

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3168.

PAPP ZSOLT TAMÁS

Experimentális és klinikai farmakológia
című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Köles László, egyetemi docens

Az Angiotenzin IV neuromoduláció és az AT4R/IRAP expresszió vizsgálata a prefrontális kéregben

Doktori értekezés

Dr. Papp Zsolt Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Köles László, egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szőke Éva, egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Ruisanchez Éva, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szőke Éva, egyetemi tanár, MTA doktora

Tagok: Dr. Gyurasics Ágnes, főosztályvezető, Ph.D.
Dr. Benyó Zoltán, egyetemi tanár, Ph.D.

Budapest
2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	8
1.1. Általános bevezetés.....	8
1.2. Prefrontális cortex.....	8
1.3. Neuropszichiátriai kórképek.....	10
1.3.1. Demenciák.....	10
1.3.2. Szkizofrénia.....	10
1.4. A glutamáterg rendszer.....	11
1.4.1. A glutamát szintézis, exocitózis, reuptake és metabolizmus.....	11
1.4.2. A glutamát receptorok.....	12
1.4.2.1. Az NMDA receptorok.....	12
1.4.2.1.1. Az NMDA receptorok struktúrája.....	12
1.4.2.1.2. Az NMDA receptorok funkciója.....	13
1.4.2.1.3. Az NMDA receptorok fiziológias szerepe.....	14
1.4.2.1.4. Az NMDA receptorok patológiás szerepe.....	15
1.4.2.1.5. Az NMDA receptorok a farmakoterápiában.....	16
1.4.2.1.6. Az NMDA receptorok neuromodulációja.....	17
1.5. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer.....	19
1.5.1. A szisztémás RAAS.....	19
1.5.2. Az agyi RAS.....	20
1.5.2.1. Az angiotenzin IV.....	22
1.5.2.1.1. A hexapeptid angiotenzin IV.....	22
1.5.2.1.2. Az Angiotenzin 4 Receptor avagy Inzulin-Regulált Aminopeptidáz funkciója.....	22
1.5.2.1.3. Az Ang IV és AT4R/IRAP expressziója.....	24
1.5.2.1.4. Az Ang IV hatása a memóriára egészséges állatokban.....	25
1.5.2.1.5. Az Ang IV hatása a memória deficitekre állatmodellekben.....	26
1.5.2.1.6. Az Ang IV interakciói neurotranszmitterekkel és neuromodulátorokkal.....	26
1.5.2.1.7. Az Ang IV elektrofiziológiai vizsgálatokban.....	27
2. Célkitűzések.....	28
3. Módszerek.....	29

3.1. Elektrofiziológia	29
3.1.1. Agyszelet preparáció	29
3.1.2. Whole-cell patch-clamp mérés agyszeleten	29
3.2. Immunhisztokémia.....	31
3.2.1. Szövetgyűjtés	31
3.2.2. Festés	32
3.3. Molekuláris biológia	36
3.3.1. Szövetgyűjtés	36
3.3.2. RNS izolálás.....	36
3.3.3. RNS mennyiségi meghatározás.....	37
3.3.4. DNáz emésztés	37
3.3.5. cDNS szintézis	37
3.3.6. Primer tervezés.....	38
3.3.7. Nem kvantitatív PCR	38
3.3.8. Gélelektroforézis	39
4. Eredmények	40
4.1. Kontrollvizsgálatok.....	40
4.2. Az angiotenzin II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein	41
4.2.1. Az Ang II gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjein	41
4.3. Az angiotenzin IV hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein	42
4.3.1. Az Ang IV gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjein	42
4.3.2. Az AT4R/IRAP mRNS szinten expresszálódik a PFC-ben	44
4.3.3. Az AT4R/IRAP fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben.....	45
4.3.4. Egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP-H7 utánozza az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein.....	47
4.3.5. Az AT1R fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben	48
4.3.6. Az AT1R antagonistá eprosartán nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein.....	50
4.3.7. Az AT4R/IRAP expresszálódik a piramissejtekben és a GABAerg interneuronokban, nem detektálható a microgliákban és az astrocytákban a PFC V. rétegében	51

4.3.8. Az akciós potenciál gátló tetrodotoxin vagy az exocitózis gátló Ca^{2+} -mentes ACSF nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein	53
5. Megbeszélés	54
5.1. Az angiotenzin II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben	54
5.1.1. Az Ang II serkentő hatásának, illetve az AT1R fehérjeszintű expressziójának vizsgálata	54
5.1.2. Az Ang II gátló hatásának vizsgálata	55
5.2. Az angiotenzin IV hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben	56
5.2.1. Az Ang IV hatásainak vizsgálata	56
5.2.2. Az Ang IV gátlás szignáltranszdukciójának, illetve receptorainak hely-specifikus mRNS és fehérjeszintű expressziójának vizsgálata	58
5.2.2.1. Az AT4R/IRAP	58
5.2.2.2. Az AT1R	59
5.2.2.3. A c-Met	59
5.2.3. Az Ang IV gátlás konnektivitásának, illetve az AT4R/IRAP sejt-specifikus fehérjeszintű expressziójának vizsgálata	60
5.3. Limitációk	61
5.3.1. Faj	61
5.3.2. Életkor	61
6. Következtetések	63
7. Összefoglalás	65
8. Summary	66
9. Irodalomjegyzék	67
10. Saját publikációk jegyzéke	86
11. Köszönetnyilvánítás	86

Rövidítések jegyzéke

A β :	béta-amiloid
ACE:	angiotenzin-konvertáló enzim
ACE2:	angiotenzin-konvertáló enzim-2
ACSF:	mesterséges cerebrospinális folyadék
Ang (1-7):	angiotenzin (1-7)
Ang A:	angiotenzin A
Ang I:	angiotenzin I
Ang II:	angiotenzin II
Ang III:	angiotenzin III
Ang IV:	angiotenzin IV
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav
AP-A:	aminopeptidáz A
AP-N:	aminopeptidáz N
AT1R:	1-es típusú angiotenzin-receptor
AT2R:	2-es típusú angiotenzin-receptor
AT4R:	angiotenzin IV receptor
ATP:	adenozin-trifoszfát
BDNF:	idegi növekedési faktor
CaMK:	kalcium/kalmodulin függő protein kináz
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
CCK:	kolecisztokinin
CREB:	cAMP-reszponzív elem kötő fehérje
D1R:	dopamin 1 receptor
D2R:	dopamin 2 receptor

DC:	dekarboxiláz
EAAT:	excitátoros aminosav transzporter
EGTA:	bis-aminoetil-glikoléter-tetraecetsav
EPSP:	excitatórikus posztzinaptikus potenciál
ERK 1/2:	extracelluláris szignál-regulált kináz1/2
GABA:	γ -aminovajsav
GAD67:	glutamát dekarboxiláz 67 kDa izoforma
GFAP:	gliális fibrilláris savas fehérje
GLUT4:	glükóz transzporter 4
GTP:	guanozin-trifoszfát
HEPES:	N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etánszulfonsav
HGF:	hepatocyta növekedési faktor
HRP:	tormaperoxidáz
IBA1:	ionizált Ca^{2+} -kötő adapter molekula 1
IC:	intracelluláris
IL-6:	interleukin-6
IRAP:	inzulin-regulált aminopeptidáz
KA:	kainát
KIR:	központi idegrendszer
LDP:	hosszú távú depresszió
LTP:	hosszú távú potenciáció
MAPK:	mitogén-aktivált protein kináz
MCP-1:	monocyta kemoattraktáns fehérje 1
mAChR:	muszkarinos acetil-kolin receptor
MasR:	Mas receptor

mEa:	monoklonális ellenanyag
mEPSC:	mini excitatórikus posztszinaptikus áram
mGluR:	metabotróp glutamát receptor
MrgD:	Mas-szerű G-fehérje-kapcsolt receptor
nAChR:	nikotinos acetil-kolin receptor
NEP:	neutrális endopeptidáz
NF- κ B:	nukleáris faktor-kappa B
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NMDAR:	N-metil-D-aszpartát receptor
NO:	nitrogén-monoxid
NOS:	nitrogén-monoxid szintáz
PACAP:	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PAI-1:	plazminogén aktivátor inhibitor 1
PBS:	foszfátpufferes sóoldat
PCP:	fenciklidin
PFC:	prefrontális kéreg
pEa:	poliklonális ellenanyag
PKC:	protein kináz C
PLC:	foszfolipáz C
RAAS:	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RAS:	renin-angiotenzin rendszer
SP:	P-anyag
TNF α :	tumor nekrozis faktor
TTX:	tetrodotoxin
vGLUT:	vezikuláris glutamát transzporter

VTa: ventrális tegmentális area

1. Bevezetés

1.1. Általános bevezetés

A prefrontális kéreg (PFC) a magasabb rendű kognitív funkciókban jelentős szerepet játszó agyterület, amely fiziológiásan például az emlékezetben és a tanulásban játszik szerepet, patológiás vonatkozásai pedig többek között a demenciákban és a szkizofréniában nyilvánulnak meg. A glutamát az excitátoros szinaptikus ingerületátvitel fő neurotranszmittere, viszont túlaktivitása apoptózishoz és neurodegenerációhoz vezethet. A neurodegeneratív folyamatok meghatározóak számtalan központi idegrendszeri (KIR) betegség patomechanizmusában. Kutatásomban a glutamáterg rendszer kulcsfontosságú elemének, az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor funkciójának finomhangolását szabályozó mechanizmusokat tanulmányoztam. Dolgozatomban a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) két komponensének, az angiotenzin II-nek (Ang II) és az angiotenzin IV-nek (Ang IV) az NMDA receptort (NMDAR) moduláló hatását foglalom össze.

A továbbiakban röviden bemutatom az anatómiai struktúrát, a prefrontális agykérget, amin a kísérleteinket végeztük. Beszélek az implikált neuropszichiátriai kórképekről, a demenciákról és szkizofréniáról. Részletezem a glutamáterg rendszert, kiemelve az NMDA receptorokat, illetve a RAAS-t, különös hangsúlyt fektetve az Ang II-re és az Ang IV-re.

1.2. Prefrontális cortex

A PFC emlősökben az agy anterior pólusán helyezkedik el. Filogenetikai fejlődése során emberszabásúakban éri el maximumát mind relatív rádiusz, mind kognitív képességek terén. Citoarchitektóniai szerkezetét tekintve **hat rétegű isocortex**, a laterális részén granuláris kéreg, jelzett IV. réteggel, az orbitomediális részén **agranuláris kéreg**, jól fejlett V-VI. réteggel, a szélein pedig átmeneti szerkezetű. Konnektivitás terén elsősorban a nucleus dorsomedialis thalamiból kap reciprok afferentációt, de rostokat vált a diencephalonnal (thalamus, hypothalamus), mesencephalonnal, limbikus rendszerrel (amygdala, limbikus cortex) és az agykéreg más területeivel is, illetőleg önálló efferenseket küld a bazális ganglionokba és a nuclei pontisba [1, 2]. Neurokémiai

szempontból a KIR legtöbb neurotranszmittere megtalálható itt is: **glutamát**, γ -aminovajsav (GABA), noradrenalin, dopamin, szerotonin és acetil-kolin. A zóna működésében legfontosabbnak tartható receptoraik az NMDA és a GABA_A receptorok (munkamemóriában van szerepük), illetve legjelentősebbnek mondható pályáik a locus coeruleusból jövő noradrenerg traktusok (kognitív funkcióban van jelentőségük), a ventrális tegmentális areából (VTA) a mesocortikális dopaminerg pálya (motivációban és a jutalmazási rendszerben vesznek részt), a raphe magvakból induló szerotoninergetvonalak (impulzuskontrollban játszanak szerepet) és a formatio reticularisból, n. basalis Meynerti-ből érkező kolinerg beidegzés. Továbbá szabályozó szereppel az alábbi neuropeptideket is leírták: szomatosztatin, P-anyag (SP), kolekisztokinin (CCK), **angiotenzin** és neurotenzin [3]. Funkcionálisan a nagyagy három asszociációs kéregrészének egyike. Végrehajtó, tág értelemben vett motoros kéreg: orbitolaterálisan inkább szomatomotoros, a kogníciót szolgálja, orbitomediálisan inkább visceromotoros, emóciókban vesz részt. Fiziológiásan szerepe van (1) az **összetett és/vagy új, célra-irányuló mozgások tervezésében, szervezésében**, ezek neuronális hálózatokban, ún. sémákban történő reprezentációjában. Szerepe van az (2) **az összetett és/vagy új, célra-irányuló mozgások végrehajtásához szükséges, belső reprezentációra irányuló fenntartott figyelemben**. Ez három részből áll össze, a (2.1) **munkamemóriából**: a mozgás tervezéséhez, szervezéséhez szükséges memória hálózatok időszakos aktivációjából. A (2.2) „**preparatory set**”-ből: a cselekvés végrehajtásához szükséges struktúrák előkészítéséből. Azaz a közelmúlt és a közeljövő (2.1 és 2.2) időbeli integrációjából. És az (2.3) „**inhibitory control**”-ből: a célra irányuló akciót befolyásoló külső és belső interferencia gátlásából. Továbbá szerepe van a (3) **döntéshozásban**: akár egyszerű, akár összetett cselekvések végrehajtásának eldöntésében, kockázatelemzésben, „cost-benefit” becslésben, „valószínűségszámításban”. Sőt filozófiai vonatkozásokban a **tudat és a szabad akarat** kérdéskörét is érinti [4, 5]. Mivel az öregedési folyamatok, atrophia először ezen az agyterületen jelentkeznek és patológiás folyamatokra, neurodegenerációra a vulnerabilitás itt a legnagyobb, nagy klinikai jelentőséggel is bír. Neuropszichitátriai implikációi elsősorban a **demenciák**, ahol a dopaminerg és kolinerg innerváció megfogyatkozása, helyi piramis sejtek pusztulása jellemző. Illetve a **szkizofrénia**, mely háttérében a dopamin, GABA, szerotonin, glutamát és noradrenalin rendszerek KIR-i fejlődést és működést érintő öröklött vagy szerzett elváltozásai

állhatnak. Továbbá felmerült szerepe a **gyermekkori figyelemzavarokban és addikciókban** is, ahol dopamin és az utóbbi esetében noradrenalin, GABA, glutamát és szerotonin deficitet is megfigyeltek az orbitomediális kéregben [3, 6].

1.3. Neuropszichiátriai kórképek

1.3.1. Demenciák

Világszerte több mint 55 millió ember szenved demenciában és közel 10 millió új esetet diagnosztizálnak évente. A demencia a vezető halálozási okok között a hetedik és egyik fő oka a rokkantságnak, gondnokság alá helyezésnek [7]. A szindróma patogenezisét alapvetően neurodegeneráció okozza, amelynek háttérében különböző patofiziológiák állhatnak. Leggyakoribb fajtái az Alzheimer-kór, a vaszkuláris demencia, a Lewy-testes és a frontotemporális demencia [8]. A demenciák kezelésében a betegséget érdemben befolyásoló, kifejezetten effektív gyógyszerekre lenne szükség, azonban a jelenleg elérhető opciók gyakorlatilag csak tüneti kezelések, limitált effektivitással [9].

1.3.2. Szkizofrénia

A szkizofrénia világszerte mintegy 24 millió embert érint [10]. A szkizofrénia kapcsán megkülönböztethetünk akut szkizofrénia, krónikus szkizofrénia és szkizoid tünetcsoportot, illetve szkizofrénia betegséget. A szkizofrénia betegség tünetei BNO-10 szerint a gondolkodás zavarai, a külső erők általi irányítottság, az érzéksalódások, a téveszmék, az érzelmi közöny, az asszociációk fellazulása, a pszichomotorium zavara, az inaktivitás, illetve a szociális hanyatlás. Kórokában adopciós és ikervizsgálatok alapján az örökletes és szerzett genetikai és biológiai faktorok merültek fel. Létezik számos neurotranszmitter elmélet: leírták már a mesocorticolimbikus dopaminerg pályarendszer D₁ receptoron (D1R) alul-, D₂ receptoron (D2R) túlműködését, a GABA alul- és szerotonin (elsősorban 5HT₂) túlműködését, illetve a glutamát (leginkább NMDA) és noradrenalin szerepét is. Továbbá pszichodinamikus teóriák, és családi genezis is szóba jöttek. Diagnózisa elsősorban tüneti, melyet pszichológiai tesztvizsgálatok (projektív tesztek (Rorschach, TAT) és kvantitatív tesztek (MMPI)) megerősíthetnek vagy

megkérdőjelezhetnek. A betegség jelentkezésekor belgyógyászati és neurológiai kivizsgálást, laborvizsgálatot és képalkotó eljárásokat is igénybe vesznek organikus eredet kizárása érdekében. Ellátásában a negyvenes évektől a legfontosabb az elektrokonvulzív terápia volt. A hetvenes évektől pedig a gyógyszeres kezelés az elsődleges: első, második (és harmadik) generációs antipszichotikumokat, esetleg lítiumot, antiepileptikumokat, benzodiazepineket, antidepresszánsokat használnak. Kiegészítésként továbbá pszichoterápiák (magatartás, család-, és szocioterápiák) alkalmazhatók. Prognózisa általában kedvezőtlen kimenetelű. A betegek több mint fele rehospitalizációra szorul. Az autonómia beszűkül, súlyos esetben krónikus institucionalizáció válik szükségessé. 15-20%-uk öngyilkossággal fejezi be életét [11].

1.4. A glutamáterg rendszer

A glutamát egy klasszikus neurotransmitter. Struktúrája tekintetében kismolekulás aminosav. Funkciója vonatkozásában excitátoros jelátvivő. A glutamáterg rendszer a KIR fő serkentő hálózata [12]. A gerincesekben az összes szinapszis 50%-át, az excitátoros szinapszisok 90%-át alkotja [13].

1.4.1. A glutamát szintézis, exocitózis, reuptake és metabolizmus

A glutamát a vér-agy gáton nem jut át, a KIR-ben szintetizálódik [14]. A KIR-i neuronokban a glutamináz enzim állítja elő glutamin dezamidálása és α -ketoglutarát transzaminálása közben. A vezikuláris glutamát transzporter (vGlut) segítségével, H^+ -grádiens terhére, kis, szinaptikus vezikulákba kerül és itt tárolódik. Kellő nagyságú ingerület hatására, Ca^{2+} -függő exocitózis során szabadul fel a szinaptikus részbe, ahol egyszerű diffúzióval éri el receptorait. Az astrocyták $Na^+/H^+/K^+$ -függő excitátoros aminosav transzportereikkel (EEAT) veszik vissza. Végül a glutamin-szintetáz enzimük glutaminná alakítja ATP-ben tárolt energia felhasználásával [15].

1.4.2. A glutamát receptorok

A glutamátnek 3 csoportba sorolt, összesen 8 féle metabotrop receptora és 3 féle ionotrop receptora ismeretes.

Az I. csoportba a mGluR1 és mGluR5, a II. csoportba a mGluR2 és mGluR3, a III. csoportba a mGluR4, mGluR6, mGluR7 és mGluR8 metabotrop receptorok tartoznak [16]. Szerkezetük tekintetében egy a ligandkötőhelyet tartalmazó extracelluláris N-terminálisból, egy hét transzmembrán doménből, illetve egy GTP-kötő fehérjéhez kapcsolódó intracelluláris C-terminálisból állnak [17]. Működésük terén az I. csoport receptorai elsősorban G_q fehérjéhez kapcsolódva a foszfolipáz C-t (PLC) serkentik, a II. és III. csoport pedig $G_{i/o}$ -hoz kapcsolódva az adenilát-cikláz gátolja [18].

α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionát (AMPA), kainát (KA) és N-metil-D-aszpartát (NMDA) ionotrop receptorokat különítettek el a szintetikus agonistáik iránti affinitásuk alapján [12]. A receptorok négy alegységből épülnek fel, középen ioncsatornát fogva közre. Az alegységek további négy doménre tagolódnak: extracelluláris N-terminálisra, ligandkötő doménre, transzmembrán szakaszra és intracelluláris C-terminálisra. Működésük tekintetében ligandfüggő kationcsatornák, a csatorna nyitott állapotában befelé irányuló Ca^{2+} és Na^+ , kifelé irányuló K^+ áram folyhat [19].

1.4.2.1. Az NMDA receptorok

Az NMDA receptor a glutamát kulcsfontosságú receptora. Sokáig úgy tartották, hogy kizárólag idegsejteken fordul elő, de az elmúlt 35 év kutatásai alapján gliasejteken is kiemelt szerepe van [20]. Megtalálható pre- és posztszinaptikusan, valamint extraszinaptikusan egyaránt [21].

1.4.2.1.1. Az NMDA receptorok struktúrája

Az NMDA receptorok is négy alegységből épülnek fel. Az alegységek az extracelluláris N-terminálisból, a ligandkötőhelyből, egy négy transzmembrán doménből és az intracelluláris C-terminálisból állnak. A kötőhelyet a transzmembrán-1 előtti szakasz és

a transzmembrán-3-4 domén közötti hurok alkotja. A pórust pedig a visszakanyarodó transzmembrán-2 domének [22]. A receptorok heterotetramerek. Háromféle alegységük, a GluN1, GluN2 és GluN3, melyeknek további nyolc (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b), négy (A, B, C, D) és két (A, B) izoformája ismert [23, 24]. A receptor alegységeinek összetétele meghatározza a struktúráját, lokalizációját és funkcióját [25].

1.4.2.1.2. Az NMDA receptorok funkciója

Működése terén mind az NMDAR aktivációja, mind a hatásmechanizmusa eltér egy átlagos ligandfüggő ioncsatornáétól.

A ligandfüggő receptorokat általában egy agonista aktiválja, mely jelen esetben is megvan, nevezetesen a GluN2 alegységen található ortosztérikus kötőhelyhez kapcsolódó glutamát, illetve további szubsztrátok az aszpartát, homocisztein és NMDA is. Ezenfelül olykor előfordulhat koagonista szükségessége. Itt a glicin és D-szerin a koaktivátorok, amiknek a GluN1 és GluN3 alegységen van kötőhelyük. A receptorok működését modulátorok szabályozhatják. Az NMDAR-nak a megszokottnál több allosztérikus kötőhelye van. Fiziológias kötőhelye például a poliamin-kötőhely. Farmakológiai antagonistái és negatív modulátorai pedig például a fenciklidin (PCP), ketamin, dizocilpin, amantadin, memantin, ifenoprodil [22]. Az NMDAR legfőbb egyedülállósága viszont feszültségfüggő mivolta. Nyugalmihoz közeli membránpotenciálon már igen kis koncentrációjú Mg^{2+} is blokkolja a csatornát [26], melyet a depolarizáció megszüntet [27], lehetővé téve és fokozva az ionáramlást. Ilyen módon az NMDA receptor képes detektálni és integrálni a preszinaptikus és posztzinaptikus aktivitásokat [23]. A receptorok funkcióját és permeabilitását poszttranszlációs módosítások, például foszforiláció, palmitoiláció, ubiquitináció szintén befolyásolják [28].

A KIR leggyakoribb ioncsatornáit által átengedett ionok, például a feszültségfüggő Na^+ csatornákon vagy AMPA receptorokon átfolyó Na^+ , a feszültségfüggő K^+ csatornákon keresztüláramló K^+ , a GABA receptorokon túljutó Cl^- , hatásukat a membránpotenciál megváltoztatásával, depolarizációval, repolarizációval vagy hyperpolarizációval fejtik ki. Az NMDA receptorok viszont nem csak Na^+ -ra, hanem Ca^{2+} -ra is permeábilisek, így a mindkét ion által kifejtett, gyors és rövid ideig tartó depolarizáló hatáson túl, a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvivő, a Ca^{2+} /kalmódulin kinázt (CaMK) aktiválva lassabban létrejövő,

viszont a kináz autofoszforilációja révén a Ca^{2+} szint normalizálódása után is fennmaradó hatások kialakítására is képes.

1.4.2.1.3. Az NMDA receptorok fiziológiás szerepe

Az NMDA receptoroknak meghatározó szerepük van a KIR-ben, a kognitív folyamatokban, nélkülözhetetlenek a neuronok integratív funkciójában, a hálózat rendszerszintű működésében.

Képesek összegezni a preszinaptikus és posztoszínaptikus hatásokat, nevezetesen a preszinaptikus neuron exocitóziséval felszabaduló glutamát kötődését a receptor ortosztérikus kötőhelyéhez és a posztoszínaptikus neuron membránpotenciál változására bekövetkező feszültségfüggő Mg^{2+} blokádi kioldását a receptor csatornájából [23].

Magas Ca^{2+} permeabilitásuknak köszönhetően különböző intracelluláris jelátviteli útvonalakon keresztül hosszútávú változásokat tudnak létrehozni. A kinázok és foszforilázok különböző makromolekulákat módosítanak, foszforilálnak vagy defoszforilálnak, a konduktanciájukat vagy denzitásukat befolyásolva. Többek között az AMPA receptorokat [29], sőt a legújabb kutatások szerint magukat az NMDA receptorokat is [30]. Az így kialakuló hosszú távú potenciáció és depresszió (LTP, LTD) áll a háttérben a szinaptikus plaszticitásnak, a tanulásnak és a memóriának, magának a kogníciónak [31].

Habár az NMDA receptorok elsősorban posztoszínaptikusan, AMPA és egyéb receptorokkal kolokalizáltan fordulnak elő, megtalálhatók extraszínaptikusan, periszínaptikusan, preszinaptikusan, sőt gliálisan is [28].

A lokalizációs elmélet szerint a szinaptikus és extraszínaptikus NMDA receptor aktiváció egyensúlya bír nagy jelentőséggel. A két különböző NMDA receptor populációnak különböző intracelluláris downstream jelátviteli útvonalakat tulajdonítanak. A szinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorok az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK 1/2) aktivációt serkentik, a cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (CREB) foszforilációt fokozzák és az idegi növekedési faktor (BDNF) expressziót növelik, összegezve elősegítik a sejtek túlélését, neuroprotektívek. Míg az extraszínaptikusan előforduló receptorok a fentiekkel ellentétes hatásúak, összességében sejthalált

okozhatnak, excitotoxikusak [25]. Előbbiek az LTP-t segítik, utóbbiak az LTP-t akadályozzák és LTD-t indukálnak [32, 33]. Előbbiekhez inkább a koagonista D-serin kötődik, utóbbiakhoz pedig inkább a glicinnek van nagyobb affinitása [34].

Az alegység elmélet szerint pedig inkább az alegységösszetétel befolyásolja jelentősen a működést. A GluN2A alegység citoprotektív és az LTP-ben van szerepe. Míg a GluN2B alegység citotoxikus és az LTD-hez járul hozzá [35, 36].

Persze a két elmélet nem különíthető el élesen egymástól, hiszen a szinaptikus NMDA receptorok főleg GluN2A alegységet tartalmaznak, az extraszinaptikusak pedig főként GluN2B alegységet foglalnak magukba [37].

1.4.2.1.4. Az NMDA receptorok patológiás szerepe

A glutamáterg rendszer túlműködése, az NMDAR túlaktivációja excitotoxikus hatású, stimulálja a Ca^{2+} -függő sejthalálútvonalakat, sejtszinten apoptózist, szervszinten pedig neurodegenerációt vált ki [38].

Agyi ischaemiában, traumás agykárosodásokban és status epilepticusban akutan alakul ki idegsejtkárosodás [39].

A krónikusan ismétlődő noxáknak pedig a neurodegeneratív betegségek, mint például az **amiotrófiás laterálszklerózis, sclerosis multiplex és Parkinson-kór** patomechanizmusában van szerepük [40]. **Alzheimer kórban** a béta-amiloid ($\text{A}\beta$) fehérjék felhalmozódása az astrocytáknak fokozza a glutamát felszabadulást, neuronokban fokozza az NMDAR excitabilitást és toxicitást [39], illetve felborítja a szinaptikus és extraszinaptikus NMDAR egyensúlyt [21]. **Huntington-kórban** a huntingtin fehérjét kódoló génben megjelenő CAG-ismétlődések széleskörű neurobiológiai következményei között az NMDAR jelátvitelnek is kiemelt szerepe van. Potencírozott NMDA áramokat mértek a striátális közepes tüskés neuronokon és az összes idegsejt fogékonyabb volt az NMDA-indukált toxicitásra [21].

A **depresszióban** elsőnek választandó szelektív re-uptake inhibitorok adásakor terápiás hatás csak 2-3 hét késéssel észlelhető. A nehezen magyarázható jelenség hátterében többek között a glutamáterg rendszerrel való interakció is felmerült [41]. Számos depresszió állatmodellben, például erőltetett úszás tesztben, farkok felfüggesztési tesztben,

tanult tehetetlenségben az NMDAR antagonisták hatékonynak bizonyultak [41]. Egy 7 emberen végzett randomizált, placebo-kontrollált, kettős vak kísérletben az NMDAR antagonista ketamin egyszeri intravénás beadása 72 óra után [42], egy 18 páciensen folytatott vizsgálatban pedig azonnali és egy héten át tartó szignifikáns antidepresszáns hatást váltott ki [43].

A glutamaterg rendszer alulműködését, az NMDAR hipofunkcióját a **szkizofréniával** hozták összefüggésbe. Az NMDAR antagonista ketamin és PCP a betegséghez hasonlóan, mind pozitív (pl.: hallucinációk, paranoia), mind negatív (pl.: érzelmi visszahúzódás, motoros immobilitás) tünetekkel társuló pszichózist indukálnak [44]. 17 szkizofréniában szenvedő beteg agyának posztmortem vizsgálatában pedig a neuroprotektív mGluR5 szignifikáns alulműködését is észlelték [45].

1.4.2.1.5. Az NMDA receptorok a farmakoterápiában

Az NMDA receptoron ható farmakonok közül mindössze ötféle van Magyarországon törzskönyvezve, klinikai használatban.

A **ketamin** egy nem kompetitív NMDAR antagonista. Önmagában adva vagy kombinálva narkózis bevezetésére és fenntartására, illetve akut és neuropáthiás fájdalom csillapítására indikált [46]. Hatékonysága major depresszióban bizonyított [42]. Több tucat esetben szuper-refrakter status epilepticusban is alkalmazták [47].

Az **eszketamin** a ketamin S(+) enantiomere. Klinikai indikációja kombinációban terápiarezisztens major depresszív zavar közepesen súlyos vagy súlyos depresszív epizódja, mely nem reagált legalább két, különböző antidepresszánssal végzett kezelésre [48].

A **memantin** (egyéb hatásmechanizmusok mellett) egy közepes affinitású, nem kompetitív NMDAR antagonista. Indikációja közepesen súlyos, illetve súlyos Alzheimer-betegség kezelése [49]. Adagolása javasolt teljes agyi sugárterápia mellett [50].

Az **amantadin** (egyéb hatásmechanizmusok mellett) egy közepes affinitású, nem kompetitív NMDAR antagonista. Indikációja Magyarországon Parkinson-kór tüneteinek

és neuroleptikumok extrapiramidális mellékhatásainak kezelése [51], az USA-ban influenza A profilaxisa és kezelése [52].

A **dextrometorfán** az NMDAR antagonizmusa mellett, szerotonin és noradrenalin visszavétel gátló, nikotinos acetil-kolin receptor (nAChR) antagonistája és σ -1 receptor agonista [53]. Az OGYEI makacs, száraz, irritatív köhögés csillapítására törzskönyvezte. Az FDA kinidinnel kombinálva pszeudobulbáris affektus [54], illetve buproprionnal kombinálva major depresszió [55] kezelésére is engedélyezte.

A **felbamát** az NMDA csatorna blokkolója és a GABA receptorainak potencírozója [56]. Indikációja monoterápiában vagy adjuvánsként terápiaerezisztens parciális indulású rohamok, illetve csak adjuvánsként terápiaerezisztens Lennox-Gastaut szindróma [57].

Az NMDA receptorok direkt gátlása súlyos nem kívánatos hatásokat idézhet elő, például disszociációt, hallucinációt, rémálmokat, koncentráció és memóriazavarokat, hangulatzavart, pszichomotoros nyugtalanságot, konfúziót, delíriumot...stb. [58]. Az előzőleg részletezett NMDAR antagonisták széleskörű alkalmazhatóságát is sokszor ezek a mellékhatások limitálják. A gyógyszerfejlesztés egyre inkább a receptor finomhangolását célozza meg. Sajnos ezek a stratégiák eddig kevés sikerrel jártak, ezért fontos minden új útvonal feltérképezése.

1.4.2.1.6. Az NMDA receptorok neuromodulációja

A **neurotranszmisszió** olyan idegsejtek közötti kapcsolat, melynek elsődleges célja az információ továbbítása. A **neuromoduláció** pedig olyan kapcsolat, melynek célja ennek a jelátvitelnek a módosítása, szabályozása.

Az ismert neurotranszmitterek szinapszisainak felfedezésre váró neuromodulátorainak új útvonalai a gyógyszerfejlesztés számára új céltargeteket, a szinapszisok közvetett befolyásolása, finomhangolása révén a klinikum számára hatékonyabb gyógyszereket jelenthetnek.

Tágabb értelemben ide sorolható, hogy az agonista glutamát és a koagonista glicin felszabadulásának és visszavételének módosítása preszinaptikusan tudja befolyásolni az NMDAR működését. Például az endogén cannabinoidok a CB1, a morfin a μ opioid, a neuropeptid Y pedig az Y1 receptorokon keresztül gátolják, a nitrogén-monoxid (NO), a

neurotenzin az NTS1, az adrenalin és noradrenalin az $\alpha 1$ és β receptorokon keresztül pedig serkentik a glutamát felszabadulást [28].

Illetve, hogy a feszültségfüggő Mg^{2+} blokk befolyásolása posztzinaptikusan képes módosítani az NMDAR aktivitást. Például az AMPA receptorok a sejt depolarizálása révén oldják, a GABA receptorai a sejt hiperpolarizálása révén fokozzák a Mg^{2+} blokádot [28]. A protonok és divalens ionok, például a Zn^{2+} , pedig a Mg^{2+} -hoz hasonlóan csatornablokkoló tulajdonságúak [19].

Valamint, hogy az endogén poliaminoknak, például a sperminnek és spermidinnek saját allosztérikus kötőhelyük van és mind glicin dependens, mind glicin independens módon serkentik az NMDA áramokat [59].

Szűkebb értelemben a különböző neuromodulátorok a legkülönbözőbb intracelluláris jelátviteli útvonalakon keresztül tudják az NMDA receptorok poszttranszlációs módosítását, például foszforilációját, S-nitrozilációját, palmitoilációját, ubikvitinációját indukálni, és így nemcsak a receptor működését, hanem elhelyezkedését is, például internalizációját, transzlokációját szabályozni. Például az adrenerg, kolinerg, szerotonerg és purinerg rendszer, a neuroszteroidok, szomatosztatin, inzulin, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), plazmin és trombin [28].

A mGluR-ok gyakran kolokalizálódnak az NMDA receptorokkal. Lényeges szerepe az I. csoportnak van. Az NMDA válaszokat általában potenciózzák, a mGluR1 szinaptikusan, a mGluR5 pedig extraszinaptikusan elhelyezkedve, protein kináz C (PKC) és egyéb útvonalakon keresztül [60]. Néhány esetben gátlást is megfigyeltek: egér cortikális neuron kultúrában az NMDAR membrán-delimitált inhibitoros modulációját [61], illetve patkány hippocampusban az NMDAR internalizációját [62]. Patkány PFC-ben a II. csoport szerepe is felmerült [63, 64]. A III. csoport NMDA receptort moduláló hatásáról nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

A glutamáterg rendszer meghatározó KIR-beli modulátora a dopamin. Receptorai az NMDA receptorok működését többféleképpen módosíthatják. A preszinaptikusan elhelyezkedő dopamin receptorok gátolják a glutamát felszabadulást, a striátumban D2R-on [65, 66], a nucleus accumbensben pedig D1R-on [67, 68] keresztül. A posztzinaptikus receptorok hatása a dopamin koncentrációjától függ. Alacsony koncentrációban ($<50 \mu M$) a D1R-okon keresztül facilitáló, magas koncentrációban (>50

μM) a D2R-okon keresztül inhibitoros hatást fejt ki az NMDAR-ra a cortexben, striátumban, nucleus accumbensben és egyéb KIR régiókban [69-71].

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az angiotenzin II (Ang II) a fiziológiásat megközelítő koncentrációtartományban (1 nM - 1 μM) potenciózza az NMDA áramokat patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. A serkentő hatást az 1-es típusú angiotenzin-receptor (AT1R) antagonistá eprosartán (1 μM) felfüggesztette, a 2-es típusú angiotenzin-receptor (AT2R) antagonistá PD123319 (5 μM) azonban nem befolyásolta, igazolva, hogy a hatást az AT1R mediálja. Illetve a serkentő hatást szinaptikus izoláció megszüntette, igazolva, hogy a hatás interneuronális közvetítéssel érvényesül. A serkentő hatást a D1R antagonistá SCH23390 (10 μM) felfüggesztette, a D2R antagonistá sulpirid (20 μM) azonban nem befolyásolta, igazolva, hogy a hatást dopaminerg interneuron D1R-on keresztül mediálja [72]. Érdekes módon az Ang II magasabb koncentrációinál (1-3 μM) az NMDA áramok gátlása is megfigyelhető volt néhány sejt esetében. Az inhibíciót sem az AT1R antagonistá eprosartán (1 μM), sem az AT2R antagonistá PD123319 (5 μM) nem függesztette fel [73], ami alapján feltételezhető volt, hogy a hatásért egy az Ang II-ből képződő másik RAS ligand és annak saját receptora a felelős.

1.5. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

1.5.1. A szisztémás RAAS

A szisztémás renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) régóta ismert. Több mint százhusz évvel ezelőtt fedezték fel, hogy a később reninnek nevezett vesekivonat befolyásolja a vérnyomást [74], illetve az angiotenzin II-t (Ang II) is már több mint 80 éve izolálták [75, 76].

A RAAS klasszikus tengelye (angiotenzinogén/renin/Ang I/ACE/Ang II/AT1R) már hosszú ideje, széles körben ismeretes. A máj által szintetizált **angiotenzinogént** a vese juxtaglomeruláris apparátusának sejtjeiben szabályozottan elválasztott **renin** enzim hasítja angiotenzin I-é (**Ang I**), majd a tüdő endothelsejtek felszínén konstitutívan jelen lévő angiotenzin-konvertáló enzim (**ACE**) vágja **Ang II**-vé. Az Ang II az 1-es típusú angiotenzin-receptoron (**AT1R**) keresztül a vesében csökkenti a Na^+ filtrációját és

fokozza reabszorpcióját, a mellékvesekéregben növeli az aldoszteron szintézisét és szekrécióját, a köztiagyban pedig emeli a vazopresszinszekréciót és szomjúságérzetet vált ki. Továbbá a prekapilláris rezisztenciaereken vazokonstrikciót hoz létre [77].

1.5.2. Az agyi RAS

Az elmúlt évtizedekben új, lokális (köztük agyi) renin-angiotenzin rendszerek (RAS), illetve új RAS tengelyek (köztük az Ang III/APN/Ang IV/IRAP/AT4R) váltak ismertté [78]. 60 éve publikálták, hogy az Ang II intraventriculáris injekciója centrálisan mediált presszor választ indukál [79]. A későbbiekben a RAS többi prekursorát és enzimét is kimutatták az agyban [80]. Az előagyi cirkumventrikuláris szervekben lévő fenesztrált kapillárisokon keresztül a szisztémás RAS elemei penetrálhatnak az agyba [81]. Viszont mivel az angiotenzin ligandok peptidek, ezért máshol nem tudnak átjutni a vér-agy gáton és így az agyi RAS alapvetően teljesen elkülönül a perifériástól [78].

Az **angiotenzinogén** fehérje az összes angiotenzin ligand prekursora. 90%-át az astrocyták szintetizálják és szekretálják. Emellett idegsejtekben és egyéb gliasejtekben is képződik [82]. Az angiotenzinogén N terminálisról a renin vágja le az Ang I-t. Az **Ang I** decapeptid C és N terminálisát pedig további, különböző karboxi- és aminopeptidázok hasítják. A KIR-ben lényegében négy végterméknek van neuroaktív szerepe: az Ang II-nek, az angiotenzin (1-7)-nek (Ang (1-7)), az alamandinnak és az angiotenzin IV-nek (Ang IV) [78].

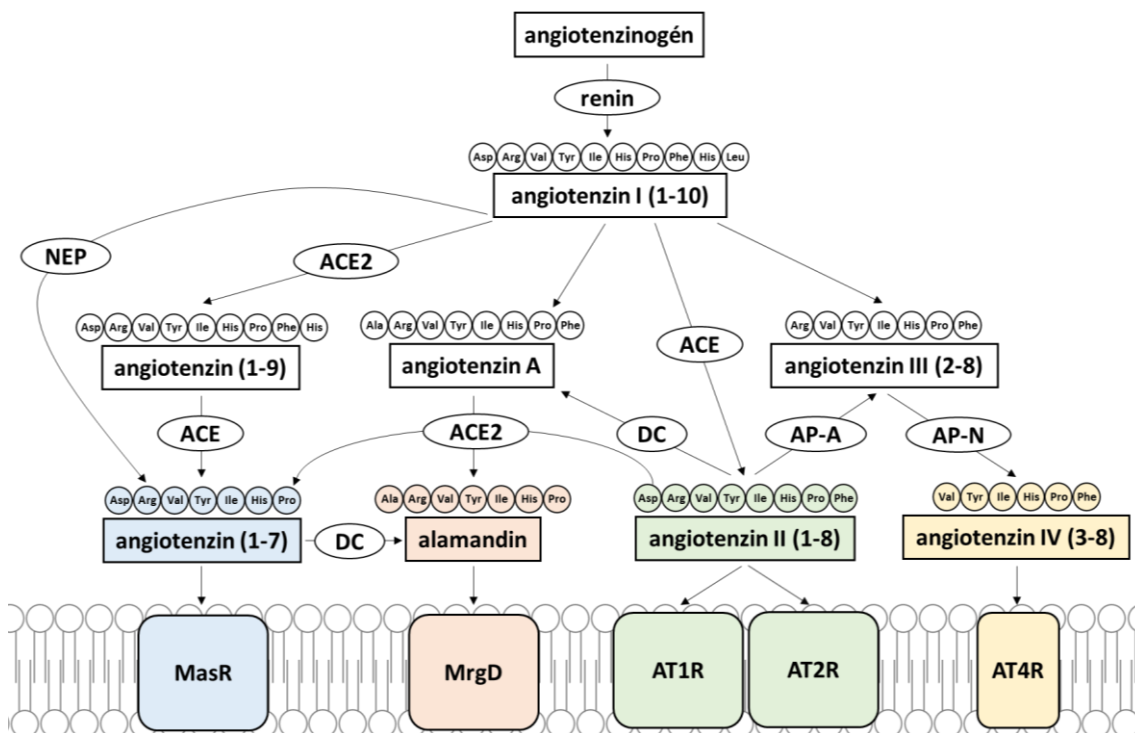
Az **Ang II** oktapeptid képződése során az Ang I C terminálisáról az ACE hasít le két aminosavat. Az Ang II-nek két receptora, az 1-es típusú angiotenzin-receptor (AT1R) és a 2-es típusú angiotenzin-receptor (AT2R), ismert. Az AT1R G_q fehérje kapcsolt receptor. Az AT2R működése nem pontosan meghatározott, $G_{i/o}$ fehérje kapcsoltság mellett egyéb jelátviteli útvonalak is felmerültek [83]. Neuronokon, astrocytákon, microgliákon fejeződnek ki a cortexben, hippocampusban és a bazális ganglionokban [84].

Az **Ang (1-7)** heptapeptid képződése során az Ang I C terminálisáról vagy az ACE hasít le két, majd az angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) egy, vagy az ACE2 egy, majd az ACE két, vagy a neutrális endopeptidáz (NEP) három aminosavat. Az Ang (1-7)-nek saját receptora van, a Mas receptor (MasR) [85]. Emellett kis affinitással az AT2R-hoz és a

Mas-szerű G-fehérje-kapcsolt receptorhoz (MrgD) is kötődik [86]. A MasR egy G fehérje kapcsolt receptor. Az agykéregben, hippocampusban és a törzsdúcokban idegsejteken, astrocytákon és microgliákon fordul elő [78].

Az **alamandin** kétféle útvonalon képződhet. Vagy az Ang I fent leírt hidrolízisével először a heptapeptid Ang (1-7) képződik és utána dekarboxilálja az N terminális aszpartát aminosavat alaninná a dekarboxiláz (DC) enzim. Vagy az Ang II dekarboxilációjával először az oktapeptid angiotenzin A (Ang A) jön létre és utána hasítja le a C terminális aminosavat az ACE2. Receptora az MrgD [86]. Az MrgD szintén G fehérje kapcsolt receptor. Neuronokon található [87].

Az **ACE** upregulációja és az **AT1R** túlaktivációja proinflammatorikus hatású [88] és a reaktív oxigén gyökök képződése révén fokozott oxidatív stresszt eredményez [89], illetve excitotoxicitásba vesz részt, a neuronok apoptózisát okozza [90, 91], súlyosbítja a kognitív károsodásokat [92]. Ezzel ellentétesen az **ACE2** enzim hatásai, illetve az **AT2R**, **MasR** és **MrgD** receptorok kötődései antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásúak, az agyban javítják a sejtek túlélését, fokozzák a kogníciót [93-95].



1. ábra. Az agyi RAS elemeinek sematikus ábrázolása. Téglalap: RAS ligandok. Színes téglalap: neuroaktív RAS ligandok. Lekerekített színes téglalap: neuroaktív RAS ligand receptorok. Ovális: enzimek. Rövidítések: angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2), aminopeptidáz A (AP A), aminopeptidáz N (AP N), 1-es típusú angiotenzin-receptor (AT1R), 2-es típusú angiotenzin-receptor (AT2R), angiotenzin IV receptor (AT4R), dekarboxiláz (DC), Mas receptor (MasR), Mas szerű G fehérje kapcsolt receptor (MrgD), neutrális endopeptidáz (NEP). [78]

1.5.2.1. Az angiotenzin IV

1.5.2.1.1. A hexapeptid angiotenzin IV

Az oktapeptid Ang II-ről az aminopeptidáz A (AP-A) hasítja le az N terminális aszpartátot, majd a képződött heptapeptid angiotenzin III-ről (Ang III) az aminopeptidáz N (AP-N) vágja le az N terminális arginint, végül egy hexapeptidet, az Ang IV-t eredményezve.

Az agyban csak nagyon alacsony koncentrációkban fordul elő [96, 97]. A nyugalmi szintje különböző agyterületek dializátumaiban sokszor detektálhatatlan. Mikrodialízis szonda behelyezését követően közvetlenül 120 és 187 pM közötti koncentrációban mutatták ki, illetve zero-net-flux módszerrel extracelluláris szintjét 46 pM-ra becsülték a striátumban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Ang IV főként intracellulárisan van jelen [98]. Számos jelentés szerint a neuronokon belül az Ang II közel 80 %-a Ang IV-gyé alakul át [99, 100]. Ugyanakkor az Ang IV extracellulárisan, de novo is szintetizálódik. Az AP-A és AP-N aminopeptidáz enzimeket pericyták plazmamembránján mutatták ki, valószínűsítve, hogy az Ang IV elsősorban az agyi kiserek körüli extracelluláris térben képződik [101, 102]. Ezt támasztja alá, hogy az Ang II striatális perfúziója után egyértelműen mérhető volt az Ang IV szint emelkedése [98].

1.5.2.1.2. Az Angiotenzin 4 Receptor avagy Inzulin-Regulált Aminopeptidáz funkciója

Habár már a kilencvenes évek elején azonosítottak egy unikális angiotenzin kötőhelyet, az **angiotenzin IV receptort (AT4R)**, amelyhez az Ang IV telíthetően, reverzibilisen,

specifikusan és nagy affinitással kötődik [103], működéséről, sőt mibenlétéről, mindmáig sincs konszenzus.

Az AT4R-t a kétezres évek elején egy transzmembrán enzimmal, az **inzulin-regulált aminopeptidázzal (IRAP)** azonosították [104] és az Ang IV-t a katalitikus domén potens, kompetitív **inhibitoraként** [105]. Az IRAP egy kettes típusú transzmembrán aminopeptidáz, ami különböző **neuroaktív peptideket**, például Ang III-t, oxitocint, vazopresszint, met-enkefalint metabolizál [106]. Az Ang IV hatása részben ezen peptidek bontásának gátlásával, közvetett módon, extracellulárisan érvényesülhet.

Az AT4R/IRAP-on egy a fent említettől különböző, juxta-membrán elhelyezkedő, allosztérikus kötőhelyet is felfedeztek, ahol az Ang IV hagyományos **agonistaként** viselkedik [107] és kötődése a receptor N-terminális farkán keresztül különböző szignáltranszdukciókat tud beindítani [108]. Az Ang IV hatásmechanizmusaként számos intracelluláris jelátviteli útvonalat ugyancsak implicáltak. Mivel a GTP γ S-nek nincs hatása a 125I-Ang IV affinitására nyúlshíjban [109], tengerimalac agyban [110] és patkány ér simaizomban [111], ezért valószínűsíthető, hogy az AT4R nem G fehérje kapcsolt receptor [112]. Az Ang IV intracerebroventrikuláris infúziója fokozza a **c-Fos** expressziót patkányagiban [113]. Az Ang IV HK-2 sejtekben emeli a foszforilált mitogén-aktivált protein kináz (**MAPK**) szintjét és fokozza a **p38 kináz** aktivitását [114]. Az Ang IV adagolása aktiválja a nukleáris faktor-kappa B-t (**NF- κ B**), ami proinflammatorikus gének, például interleukin-6 (**IL-6**), monocita kemoattraktáns fehérje 1 (**MCP-1**), plazminogén aktivátor inhibitor 1 (**PAI-1**), and tumor nekrozis faktor α (**TNF α**) transzkripciójához vezet ér simaizomsejtekben [115] és endothelben [116]. Az Ang IV disznó proximális tubulus epitheliális sejtekben tirozin foszforilációt mediál a **p125-FAK** és **paxillin** fokális adhézió fehérjéken [117]. Az Ang IV upregulálja az extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (**ERK1/2**) jelátviteli útvonalat patkány astrocyta sejt kultúrában [118]. Az Ang IV a **Protein Kináz C zeta** jelátviteli útvonalon keresztül javítja patkányok memóriáját [119]. Az Ang IV potenciózza a **nitrogén-monoxid szintáz** (NOS) működését, az L-argininből előállított **NO** aktiválja a guanilát cikláz, a képződött cGMP pedig vese, tüdő és agy ereken vazodilatátor hatású [120] és hepatoprotektív [121], illetve a NO csökkenti a sejt légzést, gátolja a szuperoxid képződést [78]. Az Ang IV L-típusú **feszültségfüggő Ca²⁺ csatornákon** keresztül növeli az intracelluláris **Ca²⁺** szintet [122], fokozza a szinaptikus jelátvitelt és az LTP-t [123].

Az AT4R/IRAP-t kimutatták szekretoros vezikulákon, a glükóz transzporter 4-gyel (**GLUT4**) kolokalizálódva. A sejtek aktivációjakor a vezikulák a sejtfelszínre transzlokálódnak, az Ang IV kötése pedig meghosszabbítja az IRAP sejtfelszíni tartózkodását és ezáltal fokozza a neuronok GLUT4-n keresztüli **glükóz** felvételét [124, 125].

Legújabban pedig az Ang IV és a hepatocita növekedési faktor (**HGF**) között számos hasonlóságot figyeltek meg és ezért receptorát, az AT4R-t egyesek a HGF receptorával, a **c-Met**-tel azonosítják [126].

Az Ang IV, saját receptora mellett, bár fiziológias körülmények között csak nagyon kis affinitással kötődik az AT1 és AT2 receptorokhoz [127], az egyensúlyi állapotok megbomlása esetén, magas koncentrációban képes az **AT1R**-t is aktiválni [78].

1.5.2.1.3. Az Ang IV és AT4R/IRAP expressziója

Magának az **Ang IV**-nek a kimutatása az **agyban** kihívást jelent, mert általában csak nagyon alacsony koncentrációkban fordul elő [128] és a nyugalmi szintjei sokszor detektálhatatlanok [98].

In vitro **autoradiográfia** segítségével feltérképezték az Ang IV kötőhelyének agyi eloszlását patkányban [113], egérben [129], tengeri malacban [110], futóegérben [130]), makákóban [131], rézusmajomban [132] és emberben [112, 133]. A különböző fajok között konzerváltság figyelhető meg [112]. A radioaktívan megjelölt Ang IV kötőhelyét számos agyi struktúrában kimutatták, a legnagyobb sűrűségben többek között a **neocortexben** [112, 130, 134].

Habár az AT4R-t már több mint 20 éve megfeleltették az **inzulin-regulált aminosavaknak (IRAP)** [104], agyi kifejeződését **immunhisztokémiai** és egyéb módszerekkel alig vizsgálták és publikálták. Az eredmények átfedtek a korábban, radioligand-kötéssel azonosított Ang IV kötőhelyekkel [100]. Prominens IRAP expressziót találtak patkány **agykéreg** egészében [135] és IRAP immunoreaktív sejteket figyeltek meg posztmortem emberi agy cerebrális cortexében [136].

Az AT4R-ről feltételezik, hogy kifejeződése **idegsejtekre** korlátozódhat [78]. Az olfaktórikus régiókban, szeptális és hipotalamikus magokban, a hippocampusban és a

neocortexben az IRAP kizárólag neuronokban expresszáldott [135, 136]. Mindazonáltal az AT4R-ről felmerült, hogy astrocytáiban is előfordulhat, de nagyon kevés az adat erre vonatkozóan [78]. IRAP jelenlétét egyedül patkány astrogliális sejt kultúráiban [118] és Alzheimer demenciás egér agyában a béta-amiloid plakkokat körülvevő aktivált astrocytáiban [137] mutatták ki.

A citoplazma szintjén az IRAP a sejteken belül lokalizálható, a nukleusz kivételével, pontszerű vezikuláris expressziós mintázatban [135].

1.5.2.1.4. Az Ang IV hatása a memóriára egészséges állatokban

Az Ang IV és analógjai jótékony hatással vannak a memóriára egészséges állatokban.

Az Ang IV és az AT4R agonista des-Phe(6)-Ang IV fokozta a tanulást kondicionált elkerülés során [138] és javította a felidézést passzív elkerülés alatt patkányokban [138-140].

Az Ang IV fokozta a memória konszolidációt egerek felismerési tesztjében [141, 142], illetve az Ang IV és a des-Phe(6)-Ang IV javította az ismerős és új tárgyak közötti különbségtételt patkányok felismerési tesztjében [119, 139, 143].

Az AT4R agonista Nle(1)-Ang IV és az IRAP inhibitor LVV-hemorfin-7 kezelésben részesült patkányok kevesebb hibát követtek el és rövidebb távolságokat tettek meg a Barnes-féle körlabirintusban [144]. Az Ang IV és a des-Phe(6)-Ang IV csökkentette a hibák számát, növelte az egymás utáni helyes belépések számát és lerövidítette a célba érési időt patkányok nyolckarú labirintusba helyezésekor [145]. Az Ang IV növelte a alternálási pontszámot emelt keresztlabirintusban, patkányokban [146].

Az AT4R antagonistá Divalinal-Ang IV beadása mélyreható deficitet okozott patkányok Morris-féle vízi labirintusbeli teljesítményében [147]. Globális IRAP knock out egerek térbeli memóriájának életkorral összefüggő, felgyorsult romlását észlelték Y-labirintusban [148], a posztnatális IRAP delécio pedig jelentős hiányosságokat eredményezett mind a térbeli referencia, mind a tárgyfelismerő memóriában [149].

1.5.2.1.5. Az Ang IV hatása a memória deficitekre állatmodellekben

Az Ang IV és analógjai javítják vagy visszafordítják a memóriazavarokat, kognitív diszfunkciókat állatmodellekben.

Az AT4R agonista Nle(1)-Ang IV ellensúlyozta a nAChR antagonistá **mekamilamin** indukálta deficiteket [150]. Az IRAP inhibitor LVV-hemorphin-7 [151], az Nle(1)-Ang IV [152] és különböző Nle(1)-Ang IV származék peptidek [153] pedig számottevő javulást eredményeztek a muszkarinos acetil-kolin receptor (mAChR) antagonistá **szkopolamin** okozta rossz latenciáidőn és megtett távolságon Morris-féle vízi labirintusban, patkányban. Szkopolaminnal kezelt patkányoknál az LVV-hemorphin-7 méréselte a passzív elkerülésben megfigyelt tanulási hiányosságokat [151], az Nle(1)-Ang IV pedig megelőzte nyolckarú labirintusban, spatial win-shift feladatban az indukált deficiteket [154].

Az Ang IV javította a térbeli memóriát a Morris-féle vízi labirintusban **sztreptozotocin**-indukált diabéteszes patkányokban [155].

Az Ang IV mérsékelt hatékonysággal védte a humán neuroglioma H4 sejteket az **alfa-szinuklein** overexpresszióval szemben, genetikai in vitro Parkinson-kór modellben [156]. Az Ang IV helyreállította a rövid távú memóriát és a térbeli tanulást **amiloid prekursor fehérje** transzgenikus, Alzheimer-kórhoz hasonló patológiájú egerekben [157].

1.5.2.1.6. Az Ang IV interakciói neurotranszmitterekkel és neuromodulátorokkal

Az Ang IV **kölcsönhatásait** számos neurotranszmitterrel és neuromodulátorral kapcsolatban tanulmányozták már.

Például az Ang IV potencírozta a depolarizáció-indukált **acetil-kolin** felszabadulást agyszeleteken [158] és modulálta az acetil-kolin szinteket in vivo a hippocampusban, patkányban [159]. A nAChR antagonisták kiváltotta térbeli memória hiányosságokat az AT4R agonista Nle(1)-Ang IV felfüggesztette [150]. Viszont az AT4R blokádozta a teljesítménycsökkenést a Morris-féle vízi labirintusban a nikotinos receptorok aktivációja nem tudta ellensúlyozni [147].

Ezenkívül Ang IV szignifikáns extracelluláris **dopamin** koncentráció emelkedést produkált szabadon mozgó patkány striátumában [160]. Az Ang IV és az AT4R agonista des-Phe6-Ang IV pozitív kognitív hatását a kondicionált elkerülő válaszok megtanulásában, passzív elkerülés felidézésében és új tárgyak felismerésében a D1 receptor antagonisták [138], D2 receptor blokádnak [161], D3 receptor parciális agonisták [162] és a D4 receptor blokkolók [145] megszüntették.

Ellenben az Ang IV, illetve a **glutamát** és az NMDAR interakciója alig kutatott, az is csak a hippocampus területén, patkányban. Sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányok Ang IV kezelt csoportjában szignifikánsan emelkedett NMDA szinteket találtak [155]. Illetve megállapították, hogy az AT4R-függő LTP-re az NMDA receptor antagonisták nincsenek hatással. [123].

1.5.2.1.7. Az Ang IV elektrofiziológiai vizsgálatokban

Az Ang IV-gyel kapcsolatos **elektrofiziológiai** vizsgálatok a **hippocampuszra**, a CA1 régióra fókuszáltak. Az AT4R aktivációja megemelte az intracelluláris Ca^{2+} szinteket és LTP-t váltott ki [123]. Az AT4R agonista Nle(1)-Ang IV fokozta a szinaptikus jelátvitelt alacsony frekvenciás teszt pulzusok során [163]. Mind az Ang IV, mind az Nle(1)-Ang IV szignifikánsan facilitálta a normális tetánia-indukált LTP-t [163, 164]. Az Nle(1)-Ang IV ellensúlyozta az etanol kiváltotta LTP szuppressziót [165]. Az Ang IV és az Nle(1)-Ang IV fokozta a excitatórikus posztzinaptikus potenciálok (EPSP) amplitúdóját és meredekségét [119], illetve a mini excitatórikus posztzinaptikus áramok (mEPSC) frekvenciáját [153, 166].

Azonban az Ang IV-t érintő patch clamp kísérleteket a **prefrontális kéregben** még nem publikáltak.

2. Célkitűzések

Célunk a glutamáterg rendszer, az NMDA receptorok angiotenzinerg neuromodulációjának vizsgálata a PFC V. sejtrétegében található piramidális neuronokon.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak során az Ang II magasabb koncentrációinak NMDA receptorokra kifejtett negatív modulációját mutatta ki, melyet sem AT1R, sem AT2R antagonistá adása nem függesztett fel. Feltételeztük, hogy a gátlás egy Ang II-ből képződő másik RAS ligandon, az Ang IV-n és saját receptorán, az AT4R/IRAP-on keresztül jött létre.

PhD munkám, saját kutatásaim konkrét célja az Ang IV negatív moduláló hatásának megerősítése, szignáltranszdukciójának és konnektivitásának tisztázása, illetve az AT4R/IRAP sejt-specifikus lokalizációjának feltérképezése. Szélesebb kontextusban a prefrontális cortex fiziológias működésének, illetve a régiót érintő neurológiai és pszichiátriai betegségek patomechanizmusának celluláris szintű megértése, terápiás céltargetek keresése.

3. Módszerek

3.1. Elektrofiziológia

3.1.1. Agyszelet preparáció

A preparációt munkacsoportunk és kollaborációink korábbi kísérleteihez hasonlóan végeztük [63, 64, 70, 167-172].

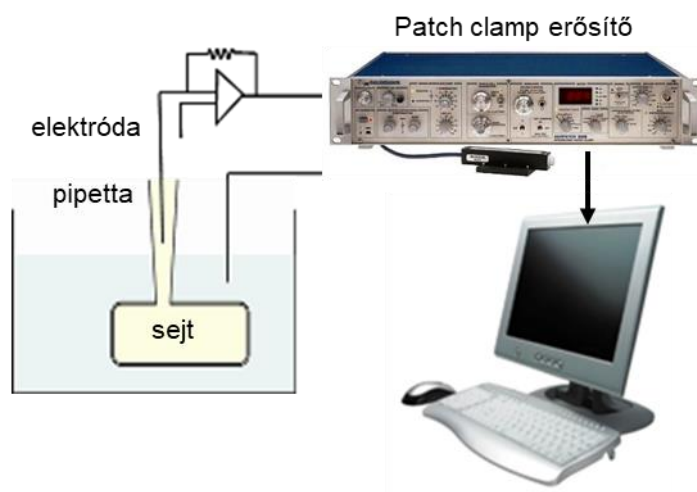
A 9-12 napos Wistar patkányokat dekapitáltuk, az agyukat néhány percre az alábbi összetételű, 0 °C-s, karbogenizált (95 % O₂, 5 % CO₂) arteficiális cerebrospinális fluidum (ACSF) oldatba helyeztük (mM): NaCl 126, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.4, MgCl₂ 1.3, NaHCO₃ 25 és glükóz 11. A mediális PFC prelimbikus részét tartalmazó szövettömbből 200 µm vastagságú frontális szeleteket készítettünk erre a célra szolgáló rezgőkéses mikrotom (MA752 mikrotom, Campden Instruments, Anglia) segítségével. A szeleteket karbogenizált ACSF oldatban 45 percig testhőmérsékleten (36 °C) inkubáltuk (Haake DC 10, Thermo Electron Corporation, USA), majd a továbbiakban szobahőmérsékleten (20-22 °C) tartottuk. Az egyes agyszeleteket a patch clamp készülék mérő kamrájába helyeztük, ahol egy perisztaltikus pumpa (MCP Standard, Ismatec, Németország/Svájc) segítségével szobahőmérsékletű (20-22 °C) ACSF oldatot áramoltattunk rajtuk keresztül 2,5-3 ml/min sebességgel.

3.1.2. Whole-cell patch-clamp mérés agyszeleten

A whole-cell patch-clamp felvételt munkacsoportunk és kollaborációink korábbi kísérleteihez hasonlóan végeztük [63, 64, 70, 167-172].

A piramissejteket vizuálisan azonosítottuk 40x víz immerziós objektívű optikai mikroszkóp (Axioskop 2 FS, Carl Zeiss, Németország) segítségével. A patch pipettákat boroszilikát üveg kapillárisokból készítettük vertikális mikropipetta húzóval (PP-83, Narishige, Japán) és az alábbi összetételű standard intracelluláris (IC) oldattal töltöttük meg (mM): K-glukonát 140, NaCl 10, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 11, Mg-ATP 1.5 és Li-GTP 0.3; a pH-t 7.3-ra állítottuk be KOH-dal. A pipetták ellenállása 5-7 MΩ volt. A whole-cell konfiguráció elérése után a rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk, hogy a patch pipetta és a sejtplazma közötti diffúziós egyensúly kialakulhasson. Utána 10

percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μ M NMDA tartalmú ACSF-t adtunk, amely a sejtbe befelé irányuló kationáramokat váltott ki, melyeket T_1 , T_2 , T_3 -mal jelöltünk. Az NMDA áramokat a patch-clamp erősítő (Axopatch 200B, Axon Instruments, Kanada) voltage-clamp üzemmódjában, a piramissejtek membrán feszültségét -70 mV-n tartva regisztráltuk. A kísérlet folyamán a feltételezett neuromodulátorokat T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk, amikor a neuromodulátor antagonistájával is dolgoztunk, az a teljes mérés alatt jelen volt az ACSF-ben. Az adatokat 2 kHz beépített filterrel szűrtük, 10 kHz-cel digitalizáltuk (Digidata 1200 series, Axon Instruments, Kanada), illetve kereskedelemben elérhető szoftver (pClamp 10.2, Molecular Devices, USA) segítségével rögzítettük és elemeztük. Kontroll kísérleteink azt mutatták, hogy az áramok T_3/T_2 viszonylatban stabilak, ezért továbbiakban eredményeinket ebben az összefüggésben vizsgáltuk és T_3/T_2 hányadosként ábrázoltunk. A piramidális neuron populáció heterogenitására és a válaszaik variabilitására való tekintettel a következő módszert alkalmaztuk az adatok elemzésére. Meghatároztunk egy kizárási kritériumot a kontrollcsoportok átlagából, az átlagok standard hibájából (SEM) és a 99,9 %-os konfidencia intervallumból. A határérték 10-15 % körül mozgott. Ennek megfelelően a különböző csoportok esetében hatásnak a T_3/T_2 arány ± 10 -15 %-os eltérését tekintettük a vonatkozó kontrollcsoportéhoz képest. Statisztikai analízist Kruskal-Wallis egyutas ANOVA és post-hoc Bonferroni teszttel végeztünk. A p-érték $\leq 0,05$ -öt tekintettük szignifikánsnak.



2. ábra. Az elektrofiziológiai vizsgálat vázlatos ábrázolása. A whole-cell konfigurációban lévő sejtől (balra) az NMDA kiváltotta membrán kationáramokat az

erősítő voltage-clamp üzemmódjában regisztráljuk (jobbra fent) és a számítógépen rögzítjük (jobbra lent).



3. ábra. Az elektrofiziológiai vizsgálatoknál alkalmazott mérési protokoll. A rendszert 10 percig nyugalomban hagyjuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μ M NMDA tartalmú ACSF-t adunk. A feltételezett neuromodulátorokat T₃ előtt 5 perccel és T₃ alatt adjuk. Amikor a neuromodulátor antagonistájával is dolgozunk, az a teljes mérés alatt jelen van az ACSF-ben. [73]

3.2. Immunhisztokémia

3.2.1. Szövetgyűjtés

A 10 napos és 6 hónapos Wistar patkányok agyát a korábban leírtakhoz hasonlóan in vivo fixáltuk [173].

A patkányokat izoflurán (5 %) inhaláltatásával, illetve ketamin (100 mg/tskg) és xylazin (10 mg/kg) intraperitoneális injekciójával anesztetizáltuk. A műtéti beavatkozás alatt az állatokat tört jégre fektettük. Felső haránt hasi metszéssel laparotomiát, majd a diaphragma mellkasfalról történő lepreparálását követően bilaterális hosszanti mellkasi vágással thoracotomiát végeztünk, aztán a pericardiumot a sternumról óvatos metszéssel leválasztottuk. A bal kamrán keresztül kanült (ISM580 vagy ISM583, Cole Palmer, USA) vezetünk az ascendens aortába és kocherral rögzítettük, végül a jobb pitvart ollóval megnyitottuk. A még verő szíven és a saját érrendszeren keresztül szobahőmérsékletű PBS-t (154 mM NaCl, 1,058 mM KH₂PO₄, 5,601 mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH=7,4), majd formalint (4 %) áramoltattunk keresztül egy perisztaltikus pumpa (MCP Standard, Ismatec, Németország/Svájc) használatával. Az egész agyakat óvatosan eltávolítottuk és

4 °C-on formalinba (4 %) helyeztük 24 órára. Utoljára a szerveket paraffinba ágyasztuk, dehidráltuk és 4 µm-s szeleteket metszettünk belőlük.

3.2.2. Festés

A **deparafinizáció**hoz a metszeteket kétszer 5 percig xilolba, a **rehidráláshoz** kétszer 5 percig abszolút alkoholba, 5-5 percig 95 %-os, 80 %-os, majd 70 %-os etanolba, utoljára 1 percig, majd 5 percig desztillált vízbe helyeztük szobahőmérsékleten. Az **antigének visszanyeréséhez** 15 percig citrát pufferben (pH=6) inkubáltuk 95°C-n, majd háromszor 5 percig PBS-ben mostuk rázás nélkül szobahőmérsékleten. Végül a **szérumblokkoláshoz** éjszaka komplett blokkolóban (2,5 % szarvasmarha szérum albumin (BSA), 2,5 % zsírszegény porlasztott, szárított teljes tejpor (NFDM), 2,5 % normál ló szérum (HS), 2,5 % normál kecske szérum (GS) PBS-ben oldva) inkubáltuk 4°C-on.

A 10 napos és 6 hónapos állatok monofestése esetén egyedül a céltargeteink, az AT1R vagy AT4R ellen alkalmaztunk **elsődleges antitestet**. Az anti-AGTR1 nyúl poliklonális ellenanyagot (pEa) (MBS151548, MyBioSource, USA) vagy az anti-IRAP (D2C5)XP® nyúl monoklonális ellenanyagot (mEa) (Cell Signaling Technology, USA) 150x vagy 150x hígítottuk komplett blokkolóban és éjszaka inkubáltuk 4°C-on. A peptid kontrollhoz az anti-AGTR1 nyúl pEa-t AGTR1 blokkoló peptiddel (MBS152017, MyBioSource, USA) 1 órán át előinkubáltuk szobahőmérsékleten, izotípus kontrollnak komplett blokkolóban 525x hígított nyúl poliklonális ellenanyagot (pEa) (31235, Invitrogen, USA), illetve ellenanyag mentes kontrollnak komplett blokkolót használtunk. A következő napon ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána egy újfajta, **tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos ellenanyagot és fluoreszcens festékkel konjugált tiramid jel amplifikálót** alkalmaztunk. Az ImmPRESS® HRP lóban készült, patkány-adszorbeált, anti-nyúl IgG-t (Vector Laboratories, USA) 1,5x hígítottuk 2,5 % normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. A TSA-FITC-t (Akoya Biosciences, USA) 1000x hígítottuk 1x Plus Amplification Diluentben (Akoya

Biosciences, USA) és 6 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten.

A 10 napos állatok kofestése esetén céltargetünk, az AT4R mellett a GABAerg interneuron, astrocyta és microglia sejttípus markerek, a glutamát dekarboxiláz 67 kDa izoforma (GAD67), gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) és ionizált Ca^{2+} -kötő adapter molekula 1 (IBA1) ellen is használtunk **elsődleges antitesteket**. Illetve mindkét esetben az újfajta, **HRP konjugált másodlagos ellenanyagot és fluoreszcens festékek konjugált tiramid jel amplifikálót** alkalmaztuk. Az anti-IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa-t (Cell Signaling Technology, USA) 100x hígítottuk komplett blokkolóban és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Izotípus kontrollnak komplett blokkolóban 350x hígított nyúl pEa-t (31235, Invitrogen, USA), illetve ellenanyag mentes kontrollnak komplett blokkolót használtunk. Utána az ImmPRESS® HRP lóban készült, patkány-adszorbeált, anti-nyúl IgG-t (Vector Laboratories, USA) 1,7x hígítottuk 2,5 % normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána a TSA-FITC-t (Akoya Biosciences, USA) 1000x hígítottuk 1x Plus Amplification Diluentben (Akoya Biosciences, USA) és 6 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána mikrohullámú kezelést végeztünk [174, 175]. A tárgylemezeket citrát pufferrel (pH=6) töltött fekete műanyag tartályba tettük, majd 800 W-os mikrohullámú sütőbe helyeztük. A folyadékot 100 %-os teljesítményen kb. 2,5 perc alatt forráspontig hevítettük. Ezt követően a metszeteket 50 %-os teljesítményen további 5 percig melegítettük. Végül a mintákat a citrát pufferben 30 percig szobahőmérsékleten hűlni hagytuk, majd háromszor 5 percig PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána az anti-GAD67 (1G10.2) egér mEa-t (Sigma-Aldrich, USA), anti-GFAP (G3893) egér mEa-t (Sigma-Aldrich, USA) vagy anti-Iba1 (GT10312) egér mEa-t (Invitrogen, USA) 50x, 100x vagy 100x hígítottuk komplett blokkolóban és éjszaka inkubáltuk 4 °C-on, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Izotípus kontrollnak komplett blokkolóban 50x hígított egér IgG2a mEa-t (02-6200, Invitrogen, USA) vagy 100x hígított egér IgG1 mEa-t (MA1-10407, Invitrogen, USA), illetve

ellenanyag mentes kontrollnak komplett blokkolót használtunk. Utána az ImmPRESS® HRP lóban készült, patkány-adszorbeált, anti-egér IgG-t (Vector Laboratories, USA) 2x hígítottuk 2,5 % normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána a TSA-Cy3-t (Akoya Biosciences, USA) 1000x hígítottuk 1x Plus Amplification Diluentben (Akoya Biosciences, USA) és 6 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten.

A 6 hónapos állatok kofestése esetén céltargetünk, az AT4R mellett a GABAerg interneuron, astrocyta és microglia sejttípus markerek, a GAD67, GFAP és IBA1 ellen is használtunk **elsődleges antitesteket**. De csak az előbbinél vettük igénybe az újfajta, **HRP konjugált másodlagos ellenanyagot és fluoreszcens festékekkel konjugált tiramid jel amplifikálót**, utóbbiaknál a konvencionális **fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos ellenanyag is** elegendőnek bizonyult. Az anti-IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa-t (Cell Signaling Technology, USA) 200x hígítottuk komplett blokkolóban és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Izotípus kontrollnak komplett blokkolóban 700x hígított nyúl pEa-t (31235, Invitrogen, USA), illetve ellenanyag mentes kontrollnak komplett blokkolót használtunk. Utána az anti-GAD67 (1G10.2) egér mEa-t (Sigma-Aldrich, USA), anti-GFAP (G3893) egér mEa-t (Sigma-Aldrich, USA) vagy anti-Iba1 (GT10312) egér mEa-t (Invitrogen, USA) 150x, 100x vagy 100x hígítottuk komplett blokkolóban és éjszaka inkubáltuk 4 °C-on, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Izotípus kontrollnak komplett blokkolóban 150x hígított egér IgG2a mEa-t (02-6200, Invitrogen, USA) vagy 100x hígított egér IgG1 mEa-t (MA1-10407, Invitrogen, USA), illetve ellenanyag mentes kontrollnak komplett blokkolót használtunk. Utána az Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor ® 555-t (Cell Signaling Technology, USA) vagy Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor ® 647-t (Cell Signaling Technology, USA) 500x hígítottuk komplett blokkolóban és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána az ImmPRESS® HRP lóban készült, patkány-adszorbeált, anti-nyúl IgG-t (Vector Laboratories, USA) 1,7x hígítottuk 2,5 % normál kecske

szérumot tartalmazó PBS-ben és 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten. Utána a TSA-FITC-t (Akoya Biosciences, USA) 1000x hígítottuk 1x Plus Amplification Diluentben (Akoya Biosciences, USA) és 6 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ötször 10 percig 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-ben mostuk óvatos rázással szobahőmérsékleten.

Ellenfestéshez a mintákon 5 percig DAPI-t (Thermo Fisher Scientific, USA) alkalmaztunk szobahőmérsékleten. Utána tárgylemezeken Fluoromount (Leica, Németország) segítségével rögzítettük a **fedőlemezt**. A festett szegmenseket **vizualizáltuk** és a képeket Leica SP8 konfokális mikroszkóppal vettük fel.

1. táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatoknál használt elsődleges ellenanyag, kontroll és másodlagos ellenanyag kombinációk.

Kor	Sejt-típus marker	Elsődleges ellenanyag kombinációk	Kontroll kombinációk	Másodlagos ellenanyag kombinációk
10 nap	Ø	AGTR1 (MBS151548) nyúl pEa (MyBioSource)	AGTR1 (MBS151548) nyúl pEa + AGTR1 blokkoló peptid (MBS152017) (MyBioSource)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Ø	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology)	Nyúl IgG (31235) izotípus kontroll (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
6 hónap	Ø	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	GABAerg interneuron	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GAD67 (1G10.2) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG2a (02-6200) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Astrocyta	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GFAP (G3893) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Microglia	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) Iba1 (GT10312) egér mEa (Invitrogen)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
6 hónap	GABAerg interneuron	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GAD67 (1G10.2) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG2a (02-6200) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor @ 555 (Cell Signaling Technology),
6 hónap	Astrocyta	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GFAP (G3893) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor @ 647 (Cell Signaling Technology)
6 hónap	Microglia	IRAP (D2C5)XP* nyúl mEa (Cell Signaling Technology) Iba1 (GT10312) egér mEa (Invitrogen)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagentek, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor @ 555 (Cell Signaling Technology)

3.3. Molekuláris biológia

3.3.1. Szövetgyűjtés

A 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos Wistar patkányok agyát a korábban leírtakhoz hasonlóan in vivo mostuk át [173].

A patkányokat izoflurán (5 %) inhaláltatásával, illetve ketamin (100 mg/tskg) és xylazin (10 mg/kg) intraperitoneális injekciójával anesztetizáltuk. A műtéti beavatkozás alatt az állatokat tört jégre fektettük. Felső haránt hasi metszéssel laparotomiát, majd a diaphragma mellkasfalról történő lepreparálását követően bilaterális hosszanti mellkasi vágással thoracotomiát végeztünk, aztán a pericardiumot a sternumról óvatos metszéssel leválasztottuk. A bal kamrán keresztül kanült (ISM580 vagy ISM583, Cole Palmer, USA) vezetünk az ascendens aortába és kocherral rögzítettük, végül a jobb pitvart ollóval megnyitottuk. A még verő szíven és a saját érrendszeren keresztül szobahőmérsékletű PBS-t (154 mM NaCl, 1,058 mM KH_2PO_4 , 5,601 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4) áramoltattunk keresztül egy perisztaltikus pumpa (MCP Standard, Ismatec, Németország/Svájc) használatával. Utoljára az egész agyakat óvatosan eltávolítottuk és a mPFC-eket $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -n QIAzolban (Qiagen, Hollandia) tároltuk.

3.3.2. RNS izolálás

A **mPFC-eket** 1 mL QIAzolban (Qiagen, Hollandia) per 50-100 mg szövet lizáltuk és homogenizáltuk (Ultra Turrax TP 18-10, Janke & Kunkel, Németország). A mintákhoz 0,2 mL kloroformot (Sigma-Aldrich, USA) per 1 mL lízisnél használt QIAzol adtunk, néhány percig szobahőmérsékleten nyugalomban hagytuk, majd 15 percig $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on 12000 G-n centrifugáltuk (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Németország), hogy szétváljanak egy felső tiszta, vizes rétegre (amely RNS-t tartalmaz), egy köztes fázisra és egy alsó, vörös, fenol-kloroform rétegre (amely DNS-t és fehérjéket tartalmaz).

Az **RNS-t tartalmazó fázist** tiszta csőbe transzferáltuk, 2 μL GlycoBlue-t (Applied Biosystems, USA) adtunk hozzá koprecipitánsként, 0,5 mL isopropanollal (Sigma-Aldrich, USA) per 1 mL lízisnél használt QIAzol precipitáltuk, 10 percig $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on nyugalomban hagytuk, 10 percig $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on 12000 G-n centrifugáltuk (Centrifuge 5810 R,

Eppendorf, Németország), majd a felülúszót eltávolítottuk, hogy fehér, gél-szerű pelletet nyerjünk. A kicsapott RNS-t 1 mL 75%-os etanollal (Reanal Labor, Magyarország) per 1 mL lízisnél használt QIazol mostuk, rövid ideig vortexeltük, 5 percig 4 °C-on 7500 G-n centrifugáltuk (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Németország), majd a felülúszót eltávolítottuk, utána a lépéseket további kétszer ismételtük. Végül a pelletet 5-10 percig szárítottuk.

3.3.3. RNS mennyiségi meghatározás

Az **RNS pelletet** 30 µL nukleáz mentes vízben (vWR, USA) reszuszpendáltuk, majd 15 percig 60 °C-on fűtőblokkban (ThermoStat plus, Eppendorf, Németország) inkubáltuk.

A minták **RNS hozamát** spektrofotométer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztuk meg. 260 nm-en a teljes nukleinsavtartalomnak, 280 nm-en pedig a minta tisztaságának abszorbanciáját mértük. Az RNS koncentrációját az „A260 × hígítás × 40 = µg RNA/mL” képlettel számítottuk ki, tisztaságát az „A260/A280” aránnyal ellenőriztük.

3.3.4. DNáz emésztés

Az RNS minták esetleges DNS szennyeződését DNáz enzimatis emésztéssel távolítottuk el. A 3 µg **RNS-t tartalmazó oldatot**, 3 µl 10x hígított reakció puffert (Thermo Fisher Scientific, USA), 3 µl DNáz I-t (Thermo Fisher Scientific, USA) és 30 µl-ig nukleáz mentes vizet (vWR, USA) jégen elegyítettünk, majd 30 percig 37 °C-on fűtőblokkban (ThermoStat plus, Eppendorf, Németország) inkubáltuk. A mintákhoz 3 µl 50mM-s EDTA-t adtunk hozzá jégen, majd 10 percig 65 °C-on inkubáltuk.

3.3.5. cDNS szintézis

A minták RNS tartalmát cDNS-re fordítottuk. A cDNS szintézist SensiFAST cDNS Szintézis Kit protokollja alapján végeztük. Az 1,125 µg **RNS-t tartalmazó oldatot**, 6 µl 5x hígított TransAmp Puffert (Bioline, Kanada), 1,5 µl reverz transzkriptázt (Bioline, Kanada) és 30 µl-ig nukleáz mentes vizet (vWR, USA) röviden vortexeltünk,

centrifugáltunk, majd pipettázással óvatosan összekevertük. A PCR készüléken (Mastercycler gradient, Eppendorf, Németország) 10 percig 25 °C-on primer hibridizációt, 15 percig 42 °C-on reverz transzkripciót, 5 percig 85 °C-on inaktivációt végeztünk, végül a mintákat 10 percig 4°C-on tartottuk.

3.3.6. Primer tervezés

A *Rattus norvegicus*, NM_001113403.3, leucil és cisztin aminopeptidáz (Lnpep) gént az NCBI adatbázisában [176] azonosítottuk. A primereket az NCBI Primer-BLAST eszközzel [177] terveztük. Forward primernek az 1132:1151 szakaszt (TGAGCACAT ACCTGGTTGC T) választottuk ki, mely 20 bp hosszúságú. Reverz primernek az 1319:1339 szakaszt (AT TGGATCTGGT GGCCATTCC) választottuk ki, mely 21 bp hosszúságú és 1323:1324 között tartalmaz egy exon-exon határt. Amplikonnak az 1132:1339 szakasz (TGAGCACAT ACCTGGTTGC TTTCATTGTA GGGGAGATGA GGAACCTGAG TCAGGATGTA AACGGGACTC TGGTTTCTGT ATATGCTGTA CCAGAAAAA TTGATCAAGT TTACCATGCC TTGGACACAA CTGTAAAGCT CCTTGAGTTT TATCAAAATT ACTTTGAAAT TCAATACCCA CTAAAGAAAT TGGATCTGGT GGCCATTCC) adódott, mely 208 bp hosszúságú és 1202:1203, 1323:1324 között tartalmaz két exon-exon határt.

A primereket az Integrated DNA Technológiától rendeltük meg. A forward primer (rIRAPf1) adatai: szekvencia: 5' - TGA GCA CAT ACC TGG TTG CT - 3', $T_m=56,6$ °C, MW = 6108 g/mol, m = 0,14 mg, V = 231 µL, cc = 100 µM. A reverz primer (rIRAPr1) adatai: szekvencia: 5' - GGA ATG GCC ACC AGA TCC AAT - 3', $T_m=57,6$ °C, MW = 6424,2 g/mol, m = 0,13 mg, V = 205 µL, cc = 100µM.

3.3.7. Nem kvantitatív PCR

A minták cDNS tartalmát amplifikáltuk. A nem kvantitatív PCR-t a SensiFAST SYBR No-ROX Kit protokollja alapján végeztük. 12 µl-t a **cDNS-t tartalmazó oldatból**, 0,9 µl 10x hígított forward primert (Integrated DNA Technologies, USA), 0,9 µl 10x hígított reverz primert (Integrated DNA Technologies, USA), 1,2 µl nukleáz mentes vizet (vWR, USA) és 15 µl Master mixet (Bioline, Kanada) jégen elegyítettünk, röviden vortexeltünk

és centrifugáltunk. A PCR készüléken (Mastercycler gradient, Eppendorf, Németország) a mintákat 2 percig 95 °C-on inkubáltuk. Majd 5 másodpercig 95 °C-on denaturációt, 10 másodpercig 60 °C-on hibridizációt, 20 másodpercig 72 °C-on polimerizációt végeztünk és a lépéseket további 31x megismételtük. Utána a mintákat 30 másodpercig 72 °C-on, végül 4 °C-on tartottuk.

3.3.8. Gélelektroforézis

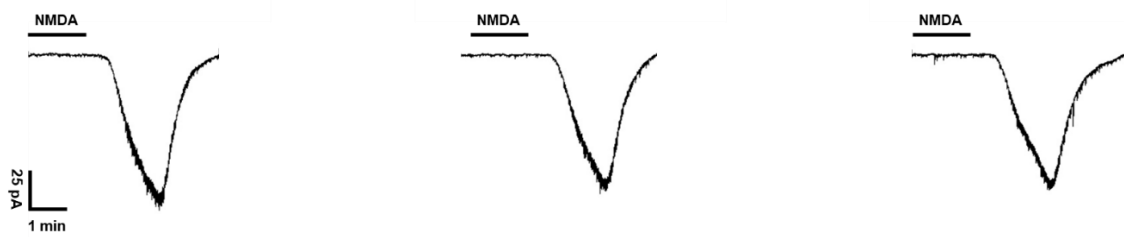
A PCR termékek méretét gélelektroforézissel analizáltuk. 2%-os agaróz gél készítettünk. Boroszilikát üvegbe 2 g agarózt (Thermo Fisher Scientific, USA) szórtunk és 100 ml 1x TAE puffert (TRIS, acetát, EDTA) öntöttünk, majd az elegyet mikrohullámú sütőben gyakori rázogatók mellett melegítettük, amíg áttetsző, szemcsétlen folyadékot nem kaptunk. Az oldatot kézmelegre hűtöttük vissza és 10000x hígított GelRed DNS festéket (Sigma-Aldrich, USA) adtunk hozzá. Kis futtatókádba mintafelvívő fésűt helyeztünk, aztán a szirupot beleöntve hagytuk megszilárdulni. Végül a kádat 1x TAE pufferral töltöttük fel.

4-4 µl **PCR termék**hez 1-1 µl loading dye-t (Thermo Fisher Scientific, USA) kevertünk és a mintákat a gél vályúiba mértük. A szélső zsebbe 100 bp DNS létrát (Thermo Fisher Scientific, USA) pipettáztunk. A mintákat 60 V feszültségen 90 percig futtattuk. Végül a DNS sávokat UV átvilágító asztalon (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, USA) detektáltuk.

4. Eredmények

4.1. Kontrollvizsgálatok

Vizsgáltuk a PFC V. réteg piramisneuronjain az NMDA ($30\ \mu\text{M}$) kiváltotta membrán kationáramok egymáshoz viszonyított arányát, mely során T_2 - T_3 viszonylatban reprodukálható amplitúdókat kaptunk, ezért továbbiakban eredményeinket ebben az összefüggésben vizsgáltuk és T_3/T_2 hányadosként ábrázoltunk. A piramidális neuron populáció heterogenitására és a válaszaik variabilitására való tekintettel a következő módszert alkalmaztuk az adatok elemzésére. Meghatároztunk egy kizárási kritériumot a kontrollcsoportok átlagából, az átlagok standard hibájából (SEM) és a 99,9%-os konfidencia intervallumból. A határérték 10-15% körül mozgott. Ennek megfelelően a különböző csoportok esetében hatásnak a T_3/T_2 arány ± 10 -15%-os eltérését tekintettük a vonatkozó kontrollcsoportéhoz képest. Statisztikai analízist Kruskal-Wallis egyutas ANOVA és post-hoc Bonferroni teszttel végeztünk. A p-érték $\leq 0,05$ -öt tekintettük szignifikánsnak.

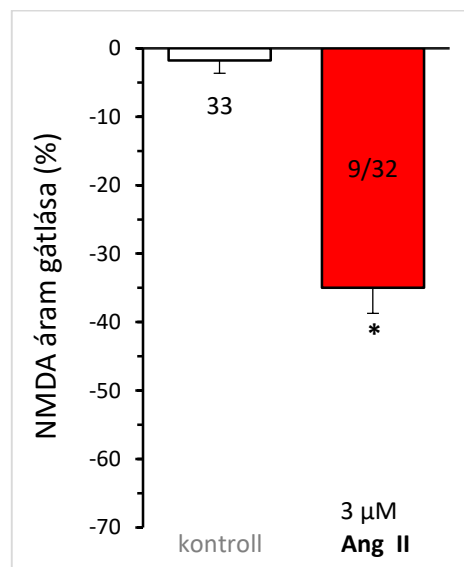
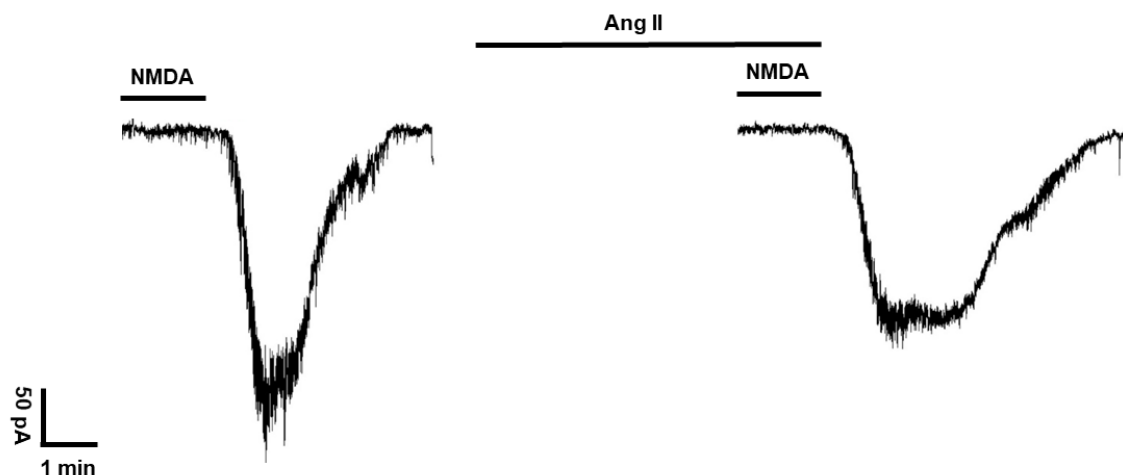


4. ábra. NMDA ($30\ \mu\text{M}$) indukálta membrán kationáramok a PFC V. réteg piramisneuronjaiban, 9-12 napos patkányban. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált $-70\ \text{mV}$ -on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig $30\ \mu\text{M}$ NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Membrán kationáramok reprezentatív áramerősség-idő grafikonja.

4.2. Az angiotenzin II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein

4.2.1. Az Ang II gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjein

Korábbi kísérletünket nagyobb elemszámmal megismételtük és azzal egybehangzó eredményt kaptunk. Az Ang II fiziológiásat meghaladó koncentrációban gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. 3 μ M-s koncentrációnál átlagosan $65,04 \pm 3,77$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 9/32 db sejt esetén.

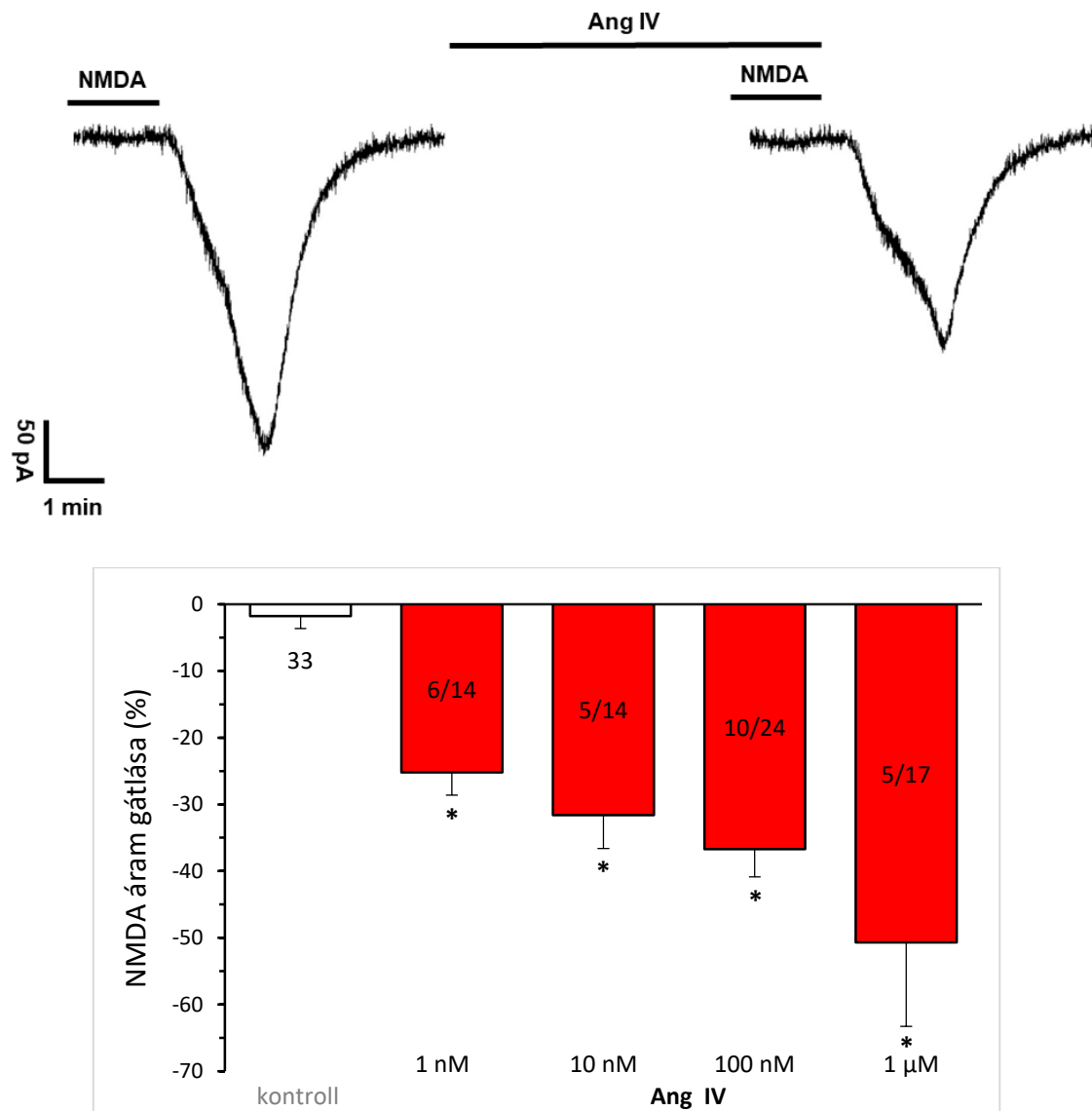


5. ábra. Az Ang II (3 μ M) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjeiben, 9-12 napos patkányban. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV-on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μ M NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az Ang II-t T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk. Fent: membrán kationáramok reprezentatív áramerősség-idő grafikonja. Lent: A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang II) a reagáló sejtek száma látható. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis egyutas ANOVA-t és Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$.

4.3. Az angiotenzin IV hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC V. rétegének piramissejtjein

4.3.1. Az Ang IV gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjein

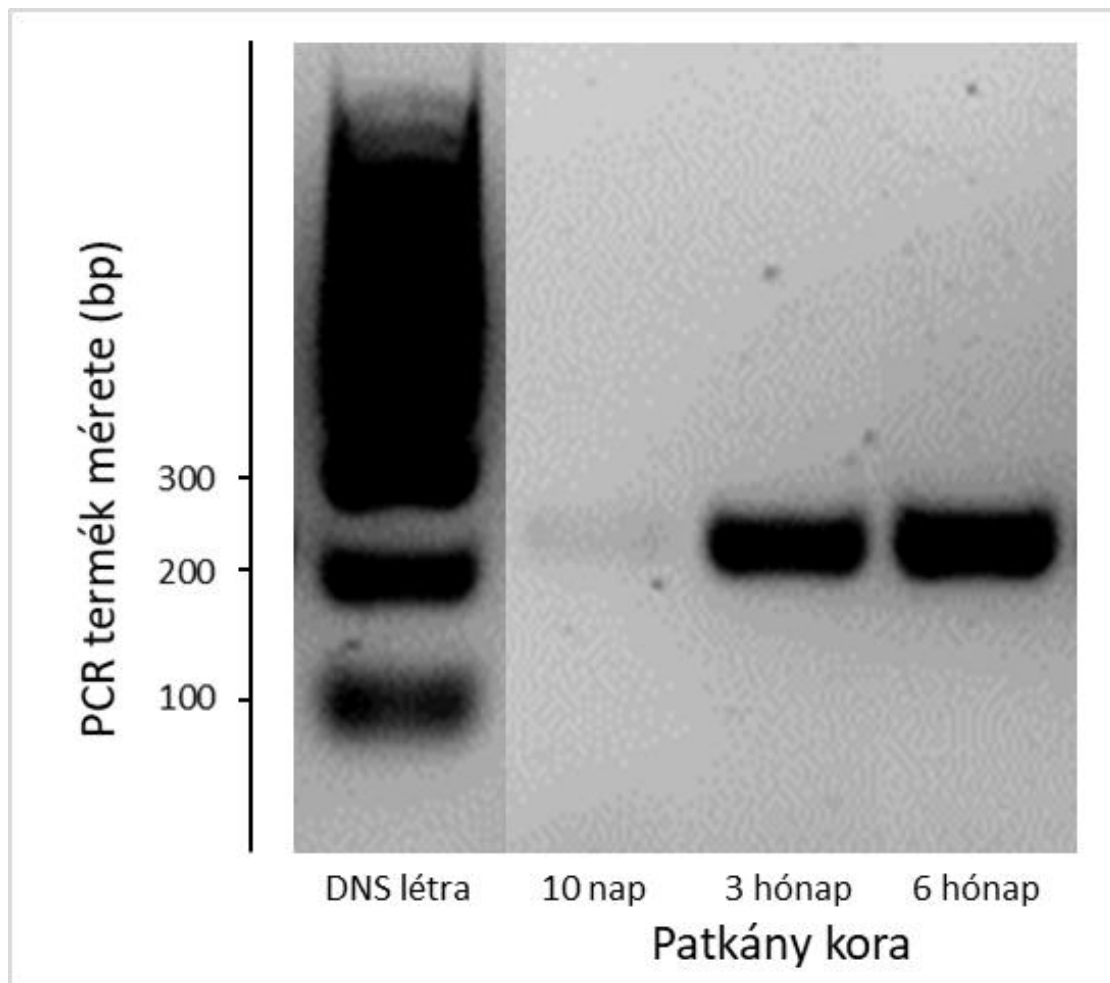
Az Ang IV széles koncentrációtartományban gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. 1 nM-s koncentrációnál átlagosan $74,78 \pm 3,41$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14 db, 10 nM-nál $68,40 \pm 5,04$ %-t 5/14 db, 100 nM-nál $63,29 \pm 4,14$ %-t 10/24 db, 1 μ M-nál $49,31 \pm 12,57$ %-t 5/17 db sejt esetén. Érdekes módon nagyobb koncentrációnál, néhány sejtnél sporadikusan potenciációt is megfigyeltünk. 1 μ M-s koncentrációnál átlagosan $142,09 \pm 12,21$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 4/17 db sejt esetén.



6. ábra. Az Ang IV különböző koncentrációinak (1 nM - 1 μM) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjeiben, 9-12 napos patkányban. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV-on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μM NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az Ang IV-t T₃ előtt 5 perccel és T₃ alatt adtuk. Fent: membrán kationáramok reprezentatív áramerősség-idő grafikonja. Lent: A T₃-nál mért válaszokat a T₂-nél mérthez normalizáltuk. *n* kísérlet átlaga±SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis egyutas ANOVA-t és Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk, *p* a szignifikanciát jelöli, * *p* < 0,01.

4.3.2. Az AT4R/IRAP mRNS szinten expresszálódik a PFC-ben

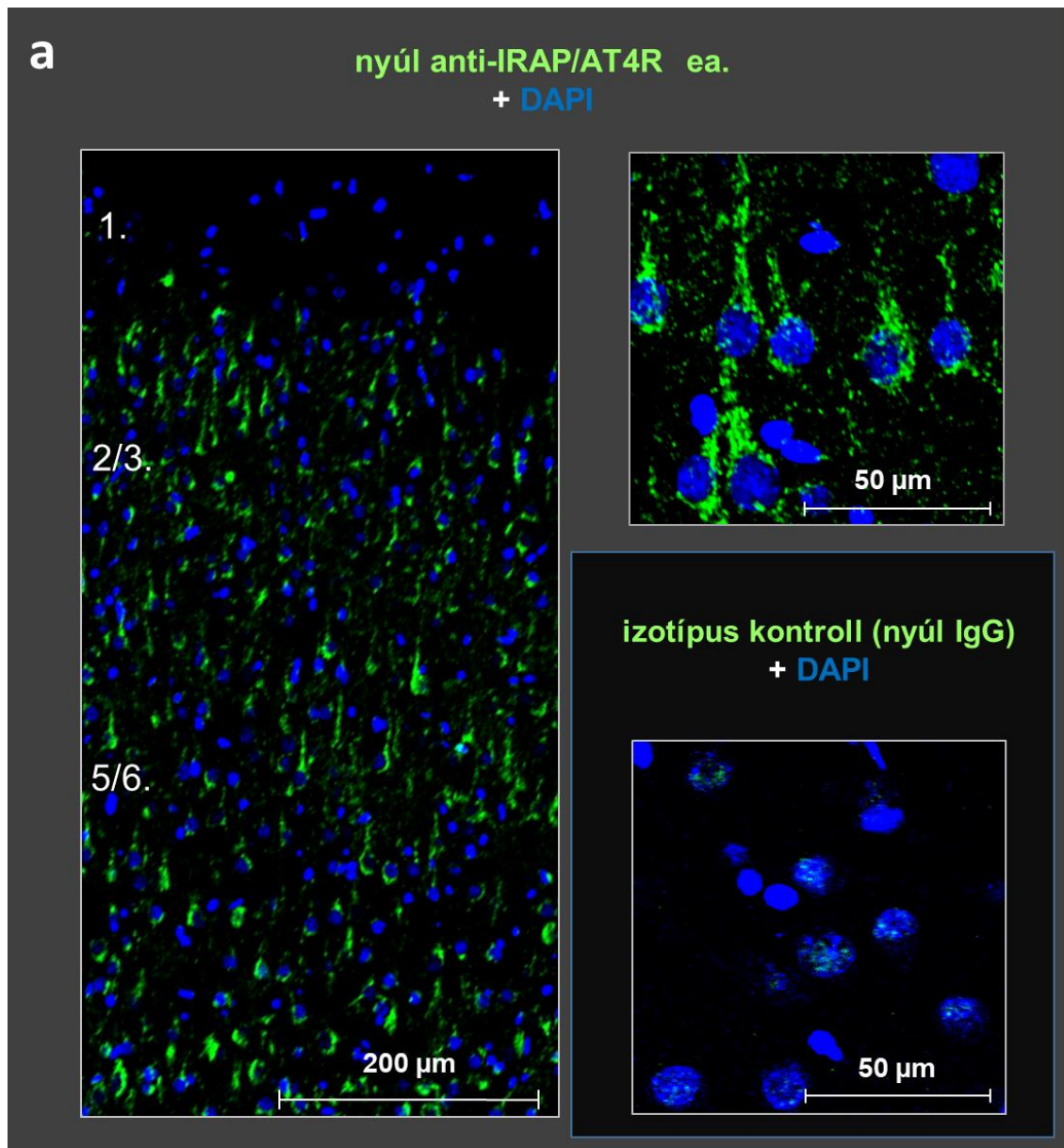
Molekuláris biológiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP-t kódoló nukleinsav jelenlétét 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkányok PFC-jében. Az előbbi korcsoportban jelzett, utóbbiakban kifejezett expresszió volt megfigyelhető.

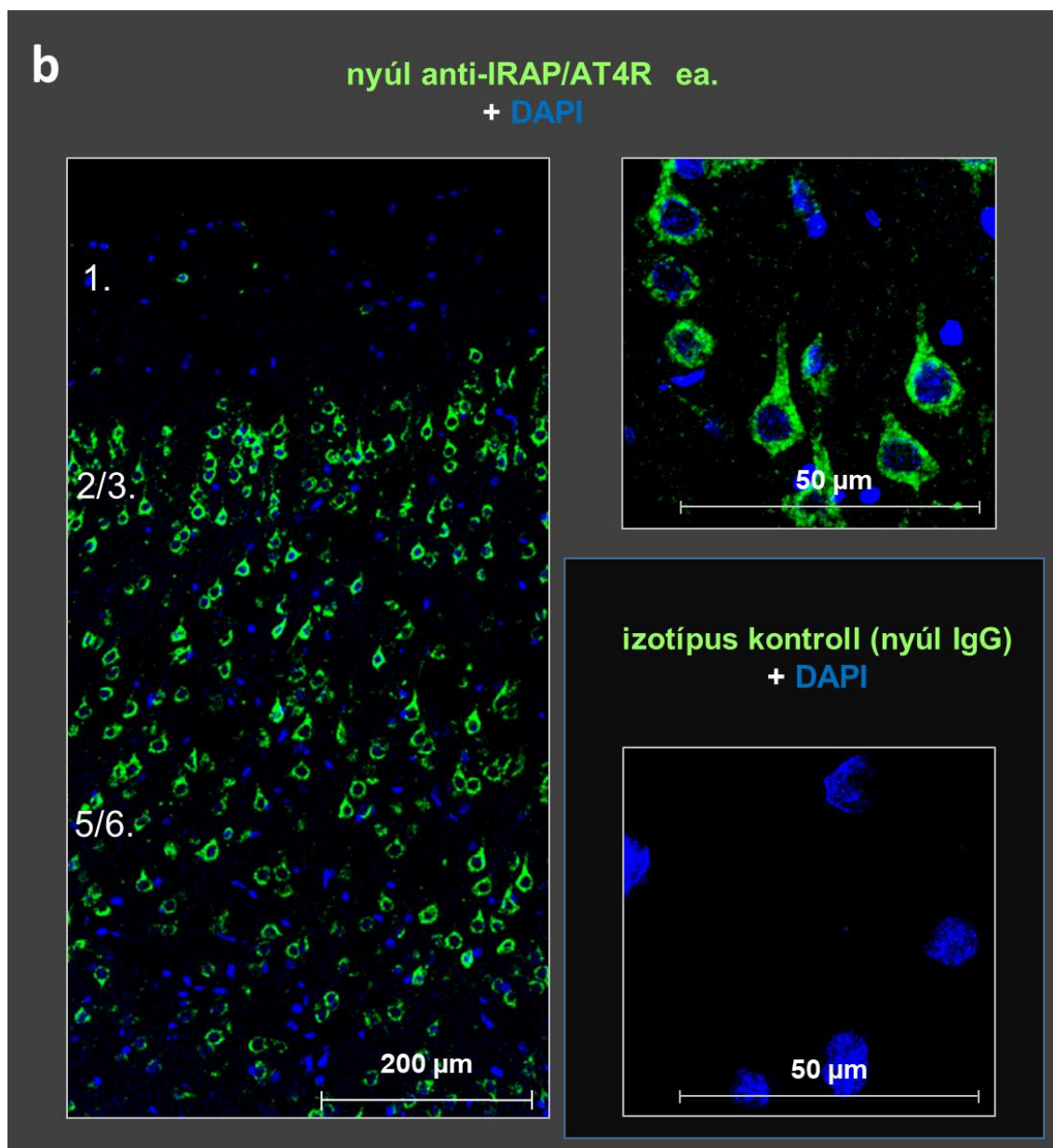


7. ábra. Az AT4R/IRAP mRNS szintű expressziója 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány PFC-ben. A molekuláris biológiai vizsgálatnál a nem kvantitatív PCR terméket agaróz gélelektroforézissel detektáltuk. Az előbbi korcsoportban jelzett, utóbbiakban kifejezett expresszió látható.

4.3.3. Az AT4R/IRAP fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az IRAP/AT4 receptorok jelenlétét 10 napos és 6 hónapos patkányok PFC-jében. Markáns expresszió volt megfigyelhető a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben, illetve az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben.

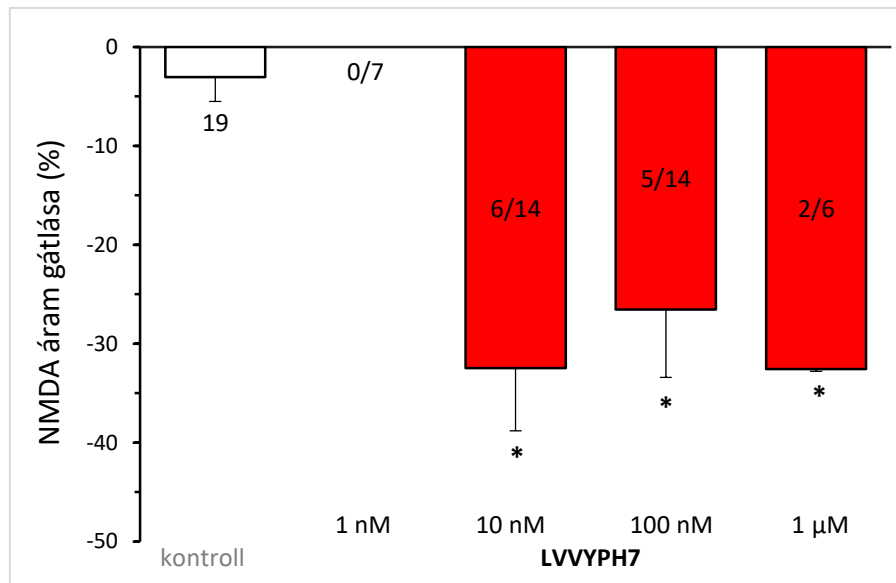




8. ábra. Az AT4R/IRAP fehérje szintű expressziója (a) 10 napos és (b) 6 hónapos patkány PFC-ben. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az IRAP/AT4R megjelenítésére anti-IRAP/AT4R nyúl poliklonális antitestet, kontrollnak nyúl IgG-t, ellenfestésként DAPI-t használtunk. (bal) A PFC egésze. A számok a PFC rétegeit mutatják. Mérték: 100 μm . Markáns expresszió a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. (jobb felső) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm . Markáns expresszió piramis morfológiájú sejtekben. (jobb alsó) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm . Izotípus kontroll.

4.3.4. Egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP-H7 utánozza az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein

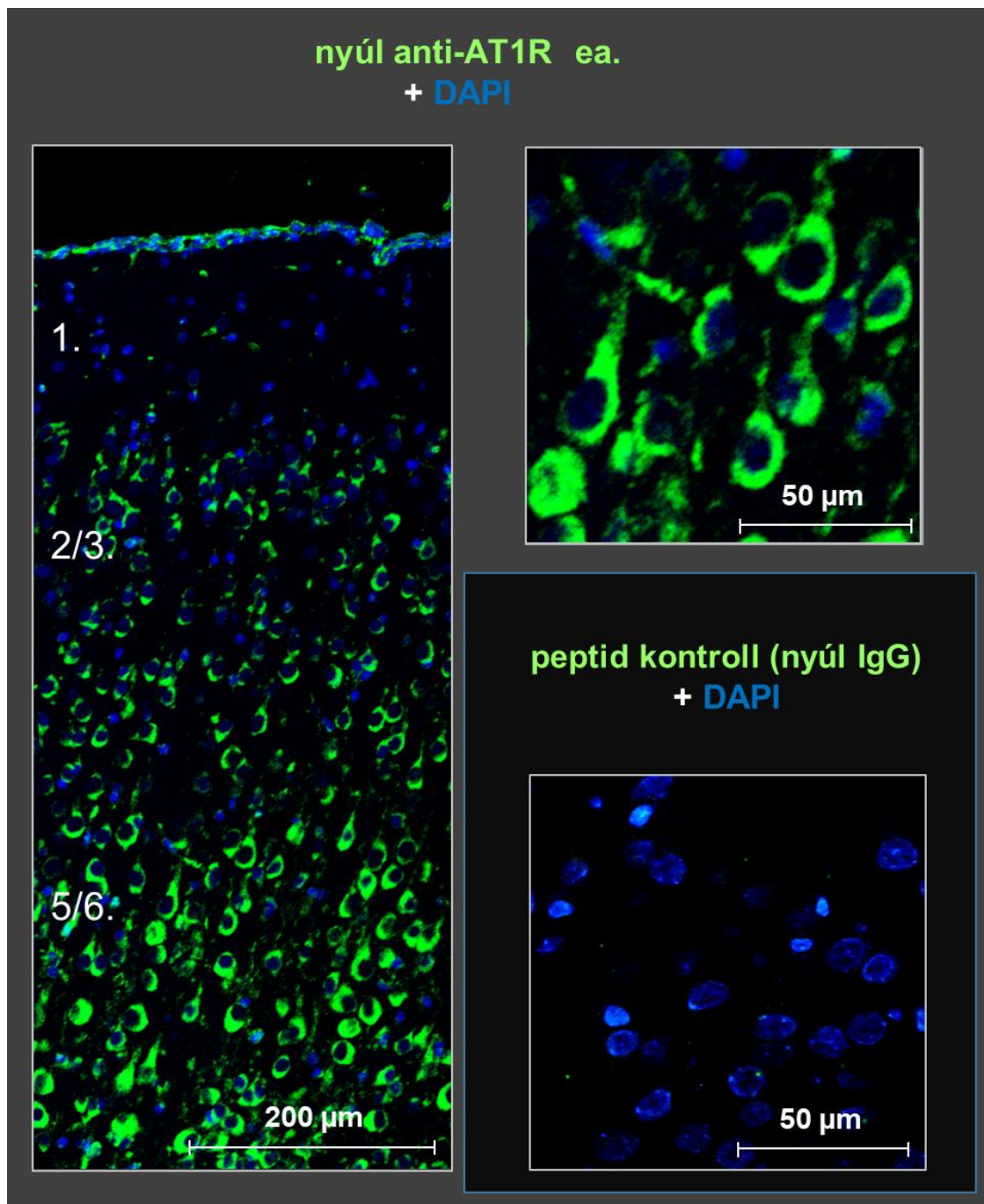
Egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP-H7 széles koncentrációtartományban, az Ang IV-hez hasonlóan, szintén gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. 10 nM-s koncentrációnál átlagosan $67,53 \pm 6,33$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14 db, 100 nM-nál $73,46 \pm 6,85$ %-t 5/14 db, 1 μ M-nál $67,43 \pm 0,22$ %-t 2/6 db sejt esetén. 1 nM-s koncentrációnál a T_3/T_2 arány nem változott. Érdekes módon nagyobb koncentrációknál az Ang IV-hez hasonlóan, néhány sejtnél sporadikusan potenciációt is megfigyeltünk. 100 nM-s koncentrációnál átlagosan $160,45 \pm 26,07$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 2/14 db, 1 μ M-nál $125,19 \pm 11,85$ %-t 2/6 db sejt esetén.



9. ábra. Az LVVYP-H7 különböző koncentrációinak (1 nM - 1 µM) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjeiben, 9-12 napos patkányban. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV-on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 µM NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az LVVYP-H7-t T₃ előtt 5 perccel és T₃ alatt adtuk. A T₃-nál mért válaszokat a T₂-nél mérthez normalizáltuk. *n* kísérlet átlaga±SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (LVVYP-H7) a reagáló sejtek száma látható. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis egyutas ANOVA-t és Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk, *p* a szignifikanciát jelöli, * *p* < 0,01.

4.3.5. Az AT1R fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben

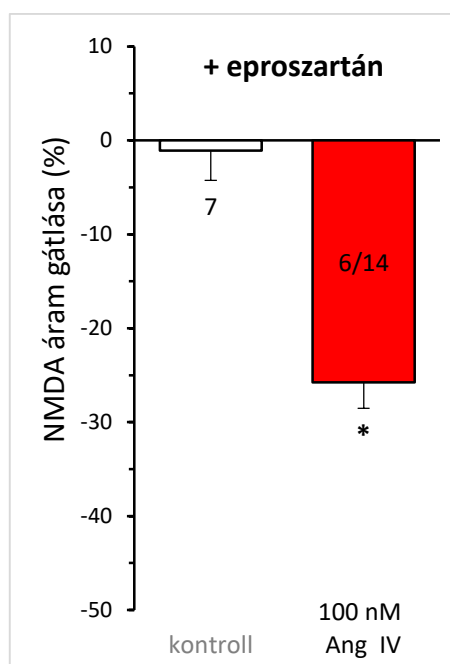
Korábbi, az Ang II NMDA áramokra kifejtett serkentő hatását vizsgáló kísérleteink [72] kapcsán immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT1 receptorok jelenlétét 10 napos patkányok PFC-jében. Nagymértékű expresszió volt megfigyelhető a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben, illetve az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben.



10. ábra. Az AT1R fehérje szintű expressziója 10 napos patkány PFC-ben. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az AT1R megjelenítésére anti-AT1R nyúl poliklonális antitestet, kontrollnak AT1R blokkoló peptidet, ellenfestésként DAPI-t használtunk. (bal) A PFC egésze. A számok a PFC rétegeit mutatják. Mérték: 200 μm. Markáns expresszió a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. (jobb felső) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm. Markáns expresszió piramis morfológiájú sejtekben. (jobb alsó) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm. Peptid kontroll.

4.3.6. Az AT1R antagonistá eproszartán nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein

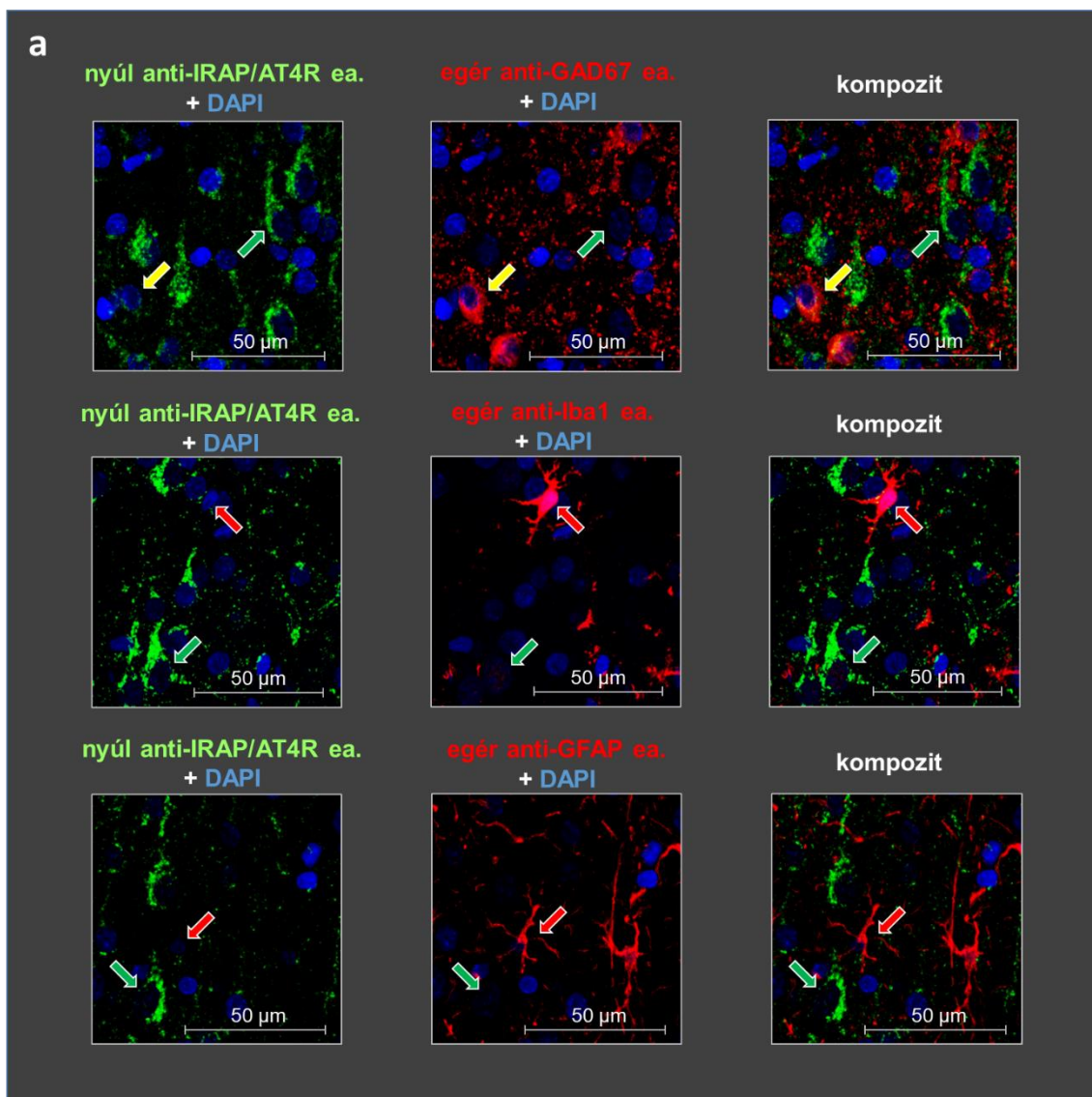
Az AT1R antagonistá eproszartán 1 μM -s koncentrációban nem függesztette fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. Ang IV 100 nM-s koncentrációjánál átlagosan $74,23 \pm 2,74$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14 db sejt esetén.

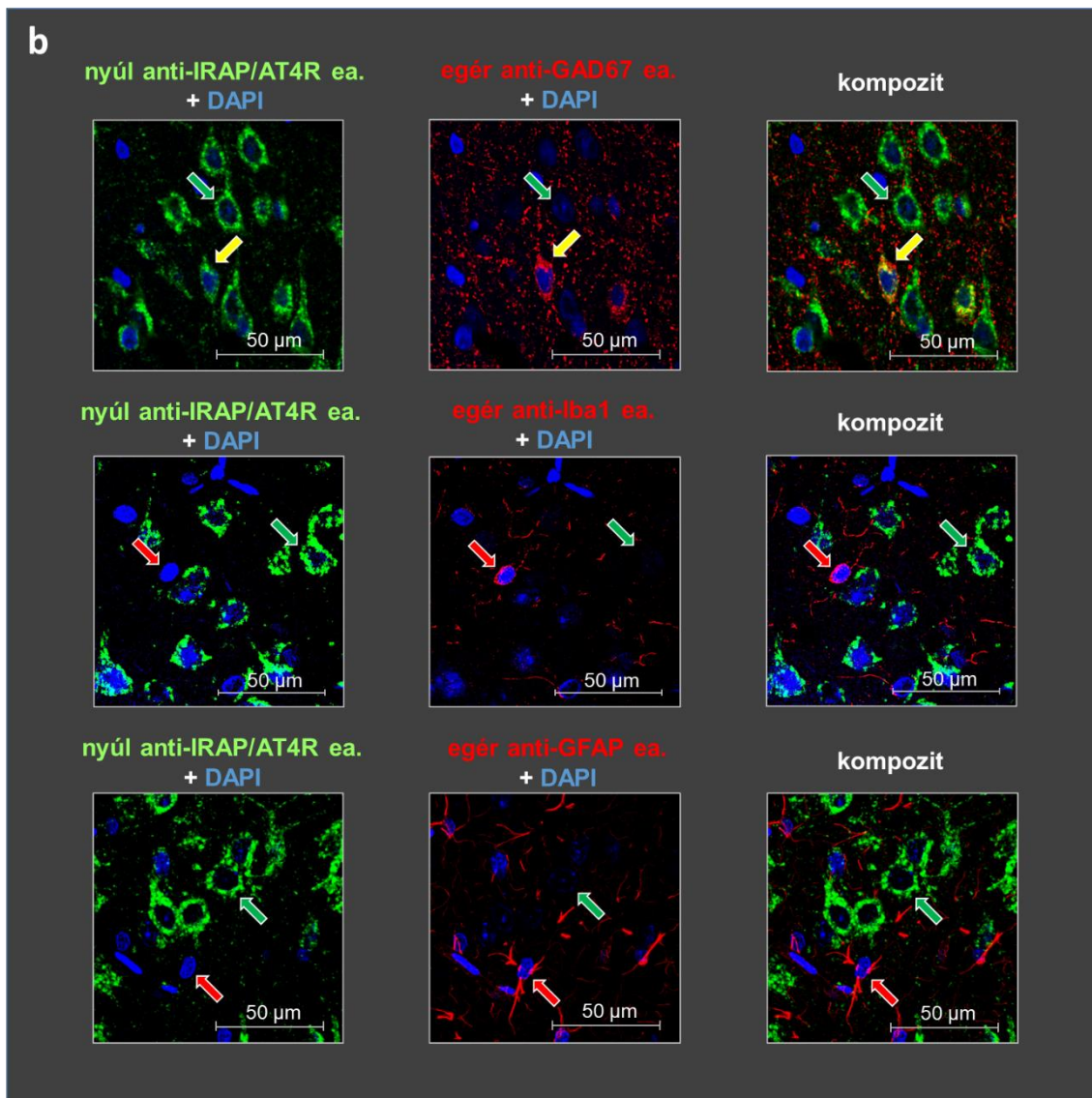


11. ábra. Eproszartán hatása az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatására a PFC V. réteg piramissejtjeiben. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV-on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μM NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az Ang IV-t T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk. Az eproszartánt (1 μM) tartalmazó ACSF a teljes mérés alatt jelen volt. A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis egyutas ANOVA-t és Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$.

4.3.7. Az AT4R/IRAP expresszálódik a piramissejtekben és a GABAerg interneuronokban, nem detektálható a microgliákban és az astrocytákban a PFC V. rétegében

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP jelenlétét 10 napos és 6 hónapos patkányok PFC-jének V. rétegében, különböző sejtípusokban. Nagymértékű expressziót figyeltünk meg piramis morfológiájú neuronokban, illetve GAD67 pozitív GABAerg interneuronokban, ellenben nem detektáltuk IBA1 jelölt microgliákban és GFAP jelölt astrocytákban.

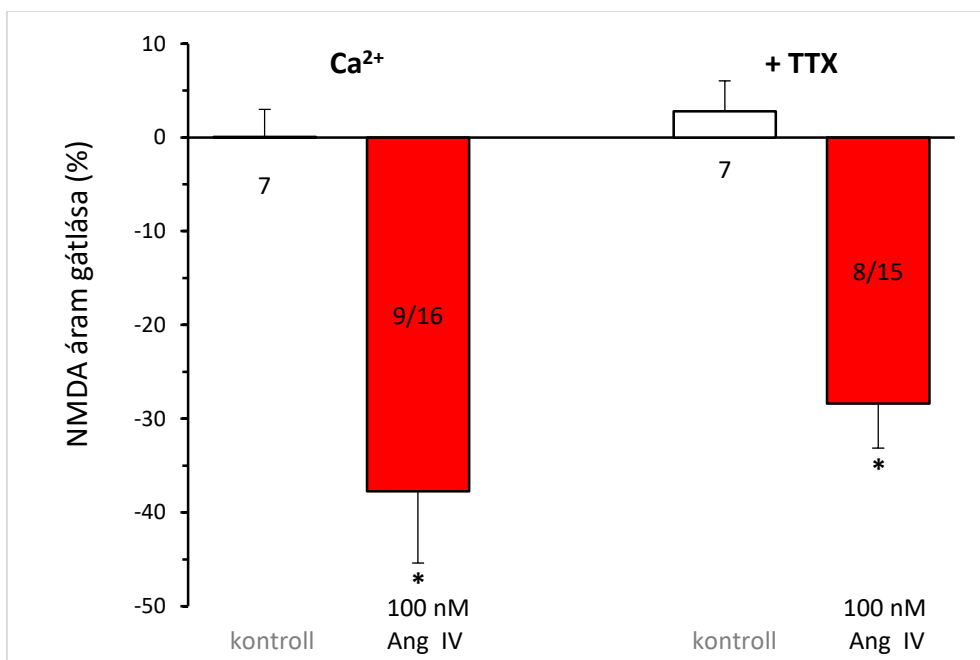




12. ábra. Az AT4R/IRAP fehérje szintű expressziója (a) 10 napos és (b) 6 hónapos patkány PFC V. rétegkülönböző sejtípusokban. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az AT4R/IRAP megjelenítésére anti-IRAP/AT4R nyúl poliklonális antitestet, GABAerg interneuron, microglia és astrocyta markernek anti-GAD67, anti-IBA1 és anti-GFAP egér poliklonális antitestet, kontrollnak nyúl IgG-t, egér IgG1-t, IgG2a-t, ellenfestésként DAPI-t használtunk. A zöld nyilak IRAP pozitív piramis morfológiájú sejtekre, a sárga nyilak IRAP és GAD67 pozitív GABAerg interneuronokra, a piros nyilak IRAP negatív és IBA1 vagy GFAP pozitív microgliákra vagy astrocytákra mutatnak. Mérték: 50 μ m.

4.3.8. Az akciós potenciál gátló tetrodotoxin vagy az exocitózis gátló Ca^{2+} -mentes ACSF nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramissejtjein

Az akciós potenciál gátló tetrodotoxin (TTX) 0,5 μM -s koncentrációban vagy az exocitózis gátló Ca^{2+} -mentes ACSF által indukált szinaptikus izoláció nem függesztette fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. Ang IV 100 nM-s koncentrációjánál TTX tartalmú ACSF-nél átlagosan $71,61 \pm 4,74$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 8/15 db, Ca^{2+} -mentes ACSF-nél $62,25 \pm 7,65$ %-t 9/16 db sejt esetén.



13. ábra. TTX tartalmú és Ca^{2+} -mentes ACSF hatása az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatására a PFC V. réteg piramissejtjeiben. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV-n tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μM NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az Ang IV-t T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk. A TTX-t (0,5 μM) tartalmazó vagy Ca^{2+} -mentes (0 μM) ACSF a teljes mérés alatt jelen volt. A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis ANOVA-t és Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk, p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$

5. Megbeszélés

Korábbi kutatásainkban munkacsoportunk számos NMDAR modulátort azonosított a PFC-ben, köztük a purinerg és a dopaminerg jelátviteli rendszereket, pre- és posztszinaptikus hatásmechanizmusokat. A hatások jellemzően a piramissejteknek csak egy-egy részhalmazára korlátozódtak, ami hangsúlyozza a piramidális neuronok szabályozásának összetettségét [28, 64, 70, 167, 178]. A PFC piramissejtjei morfológiai és fiziológiai tulajdonságaikban jelentős heterogenitást mutatnak, így nem szokatlan az a megfigyelés, hogy a különböző kölcsönhatásokban csak meghatározott szubpopulációik vesznek részt [179].

5.1. Az angiotenzin II hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben

5.1.1. Az Ang II serkentő hatásának, illetve az AT1R fehérjeszintű expressziójának vizsgálata

Korábbi vizsgálatainkban munkacsoportunk kimutatta, hogy az Ang II kisebb, fiziológiához közelítő koncentrációtartományban (1 nM - 1 μ M) serkenti az NMDA áramokat 9-12 napos patkányokban, a PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. A hatást az AT1R antagonistá eprosartán felfüggesztette, az AT2R antagonistá PD123319 nem befolyásolta, ami igazolta, hogy AT1R mediálta folyamat. A hatás szinaptikus izolációban nem volt észlelhető, ami igazolta, hogy a folyamat indirekt, interneuronális közvetítéssel valósul meg. Végül a hatást a D1R antagonistá SCH 23390 felfüggesztette, a D2R antagonistá sulpirid nem befolyásolta, ami igazolta, hogy D1R mediálta folyamat [72].

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT1R-k expresszióját 10 napos patkányok PFC-jében. Erőteljes kifejeződést figyeltünk meg a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. Nem találtunk alkalmas piramidális neuronális, illetve dopaminerg interneuronális sejtmarkert, ezért célzott kofestést nem tudtunk elvégezni.

Összefoglalva az Ang II AT1R-kon keresztül dopaminerg interneuronokat aktivál, a dopamin pedig D1R-kon keresztül potenciózza a piramissejteken az NMDAR-kat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében [72].

5.1.2. Az Ang II gátló hatásának vizsgálata

Korábbi vizsgálatainkban munkacsoportunk az Ang II nagyobb koncentrációkban (1-3 μM) történő alkalmazása esetén 9-12 napos patkányok PFC-jének V. rétegében, a piramissejtek egy (feltételezhetően másik) csoportjában az NMDA áramokra kifejtett negatív moduláló hatást is megfigyelt. A kísérletet jelen munkámban nagyobb elemszámmal megismételtem és egybehangzó eredményt kaptam. A gátlást a Na^+ -dependens akciós potenciált gátló TTX tartalmú, illetve a Ca^{2+} -dependens exocitózis gátló Ca^{2+} mentes ACSF nem függesztette fel, ami igazolta, hogy a hatás közvetlenül a piramissejteken érvényesül. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT1R-k jelenlétét piramis morfológiájú sejteken. Azonban érdekes módon az inhibíciót sem az AT1R antagonistá eprosartán, sem az AT2R antagonistá PD123319 nem befolyásolta, tehát a hatás nem az Ang II saját receptorain keresztül valósult meg.

Mivel az angiotenzin ligandok peptidek, nem jutnak át a vér-agy gáton, ezért a szintézisükhöz szükséges enzimek, így az Ang II-t metabolizáló AP-N, AP-A, DC és ACE2 jelen vannak az agyban [78]. A kísérletünkben alkalmazott magasabb koncentráció jelentette magasabb szubsztrátmennyiségnek köszönhetően ezek az enzimek a fiziológiást elérő vagy akár meg is haladó angiotenzin ligandot, Ang 1-7-t, Ang IV-t vagy alamandint lehettek képesek előállítani. Feltételeztük, hogy az Ang II gátló hatását ezen metabolitok valamelyike mediálta saját receptorán keresztül. További kutatásaimban az Ang IV hatását, szignáltranszdukcióját és konnektivitását, illetve az AT4R/IRAP nukleinsav- és fehérjeszintű kifejeződését vizsgáltam.

5.2. Az angiotenzin IV hatásainak vizsgálata az NMDA áramokra patkány PFC-ben

5.2.1. Az Ang IV hatásainak vizsgálata

Fiziológiásan az Ang IV agyi koncentrációja nagyon alacsony [96, 97]. Elsősorban intracellulárisan van jelen vagy de novo szintetizálódik. Extracellulárisan zero-net-flux módszerrel szintjét 46 pM-ra becsülték, illetve mikrodialízis szonda behelyezése után 120-187 pM közötti töménységet mértek [98]. Az Ang IV-gyel és analógjaival kapcsolatos elektrofiziológiai vizsgálatok a hippocampus régiójára és az LTP mérésére koncentráltak. Agyszeleteken végzett kísérleteknél 1 μ M-s koncentrációt alkalmaztak [119]. A preparálás folyamata sértheti a sejtek kapcsolatait, a lassú perfúziós adagolás során pedig a hatóanyagoknak kell a receptorokig bediffundálniuk [73]. Kísérleteinkben széles, a fiziológiás szintet közelítő 1 nM-tól a publikációkban használt 1 μ M-ig terjedő, koncentrációtartományt vizsgáltunk.

A glutamáterg rendszer a KIR elsődleges excitátoros hálózata [12]. Gerincesekben az összes szinapszis felét, az excitátoros szinapszisok döntő többségét alkotja [13]. Az NMDAR a pre- és posztzinaptikus hatások integrációja révén alapvető az ideghálózat rendszerszintű működésében, a kognícióban, a Ca^{2+} -dependens intracelluláris szignáltranszdukció révén pedig lényeges hosszú távú hatások kialakításában, a memóriában. A glutamáterg rendszer túlműködése, az NMDAR túlaktivációja viszont excitotoxikus, celluláris szinten apoptózist, az orgánum szintjén pedig neurodegenerációt idéz elő. Amiotrófiás laterálszklerózis, sclerosis multiplex, Parkinson-kór [40], Alzheimer kór [39] és Huntington-kór [21] patomechanizmusában is szerepe lehet. Klinikumban az NMDAR antagonistásként eszketamin depresszióban, a memantin Alzheimer-betegségben, az amantadin pedig Parkinson-kórban indikáltak.

Az Ang IV és analógjai egészséges állatokban elvégzett különböző viselkedéstesztokban, például passzív elkerülésben [138-140], kondicionált elkerülésben [138], új tárgy felismerésben [119, 139, 143], Barnes-féle körlabirintusban [144], nyolckarú labirintusban [145], emelt keresztlabirintusban [146], Morris-féle vízi labirintusban [147] jótékony hatással voltak a megjegyző, megtartó és felidéző memóriára. Valamint a

nAChR antagonista mekamilamin [150], mAChR antagonista szkopolamin [151-153] és sztreptozotocin [155] indukálta memória deficit állatmodellekben, illetve az alfa-szinuklein overexpressziós Parkinson-kór modellben [156] és amiloid prekursor fehérje transzgenikus Alzheimer-kór modellben [157] javították vagy visszafojtották az emlékezetzavarokat.

A glutamáterg rendszer és az Ang IV interakciója kevésbé kutatott, az is csak patkány hippocampusban [123, 155].

Vizsgálatainkban az Ang IV széles koncentrációtartományban (1 nM - 1 μ M) gátolta az NMDA indukálta kationáramokat 9-12 napos patkányokban, a PFC V. rétegében, a piramissejtek egy szubpopulációjában. Eredményeink alapján az Ang IV nootróp és neuroprotektív tulajdonságait az NMDAR negatív moduláló hatása magyarázhatja.

A direkt NMDAR antagonistákkal ellentétben az Ang IV egy indirekt gátló modulátor. A komplett blokáddal szemben lehetővé teszi a receptor finomhangolását. A célzott moduláció pedig csökkenheti az általános antagonizmussal járó súlyos mellékhatásokat.

Érdekes módon az Ang IV és LVVYP-H7 legmagasabb koncentrációinál (1 μ M és 100 nM - 1 μ M) néhány piramissejt esetén az NMDAR potencírozását figyeltük meg. Bár a jelenség pontos hátterét nem sikerült tisztázni, eredményeinkkel összhangban IRAP knock out egerekben a térbeli memória felgyorsult, életkor-függő hanyatlását írták le [148]. Az IRAP postnatális delécioja pedig szignifikáns deficiteket okozott mind a térbeli referencia, mind a tárgyfelismerő emlékezetben [149]. Habár az AT4R törlésével, az agonizmus intracelluláris jelátviteli útvonalainak megszüntetésével az Ang IV nootróp és neuroprotektív hatásainak kiesése is hozzájárulhat a fentiekhez, de saját eredményeink tükrében, az IRAP gén kiütését az IRAP úgymond lehető legnagyobb gátlásának tekintve, a nagy dózisú Ang IV alkalmazásakor is észlelt NMDAR túlaktiváció következtében kialakuló citotoxicitás és neurodegeneráció is magyarázhatja a kognitív deficitek megjelenését. Nem ismeretlenek egyébként az irodalomban az angiotenzin ligandok egymással ellentétes hatásai: széleskörű, változatos módon befolyásolják a neuronális struktúrákat [73]. Tehát az Ang IV és egyéb IRAP inhibitorok terápiás alkalmazásának koncentráció- és dózisfüggő optimalizálása szükséges.

5.2.2. Az Ang IV gátlás szignáltranszdukciójának, illetve receptorainak hely-specifikus mRNS és fehérjeszintű expressziójának vizsgálata

A továbbiakban az Ang IV gátló hatásának szignáltranszdukcióját, illetve receptorainak hely-specifikus mRNS és fehérjeszintű expresszióját vizsgáltuk. Nevezetesen, hogy mely receptoron, milyen útvonalon keresztül fejti ki hatását.

Ámbátor az Ang IV telíthető, reverzibilis, specifikus és nagy affinitású kötőhelyét már több mint harminc éve fedezték fel [103], a pontos működése még ma sem tisztázott, sőt maga a mibenléte is kérdéses.

Mivel az Ang IV, más angiotenzin ligandokhoz hasonlóan peptid szerkezetű, farmakokinetikai tulajdonságai kedvezőtlenek. Szájon át történő adagolás esetén az emésztés, eloszlása során a vér-agy gát jelent akadályt. Analógjait hatóanyagkönyvtárakban keresik vagy közvetlen tervezik [180]. A gyógyszerfejlesztés számára felettébb fontos az Ang IV hatás precíz targetjének, egzakt hatásmechanizmusának tisztázása.

5.2.2.1. Az AT4R/IRAP

A legelfogadottabb nézet szerint az AT4R-t egy transzmembrán enzimmel, az IRAP-pal azonosították [104], az Ang IV-t pedig a katalitikus domén potens, kompetitív inhibitoraként [105]. Az Ang IV tehát extracellulárisan, a különböző neuroaktív peptidek metabolizmusának gátlásával, koncentrációjának növelésével fejtheti ki hatását [106]. Mivel az Ang IV-nek, mint IRAP inhibitornak neutrális antagonistája nem ismert, a megszokott kísérleti összeállításra, a hatás Ang IV melletti koadminisztrációval történő felfüggesztésére nem volt lehetőségünk. Ezért a kísérletet az Ang IV helyett egy másik IRAP inhibitort perfundáltatva ismételtük meg. Az LVVYP-H7 (10 nM - 1 μ M) utánozta az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását 9-12 napos patkányokban, a PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában.

Az AT4R-on egy allosztérikus kötőhelyet is felfedeztek, ahol az Ang IV hagyományos agonistaként viselkedik [107]. Az Ang IV hatása tehát különböző intracelluláris jelátviteli útvonalak beindításával jöhet létre [108]. Mivel az Ang IV hagyományos antagonistája az AT4R-n, a Divalinal kereskedelmi forgalomban már nem kapható, ezért ezt az útvonalat nem tudtuk vizsgálni.

A radioaktívan megjelölt Ang IV agyi kötődését számos fajban vizsgálták. Patkány [113], egér [129], tengeri malac [110], futóegér [130], makákó [131], rézuszmajom [132] és ember [112, 133] agyi képleteiben, köztük a nagyagykérgében észlelték. Magas fokú fajközi konzerváltságot figyeltek meg [112]. Ezzel szemben az AT4R/IRAP fehérje szintű expressziója alig kutatott. Patkány [135] és ember [136] agyában, neocortexében detektálták. A különböző módszerek eredményei átfedtek egymással [100]. Az AT4R/IRAP mRNS szintű kifejeződését viszont még egyáltalán nem publikálták.

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP fehérje jelenlétét 10 napos és 6 hónapos patkány PFC-ben. Markáns expresszió volt megfigyelhető a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. Illetve molekuláris biológiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP-t kódoló mRNS jelenlétét 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány PFC-ben. Erőteljes kifejeződést észleltünk a fiatal felnőtt állatokban.

5.2.2.2. Az AT1R

Habár az Ang IV fiziológiás koncentrációban nagyon kis affinitással kötődik az AT1R-hoz [127], magas koncentrációban képes azt aktiválni [78]. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT1R jelenlétét a PFC különböző sejtjein. Mindazonáltal elektrofiziológiai kísérleteinkben az AT1R antagonista eprosartán, ahogy korábban az Ang II gátló hatását sem, úgy most az Ang IV hatásait sem befolyásolta.

5.2.2.3. A c-Met

Legújabb beszámolók szerint az Ang IV/AT4R rendszer egybeesik a HGF/c-Met rendszerrel. Az Ang IV és a HGF között számos hasonlóságot mutattak ki, illetve az AT4R-t a HGF receptorával, a c-Met-tel is azonosították [126]. Az Ang IV a „hinge” régióhoz kötődve fokozta a HGF dimerizációját és a c-Met aktivációját [181]. Az Ang IV

analóg Norleual pedig gátolta a HGF c-Met-hez való kötődését és a HGF-függő jelátvitelt, a proliferációt, az inváziót és a szóródást. [182] Ennek az útvonalnak a lehetséges közvetítő szerepét az Ang IV hatásaiban jelen munka nem vizsgálta.

Összefoglalva az AT4R/IRAP mRNS és protein szinten markánsan expresszálódik patkány PFC V. rétegében, valamint a piramissejtek egy csoportján az Ang IV NMDA áramokra kifejtett negatív modulációjának hatásmechanizmusa az AT4R/IRAP aminoszintáz aktivitásának inhibíciója lehet.

5.2.3. Az Ang IV gátlás konnektivitásának, illetve az AT4R/IRAP sejt-specifikus fehérjeszintű expressziójának vizsgálata

A továbbiakban az AT4R/IRAP sejt-specifikus lokalizációját és az Ang IV gátló hatásában részt vevő neuronok konnektivitását vizsgáltuk. Arra kerestük a választ, hogy az AT4R/IRAP mediálta hatás preszinaptikusan, interneuronon keresztül jön létre vagy ellenkezőleg, az AT4R/IRAP az NMDAR-ral azonos sejten, posztoszínaptikusan található meg.

A szakirodalom szerint az AT4R/IRAP feltételezhetően csak neuronokon expresszálódik [78]. Idegsejteken kimutatták az olfaktórikus régiókban, szeptális és hipotalamikus magokban, a hippocampusban és a neocortexben [135, 136]. Astrocytáknál azonban csak patkány astrogliális sejt kultúrában [118] és Alzheimer demenciás egér agyban a béta-amiloid plakkokat körülvevő aktivált astrocytáknál [137] írták le. Más sejt típusokban pedig egyáltalán nem publikálták.

Az AT4R/IRAP fehérje szintű expresszióját patkány PFC V. rétegében saját kísérleteinkben is csak neuronokban mutattuk ki, viszont nem detektáltuk microgliáknál és astrocytáknál. Különböző piramissejt-markerek alkalmazása nem eredményezett egyértelmű pozitív jelzést, de morfológia alapján is valószínűsíthetjük, hogy az AT4R/IRAP megtalálható a piramidális neuronokon, illetve a GAD67 markerrel végzett jelölés alapján biztosan állíthatjuk, hogy kifejeződik GABAerg interneuronokban.

Elektrofiziológiai kísérleteinkben az akciós potenciál gátló TTX és az exocitózis gátló Ca^{2+} -mentes ACSF által indukált szinaptikus izoláció méréseink eredményét nem befolyásolta.

Tehát kizártuk az interneuronális konnektivitás szerepét. Az Ang IV nem preszinaptikusan, egy GABAerg interneuronon vagy akár másik piramidális neuronon hatva, ideghálózati kapcsolás(ok) közvetítésével modulálja az NMDA receptorokat. Hanem posztzinaptikusan, közvetlenül a PFC V. réteg piramissejtjein lévő AT4R/IRAP-on fejt hatását és direkt módon gátolja az NMDAR áramokat.

5.3. Limitációk

5.3.1. Faj

Kísérleteinket patkányokon végeztük. Az Ang IV kötődésének patkányon [113] és emberen [112, 133] végzett radiográfiai és az AT4R/IRAP kifejeződésének patkányban [135] és emberben [136] folytatott immunhisztokémiai vizsgálataiban magas szintű fajközi konzisztenciát állapítottak meg [112]. Tehát az Ang IV-gyel és az AT4R/IRAP-pal kapcsolatos vizsgálatainkat bátrabban extrapolálhatjuk emberre is.

Ellenben a fehérje adatbázisok alapján az AT1R mRNS expressziója az emberi prefrontális cortexben nagyon alacsony [183]. Ezért az Ang II és az AT1R kapcsán szükséges az elővigyázatosság.

5.3.2. Életkor

A neurodegeneratív betegségek elsősorban az idősebb korúakat érintik. A patch clamp módszer limitációi miatt csak nagyon fiatal, 9-12 napos patkányokon tudtuk kísérleteinket elvégezni és az Ang IV-nek az IRAP aminoszékidáz aktivitásának inhibícióján keresztül az NMDAR-okra kifejtett negatív moduláló hatását kimutatni. A patkányok gyerekkora rövid, gyorsított folyamat, pontos emberi életkoroknak való megfeleltetése nehézkes. Referenciaként szolgálhat a szoptatás, mely patkányban 21 napig, emberben 6 hónapig tart, illetve a pubertás, mely 1,5 hónapos és 12,5 éves korra

tehető [184]. 9-12 napos patkányaink egy mindössze néhány hónapos csecsemővel állíthatók csak párhuzamba.

Azonban immunhisztokémiával 6 hónapos patkányokon is el tudtuk végezni az AT4R/IRAP fehérjeszintű expressziójának vizsgálatát és a 9-12 napos korosztályhoz hasonló mértékű kifejeződést észleltük. Molekuláris biológiával pedig 9-12 napos, 3 hónapos és 6 hónapos állatokban tudtuk a receptor mRNS szintű expresszióját vizsgálni és az életkor függvényében fokozódást láttunk. A 6 hónapos patkányok már fiatal, 18 éves felnőtt emberrel azonosíthatók [184]. A továbbiakban tervezzük 1, 1,5 és 2 éves korcsoportok vizsgálatát is, amik már 30, 45 és 60 éves emberi életkorokkal analógok és a neurodegeneratív betegségek szempontjából kifejezetten relevánsak.

6. Következtetések

Doktori értekezésemmel kapcsolatos munkám során a mediális PFC-ben az NMDA receptorok angiotenzinerg modulációját, illetve az angiotenzin ligandok receptorainak mRNS és fehérjeszintű expresszióját vizsgáltuk.

9-12 napos patkány mediális PFC V. réteg piramisjeiteinek NMDA receptorain végzett elektrofiziológiai vizsgálatokkal, whole-cell, patch-clamp technika alkalmazásával,

az Ang II hatásairól nagyobb elemszámmal igazoltuk, hogy:

az Ang II magasabb koncentrációban (3 μ M) negatív moduláló hatást fejt ki az NMDA áramokra a piramidális neuronok egy szubpopulációján.

az Ang IV hatásairól igazoltuk, hogy:

az Ang IV széles koncentrációtartományban (1 nM - 1 μ M) negatív moduláló hatást fejt ki az NMDA áramokra a piramidális neuronok egy szubpopulációján.

a gátlást az IRAP inhibitor LVVYP-H7 (10 nM - 1 μ M) utánózta, tehát az AT4R/IRAP aminopeptidáz aktivitásának inhibíciója mediálhatja a hatást.

a gátlást az AT1R antagonistán nem befolyásolta, tehát nem AT1R mediálja a hatást.

a gátlást sem a TTX tartalmú, sem a Ca^{2+} mentes ACSF nem függesztette fel, tehát a hatás interneuronok közvetítése nélkül, a piramis sejteken közvetlenül érvényesül.

A 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány mediális PFC-n végzett molekuláris biológiai vizsgálatokkal

az Ang IV receptorairól kimutattuk, hogy

az AT4R/IRAP-t kódoló mRNS kifejeződik a PFC-ben.

A 10 napos és 6 hónapos patkány mediális PFC-ben végzett immunhisztokémiai vizsgálatokkal, tormaperoxidázzal (HRP) aktivált tiramid jel amplifikáló technika alkalmazásával,

az Ang II receptorairól kimutattuk, hogy

az AT1R fehérjéje kifejeződik a PFC-ben.

az AT1R markánsan expresszálódik a PFC II-III. és V-VI. rétegeiben.

az AT1R megtalálható az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben.

az Ang IV receptorairól kimutattuk, hogy

az IRAP/AT4R fehérjéje kifejeződik a PFC-ben.

az IRAP/AT4R markánsan expresszálódik a PFC II-III. és V-VI. rétegeiben.

az IRAP/AT4R megtalálható az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben és GAD67 pozitív GABAerg interneuronjaiban, hiányzik IBA1 jelölt microgliáiban és GFAP jelölt astrocytáiban.

7. Összefoglalás

A prefrontális kéregnek fiziológiásan a gondolkodásban és a rövid távú memóriában lehet szerepe, melyben kiemelt jelentőséggel bírnak a glutamáterg neurotranszmisszió és az NMDA receptorok. Patológiás elváltozásai pedig demenciákban, illetve szkizofréniában figyelhetők meg. Egyik betegség esetén sincs, előfordulásuk gyakorisága, illetve lefolyásuk súlyossága ellenére, a gyógyszeres terápia teljes mértékben máig sem megoldva. A glutamát rendszer túlaktivitása apoptózishoz és neurodegenerációhoz vezet, viszont az NMDA receptorok teljes gátlása súlyos mellékhatásokat idéz elő. A gyógyszeripar egyre inkább a receptor finom hangolását célozza meg. A glutamáterg szinapszisok, NMDA receptorok neuromodulációjában az elmúlt évtizedekben ismertté vált agyi renin-angiotenzin rendszernek is felmerült a szerepe. Az Ang IV egészségesekben serkenti az emlékezetet, illetve kognitív károsodásokban javítja vagy visszafordítja a memóriazavarokat. Mivel peptid szerkezetű, rossz a farmakokinetikai profilja. Analógjait hatóanyagkönyvtárakban keresik vagy közvetlen tervezik. A gyógyszerfejlesztés számára kulcsfontosságú precíz targetjének, egzakt hatásmechanizmusának feltárása.

Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az Ang IV-nek széles, 1 nM - 1 μ M-s koncentrációtartománya negatív moduláló hatást fejt ki a 9-12 napos patkány PFC V. réteg piramissejtjeinek NMDA receptorain. A gátlást egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP-H7 utánozta, következésképp a hatásmechanizmus az aminoszintáz aktivitás szuppressziója lehet. A gátlást a szinaptikus izoláció nem szüntette meg, kizártuk tehát az intercelluláris konnektivitás szerepét. Továbbá vizsgálatainkban feltérképeztük az Ang IV receptorának, az AT4R/IRAP-nak a sejt-specifikus lokalizációját. Kimutattuk mind nukleinsav, mind fehérjeszintű jelenlétét különböző korú patkányok PFC-iben. Markáns expressziót figyeltünk meg a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. Morfológia és sejtmakerek alapján azonosítottuk kifejeződését piramidális neuronokban és GABAerg interneuronokban, nem tudtuk detektálni microgliákban és astrocytáknál.

Eredményeink magyarázhatják az Ang IV nootróp és neuroprotektív tulajdonságait és az IRAP katalitikus doménjének inhibíciója megfelelő targetet jelenhet a gyógyszerterápia számára az NMDAR negatív modulátorainak fejlesztéséhez a PFC-t érintő betegségek kezelésére.

8. Summary

Physiologically, the prefrontal cortex may have a role in thinking and short-term memory, in which glutamatergic neurotransmission and NMDA receptors are of particular importance. Pathological changes are observed in dementias and schizophrenia. Despite their frequency and severity, the pharmacological therapy is still not completely resolved in any of the diseases. Overactivity of the glutamate system leads to apoptosis and neurodegeneration, whereas complete inhibition of NMDA receptors causes severe side effects. Drug development is increasingly aimed at the fine tuning of the receptor. The brain renin-angiotensin system has been recognized in recent decades and its role has been implicated in the neuromodulation of glutamatergic synapses, NMDA receptors. Ang IV stimulates memory in the healthy and improves or reverses memory impairments in cognitive disorders. Due to its peptide structure, it exhibits a poor pharmacokinetic profile. Efforts are being made to find its analogues by virtual and substance library screening and direct design. The clarification of Ang IV's precise target and exact mechanism of action is of great relevance for drug development.

In our studies, we demonstrated that a wide concentration range of Ang IV, from 1 nM to 1 μ M, exerts a negative allosteric modulatory effect on NMDA receptors in the layer V pyramidal cells of 9-12 days old rat PFC. The inhibition was mimicked by another IRAP inhibitor, LVVYP-H7, consequently, the mechanism of action may be the suppression of aminopeptidase activity. The inhibition was not abolished by synaptic isolation, therefore a role for intercellular connectivity is excluded. Furthermore, our studies mapped the cell-specific localization of Ang IV's receptor, AT4R/IRAP. We detected both of its nucleic acid and protein levels in the PFC of rats of different ages. Marked expression was observed in cell layers II-III. and V-VI. Based on morphology and cell markers, we identified its expression in pyramidal neurons and GABAergic interneurons, but could not detect it in microglia and astrocytes.

Our results may explain the nootropic and neuroprotective properties of Ang IV and the catalytic domain of IRAP may represent a suitable target for the pharmaceutical industry to develop NMDAR negative allosteric modulators for the treatment of PFC-associated diseases.

9. Irodalomjegyzék

1. Fuster, J. M., Chapter 2 - Anatomy of the Prefrontal Cortex. In *The Prefrontal Cortex (Fourth Edition)*, Fuster, J. M., Ed. Academic Press: San Diego, 2008; pp 7-58.
2. Hathaway, W. R.; Newton, B. W., Neuroanatomy, Prefrontal Cortex. In *StatPearls*, StatPearls Publishing Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2025.
3. Fuster, J. M., Chapter 3 - Chemical Neurotransmission. In *The Prefrontal Cortex (Fourth Edition)*, Fuster, J. M., Ed. Academic Press: San Diego, 2008; pp 59-123.
4. Miller, E. K.; Cohen, J. D., An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience* **2001**, 24, 167-202.
5. Fuster, J. M., Chapter 1 - Introduction. In *The Prefrontal Cortex (Fourth Edition)*, Fuster, J. M., Ed. Academic Press: San Diego, 2008; pp 1-6.
6. Teffer, K.; Semendeferi, K., Chapter 9 - Human prefrontal cortex: Evolution, development, and pathology. In *Progress in Brain Research*, Hofman, M. A.; Falk, D., Eds. Elsevier: 2012; Vol. 195, pp 191-218.
7. who.int Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (2025. Január 1.),
8. Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P., The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* **2013**, 9, (1), 63-75.e2.
9. Shaji, K. S.; Sivakumar, P. T.; Rao, G. P.; Paul, N., Clinical Practice Guidelines for Management of Dementia. *Indian J Psychiatry* **2018**, 60, (Suppl 3), S312-s328.
10. who.int Schizophrenia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia> (2025. Január 1.),
11. Tringer, L., *A pszichiátria tankönyve*. negyedik ed.; Semmelweis Kiadó: Budapest, 2010.
12. Hollmann, M.; Heinemann, S., Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **1994**, 17, 31-108.
13. Kovács, G. L., The Endocrine Brain: Pathophysiological Role of Neuropeptide-Neurotransmitter Interactions. *Ejifcc* **2004**, 15, (3), 107-112.

14. Hawkins, R. A., The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Clin Nutr* **2009**, 90, (3), 867s-874s.
15. Rowley, N. M.; Madsen, K. K.; Schousboe, A.; Steve White, H., Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int* **2012**, 61, (4), 546-58.
16. Pin, J. P.; Duvoisin, R., The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **1995**, 34, (1), 1-26.
17. Conn, P. J.; Pin, J. P., Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1997**, 37, 205-37.
18. Niswender, C. M.; Conn, P. J., Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2010**, 50, 295-322.
19. Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingledine, R., Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **2010**, 62, (3), 405-96.
20. Dzamba, D.; Honsa, P.; Anderova, M., NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Curr Neuropharmacol* **2013**, 11, (3), 250-62.
21. Parsons, M. P.; Raymond, L. A., Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* **2014**, 82, (2), 279-93.
22. Vyklicky, V.; Korinek, M.; Smejkalova, T.; Balik, A.; Krausova, B.; Kaniakova, M.; Lichnerova, K.; Cerny, J.; Krusek, J.; Dittert, I.; Horak, M.; Vyklicky, L., Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res* **2014**, 63, (Suppl 1), S191-203.
23. Collingridge, G. L.; Volianskis, A.; Bannister, N.; France, G.; Hanna, L.; Mercier, M.; Tidball, P.; Fang, G.; Irvine, M. W.; Costa, B. M.; Monaghan, D. T.; Bortolotto, Z. A.; Molnár, E.; Lodge, D.; Jane, D. E., The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* **2013**, 64, 13-26.
24. Vance, K. M.; Hansen, K. B.; Traynelis, S. F., GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *J Physiol* **2012**, 590, (16), 3857-75.
25. Hardingham, G. E.; Fukunaga, Y.; Bading, H., Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* **2002**, 5, (5), 405-14.

26. Ault, B.; Evans, R. H.; Francis, A. A.; Oakes, D. J.; Watkins, J. C., Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. *J Physiol* **1980**, 307, 413-28.
27. Collingridge, G. L.; Herron, C. E.; Lester, R. A., Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *J Physiol* **1988**, 399, 283-300.
28. Köles, L.; Kató, E.; Hanuska, A.; Zádori, Z. S.; Al-Khrasani, M.; Zelles, T.; Rubini, P.; Illes, P., Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal* **2016**, 12, (1), 1-24.
29. Lüscher, C.; Nicoll, R. A.; Malenka, R. C.; Muller, D., Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* **2000**, 3, (6), 545-50.
30. Rebola, N.; Srikumar, B. N.; Mulle, C., Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* **2010**, 588, (Pt 1), 93-9.
31. Collingridge, G. L.; Bliss, T. V., Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* **1995**, 18, (2), 54-6.
32. Izumi, Y.; Tokuda, K.; Zorumski, C. F., Long-term potentiation inhibition by low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation involves calcineurin, nitric oxide, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hippocampus* **2008**, 18, (3), 258-65.
33. Liu, D. D.; Yang, Q.; Li, S. T., Activation of extrasynaptic NMDA receptors induces LTD in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Res Bull* **2013**, 93, 10-6.
34. Papouin, T.; Ladépêche, L.; Ruel, J.; Sacchi, S.; Labasque, M.; Hanini, M.; Groc, L.; Pollegioni, L.; Mothet, J. P.; Oliet, S. H., Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **2012**, 150, (3), 633-46.
35. Liu, L.; Wong, T. P.; Pozza, M. F.; Lingenhoehl, K.; Wang, Y.; Sheng, M.; Auberson, Y. P.; Wang, Y. T., Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **2004**, 304, (5673), 1021-4.
36. Liu, Y.; Wong, T. P.; Aarts, M.; Rooyakkers, A.; Liu, L.; Lai, T. W.; Wu, D. C.; Lu, J.; Tymianski, M.; Craig, A. M.; Wang, Y. T., NMDA receptor subunits have

- differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **2007**, 27, (11), 2846-57.
37. Paoletti, P., Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* **2011**, 33, (8), 1351-65.
 38. Lipton, S. A.; Rosenberg, P. A., Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **1994**, 330, (9), 613-22.
 39. Lewerenz, J.; Maher, P., Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci* **2015**, 9, 469.
 40. Lau, A.; Tymianski, M., Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* **2010**, 460, (2), 525-42.
 41. Skolnick, P.; Legutko, B.; Li, X.; Bymaster, F. P., Current perspectives on the development of non-biogenic amine-based antidepressants. *Pharmacol Res* **2001**, 43, (5), 411-23.
 42. Berman, R. M.; Cappiello, A.; Anand, A.; Oren, D. A.; Heninger, G. R.; Charney, D. S.; Krystal, J. H., Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* **2000**, 47, (4), 351-4.
 43. Zarate, C. A., Jr.; Singh, J. B.; Carlson, P. J.; Brutsche, N. E.; Ameli, R.; Luckenbaugh, D. A.; Charney, D. S.; Manji, H. K., A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* **2006**, 63, (8), 856-64.
 44. Javitt, D. C.; Zukin, S. R., Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **1991**, 148, (10), 1301-8.
 45. Wang, H. Y.; MacDonald, M. L.; Borgmann-Winter, K. E.; Banerjee, A.; Sleiman, P.; Tom, A.; Khan, A.; Lee, K. C.; Roussos, P.; Siegel, S. J.; Hemby, S. E.; Bilker, W. B.; Gur, R. E.; Hahn, C. G., mGluR5 hypofunction is integral to glutamatergic dysregulation in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2020**, 25, (4), 750-760.
 46. ogyei.gov.hu Calypsol 50 mg/ml oldatos injekció.
https://ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000015905_20210128153758.doc (2025. Január 1.),

47. Gomes, D.; Pimentel, J.; Bentes, C.; Aguiar de Sousa, D.; Antunes, A. P.; Alvarez, A.; Silva, Z. C., Consensus Protocol for the Treatment of Super-Refractory Status Epilepticus. *Acta Med Port* **2018**, 31, (10), 598-605.
48. ema.europa.eu Spravato 28 mg oldatos orrspray.
https://www.ema.europa.eu/hu/documents/product-information/spravato-epar-product-information_hu.pdf (2025. Január 1.),
49. ogyei.gov.hu Mirvedol 10 mg filmtabletta.
https://ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000081587_20201027135724.doc (January 1, 2025),
50. Vogelbaum, M. A.; Brown, P. D.; Messersmith, H.; Brastianos, P. K.; Burri, S.; Cahill, D.; Dunn, I. F.; Gaspar, L. E.; Gatson, N. T. N.; Gondi, V.; Jordan, J. T.; Lassman, A. B.; Maues, J.; Mohile, N.; Redjal, N.; Stevens, G.; Sulman, E.; van den Bent, M.; Wallace, H. J.; Weinberg, J. S.; Zadeh, G.; Schiff, D., Treatment for Brain Metastases: ASCO-SNO-ASTRO Guideline. *J Clin Oncol* **2022**, 40, (5), 492-516.
51. ogyei.gov.hu PK-Merz 100 mg filmtabletta.
https://ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000016373_20190326155935.doc (2025. Január 1.),
52. accessdata.fda.gov SYMMETREL® Tablets and Syrup.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/016023s041,018101s016lbl.pdf (2025. Január 1.),
53. Taylor, C. P.; Traynelis, S. F.; Siffert, J.; Pope, L. E.; Matsumoto, R. R., Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta®) clinical use. *Pharmacol Ther* **2016**, 164, 170-82.
54. accessdata.fda.gov NUEDEXTA capsules.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021879s000lbl.pdf (2025. Január 1.),
55. accessdata.fda.gov AUVELITY extended-release tablets.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/215430s000lblCorr-ect3.pdf (2025. Január 1.),

56. Rho, J. M.; Donevan, S. D.; Rogawski, M. A., Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Ann Neurol* **1994**, 35, (2), 229-34.
57. ogyei.gov.hu Taloxa 600 mg tabletta.
https://ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000016338_20210622091416.doc (2025. Január 1.),
58. Zanos, P.; Moaddel, R.; Morris, P. J.; Riggs, L. M.; Highland, J. N.; Georgiou, P.; Pereira, E. F. R.; Albuquerque, E. X.; Thomas, C. J.; Zarate, C. A., Jr.; Gould, T. D., Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. *Pharmacol Rev* **2018**, 70, (3), 621-660.
59. Williams, K., Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **1994**, 46, (1), 161-8.
60. Aniksztejn, L.; Bregestovski, P.; Ben-Ari, Y., Selective activation of quisqualate metabotropic receptor potentiates NMDA but not AMPA responses. *Eur J Pharmacol* **1991**, 205, (3), 327-8.
61. Yu, S. P.; Sensi, S. L.; Canzoniero, L. M.; Buisson, A.; Choi, D. W., Membrane-delimited modulation of NMDA currents by metabotropic glutamate receptor subtypes 1/5 in cultured mouse cortical neurons. *J Physiol* **1997**, 499 (Pt 3), (Pt 3), 721-32.
62. Snyder, E. M.; Philpot, B. D.; Huber, K. M.; Dong, X.; Fallon, J. R.; Bear, M. F., Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci* **2001**, 4, (11), 1079-85.
63. Oliveira, J. F.; Krügel, U.; Köles, L.; Illes, P.; Wirkner, K., Blockade of glutamate transporters leads to potentiation of NMDA receptor current in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex via group II metabotropic glutamate receptor activation. *Neuropharmacology* **2008**, 55, (4), 447-53.
64. Wirkner, K.; Günther, A.; Weber, M.; Guzman, S. J.; Krause, T.; Fuchs, J.; Köles, L.; Nörenberg, W.; Illes, P., Modulation of NMDA receptor current in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex by P2Y receptor activation. *Cereb Cortex* **2007**, 17, (3), 621-31.

65. Cepeda, C.; Hurst, R. S.; Altemus, K. L.; Flores-Hernández, J.; Calvert, C. R.; Jokel, E. S.; Grandy, D. K.; Low, M. J.; Rubinstein, M.; Ariano, M. A.; Levine, M. S., Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-deficient mice. *J Neurophysiol* **2001**, 85, (2), 659-70.
66. Maura, G.; Giardi, A.; Raiteri, M., Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* **1988**, 247, (2), 680-4.
67. Nicola, S. M.; Malenka, R. C., Dopamine depresses excitatory and inhibitory synaptic transmission by distinct mechanisms in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **1997**, 17, (15), 5697-710.
68. Zhang, L.; Bose, P.; Warren, R. A., Dopamine preferentially inhibits NMDA receptor-mediated EPSCs by acting on presynaptic D1 receptors in nucleus accumbens during postnatal development. *PLoS One* **2014**, 9, (5), e86970.
69. Cepeda, C.; Buchwald, N. A.; Levine, M. S., Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (20), 9576-80.
70. Wirkner, K.; Krause, T.; Köles, L.; Thümmel, S.; Al-Khrasani, M.; Illes, P., D1 but not D2 dopamine receptors or adrenoceptors mediate dopamine-induced potentiation of N-methyl-d-aspartate currents in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett* **2004**, 372, (1-2), 89-93.
71. Zheng, P.; Zhang, X. X.; Bunney, B. S.; Shi, W. X., Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience* **1999**, 91, (2), 527-35.
72. Hanuska, A.; Ribiczey, P.; Kató, E.; Papp, Z. T.; Varga, Z. V.; Giricz, Z.; Tóth, Z. E.; Könczöl, K.; Zsembery, Á.; Zelles, T.; Harsing, L. G., Jr.; Köles, L., Potentiation of NMDA Receptors by AT1 Angiotensin Receptor Activation in Layer V Pyramidal Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Int J Mol Sci* **2024**, 25, (23).
73. Hanuska, A. Az NMDA receptorok modulációjának vizsgálata a percepció és a kognitív funkciók zavaraiiban. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2021.
74. Tigerstedt, R.; Bergman, P. Q., Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* **1898**, 8, (1), 223-271.

75. Braun-Menendez, E.; Fasciolo, J. C.; Leloir, L. F.; Muñoz, J. M., The substance causing renal hypertension. *J Physiol* **1940**, 98, (3), 283-98.
76. Page, I. H.; Helmer, O. M., A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *J Exp Med* **1940**, 71, (1), 29-42.
77. Peach, M. J., Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* **1977**, 57, (2), 313-70.
78. Jackson, L.; Eldahshan, W.; Fagan, S. C.; Ergul, A., Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int J Mol Sci* **2018**, 19, (3).
79. Bickerton, R. K.; Buckley, J. P., Evidence for a Central Mechanism in Angiotensin Induced Hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1961**, 106, (4), 834-836.
80. von Bohlen und Halbach, O.; Albrecht, D., The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* **2006**, 326, (2), 599-616.
81. Wright, J. W.; Harding, J. W., Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. *Prog Neurobiol* **2011**, 95, (1), 49-67.
82. Grobe, J. L.; Xu, D.; Sigmund, C. D., An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda)* **2008**, 23, 187-93.
83. Carey, R. M.; Wang, Z. Q.; Siragy, H. M., Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* **2000**, 35, (1 Pt 2), 155-63.
84. Lenkei, Z.; Palkovits, M.; Corvol, P.; Llorens-Cortes, C., Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. *J Comp Neurol* **1996**, 373, (3), 322-39.
85. Jiang, T.; Gao, L.; Lu, J.; Zhang, Y. D., ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol* **2013**, 11, (2), 209-17.
86. Tetzner, A.; Gebolys, K.; Meinert, C.; Klein, S.; Uhlich, A.; Trebicka, J.; Villacañas, Ó.; Walther, T., G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension* **2016**, 68, (1), 185-94.

87. Crozier, R. A.; Ajit, S. K.; Kaftan, E. J.; Pausch, M. H., MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci* **2007**, 27, (16), 4492-6.
88. Labandeira-Garcia, J. L.; Rodríguez-Perez, A. I.; Garrido-Gil, P.; Rodríguez-Pallares, J.; Lanciego, J. L.; Guerra, M. J., Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **2017**, 9, 129.
89. Costa-Besada, M. A.; Valenzuela, R.; Garrido-Gil, P.; Villar-Cheda, B.; Parga, J. A.; Lanciego, J. L.; Labandeira-Garcia, J. L., Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Mol Neurobiol* **2018**, 55, (7), 5847-5867.
90. Xia, H.; Lazartigues, E., Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem* **2008**, 107, (6), 1482-94.
91. Zhang, T. L.; Fu, J. L.; Geng, Z.; Yang, J. J.; Sun, X. J., The neuroprotective effect of losartan through inhibiting AT1/ASK1/MKK4/JNK3 pathway following cerebral I/R in rat hippocampal CA1 region. *CNS Neurosci Ther* **2012**, 18, (12), 981-7.
92. Ahmed, H. A.; Ishrat, T.; Pillai, B.; Bunting, K. M.; Patel, A.; Vazdarjanova, A.; Waller, J. L.; Arbab, A. S.; Ergul, A.; Fagan, S. C., Role of angiotensin system modulation on progression of cognitive impairment and brain MRI changes in aged hypertensive animals - A randomized double-blind pre-clinical study. *Behav Brain Res* **2018**, 346, 29-40.
93. AbdAlla, S.; Lothar, H.; Abdel-tawab, A. M.; Quitterer, U., The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* **2001**, 276, (43), 39721-6.
94. Maul, B.; von Bohlen und Halbach, O.; Becker, A.; Sterner-Kock, A.; Voigt, J. P.; Siems, W. E.; Grecksch, G.; Walther, T., Impaired spatial memory and altered dendritic spine morphology in angiotensin II type 2 receptor-deficient mice. *J Mol Med (Berl)* **2008**, 86, (5), 563-71.
95. Mateos, L.; Perez-Alvarez, M. J.; Wandosell, F., Angiotensin II type-2 receptor stimulation induces neuronal VEGF synthesis after cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* **2016**, 1862, (7), 1297-308.

96. Chappell, M. C.; Brosnihan, K. B.; Diz, D. I.; Ferrario, C. M., Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem* **1989**, 264, (28), 16518-23.
97. Welches, W. R.; Santos, R. A.; Chappell, M. C.; Brosnihan, K. B.; Greene, L. J.; Ferrario, C. M., Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens* **1991**, 9, (7), 631-8.
98. Lanckmans, K.; Stragier, B.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y., Nano-LC-MS/MS for the monitoring of angiotensin IV in rat brain microdialysates: limitations and possibilities. *J Sep Sci* **2007**, 30, (14), 2217-24.
99. Stragier, B.; De Bundel, D.; Sarre, S.; Smolders, I.; Vauquelin, G.; Dupont, A.; Michotte, Y.; Vanderheyden, P., Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev* **2008**, 13, (3), 321-37.
100. Karnik, S. S.; Unal, H.; Kemp, J. R.; Tirupula, K. C.; Eguchi, S.; Vanderheyden, P. M.; Thomas, W. G., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev* **2015**, 67, (4), 754-819.
101. Healy, D. P.; Wilk, S., Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res* **1993**, 606, (2), 295-303.
102. Kunz, J.; Krause, D.; Kremer, M.; Dermietzel, R., The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem* **1994**, 62, (6), 2375-86.
103. Swanson, G. N.; Hanesworth, J. M.; Sardinia, M. F.; Coleman, J. K.; Wright, J. W.; Hall, K. L.; Miller-Wing, A. V.; Stobb, J. W.; Cook, V. I.; Harding, E. C.; et al., Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* **1992**, 40, (3), 409-19.
104. Albiston, A. L.; McDowall, S. G.; Matsacos, D.; Sim, P.; Clune, E.; Mustafa, T.; Lee, J.; Mendelsohn, F. A.; Simpson, R. J.; Connolly, L. M.; Chai, S. Y., Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* **2001**, 276, (52), 48623-6.

105. Lew, R. A.; Mustafa, T.; Ye, S.; McDowall, S. G.; Chai, S. Y.; Albiston, A. L., Angiotensin AT₄ ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem* **2003**, 86, (2), 344-50.
106. Gard, P. R., Cognitive-enhancing effects of angiotensin IV. *BMC Neurosci* **2008**, 9 Suppl 2, S15.
107. Caron, A. Z.; Arguin, G.; Guillemette, G., Angiotensin IV interacts with a juxtamembrane site on AT₄/IRAP suggesting an allosteric mechanism of enzyme modulation. *Regul Pept* **2003**, 113, (1-3), 9-15.
108. Vauquelin, G.; Michotte, Y.; Smolders, I.; Sarre, S.; Ebinger, G.; Dupont, A.; Vanderheyden, P., Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2002**, 3, (4), 195-204.
109. Hanesworth, J. M.; Sardinia, M. F.; Krebs, L. T.; Hall, K. L.; Harding, J. W., Elucidation of a specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in mammalian heart membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**, 266, (2), 1036-42.
110. Miller-Wing, A. V.; Hanesworth, J. M.; Sardinia, M. F.; Hall, K. L.; Wright, J. W.; Speth, R. C.; Grove, K. L.; Harding, J. W., Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**, 266, (3), 1718-26.
111. Hall, K. L.; Hanesworth, J. M.; Ball, A. E.; Felgenhauer, G. P.; Hosick, H. L.; Harding, J. W., Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV. *Regul Pept* **1993**, 44, (2), 225-32.
112. de Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T., International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **2000**, 52, (3), 415-72.
113. Roberts, K. A.; Krebs, L. T.; Kramar, E. A.; Shaffer, M. J.; Harding, J. W.; Wright, J. W., Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. *Brain Res* **1995**, 682, (1-2), 13-21.

114. Handa, R. K., Characterization and signaling of the AT(4) receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *J Am Soc Nephrol* **2001**, 12, (3), 440-9.
115. Esteban, V.; Ruperez, M.; Sanchez-Lopez, E.; Rodriguez-Vita, J.; Lorenzo, O.; Demaegdt, H.; Vanderheyden, P.; Egido, J.; Ruiz-Ortega, M., Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **2005**, 96, (9), 965-73.
116. Kerins, D. M.; Hao, Q.; Vaughan, D. E., Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* **1995**, 96, (5), 2515-20.
117. Chen, J. K.; Zimpelmann, J.; Harris, R. C.; Burns, K. D., Angiotensin IV induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **2001**, 280, (6), F980-8.
118. Holownia, A.; Braszko, J. J., The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2007**, 376, (3), 157-63.
119. Chow, L. H.; Tao, P. L.; Chen, Y. H.; Lin, Y. H.; Huang, E. Y., Angiotensin IV possibly acts through PKMzeta in the hippocampus to regulate cognitive memory in rats. *Neuropeptides* **2015**, 53, 1-10.
120. Patel, J. M.; Martens, J. R.; Li, Y. D.; Gelband, C. H.; Raizada, M. K.; Block, E. R., Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol* **1998**, 275, (6), L1061-8.
121. Tabka, D.; Bejaoui, M.; Javellaud, J.; Achard, J. M.; Ben Abdennebi, H., Angiotensin IV improves subnormothermic machine perfusion preservation of rat liver graft. *Biomed Pharmacother* **2018**, 104, 841-847.
122. Dulin, N.; Madhun, Z. T.; Chang, C. H.; Berti-Mattera, L.; Dickens, D.; Douglas, J. G., Angiotensin IV receptors and signaling in opossum kidney cells. *Am J Physiol* **1995**, 269, (5 Pt 2), F644-52.
123. Davis, C. J.; Kramar, E. A.; De, A.; Meighan, P. C.; Simasko, S. M.; Wright, J. W.; Harding, J. W., AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation. *Neuroscience* **2006**, 137, (4), 1369-79.

124. Chai, S. Y.; Fernando, R.; Peck, G.; Ye, S. Y.; Mendelsohn, F. A.; Jenkins, T. A.; Albiston, A. L., The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, (21), 2728-37.
125. Fernando, R. N.; Luff, S. E.; Albiston, A. L.; Chai, S. Y., Sub-cellular localization of insulin-regulated membrane aminopeptidase, IRAP to vesicles in neurons. *J Neurochem* **2007**, 102, (3), 967-76.
126. Wright, J. W.; Yamamoto, B. J.; Harding, J. W., Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol* **2008**, 84, (2), 157-81.
127. Bosnyak, S.; Jones, E. S.; Christopoulos, A.; Aguilar, M. I.; Thomas, W. G.; Widdop, R. E., Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)* **2011**, 121, (7), 297-303.
128. Allen, A. M.; Moeller, I.; Jenkins, T. A.; Zhuo, J.; Aldred, G. P.; Chai, S. Y.; Mendelsohn, F. A., Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* **1998**, 47, (1), 17-28.
129. von Bohlen und Halbach, O.; Albrecht, D., Identification of angiotensin IV binding sites in the mouse brain by a fluorescent binding study. *Neuroendocrinology* **2000**, 72, (4), 218-23.
130. Wright, J. W.; Harding, J. W., Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* **1997**, 25, (1), 96-124.
131. Moeller, I.; Paxinos, G.; Mendelsohn, F. A.; Aldred, G. P.; Casley, D.; Chai, S. Y., Distribution of AT4 receptors in the Macaca fascicularis brain. *Brain Res* **1996**, 712, (2), 307-24.
132. Wright, J. W.; Krebs, L. T.; Stobb, J. W.; Harding, J. W., The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* **1995**, 16, (1), 23-52.
133. Chai, S. Y.; Bastias, M. A.; Clune, E. F.; Matsacos, D. J.; Mustafa, T.; Lee, J. H.; McDowall, S. G.; Paxinos, G.; Mendelsohn, F. A.; Albiston, A. L., Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat* **2000**, 20, (3-4), 339-48.

134. Wright, J. W.; Harding, J. W., Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* **1994**, 18, (1), 21-53.
135. Fernando, R. N.; Larm, J.; Albiston, A. L.; Chai, S. Y., Distribution and cellular localization of insulin-regulated aminopeptidase in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **2005**, 487, (4), 372-90.
136. Bernstein, H. G.; Muller, S.; Dobrowolny, H.; Wolke, C.; Lendeckel, U.; Bukowska, A.; Keilhoff, G.; Becker, A.; Trubner, K.; Steiner, J.; Bogerts, B., Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **2017**, 267, (5), 427-443.
137. Yeatman, H.; Albiston, A.; Chai, S., P3-477: Insulin-regulated aminopeptidase in astrocytes: Role in Alzheimer's disease? *Alzheimer's & Dementia* **2011**, 7, (4S_Part_19), S668-S668.
138. Braszko, J. J., Involvement of D1 dopamine receptors in the cognitive effects of angiotensin IV and des-Phe6 angiotensin IV. *Peptides* **2004**, 25, (7), 1195-203.
139. Braszko, J. J.; Walesiuk, A.; Wielgat, P., Cognitive effects attributed to angiotensin II may result from its conversion to angiotensin IV. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2006**, 7, (3), 168-74.
140. Tchekalarova, J.; Kambourova, T.; Georgiev, V., Interaction between angiotensin IV and adenosine A(1) receptor related drugs in passive avoidance conditioning in rats. *Behav Brain Res* **2001**, 123, (1), 113-6.
141. Gard, P. R.; Naylor, C.; Ali, S.; Partington, C., Blockade of pro-cognitive effects of angiotensin IV and physostigmine in mice by oxytocin antagonism. *Eur J Pharmacol* **2012**, 683, (1-3), 155-60.
142. Fidalgo, S.; Patel, M.; Quadir, A.; Sadiq, W.; Gard, P. R., Decreased behavioural and neurochemical effects of angiotensin IV following prenatal alcohol exposure in the mouse. *Neuropeptides* **2019**, 77, 101931.
143. Paris, J. J.; Eans, S. O.; Mizrachi, E.; Reilley, K. J.; Ganno, M. L.; McLaughlin, J. P., Central administration of angiotensin IV rapidly enhances novel object recognition among mice. *Neuropharmacology* **2013**, 70, 247-53.

144. Lee, J.; Albiston, A. L.; Allen, A. M.; Mendelsohn, F. A.; Ping, S. E.; Barrett, G. L.; Murphy, M.; Morris, M. J.; McDowall, S. G.; Chai, S. Y., Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience* **2004**, 124, (2), 341-9.
145. Braszko, J. J., Dopamine D4 receptor antagonist L745,870 abolishes cognitive effects of intracerebroventricular angiotensin IV and des-Phe(6)-Ang IV in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **2009**, 19, (2), 85-91.
146. De Bundel, D.; Smolders, I.; Yang, R.; Albiston, A. L.; Michotte, Y.; Chai, S. Y., Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. *Neurobiol Learn Mem* **2009**, 92, (1), 19-26.
147. Wilson, W. L.; Munn, C.; Ross, R. C.; Harding, J. W.; Wright, J. W., The role of the AT4 and cholinergic systems in the Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM): effects on spatial memory. *Brain Res* **2009**, 1272, 25-31.
148. Albiston, A. L.; Fernando, R. N.; Yeatman, H. R.; Burns, P.; Ng, L.; Daswani, D.; Diwakarla, S.; Pham, V.; Chai, S. Y., Gene knockout of insulin-regulated aminopeptidase: loss of the specific binding site for angiotensin IV and age-related deficit in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* **2010**, 93, (1), 19-30.
149. Yeatman, H. R.; Albiston, A. L.; Burns, P.; Chai, S. Y., Forebrain neurone-specific deletion of insulin-regulated aminopeptidase causes age related deficits in memory. *Neurobiol Learn Mem* **2016**, 136, 174-182.
150. Olson, M. L.; Olson, E. A.; Qualls, J. H.; Stratton, J. J.; Harding, J. W.; Wright, J. W., Norleucine1-Angiotensin IV alleviates mecamylamine-induced spatial memory deficits. *Peptides* **2004**, 25, (2), 233-41.
151. Albiston, A. L.; Pederson, E. S.; Burns, P.; Purcell, B.; Wright, J. W.; Harding, J. W.; Mendelsohn, F. A.; Weisinger, R. S.; Chai, S. Y., Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. *Behav Brain Res* **2004**, 154, (1), 239-43.
152. Pederson, E. S.; Krishnan, R.; Harding, J. W.; Wright, J. W., A role for the angiotensin AT4 receptor subtype in overcoming scopolamine-induced spatial memory deficits. *Regul Pept* **2001**, 102, (2-3), 147-56.

153. Benoist, C. C.; Wright, J. W.; Zhu, M.; Appleyard, S. M.; Wayman, G. A.; Harding, J. W., Facilitation of hippocampal synaptogenesis and spatial memory by C-terminal truncated Nle1-angiotensin IV analogs. *J Pharmacol Exp Ther* **2011**, 339, (1), 35-44.
154. Olson, M. L.; Cero, I. J., Intrahippocampal Norleucine(1)-Angiotensin IV mitigates scopolamine-induced spatial working memory deficits. *Peptides* **2010**, 31, (12), 2209-15.
155. Kilic, A.; Ustunova, S.; Elibol, B.; Bulut, H.; Meral, I.; Sahin, G., Angiotensin IV improves spatial memory in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress and altering BDNF levels. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **2021**, 81, (2), 161-170.
156. Grammatopoulos, T. N.; Outeiro, T. F.; Hyman, B. T.; Standaert, D. G., Angiotensin II protects against alpha-synuclein toxicity and reduces protein aggregation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 363, (3), 846-51.
157. Royea, J.; Martinot, P.; Hamel, E., Memory and cerebrovascular deficits recovered following angiotensin IV intervention in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **2020**, 134, 104644.
158. Lee, J.; Chai, S. Y.; Mendelsohn, F. A.; Morris, M. J.; Allen, A. M., Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology* **2001**, 40, (4), 618-23.
159. De Bundel, D.; Demaegdt, H.; Lahoutte, T.; Caveliers, V.; Kersemans, K.; Ceulemans, A. G.; Vauquelin, G.; Clinckers, R.; Vanderheyden, P.; Michotte, Y.; Smolders, I., Involvement of the AT1 receptor subtype in the effects of angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 on hippocampal neurotransmitter levels and spatial working memory. *J Neurochem* **2010**, 112, (5), 1223-34.
160. Stragier, B.; Sarre, S.; Vanderheyden, P.; Vauquelin, G.; Fournie-Zaluski, M. C.; Ebinger, G.; Michotte, Y., Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *J Neurochem* **2004**, 90, (5), 1251-7.
161. Braszko, J. J., D2 dopamine receptor blockade prevents cognitive effects of Ang IV and des-Phe6 Ang IV. *Physiol Behav* **2006**, 88, (1-2), 152-9.

162. Braszko, J. J., (+)-UH 232, a partial agonist of the D3 dopamine receptors, attenuates cognitive effects of angiotensin IV and des-Phe(6)-angiotensin IV in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **2010**, 20, (4), 218-25.
163. Kramar, E. A.; Armstrong, D. L.; Ikeda, S.; Wayner, M. J.; Harding, J. W.; Wright, J. W., The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. *Brain Res* **2001**, 897, (1-2), 114-21.
164. Wayner, M. J.; Armstrong, D. L.; Phelix, C. F.; Wright, J. W.; Harding, J. W., Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides* **2001**, 22, (9), 1403-14.
165. Wright, J. W.; Kramar, E. A.; Myers, E. D.; Davis, C. J.; Harding, J. W., Ethanol-induced suppression of LTP can be attenuated with an angiotensin IV analog. *Regul Pept* **2003**, 113, (1-3), 49-56.
166. McCoy, A. T.; Benoist, C. C.; Wright, J. W.; Kawas, L. H.; Bule-Ghogare, J. M.; Zhu, M.; Appleyard, S. M.; Wayman, G. A.; Harding, J. W., Evaluation of metabolically stabilized angiotensin IV analogs as procognitive/antidementia agents. *J Pharmacol Exp Ther* **2013**, 344, (1), 141-54.
167. Wirkner, K.; Köles, L.; Thümmel, S.; Luthardt, J.; Poelchen, W.; Franke, H.; Fürst, S.; Illes, P., Interaction between P2Y and NMDA receptors in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* **2002**, 42, (4), 476-88.
168. Wirkner, K.; Gerevich, Z.; Krause, T.; Günther, A.; Köles, L.; Schneider, D.; Nörenberg, W.; Illes, P., Adenosine A2A receptor-induced inhibition of NMDA and GABAA receptor-mediated synaptic currents in a subpopulation of rat striatal neurons. *Neuropharmacology* **2004**, 46, (7), 994-1007.
169. Khakpay, R.; Polster, D.; Köles, L.; Skorinkin, A.; Szabo, B.; Wirkner, K.; Illes, P., Potentiation of the glutamatergic synaptic input to rat locus coeruleus neurons by P2X7 receptors. *Purinergic Signal* **2010**, 6, (3), 349-59.
170. Köles, L.; Garção, P.; Zádori, Z. S.; Ferreira, S. G.; Pinheiro, B. S.; da Silva-Santos, C. S.; Ledent, C.; Köfalvi, A., Presynaptic TRPV1 vanilloid receptor function is age- but not CB1 cannabinoid receptor-dependent in the rodent forebrain. *Brain Res Bull* **2013**, 97, 126-35.

171. Kiraly, K.; Caputi, F. F.; Hanuska, A.; Kató, E.; Balogh, M.; Köles, L.; Palmisano, M.; Riba, P.; Hosztafi, S.; Romualdi, P.; Candeletti, S.; Ferdinandy, P.; Fürst, S.; Al-Khrasani, M., A new potent analgesic agent with reduced liability to produce morphine tolerance. *Brain Res Bull* **2015**, 117, 32-8.
172. Koványi, B.; Csölle, C.; Calovi, S.; Hanuska, A.; Kató, E.; Köles, L.; Bhattacharya, A.; Haller, J.; Sperlágh, B., The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. *Sci Rep* **2016**, 6, 36680.
173. Gage, G. J.; Kipke, D. R.; Shain, W., Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* **2012**, (65).
174. Tóth, Z. E.; Mezey, E., Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J Histochem Cytochem* **2007**, 55, (6), 545-54.
175. Harms, P. W.; Frankel, T. L.; Moutafi, M.; Rao, A.; Rimm, D. L.; Taube, J. M.; Thomas, D.; Chan, M. P.; Pantanowitz, L., Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Mod Pathol* **2023**, 36, (7), 100197.
176. ncbi.nlm.nih.gov Nuccore. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (2025. Január 1.),
177. ncbi.nlm.nih.gov Primer-BLAST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> (2025. Január 1.),
178. Krügel, U.; Köles, L.; Illés, P., Integration of neuronal and glial signalling by pyramidal cells of the rat prefrontal cortex; control of cognitive functions and addictive behaviour by purinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacol Hung* **2013**, 15, (4), 206-13.
179. Kawaguchi, Y., Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* **1993**, 69, (2), 416-31.
180. Hallberg, M.; Larhed, M., From Angiotensin IV to Small Peptidemimetics Inhibiting Insulin-Regulated Aminopeptidase. *Front Pharmacol* **2020**, 11, 590855.

181. Kawas, L. H.; Yamamoto, B. J.; Wright, J. W.; Harding, J. W., Mimics of the dimerization domain of hepatocyte growth factor exhibit anti-Met and anticancer activity. *J Pharmacol Exp Ther* **2011**, 339, (2), 509-18.
182. Yamamoto, B. J.; Elias, P. D.; Masino, J. A.; Hudson, B. D.; McCoy, A. T.; Anderson, Z. J.; Varnum, M. D.; Sardinia, M. F.; Wright, J. W.; Harding, J. W., The angiotensin IV analog Nle-Tyr-Leu-psi-(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe (norleual) can act as a hepatocyte growth factor/c-Met inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, 333, (1), 161-73.
183. ProteinAtlas.org The Open Access Resource for Human Protein. <https://www.proteinatlas.org> (2024. Augustus 1.),
184. Sengupta, P., The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* **2013**, 4, (6), 624-30.

10. Saját publikációk jegyzéke

PhD értekezés benyújtásához, az **MTMT-be** feltöltött **eredeti közlemények** alapján

Jelölt neve: Dr. Papp Zsolt Tamás

Törzskönyvi száma: 121/2017

Hallgatói azonosítója (Neptun-kód):
F3MBL5

Doktori Tagozat neve: Gyógyszertudományok Doktori iskola

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Papp Zsolt Tamás, Ribiczey Polett, Kató Erzsébet, Tóth Zsuzsanna E, Varga Zoltán V, Giricz

Zoltán, Hanuska Adrienn, Al-Khrasani Mahmoud, Zsembery Ákos, Zelles Tibor, Harsing

Laszlo G, Köles László

Angiotensin IV Receptors in the Rat Prefrontal Cortex: Neuronal Expression and NMDA Inhibition

BIOMEDICINES 13 : 1 Paper: 71 , 19 p. (2025)

Közlemény: 35663377 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

IF: 3,9

Hanuska Adrienn, Ribiczey Polett, Kató Erzsébet, **Papp Zsolt Tamás**, Varga Zoltán V, Giricz Zoltán, Tóth Zsuzsanna E, Könczöl Katalin, Zsembery Ákos, Zelles Tibor, Harsing Laszlo G,

Köles László

Potentiation of NMDA Receptors by AT1 Angiotensin Receptor Activation in Layer V Pyramidal Neurons of the Rat Prefrontal Cortex

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 25 : 23 Paper:

12644,

18 p. (2024)

Közlemény: 35645506 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Inorganic Chemistry SJR indikátor: D1

Scopus - Organic Chemistry SJR indikátor: D1

Scopus - Spectroscopy SJR indikátor: D1

Scopus - Computer Science Applications SJR indikátor: Q1

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Physical and Theoretical Chemistry SJR indikátor: Q1

Scopus - Catalysis SJR indikátor: Q2

Scopus - Molecular Biology SJR indikátor: Q2

IF: 4,9

A 2024-es és 2025-ös IF- és presztízssértékek (D1, Q) várható értékek

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Bereczki Zoltán, Benczik Bettina, Balogh Olivér M, Marton Szandra, Puhl Eszter, Pétervári

Mátyás, Váczy-Földi Máté, **Papp Zsolt Tamás**, Makkos András, Glass Kimberly, Locquet Fabian, Euler Gerhild, Schulz Rainer, Ferdinandy Péter, Ágg Bence

Mitigating off-target effects of small RNAs: conventional approaches, network theory and artificial intelligence

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 182 : 2 pp. 340-379. (2025)

Közlemény: 35364643 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Pharmacology SJR indikátor: D1

IF: 6,8

Galambos Anna Rita, **Papp Zsolt Tamás**, Boldizsár Imre, Zádor Ferenc, Köles László, Harsing Laszlo G, Al-Khrasani Mahmoud

Glycine Transporter 1 Inhibitors: Predictions on Their Possible Mechanisms in the Development of Opioid Analgesic Tolerance

BIOMEDICINES 12 : 2 Paper: 421 , 21 p. (2024)

Közlemény: 34592029 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

IF: 3,9

A 2024-es és 2025-ös IF- és presztízssértékek (D1, Q) várható értékek

A Központi Könyvtár igazolása:

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények összesített
impaktfaktor értéke: 8,8

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények
összesített impaktfaktor értéke: 10,7

I.+II. A könyvtári adatlapon feltüntetett közlemények összesített impaktfaktor értéke:
19,5

Budapest, 2025.02.10.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Köles Lászlónak a kutatásban nyújtott iránymutatásért, támogatásért.

Hatalmas köszönettel tartozom Dr. Szentirmainé Dr. Ribiczey Polettnak az immunhiszókémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok megtanításáért, elvégzésében nyújtott segítségéért, feldolgozása során adott tanácsaiért.

Köszönöm továbbá Dr. Kató Erzsébetnek.

Köszönöm Dr. Humli Viktóriának, Dr. Szepesy Juditnak és Dr. Zelles Tibornak a labormunkákban nyújtott sok-sok segítséget és jótanácsot.

Köszönöm Dr. Giricz Zoltánnak, Kovács Andreának, Dr. Varga Zoltánnak a szövetlaborban és a konfokális mikroszkópnál a lehetőséget, útmutatást és segítséget.

Köszönöm Gulyás Antalnak az elektrofiziológia mechanikájában és elektronikájában nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Király Kornélnak az alapos és részletes házi bírálatot.

Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet és az Orálbiológiai Tanszék összes munkatársának.

Köszönöm Prof. Dr. Ferdinandy Péternek és Dr. Zsembery Ákosnak, akik lehetővé tették, hogy Ph.D. munkámat itt végezzem.

Végül köszönöm gyermekemnek, feleségemnek, és szüleimnek a támogatást és a türelmet.