

Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a környezeti ingerekre adott válaszreakciók szabályozásában

Doktori tézisek

Aliczki Manó

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Haller József, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Bárdos György, D.Sc., egyetemi docens

Dr. Timár Júlia, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla, az MTA tagja, professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bartha Tibor, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Zachar Gergely, Ph.D., tudományos
segédmunkatárs

Budapest
2013

BEVEZETÉS

Az endokannabinoid rendszer elemeinek, a kannabinoid receptoroknak, ligandoknak és ezen ligandokat metabolizáló enzimeknek, illetve a retrográd endokannabinoid jelátviteli útnak a leírása az idegrendszer működésének egy fontos új mechanizmusát tárta fel a XX. század végén. Az endokannabinoid jelátvitel megismerése új távlatokat nyitott a központi idegrendszer finom működésének megértésében, illetve – mivel az endokannabinoid rendszer rendkívül fontos eleme az emocionális magatartás neuronális szabályozásának – hosszú távon hozzájárulhat olyan pszichiátriai zavarok terápiájához is, amelyek komoly egészségügyi terhet rónak a társadalomra. Emiatt jelentős figyelem irányul a rendszer működésének további részletes feltárására.

Az utóbbi években az endokannabinoid kutatások fő irányvonala az endokannabinoid rendszer receptor agonistákkal, illetve antagonistákkal való manipulálása felől egyre inkább a specifikusabb vizsgálatokat lehetővé tévő közvetett modulációk (az endokannabinoid-visszavétel, illetve -lebontás gátlása) irányába tolódott el. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, az endokannabinoid rendszer befolyásolásának magatartási hatásai rendkívül erősen függenek a kísérleti körülményektől, a kannabinoidok magatartási hatásainak jellegét jelen pillanatban még nem értjük jól, feltételezhetően a hatásmechanizmusok összetettsége miatt.

Jelen tanulmányban a korábban leírt ellentmondások tisztázásának céljából egy új megközelítésből vizsgáltuk a kannabinoidok magatartásra kifejtett hatásait. Az endokannabinoid metabolizmus gátlásával indirekt módon fokoztuk az endokannabinoid jelátvitelt, majd ennek vizsgáltuk hatásait arra, hogy a kísérleti alanyok miként reagálnak eltérő kísérleti körülményekre, illetve a manipulált endokannabinoid jelátvitel befolyásolja-e a stratégiát, magatartási mintázatot, amit az alanyok a környezeti kihívásokkal való megküzdés során mutatnak. Emellett vizsgáltuk azt is, hogy az endokannabinoid jelátvitel befolyásolja-e a stresszválasz kialakításáért felelős, illetve a megküzdési stratégiák szabályozásában is részt vevő hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg-tengely (HPA-tengely) működését, és ezáltal másodlagosan eltérő magatartási hatásokat okoz-e a HPA-tengelyt eltérő mértékben aktiváló környezetben.

Munkánk első felében, az endokannabinoid anandamid (AEA) lebontását végző zsírsavamid-hidroláz (FAAH) enzim fokoztuk az AEA jelátvitelt, és ennek a fokozott jelátvitelnek vizsgáltuk a hatásait a

magatartási válaszra melyeket az alanyok eltérően averzív környezeti körülményekre adtak. Emellett vizsgáltuk a különböző megküzdési stratégiákra gyakorolt AEA-hatást is, a stratégiákat közvetlenül vizsgáló magatartástereszték alkalmazásával.

Vizsgálataink végzése közben vált elérhetővé a monoacil-glicerol-lipáz (MAGL), a másik endokannabinoid, a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) bontóenzimének specifikus inhibitora, melynek alkalmazásával lehetőségünk nyílt a 2-AG jelátvitel szerepének tanulmányozására a magatartás szabályozásban. Az ilyen jellegű vizsgálatok első lépéseként tanulmányoztuk i.) a MAGL-gátlás magatartási hatásait eltérően averzív környezeti körülmények között, illetve ii.) a magatartási hatások stresszválással való összefüggéseit. Utóbbi vizsgálat előzménye egyrészt az volt, hogy előzetes eredményeink szerint a MAGL gátlása befolyásolta a magatartást, illetve a már ismert interakciók az endokannabinoid jelátvitel és a HPA-tengely aktivitása között. Továbbá a glükokortikoid stresszválasz fontos szerepet játszik a megküzdési stratégiák szabályozásában is. A magatartásvizsgálatok mellett több élettani paramétert is megfigyeltünk, pl. a testhőmérséklet változásait, illetve a vérplazma kortikoszteron koncentrációját.

CÉLKITŰZÉSEK

Az egyes vizsgálataink kérdései az alábbiak voltak:

I. A FAAH gátlás hatása a környezeti változásokra adott magatartási reakciókra és megküzdési stratégiákra

1. Megváltoztatja-e a FAAH-enzim gátlása a megemelt keresztpalló tesztben a megküzdési stratégiák egy fontos komponensét, a környezeti ingerekre adott magatartási válaszreakció jellegét?
2. Befolyásolja-e a FAAH-aktivitás gátlása a magatartási mintázatokat egy specifikusan a megküzdési stratégiákat specifikusan vizsgáló farokcsípés tesztben?
3. 1-es típusú kannabinoid receptoron (CB₁R) keresztül zajlanak-e le a FAAH-gátlás megküzdési stratégiákra gyakorolt hatásai?

4. Elképzelhető-e, hogy a FAAH-gátlás megküzdési stratégiákra kifejtett hatása valójában a kezelés szorongásoldó hatásának másodlagos hatása?
5. Megváltoztatják-e a megküzdési stratégiák, illetve a FAAH enzim gátlása a fájdalomküszöböt, és ez befolyásolhatja-e a megküzdési stratégiákat vizsgáló farokcsípés teszt során mutatott magatartást?
6. Befolyásolja-e a FAAH-aktivitás gátlása a a víz hőmérséklet hatását a magatartásra a kényszerített úszás tesztben egerek esetében, azaz egy új modellállatban, illetve vizsgálati paradigmában, mely egy újabb érzékszervei modalitást vesz idénybe?
7. Megváltoztatja-e a FAAH enzim gátlása egerek magatartási stratégiáit a hátrafordítás tesztben?

II. A MAGL gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválásra

8. Az alanyok számára averzívabbnak tekinthető, ismeretlen környezetben befolyásolja-e a MAGL gátlása a lokomotoros aktivitást, illetve a szorongást, és ezek a hatások a kezelés után mennyi idővel jelentkeznek?
9. A fenti hatások függenek-e az alkalmazott modellállatfaj törzsétől?
10. Befolyásolja-e a MAGL-gátlás a lokomotoros aktivitást, illetve a testhőmérsékletet kevésbé averzívnek tekinthető, ismert környezetben, illetve milyen idődinamikával jelentkeznek a MAGL-inhibíció ilyen jellegű hatásai?
11. Befolyásolja-e a MAGL-aktivitás gátlása a bazális, illetve stresszindukált kortikoszteron-szintet, illetve a hatások milyen idődinamikával alakulnak ki?
12. A MAGL gátlásának korábban kimutatott hatásai a lokomotoros aktivitásra, illetve a szorongásra HPA-tengelyfüggő módon alakulnak-e ki?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti alanyok

A kísérleti alanyok 2-3 hónapos, 300-350 g tömegű hím Wistar patkányok, illetve 30-35 g tömegű hím CD1 és C57BL/6J egerek voltak (Charles River Laboratories, Budapest). Az állatokat 12:12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, csapvíz és rágcsáló táplálék *ad libitum* elérhető volt. A patkányokat 4 egyedből álló csoportokban, míg az egereket izoláltan tartottuk, gyanis a patkányokkal ellentétben az egerek csoportban való tartáskor erőteljes szociális hierarchiát alakítanak ki, mely befolyásolhatja a későbbi magatartásvizsgálatok eredményeit.. A szociálisan tartott patkányokat magatartási teszteléskor a teszt nap előtt 3 napra izoláltuk. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC) és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával zajlottak le.

Magatartástesztek és elemzésük

Magatartástesztjeinket a világos periódus korai óráiban végeztük egy erre a célra elkülönített kísérleti szobában. A tesztek során a kísérleti alanyok magatartását digitális videokamerával rögzítettük. A videofelvételek utólagos elemzését a H77 eseményrekorder szoftverrel végeztük (Haller József, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest).

Megemelt keresztpalló teszt (EPM)

A megemelt keresztpalló teszt az egyik legelterjedtebben alkalmazott magatartásteszt laboratóriumi rágcsálók szorongásának vizsgálatára orvosi biológiai kutatásokban. A tesztapparátus a földtől 80 cm-re megemelt két zárt, illetve két nyílt karból áll, melyeket egy centrum platform köt össze. A teszt során a kísérleti alanyt a centrum platformra helyeztük, majd magatartását 5 percen át rögzítettük. A nyílt karban töltött idő a szorongást, míg a zárt karba való belépések száma a lokomotoros aktivitást jelezte. Továbbá a magatartás ún. „etológiai” paramétereit is vizsgáltuk, nevezetesen a kockázatbecslő magatartás egyes elemeit, melyek szintén a szorongás indikátorai.

Nyílt-tér teszt (OF)

A nyílt-tér teszt az egyik legszélesebb körben alkalmazott teszt a laboratóriumi rágcslók lokomotoros aktivitásának mérésére. A nyílt-tér apparátus egy fehér műanyag doboz, átlátszó plexilapokkal lefedve. A kísérleti alanyt az apparátus egyik sarkába helyeztük, majd 5 percen keresztül rögzítettük viselkedését. Az apparátusban megtett út a lokomotoros aktivitást jellemezte, míg a nyílt-tér közepén eltöltött idő a szorongást.

Kényszerített úszás teszt (FST)

A kényszerített úszás teszt egy széles körben elterjedt procedúra laboratóriumi rágcslók depresszió-jellegű magatartásainak vizsgálatára. A teszthez használt apparátus egy csapvízzel feltöltött üveghenger. Jelen tanulmányban a tesztet az eredeti procedúrától eltérően alkalmazva, nem a kezelés depresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk, hanem azt, hogy eltérő körülmények között eltérő magatartást mutatnak-e a kísérleti alanyok. Ennek érdekében alanyaikat a vízbe helyeztük, és magatartásukat 6 percen át rögzítettük. Három magatartási paramétert figyeltünk meg: a lebegést, a küzdést, illetve az úszást. Egyes vizsgálataink során a kényszerített úszást nem magatartástesztként, hanem stresszorként alkalmaztuk.

Farokcsípés teszt

Patkányok megküzdési stratégiáinak vizsgálatára a farokcsípés tesztet alkalmaztuk. A teszt során az alany farkára egy binder csipeszt helyeztünk, majd magatartását rögzítettük 5 percen keresztül. Az alanyok magatartását részletes etológiai elemzést alá vetettük. A vizsgált magatartási paraméterek közül a teszt idejét kb. 85%-ban kitevő két paramétert, a csipesz rágását, illetve a csipesztől független explorációs magatartást vizsgáltuk, előbbit „probléma-orientált”, aktív válasznak, utóbbit „problémát mellőző”, passzív válasznak tekintettük, és az állatokat a két paraméter aránya alapján soroltuk elsődlegesen aktív, illetve elsődlegesen passzív megküzdési stratégiát mutató csoportokba.

Hátrafordítás teszt

A hátrafordítás tesztet eredetileg malacokra fejlesztették ki, majd alkalmazták később laboratóriumi rágcslókon. A teszt során az alanyokat 1 percig manuálisan a hátukra fordítva tartottuk, majd magatartásukat rögzítettük. A megküzdési stratégiákat a „szökési kísérletek” és az immobilitással töltött idő aránya alapján állapítottuk meg.

Forró lap teszt

A forró lap teszt egy széleskörben alkalmazott magatartási teszt az állatok fájdalomküszöbének vizsgálatára. A teszt során a kísérleti alanyt egy melegíthető lapra helyezük, melyet egy átlátszatlan plexiből készült doboz vesz körül. Az állatok 3 percen át habituálódhattak a dobozhoz, majd a lap fokozatosan melegedni kezdett. Amint az állat megnyalta valamelyik hátulsó végtagját, a melegítés abbamaradt, és a hőmérséklet érték rögzítésre került.

***In vivo* biotelemetriás mérések**

Alanyaink testhőmérsékletének és saját ketrecükben való mozgásaktivitásának mérésére hasüregükben *in vivo* biotelemetriás e-mittert implantáltunk (HR E-Mitter, PDT-4000; Mini Mitter Company, Bend, OR, USA). Az e-mitter által továbbított jeleket az alanyok ketrece alatt található jelző detektálta és továbbította egy számítógépre, amin a VitalView Data Acquisition System szoftver (Mini Mitter Company, Bend, OR, USA) regisztrálta. A farmakológiai kezeléseket megelőzően 2 órán keresztül rögzítettük mindkét paraméter alapszintjét, majd a kezeléseket követően az ettől való eltéréseket vizsgáltuk.

Vérvétel és hormonmérések

A hormonmérésekhez szükséges vérmintákat az állatok farkán ejtett bemetszéseken keresztül, illetve törzsvérből nyertük. A vérmintákat lecentrifugáltuk, majd a vérplazmát a hormonmérésig -20°C-on tároltuk. A plazma kortikoszteronszintjét radioimmunoassay módszerrel mértük meg. Jelölőanyagként ¹²⁵I-jelölt kortikoszteron-karboximetiloxim-tirozin-metil észterszármazékot használtunk. A kortikoszteron antitest más természetes szteroidokkal való keresztreaktivitása 0,05% alatt volt, kivéve a deoxikortikoszteront (1,5%) és a progeszteront (2,3%). A mérés érzékenysége 1 pmol/ml volt. A mérésen belüli ~10%, illetve a mérések közti varianciakoefficiens ~15% volt.

Statisztikai analízis

Adatainkat egy- vagy többfaktoros, illetve ismételt mérések varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk, mely kritériumainak teljesülését

Levenne-tesztel ellenőriztük. Amennyiben arra szükség volt, a kritériumok teljesülésének érdekében az adatokat négyzetgyök-transzformációnak vetettük alá. Páros összehasonlításokhoz *post-hoc* Duncan tesztet alkalmaztunk. Két változó közötti korrelációt Spearman-féle korrelációs teszttel, míg az eloszlásuk közötti különbségeket a χ^2 -próbával vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatokat a Statistica 11 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZLÉSÜK

I. A FAAH-aktivitás gátlásának szerepe a környezetre adott magatartási reaktivitás és a megküzdési stratégiák szabályozásában

A környezet averziválásának fokozása a megemelt keresztpalló tesztben csökkentette a nyílt kari exploráció mértékét patkányokban. Az averzív körülményekre adott ilyen jellegű magatartási választ a FAAH-aktivitás gátlásával fokozott AEA jelátvitel tompította. Ez a tompított magatartási reaktivitás elképzelhetően az aktív megküzdési stratégia megerősödésének lehet a jele, ugyanis erre a stratégiára jellemző a környezet által csekély mértékben befolyásolt autonóm magatartás. Ezt a feltevést bizonyították megfigyeléseink a megküzdést vizsgáló farokcsipés tesztben, miszerint a FAAH-aktivitás gátlása növelte az alanyok között az aktív megküzdés arányát. Kimutattuk továbbá, hogy a FAAH enzim gátlásának megküzdési stratégiákra kifejtett hatásai patkányokban a CB1R-on keresztül zajlanak le, illetve nem a kezelés által kiváltott szorongásoldás másodlagos hatásai. A hatások a fájdalomküszöb változásaihoz sem köthetőek, ugyanis azt sem a megküzdési stratégiák, sem a FAAH-aktivitás gátlása nem befolyásolta. A patkányok esetében tapasztaltakhoz az egerek a környezeti körülményekhez igazították magatartásukat az kényszerített úszás tesztben. Feltételezéseink szerint, akárcsak patkányoknál, ezek a változások az aktív megküzdés erősödésével magyarázhatóak. A FAAH-aktivitás gátlása ezeket a változásokat tompította. Ez a feltevés bebizonyosodott a hátrafordítás tesztben, ahol a FAAH inhibíciója növelte az aktív megküzdési stratégia arányát.

A FAAH aktivitás gátlása tompította a környezet magatartásra gyakorolt hatását, és aktív válaszokat alakított ki környezeti kihívásokkal való szembesüléskor. Mi ezt a hatást a megküzdési stratégiák változásaival interpretáltuk, ugyanis az aktív megküzdés probléma-orientált, rutin által vezérelt magatartással jellemezhető, melyet a környezeti körülmények gyengén befolyásolnak. Elképzelhető tehát, hogy a fokozott AEA jelátvitel

aktív megküzdési stratégiát alakít ki, mely feltevés egyes korábbi tanulmányok indirekt bizonyítékaival is összhangban áll.

Alaputatási jelentőségük mellett jelen eredményeink felhívják a figyelmet az AEA metabolizmus gátlásának új terápiás lehetőségeire is. Az egyedek kihívásokkal való megküzdése során mutatott stratégiáinak számos gyógyászati vonatkozása lehet, elsősorban a pszichiátria területén. Több pszichiátriai zavar esetében az aktív megküzdési stratégia előtérbe helyezése fontos eleme a terápiának. Ilyen zavarok például egyes, passzív megküzdéssel karakterizálható rendellenességek, mint a depresszió, illetve olyan zavarok, ahol a környezeti ingerekre adott túlzott, inadekvát válaszok jelentik a betegség kulcsát. Ilyen rendellenességek például a szorongásos zavarok egyes formái, mint a fóbiák vagy poszttraumatikus stressz zavar (PTSD). Az AEA metabolizmus gátlásának sikeres felhasználása a társadalmat jelentős teherrel sújtó PTSD terápiájában jelenthetne különösen nagy előrelépést, ugyanis ennek a zavarnak a kezelése a mai napig nem megoldott, a jelenleg alkalmazott terápiás módszerek mellett továbbra is szükség van alternatív terápiás utak kifejlesztésére.

II. A MAGL-gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválásra

Eredményeink szerint a MAGL-aktivitás inhibíciója ismeretlen környezetben (az OF, illetve EPM tesztekben) növelte a lokomotoros aktivitást, illetve csökkentette a szorongás mértékét. Ezek a hatások 80 perccel a kezelés után jelentkeztek, jóval a kezelés irodalmi adatok alapján feltételezett biokémiai hatásai után (pl. agyi 2-AG szint fokozása). A hatások feltételezhetően többé-kevésbé általánosak egerekre nézve, ugyanis azok mindkét vizsgált egértörzsből kimutathatóak voltak. Ezzel szemben ismert környezetben (az alanyok saját ketrecében) a MAGL gátlásának hatásai a kezelés után jóval hamarabb alakultak ki. Itt a kezelés tompította az injekció által kiváltott, a kezelés után körülbelül 20 perccel jelentkező testhőmérséklet-növekedést, míg megközelítőleg ugyanebben az időpontban eltűntette a szintén az injekció által kiváltott változásokat a lokomotoros aktivitás mintázataiban. Emellett a kezelés után körülbelül 120 perccel, a MAGL inhibíciója növelte az immobilitásban töltött idő arányát, szemben az ismeretlen környezetben tapasztaltakkal, ahol ebben az időpontban a kezelés fokozta a lokomóciót. Kimutattuk továbbá, hogy a MAGL aktivitás gátlása rövidebb idővel az injekció után időlegesen megnövelte a bazális kortikoszteronszintet. A stresszindukált kortikoszteronszintet a kezelés nem befolyásolta. A MAGL-gátlás magatartási és endokrin hatásainak összefüggéseit vizsgálva megállapítottuk, hogy a kezelés lokomotoros

aktivitásra gyakorolt stimuláló hatása független a kortikoszteron-szintézistől, míg szorongásoldó hatásaiért részben a MAGL inhibíció által megnövelt kortikoszteron alapszint lehet felelős, ugyanis ezek a hatások a kortikoszteron-szintézis gátlásakor nem jelentkeztek.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a MAGL-aktivitás gátlásával indukált fokozott 2-AG jelátvitel rövid idő alatt tompítja a stressz által kiváltott mozgásmintázat-beli változást, illetve testhőmérséklet-növekedést. A 2-AG jelátvitel evésbé averzív körülmények között, mint pl. az állatok saját ketrecében fázikus, rövid idő alatt lecsengő hatást gyakorol az egyes magatartási és élettani paraméterekre. Ezzel szemben ismeretlen, averzív körülmények között a MAGL inhibíciója inkább lassan kialakuló, hosszab ideig tartó, tónikus módon csökkenti a szorongást és növeli a mozgásaktivitást. Emellett vizsgálataink tisztázták, hogy a 2-AG jelátvitel fokozása serkenti a HPA-tengely alapszintű működését, mely a MAGL gátlásának egyes magatartási hatásai háttérében állhat. Kortikoszteron-szintézistől független magatartási hatások szintén kimutathatóak voltak, melyekért feltehetőleg 2-AG által mediált neurális folyamatok felelhetnek. Feltételezéseink szerint a MAGL aktivitás gátlása és a HPA-tengely közötti interakciók állhatnak a MAGL inhibíció hatásainak, illetve ezen hatások idődinamikájának kontext-dependenciája mögött.

III. Összegzés

Vizsgálataink során a FAAH gátlásával fokozott AEA jelátvitel hatására fokozódott az aktív megküzdési stratégia környezeti kihívással való szembesüléskor. Ezzel a mechanizmussal számos korábbi, az irodalomban, illetve általunk leírt ellentmondás magyarázhatóvá vált. A MAGL-aktivitás specifikus farmakológiai gátlására csak az utóbbi időkben adódott lehetőség, ezáltal a 2-AG jelátvitel kihívásokra adott válaszadásra gyakorolt hatásait teljes részleteiben még nem volt módunk feltárni. Ennek ellenére demonstráltuk, hogy a környezet averzívítása eltérő irányban befolyásolja a lokomotoros aktivitásra kifejtett 2-AG hatásokat, továbbá a magatartási hatások idődinamikája is nagyban függ a környezeti körülményektől. Kutatócsoportunk egy korábbi munkáján alapulva egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint a MAGL gátlása tompítja az averzív körülmények szorongáskeltő hatásait. Látva, hogy a környezeti változások a MAGL inhibíciója esetén a FAAH-aktivitás gátlásakor tapasztaltakhoz hasonlóan befolyásolják a magatartási reakciókat, elképzelhető, hogy a 2-AG jelátvitel is részt vehet a megküzdési stratégiák szabályozásában. Ezt a feltevést erősíti az a megfigyelésünk is, hogy a MAGL-aktivitás gátlásakor

megváltozott a megküzdési stratégiákkal szorosan összefüggő HPA-tengely működése is. Mindezek alapján fontos lehet a MAGL gátlás magatartási hatásainak környezeti averzivitással való kapcsolatának vizsgálata, hasonló módon, mint ahogy azt az AEA jelátvitel hatásait illetően tettük. Ugyan még kevés tudás áll rendelkezésünkre a MAGL gátlásának hatásairól, azonban az eddigi eredmények arra utalnak, hogy az AEA jelátvitelhez hasonlóan ez az endokannabinoid is fontos lehet a kihívásokra adott válaszok szabályozásában. Ebben a témában mindenféleképpen szükséges a jövőben célzott vizsgálatokat végezni.

Összefoglalva kijelenthető, hogy vizsgálatainkban az endokannabinoid jelátvitel fokozása nem specifikus magatartási hatásokat fejtett ki, hanem a környezeti ingerekre, kihívásokra adott válaszadást befolyásolta. Az AEA jelátvitel serkentése munkánkban bizonyítottan fokozta az aktív megküzdést, mely hatás feltehetőleg általánosnak mondható, az ugyanis mindkét vizsgált állatfajban, illetve több paradigmában is megjelent. Ugyan a fokozott 2-AG jelátvitel vizsgálatára még csak a közelmúltban nyílt mód, jelen eredményeink szerint feltételezhető, hogy ez az endokannabinoid is részt vesz a megküzdés AEA jelátvitelhez hasonló szabályozásában, melyet mind magatartási eredményeink, mind a 2-AG endokrin hatásai is sugallnak.

KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. A FAAH-aktivitás gátlása által fokozott AEA jelátvitel aktív megküzdési stratégiát alakít ki.
 - a. A FAAH-aktivitás gátlásának hatására tompul a környezet változásaira adott reaktivitás, mely az aktív megküzdési stratégia egy jellemzője.
 - b. A fokozott AEA jelátvitel közvetlenül is előtérbe helyezi az aktív megküzdést.
 - c. A hatások nem a fájdalomérzékelés, illetve a szorongás másodlagos hatásai voltak, hanem a fokozott AEA jelátvitel közvetlenül a megküzdési stratégiákat befolyásoló, CB1R-on keresztül lezajló hatásai.

- d. A fenti hatások többé-kevésbé általánosak, ugyanis különböző modellállatokban és eltérő tesztparadigmákban is tapasztalhatóak voltak.
2. A MAGL inhibíciója által fokozott 2-AG jelátvitel eltérően averzív környezetben eltérő magatartási hatásokat okoz, részben a stresszválasz befolyásolásán keresztül.
- a. A fokozott 2-AG jelátvitel növeli a lokomotoros aktivitást és oldja a szorongást, illetve tompítja az averzív stimulus által kiváltott mozgásmintázatokat és testhőmérséklet-növekedést.
 - b. 120 perccel a kezelés után a MAGL-aktivitás gátlása ellentétes irányban befolyásolja a lokomotoros aktivitást ismert és ismeretlen környezetben.
 - c. A hatások ismeretlen környezetben lassab, tónikus, míg ismert környezetben gyorsabb, fázikus idődinamikával jelentkeztek, illetve azok többé-kevésbé függetlenek voltak a vizsgált törzstől.
 - d. A MAGL gátlása fokozta a HPA-tengely alpműködését, míg a stresszválaszt nem befolyásolta.
 - e. A HPA-tengely bazális működésére gyakorolt hatás részben felelős a fokozott 2-AG jelátvitel szorongásoldó hatásaiért, míg a manipuláció lokomotoros hatásai ettől függetlenek.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az endokannabinoid jelátvitel kulcsfontosságú szerepet játszik az emocionális magatartás szabályozásában. Ez a szerep azonban nem teljesen egyértelmű, számos tanulmányban a kannabinoid manipulációk emocionális hatásai erősen függtek a környezeti kontextus averzivitásától. Jelen tanulmány célja a kannabinoidok kontextusfüggő emocionális hatásaival kapcsolatos kérdések tisztázása. Vizsgálatainkban az endokannabinoid metabolizmus gátlásával fokoztuk az endokannabinoid jelátvitelt, és ennek vizsgáltuk magatartási és élettani hatásait eltérően averzív kontextusokban.

Eredményeink szerint a zsírsav-amid-hidroláz inhibíciójával fokozott anandamid jelátvitel tompítja a környezet averzivitásának

változásai által kiváltott magatartási válaszreakciókat, illetve környezeti kihívások esetén problémaorientált megküzdési mintázatokat indukált. A hatások feltételezhetően arra utalnak, hogy a fokozott anandamid jelátvitel erősíti az aktív megküzdési stratégiát, ennek a stratégiának ugyanis jellemzője, hogy az egyedek magatartási válasza kihívások esetén problémaorientált, rutin által befolyásol, illetve a környezeti ingerek kevésbé befolyásolják.

Tanulmányunk második felében egy újonnan kifejlesztett ágenssel a monoacil-glicerol-lipáz aktivitását gátoltuk, fokozva a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) jelátvitelt, majd ennek vizsgáltuk magatartási hatásait eltérő kontextusokban. A kezelés averzív környezetben oldotta a szorongást és fokozta a mozgásaktivitást, illetve kevésbé averzív kontextusban tompította a stresszindukált lokomotoros és testhőmérséklet-változásokat. Érdekes módon a hatások idődinamikája kontextusfüggő volt, ugyanis a kezelés hatásai kevésbé averzív környezetben gyors, fázikus módon jelentkeztek, míg averzív kontextusban lassan, tónikus módon alakultak ki. A fokozott 2-AG jelátvitel emellett növelte a HPA-tengely alapműködését is, mely részben felelős volt az averzív kontextusban tapasztalt szorongásoldó hatásokért.

Összefoglalva, az endokannabinoid jelátvitel nem fejt ki specifikus hatást egyes emocionális állapotokra, ehelyett inkább a környezeti ingerek agyi interpretációját szabályozza, illetve az ingerekre adott magatartási válaszokat hangolja. Ez a szabályozás egyrészt az aktív megküzdési stratégia erősödésén, másrészt a stresszválással való interakciókon keresztül valósul meg.

A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Haller, J., Goldberg, S.R., Gyimesiné Pelczer, K., **Aliczki, M.**, Panlilio, L.V., 2013. The effects of anandamide signaling enhanced by the FAAH inhibitor URB597 on coping styles in rats *Psychopharmacology* DOI: 10.1007/s00213-013-3161-2 **IF: 4.061**
2. **Aliczki, M.**, Zelena, D., Mikics, E., Varga, Z.K., Pinter, O., Venczkone Bakos, N., Varga, J., Haller, J., 2013. Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma

corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CDI mice. *Horm Behav* DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.03.017 **IF: 3.735**

3. **Aliczki, M.**, Balogh, Z., Tulogdi, A., Haller, J., 2012. The temporal dynamics of the effects of monoacylglycerol lipase blockade on locomotion, anxiety and body temperature. *Behav Pharm* 23, 348-357 **IF: 2.301**

A szerző egyéb közleményei

1. Haller, J., **Aliczki, M.**, Gyimesine Pelczer, K., 2013. Classical and novel approaches to the preclinical testing of anxiolytics: A critical evaluation. *Neurosci Biobehav Rev* DOI: 10.1016/j.neubiorev.2012.09.001 **IF: 9.440**
2. Tulogdi, A., Soros, P., Toth, M., Nagy, R., Biro, L., **Aliczki, M.**, Klausz, B., Mikics, E., Haller, J., 2012 Temporal changes in c-Fos activation patterns induced by conditioned fear. *Brain Res Bull* 88, 359-370 **IF: 2.935**
3. Panlilio, L.V., Justinova, Z., Mascia, P., Pistis, M., Luchicchi, A., Lecca, S., Barnes, C., Redhi, G.H., Adair, J., Heshman, S.J., Yasar, S., **Aliczki, M.**, Haller, J., Goldberg, S.R., 2012. Novel use of a lipid-lowering fibrate medication to prevent nicotine reward and relapse: Preclinical findings. *Neuropsychopharmacology* 37, 1838-1847 **IF: 8.678**
4. Haller, J., **Aliczki, M.**, 2012. Current animal models of anxiety, anxiety disorders and anxiolytic drugs. *Curr Op Psych* 25, 59-64 **IF: 3.422**
5. Zanettini, C., Panlilio, L., **Aliczki, M.**, Goldberg, S., Haller, J., Yasar, S., 2011. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci* 5, 57 **IF: 4,758**
6. Toth, M., Mikics, E., Tulogdi, A., **Aliczki, M.**, Haller, J., 2011. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Horm Behav* 60, 28-36 **IF: 3.991**

7. Mikics, E., Vas, J., **Aliczki, M.**, Halasz, J., Haller, J., 2009. Interactions between the anxiogenic effects of CB1 gene disruption and 5-HT3 neurotransmission. *Behav Pharm* 20, 265-272 **IF: 2.854**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Haller Józsefnek a lehetőséget, hogy kutatócsoportjában végezhettem doktori munkámat. Mindig rendelkezésemre álló felbecsülhetetlen szakmai támogatása, ötletei, építő kritikái nélkül nem jöhettek volna létre ezek az eredmények, és segítsége nélkül a tudományos gondolkodás, a tudományos munka alapjait sem sajátíthattam volna el.

Hálás vagyok kollégámnak, Dr. Mikics Évának a kimagasló elméleti és gyakorlati segítségéért, kritikáiért, állandó motivációjáért, mindig jókedélyű, közös munkánkért, mely során nélkülözhetetlen szakmai tudást adott át nekem.

Hálával tartozom kollégáimnak, barátaimnak, különösen Balogh Zoltánnak, Dr. Barna Istvánnak, Barsvári Beátának, Biró Lászlónak, Dr. Fodor Annának, Gyimesiné Pelczer Katalinnak, Dr. Pintér Ottónak, Dr. Tóth Máténak, Tulogdi Áronnak, Varga Jánosnak, Varga Zoltánnak, Venczkóné Bakos Nikolettának és Dr. Zelena Dóranak a munkámban nyújtott segítségért, illetve a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Magatartás Neurobiológiai Osztályán dolgozó további kollégáimnak szakmai támogatásukért és a folyamatos motiváló, barátságos légkörért, mely megkönnyítette, kellemessé tette munkámat. Köszönet illeti továbbá Dr. Kovács Krisztinát az értekezéssel kapcsolatos értékes kritikáiért, illetve Szűcsné Kazi Máriát és Szafner Rozáliát, az Orvosi Géntechnológiai Részleg munkatársait a munkám során lebonyolított állatkísérletek zökkenőmentessé tételéért.

Köszönöm Dr. Steven R. Goldberg és Dr. Leigh V. Panlilio közreműködését a jelen munkában, illetve azt a sok hasznos tapasztalatot, melyet Baltimore-ban kaptam tőlük a velük való közös munka során.

Végül pedig köszönöm családom türelmét és bizalmát, mellyel mindig mögöttem álltak és támogattak, külön köszönetet érdemel húgom, Aliczki Johanna az értekezés nyelvi ellenőrzéséért. Továbbá hálás vagyok barátaim és csapattársaim támogatásáért is, nélkülük mindez nem valósulhatott volna meg.

