

Szent István Egyetem - Állatorvos-Tudományi Kar

Biológia Intézet – Ökológia tanszék

# **Kannabinoidok hatása a magatartási stressz-válaszra**

**Varga Zoltán Kristóf**

**Témavezető:** **Dr. Haller József, Ph.D., D.Sc.**, osztályvezető,  
tudományos tanácsadó

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,  
Magatartásneurobiológiai Osztály

**Belső konzulens:** **Dr. Kabai Péter, Ph.D.**, egyetemi docens  
SZIE Állatorvos-tudományi Kar,  
Ökológiai Tanszék

**Budapest**

**2013**

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Bevezetés .....</b>	<b>3</b>
2.1 A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer.....	3
2.2 Kannabinoidok és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA-tengely) ...	6
2.3 Kannabinoidok és a magatartás .....	9
<b>3. Célkitűzés .....</b>	<b>13</b>
<b>4. Anyag és módszer .....</b>	<b>14</b>
4.1 Kísérleti alanyok.....	14
4.2 Drogok és dózisok .....	14
4.3 Viselkedés-elemzés .....	14
4.4 Hormonmérés .....	16
4.5 Kísérleti elrendezés.....	16
4.6 Statisztikai analízis .....	18
<b>5. Eredmények.....</b>	<b>19</b>
<b>6. Megvitatás .....</b>	<b>23</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>26</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>27</b>
<b>9. Hivatkozások.....</b>	<b>28</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>35</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>2-AG</b>	2-arachidonoil-glicerol
<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	$\Delta^9$ -tetrahidrokannabinol
<b>ACTH</b>	adrenokortikotróp hormon
<b>AEA</b>	2-arachidonolil-etanolamid (anandamid)
<b>ANOVA</b>	varianciaanalízis
<b>AVP</b>	arginin vazopresszin
<b>CB<sub>1</sub></b>	1-es típusú kannabinoid receptor
<b>CB<sub>2</sub></b>	2-es típusú kannabinoid receptor
<b>CB<sub>1</sub> KO</b>	1-es típusú kannabinoid receptor génkiütött (knock-out)
<b>CBx</b>	eddig ismeretlen kannabinoid receptor
<b>cAMP</b>	ciklikus adenzin-monofoszfát
<b>CRH</b>	kortikotropin felszabadulást serkentő hormon (corticotropin releasing hormone)
<b>DAG</b>	1,2-diacil-glicerol
<b>DMSO</b>	dimetil-szulfoxid
<b>eCB</b>	endokannabinoid
<b>FAAH</b>	zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amid hydrolase)
<b>i.c.v.</b>	intracerebroventrikuláris
<b>i.p.</b>	intraperitoneális
<b>GABA</b>	gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
<b>GC</b>	glükokortikoid
<b>HD</b>	lenézés (head dipping)
<b>HPA-tengely</b>	hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-axis)
<b>MAGL</b>	monoacilglicerol-lipáz
<b>MC</b>	metilcellulóz
<b>NAPE</b>	N-acil-foszfatidil-etanolamin
<b>PTSD</b>	poszt-traumatikus stressz-zavar (post-traumatic stress disorder)
<b>PVN</b>	hipotalamusz paraventriculáris nukleusza
<b>SAP</b>	feszült figyelmi testhelyzet (stretched attend posture)
<b>TRPV1</b>	egyres típusú vanilloid receptor (transient receptor potential vanilloid type 1)

## 2. Bevezetés

### 2.1 A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer

Az indiai kender (*Cannabis indica*) különböző származékainak élvezeti és gyógyászati célokra való tudatos felhasználása az ókori időkre tekint vissza. A történelem során egyes feljegyzésekben orvosságként, másokban kábítószerként említik, ennek megfelelően a használata iránti tolerancia is széles skálán változott. Bár mentális betegségek kezelésére, fájdalomcsillapításra, valamint nyugtatóként régóta alkalmazták, a kannabisz magas abúzus potenciáljára és használatának egyéb káros hatásaira hivatkozva elsőként az USA-ban 1937-ben, majd ezt követően a világ szinte összes országában betiltották. A marihuána hatásaiért felelős egyes kannabinoidokat tartalmazó szerek orvosi használata az utóbbi években egyre kevésbé korlátozott, így több országban is alkalmazható például AIDS, illetve daganatos megbetegedések kezelési mellékhatásainak enyhítésére (étvágytalanság, súlyvesztés) valamint glaukóma kezelésére (szemnyomás csökkentése).

Az 1940-es években írták le, hogy a kannabisz hatásaiért úgynevezett phytokannabinoidok felelősek, amelyekből ma, csak az indiai kenderből izolálva, már több mint hatvanat ismerünk. Ezek közül a legjelentősebb a  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC), amely a marihuána pszichoaktív hatásaiért felelős, pontos szerkezetét Gaoni és Mechoulam határozta meg 1964-ben (Gaoni és Mechoulam, 1964). A  $\Delta^9$ -THC és egyéb természetes valamint mesterséges exogén kannabinoidok hatásmechanizmusát tanulmányozva írták le 1990-ben az állati szervezetben működő kannabinoid receptorok (CB receptor) jelenlétét, ezzel az endokannabinoid rendszer (eCB rendszer) első nyomaira bukkanva. A rendszert egyre inkább feltérképezve jöttek rá, hogy léteznek ezeken a receptorokon keresztül ható endogén ligandok, zsírszerű molekulák, melyek szerkezetileg kevésbé, ám farmakológiai tulajdonságaikban sokkal inkább hasonlítanak a korábban megismert phytokannabinoidokra. Ma két, jelentőségükben kiemelkedő, CB receptoron ható endogén kannabinoidot (eCB) tartunk meghatározónak a rendszer működésében. A korábban, 1992-ben leírt arachidonoil-etanolamidot, más néven anandamidot (AEA) (Devane és mtsai., 1992) és az eddig még kevésbé kutatott 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG) (Stella és mtsai., 1997).

Az eCB rendszer fontos komponensei a specifikus CB receptorok, melyek 7 helikális transzmembrán doménből álló, G-proteinhez kapcsolt fehérje komplexek. Ismerünk 1-es (CB<sub>1</sub>) (Matsuda és mtsai., 1990), illetve 2-es (CB<sub>2</sub>) (Gérard és mtsai., 1991) típusú kannabinoid receptorokat, valamint feltételezhetőek eddig még ismeretlen CB receptorok mind perifériásan, mind centrálisan. Adott receptor típuson keresztül kifejeződő hatás gyakran

lehet régió vagy ligand függő, így ritkán lehet általános kijelentéseket tenni egy bizonyos receptor funkcióját tekintve. A CB<sub>1</sub> receptor leginkább a központi idegrendszerben reprezentált, általánosan elmondható, hogy nagyobb mennyiségben megtaláljuk a bulbus olfactoriusban, corticalis, thalamicus, hypothalamicus, cerebellaris és agytörzsi területeken, illetve a fájdalomérzet pályáin a gerincvelőben (összefoglaló: Mackie és mtsai., 2005), de ez fajoként eltérő mintázatokat mutathat. Találunk CB<sub>1</sub> receptort perifériásan is a májban, a vesében, illetve a mellékvesekéregben, utóbbinak jelentősége lehet az endokannabinoid rendszer és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA-tengely) kapcsolatában, lévén a mellékvesekéreg zona fasciculata sejtjei felelősek a glükokortikoidok szintéziséért. CB<sub>1</sub> receptoron nagyjából azonos affinitással kötődik a  $\Delta^9$ -THC és az AEA is (Lutz és mtsai., 2002; összefoglaló: Pertwee és Ross, 2002), ezzel ellentétben az utóbbi a döntően az immunrendszerben előforduló CB<sub>2</sub> receptornak csak parciális agonistája. Az AEA egyébként számos receptor típuson kifejtheti hatását, így például CB<sub>1</sub> receptor agonista, CB<sub>2</sub> receptor parciális agonista, de a két eddig megismert CB receptoron kívül valószínűleg a központi idegrendszerben a HPA-tengely moduláló hatásai részben egy eddig ismeretlen CB receptorhoz (CB<sub>x</sub>) is köthetőek. Ezen kívül gyenge agonistája még az 1-es típusú vanilloid receptornak (TRPV1), de megfigyelhetőek TRPV1 független vanilloid szerű hatásai is (Wenger, 2003). A 2-AG mindkét ismert CB receptor teljes értékű agonistája (Stella és mtsai., 1997). Eddig meg nem ismert, kannabinoid érzékeny receptorok hatásait láthattuk glutamáterg szinapszisok szabályzásában (Kőfalvi és mtsai., 2005), illetve bizonyos magatartásokban, például a szorongás szabályozásban (Haller és mtsai., 2002) is.

Az endokannabinoidok legalapvetőbb funkciója a központi idegrendszeri neuronális hálózat aktivitásának szabályozása, glutamáterg és GABAerg szinapszisok neurotranszmitter kibocsátásának modulálása. Ezt egy retrográd jelátviteli úton keresztül éri el, vagyis poszt-szinaptikus-pre-szinaptikus irányban hatva negatívan szabályozzák saját szinaptikus bemenetüket (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001). A tüzelő neuron pre-szinaptikus membránjáról neurotranszmitterek ürülnek a szinaptikus részbe, majd ezek poszt-szinaptikusan kötődnek, ezzel az idegsejt depolarizációját okozva. A depolarizáció feszültség függő Ca<sup>2+</sup> csatornák megnyílását eredményezi, így megnő az ion intracelluláris koncentrációja, aminek hatására aktiválódik egy Ca-dependens transzacyláz enzim. Ez az enzim katalizálja a membránban jelenlévő foszfatidil-kolin átalakulását N-acilfoszfatidil-etanolaminná (NAPE), az AEA prekursorává. Ez után a NAPE-AEA átalakulás egy több lépcsős, foszfolipáz C, illetve foszfolipáz D mediálta enzimátikus kaszkád rendszer keretein belül zajlik le. A 2-AG szintézise szintén Ca<sup>2+</sup> ionhoz kötött

folyamat, ahol a fent említett foszfolipázok foszfatidil-inozitról állítják elő a 1,2-diacilglicerolt (DAG), ami egy diacilglicerol lipáz enzim katalizálta reakcióban alakul 2-AG-vá (Di Marzo és Petrozino, 2007). A 2 fő endokannabinoid szintézise, nem kizárólagosan neurotranszmitter mediált, egyes cAMP serkentő ágensek az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növelésével szintén kiválthatják kialakulásukat, ahogy ez például a későbbiekben részletezendő glükokortikoid mediált eCB szintézis során történik (Di Marzo és Deutsch, 1998, Malcher-Lopes és Di, 2006). A szintézis után a kannabinoidok kijutnak a szinaptikus részbe, majd a pre-szinaptikus neuron felületén vagy közvetlenül ioncsatornákhöz kötődve hatnak, vagy G-protein kapcsolt CB receptorokhoz kötődnek, hatásukat ezen keresztül fejtik ki (Di Marzo és Petrozino, 2007). Közvetlen módon N, illetve P/Q  $Ca^{2+}$  csatornákhöz kötődve blokkolják azok működését, ezzel meggátolva a sejtbe való további  $Ca^{2+}$  beáramlást, a neuron tüzelését (Twitchell és mtsai., 1997; Kreitzer és Regehr, 2001). CB receptorhoz kötve G-protein rendszeren át is képesek az N típusú  $Ca^{2+}$  csatornákat gátolni (Lenz és mtsai., 1998), illetve a befelé irányuló  $K^+$  csatornákat nyitni (Guo és Ikeda, 2004), ezek eredőjével pedig a neuron aktivitását negatívan modulálni. A ligandok intracellulárisan enzimatis úton bomlanak le. Az AEA lebontását a zsírsav-amid hidroláz (fatty-acid-amid hydrolase) (FAAH) enzim végzi arachidonsavvá és etanol-aminná, míg a 2-AG-t a monoacilglicerol lipáz (MAGL) bontja el arachidonsavvá és glicerinné (Dinh és mtsai., 2002; összefoglaló: Freund és mtsai., 2003; Di Marzo és Petrozino, 2007). Ezen metabolizmus befolyásolása egy jelenleg is alkalmazott, potenciális támadási felület a rendszer manipulálására.

Az endokannabinoid rendszer tanulmányozása a rendszer befolyásolásán, manipulálásán keresztül lehetséges. Erre több módszer is adódik, egyre pontosabb, egyre specifikusabb válaszokat adva. Gyakran alkalmazott módszer a gén-diszruptció, vagyis Knock Out (KO) állatok előállítása. Valamely CB receptor génjének kiütésével specifikus módon vizsgálhatjuk az egyes endokannabinoidok receptor-függő hatásait, illetve a tapasztalt hatások mechanizmusát. A módszer hátránya lehet, hogy felléphet gén-kompenzáció, vagyis a kiütött gén által kódolt fehérjék bizonyos funkcióit átvehetik más génproduktumok, egyes neurotranszmissziós folyamatok átstrukturálódhatnak, ezzel torzítva az eredményeket. Szintén gyakran alkalmaznak farmakológiai módszereket, például receptor agonisták, illetve antagonisták használatát. Gyakran használt CB receptor agonisták a WIN55,212-2, a CP55940, HU210.  $CB_1$  antagonisták vagy inverz agonisták például az AM251, az AM281, az SR141716 (rimonabant), vagy az O2050. Nagy előnyük ezeknek a ligandoknak hogy gyakran receptor specifikusak, hátrányuk hogy nem régió specifikusak, erre semmilyen agonista vagy

antagonista nem képes. Ebből következik, hogy nehéz a kifejtett hatás szintjét beazonosítani, mivel CB receptorok széles körben jelen vannak a központi idegrendszerben. Akár szisztémásan, akár intracerebroventrikulárisan (i.c.v.) alkalmazva, hatásukat több, CB receptort prezentáló szinten kifejtik, ami egy ilyen érzékeny rendszer tanulmányozása során, mint az eCB rendszer, félrevezető lehet. A ma alkalmazandó talán legspecifikusabb farmakológiai módszer a kannabinoid metabolizmus gátlás, ami az adott endokannabinoidot fiziológiásan lebontó enzim blokkolását jelenti, ezzel felerősítve a jelátvitelt. A módszer legnagyobb előnye a nagy mértékű szelektivitás, és az *on-demand* hatás, vagyis hogy a jel csak ott és csak akkor erősödik, ahol és amikor valóban létrejön eCB jelátvitel. Ezzel elérhető magas fokú régió- és ligand-specificitás. A korábban felfedezett AEA-t gátló FAAH blokkolására széles körben alkalmazott vegyület az URB597 (Piomelli és mtsai., 2003), amely élettani és magatartási hatásairól nagy mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. A 2-AG-t elbontó MAGL gátlásának hatásai korántsem mondhatóak ennyire feltérképezettnek, mivel erre csak az utóbbi időben előállított JZL184 (Long és mtsai., 2009) nevű vegyület kínál lehetőséget.

## **2.2 Kannabinoidok és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA-tengely)**

A szervezet stressz-reaktivitásának központi szerepű, kulcsfontosságú szerv-együttese a HPA-tengely. Ez a tengely irányítja a stressz-válasz hormonális és ezen keresztül még sok más oldalát egy három lépcsős kaszkád mechanizmuson át, aminek végső végrehajtói a glükokortikoidok (GC). A HPA-tengely így többek között hatással van a metabolizmusra, energia homeosztázisra, kognitív folyamatokra, viselkedésre, illetve saját működésére. Külső vagy belső stresszor hatására az agy egyes szenzoros és limbikus központjai (pl: PFC, amygdala, hipokampusz) serkentik a HPA-tengely legfőbb agyi központjának a hipotalamusz paraventrális nukleuszának (PVN) aktivitását (Patel és mtsai., 2003). A PVN parvocelluláris magcsoportjának neuronjai kortikotropin felszabadulást serkentő hormont (CRH) és arginin vasopresszint (AVP) termelnek, amik az axonból az eminentia medianán keresztül a portális keringésbe jutnak, ahonnan a hipofízis elülső lebenyébe ürülnek. Itt a CRH és az AVP fokozza a hipofízisben termelődő adrenokortikotróp hormon (ACTH) prekursorának, a proopiomelanocortinnak a szintézisét, valamint elősegíti, a már kész, vezikulomokban tárolódó ACTH vérbe ürülését. A szisztémás keringésbe jutott ACTH a mellékvesekéreg zona fasciculatajában kiváltja a glükokortikoidok termelődését, amik ezek után belépve a vérkeringésbe és a célsejtekhez eljutva fejtik ki hatásukat a periférián (Vale és mtsai., 1981; Herman és mtsai., 1997, Dallman és mtsai., 2005). A glükokortikoidok saját szintézisüket is



befolyásolják, rövid, illetve hosszúpályás feedback révén, vagyis mind a hipofízis, mind a hipotalamusz szintjén.

Az endokannabinoid rendszer és a HPA-tengely kapcsolatának kérdése akkor merült föl először, amikor a CB<sub>1</sub> receptor nagyfokú expresszátságára lettek figyelmesek patkány hipotalamuszban és hipofízisben (Herkenham és mtsai. 1991). Ebből arra következtethetünk, hogy az eCB rendszer befolyással bírhat a HPA-tengelyre és így a stressz-reaktivitásra, valamint a magatartásra. Az eCB rendszer-HPA-tengely kapcsolat egy alapvető jelenségének leírása Di és munkatársai (2003; 2005; 2009) munkájához kötődik. A glükokortikoidok negatív, nem-genomiális, gyors visszacsatolását eCB jelátvitelen keresztül megvalósuló folyamatként írja le. A PVN parvo- és magnocelluláris magcsoportjaiban lévő CRH-t kiválasztó neuronokat serkentő glutamáterg, illetve gátló GABAerg szinapszisok idegzik be, endokrin szekréciójukat ezek szabályozzák. Di és munkatársai *in vitro* hipotalamikus metszeteken végeztek kísérleteket, ahol is a rendszerhez adott glükokortikoidok hatására gyengült a glutamáterg szinapszisok aktivitása. Poszt-szinaptikus G-protein aktivitást gátló vegyületet (GDP-béta-S) a rendszerhez adva a fenti jelenség nem volt megfigyelhető, tehát a GC hatás valószínűleg G-protein kapcsolt receptorokon keresztül valósul meg. A blokkoló jelátvitel endokannabinoid természetét CB<sub>1</sub> antagonisták hozzáadásával igazolták. Tehát a stressz-válasz során felszabaduló glükokortikoidok CRH-t szintetizáló neuronokon lévő membránkapcsolt, G-protein-függő glükokortikoid receptorokhoz kötődnek, majd G-alfa-S-cAMP-proteinkináz-A (PKA) úton eCB termelést váltanak ki. Az endokannabinoidok retrográd jelátvitellel a pre-szinaptikus neuron CB<sub>1</sub> receptoraihoz kötődnek, így befolyásolják annak excitatorikus aktivitását. Glutamáterg serkentő szinapszis esetében a megkötött endokannabinoidok negatívan hatnak a glutamát termelésre, ezzel a poszt-szinaptikus neuron CRH termelését gátolva, a HPA tengely aktivitását negatívan modulálva (Di és mtsai., 2003, 2005). Di munkájából kiderül, hogy a GABAerg szinapszisok pozitív modulálásáért felelős retrográd hírvivő nem az eCB rendszer része, valószínűsíthetően nitrogén-monoxid (Di és mtsai., 2009).

A fenti elmélettel konzisztens eredményeket adott több CB<sub>1</sub>KO állatokon végzett kísérlet is. Cota és munkatársai (2007) kísérletesen bizonyították, hogy a CB<sub>1</sub> receptort nélkülöző állatok a vad típushoz képest eltérő glükokortikoid cirkadián oszcillációval rendelkeznek, ugyanis éjszakai, aktív periódusban kortikoszteron szintjük jóval magasabb. Emellett a gén-kiütött állatok PVN-jében szignifikánsan magasabb volt a CRH mRNS szint, mint vad típusú társaiknál. Láthatóan a CB<sub>1</sub> receptor hiánya összezavarja, gyengíti a GC gyors negatív feedback mechanizmusát, ezzel is bizonyítva a két rendszer közötti szoros



kapcsolatot. Wenger és munkatársai (2003) specifikusan az AEA HPA-tengelyre gyakorolt hatásait vizsgálták CB<sub>1</sub>KO egerekben. A kis dózisban adott AEA megnövelte a vér kortikoszteron és ACTH koncentrációját, meglepő módon mind vad típusú, mind pedig CB<sub>1</sub>KO egerekben. A kérdés feltárása érdekében alkalmazott CB<sub>1</sub> antagonistá SR141716, illetve a TRPV1 antagonistá kapszazepin nem voltak hatással a fenti jelenségre, így valószínűsíthetően az AEA stressz-reaktivitásra kifejtett serkentő hatásai egy non-kannabinoid, non-vanilloid, eddig ismeretlen receptoron keresztül valósulnak meg. Hasonlóan az eddig leírtakhoz Barna és munkatársai (2004) kimutatták a CB<sub>1</sub> receptor hiányának HPA-tengely serkentő hatásait. A CB<sub>1</sub>KO állatoknak mind a bazális, mind a stressz-indukált ACTH és kortikoszteron szintje magasabb volt, mint a vad típusúaké. *In vitro* anterior hipofízis szeletek anyagcseréjét perfúziós készülékkel fenntartva nem volt különbség a csoportok között sem a bazális, sem a CRH-indukált ACTH szintek tekintetében. A rendszeren a GC agonista dexametazon, illetve a CB<sub>1</sub> agonista WIN55,212-2 átáramoltatásával sem lehetett változást elérni a fentiekben, vagyis az egér hipofízisben lokalizálható CB<sub>1</sub> receptorok ellenére a HPA-tengely eCB rendszer általi szabályozása nem ezen a szinten valósul meg. Patel és munkatársai (2004) mind SR141716 CB antagonistával kezelt, mind immobilizációs stressznek kitett kezelt állatok esetében, alacsony, de szignifikáns szérumban kortikoszteron növekedést detektáltak egerekben. Az SR141716 előkezelt, immobilizációs stressznek kitett állatok esetében erősebb növekedést figyeltek meg, ugyanakkor akár a CB<sub>1</sub> agonista CP55940, akár az eCB transzport gátló AM404, akár a FAAH gátló URB597 alkalmazása ezeket a hatásokat csökkentette vagy teljesen elnyomta, mutatva ezzel az endokannabinoid rendszer erős negatív HPA-tengely moduláló hatásait. Az állatokat akut immobilizációs stressznek kitéve a megnőtt kortikoszteron koncentráció mellett csökkent 2-AG szinteket mértek a PVN-ben, ezzel szemben 5 napon át 30 perces akut immobilizációs stressznek kitétt, habituált állatok esetében, ugyan ebben a régióban egy kevésbé megemelkedett kortikoszteron koncentrációt, illetve megnövekedett 2-AG szintet detektáltak a kontroll állatokhoz képest. Ez azt sugallja, hogy a PVN-ben nyugalmi állapotban tartósan magas 2-AG szint áll fenn, ami a HPA-tengely aktivitást negatívan modulálja, alacsony szinten tartja. Stressz hatására a 2-AG szint lecsökken, ezzel hagyva a HPA-tengelyen keresztül megvalósuló stressz-választ kifejeződni. A fenti állítás látszólag ellentétes a Di és munkatársai által leírt glükokortikoid negatív gyors feedback jelenséggel, ahol a glükokortikoid pozitívan hat az eCB rendszer aktivitására. Ez az ellentét azonban potenciálisan feloldható a két kísérlet idődinamikai, régió, valamint mérési módszer szerinti összehangolásával. Di munkájában közvetlenül a PVN-be jutatták a farmakológiai ágenseket, míg Patel és munkatársai a vegyületeket szisztémásan

alkalmazták, így nem szűrhetők ki az esetleges indirekt hatásokat. CB receptorok mind centrálisan mind pedig perifériásan igen széles körben reprezentáltak, így egy szisztémás kezelés nem törvényszerűen egy területre, egy funkcióra hat, erre szükségszerű kontrolálni. A szerzők emellett az akut stressz-indukált glükokortikoid növekedés hatására létrejövő eCB aktivitás csökkenést összeférhetőnek tartják Di modelljével, mondván a lecsökkent 2-AG szint a stresszor jelenlétében áll fenn, míg a negatív feedback mechanizmus potenciálisan a stresszor megszűnte után lép működésbe. Patel és munkatársai tehát kimutatták az endokannabinoid rendszer egy intenzív, kontextus dependens, stressz-indukált HPA tengely aktivitást negatívan szabályzó hatását.

### **2.3 Kannabinoidok és a magatartás**

A történelem során a kannabinoidok tapasztalati úton megismert magatartási hatásait nehéz egységes trendként jellemezni, mivel egyes hatások, amelyek alkalmazhatóvá tették orvosi és/vagy élvezeti célokra, eltérő kontextusban akár meg is fordulhattak. Így például egy bizonyos kannabinoid okozhat eufóriát, illetve pozitív hatással lehet a szorongásra vagy a szociális kapcsolatokra (Sethi mtsai., 1986; Stewart mtsai., 1997; Osborne mtsai., 2000), ezzel szemben akár más kontextusban az esetleges környezeti interakciók, akár az egyéni gén-expressziós profil miatt okozhat pánikszerű tüneteket, pszichózist (Fattore és mtsai., 2001; Justinova és mtsai., 2003), növelheti a szorongást (Moreira és mtsai., 2009). Az endokannabinoid rendszer szorongásra gyakorolt hatásait szintén a fentebb említett, a rendszert manipuláló genetikai és farmakológiai modellek készítésével térképezhetjük fel.

CB<sub>1</sub> gén kiütött (CB<sub>1</sub> KO) egerekben több kísérletben is, mint a megemelt kereszt-palló vagy a világos/sötét doboz teszt, megemelkedett szorongás volt detektálható, azonban ez nem mondható általánosnak, a hatások a kísérleti körülményektől nagyban függtek. Haller és munkatársai (2004) CB<sub>1</sub> KO egerekben erősen kontextus függő magatartási hatásokról számoltak be olyan viselkedési paradigmákban, ahol platformként az elvárható viselkedés mintázat nem, csak egyes környezeti paraméterek különböztek. A megemelt kereszt-palló tesztben a két kontextust az erős és a gyenge fény jelentette, ezzel egyazon platformon egy erősebben és egy kevésbé averzív környezetet reprezentálva. A CB<sub>1</sub> KO állatoknál averzívabb környezetben erősebb szorongást detektáltak vad típusú társaikhoz képest, míg az egereknek barátságosabb környezetet jelentő enyhébb fényben nem volt szignifikáns eltérés a csoportok között. Szociális kihívást reprezentáló paradigmákban szintén erős eltéréseket mutattak a CB<sub>1</sub> KO állatok, miszerint a rezidens-betolakodó tesztben fokozott agresszió, a szociális-interakció tesztben csökkent szociális aktivitás volt megfigyelhető. A fentiekből látható, hogy a CB<sub>1</sub>

jelátvitel hiányának hatásai kontextus függőek és erősen befolyásoltak stresszhelyzet, illetve az alany stressz-érzékenysége által. A szerzők hipotézise, hogy a kannabiodok nem érintik közvetlenül a viselkedést irányító agyi központokat, ellenben befolyásolják a környezeti stimulusok agyi interpretációját. Urigüen és munkatársai (2004) szintén erősebb szorongási hatásokról számoltak be CB<sub>1</sub> KO egerekben, emellett kimutatták, hogy ezek az állatok érzéketlenebbek szorongás oldó vegyületekre, például buspironra vagy bromazepamra, mint vad típusú társaik. Ebből arra következtettek, hogy a CB<sub>1</sub> receptor génjének diszruptciója és ezzel a CB<sub>1</sub> receptoron folyó jelátvitel hiánya nem általánosan, egy specifikus irányba mozdítja el a magatartást, hanem a környezetre való válaszkészséget erősíti föl, így kontextus függően növeli a szorongást, befolyásolja a szociális magatartást. CB<sub>1</sub> antagonisták alkalmazásával több alkalommal is hasonló eredményeket értek el a megemelkedett kereszt-palló tesztben, vagyis a kezelés a kontrollhoz képest növelte a szorongást vad típusú állatokban (AM251, illetve SR141716) (Navarro és mtsai., 1997; Arévalo és mtsai., 2001; Haller és mtsai., 2004b; Patel és Hillard, 2006; Moise és mtsai., 2008). Ezzel konzisztensen CB<sub>1</sub> agonisták alkalmazása anxiolitikus hatásúnak bizonyult (Haller és mtsai., 2004b; Patel és Hillard, 2006), ugyanakkor ezt a hatást CB<sub>1</sub> receptor antagonisták elnyomták, valamint CB<sub>1</sub> KO állatoknál nem jelentkezett, ezzel bizonytva a mechanizmus CB<sub>1</sub> receptor függését (Haller és mtsai., 2004b). Az endokannabinoid rendszer farmakológiai manipulálása nem mindig ad ennyire egyértelmű eredményeket, ennek hatásai ugyanis erősen függenek az alkalmazott vegyület érzékenységtől, hatás-mechanizmusától, illetve a kísérleti körülményektől. Rodgers és munkatársai (2005) SR141716 CB receptor antagonistát alkalmazva a megemelt kereszt-palló tesztben nem detektáltak szorongásra gyakorolt hatást teszt-naív állatoknál, ezzel szemben a teszt második alkalmazásakor anxiolitikus hatások voltak megfigyelhetőek. A jelenséget Rodgers „one-trial sensitisation”-nek vagyis „egy-próbás szenzitizációnak” nevezte el. A nem teszt-naív állatoknál tapasztalt, korábbi eredményeknek ellent mondó hatások feltárása érdekében egy CB<sub>1</sub> receptorra specifikusabb antagonistát, az AM251-et alkalmaztak, ami kiváltotta a korábbi kutatási eredményekkel konzisztens szorongás emelő hatást. A fentebb tapasztaltakból kiindulva valószínűsíthető egy SR141716 érzékeny, eddig ismeretlen CB receptor jelenléte a központi idegrendszerben, aminek gátlása a CB<sub>1</sub> receptor gátlásával ellentétesen, csökkenti a szorongást. Ezt a feltevést támogatja több, az SR141716-al végzett korábbi kísérlet is, ahol ez az antagonista szintén anxiolitikus hatással bírt (Haller és mtsai., 2002; Degroot és Nomikos, 2004; Griebel és mtsai., 2005). Az eCB jelátvitel magatartási hatásai fajonként is erősen különbözhetnek. Haller és munkatársai (2007) kimutatták, hogy ugyanazon farmakológiai kezelés mennyire

eltérő hatásokat okozhat egérben, illetve patkányban. Egérben a WIN55,212-2 CB<sub>1</sub> receptor agonista kezelés anxiolitikus hatásának bizonyult, míg az AM251 CB<sub>1</sub> receptor antagonistája növelte a szorongást. Ezzel szemben patkányban az agonista növelte a szorongást, az antagonistája pedig ezt a hatást tovább erősítette. Valószínűleg a szorongást eltérően szabályozó glutamaterg és GABAerg jelátvitel eCB érzékenységének két faj közötti eltérésein alapul a különbség. Így egérben a WIN55,212-2 a GABAerg szinapszisokon keresztül fejtette ki hatását, ezzel a szorongást csökkentve, míg patkányban elsősorban a glutamaterg rendszert érintette, ezzel a szorongást növelve. Az utóbbi fajban az AM251 gátolta a GABAerg jelátvitelt, ezzel elérve egy még erőteljesebben érvényesülő, serkentő glutamaterg hatást a szorongást tovább fokozta.

Az eCB rendszer manipulálására adódó másik farmakológiai módszer, a metabolizmus gátlás szintén mutatott jól körülírható hatásokat, ugyan akkor ez sem tekinthető ellentmondásoktól mentesnek. Az eCB jelátvitelt a FAAH enzim gátlásával felerősítő URB597, illetve az AEA transzportját blokkolva serkentő hatású AM404 vegyületek szorongásoldóként viselkedtek a 0-palló, a megemelt kereszt-palló, a világos/sötét doboz és az izoláció-indukált ultrahang vokalizáció tesztekben (Kathuria és mtsai., 2003; Bortolato és mtsai., 2006; Patel és Hillard, 2006; Moise és mtsai., 2008; Moreira és mtsai., 2008; Scherma és mtsai., 2008). Ugyan akkor megfigyelhető volt olyan jelenség is, hogy a teszt érzékenyebbé tételével, az egyes körülmények szélsőséges irányba tolásával tudták csak detektálni a hatásokat, így például Naidu és munkatársai (2007) a megemelt kereszt-palló tesztben erősebben világították meg a nyílt karokat, kevésbé a zártakat, ezzel elérve, hogy a FAAH enzim gátlása kifejtse szorongás oldó hatásait. Ellentmondásos eredmények születtek továbbá a FAAH gátlás teszt-specifitása tekintetében is, miszerint Moreira (2008) ki tudta mutatni a szorongás oldó hatást a megemelt kereszt-palló tesztben, de a világos/sötét doboz tesztben már nem, ezzel ellentétben ez másoknak sikerült (Schrema, 2008), ezzel sokak szerint feloldva a fenti kérdést. Emellett Rubino és munkatársai (2008) a vegyület dózis-függő hatásairól számoltak be, miszerint az kis dózisu URB597 kezelés anxiolitikus, a nagy dózis azonban már szorongás fokozó lehet. A fenti ellentmondásos eredmények tisztázására Haller és munkatársai (2009) egy olyan hipotézissel álltak elő, miszerint az URB597 indukálta AEA jelátvitel felerősítése nem közvetlenül és specifikusan befolyásolja a magatartást, hanem a környezet averzivitására, a kísérleti körülményekre adott válasz intenzitását modulálja. Ennek bizonyítására URB597 kezelést kapott patkányokat egyes viselkedési tesztekben különböző mértékű stressznek, averzivitásnak tettek ki, majd detektálták a kezelés és a körülmények szorongásra gyakorolt hatásait. Annak tisztázása érdekében, hogy az esetleges szorongás oldó

hatások a különböző averzivitású környezetben valóban eCB specifikusak, a kísérleteket megismételték egy a klinikumban elterjedten használt szorongásoldó benzodiazepin, a klórdiazepoxid kezelésnek alávetve az állatokat. Végül pedig mérték a különböző mértékben barátságatlan környezetek HPA-tengelyre gyakorolt hatásait a megemelt kereszt-palló tesztben. Az eredmények szerint az URB597 indukálta FAAH enzim gátlás nem volt szorongás oldó hatású a kísérleti platformokhoz szoktatott, illetve a megemelt kereszt-palló tesztben enyhébb fénynek kitett állatok esetében, ellenben a platformokhoz nem habituálódott, valamint az averzívabb körülményeknek, tehát erősebb fénynek kitett csoportoknál szignifikáns szorongásoldás volt megfigyelhető. A klórdiazepoxiddal kezelt csoportoknál averzivitástól függetlenül minden esetben anxiolitikus hatást detektáltak. Az URB597 indukálta hatások megszüntethetőek voltak az AM251 CB<sub>1</sub> antagonistá alkalmazásával, mutatva ezzel a mechanizmus CB<sub>1</sub> receptor függését. A fentiek tehát egy potenciális megoldást, a korábban tapasztalt ellentmondások feloldását jelenthetik, miszerint az AEA-ot elbontó FAAH enzim specifikus gátlása enyhe vagy közepes stressz hatás alatt nem befolyásolja a szorongást, míg anxiolitikus hatások lépnek fel erősen averzív kondíciók alatt, ezzel felhívva a figyelmet a kísérleti körülmények összehasonlításának, összehangolásának fontosságára, és az endokannabinoid rendszer működésének érzékenységére. A másik kiemelkedő szerepű eCB, a 2-AG metabolizmus gátlásának magatartásra gyakorolt hatásai még korántsem mondhatóak feltérképezettnek, valamint az eddig született eredmények sem tekinthetőek konzisztensnek. A JZL184 indukált MAGL gátlás hatása a lokomotoros aktivitásra tesztenként eltérőnek mutatkozott, miszerint a nyílt-tér tesztben csökkent (Long és mtsai., 2009a, 2009b, 2009c; Guindon és mtsai., 2011), a megemelt kereszt-palló tesztben növekedett a kontrollhoz képest (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Kinsey és mtsai., 2011; Sciolino és mtsai., 2011). Ugyan akkor ezek az eredmények nem voltak minden esetben reprodukálhatóak. A 2-AG jelátvitel felerősítésének szorongásra gyakorolt hatásai kontextus függő módon jelentkeztek, sok paradigmában anxiolitikus hatás volt tapasztalható (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Kinsey és mtsai., 2011; Aliczki és mtsai., 2012), de volt, ahol csak fokozottan averzív környezetben sikerült hasonló változást detektálni (Sciolino és mtsai., 2011). Érdekes még megemlíteni a kezelés magatartási hatásainak idődinamikájában felmerülő kérdéseket, miszerint ugyan a JZL184 a kezelés után 30 perccel már kimutathatóan megemeli a 2-AG szintet az agyban (Long és mtsai., 2009a), több kísérletben csak 120 perc után elemezték a magatartást. Ennek feloldására Aliczki és munkatársai (2012) a JZL184-el való kezelés után 40, 80, 120, illetve 240 perccel tettek ki egereket a nyílt-tér és a megemelt kereszt-palló tesztnek, valamint egy másik kezelt csoportban

figyelték a lokomotoros aktivitást és a testhőmérsékletet saját ketrecben in vivo telemetriás adók segítségével. A nyílt-tér és a megemelt kereszt-palló tesztekben 40 percnél még nem, de 80 illetve 120 percnél szignifikáns szorongásoldás, valamint lokomóció növekedés volt megfigyelhető. A saját ketrecben szintén nőtt a lokomotoros aktivitás, valamint az injekció indukálta testhőmérséklet növekedés csökkent a kontroll állatokhoz képest és ami igen fontos lehet, ezek a magatartási hatások szinte azonnal jelentkeztek. Lehetséges, hogy az idegen helyzet stressznek kitett állatokban az aktiválódott HPA-tengely befolyásolta a magatartási hatásokat szemben a rövid idő alatt jelentkező biokémiaival, de épp úgy előfordulhat, hogy az egyéni gén-expressziós profil zavarta meg a hatásokat. Ettől függetlenül a MAGL gátlás anxiolitikus és lokomotoros aktivitást emelő hatásai tisztán detektálhatóak voltak.

### **3. Célkitűzés**

Az endokannabinoid rendszer HPA-tengelyre, illetve a magatartásra gyakorolt hatásainak, a rendszer nagyfokú érzékenységből adódó ellentmondásai azt mutatják, hogy még sok vizsgálatra van szükség a problémák feloldásához, a rendszer feltérképezéséhez. Különösen igaz ez a 2-AG stressz reaktivitásra és magatartásra kifejtett hatásaira, amelyek ligand-specifikus vizsgálatára még csak nem olyan rég nyílt lehetőségünk, a JZL184 indukálta MAGL enzim gátlása által. Munkánk célja a fenti endokannabinoid magatartási stressz-válaszra kifejtett hatásainak feltérképezése. Kérdésünk, hogy hatással van-e a JZL184 indukálta megemelkedett 2-AG szint a kezelt állatok stressz reaktivitására, illetve ez által és/vagy ettől függetlenül azok magatartására. Hipotézisünk, hogy a 2-AG jelátvitel hatást gyakorol a stressz-reaktivitásra és ezen keresztül a magatartásra. Ennek feltárása érdekében, elsőként megvizsgáltuk a JZL184 indukálta MAGL gátlás hatásait a bazális és a stressz-indukált kortikoszteron szintekre CD1 egerekben. Miután láttunk változást a kezelés hatására, kíváncsiak voltunk, hogy vajon a korábbi MAGL gátlással végzett kísérletekben tapasztalható magatartási hatások milyen mértékben írhatóak a megváltozott HPA-tengely aktivitás számlájára. Ennek érdekében a kortikoszteron szintézist gátló metirapon és JZL184 kezeléseket kombináltan alkalmazva tettük ki az állatokat a nyílt-tér, majd a megemelt kereszt-palló tesztnek és detektáltuk a magatartási hatásokat a szorongás illetve a lokomotoros aktivitás tekintetében.



## 4. Anyag és módszer

### 4.1 Kísérleti alanyok

Az alanyok minden kísérlet alkalmával vad típusú, 2 hónapos, hím egerek voltak a CD1 törzsből (Charles River laboratories, Budapest, Hungary). Minden alany teszt- és droгнаív, állat volt, kísérletnek egyszeri alkalommal tettük ki őket. Az egerek a szociális tartáskor kialakuló hierarchia kiküszöbölése végett egyénileg voltak tartva, 15x45x20 cm-es átlátszó falú dobozokban. A kísérleti szobában a hőmérséklet egységesen  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on, a páratartalom  $60\pm 10\%$ -on volt tartva. A fény-sötét ciklus 12:12 órás volt, a lámpák 07.00-kor kapcsolódtak fel. Víz és rágcsáló-pellet *ad libitum* elérhető volt. A magatartási tesztek a nap világos periódusának első felében végeztük. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC) és a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Tanácsának jóváhagyásával zajlottak le.

### 4.2 Drogok és dózisok

A kísérleteknél alkalmazott MAGL gátló JZL184-et dimetil-szulfoxidban (DMSO), majd 0,4%-os metilcellulóz oldatban (MC) oldottuk föl úgy, hogy a dózisok 0, 8, 16, illetve 32 mg/ttkg-nek adódjanak. Minden állat egységesen 10 ml/ttkg folyadékot kapott i.p. injekciók formájában. A kontroll állatok csak a JZL184 vivőanyagát, a DMSO-t és a MC-t kapták meg. A második kísérletben alkalmazott kortikoszteron szintézis gátló metirapon hígítása 5% Tween80-at tartalmazó fiziológiás sóoldattal történt. Itt az alkalmazott dózis 0 és 30 mg/ttkg volt. Ez alkalommal 5 ml/ttkg folyadékot kaptak az állatok, hogy a kombinált kezelések végett se kaphassanak esetlegesen túl megterhelő mennyiséget. A kezelések i.p. injekciók formájában lettek alkalmazva.

### 4.3 Viselkedés-elemzés

Munkánk során a magatartást a nyílt-tér vagy más néven porond tesztben, illetve a megemelt kereszt-palló tesztben elemeztük. Mindkettő teszt a szorongás és a lokomotoros aktivitás detektálására érzékeny teszt, előbbi gyakrabban alkalmazott lokomoció mérésére, míg utóbbi a szorongására (Pellow és mtsai., 1985; Careau és mtsai., 2012).

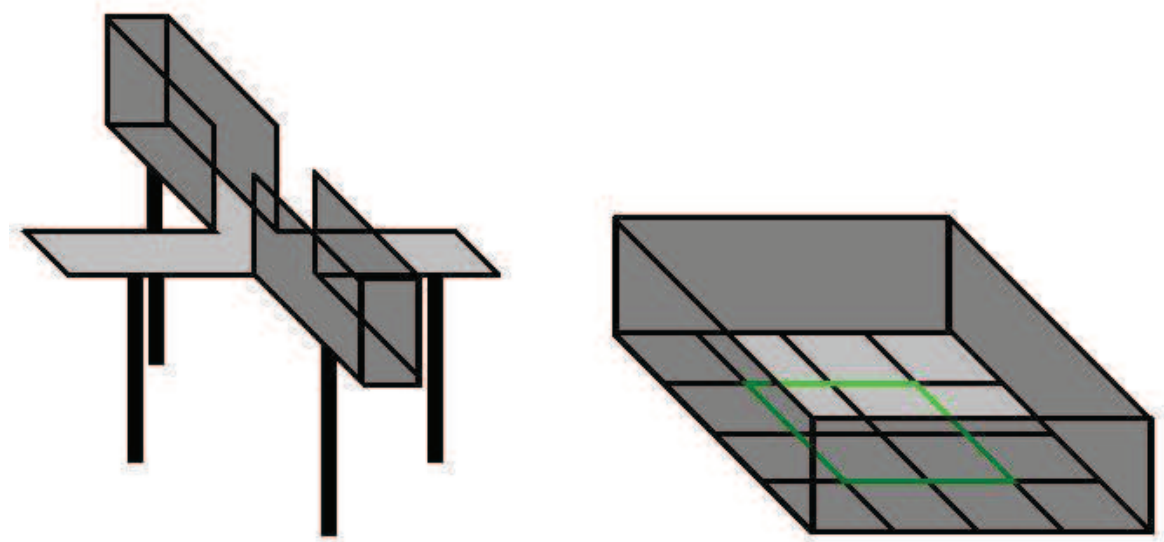
A nyílt-tér teszt a rágcsálók vele született erősen kitett, nyílt területektől való félelme, valamint az ezzel ellentétesen ható explorációs motivációja közötti csereviszonyon alapul. Minél erősebb a szorongás mértéke, annál inkább a félelem dominál az explorációval



szemben, ezt pedig egyes spaciotemporális paraméterek nyomon követésével mérhetjük. Lokomotoros aktivitás esetében az állat esetleges fokozott, vagy csökkent lokomócióját a kísérleti platformra vetített négyzetrácsokon való áthaladással detektálhatjuk. A kísérleti platform egy egyszerű, 25 cm magas, fehér fallal határolt, 45x45 cm területű doboz, amelyet a teszt idejére egy átlátszó, lyukacsos tetővel fedünk le. Az teszt során az állatot a platform szélére, a fal mellé helyezzük, majd viselkedését 5 percen át rögzítjük kamerával. A területre utólagosan 4x4-es négyzetrácsot vetítünk, ami alapján az elemzés történik, egy H77 nevű esemény-recorder programmal (Haller József, Budapest). A szorongással negatív korrelációban áll a közepső 2x2-es egységekben való tartózkodás idejének aránya a kísérlet egész idejéhez képest, míg a lokomóciót a vonal átlépések száma reprezentálja. Vonalátlépésnek egér esetében, megegyezés szerint az minősül, ha az állat legalább 3 lábát áteszi egy szomszédos mezőbe. A tesztek között a kísérleti platformot minden alkalommal vízzel letisztítottuk és szárazra töröltük.

A megemelt kereszt-palló teszt jelenleg a legfontosabb és legelterjedtebben alkalmazott szorongás tesztek közé tartozik, sok a humán gyógyászatban alkalmazott szorongás oldó vegyület hatását jól körülírhatóan mutatja (Pellow és mtsai., 1985). A kísérleti platform két, egymásra merőleges és így keresztet formáló, egyenként 5x20 cm-es pallóból áll, amelyek a földtől 80 cm magasban helyezkednek el. Két szemben lévő kar zárt, 30 cm magas fallal körülvett, míg a két másik kar nyitott, ezeket csak egy 0.3 cm-es perem határolja. A 4 kar találkozási pontja a centrum. A teszt során az állatot ide helyezzük, majd 5 percen át rögzítjük viselkedését kamerával. A magatartást ez esetben is a H77 esemény-recorder programmal elemezzük. A teszt a nyílt-tér teszthez hasonlóan a rágeszélők félelme és explorációs motivációja közötti csereviszonyon alapul. Paraméterei a nyílt karban töltött idő aránya, a kísérlet teljes idejéhez képest, a nyílt kari belépések száma, vagy a nyílt kari belépések/az összes kari belépések hányadosa, amelyek mind negatív korrelációban állnak a szorongással. A szorongásnak a megemelt kereszt-palló tesztben jól értelmezhető és detektálható indikátorai még a kockázat felmérő magatartási elemek (risk assessment). Ezek a feszült figyelmi testhelyzet (stretched attend posture) (SAP), mikor az állat két hátsó lábát hátul hagyva előre nyújtózik, illetve a lenézés (head dipping) (HD), mikor az állat letekint a kísérleti platformról. Mindkét kockázat felmérő magatartásból létezik nem-védett és védett (protected) is, attól függően, hogy az állat a nyílt (nem-védett) vagy a zárt karban, esetleg a centrumban (védett) tartózkodik. Ezek mindegyike pozitív korrelációban áll a szorongással. A lokomotoros aktivitással pozitív korrelációban álló paraméter például a zárt kari belépések száma. A kari belépés egér esetében megegyezés szerint az, ha az állat legalább 3 lábát

áthelyezi a másik kompartmentre. Két kísérlet között a platformot vízzel lemoszuk és szárazra töröljük. A megemelt kereszt-palló és a nyílt-tér teszt sematikus képe az 1. ábrán láthatóak.



1. ábra: a megemelt kereszt-palló (bal) és a nyílt-tér teszt apparátusa (jobb)

#### 4.4 Hormonmérés

A plazma kortikoszteron mérésénél, mind a fark véréből vett, mind pedig a dekapitációval nyert vért Etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük, majd jégágyon tároltuk a centrifugálásig. A vérvétel egyik esetben sem tartott tovább egy percnél, így a procedúra által esetlegesen okozott stressz nem befolyásolhatta a kapott eredményeket. A centrifugálást 4 °C-on végeztük, ez után a plazmát leszívtuk, majd a mintákat a hormonmérésig –20 °C-on tároltuk. A plazma kortikoszteron-szint mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel történt (Gomez-Sanchez és mtsai., 1977; Elekov és mtsai., 1992). Minden mintát kétszer és egy kísérlet alatt ugyan abban az assay-ben mértünk meg. A méréseket megelőzően a kortikoszteroid-kötő-fehérjét (CBG) alacsony pH-n elimináltuk. Jelölőanyagként <sup>125</sup>I-jelölt kortikoszteron-karboximetiloxim-tirozin-metil észter származékot használtunk.

#### 4.5 Kísérleti elrendezés

Az 1. kísérlet célja, hogy tanulmányozzuk a megemelkedett 2-AG jelátvitel hatásait a HPA-tengely aktivitására. Ezt a 2-AG-t fiziológiásan lebontó MAGL enzimet specifikusan gátló JZL184 kezeléssel értük el, majd mértük a bazális és stressz-indukált kortikoszteron

szinteket. A kísérletben az állatok 0 (vivőanyag), 8, illetve 16 mg/ttkg JZL184 kezelést kaptak, véletlenszerű sorrendben, i.p. injekciók formájában, majd a kezelés után 40, 80, illetve 120 perccel (1a, 1b, és 1c kísérlet), vért vettünk a fark-vénából a bazális kortikoszteron koncentráció méréséhez. A vérvétel után az állatokat 8 percen át tettük ki úszás stressznek, majd dekapitáltuk őket újabb vérvétel céljából, a stressz-indukált kortikoszteron koncentráció méréséhez. A kísérleti csoportok beosztását a csoportok mintaelemszámaival, illetve a kezeléseket az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Csoportok és kezelések az első kísérletben

Kísérlet	Csoport	Látencia	Kezelés
1a	Kontroll ( <i>n</i> =10)	40 perc	i.p. vivőanyag
	JZL184 8 ( <i>n</i> =10)	40 perc	i.p. 8 mg/ttkg JZL184
	JZL184 16 ( <i>n</i> =10)	40 perc	i.p. 16 mg/ttkg JZL184
1b	Kontroll ( <i>n</i> =10)	80 perc	i.p. vivőanyag
	JZL184 8 ( <i>n</i> =10)	80 perc	i.p. 8 mg/ttkg JZL184
	JZL184 16 ( <i>n</i> =10)	80 perc	i.p. 16 mg/ttkg JZL184
1c	Kontroll ( <i>n</i> =10)	120 perc	i.p. vivőanyag
	JZL184 8 ( <i>n</i> =10)	120 perc	i.p. 8 mg/ttkg JZL184
	JZL184 16 ( <i>n</i> =10)	120 perc	i.p. 16 mg/ttkg JZL184

A 2. kísérletben azt vizsgáltuk, hogy JZL184 indukálta MAGL gátlás magatartási hatásai mennyiben függenek a plazma kortikoszteron koncentrációktól, feltételezve, hogy a kísérleti alanyok a viselkedési tesztekbe már egy a kezelés-indukálta megemelkedett hormon szinttel érkeznek. A kezelés hatására megemelkedett bazális kortikoszteron szint ellenőrzésére irányult a 2a elő-kísérlet. JZL184 és metirapon kezeléseket kombináltan alkalmaztunk, majd a 2a kísérlet alkalmával mértük a bazális kortikoszteron szinteket, míg a 2b kísérlet során a nyílt-tér és a megemelt-keresztpalló tesztekben detektáltuk a szorongást, valamint a lokomotoros aktivitást, majd mértük a kísérleti-stressz indukálta kortikoszteron koncentrációt. Elő-kísérletekre hivatkozva 30 mg/ttkg-os metirapon dózist választottunk, ami megbízhatóan és szignifikánsan csökkenti a kortikoszteron koncentrációt, de nem változtatja meg szignifikánsan a lokomotoros aktivitás mértékét. Metirapon kezelést az állatok fele kapott, a kontroll csoportot a drog vivőanyagával kezeltük, szintén i.p. injekciók formájában. A JZL184 dózisosok az 1. kísérletben alkalmazottak szerint alakultak, vagyis 0 (vivőanyag), 8 és 16 mg/ttkg. Az 2a kísérlet alkalmával ellenőriztük, hogy a metirapon lecsökkenti-e az első kísérletben tapasztalt bazális kortikoszteron koncentráció növekedést. Ennek érdekében az állatokat a kezelés után 40 perccel dekapitáltuk vérvétel céljából, a bazális kortikoszteron

koncentrációk méréséhez. A 2b kísérlet során a kombinált kezelések magatartásra és stressz-indukált HPA-tengely aktivitásra gyakorolt hatásaira voltunk kíváncsiak. Ez alkalommal az állatok a kezelés után 40 perccel a nyílt-tér tesztbe, majd egyből utána a megemelt kereszt-palló tesztbe kerültek a szorongás, illetve a lokomotoros aktivitás detektálása érdekében. A tesztek videón rögzítettük a később elvégzett elemzéshez. A magatartási tesztek után az állatokat dekapitultuk vérvétel céljából a stressz-indukált kortikoszteron koncentrációk méréséhez. A kísérleti csoportok beosztását illetve a kezeléseket a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: Csoportok és kezelések a második kísérletben

Kísérlet	Csoport	Kezelés 1	Kezelés 2
2a	Kontroll	JZL184 vivőanyag	Metirapon vivőanyag
	Met	JZL184 vivőanyag	Metirapon 30 mg/ttkg
	JZL184 8	JZL184 8 mg/ttkg	Metirapon vivőanyag
	JZL184 8*Met	JZL184 8 mg/ttkg	Metirapon 30 mg/ttkg
	JZL184 16	JZL184 16 mg/ttkg	Metirapon vivőanyag
	JZL184 16*Met	JZL184 16 mg/ttkg	Metirapon 30 mg/ttkg
2b	Kontroll	JZL184 vivőanyag	Metirapon vivőanyag
	Met	JZL184 vivőanyag	Metirapon 30 mg/ttkg
	JZL184 8	JZL184 8 mg/ttkg	Metirapon vivőanyag
	JZL184 8*Met	JZL184 8 mg/ttkg	Metirapon 30 mg/ttkg
	JZL184 16	JZL184 16 mg/ttkg	Metirapon vivőanyag
	JZL184 16*Met	JZL184 16 mg/ttkg	Metirapon 30 mg/ttkg

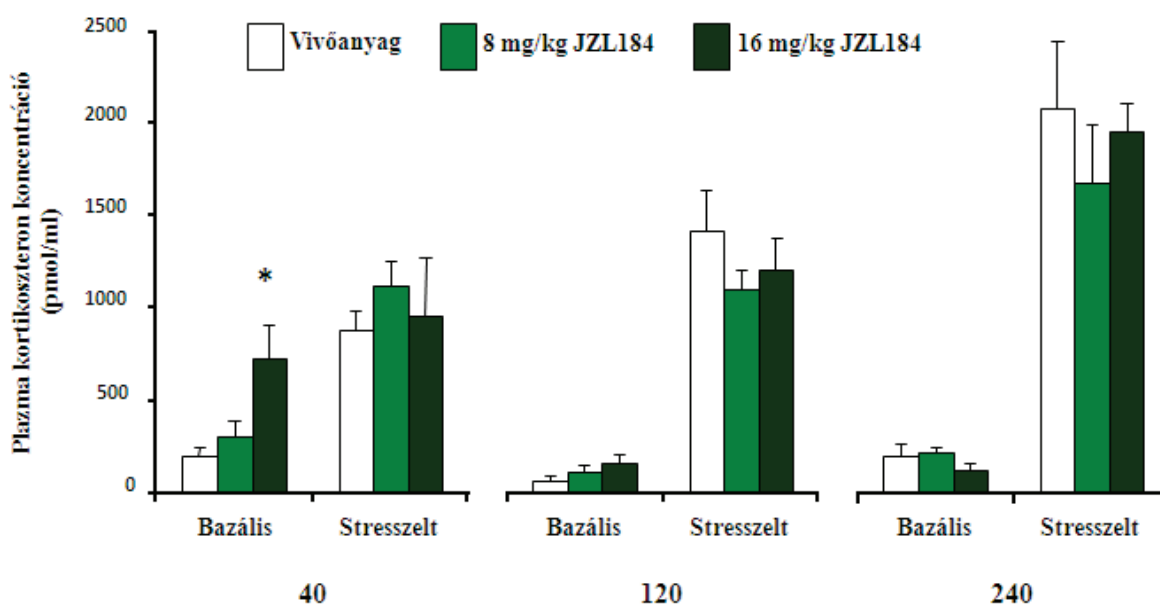
#### 4.6 Statisztikai analízis

Az első kísérletben a JZL184 kezelés hatását a kortikoszteron koncentrációkra, vagyis a csoportok közötti koncentráció különbségek összehasonlítását ANOVA-val végeztük. Szignifikancia esetén a csoportok közötti páronkénti összehasonlítást Duncan *post hoc* tesztet alkalmaztunk.

A második kísérletben a kombinált kezelések magatartásra és kortikoszteron szintekre gyakorolt hatásainak elemzésére két-utas ANOVA-t végeztünk, amelyben a tényezők a JZL184 kezelés (kezelés 1) és a metirapon kezelés (kezelés 2) voltak. A viselkedési paraméterek normalitása érdekében az adatokat négyzetgyök transzformáltuk. Szignifikancia esetén a csoportok közötti páronkénti összehasonlítást ez alkalommal is a Duncan *post hoc* tesztet végeztük. Csoportok közötti szignifikanciát minden alkalommal  $p < 0,05$  fogadtunk el. Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba formában ábrázoltuk. Mindent analízist a Statistica 9.0 szoftverrel (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) végeztük.

## 5. Eredmények

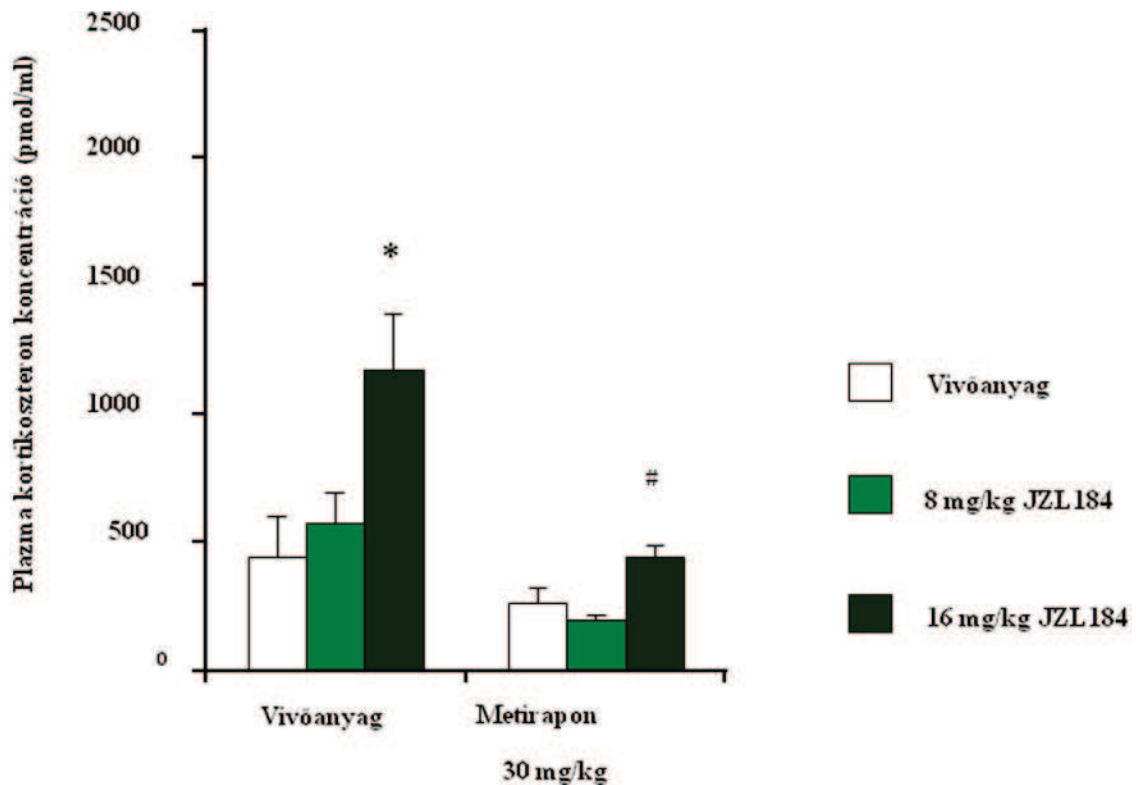
Az 1. kísérletben 0 (vivőanyag), 8 és 16 mg/ttkg dózisú JZL184 kezelés hatását vizsgáltuk a bazális és a stressz-indukált kortikoszteron szintekre, a kezelés után 40, 80, 120 és 240 perccel. A JZL184 dózis függően (16 mg/ttkg), szignifikánsan megemelte a bazális kortikoszteron szintet 40 perccel a kezelés után ( $F(2,17)= 7.46; p < 0.01$ ) (1. ábra), míg a stressz-indukált szinteket változatlanul hagyta ( $F(2,17)= 0.70; p = 0.51$ ) (2. ábra). A hatás 120, illetve 240 percnél már nem volt detektálható, sem a bazális (120 perc:  $F(2,15)= 1.74; p = 0.21$ ; 240 perc:  $F(2,20)= 1.18; p = 0.32$ ) (2. ábra), sem a stressz-indukált kortikoszteron szintek nem különböztek a kontrolltól (120 perc:  $F(2,15)= 0.86; p = 0.44$ ; 240 perc:  $F(2,20)= 0.49; p = 0.61$ ) (2. ábra).



2. ábra: bazális és stressz-indukált (úszás stressz) plazma kortikoszteron koncentrációk a kezelés után 40, 120, illetve 240 perccel. \*: szignifikán eltérés a kontrolltól

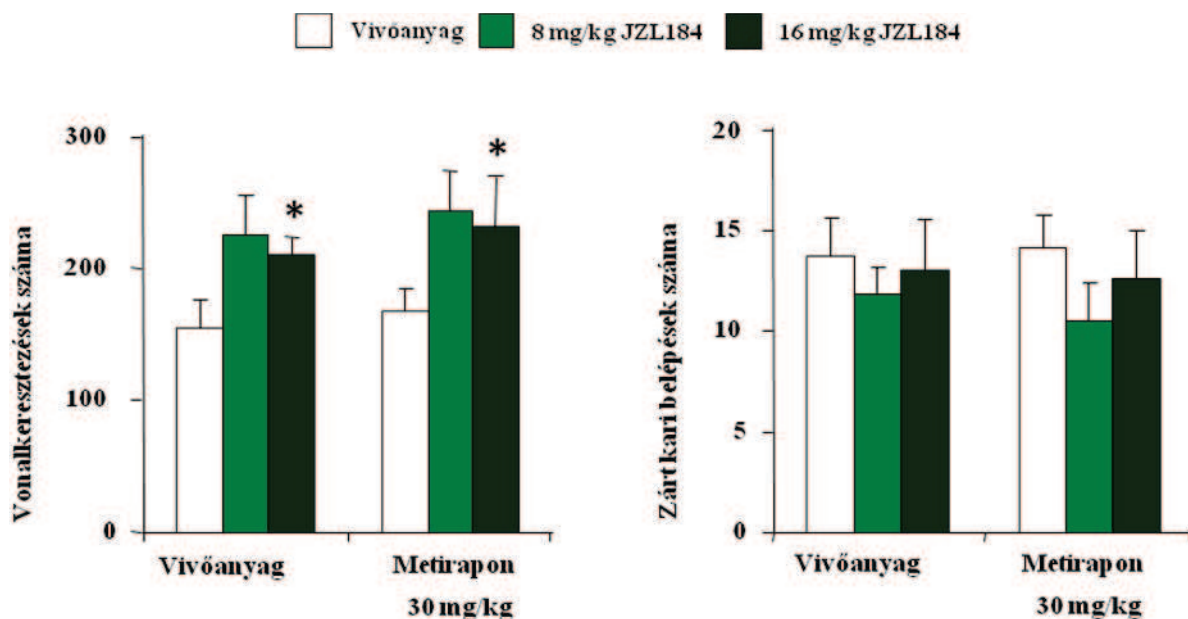
A 2a kísérletben JZL184 és metirapon kezelés kombinációkat alkalmaztunk azt vizsgálva, hogy a JZL184 az 1. kísérlethez hasonlóan megemeli-e a bazális kortikoszteron szintet és ez a hatás eltüntethető-e a kortikoszteron szintézis gátló metirapon alkalmazásával. Ismét dózis-függő (16 mg/ttkg), szignifikáns bazális kortikoszteron koncentráció emelkedést láttunk 40 perccel kezelés után ( $F_{JZL184}(2,52)= 13.38; p < 0.01$ ) (3. ábra). A metirapon kezelés szignifikánsan csökkentette a kortikoszteron szinteket a kontroll állatoknál ( $F_{Metirapon}(1,52)= 32.67; p < 0.01$ ) (3. ábra), valamint interakció mutatkozott a két kezelés között, mivel a

metirapon teljesen eltüntette a JZL184 bazális kortikoszteron koncentráció-emelő hatását ( $F_{\text{Interakció}}(2,52) = 4.44; p = 0.01$ ) (3. ábra).



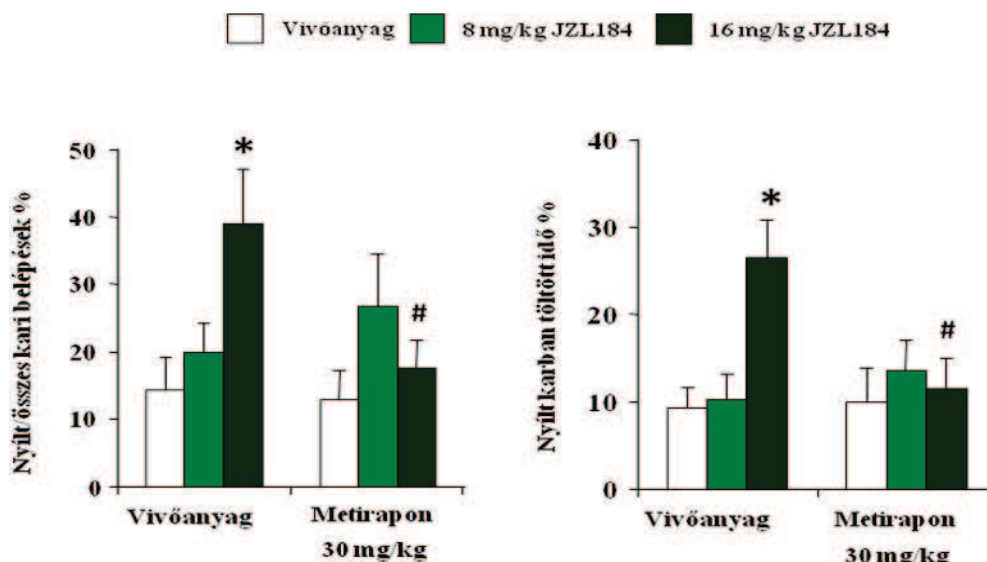
3. ábra: JZL184 és Metirapon kezelés hatása a bazális plazma kortikoszteron szintekre. \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól. #: szignifikáns eltérés a kizárólag JZL184-el kezelt csoportoktól (16mg/ttkg).

A 2b kísérletben a fenti kezelés kombinációk hatását néztük a lokomócióra és a szorongásra a nyílt-tér és a megemelt kereszt-palló tesztekben valamint mértük az idegen helyzet-stressz indukált kortikoszteron koncentrációkat. A kísérletben a JZL184 kezelés minden dózisban szignifikánsan megemelte a vonal-átlépések számát a nyílt-tér tesztben, vagyis növelte a lokomotoros aktivitást ( $F_{\text{JZL184}}(2,48) = 4.09; p = 0.02$ ) (4. ábra). Ez a hatás nem volt eltüntethető a metirapon kezeléssel, tehát kortikoszteron független módon történt ( $F_{\text{Metirapon}}(1,48) = 0.14; p = 0.70; F_{\text{Interakció}}(2,48) = 0.21; p = 0.80$ ) (4. ábra). A megemelt kereszt-palló tesztben nem detektáltunk szignifikáns lokomóció növekedést a kontrollhoz képest egyik csoportban sem ( $F_{\text{JZL184}}(2,48) = 1.04; p = 0.35; F_{\text{Metirapon}}(1,48) = 0.08; p = 0.75; F_{\text{Interakció}}(2,48) = 0.09; p = 0.91$ ) (4. ábra).



4. ábra: A JZL184, illetve a Metiraponnal kombinált kezelések hatása a locomotoros aktivitásra a nyílt-tér (bal) valamint a megemelt kereszt-palló tesztben (jobb). \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól.

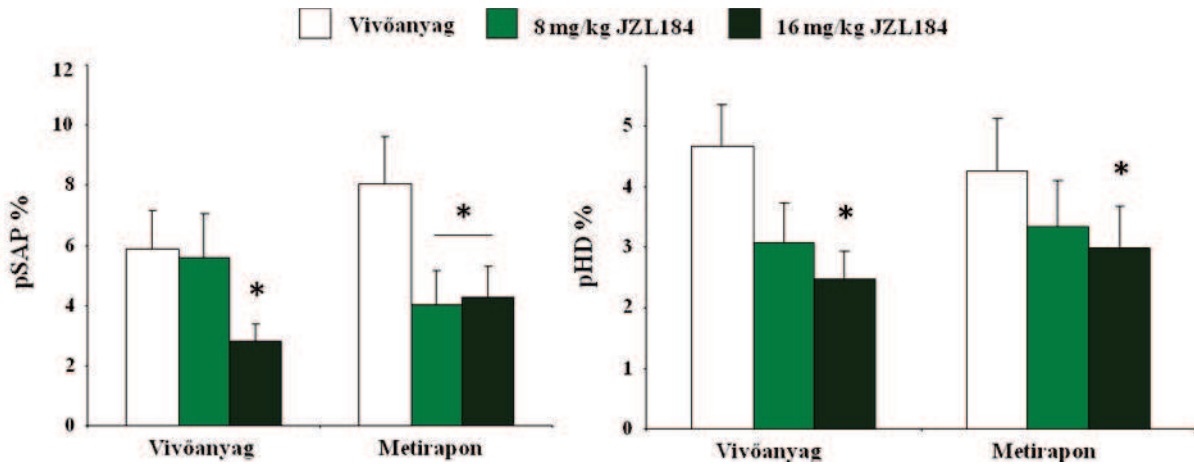
A JZL184 dózis-függő módon, szignifikánsan növelte a nyílt/összes kari belépési százalékot ( $F_{JZL184(2,48)} = 3.29$ ;  $p = 0.04$ ) (5. ábra), valamint a nyílt kartban töltött időt ( $F_{JZL184(2,48)} = 3.81$ ;  $p = 0.02$ ) (5. ábra), tehát csökkentette a szorongást a megemelt kereszt-palló tesztben. A hatás eltüntethető volt metirapon kezeléssel, vagyis kortikoszteron-függő módon ment végbe (nyílt/összes kari belépési százalék:  $F_{Interakció(2,48)} = 3.27$ ;  $p = 0.04$ ; nyílt kartban töltött idő:  $F_{Interakció(2,48)} = 4.04$ ;  $p = 0.02$ ) (5. ábra).



5. ábra: JZL184, illetve a metiraponnal kombinált kezelések hatása nyílt/összes kari belépések %-os arányára (bal), illetve a nyílt karban töltött idő %-os arányára a megemelt kereszt-palló tesztben. \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól. #: szignifikáns eltérés a kizárólag JZL184-el kezelt csoportoktól (16mg/ttkg).

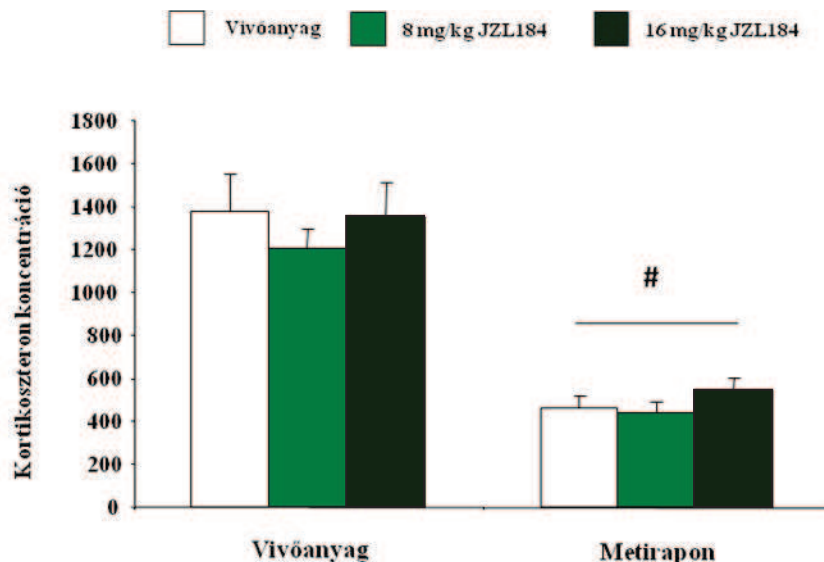


Emellett a kezelés szignifikánsan csökkentette a szorongással pozitív korrelációban álló védett feszült figyelmi testhelyzet (pSAP) és a védett lenézés (pHD) százalékos arányát (pSAP időtartam:  $F_{JZL184}(2,48) = 3.55$ ;  $p = 0.03$ ; pHD időtartam:  $F_{JZL184}(2,48) = 2.62$ ;  $p = 0.08$ ) (6. ábra). A hatás metirapon kezeléssel nem volt eltüntethető, tehát kortikoszteron független módon ment végbe (pSAP:  $F_{Interakció}(2,30) = 1.30$ ;  $p = 0.28$ ; pHD:  $F_{Interakció}(2,30) = 0.14$ ;  $p = 0.86$ ) (6. ábra).



6. ábra: JZL184, illetve metirapon kombinált kezelések hatása a védett feszült figyelmi testhelyzet (pSAP) %-os arányára, valamint a védett lenézés (pHD) %-os arányára a megemelt kereszt-palló tesztben. \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól.

A JZL184 kezelés nem hatott a stressz-indukált kortikoszteron szintekre, míg a metirapon szignifikánsan csökkentte azt ( $F_{JZL184}(2,50) = 0.73$ ;  $p = 0.48$ ;  $F_{Metirapon}(1,50) = 75.73$ ;  $p < 0.01$ ;  $F_{Interakció}(2,50) = 0.19$ ;  $p = 0.82$ ) (7. ábra).



7. ábra: JZL184, illetve metirapon kezelések hatása a stressz-indukált plazma kortikoszteron szintekre. #: szignifikáns eltérés a kizárólag JZL184-el kezelt csoportoktól.

## 6. Megvitatás

Tanulmányunkban elsőként mutattuk ki a JZL184-indukálta MAGL gátlással indirekt módon felerősített 2-AG jelátvitel HPA-tengelyre gyakorolt hatásait. A JZL184 kezelés dózis-függően, drasztikusan megnövelte a bazális kortikoszteron szintet 40 perccel a kezelés után, ugyanakkor a stressz-indukált koncentrációt változatlanul hagyta. A hatás két órán belül már nem volt detektálható, a kortikoszteron szintek a kontrolltól nem mutattak szignifikáns eltérést. Ezen felül kimutattuk a MAGL gátlás kortikoszteron-független lokomóció növelő hatását a nyílt-tér tesztben, valamint szorongásoldó hatásait a megemelt kereszt-palló tesztben, amelyek egy része a stressz-reaktivitáson keresztül, egy része pedig önállóan valósult meg.

Az általunk kimutatott HPA-tengelyre gyakorolt hatások részben összecsengenek korábban leírt eredményekkel, mivel i.c.v alkalmazott exogén kannabinoidok, mint a  $\Delta^9$ -THC, valamint az URB597 indukálta FAAH gátláson keresztül felerősített AEA jelátvitel szintén megemelte a bazális kortikoszteron koncentrációkat (Zuardi és mtsai., 1984; Weidenfeld és mtsai., 1994; Sciolino és mtsai., 2011; Wenger és mtsai., 2003). Ugyan akkor a  $\Delta^9$ -THC növelte, a megnövekedett AEA szint pedig csökkentette a stressz indukált kortikoszteron szintet (Zuardi és mtsai., 1984; Weidenfeld és mtsai., 1994), tehát ebből a szempontból hatásaik eltérnek a 2-AG-étől, ami nem fejtett ki hatást poszt-stressz koncentrációkra. Így láthatjuk, hogy a MAGL gátlás a bazális HPA-tengely aktivitásra gyakorolt hatásaiban megegyezik egyéb  $CB_1$  receptor agonistákkal, míg a stressz-indukált aktivitásra kifejtett hatásaiban eltér. Ugyan akkor a 2-AG általunk kimutatott HPA-tengelyre gyakorolt hatásai egyes pontokon eltérnek Patel és munkatársai korábbi eredményeivel (2004), amelyben SR141716  $CB$  receptor antagonistája, illetve akut immobilizációs-stressz, valamint ezek kombinációjának hatására megnövekedett kortikoszteron szinteket és erősödő c-Fos aktivitást detektált a PVN-ben. Fontos azonban megjegyezni, hogy az általa leírt eCB jelátvitel-indukálta negatív moduláció erősen kontextus és dózis-függő. Írásában az SR141716-ra mint  $CB_1$  antagonistára hivatkozik, ami azonban sok kutatásban  $CB_1$ -en keresztül megvalósuló hatásokkal ellentétesen működött, például a szorongás tekintetében. Ennek alapján többek között Rodgers és munkatársai (2005) egy SR141716-ra érzékeny, központi idegrendszerben jelen lévő  $CB_x$  receptor jelenlétét feltételezik, amelynek magatartási és ennek alapján potenciálisan egyéb területekre kifejtett hatásai eltérnek a  $CB_1$  receptoron megvalósuló klasszikus hatásoktól (Rodgers és mtsai., 2005; Degroot és Nomikos, 2004; Griebel és mtsai.,

2005; Haller és mtsai., 2002). Emellett tisztán farmakológiai moduláció, vagyis az SR141716 önálló alkalmazása legnagyobb dózisban nem fejtett ki hatást c-Fos aktivitásra a PVN-ben. Az SR141716 előkezelés után immobilizációs stressznek kitett állatok esetében kortikoszteron növekedés mellett már detektálták a várt c-Fos aktivitás növekedést a PVN-ben, de fontos megjegyezni, hogy Patel egy erősen kontextus függő hatásról beszél, így az eredmények esetleges összehangolására szükség lenne az alkalmazott stresszorok, módszerek, farmakológiai ágensek, az idődinamika, illetve a megfigyelt régiók kísérletenkénti egyeztetésére. A fentiekén túl beszámol még akut stressz hatására csökkenő, illetve az állatokat a kísérlethez habituálva enyhén növekvő 2-AG koncentrációkról a PVN-ben. Ez a hatás c-Fos aktivitás alapján egy a PVN-en keresztül ható centrális mechanizmus, míg jelen kutatásban nem szorítkoztunk kizárólagosan a hipotalamuszban végbemenő folyamatokra. Ezen felül a 2-AG szintek mind poszt-stressz állapotban lettek mérve, míg ezen tanulmány esetében bazális HPA-tengely aktivitásra kifejtett hatásról beszélhetünk.

Csoportunk ismét kimutatta a JZL184 anxiolitikus hatásait a megemelt kereszt-palló tesztben, bár apróbb eltérések voltak megfigyelhetőek az idődinamika tekintetében mind a nálunk, mind pedig a más csoportokban született korábbi eredményekhez képest (Sciolino és mtsai, 2011; Busquets-Garcia és mtsai, 2011; Aliczki és mtsai, 2012). Korábbi kísérletünk alkalmával averzív környezetben a magatartási hatások, mint a szorongás, később jelentkeztek (80 perc), mint a biokémiai változások, vagyis a 2-AG jelátvitel felerősödése. Ezzel szemben jelen (2b) kísérletünkben már a kezelés után 40 perccel detektálhatóak voltak szorongás-oldó hatások. Jelen pillanatban a két eredmény közötti eltérést nehéz magyarázni, még akkor is, ha csak egy idődinamikai eltérésről és nem drasztikusan különböző vagy teljesen ellentétes hatásokról beszélünk. Fontos azonban megjegyezni, hogy a MAGL gátlás magatartási hatásainak kísérletek közti eltérései akár azonos körülmények között és egy csoport munkáját követve is olyan probléma, amivel már más kutatócsoport is találkozott (Long és mtsai, 2009a; 2009b; 2009c). A szorongásoldó hatások másik érdekes mozzanata azok kortikoszteron-függése. Mivel a JZL184-indukálta MAGL gátlás megemelte a bazális kortikoszteron szintet, felmerült a kérdés, hogy a kezelés után detektált magatartási változások nem csak a magas glükokortikoid szint másodlagos hatásai-e, vagyis a 2-AG magatartásra gyakorolt hatásai a stressz-reaktivitás befolyásolásán keresztül, vagy önállóan valósulnak-e meg. Láthattuk, hogy a JZL184 kezelés növelte a nyílt/összes kari belépések százalékos arányát, a nyílt karban töltött időt, valamint csökkentette a kockázat felmérő magatartások, a pSAP és a pHD számát a megemelt kereszt-palló tesztben, tehát anxiolitikus hatású volt. Kortikoszteron szintézisben gátolt állatoknál a spaciotemporális paramétereket figyelembe

véve nem detektáltuk szorongásoldó hatást, tehát HPA-tengely aktivitás függő magatartási változásról beszélhetünk. Ezzel szemben ugyanitt a kockázat felmérő magatartások aránya nem változott a metirapon kontrollhoz képest, tehát kortikoszteron-független magatartási hatásról beszélhetünk. Így láthatjuk, hogy a JZL184 szorongásoldó hatásai részben a stressz-reaktivitáson keresztül, kortikoszteron-függő módon, részben pedig egy stressz-választól, kortikoszteron koncentrációtól független módon valósulnak meg. Az eredmény azért is érdekes, mert korábban a megemelt kereszt-palló teszt szorongás-indikátorai közül a kockázat felmérő magatartásokat hozták összefüggésbe akut kortikoszteron változásokkal, míg a nyílt kari explorációt vélték attól függetlennek (Mikics és mtsai 2005). Maga a jelenség, hogy a megnövekedett bazális HPA-tengely aktivitás szorongás-oldó hatású lehet, meglepőnek tűnhet, mivel a stresszt általában erősödő szorongással hozzák összefüggésbe. Ez azonban általában a hosszú távú, krónikusan fennálló stresszre igaz, az akut stressz, mint a környezet kihívásaira adott gyors válasz, rövidtávon anxiolitikus hatással bírhat (Haller és mtsai, 1998).

Ezen felül a MAGL gátlás dózis-független, szignifikáns lokomóció növekedést okozott, ami teljes mértékben kortikoszteron függetlennek mutatkozott. Ez konzisztens korábbi eredményekkel, miszerint akut kortikoszteron változások nincsenek hatással a nyílt-tér tesztben detektálható lokomotoros aktivitásra (Mikics és mtsai 2005).

A 2-AG metabolizmusát gátolva a stressz-reaktivitás és magatartás kapcsolatát tudomásunk szerint előttünk még nem vizsgálták. Kimutattuk a JZL184 indukálta MAGL gátlással felerősített 2-AG jelátvitel bazális HPA-tengely aktivitásra gyakorolt serkentő hatásait, valamint azt, hogy léteznek ezen keresztül végbemenő, valamint ettől függetlenül végbemenő szorongásoldó és lokomóció növelő hatások. Láthattuk tehát, hogy a magatartási hatások egy része a stressz-reaktivitás befolyásolásán keresztül valósul meg, míg egy részük önállóan jön létre. A korábbi ellentmondások egy potenciális feloldását jelentheti a megfigyelés, hogy a 2-AG jelátvitel nem egy specifikus irányba változtatja meg a magatartást, hanem az egyes környezeti stimulusok agyi interpretációját befolyásolja, részben a HPA-tengely manipulációján keresztül. Vizsgálatainkból, illetve korábbi eredményekből arra következtethetünk, hogy a 2-AG jelátvitel, még az endokannabinoid rendszert tekintve is egy rendkívül finoman hangoló, nagyon összetett rendszer, ami igen érzékeny lehet a kontextusra, illetve a kísérleti zajra, amit figyelembe kell venni mind a kísérletek kivitelezésénél, mind pedig az eredmények értékelésénél.

## 7. Összefoglalás

Korábbi eredmények igazolták, hogy a hipotalamusz–hipofízis–mellékvesekéreg tengely (HPA-tengely) működése nagymértékben az endokannabinoid rendszer befolyása alatt áll. Az anandamid nevű endokannabinoid metabolizmusának gátlása megnövelte a bazális kortikoszteron koncentrációt, míg a stressz-indukált kortikoszteron szintet csökkentette. Munkánk során az eddig kevésbé kutatott másik fő endokannabinoid, a 2-arachidonoilglicerolt (2-AG) elbontó monoacilglicerol lipáz (MAGL) JZL184-indukált specifikus gátlának hatásait vizsgáltuk a bazális és a stressz-indukált kortikoszteron szintekre hím CD1 egerekben. Eredményeink szerint a MAGL gátlás drasztikusan növelte a bazális koncentrációt, a stressz-indukált szintet pedig változatlanul hagyta. Mivel a kortikoszteron koncentráció akut változásai befolyással lehetnek a magatartásra, JZL184 és a kortikoszteron szintézisét blokkoló metirapon kezelések kombinált alkalmazásával kívántuk feltárni a MAGL gátlás magatartási hatásainak kortikoszteron függését a nyílt-tér és a megemelt keresztpalló tesztekben. Eredményeink alapján a kortikoszteron szintézis-gátlás kivédte a MAGL gátlás szorongásoldó hatásainak egy részét, míg annak lokomotoros aktivitást fokozó hatásait nem befolyásolta. Összefoglalva tehát a MAGL specifikus gátlása drasztikusan emelte a bazális kortikoszteron koncentrációt, a stressz-indukált szintet érintetlenül hagyva, emellett kortikoszteron független módon emelte a lokomotoros aktivitást, valamint részben kortikoszteron-függő, részben független módon csökkentette a szorongást.

## 8. Summary

It was previously shown, that the hypothalamus–hypophysis–adrenal-axis (HPA-axis) function is strongly controlled by the endocannabinoid system. Enhancement of anandamide signaling by the blockade of its degradation increased basal corticosterone levels, while it dampened corticosterone stress responses. In the present study, we investigated the effects of the JZL184-induced blockade of monoacylglycerol lipase (MAGL), the degrading enzyme of the other main endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on basal and stress-induced corticosterone levels in male CD1 mice. We found that the blockade of MAGL dramatically increased basal corticosterone levels without affecting stress responses. Since acute changes in corticosterone levels can affect behavior, JZL184 was administered concurrently with the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone, to investigate the corticosteron dependence of the behavioral effects in the elevated-plus maze and the open-field tests. We found that the inhibition of corticosterone-synthesis abolished some effects of the MAGL blockade on anxiety-related behaviour, while the locomotion-enhancing effects of the compound were not affected. Summarizing our results, specific blockade of MAGL activity dramatically increased basal levels of corticosterone, while leaving stress-induced levels unaltered. It also enhanced locomotor activity in a corticosterone-synthesis independent manner and had anxiolytic effects at least partly dependent of corticosterone.

## 9. Hivatkozások

1. Arévalo C., de Miguel R., Hernández-Tristán R. (2001) Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 70, 123-131
2. Barna I., Zelena D., Arszovszki A.C., Ledent C. (2004) The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice, *Life Sciences* 75, 2959-2970.
3. Bortolato M., Campolongo P., Mangieri R.A., Scattoni M.L., Frau R., Trezza V., La Rana G., Russo R., Calignano A., Gessa G.L., Cuomo V., Piomelli D. (2006) Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31, 2652-2659.
4. Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biological psychiatry* 70:479-486
5. Careau V, Bininda-Emonds OR, Ordonez G, Garland T Jr. (2012) Are voluntary wheel running and open-field behavior correlated in mice? Different answers from comparative and artificial selection approaches. *Behav Genet.* 2012 Sep;42(5):830-44
6. Cota D., Steiner M-A., Marsicano G., Cervino C., Herman J.P., Grübler Y., Stalla J., Pasquali R., Lutz B., Stalla G. K., Pagotto U. (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148, 1574-1581.
7. Dallman, M. F. (2005) Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future. *Front. Neuroendocrinol.*, 26, 103-108.
8. Degroot A., Nomikos G.G. (2004) Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test. *European Journal of Neuroscience* 20, 1059-1064.
9. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.
10. Di Marzo V, Deutsch DG. (1998) Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.*



11. Di Marzo V., Petrosino S. (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Current Opinion in Lipidology* 18, 129–140.
12. Di S., Malcher-Lopes R., Halmos K.Cs., Tasker J.G. (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus a fast feedback mechanism. *The Journal Of Neuroscience* 23, 4850-4857.
13. Di S., Malcher-Lopes R., Marcheselli V.L., Bazan N.G., Tasker J.G. (2005) Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 145, 4292–4301.
14. Di S., Marc M. Maxson, Alier Franco, and Jeffrey G. Tasker (2009) Glucocorticoids Regulate Glutamate and GABA Synapse-Specific Retrograde Transmission via Divergent Nongenomic Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience*, January 14, 2009 29(2):393– 401 393
15. Dinh T.P., Carpenter D., Leslie F.M., Freund T.F., Katona I., Sensi S.L., Kathuria S., Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 10819–10824.
16. Elenkov, I. J., Kovacs, K., Kiss, J., Bertok, L. & Vizi, E.S. (1992) Lipopolysaccharide is able to bypass corticotrophin-releasing factor in affecting plasma ACTH and corticosterone levels: Evidence from rats with lesions of the paraventricular nucleus. *J. Endocrinol.*, 133, 231-236.
17. Fattore, L., Cossu, G., Martellotta, CM., Fratta, W. (2001) Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 156:410-6.
18. Freund T.F., Katona I., Piomelli D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiological Reviews* 83, 1017–1066.
19. Gaoni Y., Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of American Chemical Society* 86, 1646-1647.
20. Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1991). "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis". *Biochem. J.* 279 (Pt 1): 129–34.
21. Gomez-Sanchez, C., Milewich, L. & Holland, O.B. (1977) Radioiodinated derivatives for steroid radioimmunoassay. application to the radioimmunoassay of cortisol. *J. Lab. Clin. Med.*, 89, 902-909.

22. Griebel G., Stemmelin J., Scatton B. (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biological Psychiatry* 57, 261-267.
23. Guindon J, Guijarro A, Piomelli D, Hohmann AG. (2011) Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 2011;163:1464-78.
24. Guo J., Ikeda S.R. (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Molecular Pharmacology* 65, 665-74.
25. Haller J, Halasz J, Makara GB, Kruk MR (1998) Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23:337-344
26. Haller J., Bakos N., Szirmay M., Ledent C., Freund T. F. (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *European Journal of Neuroscience* 16, 1395-1398
27. Haller J., Varga B., Ledent C., Barna I., Freund T.F. (2004a) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *European Journal of Neuroscience* 19, 1906-1912
28. Haller J., Varga B., Ledent C., Freund T. F. (2004b) CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behavioural Pharmacology* 15, 299–304
29. Haller J., Yasar S., Tanda G., Goldberg S.R. (2008) The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* 54, 129-140.
30. Herkenham M., Lynn A.B., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience* 11, 563-583.
31. Herman, J. P. & Cullinan, W.E. (1997) Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.*, 20, 78-84.
32. Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003). Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 169:135-140.

33. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature Medicine* 9, 76-81.
34. Kinsey SG, O'Neal ST, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav* 98:21–27.
35. Kőfalvi A., Rodrigues R.J., Ledent C., Mackie K., Vizi E.S., Cunha R.A., Sperlágh B. (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *The Journal of Neuroscience* 25, 2874-84.
36. Kreitzer A.C., Regehr W.G. (2001a) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *The Journal of Neuroscience* 21,RC174
37. Kreitzer A.C., Regehr W.G. (2001b) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29, 717–727.
38. Lenz R.A., Wagner J.J., Alger BE. (1998) N- and L-type calcium channel involvement in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *Journal of Physiology* 512. 61–73.
39. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nature chemical biology* 5:37-44
40. Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF (2009) Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chemistry & biology* 12 16:744-753
41. Long JZ, Nomura DK, Vann RE, Walentiny DM, Booker L, Jin X, Burston JJ, Sim-Selley LJ, Lichtman AH, Wiley JL, Cravatt BF (2009) Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:20270-20275
42. Lutz B. (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66, 123-142.

43. Mackie K. (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology* 168, 299-325.
44. Manó Aliczki (2009) Az endokannabinoid rendszer hatása a magatartási reaktivitásra, Egyetemi Szakdolgozat, SZIE ÁOTK
45. Manó Aliczki, Zoltán Balogh, Áron Tulogdi and József Haller (2012) The temporal dynamics of the effects of monoacylglycerol lipase blockade on locomotion, anxiety, and body temperature. *Behav Pharmacology* 23:348-57
46. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA". *Nature* 346 (6284): 561–4.
47. Mikics E, Barsy B, Barsvari B, Haller J 2005 Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open
48. Moise A.M., Eisenstein S.A., Astarita G., Piomelli D., Hohmann A.G.(2008) An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behavior in male Syrian hamsters. *Psychopharmacology* 200, 333-346
49. Naidu P.S., Varvel S.A., Ahn K., Cravatt B.F., Martin B.R., Lichtman A.H. (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology* 192, 61-70.
50. Navarro M., Hernández E., Munoz R.M., del Arco I, Villanúa M.A., Carrera M.R., Rodríguez de Fonseca F. (1997) Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8, 491-496.
51. Ogborne, A.C., Smart, R.G., Weber, T. & Birchmore-Timney, C. (2000) Who is using cannabis as a medicine and why: an exploratory study. *J. Psychoactive drugs*, 32, 435-443.
52. Patel S., Roelke C.T., Rademacher D.J., Cullinan W.E., Hillard C.J. (2004) Endocannabinoid Signaling Negatively Modulates Stress-Induced Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Endocrinology* 145, 5431–5438
53. Patel S., Hillard C.J. (2006) Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318, 304-311.

54. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *The Journal of Neuroscience Methods* 14, 149-167.
55. Pertwee R.G., Ross R.A. (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids* 66,101-121.
56. Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 10819–10824.
57. Rodgers R.J., Haller J., Halász J., Mikics É. (2003) One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *The European Journal of Neuroscience* 17,1279-86.
58. Rodgers R.J., Evans P.M., Murphy A. (2005) Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behavioural Pharmacology* 16, 405-413.
59. Rubino T., Realini N., Castiglioni C, Guidali C., Viganó D, Marras E., Petrosino S., Perletti G., Maccarrone M., Di Marzo V., Parolaro D. (2008) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 18, 1292-1301.
60. Sethi, B.B., Trivedi, J.K., Kumar, P., Gulati, A., Agarwal, A.K. & Sethi, N. (1986) Antianxiety effects of cannabis: involvement of central benzodiazepine receptors. *Biol. psychiatry*, 21, 3-10.
61. Scherma M., Medalie J., Fratta W, Vadivel S.K., Makriyannis A., Piomelli D., Mikics E., Haller J., Yasar S., Tanda G., Goldberg S.R. (2008) The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* 54, 129-140.
62. Sciolino NR, Zhou W, Hohmann AG 2011 Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 64:226-234
63. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 21;388 (6644):773-8.
64. Steward, S.H., Karp, J., Pihl, R.O. & Peterson, R.A. (1997) Anxiety sensitivity and self-reported reasons for drug use. *J.Subst. Abuse*, 9, 223-240.

65. Twitchell W., Brown S., Mackie K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 78, 43-50.
66. Urigüen L, Pérez-Rial S, Ledent C, Palomo T., Manzanares J. (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 46, 966–973
67. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. & Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and betaendorphin. *Science*, 213, 1394-1397
68. Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R 1994 Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* 59:110-112
69. Wenger T., Ledent C., Tram G. (2003) The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in cb1 cannabinoid receptor knockout mice. *Neuroendocrinology* 78, 294–300
70. Zuardi AW, Teixeira NA, Karniol IC (1984) Pharmacological interaction of the effects of delta 9-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on serum corticosterone levels in rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 269:12-19

## 10. Köszönetnyilvánítás

Nagy köszönettel tartozom kollégámnak, Aliczki Manónak, akitől munkám során a legtöbbet tanulhattam, segítségére mindig számíthattam, Nélküle ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Haller Józsefnek, hogy lehetőséget teremtett, hogy munkámat az általa vezetett magas színvonalon működő kutatócsoportban végezhettem, valamint, hogy nagyfokú szaktudásával mindig segítette előrehaladásom.

Köszönöm belső konzulensemnek, Dr. Kabai Péternek, akinek ajánlásával a csoportba kerülhettem, és aki széles látókörével és építő jellegű kritikáival mindig gondolkodásra sarkalt.

Ezen felül szeretném megköszönni a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Magatartás Neurobiológiai Osztályán dolgozó minden alkalmazottnak, amiért mindannyian segítőkészek és pozitívak voltak irányomban, és nagyban segítették a csoportba való beilleszkedésemet.