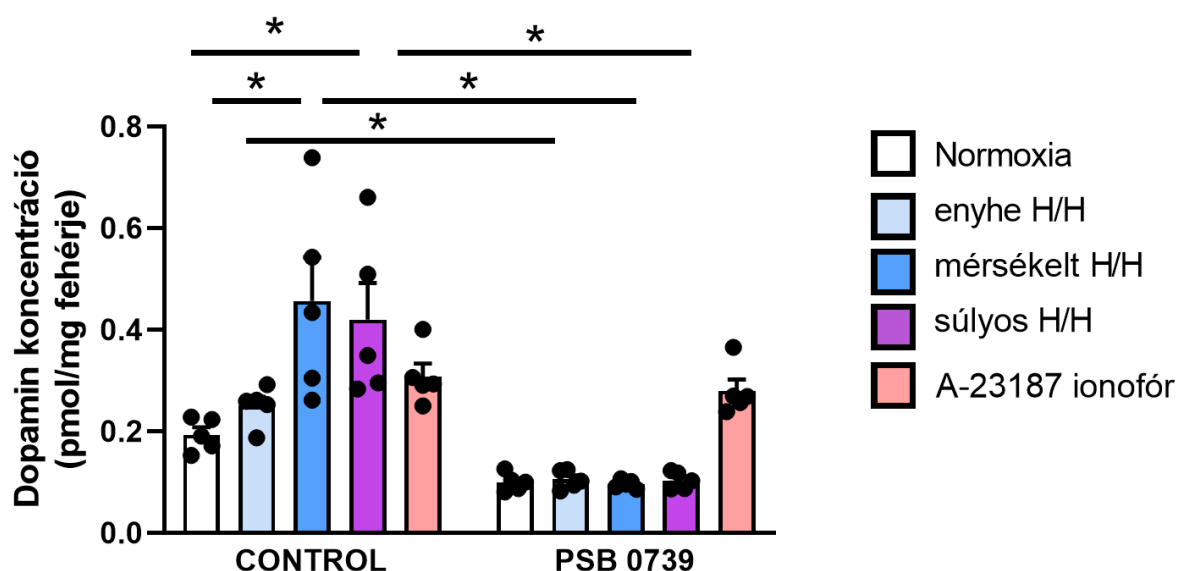
5.ábra. A kolokalizációs valószínűség ábrázolása citofluorimetriával. Kétdimenziós szórásdiagram szemlélteti a kolokalizációs értékek közötti különbséget a vad típusú (Control balra), és a knock-out (P2Y₁₂R-KO, jobbra) egerekből izolált glomus caroticum metszetekről.



6.ábra. Pearson-szerinti kolokalizációs valószínűség a TH és P2Y₁₂R lézerjelek között vad-típusú (Control) és knock-out (P2Y₁₂R-KO) egerekből izolált glomus caroticum metszeteken. Az oszlopdiagram a középérték $\pm$ standard hiba szórását ábrázolja, $n=9$; statisztika Student-féle párosítatlan kétmintás t -próba, a $p \leq 0,0001$.

Kísérleteinkben a felnőtt glomus caroticum fehérjeexpressziós mintázatának tanulmányozásával a P2Y₁₂R jelenlétét a kemoreceptorként működő glomus sejtekben kimutattuk, mely a további vizsgálatok alapjául szolgált. Ezt követően kutatócsoportunk a purinerg rendszer szerepére összpontosított az akut oxigénérzékelés és kemoreflex aktiválás szabályozásában.

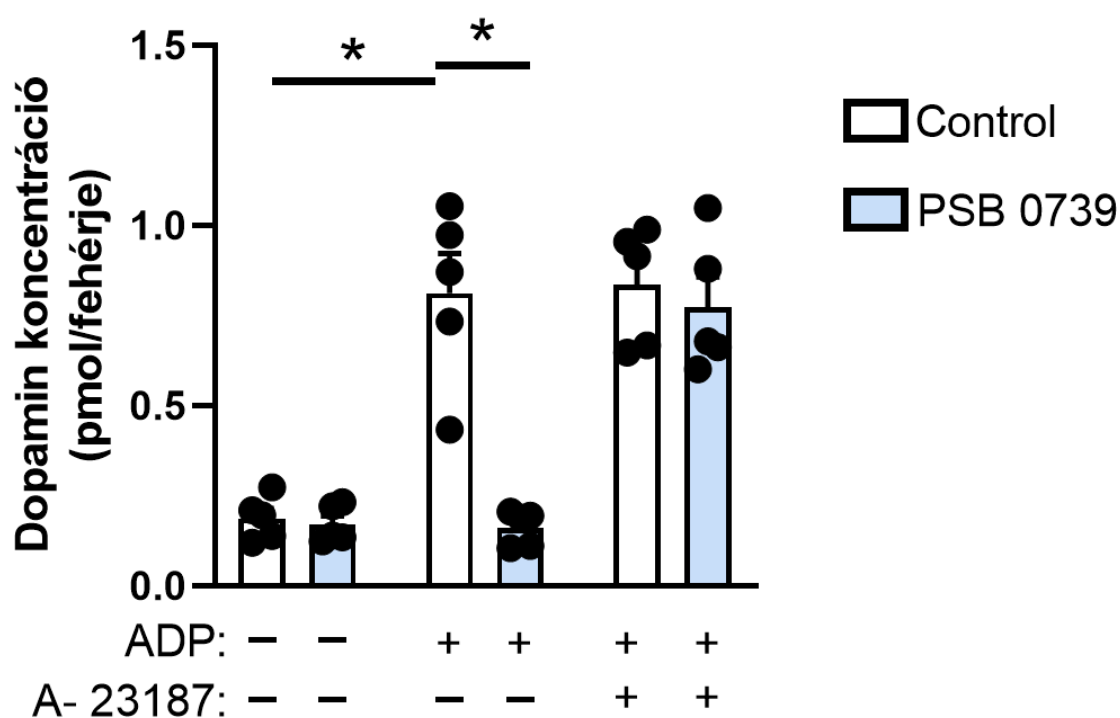
A glomus caroticum I-es típusú sejtjeit izoláltuk vad típusú kontroll egerekből, a sejteket tenyésztettük, majd lépcsőzetes hipoxiának és hiperkapniának kiteve (H/H) *in vitro* körülmények között tanulmányoztuk. Kezdeti eredményeink azt igazolták, hogy a tenyésztett glomus sejtek aktiválódtak a lépcsőzetes H/H alatt és neurotranszmitterek szabadultak fel. Dopamin felszabadulásához már mérsékelt H/H szint elegendő volt, a felszabadulás a specifikus P2Y₁₂R-gátló, a PSB 0739 jelenlétében pedig teljesen megszűnt (7. ábra). A P2Y₁₂R gátlása normoxiás körülmények között nem befolyásolta az extracelluláris dopamin koncentráció változásait, így megállapítható, hogy a receptorok konstitutívan nem aktiválódnak (7. ábra). Az A-23187 kalcium-ionofór beadása a maradék dopamint tartalmazó vezikulumok glomus sejtekből történő kibocsátását indukálta, bizonyítva, hogy a sejtek a lépcsőzetes H/H protokoll végén még életképesek voltak és dopamint tudtak felszabadítani ingerekre, megerősítve a P2Y₁₂R szerepét a H/H indukált dopamin felszabadulásban (7. ábra).



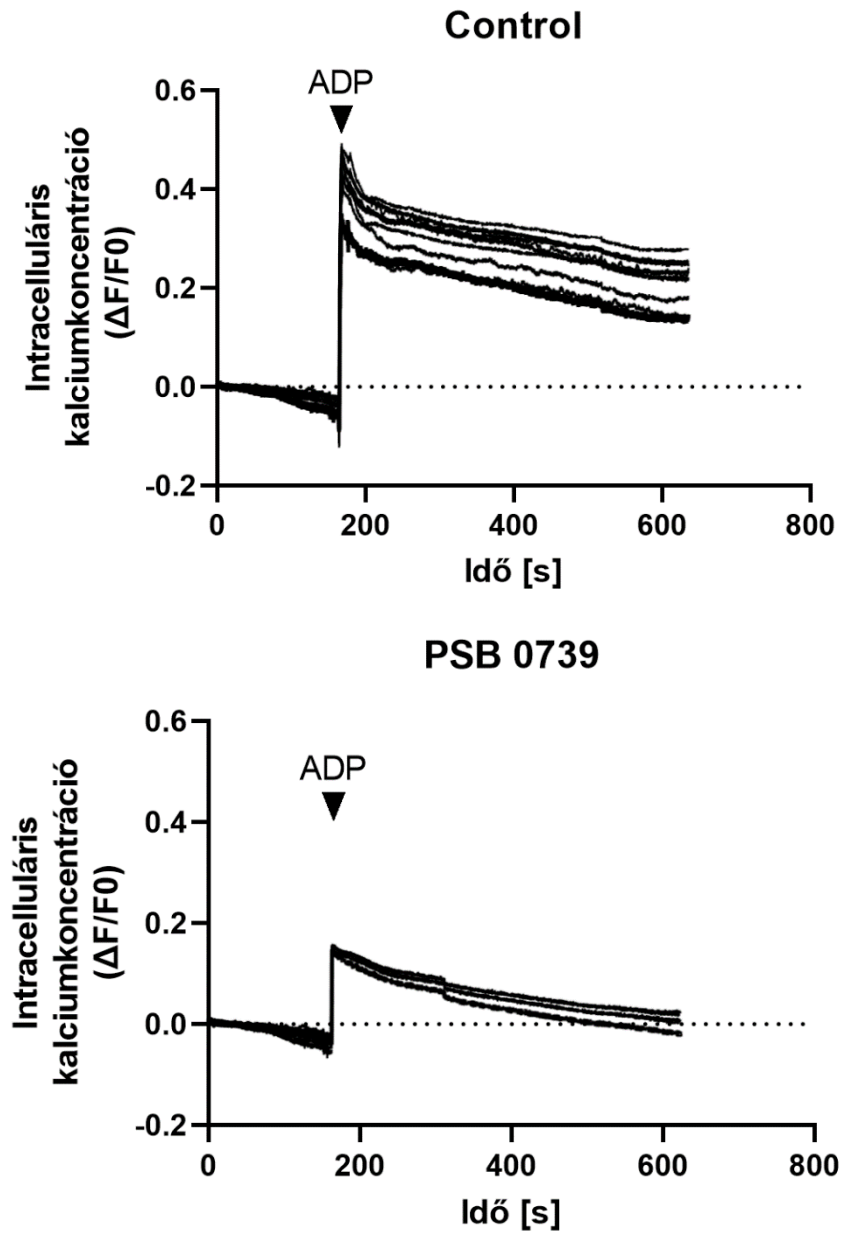
7.ábra. Az oszlopdiagramok a dopamin (n=5) felszabadulását mutatják vad típusú (Control) és P2Y₁₂R-gátolt (PSB 0739, 500 nM, 30 perc) primer glomus sejt sejt kultúrában. Az A-23187 kalcium-ionofórt (1 μ M, 1 perc) használtuk a reziduális neurotranszmitter exocitózisának értékelésére. Az oszlopdiagram a középérték $\pm$ standard hiba szórását ábrázolja, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$, statisztika kétutas ANOVA Bonferroni *post-hoc* teszttel.

A továbbiakban normoxiás körülmények között endogén ligandummal (ADP, 10 μ M, 5 perc) aktiváltuk a P2Y₁₂R-t ARL 67156 ektonukleotidáz inhibitor jelenlétében, mely dopamin felszabaduláshoz vezetett (8. ábra). Az ADP hatása a funkcionális P2Y₁₂R jelenlététől függött, mivel a receptor gátlása teljesen megszüntette az ADP által kiváltott dopamin felszabadulást, mely kalcium-ionofór adása esetén dopamin felszabadulásához vezetett receptorhiányos sejtekben (8. ábra).

A pontosabb intracelluláris mechanizmus felderítése érdekében megvizsgáltuk az ADP stimuláció hatását az intracelluláris kalcium koncentrációra, ahol az ADP kezelés kezdeti kalciumcsúcsot eredményezett, melyet egy tartós platófázis követett (9. ábra). A receptorblokádnál az intracelluláris kalciumszint jelentős csökkenését eredményezte a platófázis alatt (9. ábra), ami hozzájárulhat a receptorstimuláció során bekövetkező elégtelen dopaminfelszabaduláshoz.



8. ábra. Dopamin-felszabadulás mérése a sejtek felülúszójából ADP (10 μ M, 5 perc) és A-23187 (1 μ M, 1 perc) beadását követően vad típusú (Control) és a P2Y₁₂R-gátolt (PSB 0739, 500 nM, 30 perc) sejt kultúrákban (n=5). Az oszlopdiagram a középérték $\pm$ standard hiba szórását ábrázolja, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$, statisztika kétutas ANOVA Bonferroni *post-hoc* teszttel.



9.ábra. Reprezentatív grafikonok az intracelluláris kalciumkoncentráció változásáról ADP beadása után (10 μ M, 5 perc) vad típusú (Control) és P2Y₁₂R-gátolt sejtekben (PSB 0739, 500 nM, 30 perc). A szaggatott vonalak a stimuláció előtti nyugalmi intracelluláris kalciumszintet szemléltetik.

6. Diszkusszió

A test homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen folyamat a carotis test által a keringő vér paramétereinek felügyelete annak érdekében, hogy elegendő oxigént biztosítsanak a szöveteknek. Kísérletes eredményeink igazolták a vad-típusú állatok carotis test sejtjein a P2Y₁₂R jelenlétét, mely a receptor-deficiens állatokban nem volt jelen, alátámasztva ezzel antitest alapú vizsgálati módszerünk érzékenységét és pontosságát. Továbbá, az I-es típusú, a kemotranszdukcióban részt vevő sejtre jellemző enzim, a tirozin-hidroxiláz, illetve a P2Y₁₂R egyidejű festése nagymértékű átfedést mutatott vad-típusú állatok glomus caroticum szeletein, mely felveti a receptor szerepét a hipoxia által kiváltott kemoreflex aktiválásában. Ahhoz, hogy a P2Y₁₂R szerepét az akut oxigénérzékelés szabályozásában megértsük, monoamin és nukleotid neurotranszmitterek felszabadulását elemeztük súlyosbodó hipoxia és hiperkapnia során. Izolált primer sejt kultúrán végzett vizsgálataink igazolták a P2Y₁₂R szükségességét hipoxia és kombinált hipoxia és hiperkapnia során történő monoamin transzmitter felszabadulásában. Normoxiás környezetben történő receptor aktiváció az intracelluláris kalciumszint tartós növekedéséhez vezetett, mely elengedhetetlen előfeltétele a sejtben tárolt neurotranszmitterek vezikuláris exocitózisához, és az idegi aktivitás szabályozásához.

A klinikai gyakorlatban széleskörűen használt thrombocyta-aggregáció gátló, klopidoгрél (Plavix[®]) a periférián fellelhető P2Y₁₂R-t blokkolja. Eredményeinket figyelembe véve, miszerint a P2Y₁₂R jelen van a glomus sejteken, és mérsékelt hipoxia során is alapvető szerepet játszik a kemoreflex aktiválásban, felveti a lehetőséget, hogy a gyógyszeres kezelés akaratlanul is befolyásolhatja a perifériás kemoreflex érzékenységet, következésképpen a klinikai kezelés haszna csökkenhet krónikus légúti megbetegedések esetén.

7. Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretném megköszönni Dr. Iring Andrásnak fáradhatatlan munkáját és segítőkészségét. Rengeteg időt és energiát fordított rám, és neki köszönhetem azt, hogy elindulhatok a konferencián. Bármilyen kérdésemre azonnal válaszolt számos teendője ellenére is. Példát mutat nekem a mai napig azzal, hogy milyen kutatóvá szeretnék válni és remélem, hogy még lesz alkalmam sok éven át tanulni és fejlődni mellette.

Köszönet illeti Prof. Dr. Sperlág Beátát, aki lehetőséget biztosított nekem, hogy a Molekuláris Farmakológia Kutatócsoport TDK hallgatója lehessenek.

Köszönöm a Molekuláris Farmakológia Kutatócsoport minden tagjának, hogy bevezettek a laboratóriumi munkafolyamatok világába. Rengeteg tanáccsal, türelemmel és nem utolsósorban megértéssel és kedvességgel fordultak hozzám.

Köszönettel tartozom Dr. Vitéz-Cservenák Melindának, hogy szakértő véleménnyel és alaposággal segített dolgozatom elkészítésében, figyelemmel kísérte a munkámat. Számos kritikai meglátással és javaslattal támogatta dolgozatom elkészítését és emelte annak színvonalát.

Nem lehetek elég hálás a családomnak, amiért megteremtik a lehetőséget, hogy kibontakozhassak és támogatnak abban, amit igazán szeretnék csinálni. Folyamatosan érdeklődnek és lelkesítenek, bízva bennem.

Köszönöm kedves Fanni barátnőm minden egyes bátorító szavát, meglátását, amit tőle kaptam. Az egyik leginspirálóbb személy, akit ismerek, kitartása és akaratereje példaértékű számomra.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni barátomnak, Bálintnak odaadó lelkesítését, inspirálását, szeretetét. Ha nem hiszek magamban, ő akkor is biztat és büszke rám, amiért nem torpanok meg. Számos alkalommal nem csak érzelmi támasz számomra, hanem szakmai tudását kamatoztatva igyekszik bármikor segíteni nekem.

Hálásan köszönöm mindenkinek!

8. Irodalom

- Ardell, J. L., Andresen, M. C., Armour, J. A., Billman, G. E., Chen, P. S., Foreman, R. D., Herring, N., O'Leary, D. S., Sabbah, H. N., Schultz, H. D., Sunagawa, K., & Zucker, I. H. (2016). Translational neurocardiology: preclinical models and cardioneural integrative aspects. *J Physiol*, 594(14), 3877-3909.
<https://doi.org/10.1113/jp271869>
- Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S172-181.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706429>
- Császár, E., Lénárt, N., Cserép, C., Környei, Z., Fekete, R., Pósai, B., Balázsfői, D., Hangya, B., Schwarcz, A. D., Szabadits, E., Szöllősi, D., Szigeti, K., Máthé, D., West, B. L., Sviatkó, K., Brás, A. R., Mariani, J. C., Kliwer, A., Lenkei, Z., . . . Dénes, Á. (2022). Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. *J Exp Med*, 219(3).
<https://doi.org/10.1084/jem.20211071>
- Eberhardt, N., Bergero, G., Mazzocco Mariotta, Y. L., & Aoki, M. P. (2022). Purinergic modulation of the immune response to infections. *Purinergic Signalling*, 18(1), 93-113.
<https://doi.org/10.1007/s11302-021-09838-y>
- Gao, L., Ortega-Sáenz, P., García-Fernández, M., González-Rodríguez, P., Caballero-Eraso, C., & López-Barneo, J. (2014). Glucose sensing by carotid body glomus cells: potential implications in disease [Review]. *Frontiers in Physiology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00398>
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9(12), 1512-1519.
<https://doi.org/10.1038/nn1805>
- Horváth, G., Göllöncsér, F., Csölle, C., Király, K., Andó, R. D., Baranyi, M., Koványi, B., Máté, Z., Hoffmann, K., Algaier, I., Baqi, Y., Müller, C. E., Von Kügelgen, I., & Sperlágh, B. (2014). Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis*, 70, 162-178.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.011>
- Ichikawa, H. (2002). Innervation of the carotid body: Immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc Res Tech*, 59(3), 188-195.
<https://doi.org/10.1002/jemt.10193>

- Iring, A., Tóth, A., Baranyi, M., Otrokocsi, L., Módos, L. V., Gölöncsér, F., Varga, B., Hortobágyi, T., Bereczki, D., Dénes, Á., & Sperlág, B. (2022). The dualistic role of the purinergic P2Y₁₂-receptor in an in vivo model of Parkinson's disease: Signalling pathway and novel therapeutic targets. *Pharmacol Res*, 176, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106045>
- Iturriaga, R., Alcayaga, J., Chapleau, M. W., & Somers, V. K. (2021). Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev*, 101(3), 1177-1235. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2019>
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 201-212. <https://doi.org/10.1038/nri2938>
- Kato, K., Yokoyama, T., Yamaguchi-Yamada, M., & Yamamoto, Y. (2013). Short-term hypoxia transiently increases dopamine β -hydroxylase immunoreactivity in glomus cells of the rat carotid body. *J Histochem Cytochem*, 61(1), 55-62. <https://doi.org/10.1369/0022155412464639>
- Kauffmanstein, G., Bergmeier, W., Eckly, A., Ohlmann, P., Léon, C., Cazenave, J. P., Nieswandt, B., & Gachet, C. (2001). The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the α (IIb) β (3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett*, 505(2), 281-290. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02824-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02824-1)
- McGrath, J. C., & Lilley, E. (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol*, 172(13), 3189-3193. <https://doi.org/10.1111/bph.12955>
- Montoro, R. J., Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Alvarez de Toledo, G., & López-Barneo, J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol*, 107(1), 133-143. <https://doi.org/10.1085/jgp.107.1.133>
- Nurse, C. A., & Piskuric, N. A. (2013). Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin Cell Dev Biol*, 24(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.09.006>
- Ortega-Sáenz, P., Levitsky, K. L., Marcos-Almaraz, M. T., Bonilla-Henao, V., Pascual, A., & López-Barneo, J. (2010). Carotid body chemosensory responses in mice deficient of

- TASK channels. *J Gen Physiol*, 135(4), 379-392.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910302>
- Ortega-Sáenz, P., & López-Barneo, J. (2020). Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. *Annual Review of Physiology*, 82(1), 127-149.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114427>
- Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y., & Duncan, M. K. (2021). A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochem Biophys Rep*, 25, 100916.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100916>
- Shoja, M. M., Rai, R., Lachkar, S., Iboroma Akobo, S., Yilmaz, E., Loukas, M., Binello, E., Gorjaian, M., Griessenauer, C. J., Iwanaga, J., & Tubbs, R. S. (2019). The Carotid Sinus Nerve and the First English Translation of Hering's Original Research on this Nerve. *Cureus*, 11(1), e3898.
<https://doi.org/10.7759/cureus.3898>
- Sriram, K., & Insel, P. A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol*, 93(4), 251-258.
<https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>
- van Bilsen, M., Patel, H. C., Bauersachs, J., Böhm, M., Borggrefe, M., Brutsaert, D., Coats, A. J. S., de Boer, R. A., de Keulenaer, G. W., Filippatos, G. S., Floras, J., Grassi, G., Jankowska, E. A., Kornet, L., Lunde, I. G., Maack, C., Mahfoud, F., Pollesello, P., Ponikowski, P., . . . Lyon, A. R. (2017). The autonomic nervous system as a therapeutic target in heart failure: a scientific position statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*, 19(11), 1361-1378.
<https://doi.org/10.1002/ejhf.921>
- Varas, R., Alcayaga, J., & Iturriaga, R. (2003). ACh and ATP mediate excitatory transmission in cat carotid identified chemoreceptor units in vitro. *Brain Res*, 988(1-2), 154-163.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03366-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03366-3)
- von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50-61.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Wakai, J., Takayama, A., Yokoyama, T., Nakamuta, N., Kusakabe, T., & Yamamoto, Y. (2015). Immunohistochemical localization of dopamine D2 receptor in the rat carotid body. *Acta Histochem*, 117(8), 784-789.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.07.007>

Wyatt, C. N., & Buckler, K. J. (2004). The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol*, 556(Pt 1), 175-191.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058131>

Zhang, M., Vollmer, C., & Nurse, C. A. (2018). Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current I_h in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture. *The Journal of Physiology*, 596(15), 3101-3117.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1113/JP274743>

Zhou, T., Chien, M. S., Kaleem, S., & Matsunami, H. (2016). Single cell transcriptome analysis of mouse carotid body glomus cells. *J Physiol*, 594(15), 4225-4251.

<https://doi.org/10.1113/jp271936>