

Szumatriptán hatása a P2X7 purinerg receptor mediált jelátvitelre az amfetamin által kiváltott akut mánia egér modellben

36. OTDK Biológia Szekció

készítette:

MAÁ CZ FRU ZSINA

biológus MSc. 2. évfolyam

témavezetők:

PROF. DR. SPERLÁGH BEÁTA

kutatóprofesszor, igazgatóhelyettes, az MTA levelező tagja, ELKH KOKI, Molekuláris Farmakológia kutatócsoport

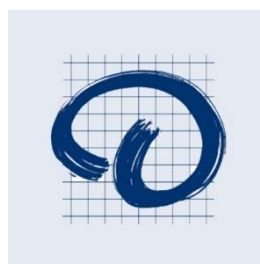
GÖLÖNCSÉR FLÓRA PhD

tudományos munkatárs, ELKH KOKI, Molekuláris Farmakológia kutatócsoport

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET

ELKH KÍSÉRLETI ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZET



Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Absztrakt	5
2. Bevezetés	6
3. Célkitűzések.....	10
4. Anyag és módszer	11
4.1. Állatok	11
4.2. Felhasznált anyagok	11
4.3. Kísérleti elrendezés	12
4.4. Viselkedésteszték	13
4.4.1. Nyílt tér teszt (OF)	13
4.4.2. Megemelt keresztpalló teszt (EPM)	13
4.5. C-fos immunhisztokémia	13
5. Eredmények.....	15
5.1. Nyílt tér teszt.....	15
5.2. Megemelt keresztpalló teszt.....	21
5.3. C-fos immunhisztokémia	23
6. Diskusszió.....	25
7. Összefoglalás.....	27
8. Szerzői hozzájárulás	28
9. Irodalomjegyzék.....	29
10. Köszönetnyilvánítás	33

Rövidítésjegyzék

ADO	adenozin
ADP	adenozin-difoszfát
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPH	amfetamin
AMPH 2.5	amfetamin kezelés (2,5 mg/kg)
ATP	adenozin-trifoszfát
BD	bipoláris zavar
DA	dopamin
DAT	dopamin-transzporter
EPM	megemelt keresztpalló teszt
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
5-HT	5-hidroxi-triptamin, szerotonin
5-HT₁₋₇	szerotonin receptor 1-7 család
5-HT_{1A/1B/1D/1E/1F}	az 5-HT ₁ család A,B,D,E,F tagok
[³H]	trícium
JNJ 20	JNJ47965567 kezelés (20 mg/kg)
MAO	mitokondriális monoamin-oxidáz
NE	noradrenalin
NET	noradrenalin-transzporter
NDS	normál számár szérum
OF	nyílt tér teszt
PB	foszfát-puffer
PFA	paraformaldehid
P2X	P2X receptorcsalád
P2X7R	P2X7 receptor
P2X7KO	P2X7 receptor génkiütött egér
Sal	sóoldatos kezelés
SEM	standard hibák, hibasávok
SERT	szerotonin-transzporter

SUMA 0.3	szumatriptán kezelés (0,3 mg/kg)
VMAT-2	vezikuláris monoamin transzporter
WT	vad típusú egér

1. Absztrakt

Az akut mánia a bipoláris zavar egyik fázisa. Tünetei közé tartozik többek között az emelkedett hangulat és az intenzív energia. A betegség megértése és új gyógyszercélpontok azonosítása fontos előrelépést jelenthet a kórkép ma még távolról sem megoldott kezelésében. A purinerg jelátvitel diszfunkciója szerepet játszik az akut mánia patofiziológiájában. A P2X7 receptor (P2X7R) befolyásolja a neurotranszmitterek felszabadulását és a mánia-szerű viselkedést egérmodellekben.

Kutatómunkám során a vad típusú (WT) és P2X7R génkiütött (P2X7KO) egerekben vizsgáltam az amfetamin által kiváltott hiperaktivitást nyílt tér (OF) és megemelt keresztpalló teszttel (EPM), valamint immunhisztokémiai módszerrel a c-fos expresszió változásait a striátumban.

A viselkedés tesztekben a szerotonin 5-HT_{1A/1B/1D} receptor agonista szumatriptán és a P2X7R antagonistája JNJ47965567 csökkentette az amfetamin (AMPH) által kiváltott hiperlokomóciót a WT egerekben, míg a szumatriptánnak nem volt hatása a P2X7KO egerekben. Ugyanakkor a szumatriptán és a JNJ47965567 együttes adása nem befolyásolta a WT egerek hiperaktivitását. A c-fos expresszió AMPH hatására a WT és a P2X7KO egerekben szignifikánsan emelkedett.

Eredményeim szerint, a szumatriptán gátolja a mánia-szerű viselkedést egerekben, és a P2X7R szerepet játszik annak moduláló hatásának közvetítésében, így a szumatriptán nem csak a migrén, hanem a mánia kezelésében is hatékony lehet.

2. Bevezetés

A bipoláris zavar (BD) egy súlyos hangulatzavar, amely becslések szerint a világ népességének 3-6 %-át érinti (Cotovio és Oliveira-Maia, 2022). Visszatérő depressziós, illetve mániás epizódok váltakozása jellemezi, viszonylag normális hangulatú időszakokkal elválasztva (Smith és mtsai., 2012). A bipoláris zavarban szenvedő betegek körülbelül 40%-ánál fordulnak elő vegyes epizódok, azaz a mániás állapot depressziós tünetekkel, vagy a depressziós állapot mániás tünetekkel együtt való megjelenése (Fagiolini és mtsai., 2015).

A mánia a hangulat, az alvás, az érzékelés és a viselkedés epizodikus zavara. Tünetei közé tartozik a hirtelen elragadtatott és/vagy ingerlékeny hangulat, a megnövekedett energia és önértékelés, az alváshiány, a megszokottnál több beszéd, a kuszálódó gondolatok megjelenése és a rossz ítélőképesség. A rendellenességnek sok alcsoportja ismert (ingerlékeny, eufórikus, pszichotikus, depressziós), azonban mindegyikben jellemző a pszichomotoros izgatottság, így feltételezik, hogy a megnövekedett energia, vagy "túlzott aktivitás" a mánia alapvető jellemzője (Young és mtsai., 2011). A betegséget előidézhetheti többek között vírusfertőzés, fejsérülés és neurológiai rendellenesség is.

A betegek jólétére gyakorolt igen jelentős hatások ellenére, a mánia diagnózisa és kezelése még mindig klinikai kihívást jelent, kialakulásának pontos okai pedig még nem ismertek (Cotovio és Oliveira-Maia, 2022).

A mánia patofiziológiájában szerepet játszhat többek között a szinaptikus neurotranszmisszió, vagy az agyi hálózatok (Cotovio és Oliveira-Maia, 2022), illetve a szinaptikus plaszticitás szabályozási zavara, amely háttérben az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) szintjének csökkenése állhat (Gubert és mtsai., 2016). További bizonyítékok utalnak arra, hogy megnövekedett a gyulladásos citokinek, az interleukin-6, a tumor-nekrózis-faktor-alfa és az interleukin-1-béta szintje, mind a plazmában, mind pedig a BD-ben szenvedő betegek frontális kérgében. Ezenkívül itt postmortem fokozott excitotoxicitást és fokozott oxidatív stresszt mutattak ki (Gubert és mtsai., 2016).

Már korábban leírták, hogy a mániás tünetek és a húgysav megemelkedett szintje között összefüggés figyelhető meg. A húgysavról később bebizonyosodott, hogy a purinerg rendszerhez sorolható, így e rendszernek szerepe lehet a mánia kialakulásában (Gubert és mtsai., 2020; Mondimore, 2005).

A purinerg jelátviteli rendszer fő közvetítő anyaga az extracelluláris adenzin-trifoszfát (ATP), amely különböző. a plazmamembránban elhelyezkedő purinerg receptorokon éri el fontos ingerületátvivő, neuromodulátori és trofikus hatását (Burnstock, 2007). A purinerg

receptorok képesek megkötni az ATP-t vagy bomlástermékeit, az adenzin-difoszfátot (ADP) és az adenzin-monofoszfátot (AMP), illetve akár az adenzint (ADO) is. A ligandumok alapján két különböző csoportba sorolhatóak a purinerg receptorok: a P1 (A) receptorok az ADO-t, míg a P2 nukleotid receptorok az ATP-t és annak hidrolizált formáit kötik meg (Burnstock és Kennedy, 1985)

A purinerg P2X7R egy ligandvezérelt, magas koncentrációjú ATP által aktivált kationcsatorna. Kifejeződik hematopoetikus eredetű vörösvértesteken, immunsejteken, mint például monocitákon, T-és B limfocitákon és perifériás makrofágokon. Ezen felül a központi és a perifériás idegrendszer sejtjein is leírták már, mint például asztrocitákon, preszinaptikus idegvégződéseken, dendritikus sejteken, oligodendrocitákon, mikrogliaon, ependimális sejteken, Schwann-sejteken a radiális glián és szatellita sejteken (Sorge és mtsai., 2012; Sperlág és Illes, 2014; Tewari és Seth, 2015). A P2X7 receptor egy nem-szelektív kation csatorna, tehát a Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionokat is átereszt. Az ATP vagy más agonisták rövid idejű vagy kis koncentrációban történő megkötése után a csatorna nyílik, így a K^+ ionok kiáramlanak a sejtől, míg ezzel ellentétesen a Na^+ és Ca^{2+} beáramlanak a sejtbe (Sperlág és mtsai., 2007). Aktiválódása központi szerepet játszik a gyulladás kialakulásában és fenntartásában, a sejtölés közvetítésében és a neurotranszmitterek felszabadulásában is. A P2X7R aktiválódása során főleg glutamát szabadul fel az extracelluláris térbe (Sperlág és Illes., 2014). Mivel a P2X receptorok viszonylag nagy Ca^{2+} áteresztőképességgel rendelkeznek, a transzmitterek felszabadulása közvetlenül a receptor ioncsatorna-komplexumon keresztül történik (Sperlág és mtsai., 2006). Többek közt kimutatták a P2X7R által közvetített glutamát, GABA és 5-HT felszabadulást patkány és egér hippocampusz szeletekből (Sperlág és mtsai., 2002; Sperlág és mtsai., 2006; Sperlág és Illes, 2014; Göllöncsér és mtsai., 2017).

A P2X7R szerepét többek között kutatócsoportunk is kimutatta már a major depresszió és a mánia patofiziológiájában is (Csölle és mtsai., 2013; Gubert és mtsai., 2020; Sperlág és mtsai., 2012). A P2X7R gátlása csökkentette a depressziós és mániás tüneteket a vizsgált állatmodellekben (Csölle és mtsai., 2013; Gubert és mtsai., 2016). Leírták továbbá, hogy P2X7R-t kódoló gén egy olyan lokuszon található, amely kapcsolatos a bipoláris zavarral és a specifikus polimorfizmusok összefüggésben lehetnek a betegséggel (Barden és mtsai., 2006).

A mániának több állatmodellje ismert. A környezeti modellekhez tartozik például az alvásmegvonás és a cirkadián ritmus megzavarásán alapuló kísérletek, vagy a rezidens-behatoló viszony modellezése. Genetikai modellek is ismertek, mint például a DAT génkiütött, vagy a Clock Δ 19 mutáns egereket használó kísérletek (Logan és McClung, 2016). A mánia egyik használt farmakológiai állatmodellje a d-amfetamin által kiváltott akut mánia modell

(Berggren és mtsai., 1978; Gubert és mtsai., 2016). Az AMPH egy pszichostimuláns szer, amely hosszú távú változásokat okoz a jutalmazási rendszerben.

Az amfetamin elsődleges molekuláris célpontjai a plazmamembrán transzporterek. Ezek általában úgy működnek, hogy extracelluláris monoaminokat vesznek fel az axonplazmába, hogy aktivitásukat megszüntessék. Az amfetamin kompetitív szubsztrátként viselkedik a noradrenalin (NE) transzporterén (NET), a dopamin (DA) transzporterén (DAT) és az 5-HT transzporterén (SERT) keresztül történő újrafelvételhez. Az AMPH és a neurotranszmitterek közötti keresztaffinitás hozzájárul az amfetamin specifikus neuronokon belüli tárolásához. Miután az AMPH plazmamembrán transzporterhez kötődött, megakadályozza a monoaminok transzporterhez való kötődését, belép az axonplazmába és a transzport irányát is visszafordítja. Ez főként a katekolamin neuronok esetében fordul elő, mivel az AMPH erősen megkülönbözteti a SERT-et, amelyhez sokkal kisebb affinitással kötődik, a DAT-hoz és a NET-hez képest. Az AMPH-k különösen a NET-hez kötődnek ötször-kilencszer nagyobb affinitással, mint a DAT-hoz. Ez a fő oka annak, hogy az AMPH-k a DA-nál erősebben szabadítják fel az NE-t, és sokkal jobban, mint az 5-HT-t. Ezzel a mechanizmussal megemelkedik a noradrenalin, a dopamin és a szerotonin szinaptikus szintje (Ferrucci és mtsai., 2019).

Valamint a szinaptikus vezikulákba belépve kölcsönhatásba lép a vezikuláris monoamin transzporterrel (VMAT-2) is. A vezikula savasodásának gátlásával és a pH szint emelésével eléri, hogy a monoaminok, amelyek gyenge bázisok semleges pH-n elveszítsék töltésüket, és diffundáljanak a vezikulamembránon keresztül. Így az amfetamin a monoaminok gyors felszabadulását idézi elő a citoplazmában (Ferrucci és mtsai., 2019; Heal és mtsai., 2013).

A harmadik molekuláris célpont, amely károsodik az amfetamin hatására, az a mitokondriumhoz kötött monoamin-oxidáz (MAO) enzim. Mindkét MAO-A/-B izoenzim oxidatív módon deaminálja a DA-t, NE-t és 5-HT-t (Ferrucci és mtsai., 2019).

Az AMPH hatására megemelkedik a dopamin felszabadulás a kortikomesolimbikus útvonalon keresztül, illetve módosul a dendrittüskék mérete, elhelyezkedése, a dendritfák morfológiája és így a neuronális plaszticitás is a *nucleus accumbens*-ben és a dorzális striátumban. Ezen elváltozások fizikai tüneteket is okozhatnak, mint például a hiperaktivitás az emberekben és a rágcsálókban is (Sequeira-Cordero és Brenes, 2021).

A szerotonerg neuronok az agytörzsi *raphe* magcsoportot alkotják, és axonjaik az egész agykérget beidegzik. Neurotranszmitterük a szerotonin (5-hidroxi-triptamin, 5-HT). Az 5-HT és az 5-HT receptorok fontos szerepet játszanak gyakorlatilag az összes agyi funkcióban, és receptorainak vizsgálata továbbra is új, orvosi szempontból fontos biológiai felismerésekkel szolgál. A szerotonerg rendszer diszregulációját összefüggésbe hozták már számos pszichiátriai

és neurológiai rendellenesség, mint a depresszió, skizofrénia, epilepszia, Parkinson-kór és a mánia kialakulásával is (Shiah és Yatham, 2000; Berger és mtsai., 2009; di Giovanni, 2013). Az 5-HT receptorokat hét családba soroljuk (5-HT₁-5-HT₇). Valamennyi 5-HT-receptor a hét transzmembrándoménos G-proteíncsatolt receptor (GPCR) szupercsaládba tartozik, kivéve az 5-HT₃ receptort, amely egy ligandumkapcsolt csatorna. Az 5-HT₁ receptor osztály öt receptor altípusból áll (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} és 5-HT_{1F}) (di Giovanni, 2013). Mániában 5-HT deficit van jelen és az is bizonyított, hogy az 5-HT neurotranszmisszió fokozása hangulatstabilizáló hatást fejt ki (Shiah és mtsai., 2000).

A P2X7R valószínűleg szabályozza a szerotonerg transzmissziót. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a P2X7KO állatokban megemelkedett az endogén 5-HT szint a hippocampusban (Csölle és mtsai., 2013). Továbbá, hogy a P2X7R-nak a genetikai delécióna és a farmakológiai gátlása is csökkentette az elektromos stimulációval kiváltott 5-HT felszabadulást a hippocampusban. Az elektromos stimulációval felszabadított hippocampális [³H]5-HT-t a 5-HT_{1A/1B/1D} receptor agonista, szumatriptán szabályozta, míg az 5-HT_{1A} parciális agonista buspiron hatástalan volt (Gölöncsér és mtsai., 2017).

Egy másik vizsgálatban a JNJ42253432, egy P2X7R antagonistája növelte az 5-HT extracelluláris szintjét in vivo a prefrontális kéregben, és gátolta az 5-HT transzportert (Lord és mtsai., 2014). Ezzel szemben egy másik tanulmány a gerincvelőben csökkent 5-HT szintet talált a P2X7 gátlására válaszul a rostrális ventromedialis medullában (Huang és mtsai., 2014). Továbbá akut stressz hatására az 5-HT szintje magasabb volt a P2X7KO egerek amygdalájában, összehasonlítva a WT társaikkal (Csölle és mtsai., 2013). Több adat is utal arra tehát, hogy a P2X7 receptornak szerepe lehet a szerotonerg rendszer modulációjában.

Dolgozatomban azt figyeltem meg, hogy a szumatriptán milyen viselkedésbeli változásokat indukál az AMPH által kiváltott akut mánia egérmodelljében, és ebben a P2X7R-nak milyen szerepe lehet. Ehhez P2X7KO egereket használtam és P2X7R antagonistája JNJ47965567 kezelést alkalmaztam.

3. Célkitűzések

Célom, a d-amfetamin által kiváltott mánia egérmodelljében megvizsgálni, hogy hogyan befolyásolja a szumatriptán és JNJ47965567 kezelés, valamint a P2X7R ablációja az egerek AMPH indukálta hiperaktivitását és a c-fos expresszióját a striátumban. Az alábbi kérdéseket vizsgáltam:

1. Hogyan befolyásolja a P2X7R genetikai gátlása a mániaszerű magatartást állatmodellünkben?
2. Megelőzhető-e az AMPH hatása a WT és P2X7KO egerek 5-HT_{1A/1B/1D} agonista szumatriptán előkezelésével?
3. Megelőzhető-e az AMPH hatása a WT egerek P2X7 szelektív antagonistája JNJ47965567 előkezelésével?
4. Hogyan befolyásolja az AMPH kezelés a c-fos expresszióját a striátumban és van-e különbség a két genotípus között?

4. Anyag és módszer

4.1. Állatok

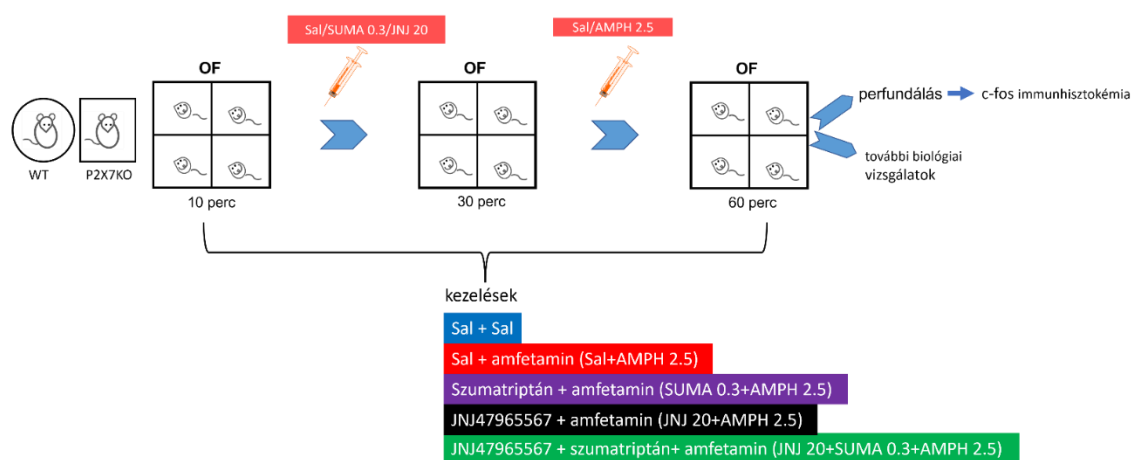
A viselkedéstesztetekhez 64 db C57/Bl6 háttérű P2X7R WT és P2X7KO hím egeret használtam, melyek a lentebb található ábra (1.ábra) szerinti kezeléseket kapták. Az állatok kora (40-70 nap) és tömege (~30 g) hasonló volt. Az egereket standard körülmények között tartottam az állattartó szobákban (páratartalom: $60\pm 10\%$, hőmérséklet: $23\pm 2^\circ\text{C}$), 12-12 órás fény-sötét ciklusban, ahol megfelelő mennyiségű és minőségű táplálék és víz folyamatosan a rendelkezésükre állt. A viselkedésteszteteket a fény ciklusban, 9-14 óra között végeztem minden kezelési csoport esetében 8-8 egérrel. A perfundálást és a c-fos immunhisztokémiát 5-5 állattal végeztem kezelési csoportonként. A vizsgálatok elvégzésekor végig figyelembe vettem és betartottam a laboratóriumi állatok tartásáról és felhasználásáról meghatározott alapelveket.

4.2. Felhasznált anyagok

A viselkedésvizsgálatokhoz a következő anyagokat használtam: fiziológiás sóoldat (NaCl, 0,9%), d-amfetamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), JNJ 47965567 (Tocris, Minneapolis, MN, USA) és oldószere, egy polianionos béta-ciklodextrin származék (Captisol, San Diego, CA, USA), szumatriptán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az egerek túlaltatásához izoflurán. A 4% paraformaldehid (PFA) fixáló oldatot transzkardiális perfúzióval juttattam be. Az immunhisztokémiához felhasznált anyagok: elsődleges antitest c-fos (tengerimalac, poliklonális, Synaptic Systems, Göttingen, Németország), másodlagos antitest Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és a Hoechst 33342 (Tocris, Minneapolis, MN, USA).

4.3. Kísérleti elrendezés

A spontán lokomotoros aktivitást és az általános magatartást nyílt tér tesztben vizsgáltam 10 percig. A habituációs szakasz után az egerek a csoportjuknak megfelelő előkezelést kapták: fiziológiás sóoldat (Sal), szumatriptán (SUMA 0.3, 0,3 mg/kg), JNJ47965567 (JNJ 20, 20 mg/kg) vagy az utolsó kettő keverékéből való intraperitoneális injekciót, majd 30 percre visszahelyeztem az egereket az arénába. Ennek letelte után az egereknek Sal vagy d-amfetamin (AMPH 2.5, 2,5 mg/kg) kezelést adtam, és 60 percet futtattam őket az arénában. A JNJ 20 esetében a nyílt tér tesztet megelőző napon reggel és 12 óra elteltével este is kezeltem az állatokat. Az emelt keresztpalló tesztet az amfetamin kezelés után 30 perccel végeztem. A viselkedésteszték után az egereket perfundáltam, majd c-fos immunhisztokémiai festést végeztem, vagy kipreparáltam az egerek hippocampusát, striátumát, prefrontális kérgét és vérplazmáját (1.ábra). Ezeket -80 fokon tárolom és a jövőben neurotranszmitterek felszabadulásának mértékét, gyulladásokeltő citokinek vagy BDNF (agyi növekedési faktor) szintjének elemzését tervezem további biológiai vizsgálatokkal.



1.ábra: Kísérleti elrendezés. Az egerek (WT és P2X7KO) először kezelés nélkül 10 percig futottak az arénában. Ez alól kivételt jelentettek a JNJ 20-szal kezelt csoportok, melyek előző nap reggel és este is kaptak kezelést. 10 perc elteltével történt meg az első kezelés: Sal, SUMA 0.3, JNJ 20, vagy az utolsó kettő keverékével. Ezután 30 percig futottak az állatok. Majd a második kezelés következett, amikor Sal vagy AMPH 2.5 injekciót kaptak, és az újabb kör futtatás során 60 percig figyeltem meg lokomóciójukat. 60 perc elteltével perfundáltam őket a c-fos immunhisztokémiához, vagy agyukat egyéb biológiai vizsgálatokra használtam fel.

4.4. Viselkedésteszt

4.4.1. Nyílt tér teszt (OF)

Az egereket egyenként egy 40 x 36 cm-es fehér műanyag aréna közepén helyeztem el. Az arénát két részre osztottam: perifériára és centrumra, mely utóbbi az egész terület 60%-át fedte le. A teszteket kamerával rögzítettem, és az egerek viselkedését a Noldus Ethovision XT 15 (Noldus, VA, USA) szoftver segítségével elemeztem. Ezután kaptam meg az egerek által megtett utat (cm), a sebességüket (cm/s), a centrumban eltöltött idejüket (%) és a keringő (cirkuláló) mozgásuk számát. Az arénákat minden kör teszt után 20%-os etanollal kitisztítottam.

4.4.2. Megemelt keresztpalló teszt (EPM)

30 perccel az utolsó Sal vagy AMPH 2.5 kezelés után az egereket egy emelt, 2 nyílt és 2 zárt karral rendelkező plusz-alakú arénában helyeztem 50 cm-re a földtől (a karok hossza és szélessége: 30 és 7 cm, centrum: 7x7 cm, a zárt kar magassága: 30 cm). A vizsgált egereket a megemelt keresztpalló centrumába helyeztem, úgy, hogy a nyílt kar felé nézzenek. A Noldus Ethovision XT 15 (Noldus, VA, USA) program segítségével 5 percen keresztül mértem az állatok által megtett út hosszát (cm), a sebességüket (cm/s), kitekintéseik gyakoriságát, illetve a nyílt és zárt karokban történt látogatásaik számát és az ott eltöltött idejüket (%). Az arénát minden kör teszt után 20%-os etanollal kitisztítottam.

4.5. C-fos immunhisztokémia

Annak érdekében, hogy látható legyen, az AMPH fokozza-e a c-fos kifejeződését a striátumban, immunfluoreszcens festést alkalmaztam. A OF után az egereket izofluránnal túlaltattam, ezt követően pedig transzkardiálisan 0,9 %-os NaCl oldattal, majd 4 %-os paraformaldehid (PFA) oldattal perfundáltam. A perfúziót követően az agyakat kivettem, és utólagosan még fixáltam 24 órán át 4 %-os PFA oldatban. Ezután az agyakat 0,1 M foszfát-puffer (PB) oldatba helyeztem át, és ezekből vibratóm (Leica Microsystems GmbH, Németország) segítségével 40 µm vastag koronális metszeteket készítettem a striátumot tartalmazó szegmensből. Minden negyedik metszetet 5 %-os normál szarvú szérummal (normal donkey serum, NDS), mely 0,3 %-os Triton X 100-at tartalmazott, 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoltam. Ezután 24 órán keresztül 4°C-on történő inkubáció

következett az SC52-es nyúl-anti-c-fos (1:500) elsődleges antitesttel, majd alapos pufferes mosást követően a metszeteket másodlagos fluoreszcensen antitesttel (Alexa Fluor 488, 1:500), a sejtmagokat pedig Hoechst 33342-vel (1:10000) festettem 2 órán át szobahőmérsékleten. Végül a metszeteket tárgylemezre felhúztam, és lefedtem a fluoreszcens festést védő folyadékkal és fedőlemezzel. A C2 konfokális mikroszkóppal (Nikon, Japán) 20x nagyítással képeket készítettem a striátumról, majd a c-fos pozitív, immunreaktív sejtmagokat megszámláltam minden egyes metszetben az ImageJ program segítségével.

4.6. Statisztika

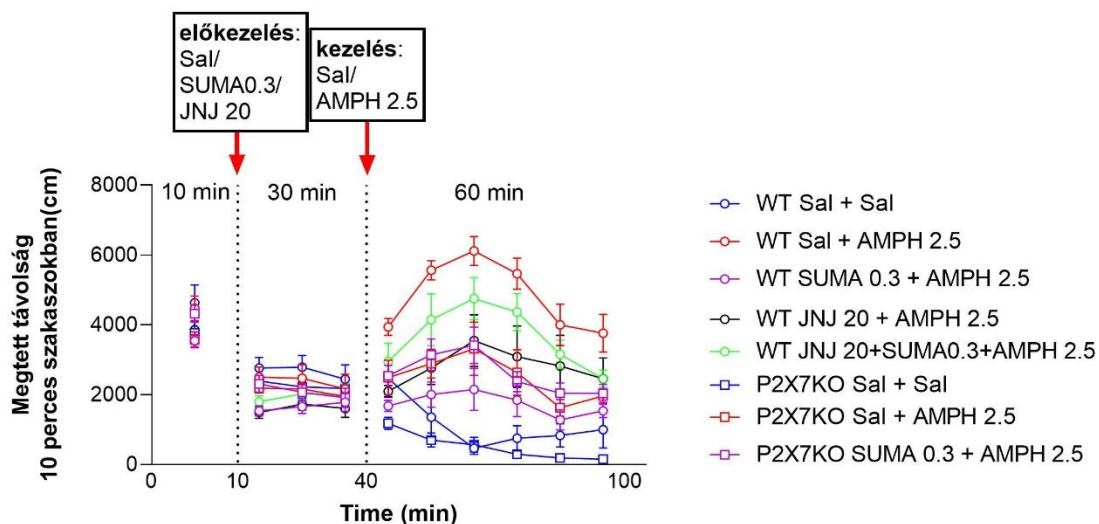
Statisztikai elemzést csak azoknál a csoportoknál végeztem, ahol a minimum elemszám $n=5$ volt. Az adatok normál eloszlását is ellenőriztem. Ezeket független változókként kezeltem. A kiugró elemeket is belevontam az adatok kiértékelésébe. Minden értéket átlag $\pm$ SEM (hibasávok) értékeként mutatok be. Az adatsoroktól függően a statisztikai elemzéseket egy, kétutas vagy ismételt méréses ANOVA-val és Tukey's *post hoc* teszttel végeztem a Graphpad Prism (San Diego, California) 8.0.2. verziójú és STATISTICA szoftverrel. *Post hoc* tesztek csak akkor végeztem, ha az F az ANOVA-ban elérte a $p<0,05$ értéket. A 0,05-nél kisebb P-értékeket a vizsgálat során végig statisztikailag szignifikánsnak tekintettem.

5. Eredmények

5.1. Nyílt tér teszt

Az egerek átlagos megtett távolsága 10 perces szakaszokban mérve a 100 perces munkamenet során

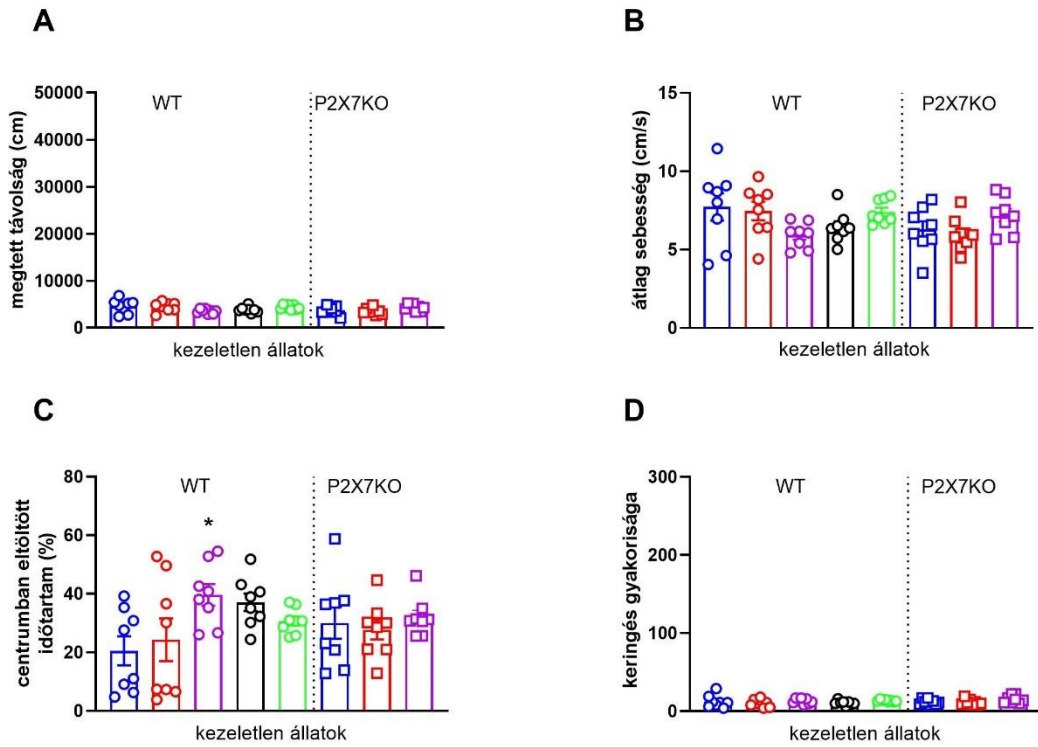
Míg az aktivitás mintázata számos tényezőtől függően változhat, az egerek általában nagyon aktívak, amikor először a nyílt térbe helyezik őket. A mi esetünkben is ez látszik a 2. ábrán a habituációs szakaszban (első 10 perc). Ez a magas aktivitási szint az idő múlásával lassan csökken, és 30-60 perc alatt eléri a viszonylag állandó állapotot. Ez a mi esetünkben is megfigyelhető a 30 perces szakasznál. Az szintén látszik, hogy az egerek lokomotoros aktivitását az előkezelések nem befolyásolták (Ismételt méréses ANOVA, WT és P2X7KO összehasonlítás: idő x genotípus x kezelés: $F_{[1,84]}=1,1853$, $p=0.3232$; kezelési csoportok összehasonlítása WT-ben: idő x kezelés: $F_{[1,70]}=0,8666$, $p=0.5487$). A 60 perces szakasznál az amfetamin által kiváltott hiperlokomóció a 10 perces szakaszokban is látszódik, mind a WT, mind a P2X7KO egerek esetében. Ugyanakkor az AMPH 2.5 hatását egyes előkezelések és a P2X7R génkiütés befolyásolták (Ismételt méréses ANOVA, WT és P2X7KO összehasonlítás: idő x genotípus x kezelés: $F_{[1,210]}=1,6969$, $p=0,0830$; kezelési csoportok összehasonlítása WT-ben: idő x kezelés: $F_{[1,175]}=3,8389$, $p=0,000001$) (2. ábra). A 10, 30, 60 perces időszakaszokat később részletesen tárgyalom.



2. ábra: Átlagos megtett távolság 10 perces szakaszokban mérve egy 100 perces munkamenet során a nyílt tér tesztben. Az egerek két megszakítással, amíg a két kezelés tartott, összesen 100 percet töltöttek az arénában. Az első kezelés 10 perc habituáció, míg a második 30 perc futtatás után történt. A 30 perces szakasznál nincs eltérés a mozgásban, majd a 60 perces szakaszban látszódik az AMPH 2.5 által kiváltott hiperlokomóció. Az adatokat cm-ben fejeztük ki, $n=8$ egér/csoport. A statisztikai analízis során ismételt méréses ANOVA-t és azt követő Tukey *post hoc* tesztet alkalmaztunk.

Naiv, még kezeletlen állatoknál a P2X7R hiánya nem befolyásolja az egerek spontán lokomóciós aktivitását

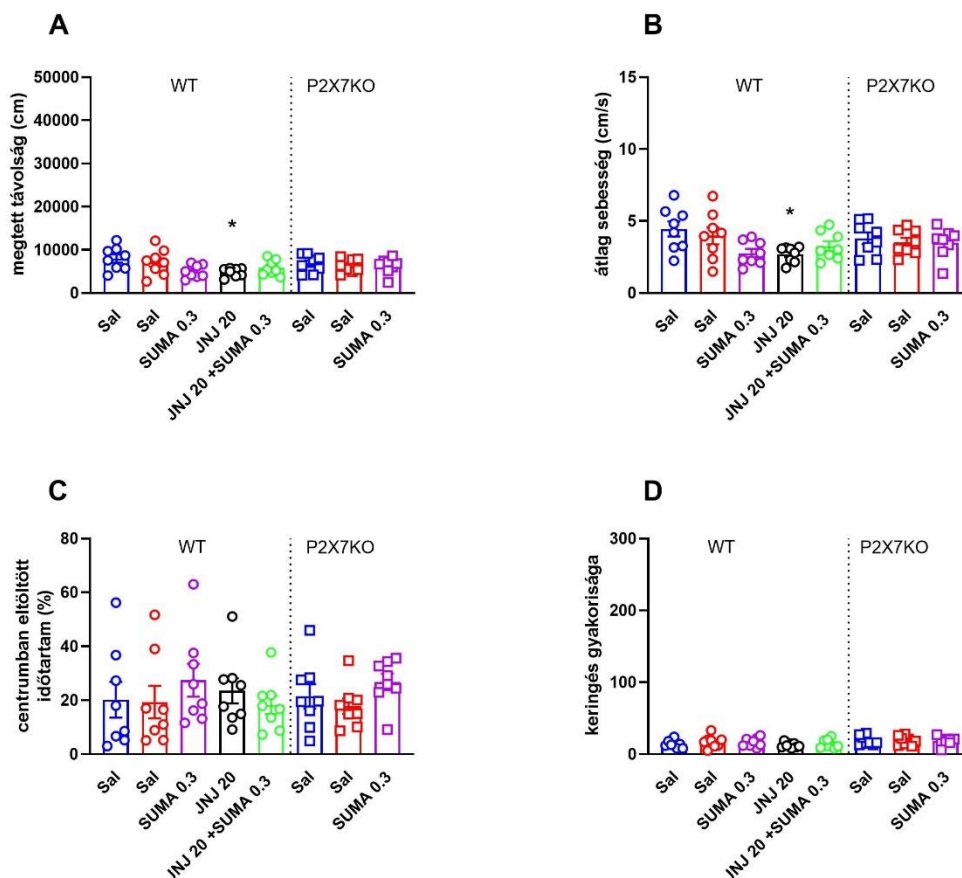
A JNJ 20 (○, ○) kezelések (előző nap reggel és este) kivételével a 10 perces, habituációs szakasz előtt az egerek nem kaptak előkezelést. A naiv WT és P2X7KO egerek által megtett távolságban, átlagsebességükben és a keringő (cirkuláló) mozgásuk gyakoriságában nem volt különbség (3. ábra, A, B, D). Azonban volt egy olyan csoport, amely bár előkezelést nem kapott (○), mégis szignifikánsan több időt töltött a centrumban, mint más csoportok ($*p<0.05$) (3. ábra, C). Az egerek centrumban eltöltött idejét számos egyéb faktor is befolyásolhatta, mint pl. a ketrec berendezése és pozíciója, társak, korábbi viselkedési tapasztalat, bánásmód, zajszt, stb. Továbbá, a JNJ 20 előkezelések nem befolyásolták az állatok viselkedését.



3. ábra: **A 10 perces szakasz a nyílt tér tesztben.** (A) Megtett távolság. (B) Átlagsebesség. (C) Centrumban eltöltött idő. (D) Keringés gyakorisága. Az adatok átlagait a standard hibákkal együtt (SEM) ábrázoltam (n=8 egér/csoport). Egyutas ANOVA-t a WT csoporton belül a kezelések összehasonlítására és kétutas ANOVA-t a WT és KO csoportok összehasonlítására, Tukey *post hoc* teszttel: *p<0.05 a Sal+ Sal, azonos genotípusban levő csoportokhoz képest.

A JNJ 20 előkezelés szignifikánsan csökkentette a WT állatok lokomóciós aktivitását a 30 perces szakaszban

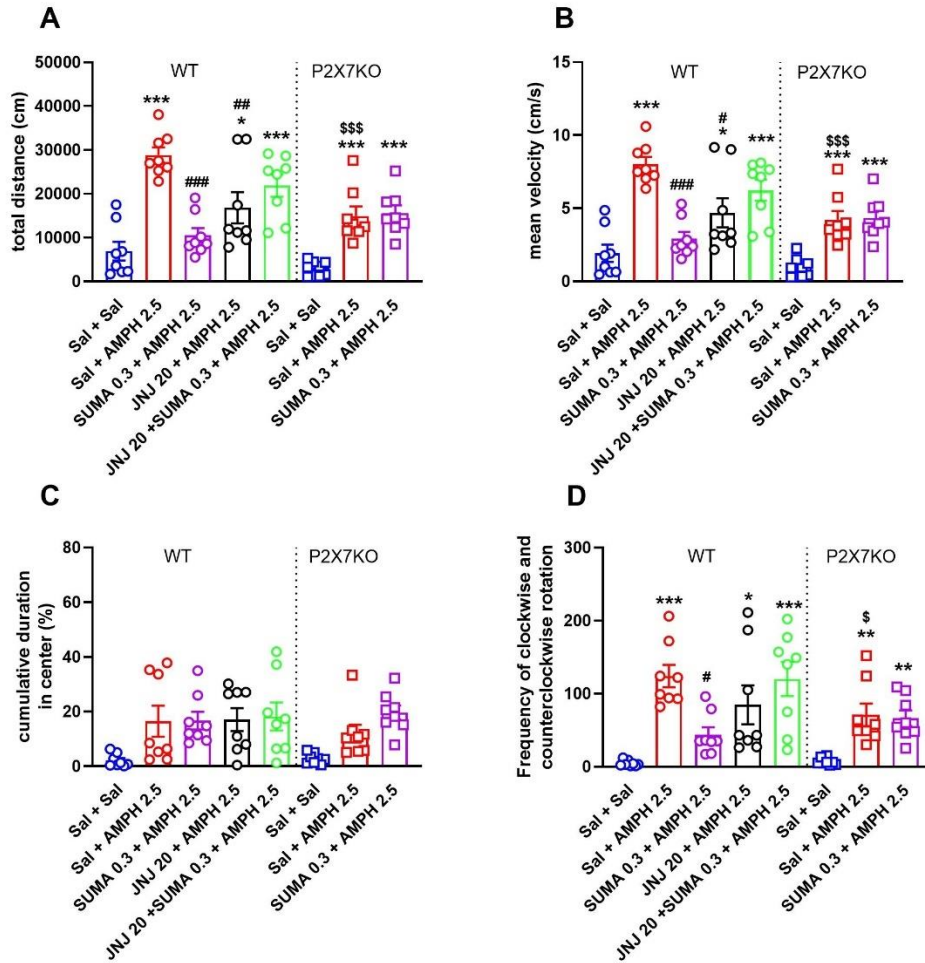
Az előkezelés során minden állat a csoportjának megfelelő szert kapta: Sal, SUMA 0.3, JNJ 20 és JNJ 20 + SUMA 0.3. Ezután 30 percet futottak az egerek az arénában. A JNJ 20 (○) előkezelés szignifikánsan csökkentette a WT (○) egerek által megtett távolságot és az átlagsebességüket a Sal (* $p < 0.05$) csoporthoz képest (4. ábra, A, B), de a centrumban eltöltött időt és a keringés gyakoriságát nem befolyásolta (4. ábra, C, D). A SUMA 0.3 (○, □) nem befolyásolta sem a WT sem a P2X7KO egerek aktivitás mintázatát. Érdekes módon a JNJ 20 és SUMA 0.3 együtt adva (○) szintén nem befolyásolta ezeket a mintázatokat.



4. ábra: **A 30 perces szakasz a nyílt tér tesztben.** A megtett távolság és az átlagsebesség szignifikánsan csökkent a JNJ 20-szal kezelt WT állatok esetében (○). A többi mért adatnál (centrumban eltöltött idő, keringés) nem volt különbség sem a WT sem a P2X7KO állatok esetében. (A) Megtett távolság. (B) Átlagsebesség. (C) Centrumban eltöltött idő. (D) Keringés gyakorisága. Az adatok átlagait a standard hibákkal együtt (SEM) ábrázoltuk (n=8 egér/csoport). Egyutas ANOVA-t a WT csoporton belül a kezelések összehasonlítására és kétutas ANOVA-t a WT és KO csoportok összehasonlítására, Tukey *post hoc* teszttel: * $p < 0.05$ a Sal+ Sal, azonos genotípusban levő csoportokhoz képest.

Az AMPH 2.5 által kiváltott hiperlokomóciót szignifikánsan csökkentette a SUMA 0.3 és a JNJ 20 kezelés is a WT egerekben, miközben az együttes adásuk már nem volt hatásos

A második kezelés során az állatok a csoportjuknak megfelelő szert kapták: Sal vagy AMPH 2.5. Majd 60 percet futottak az arénában. Az AMPH 2.5 (○,□) kezelés szignifikánsan növelte a WT és P2X7KO egerek motoros aktivitását a Sal+Sal csoporthoz képest (○,□) (* $p < 0.05$) (5. ábra A, B, D). Ugyanakkor a P2X7KO egerek (□) még így is kevésbé voltak aktívak, mint WT társaik (○) az AMPH 2.5 kezelés után ($^{\$}p < 0.05$) (5. ábra A, B, D). Mind a SUMA 0.3 (○), mind a JNJ 20 (○) kezelés szignifikánsan csökkentette az AMPH 2.5 által kiváltott hiperaktivitását a WT egerekben ($^{\#}p < 0.05$). Míg a SUMA 0.3-nak (□) ez a hatása nem volt megfigyelhető a P2X7KO állatokban (5. ábra A, B, D). Érdekes módon, a SUMA 0.3 és a JNJ 20 együttes adása sem védte ki az AMPH 2.5 hiperaktivitást okozó hatását a WT egerekben (○) (* $p < 0.05$) (5. ábra A, B, D).

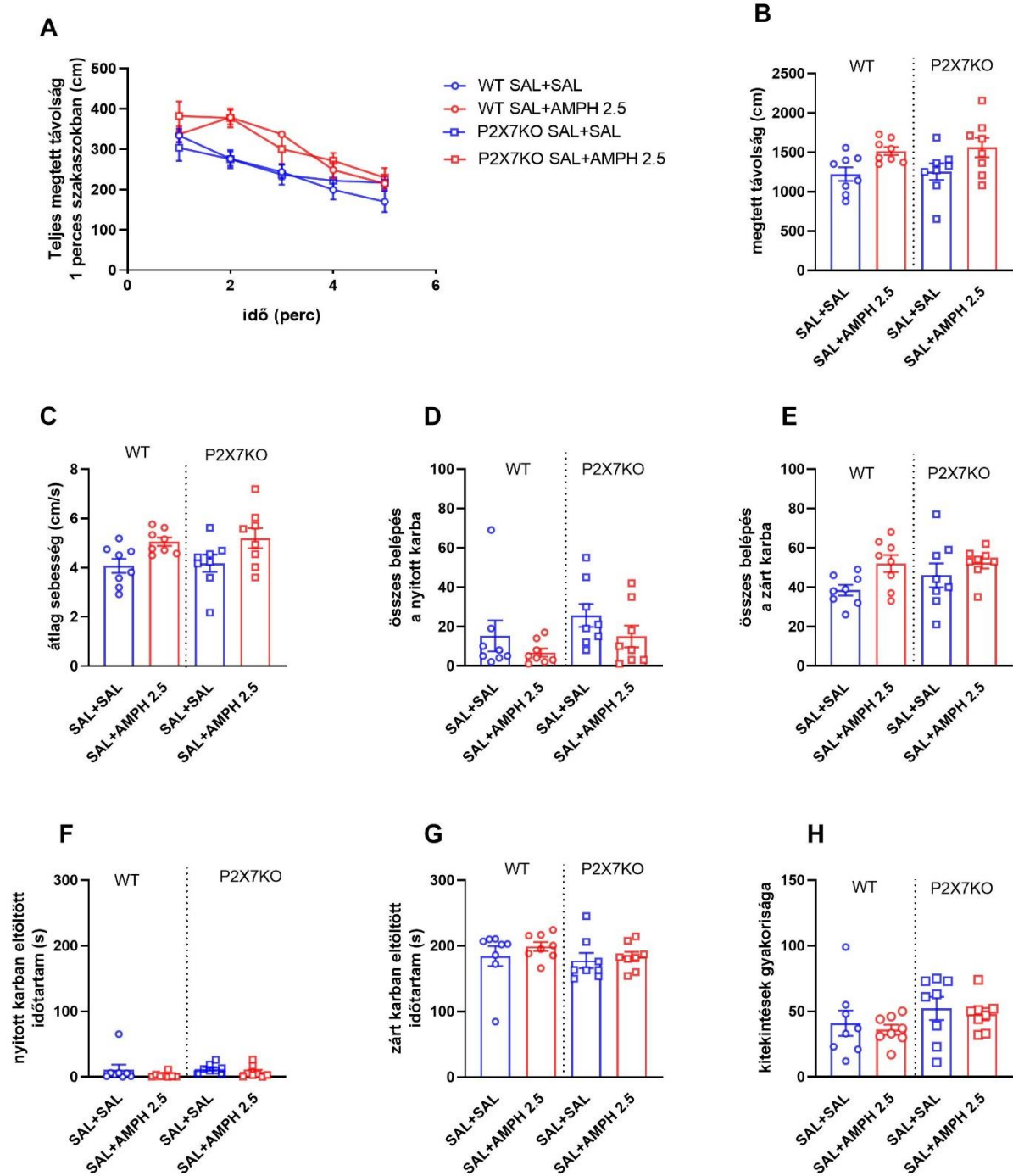


5.ábra: A 60 perces szakasz a nyílt tér tesztben. A megtett távolság, az átlag sebesség és a keringés gyakorisága szignifikánsan nőtt a WT (○) és a P2X7KO (□) állatoknál is AMPH 2.5 kezelés hatására. A SUMA 0.3 (◇) és a JNJ 20 (○) a WT egerekben csökkentette az AMPH indukálta hiperlokomóciót, míg a SUMA 0.3 nem volt hatással a P2X7KO egerekben (□). Ugyanakkor a SUMA 0.3 és JNJ 20 együttes adása (◇) nem védte ki az AMPH 2.5 hatását a WT egerekben. (A) Megtett távolság. (B) Átlagsebesség. (C) Centerben eltöltött idő. (D) Keringés gyakorisága. Az adatok átlagait a SEM-mel együtt ábrázoltuk (n=8 egér/csoport). Egyutas ANOVA-t a WT csoporton belül a kezelések összehasonlítására és kétutas ANOVA-t a WT és KO csoportok összehasonlítására, Tukey *post hoc* teszttel: *p<0.05 Sal+ Sal, azonos genotípusban levő csoportokhoz képest, #p<0.05 a Sal+AMPH 2.5, azonos genotípusban levő csoporthoz képest, \$\$\$p<0.001 az azonos kezelési csoportba tartozó WT egerekhez képest.

5.2. Megemelt keresztpalló teszt

Az AMPH 2.5 kezelésnek nem volt hatása a WT és P2X7KO egerek felfedező viselkedésére

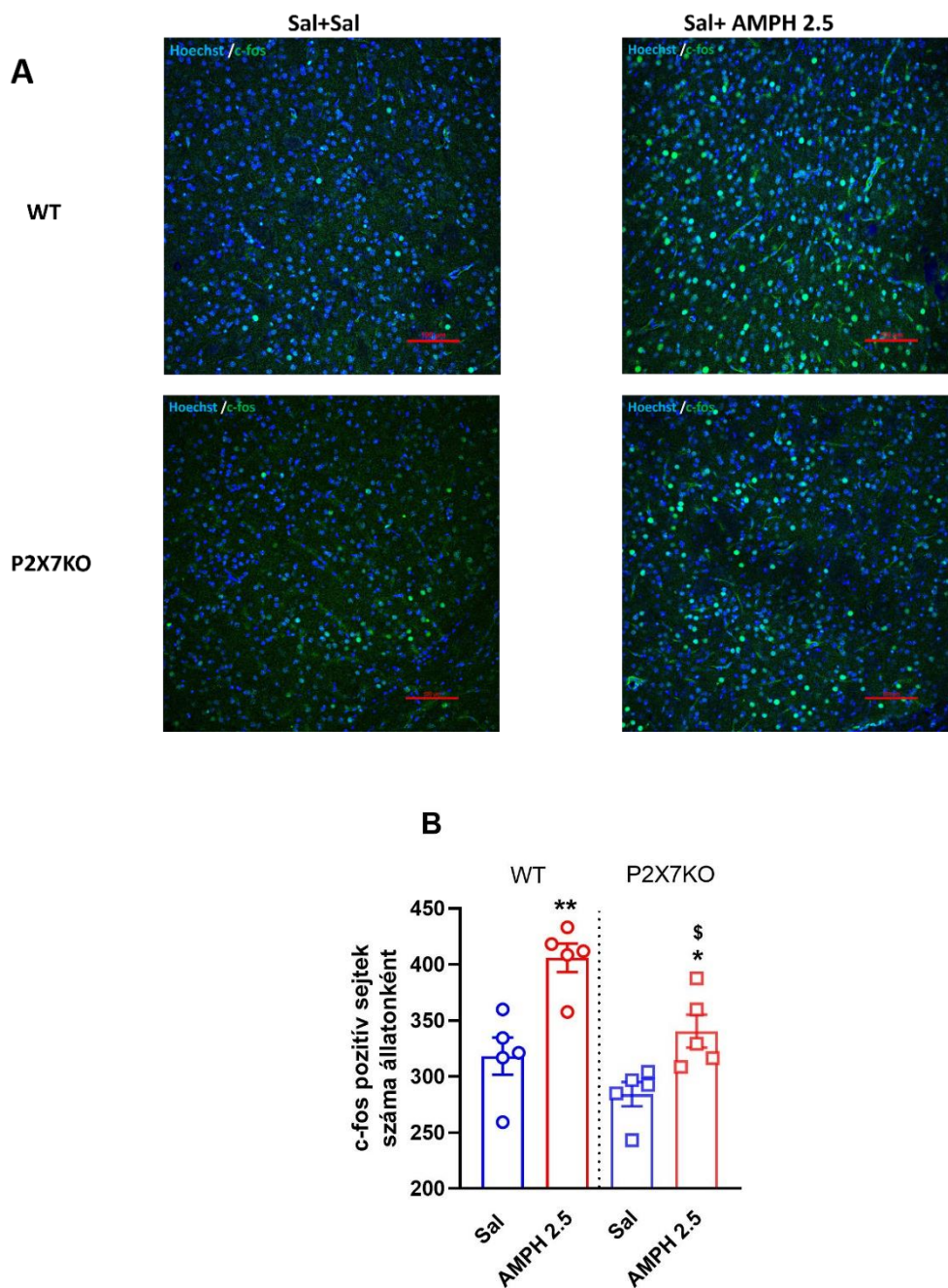
A megemelt keresztpalló tesztet csak a Sal+Sal és a Sal+AMPH 2.5 csoportoknál végeztem el. Az AMPH 2.5 nem volt hatással az egerek lokomotoros aktivitására (6. ábra A, B, C). Azonban az egerek lokomóciója az idő előrehaladtával egyre csökkent (Ismételt méréses ANOVA, Idő hatás: $F_{[4, 112]}=56,1862$, $p=0,0000001$). Továbbá az amfetamin kezelés az egerek felfedező/kockázavállaló viselkedésére sem volt hatással. Nem volt szignifikáns különbség az egerek nyitott és zárt karban eltöltött időtartamában, a nyitott és zárt karokba történő belépések számában és a kitekintések gyakoriságában sem (6. ábra D, E, F, G, H).



6.ábra: Az AMPH 2.5 hatásának vizsgálata az EPM-ben. (A) Az egerek által megtett távolság 1 perces szakaszokban, amit az AMPH 2.5 kezelés nem befolyásolt sem a WT, sem a P2X7KO egerekben. Az állatok lokomóciója minden csoportnál egyre csökkent. Sem a WT, sem a P2X7KO állatok esetében sem volt szignifikáns különbség a megtett távolság (B), az átlag sebesség (C), a nyitott (D) és a zárt (E) karba történő összes belépést, a nyitott (F) és a zárt (G) karban eltöltött időt és a kitekintések gyakoriságát (H) tekintve a Sal+Sal (○, □) és az Sal+AMPH 2.5 (○, □) egerek között. Az értékek csoportonként n=8 egér átlaga ± SEM. Ismételt mérések és kétutas ANOVA-t a WT és KO csoportok összehasonlítására, Tukey *post hoc* teszttel használtam.

5.3. C-fos immunhisztokémia

Az AMPH kezelés hatására történő c-fos expresszió változásait a striatumban vizsgáltam. A nyílt tér tesztet követően az állatok egy részét perfundáltam és agyaikat lemetszettem, majd ezeken c-fos immunhisztokémiát végeztem el. A Sal+Sal és a Sal+AMPH 2.5 csoportokból festettem meg metszeteket vad, illetve P2X7KO egerekből. Eredményeim azt mutatják, hogy a WT és a P2X7KO egerek striátumában a c-fos pozitív sejtek száma szignifikánsan növekedett az AMPH kezelés hatására a Sal+Sal csoportokhoz képest (* $p < 0.05$). Ez az érték alacsonyabb volt a P2X7KO-ban a WT egerekben ($^{\$}p < 0.05$) (7.ábra, A, B).



7.ábra: C-fos expresszió változása a striátumban amfetamin kezelés hatására WT és P2X7KO állatoknál. AMPH 2.5 kezelés hatására a c-fos pozitív sejtek száma emelkedett a WT és a P2X7KO egerkben egyaránt. (A) A c-fos pozitív sejtmagok ábrázolása a kezelési csoportokban. Sejtmagok kékkel jelöltek (Hoechst), a c-fos pozitív sejtek pedig zölddel. (B) A c-fos pozitív sejtek száma a Sal+Sal (○, □) és a Sal+AMPH 2.5 (○, □) kezelést követően aWT és P2X7KO egerekben (n=5 egér/csoport). Skála: 100 μm. Kétutas ANOVA-t a kezelések és a genotípus összehasonlítására, Tukey *post hoc* teszttel használtam: * $p < 0.05$ Sal+Sal, azonos genotípusban levő csoportokhoz képest, \$ $p < 0.05$ az azonos kezelési csoportba tartozó WT egerekhez képest. A képeket az ImageJ programban elemeztem, és a háttérrel is itt vontam ki. A c-fos intenzitás mérésére az érdeklődésre számot tartó régiót rajzoltam ki (47500 μm²), és itt számoltam a sejtmagokat. Egerenként 6 metszetet számoltam le mindkét oldali striátumról.

6. Diszkusszió

Több tanulmány kimutatta már a purinerg jelátviteli rendszer szerepét a bipoláris zavar patofiziológiájában, azon belül is a P2X7R gátlása ígéretes terápiás jelöltnek bizonyult a mánia preklinikai modelljeiben (Csölle és mtsai., 2013; Gubert és mtsai., 2020; Sperlággh és mtsai., 2012). Dolgozatomban a szerotonin 5-HT_{1A/1B/1D} receptorok szerepét vizsgáltam a mánia AMPH által kiváltott egérmodelljében, illetve annak P2X7 általi modulációját. Ehhez 5-HT_{1A/1B/1D} agonista szumatriptánt, P2X7R szelektív antagonistá JNJ47965567-t és P2X7KO egereket használtam. Bemutattam, hogy a szumatriptán antimániás hatásának eléréséhez a P2X7 receptor jelenlétére van szükség.

A d-amfetamin által kiváltott hiperaktív mozgás még mindig a legelfogadottabb és legszélesebb körben használt állatmodell a mániás viselkedés utánzására, segítve a mánia molekuláris alapjainak vizsgálatát (Gonçalves és mtsai., 2022; Gubert és mtsai., 2016). Kísérleteimben az akut AMPH kezelés hiperlokomóciót váltott ki a WT és P2X7KO egerekben egyaránt a OF-ben, azonban ez az emelkedés a P2X7KO egerekben kisebb volt, mint WT társaikban (2. és 5. ábra). A P2X7R gátlása a JNJ47965567 antagonistával szintén gyengítette az AMPH által kiváltott hiperaktivitást a WT egerekben. Ez az eredmény megerősíti azokat a korábbi eredményeket, amelyek a P2X7R gátló hatását mutatták ki akut és szubkrónikus AMPH indukált hiperaktivás modellben (Bhattacharya és mtsai., 2013; Csölle és mtsai., 2013; Gubert és mtsai., 2016). Lehetséges, hogy az AMPH lokális ATP felszabadulást idéz elő az agyban a túlzott ingerlékenység következtében, és P2X7 antagonistával szerzett adataink is azt sugallhatják, hogy ez a P2X7R aktivációjához vezet az AMPH szenzitizációs fázisában.

Érdekes módon a szumatriptán szintén csökkentette az AMPH által kiváltott hiperlokomóciót a WT egerekben, de nem volt hatása a P2X7KO egerekben. Valamint, ha gátoltuk a P2X7R-okat, akkor a szumatriptán szintén hatástalannak bizonyult az AMPH által kiváltott hiperaktivitás enyhítésében a WT egerekben (2. és 5. ábra). Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a szumatriptán hatásának közvetítéséhez szükség van a P2X7 receptorok jelenlétére. Sajnos nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat az 5-HT_{1A/1B/1D} receptorok és a P2X7R kapcsolatáról. Ezért a jövőben még szeretném pontosan feltárni ezt a szabályozási mechanizmust.

Az AMPH szorongáskeltő hatása a megemelt keresztpalló tesztben erősen ellentmondásos. A tesztből származó adataim nem mutattak semmilyen robusztus változást, amelyet az AMPH alkalmazása indukált (nem volt hatással a belépésekre és a nyitott /zárt karokban eltöltött időre), ellenben a OF-fel. Ez összhangban van a közelmúltban végzett tanulmányokkal (Pometlová és

mtsai., 2016; Šlamberová és mtsai., 2015). Az OF és az EPM eredményei közötti eltérések magyarázata az AMPH motoros aktivitásra gyakorolt hatása tekintetében a kísérleti elrendezésben rejlik, mivel e két teszt között minőségi környezeti különbségek vannak. Valójában, míg az OF-ben az aréna lehet semleges környezet, addig a megemelt keresztpalló teszt apparátusa két nyitott kart tartalmaz, amelyek egy olyan állapotot szimulálnak, amelyet a rágcsálók természetesen elkerülnek, így az a készülék nagyobb szorongást válthat ki a rágcsálókban, mint a nyílt aréna. Így az akut AMPH szorongáskeltő hatása elfedheti hiperlokomotoros hatását (Sanday és mtsai., 2013).

A c-fos egy azonnali korai gén, amely a neuronokban expresszálódik, miután különféle ingerek aktiválják, és így széles körben használják általános markerként az agy funkcionális útvonalainak feltérképezéséhez. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy AMPH kezelés hatására a c-fos expresszió emelkedik a striátumban (Frey és mtsai., 2006; Uslaner és mtsai., 2001). Munkám során hasonló tendenciát lehetett megfigyelni a c-fos expresszió változásban az AMPH kezelés hatására a WT és P2X7KO egerekben. Érdekes módon a P2X7KO állatokban ez az emelkedés alacsonyabb volt, mint a WT egerekben. Ez az eredmény egybevág az OF-ben kapott eredményeinkkel, ahol az AMPH által kiváltott hiperaktivitás kisebb mértékű volt a P2X7KO egerekben, mint a WT-ben. Eredményeimből még sajnos hiányoznak további kezelési csoportok. Ezért a jövőben célok ezek pótlása.

A BD olyan pszichiátriai rendellenesség, amely nőket és férfiakat egyaránt érint. A BD prevalenciája az általános populációban az elmúlt évtizedben nőtt, azonban kevés epidemiológiai tanulmány áll rendelkezésre a BD nemi megoszlására vonatkozóan, így megválaszolatlanul marad a kérdés, hogy a BD diagnózisok gyakran jelentett növekedése nemspecifikus lehet-e (Dell’Osso és mtsai., 2021).

Mivel azonban a BD lefolyása eltérhet a két nem között, így a jövőbeni célok megvizsgálni a P2X7R részvételét a BD modellekben a nőstény egerek esetében is.

A vizsgálat korlátai

Az eredmények egy még folyamatban lévő kutatásból származnak, ezért egyes kezelési csoportok még hiányoznak. Ezért egyutas ANOVA-t a WT csoporton belül a kezelések összehasonlítására és kétutas ANOVA-t a WT és KO csoportok összehasonlítására használtam.

7. Összefoglalás

Az akut mánia a bipoláris zavar egyik fázisa. Tünetei közé tartozik az emelkedett hangulat és az intenzív energia. A betegek jólétére gyakorolt igen jelentős hatások ellenére, a mánia diagnózisa és kezelése még mindig klinikai kihívást jelent, kialakulásának pontos okai pedig még nem ismertek az orvostudomány számára. A betegség megértése, és esetleges új gyógyszer-célpontok azonosítása kulcsfontosságú lehet a jövőre nézve.

Többek közt kutatócsoportunk is kimutatta már, hogy a purinerg jelátvitel diszfunkciója szerepet játszik az akut mánia patofiziológiájában. A P2X7 receptor egy ATP által aktivált, nem-szelektív kationcsatorna, mely befolyásolja a neurotranszmitterek felszabadulását és a mánia-szerű viselkedést egérmodellekben.

Dolgozatomban a szerotonin 5-HT_{1A/1B/1D} receptorok szerepét vizsgáltam a mánia AMPH által kiváltott egérmmodelljében, illetve annak P2X7 általi szabályozását.

Kutatómunkám során a d-amfetamin által kiváltott akut mánia egér modellben vizsgáltam az általam adott szerek (szumatriptán és JNJ47965567) hatását. Illetve végeztem megemelt keresztpalló tesztet az amfetamin szorongásoldó hatásának vizsgálatához és c-fos immunhisztokémiát is, hogy a striátumban vizsgáljak a c-fos expresszióbeli változásait amfetamin kezelés hatására.

Kimutattam, hogy a nyílt tér tesztben az amfetamin kezelés WT egerekben jelentősebb hiperlokomóciót váltott ki, mint P2X7KO társaikban. A szumatriptán és a P2X7R antagonistája JNJ47965567 a WT egerekben csökkentette az amfetamin-indukálta hiperlokomóciót, míg a szumatriptán nem volt hatással a P2X7KO egerekben. Ugyanakkor a szumatriptán és JNJ47965567 együttes adása nem befolyásolta a WT egerek hiperaktivitását. A megemelt keresztpalló tesztben az amfetamin kezelés nem volt hatással az egerek lokomotoros aktivitására, illetve felfedező/kockázatvállaló viselkedésükre sem. A c-fos immunhisztokémia során megállapítottam, hogy az amfetamin kezelés szignifikánsan növeli a c-fos expressziót a striátumban a WT állatok esetében, azonban P2X7KO állatoknál nem tapasztaltam szignifikáns különbséget a c-fos pozitív sejtek számában.

Eredményeim arra utalnak, hogy a szumatriptán gátolja a mánia-szerű viselkedést egerekben és antimániás hatásának eléréséhez a P2X7 receptor jelenlétére van szükség. Így a szumatriptán nem csak a migrén, hanem a mánia gyógyításában is hatásos lehet.

8. Szerzői hozzájárulás

A dolgozatban ismertetett technikák mindegyikét elsajátítottam, a jelenlegi vizsgálat lépéseit (viselkedésvizsgálatok, perfúzió, vibratómos metszés, immunhisztokémia, konfokális mikroszkópia) segítséggel, vagy én végeztem el.

1. A nyílt tér tesztet, az ahhoz szükséges kezeléseket és annak eredményeinek kiértékelését én végeztem el, a következő eredmények születtek: a szumatriptán és a JNJ47965567 a WT egerekben csökkentette az amfetamin-indukálta hiperlokomóciót, míg a szumatriptán nem volt hatással a P2X7KO egerekben, ugyanakkor a szumatriptán és JNJ47965567 együttes adása nem befolyásolta a WT egerek hiperaktivitását.
2. A megemelt keresztpalló tesztet és annak elemzését segítséggel én végeztem el a következő eredménnyel: egyik csoportnál sem volt szignifikáns különbség a vizsgált tényezőkben.
3. A c-fos immunhisztokémiához szükséges perfúziót, vibratómos metszést, és immunfluoreszcens festést én végeztem el, a striátumról készült konfokális mikroszkópos felvételek létrehozásában kaptam segítséget, a mikroszkópos technikát elsajátítottam és a következő eredményt kaptam: a c-fos expresszió amfetamin hatására a WT és P2X7KO egerekben is megemelkedett.

9. Irodalomjegyzék

- Barden N, Harvey M, Gagné B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, Labbé M, Villeneuve A, Rochette D, Bordeleau L, Stadler H, Holsboer F, Müller-Myhsok B. Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006; 141B(4):374-82. doi: 10.1002/ajmg.b.30303.
- Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009; 60:355-66. doi: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
- Berggren U, Tallstedt L, Ahlenius S, Engel J. The effect of lithium on amphetamine-induced locomotor stimulation. *Psychopharmacology (Berl).* 1978; 59(1):41-5. doi: 10.1007/BF00428028.
- Bhattacharya A, Wang Q, Ao H, Shoblock JR, Lord B, Aluisio L, Fraser I, Nepomuceno D, Neff RA, Welty N, Lovenberg TW, Bonaventure P, Wickenden AD, Letavic MA. Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol.* 2013; 170(3):624-40. doi: 10.1111/bph.12314.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(12):1471-83. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? *Gen Pharmacol.* 1985;16(5):433-40. doi: 10.1016/0306-3623(85)90001-1.
- Cotovio G, Oliveira-Maia AJ. Functional neuroanatomy of mania. *Transl Psychiatry.* 2022; 12(1):29. doi: 10.1038/s41398-022-01786-4.
- Csölle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Göllöncsér F, Illes P, Papp E, Vizi ES, Sperlággh B. Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One.* 2013; 8(6):e66547. doi: 10.1371/journal.pone.0066547.
- Dell'Osso B, Cafaro R, Ketter TA. Has Bipolar Disorder become a predominantly female gender related condition? Analysis of recently published large sample studies. *Int J Bipolar Disord.* 2021; 9(1):3. doi: 10.1186/s40345-020-00207-z.

Di Giovanni G. Serotonin in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *Exp Brain Res*. 2013; 230(4):371-3. doi: 10.1007/s00221-013-3701-3.

Fagiolini A, Coluccia A, Maina G, Forgione RN, Goracci A, Cuomo A, Young AH. Diagnosis, Epidemiology and Management of Mixed States in Bipolar Disorder. *CNS Drugs*. 2015; 29(9):725-40. doi: 10.1007/s40263-015-0275-6.

Ferrucci M, Limanaqi F, Ryskalin L, Biagioni F, Busceti CL, Fornai F. The Effects of Amphetamine and Methamphetamine on the Release of Norepinephrine, Dopamine and Acetylcholine From the Brainstem Reticular Formation. *Front Neuroanat*. 2019; 13:48. doi: 10.3389/fnana.2019.00048.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res*. 2006; 31(5):699-703. doi: 10.1007/s11064-006-9070-6.

Gonçalves MCB, Andrejew R, Gubert C. The Purinergic System as a Target for the Development of Treatments for Bipolar Disorder. *CNS Drugs*. 2022; 36(8):787-801. doi: 10.1007/s40263-022-00934-0.

Gölöncsér F, Baranyi M, Balázsfői D, Demeter K, Haller J, Freund TFF, Zelena D, Sperlágh B. Regulation of Hippocampal 5-HT Release by P2X7 Receptors in Response to Optogenetic Stimulation of Median Raphe Terminals of Mice. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10:325. doi: 10.3389/fnmol.2017.00325.

Gubert C, Fries GR, Pfaffenseller B, Ferrari P, Coutinho-Silva R, Morrone FB, Kapczinski F, Battastini AMO. Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(1):611-620. doi: 10.1007/s12035-014-9031-z.

Gubert C, Andrejew R, Leite CE, Moritz CEJ, Scholl J, Figueiro F, Kapczinski F, da Silva Magalhães PV, Battastini AMO. P2X7 Purinergic Receptor Is Involved in the Pathophysiology of Mania: a Preclinical Study. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(3):1347-1360. doi: 10.1007/s12035-019-01817-0.

Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. Amphetamine, past and present--a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol*. 2013; 27(6):479-96. doi: 10.1177/0269881113482532.

Huang ZX, Lu ZJ, Ma WQ, Wu FX, Zhang YQ, Yu WF, Zhao ZQ. Involvement of RVM-expressed P2X7 receptor in bone cancer pain: mechanism of descending facilitation. *Pain*. 2014; 155(4):783-791. doi: 10.1016/j.pain.2014.01.011.

Logan RW, McClung CA. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*. 2016; 321:163-188. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.041.

Lord B, Aluisio L, Shoblock JR, Neff RA, Varlinskaya EI, Ceusters M, Lovenberg TW, Carruthers N, Bonaventure P, Letavic MA, Deak T, Drinkenburg W, Bhattacharya A. Pharmacology of a novel central nervous system-penetrant P2X7 antagonist JNJ-42253432. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 351(3):628-41. doi: 10.1124/jpet.114.218487.

Mondimore FM. Kraepelin and manic-depressive insanity: an historical perspective. *Int Rev Psychiatry*. 2005; 17(1):49-52. doi: 10.1080/09540260500080534.

Pometlová M, Yamamotová A, Nohejlová K, Šlamberová R. Can Anxiety Tested in the Elevated Plus-maze Be Related to Nociception Sensitivity in Adult Male Rats? *Prague Med Rep*. 2016; 117(4):185-197. doi: 10.14712/23362936.2016.19.

Sanday L, Patti CL, Zanin KA, Tufik S, Frussa-Filho R. Amphetamine-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(3):583-92. doi: 10.1017/S1461145712000296.

Sequeira-Cordero A, Brenes JC. Time-dependent changes in striatal monoamine levels and gene expression following single and repeated amphetamine administration in rats. *Eur J Pharmacol*. 2021; 904:174148. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174148.

Shiah IS, Yatham LN. Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. *Bipolar Disord*. 2000; 2(2):77-92. doi: 10.1034/j.1399-5618.2000.020201.x.

Šlamberová R, Mikulecká A, Macúchová E, Hřebíčková I, Ševčíková M, Nohejlová K, Pometlová M. Effects of psychostimulants on social interaction in adult male rats. *Behav Pharmacol*. 2015; 26(8 Spec No):776-85. doi: 10.1097/FBP.0000000000000148.

Smith DJ, Whitham EA, Ghaemi SN. Bipolar disorder. *Handb Clin Neurol*. 2012; 106:251-63. doi: 10.1016/B978-0-444-52002-9.00015-2.

Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Herbert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E,

Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, Woolf CJ, Peltz G, Maixner W, Diatchenko L, Seltzer Z, Salter MW, Mogil JS. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med.* 2012; 18(4):595-9. doi: 10.1038/nm.2710.

Sperlágh B, Köfalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Vizi ES. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem.* 2002; 81(6):1196-211. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00920.x.

Sperlágh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2006; 78(6):327-46. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.03.007.

Sperlágh B, Heinrich A, Csölle C. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal.* 2007; 3(4):269-84. doi: 10.1007/s11302-007-9080-0.

Sperlágh B, Csölle C, Ando RD, Gölöncsér F, Kittel A, Baranyi M. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2012; 14(4):231-8. doi: 10.5706/nph201212003.

Sperlágh B, Illes P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35(10):537-47. doi: 10.1016/j.tips.2014.08.002.

Tewari M, Seth P. Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing Res Rev.* 2015; 24(Pt B):328-42. doi: 10.1016/j.arr.2015.10.001.

Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE. Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(10):1977-83. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01574.x.

Young JW, Henry BL, Geyer MA. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4):1263-84. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01318.x.

10. Köszönetnyilvánítás

Itt szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Sperlág Beátának, hogy a munkám során mindig számíthattam a segítségére, szakmai tanácsaira és támogatására.

Külön köszönöm témavezetőmnek, Göloncsér Flórának, hogy energiát és időt nem sajnálva bevezetett a labormunka rejtelmeibe. Nagyon hálás vagyok segítőkészségéért, minden ötletéért, kritikájáért, tanácsáért, biztatásáért, végtelen türelméért és lelkesítésért, amit a dolgozatom elkészítése alatt adott nekem.

Szeretném megköszönni a Molekuláris Farmakológia Kutatócsoport minden tagjának a sok odafigyelést és segítséget, amit a dolgozatom és a labormunkám során nyújtottak és nyújtanak a mai napig.

Ezentúl rendkívül hálás vagyok a családom gondoskodásáért, szeretetéért. Szüleim és öcsém figyelméért és kitartásáért.

Hatalmas köszönet illeti barátomat, Dominikot is, aki akkor is hitt bennem, amikor én már nem, akire mindig számíthattam és a legnehezebb pillanatokban nyújtott segítő kezét és hatalmas szeretetet.

Szeretném megköszönni Panninak a rengeteg beszélgetést, megértést, tanácsot, bizalmat, türelmet és végtelen szeretetet, amit tőle kaptam.

Nélkülük nem lennék az, aki, köszönöm!