

Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a környezeti ingerekre adott válaszreakciók szabályozásában

Doktori értekezés

Aliczki Manó

Semmelweis Egyetem
Szentágothai 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

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2.	BEVEZETÉS	8
3.	IRODALMI HÁTTÉR	9
3.1.	A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer	9
3.2.	„Klasszikus” kannabinoid magatartási és élettani hatások	17
3.3.	Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a stresszreaktivitás szabályozásában	18
3.4.	Az endokannabinoid jelátvitel hatásai az emocionális magatartásra	21
3.5.	Ellentmondások az emocionális magatartás endokannabinoid szabályozásában	24
3.6.	Az endokannabinoid rendszer szerepe a környezeti kihívásokra adott válaszreakciók szabályozásában	27
3.7.	Megküzdési (<i>coping</i>) stratégiák	28
4.	CÉLKITŰZÉSEK	30
4.1.	A FAAH-gátlás hatásai a környezeti változásokra adott magatartási reakciókra és megküzdési stratégiákra patkányokban	31
4.2.	A FAAH-gátlás hatása a környezeti változásokra adott magatartási reakciókra és megküzdési stratégiákra egerekben	32
4.3.	A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája eltérő mértékben averzív környezetben egerekben	32
4.4.	A MAGL-gátlás hatása a HPA-tengely működésére és a HPA-tengelyfüggő magatartási hatásokra egerekben	32
5.	ANYAG ÉS MÓDSZEREK	33
5.1.	Kísérleti alanyok	33
5.2.	Drogok és dózisok	34

5.3.	Magatartástesztek és elemzésük	34
5.3.1.	Megemelt keresztpalló teszt egereken és patkányokon (EPM, <i>elevated plus-maze</i>)	35
5.3.2.	Nyílt-tér teszt egereken (porond teszt, OF, <i>open-field</i>)	37
5.3.3.	Kényszerített úszás teszt egereken (FST, <i>forced swimming</i>)	38
5.3.4.	Farokcsípés teszt patkányokon (<i>tail pinch test</i>)	39
5.3.5.	Hátrafordítás teszt egereken (<i>back test</i>)	40
5.3.6.	Forró lap teszt patkányokon (<i>hot plate test</i>)	42
5.4.	<i>In vivo</i> biotelemetriás vizsgálatok egerekben	42
5.4.1.	<i>In vivo</i> biotelemetriás e-mitter implantáció egerekben	42
5.4.2.	<i>In vivo</i> biotelemetriás mérések	42
5.5.	Vérvétel és hormonmérések	43
5.6.	Kísérleti elrendezés	44
5.6.1.	A FAAH-aktivitás gátlásának szerepe a környezetre adott magatartási reaktivitás és a megküzdési stratégiák szabályozásában	44
5.6.1.1.	A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a megemelt keresztpalló tesztben	44
5.6.1.2.	A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok megküzdési stratégiáira a farokcsípés tesztben	44
5.6.1.3.	A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a kényszerített úszás tesztben	46
5.6.1.4.	A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek megküzdési stratégiáira a hátrafordítás tesztben	46
5.6.2.	A MAGL-gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválásra	47
5.6.2.1.	A MAGL gátlás magatartási hatásainak idődinamikája averzív környezetben CD1 és C57BL/6J egerekben	47

5.6.2.2. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája kevésbé averzív környezetben CD1 egerekben	48
5.6.2.3. A MAGL-gátlás hatása a HPA-tengely bazális és stressz-indukált aktivitására CD1 egerekben	48
5.6.2.4. A MAGL-gátlás HPA-tengelyfüggő magatartási hatásai CD1 egerekben	49
5.7. Statisztikai analízis	50
6. EREDMÉNYEK	52
6.1. A FAAH-aktivitás gátlásának szerepe a környezetre adott magatartási reaktivitás és a megküzdési stratégiák szabályozásában	52
6.1.1. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a megemelt keresztpalló tesztben	52
6.1.2. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok megküzdési stratégiáira a farokcsípés tesztben	53
6.1.3. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a kényszerített úszás tesztben	57
6.1.4. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek megküzdési stratégiáira a hátrafordítás tesztben	59
6.2. A MAGL-gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválásra	60
6.2.1. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája averzív környezetben CD1 és C57BL/6J egerekben	60
6.2.2. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája kevésbé averzív környezetben CD1 egerekben	65
6.2.3. A MAGL-gátlás hatása a bazális és stresszindukált HPA-tengely aktivitásra CD1 egerekben	69
6.2.4. A MAGL-gátlás HPA-tengelyfüggő magatartási hatásai CD1 egerekben	71

7.	MEGVITATÁS	75
7.1.	A FAAH-aktivitás gátlásának szerepe a környezetre adott magatartási reaktivitás és a megküzdési stratégiák szabályozásában	75
7.2.	A MAGL-gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválásra	78
7.3.	Összegzés	85
8.	KÖVETKEZTETÉSEK	87
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	89
10.	SUMMARY	90
11.	IRODALOMJEGYZÉK	91
12.	A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE	119
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT	5-hidroxi-triptamin, szerotonin
ACTH	adrenokortikotróp hormon
AEA	N-arachidonoil-etanol-amin, anandamid
ANOVA	varianciaanalízis
CB₁R	1-es típusú kannabinoid receptor
CB₂R	2-es típusú kannabinoid receptor
CB₁ KO	CB ₁ R génkiütött, <i>knockout</i>
CBD	kannabidiol
CBN	kannabinol
CRH	kortikotróp-felszabadulást serkentő hormon, <i>corticotrop releasing hormone</i>
DAG	diacil-glicerol
EPM	megemelt keresztpalló teszt, <i>elevated plus-maze</i>
FAAH	zsírsav-amid-hidroláz, <i>fatty acid amide hydrolase</i>
FST	kényszerített úszás teszt, <i>forced swimming test</i>
GABA	gamma-amino-vajsav, <i>gamma-aminobutyric acid</i>
GPR55	G-proteinhez kötött receptor 55, <i>G protein-coupled receptor 55</i>
i.p.	intraperitoneális beadás
HD	lenézés, <i>head dipping</i>
HPA	hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg, <i>hypothalamus-pituitary-adrenal</i>
MAGL	monoacil-glicerol-lipáz
NAPE	N-acil-foszfatidil-etanol-amin
NArPE	N-arachidonoil-foszfatidil-etanol-amin

OF	nyílt-tér teszt, <i>open-field</i>
PIP₂	foszfo-inozitol-biszfoszfát
PTSD	poszttraumatikus stresszavar, <i>posttraumatic stress disorder</i>
PVN	hypothalamus paraventricularis nucleus
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
SAP	feszült figyelmi testhelyzet, <i>stretched attend posture</i>
SE	standard hiba, <i>standard error</i>
SR141716A	rimonabant
THC	tetrahidrokannabinol
TRPV₁	1-es típusú vanilloid receptor, <i>transient receptor potential vanilloid 1</i>

2. 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.

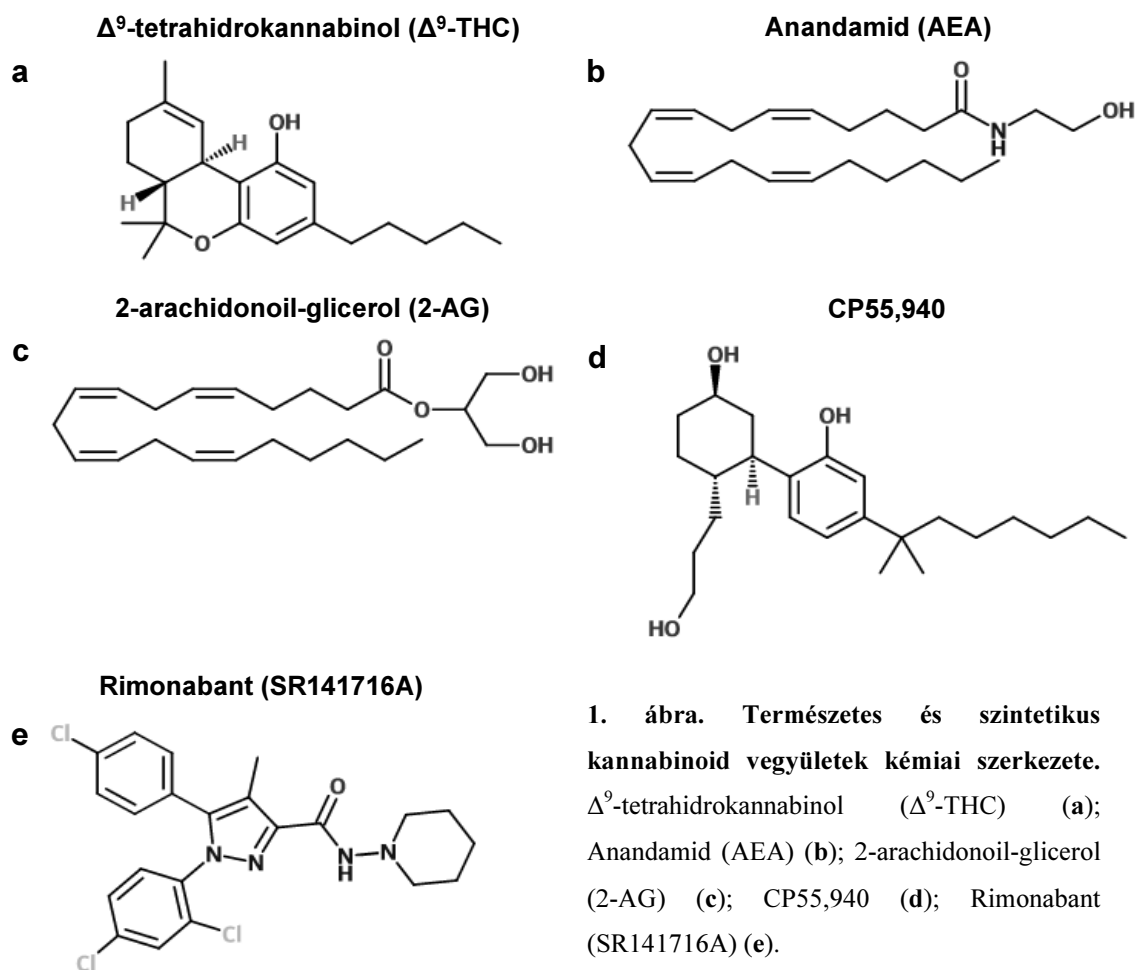
3. IRODALMI HÁTTÉR

3.1. A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer

Az indiai kender (*Cannabis indica*, Lamarck, 1785) a kenderfélék családjába (*Cannabaceae*) tartozó, Közép- és Dél-Ázsiában őshonos növény. Különböző származékait, pl. a marijuanat és hashisht, az Ókor óta ismert pszichoaktív hatásai miatt az asszír, hindu, illetve kínai kultúrákban elterjedten használták élvezeti, rituális, illetve gyógyászati célokra. Európába a Napóleoni háborúk során az Egyiptomból hazatérő francia, illetve az Indiából hazatérő brit katonák hozták be az 1800-as évek elején. Fogyasztásának veszélyeit felismerve, az Amerikai Egyesült Államokban a világ egyik első drogellenes törvényével 1906-ban kriminalizálták birtoklását, fogyasztását és kereskedelmét. Ezt követően fokozatosan a világ egyre több országában illegálissá tették a kannabisz rekreációs célú felhasználását. 1925-ben Hágában a Nemzetközi ópium Konvención betiltották az indiai kender exportját minden olyan országba, amely tiltja fogyasztását, nemzetközi kereskedelmét pedig szigorú szabályokhoz kötve kizárólag tudományos és klinikai célokra tették lehetővé.

A XX. században erőfeszítéseket tettek a kannabisz pszichoaktív hatásaiért felelős kannabinoid vegyületek izolációjára, azonban a marijuana és hashish több mint 60 hasonló jellegű vegyületet tartalmaz, ezért az aktív hatóanyagok elkülönítése csak az évszázad második felében vált lehetővé. A kannabisz tudatmódosító hatásaiért leginkább felelős Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) szerkezetét 1964-re sikerült megfejteni (Gaoni és Mechoulam, 1964), majd 1967-ben szintetikus előállítása is megvalósult (Mechoulam és mtsai., 1967) (1a. ábra). A Δ^9 -THC után második legjelentősebb növényi kannabinoid, a nem-pszichoaktív hatású kannabidiol (CBD) szerkezetét valamivel korábban, 1963-ban tárták fel (Mechoulam és Shvo, 1963). A két fenti kannabinoid mellett, melyek a növényben elsősorban egy nem-pszichoaktív hatású karboxil prekursor formában fordulnak elő, még egy jelentős kannabinoid vegyület található a vadkenderben, a Δ^1 -, illetve Δ^6 -THC metabolitja, a kannabinol (CBN). Ez a vegyület elsősorban a THC levegő és fény hatására bekövetkező bomlásakor jön létre, szerkezete 1975-ben vált ismertté (McCallum és mtsai., 1975). A különböző kenderfajok, alfajok, változatok pszichoaktív hatóanyagtartalma jelentősen eltérhet. A

Cannabis sativa Δ^9 -THC tartalma jóval 1% alatt van, míg a *Cannabis indicáé* 5% fölött, egyes tenyésztett fajták azonban 15%-nál több Δ^9 -THC-t is tartalmazhatnak.



1. ábra. Természetes és szintetikus kannabinoid vegyületek kémiai szerkezete. Δ^9 -tetrahydrokannabinol (Δ^9 -THC) (a); Anandamid (AEA) (b); 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) (c); CP55,940 (d); Rimonabant (SR141716A) (e).

A pszichoaktív növényi kannabinoidvegyületek szerkezetének megismerésével a kannabinoidkutatások az 1980-90-es években egyre inkább az agyi kannabinoidhatások helyszíneinek, illetve hatásmódjának felderítésére összpontosítottak. 1986-ban védődött fel a specifikus kannabinoid receptorok létének lehetősége, amikor bizonyítást nyert, hogy kannabinoidkezelés hatására egy G-proteinekhez kötött mechanizmuson keresztül gátlódik az adenilát-cikláz aktivitása (Howlett és mtsai., 1986). Röviddel ezután bizonyossá vált a kannabinoid receptorok léte az agyban (Devane és mtsai., 1988), majd az 1990-es évek elején leírták az eddig ismert két receptor szerkezetét. A központi idegrendszerből izolálták az 1-es, illetve a lépből a 2-es típusú kannabinoid receptort (CB_1R , illetve CB_2R) (Matsuda és mtsai., 1990; Munro és mtsai., 1993). A két receptor aminosavsorredje 48%-ban megegyezik. Mindkettő a 7 transzmembrán fehérjét

tartalmazó, G-proteinhez kötött receptorok szupercsaládjába tartozik, a G-proteineken keresztül adenilát-cikláshoz, illetve mitogén-aktivált protein-kinázhoz kötődnek. A CB₁R az agyban fordul elő leggyakrabban, elsősorban az amygdalában, cerebellumban, basalis ganglionokban, hippocampusban, hypothalamicus és thalamicus területeken, illetve a substantia nigrában. Expresszálódik emellett az érző, illetve motoros kéregben is, az agytörzsben azonban nem található meg (Herkenham és mtsai., 1990; Howlett és mtsai., 2002). A receptor eloszlása az agyban a korról változik, fiatalabb korban nagyobb mértékben expresszálódik a fehérállományban, mint később (Romero és mtsai., 1997). A CB₁R-t elsősorban a GABAerg és glutamáterg interneuronok expresszálják az agyban (Auclair és mtsai., 2000; Hajos és mtsai., 2001; Katona és mtsai., 1999; Marsicano és Lutz, 1999). A GABAerg interneuronok közül egész pontosan a kolecisztoxinint expresszáló idegsejtek felszínén találhatóak meg a receptorok a basolateralis amygdalában (Katona és mtsai., 2001; Marsicano és Lutz, 1999), hippocampusban (Katona és mtsai., 1999; Marsicano és Lutz, 1999), illetve a neocortexben (Marsicano és Lutz, 1999). A GABAerg és glutamáterg interneuronok mellett a dopaminerg, noradrenerg és szerotonerg neuronok is expresszálják a receptort (Lau és Schloss, 2008; Vizi és mtsai., 2001). A szem, elsősorban a retina is expresszálja a receptort, ezt több állatfaj után (Porcella és mtsai., 1998; Straiker és mtsai., 1999a) emberben is kimutatták (Straiker és mtsai., 1999b). Az idegrendszer mellett egyes neuroendokrin szervekben is kimutatható a CB₁R expresziója, elsősorban a hypophysisben (Herkenham és mtsai., 1991), illetve a mellékvesekéregben (Galiegue és mtsai., 1995). A receptor számos más perifériás szövetben is expresszálódik. Megtalálható a herében (Gerard és mtsai., 1991), ahol elsősorban a Leydig-sejtek expresszálják (Wenger és mtsai., 2001), a Sertoli-sejtek nem (Maccarrone és mtsai., 2003). Emellett bizonyos, hogy a spermiumok is expresszálják a receptort (Rossato és mtsai., 2005). Kimutatható a CB₁R egyes női reprodukciós szövetekben is, az ovariumban (Galiegue és mtsai., 1995), ahol elsősorban a granulosa sejtek expresszálják (Das és mtsai., 1995), illetve a myometriumban (Dennedy és mtsai., 2004). A CB₂R elsősorban a periférián fordul elő, nagy mennyiségben expresszálják az immunrendszerben, elsősorban a lépben, mandulákban, illetve a thymusban található monocyták, macrophagok, B-, illetve T-lymphocyták (Galiegue és mtsai., 1995). Ugyan a CB₂R-t először a lépből mutatták ki, és sokáig elterjedt nézet volt, hogy ez a receptor

csak az immunrendszerben fordul elő, bebizonyosodott, hogy kis mennyiségben a központi idegrendszerben is megtalálható (Ashton és mtsai., 2006; Van Sickle és mtsai., 2005), elsősorban a microglia sejteken (Nunez és mtsai., 2004). Az immun- és idegrendszeren kívül a gastrointestinalis rendszerben is expresszálódik a CB₂R (Pertwee, 2001). A már említett phytokannabinoid vegyületek közül a Δ^9 -THC erősen kötődik a CB₁R-hoz, illetve valamivel gyengébben a CB₂R-hoz (Lutz, 2002). A CBD erős antagonistája, míg a CBN gyenge agonistája a CB₁R-nak (Mechoulam és mtsai., 2007; Petit et al., 1998). Ugyan egyelőre csak a fent tárgyalt két kannabinoid receptor ismert, egyes bizonyítékok más, eddig ismeretlen kannabinoid receptorok léteire is engednek következtetni. Az 1990-es évek végén írták le a G-proteinhez kötött receptor 55 (GPR55) receptor génjét (Sawzdargo és mtsai., 1999), mely receptor szerkezetileg a CB₁, illetve CB₂R-hoz hasonlít (Petit et al., 2006). Ugyan a receptor ligandprofilja valamelyest eltér a két ismert receptortípustól, azt egyes szintetikus (Petit et al., 2006; Ryberg és mtsai., 2007), illetve endogén kannabinoidok is aktiválják (Sharir és mtsai., 2012). Az eddig ismeretlen szerkezetű kannabinoid receptorok számos élettani folyamat szabályozásában részt vesznek, például egyes, a mesentericus artériák endothel rétegén található, nem-CB₁, nem-CB₂ receptor jellegű, de CB₁ és CB₂ receptor antagonistákra érzékeny receptorok szabályozhatják a perifériás artériák vasodilatációját (Jari et al., 1999; Wagner és mtsai., 1999), de a szopás szabályozásában is szerepet játszhatnak újszülöttekben (Fride et al., 2003). Az élettani folyamatok mellett a nem-CB₁ típusú, kannabinoid-érzékeny receptorok szerepet játszhatnak a magatartás, például a szorongás szabályozásában is (Haller et al., 2002).

Az endogén kannabinoid receptorok leírása után megkezdődött a feltételezett endogén kannabinoid ligandok felkutatása is, melyeket az 1990-es évek elején sikerült azonosítani. Előbb az arachidonoil-etanol-amint írták le, mely a szanszkrít *ananda*, azaz „legfelsőbb öröm” szó után az anandamid (AEA) nevet kapta (Devane et al., 1992b). Röviddel ezután felfedeztek egy újabb endokannabinoid ligandot, a 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG) is (Mechoulam et al., 1995). Ugyan a két endokannabinoid vegyület kémiai szerkezete jelentősen eltér a fő növényi kannabinoid Δ^9 -THC-étől (1b-c. ábra), farmakológiai jellemzőik hasonlóak. Mindkettő agonistája a CB₁R-nak, habár az AEA csak parciális, a 2-AG teljes agonista (Mackie et al.,

1993; Sugiura és mtsai., 1999). Affinitását tekintve az AEA körülbelül három nagyságrenddel erősebben kötődik a CB₁R-hoz, mint a 2-AG (Devane és mtsai., 1992a; Sugiura és mtsai., 1999). A kisebb affinitás ellenére egyes nézetek szerint a 2-AG CB₁R-mediált neurobiológiai folyamatokban betöltött szerepe nagyobb az AEA-énál, ezt sugallhatja az a megfigyelés is, hogy nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben fordul elő az agyban, mint az AEA (Sugiura és Waku, 2000). A két ismert endokannabinoid mellett feltételezhetően egy harmadik vegyület, a 2-arachidonoil-gliceril-éter, más néven a noladin-éter is hat az endokannabinoid rendszeren keresztül, az ugyanis nagy affinitással kötődik a CB₁R-hoz (Hanus és mtsai., 2001).

Az endokannabinoidok metabolizmusának jellegzetessége, hogy más neurotranszmitterekkel szemben, az idegsejtekben nem vezikulákban tárolódnak a szintetizált molekulák, hanem csak akkor kerül sor szintézisükre, amikor a neuron le is adja őket az endokannabinoid jelátvitel lezajlásakor. Ezt a szintézismódot hívjuk ún. *on-demand* („szükség szerinti”) szintézisnek. Alapvetően az endokannabinoidok különböző membránlipidekből szintetizálódnak, specifikus szintetizáló enzimgarnitúra segítségével. Az AEA prekuzora egy sejtmembránban található arachidonsav származék, az N-arachidonoil-foszfátidil-etanol-amin (NArPE), melyből több alternatív úton keletkezhet AEA. Az egyik út szerint a prekuzorból egy N-acil-transzferáz enzim katalizációja mellett N-acil-foszfátidil-etanol-amin (NAPE) keletkezik, melyből egy NAPE-specifikus foszfolipáz D enzim hozza létre a végterméket (Okamoto és mtsai., 2004). A NArPE-ből emellett egy foszfolipáz A₂ enzim katalizációját igénybe vevő folyamat során 2-lizo-NAPE is keletkezhet, melyből lizofoszfolipáz alakít ki AEA-ot (Sun és mtsai., 2004). A harmadik út szerint a NArPE-ből foszfolipáz C alakít ki foszfo-AEA-ot, melyből a PTPN22 protein-tirozin-foszfátáz állít elő AEA-ot (Liu és mtsai., 2006). Végül egy negyedik metabolikus úton keresztül a NArPE prekuzorból az a/b hidroláz 4 állít elő glicero-foszfo-AEA-ot, melyből foszfodiészteráz alakít ki AEA-ot (Simon és Cravatt, 2006). Felhasználása után az AEA hidrolízisét a zsírsav-amid-hidroláz (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*) végzi, a végtermék arachidonsav, illetve etanol-amin (Cravatt és mtsai., 1996). Fontos megjegyezni, hogy a FAAH nem AEA-szelektív enzim, számos nem CB₁R-on ható hosszú láncú zsírsav-amid (pl. N-acil-aminosavak, illetve N-acil-aurinok) hidrolízisét is ez az enzim végzi (Saghatelian és

mtsai., 2004). Ennek többek között az endokannabinoid jelátvitel FAAH aktivitáson keresztül történő farmakológiai manipulációi kapcsán van jelentősége.

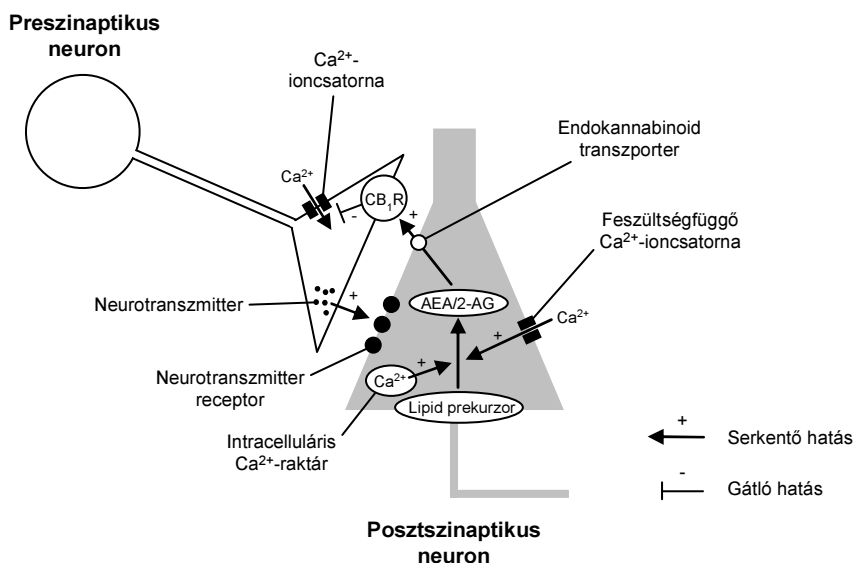
A 2-AG szintézise két úton lehetséges. Az egyik úton prekuzorként a foszfoinozitol-biszfoszfát (PIP₂) szolgál, ebből a vegyületből egy PIP₂-szelektív foszfolipáz C állít elő diacil-glicerolt (DAG), melyből a DAG-lipáz a, illetve b állítja elő a 2-AG-t (Bisogno és mtsai., 2003; Stella és mtsai., 1997). Foszfatisav prekuzorból is létrejöhet 2-AG, ebben az esetben a prekuzorból egy foszfatisav-szelektív foszfohidroláz állít elő DAG-t, melyből az előző úthoz hasonlóan DAG-lipáz a, illetve b alakítja ki a végterméket (Bisogno és mtsai., 2003; Bisogno és mtsai., 1999). A 2-AG-t a monoacil-glicerol-lipáz (MAGL) bontja le arachidonsavra, illetve glicerinre (Saghatelian és mtsai., 2004).

Az endogén kannabinoid ligandok szerkezetének felkutatásával párhuzamosan megkezdődött a szintetikus kannabinoid receptor ligandok kifejlesztése is. Az egyik legelső CB₁R agonista szintetikus vegyület a CP55,940 volt, mely nagy affinitással kötődik a CB₁R-hoz, illetve a CB₂R-nak is agonistája (Rinaldi-Carmona és mtsai., 1996) (1d. ábra). Hasonló agonista vegyület még a WIN55,212-2 (Compton és mtsai., 1992), mely körülbelül olyan affinitással kötődik a CB₁R-hoz, mint a Δ⁹-THC (Kuster és mtsai., 1993; Rinaldi-Carmona és mtsai., 1996). Nagy affinitású CB₁R agonista a HU-210 (Mechoulam és mtsai., 1990), mely körülbelül két nagyságrenddel erősebben kötődik a receptorhoz a THC-nál (Devane és mtsai., 1992a). A CB₂R aktiválására jóval kevesebb szintetikus vegyület áll rendelkezésünkre, mint a CB₁R-ére, az egyik első ilyen CB₂R-szelektív vegyület a HU-308 volt (Hanus és mtsai., 1999), illetve a már említett WIN55,212-2 is agonistája a CB₂R-nak, ehhez a receptortípushoz erősebben kötődik, mint a CB₁R-hoz (Felder és mtsai., 1995; Song és mtsai., 1999). A kannabinoid receptor agonisták mellett számos antagonistát is fejlesztettek. Az egyik legjelentősebb, és tudományos kutatásban az egyik legelterjedtebben használt ilyen vegyület a rimonabant (SR141716A) CB₁R antagonist (Rinaldi-Carmona és mtsai., 1996) (1e. ábra). A vegyület kiemelkedően nagy affinitással kötődik a receptorhoz (Rinaldi-Carmona és mtsai., 1996), illetve feltételezhetően egy eddig ismeretlen kannabinoid receptorhoz is kötődhet (Haller és mtsai., 2002). A vegyület emellett nem csak antagonistája a CB₁R-nak, hanem inverz agonistája is (Landsman és mtsai., 1997). A rimonabantot a tudományos célok mellett klinikai célokra is alkalmazták, 2006-tól vált

elérhetővé a kóros obezitás terápiájára, azonban 2008-ban a felmerülő pszichiátriai mellékhatásai miatt (szorongás, depresszió) kivonták a forgalomból (Moreira és Crippa, 2009). A közelmúltban felmerült egy kérdés, miszerint a CB₁R, illetve az 5HTTLPR szerotonin transzporter gén egyes polimorfizmusai fogékonyabbá teszik a pácienseket a rimonabant pszichiátriai mellékhatásaira, így egyes páciensek terápiájába újra be lehetne vonni a rimonabantot, a hajlamosító génpolimorfizmusok előzetes szűrése után (Lazary és mtsai., 2011). A rimonabant mellett az AM251 nevű CB₁R antagonistá használata is elterjedt a tudományos kutatásokban (Gatley és mtsai., 1996). Ennek a vegyületnek a kémiai szerkezete a rimonabantra hasonlít, azonban farmakológiai tulajdonságai eltérőek, mind szelektivitása, mind affinitása felülmúlja a rimonabantét (Lan és mtsai., 1999). A receptor agonisták, illetve antagonisták használata mellett az elmúlt időkben egyre inkább teret nyert a kannabinoid metabolizmus gátlása az endokannabinoid rendszer manipulálásának módszerei között (Gobbi és mtsai., 2005; Kathuria és mtsai., 2003; Piomelli és mtsai., 2006). Ezzel a módszerrel az endokannabinoid jelátvitel indirekt fokozható, mégpedig – az endokannabinoid ligandok korábban ismertetett, ún. *on-demand* szintézise révén – csakis azokon az agyterületeken, ahol az adott pillanatban endokannabinoid jelátvitel zajlik. Így specifikusabban vizsgálhatóak egyes endokannabinoid-mechanizmusok, ugyanis az épp zajló kannabinoid jelátvitelt fokozzuk, nem pedig globálisan idézzük elő az agyban, ahol csak a kannabinoid receptor expresszálódik. Az AEA jelátvitel indirekt fokozható a FAAH enzim gátlásával, erre a lelegeleterjedtebben használt metabolizmusgátló az URB597 (Kathuria és mtsai., 2003). Mód van emellett a 2-AG-t bontó MAGL gátlására is a JZL184 nevű vegyület használatával (Long és mtsai., 2009a). Hasonló okokból specifikus endokannabinoid-manipulációs módszer az endokannabinoid visszavétel gátlása is, melyre az egyik lelegeleterjedtebben használt vegyület a paracetamol egy aktív metabolitja, az N-arachidonoil-aminofenol, azaz az AM404. A vegyület hatásainak specificitásával kapcsolatban azonban több kérdés is felmerült, ugyanis az AM404 agonistája az 1-es típusú vanilloid receptornak (TRPV₁) (Hogestatt és mtsai., 2005), illetve feltételezhetően FAAH inhibitor hatása is van, egy tanulmány egyenesen a kannabinoid transzporterek létét is megkérdőjelezi és az AM404 hatásait a FAAH-aktivitás gátlásának tulajdonítják (Glaser és mtsai., 2003).

Miután a 2000-es évekig leírták az endokannabinoid rendszer különböző komponenseit, a figyelem egyre inkább a rendszer működésére, funkciójára irányult. Révén a központi idegrendszerben megtalálható kannabinoid receptorokat elsősorban interneuronok expresszálják, felmerült, hogy a rendszer a neuronális hálózatok aktivitásának szabályozásában fontos szerepet tölthet be. Az endokannabinoid rendszer komponenseinek sejtszintű előfordulását vizsgálva megfigyelték, hogy a CB₁R, illetve a 2-AG lebontásához szükséges MAGL túlnyomórészt preszinaptikusan (Egertova és Elphick, 2000; Gulyas és mtsai., 2004; Herkenham és mtsai., 1990; Matsuda és mtsai., 1990; Tsou és mtsai., 1998), míg a ligand szintéziséhez szükséges DAG-lipáz posztszinaptikusan fordul elő (Yoshida és mtsai., 2011). Ez alapján felvetődött a kérdés, miszerint az endokannabinoid, különösképpen a 2-AG jelátvitel retrográd irányban zajlik le, azaz a posztszinaptikus neurontól a preszinaptikus neuron felé irányulva. Röviddel az ezredfordulót követően be is bizonyosodott, hogy a neuronok aktivitásuktól függően egy retrográd endokannabinoid szignállal befolyásolják szinaptikus bemenetüket mind serkentő (Kreitzer és Regehr, 2001), mind gátló szinapszisok esetében (Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001). A retrográd jelátvitelt a depolarizálódott posztszinaptikus neuronban létrejövő intracelluláris Ca²⁺-ion koncentráció növekedése váltja ki, melyet feszültségfüggő Ca²⁺-ioncsatornák, illetve intracelluláris Ca²⁺-raktárak nyílása alakít ki. Ennek a koncentrációnövekedésnek következtében indul be az endokannabinoidok Ca²⁺-függő bioszintézise, majd leadása. A szinaptikus térbe ürült endokannabinoidok a preszinaptikus neuronon kannabinoid receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásaikat, melyek befolyásolják a preszinaptikus sejt tüzelését. Egyrészt közvetlenül gátolják az N- és P/Q-típusú Ca²⁺-ioncsatornákat, így csökkentve a Ca²⁺-ionok beáramlását a neuronba (Kreitzer és Regehr, 2001; Mackie és Hille, 1992; Twitchell és mtsai., 1997). Másrészt a kannabinoid receptor aktiváció egy G-proteinekhez kötött folyamaton keresztül is blokkolja az N-típusú Ca²⁺-ioncsatornákat (Lenz és mtsai., 1998), illetve nyitja a G-proteinhez kapcsolt befelé egyenirányító K⁺-csatornákat (Guo és Ikeda, 2004; Mackie és mtsai., 1995). A kannabinoid receptoron kifejtett hatása után az AEA és a 2-AG egy közös specifikus kannabinoid transzporterrel a preszinaptikus neuronba jut (Beltramo és Piomelli, 2000; Bisogno és mtsai., 2001). Egyes elméletek szerint, mivel a sejtbe bejutott endokannabinoidokat rendkívül gyorsan lebontja a sejt, feltételezhető, hogy a

kannabinoid hidrolízis függvényében változhat a kannabinoid transzport mértéke is. Ezt az elméletet kísérletesen bizonyították is (Day és mtsai., 2001), bár több más tanulmány ezt nem tudta reprodukálni (Beltramo és mtsai., 1997a; Beltramo és mtsai., 1997b; Giuffrida és mtsai., 2001), így a kannabinoid hidrolízis és transzport kapcsolata egyelőre még nem mondható tisztázottnak. A retrográd endokannabinoid jelátviteli működését a 2. ábra mutatja be.



2. ábra. A retrográd endokannabinoid jelátviteli út. A posztszinaptikus neuron depolarizációja során nyílnak a feszültségfüggő Ca^{2+} -ioncsatornák, illetve intracelluláris Ca^{2+} -raktárak, mely hatására megnő az intracelluláris Ca^{2+} -ionkoncentráció. Ca^{2+} -ionkoncentráció növekedése beindítja a plazmamembránban található lipid prekursorokból az AEA, illetve 2-AG szintézise. Az AEA és 2-AG egy transzporterrel keresztül retrográd úton a preszinaptikus sejt felé vándorol, majd CB_1R -hoz kötődve gátolja a neuron Ca^{2+} -ioncsatornáinak nyílását, így a preszinaptikus neuron tüzelése megszűnik.

3.2. „Klasszikus” kannabinoid magatartási és élettani hatások

A kannabiszfogyasztás különböző élettani és hangulati, magatartási hatásait már az ókor óta ismeri az emberiség, és a hatásokat gyógyászati és élvezeti célokra többé-kevésbé alkalmazza is. A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer XX. században való folyamatos megismerésével együtt írták le a Δ^9 -THC általános farmakológiai profilját is. A Δ^9 -THC úgynevezett „klasszikus” hatásai közé tartozik a spontán aktivitás csökkenése (csökkent lokomotoros aktivitás), a fájdalomcsillapítás, illetve a hypothermia, mely hatásokat a Δ^9 -THC-n kívül egyes szintetikus

kannabinoidokkal is elő lehet idézni (Martin és mtsai., 1991). A hatások alapvetően CB₁R-függő módon jelennek meg, ugyanis receptorantagonistával kivédhetőek (Compton és mtsai., 1996). Feltehetőleg ilyen jellegű hatásokat nem minden esetben okoz a CB₁R endogén aktiválódása, ugyanis FAAH-gátlás által indukált fokozott AEA jelátvitellel „klasszikus” Δ⁹-THC hatások nem válthatók ki (Lichtman és mtsai., 2004). Ezzel szemben a MAGL-aktivitás gátlásával serkentett 2-AG jelátvitel kivált egyes „klasszikus” kannabinoid hatásokat (Long és mtsai., 2009a), azonban egyértelműen a fokozott 2-AG jelátvitel sem felelős az összes ilyen jellegű hatásért, például a lokomotoros aktivitásra és katelepszia-ra kifejtett hatások részben ellentmondóak, akár még egy kutatócsoport munkáin belül is: Long és munkatársai egy munkájukban kateleptikus hatást tapasztaltak MAGL-inhibíció után (Long és mtsai., 2009a), azonban egy későbbi publikációjukban csupán lokomotoros aktivitásbeli csökkenés volt látható hasonló kezelés után (Long és mtsai., 2009b). Egy harmadik munkájukban pedig csak a FAAH és a MAGL egyidejű gátlásával tudtak kateleptikus hatást előidézni (Long és mtsai., 2009c). Emellett a MAGL-gátlás lokomotoros hatásait kérdéssé teszi az a tény is, hogy egyelőre a fenti hatásokat más kutatócsoportok nem tudták reprodukálni (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Schlosburg és mtsai., 2009; Sciolino és mtsai., 2011). A „klasszikus” hatásokon kívül az endokannabinoid jelátvitel számos élettani folyamat szabályozásában vesz részt, melyek közül az egyik legjelentősebb talán az étvágy szabályozásában betöltött szerepe (Williams és Kirkham, 1999; Williams és mtsai., 1998), mely miatt a rendszer manipulációja terápiás potenciált is hordoz magában. Emellett különböző neuroendokrin hatásai is vannak az endokannabinoid jelátvitelnek, melyek közül talán az egyik legfontosabb a stresszválasz szabályozásában betöltött funkció (lásd 3.3).

3.3. Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a stresszreaktivitás szabályozásában

Mivel a CB₁R a neuroendokrin stresszválasz kialakításáért felelős hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengely (HPA, *hypothalamus-pituitary-adrenal*) több pontján is expresszálódik (Herkenham és mtsai., 1991), felvetődött a

kérdés, befolyásolhatja-e az endokannabinoid rendszer a stressztengely működését, a stresszreaktivitást.

CB₁R gént nem expresszáló ún. génkiütött (CB₁ KO, *knockout*) egereket vizsgálva több tanulmány is a HPA-tengely aktivitásának megváltozásáról számol be. A CB₁ KO állatok a vad típusú egerekhez képest eltérő cirkadián kortikoszteron-oszcillációt mutatnak, illetve hypothalamusuk paraventricularis nucleusában (PVN) magasabb a kortikotróp-fel szabadulást serkentő hormon (CRH, *corticotrop releasing hormone*) mRNS szintje (Cota és mtsai., 2007). Emellett a CB₁ KO egerek bazális plazma adrenokortikotróp hormon- (ACTH, *adrenocorticotrop hormone*) és kortikoszteronszintje is magasabbnak bizonyul a vad típusú állatokénál (Barna és mtsai., 2004; Cota és mtsai., 2007; Haller és mtsai., 2004a). A CB₁R farmakológiai gátlása is fokozza a stressztengely működését, Patel és munkatársai tanulmányában rimonabantkezeléssel hasonló mértékű kortikoszteronszint emelkedés volt kiváltható, mint bezártságstresszel; a hatás CB₁R agonistával (CP55,940), kannabinoid visszavételgátlással (AM404), illetve FAAH-inhibícióval (URB597) tompítható volt (Patel és Hillard, 2006).

Az endokannabinoid jelátvitel farmakológiai serkentése feltételezhetően bifázikus hatást gyakorol a HPA-tengely működésére. A CB₁R agonistái, akár növényi (THC, CBD, CBN), endo- (AEA) vagy szintetikus kannabinoidokról (CP55,940, HU210, illetve WIN55,212-2) legyen szó, akutan növelik a kortikoszteron alapszintet (Barna és mtsai., 2009; Johnson és mtsai., 1978; Martin-Calderon és mtsai., 1998; Romero és mtsai., 2002; Weidenfeld és mtsai., 1994; Zuardi és mtsai., 1984). A FAAH farmakológiai gátlásával fokozott AEA jelátvitel is hasonló hatást okozott (Saber-Tehrani és mtsai., 2010), azonban ezt a hatást más tanulmányok nem erősítették meg (Hill és mtsai., 2010; Kerr és mtsai., 2012). Emellett az is kérdéses, hogy az AEA a CB₁R-on keresztül befolyásolja-e a HPA-tengely aktivitását (Wenger és mtsai., 2003). A HPA-tengely bazális aktivitására kifejtett hatással szemben az eddigi tapasztalatok azt sugallják, a CB₁R farmakológiai aktiválása, illetve a FAAH-inhibíció által fokozott AEA jelátvitel tompítja az endokrin stresszreaktivitást akut stresszben (Ganon-Elazar és Akirav, 2009; Hill és mtsai., 2010; Hill és mtsai., 2009; Patel és mtsai., 2004). A 2-AG jelátvitelnek a HPA-tengely működésére kifejtett hatásairól saját ezirányú munkánk előtt nem állt rendelkezésre információ.

A genetikai és farmakológiai kannabinoid-manipulációk stresszreaktivitásra gyakorolt hatásának megfigyelései után Di és munkatársai részletesen leírták a mechanizmust, amelyen keresztül – legalábbis részben – az endokannabinoid jelátvitel részt vesz a HPA-tengely működésének szabályozásában (Di és mtsai., 2003; Di és mtsai., 2005). *In vitro* megfigyeléseik szerint, a kortikoszteron a PVN-ben egy G-proteinhez kapcsolt membránreceptorhoz kötődik a CRH-t termelő neuronokon, amelyek a kötődés hatására endokannabinoidokat szintetizálnak és adnak le. Az endokannabinoid molekulák retrográd irányban a CRH neuronokat beidegző glutamaterg sejtek CB₁R-aihoz kötődve tompítják a CRH neuronokat serkentő glutamaterg szinaptikus bemeneteket, így csökkentve a CRH-termelődést. Látható tehát, hogy a kortikoszteron egy gyors, nem-genomiális mechanizmuson keresztül, retrográd endokannabinoid jelátvitel segítségével csökkenti a CRH-szekrúciót. A CB₁R-ok hypophysealis expressziója (Herkenham és mtsai., 1991) kapcsán felmerült, hogy az endokannabinoid jelátvitel akár hypophysealis szinten is befolyásolhatja a HPA-tengely működését, azonban Barna és munkatársai ezt a feltételezést megcáfolták, ugyanis egy *in vitro* infúziós rendszerben hypophysis preparátumok CRH-indukált ACTH-kibocsátását vizsgálva, azt sem a szintetikus kortikoszteron analóg dexametazon, sem a CB₁R agonista WIN55,212-2 nem befolyásolta (Barna és mtsai., 2004).

Amellett, hogy az endokannabinoid jelátvitel befolyásolja a HPA-tengely alapszintű, illetve stresszindukált aktivitását, több tanulmány közvetlen kapcsolatot is leírt a kannabinoid manipulációk által megváltoztatott stresszreaktivitás és a magatartás között. A CB₁ KO egerek például megemelkedett kortikoszteronszint mellett szorongó fenotípust mutattak több tanulmányban (Barna és mtsai., 2004; Cota és mtsai., 2007; Haller és mtsai., 2004a). Feltételezhetően az endokannabinoid jelátvitel a HPA-tengely aktivitását, illetve a magatartást befolyásoló hatása alacsonyabb rendű gerinces taxonokban is jelen van. Coddington és munkatársai tanulmánya szerint az érdesbőrű gőtékből (*Taricha granulosa*), egy Észak-Amerikában honos szalamandrafélében (*Salamandridae*), melyben jól karakterizált a CB₁R-ok agyi expressziós mintázata (Hollis és mtsai., 2006), a hímek párzási viselkedése, illetve a viselkedésforma szabályozásában részt vevő agyterületek aktivitása akut stressz, illetve kortikoszteronkezelés hatására gátlódik, mely hatás CB₁R antagonistával kivédhető (Coddington és

mtsai., 2007). Feltételezhető tehát, hogy az endokannabinoid rendszer részt vesz a szexuális viselkedés HPA-tengely általi kontrolljában.

3.4. Az endokannabinoid jelátvitel hatásai az emocionális magatartásra

A különböző kannabiszszármazékok humán rekreációs célú felhasználásából eredő évezredes tapasztalatok arra engedtek következtetni, hogy az endokannabinoid jelátvitel fontos eleme az emocionális magatartás szabályozásának. Ezt a feltételezést az a tény is erősíti, hogy a kannabinoid receptorok nagy mennyiségben expresszálódnak az ilyen magatartásformákat és állapotokat szabályozó agyterületeken (Herkenham és mtsai., 1990), illetve hogy az endokannabinoid jelátvitel a fent ismertetett módon bizonyítottan befolyásolja az emocionális magatartással is összefüggő HPA-tengely működését (lásd 3.3.).

A 2000-es évek elején számos tanulmányban vizsgálták CB₁ KO egerek magatartási profilját. A vizsgálatok alapján általánosan elmondható, hogy ezek az állatok fokozott szorongást mutattak a legtöbb szorongástesztben, mint pl. a megemelt keresztpalló (Haller és mtsai., 2002; Haller és mtsai., 2004a; Haller és mtsai., 2004b; Hill és mtsai., 2011; Mikics és mtsai., 2009; Uriguen és mtsai., 2004), a nyílt-tér (Maccarrone és mtsai., 2002), illetve a fény-sötét doboz tesztben (Maccarrone és mtsai., 2002; Martin és mtsai., 2002). Uriguen és munkatársai kimutatták továbbá, hogy egyes szorongásoldó vegyületek, mint a benzodiazepin bromazepam vagy az 5-HT_{1A} szerotonin receptor parciális agonista buspiron kisebb hatékonysággal működnek CB₁ KO állatokban (Uriguen és mtsai., 2004). Erősebb emellett ilyen állatokban a kondicionált félelem reakció is (Jacob és mtsai., 2012), illetve a CB₁ KO egerek egy depresszióhoz hasonló fenotípust is mutatnak (Fride és mtsai., 2005). A CB_{1R} gén kiütésének hatására megváltozik a szociális magatartás is, az agresszió mértéke nő, míg a szociális interakció csökken (Haller és mtsai., 2004a). Hill és munkatársai feltételezései alapján a receptor génjének kiütése során a krónikus stressz állapotához hasonló magatartási és neurobiológiai változások jönnek létre ezekben az egerekben (Hill és mtsai., 2011).

A génkiütött állatoknál tapasztaltakkal összhangban, ha receptor antagonistákkal (pl. rimonabant vagy AM251) csökkentjük az endokannabinoid aktivitást, anxiogén hatás tapasztalható (Arevalo és mtsai., 2001; Haller és mtsai., 2004b; Kupferschmidt és mtsai., 2012; Moise és mtsai., 2008; Navarro és mtsai., 1997; Patel és Hillard, 2006; Sink és mtsai., 2010). A szorongáskeltő hatás nem csupán az antagonisták szisztémás adagolásakor jelentkezett, hanem a bazolaterális amygdalába való lokális injektálásukkor is (Dono és Currie, 2012). Kondicionált félelem esetében a CB₁R antagonisták csökkentik az extinkció mértékét (Marsicano és mtsai., 2002b; Niyuhire és mtsai., 2007). A CB₁R-ok farmakológiai gátlása depressziós állapotot idéz elő több modellben is (pl. kényszerített úszás teszt, cukorpreferencia teszt), akár akut (Steiner és mtsai., 2008), akár krónikus kezelésnek vetették alá az alanyokat (Beyer és mtsai., 2010). A CB₁R antagonizmus szorongásfokozó, illetve depresszív hatásait bizonyítják a rimonabant klinikai alkalmazása során tapasztalt pszichiátriai mellékhatások is, melyek miatt az étvágycsökkentő gyógyszert 2008-ban kivonták a forgalomból (Moreira és Crippa, 2009).

A CB₁R genetikai, illetve farmakológiai gátlásakor tapasztaltakkal szemben, ha agonistákkal aktiváljuk az agyban a CB₁R-okat, alapvetően anxiolitikus hatás alakul ki. Ez phytokannabinoidokkal (Braidá és mtsai., 2007), illetve szintetikus kannabinoid ligandokkal való kezelése esetén egyaránt tapasztalható volt (Haller és mtsai., 2004b; Hill és Gorzalka, 2004; Patel és Hillard, 2006). A hatások a CB₁R-ok antagonistákkal való gátlásával egyes esetekben kivédhetőek (Haller és mtsai., 2004b). Kondicionált félelem modellekben növényi, endogén és szintetikus kannabinoidok is elősegítik a félelmi memória extinkcióját, illetve csökkentik magát a kondicionált félelem-reakciót (Bitencourt és mtsai., 2008; Pamplona és mtsai., 2008; Resstel és mtsai., 2008). Ez a jelenség laboratóriumi rágcsálókön kívül humán modellben is kimutatható volt (Rabinak és mtsai., 2013). Depressziós modellekben a phyto- és szintetikus kannabinoidok is antidepresszánsként hatnak (Bambico és mtsai., 2012; El-Alfy és mtsai., 2010; Hill és Gorzalka, 2005), a hatások szisztémás kezelés mellett lokális, a hippocampusba adott injekció esetén is jelentkeznek (McLaughlin és mtsai., 2007), illetve CB₁R-függő módon alakultak ki, ugyanis receptor antagonistával kivédhetőnek bizonyulnak (Hill és Gorzalka, 2005).

Az endokannabinoid-visszavétel, illetve metabolizmusgátlás emocionális magatartásra kifejtett hatásairól egyelőre kevesebb adat áll rendelkezésre, mint az endokannabinoid receptorok manipulációinak hasonló hatásairól. Elmondható, hogy az endokannabinoid transzport gátlása szorongásoldó hatással bír (Bortolato és mtsai., 2006; Naderi és mtsai., 2008), serkenti a félelmi memória extinkcióját (Bitencourt és mtsai., 2008; Chhatwal és mtsai., 2005; Lin és mtsai., 2006; Pamplona és mtsai., 2008), illetve csökkenti a kondicionált félelmi választ is egy feltételezhetően a medialis prefrontális kéregben lezajló mechanizmuson keresztül (Resstel és mtsai., 2008). Emellett az endokannabinoid transzport gátlása antidepresszáns hatásának is bizonyult (Adamczyk és mtsai., 2008).

Az AEA-ot bontó FAAH enzim génjét nem expresszáló, fokozott AEA jelátvitelű egerek egy kevésbé szorongó fenotípust mutatnak (Cassano és mtsai., 2011), míg félelmi memóriájuk extinkciója gyorsabb vad típusú fajtársaikénál (Varvel és mtsai., 2007). Ehhez hasonlóan a FAAH enzim farmakológiai gátlása is több modellben szorongásoldó hatású, pl. a megemelt keresztpalló (Bambico és mtsai., 2012; Moise és mtsai., 2008; Moreira és mtsai., 2008; Patel és Hillard, 2006; Rubino és mtsai., 2008b), a fény-sötét doboz (Scherma és mtsai., 2008), a 0-palló (Kathuria és mtsai., 2003; Piomelli és mtsai., 2006), illetve a Vogel-konfliktus tesztekben (Lisboa és mtsai., 2008). A szorongásoldó hatások feltételezhetően a prefrontális kéreghez, illetve a periaqueductalis szürkeállományhoz köthetőek (Lisboa és mtsai., 2008). A farmakológiai FAAH-gátlás ezen kívül antidepresszáns hatású is a kényszerített úszás (Adamczyk és mtsai., 2008; Bambico és mtsai., 2012; Gobbi és mtsai., 2005; Piomelli és mtsai., 2006) és a szukróz preferencia tesztben (Realini és mtsai., 2011), illetve a krónikus enyhe stressz modellben (Bortolato és mtsai., 2007). Utóbbi hatás akkor is tapasztalható, ha az állatok szisztémás kezelés helyett lokálisan a hippocampusukba vagy a gyrus dentatusukba kapnak FAAH-inhibítort (McLaughlin és mtsai., 2007).

A 2-AG-t hidrolizáló MAGL-enzim gátlására csak a közelmúltban fejlesztettek ki specifikus, hatékony farmakológiai ágenszt (Long és mtsai., 2009a), így ennek az endokannabinoid manipulációnak a magatartási hatásai egyelőre kevésbé ismertek. Egyes tanulmányokban a MAGL-inhibíció csökkentette az általános szorongási állapotot (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Kinsey és mtsai., 2011), illetve a krónikus

stresszel kiváltott szorongást (Sumislawski és mtsai., 2011). A kezelés egyéb emocionális magatartásformákra kifejtett hatásai egyelőre nem ismertek.

3.5. Ellentmondások az emocionális magatartás endokannabinoid szabályozásában

A különböző endokannabinoid-manipulációk emocionális magatartásra kifejtett hatásai alapján megállapítható, hogy az endokannabinoid jelátvitel fokozása alapvetően csökkenti, míg az endokannabinoid jelátvitel gátlása alapvetően serkenti a szorongásos, illetve depressziós állapotok kialakulását. Az endokannabinoid jelátvitel emocionális magatartás szabályozásában betöltött szerepe azonban korántsem ennyire egyértelmű, számos, a fenti kapcsolattal ellentmondó hatást írtak le, a hatások több esetben rendkívül erősen függenek a kísérleti körülményektől. Feltehetően a szabályozást több komplex, egymással összefüggő mechanizmus alakítja ki.

Több esetben az endokannabinoid aktivitás farmakológiai stimulációja az alkalmazott farmakológiai ágens dóziséjától függő módon bifázikus hatást gyakorol az emocionális magatartásra. CB₁R agonisták például kis dózisban alkalmazva anxiolitikus, míg nagy dózisban alkalmazva anxiogén hatást fejtenek ki (Fogaca és mtsai., 2012; Moreira és Wotjak, 2010). A hatás egy feltételezhető magyarázata, hogy a CB₁R agonisták kis dózisban a CB₁R aktivációja által fejtik ki szorongásoldó hatásukat, míg nagy dózisban a TRPV₁-et aktiválva fokozzák a szorongást (Casarotto és mtsai., 2012; Rubino és mtsai., 2008b). A FAAH-aktivitás inhibíciója is egyes esetekben hasonló bifázikus hatást gyakorol a szorongásra (Rubino és mtsai., 2008b), a jelenség ebben az esetben is a nagy dózisban a TRPV₁-et aktiváló AEA-val függhet össze. Gyakran akár az alkalmazott dózistól függetlenül is egyes CB₁R-aktivitást manipuláló farmakológiai ágensek általános hatásaitól eltérően befolyásolják a magatartást. Egyes esetekben például a CB₁R gátlása nem befolyásolta (Moreira és mtsai., 2007; Thiemann és mtsai., 2009; Zarrindast és mtsai., 2008) vagy csökkentette a szorongást (Griebel és mtsai., 2005; Roohbakhsh és mtsai., 2007), a kondicionált félelmi választ (Mikics és mtsai., 2006), illetve a depressziót (Lee és mtsai., 2009). Többször a CB₁R aktiválása ezzel szemben pedig szorongásfokozó hatást okozott (Giuliani és mtsai., 2000; Roohbakhsh és mtsai., 2009). Bizonyos esetekben a fentiekhez hasonló ellentmondó

magatartási hatások magyarázhatóak az egyes fajok, törzsek, illetve akár egyedek közötti CB₁R expressziós mintázatokkal az emocionális magatartás szabályozásának szempontjából releváns agyterületeken. Haller és kollégái munkájában például CB₁R agonisták, illetve antagonisták ellentétes hatást váltottak ki egerekben, illetve patkányokban, mely jelenség feltételezhetően a szorongás szabályozásában ellentétes szerepet betöltő glutamaterg és GABAerg rendszer fajfüggő relatív kannabinoid érzékenységevel magyarázható (Haller és mtsai., 2007). Elképzelhetően több ellentmondó magatartási kannabinoid hatás is hasonló receptor expressziós mintázatbeli különbségekkel magyarázható, legalábbis részben. Emellett feltételezhető egyes, eddig ismeretlen kannabinoid receptorok léte, illetve részvétele az emocionális magatartás szabályozásában, melyeknek aktivációja ellentétes hatást okoz, mint a CB₁R aktivációja. Rodgers és munkatársai például indirekt úton kimutatták egy rimonabantra-érzékeny kannabinoid receptor létét, melynek gátlása oldja a szorongást (Rodgers és mtsai., 2005; Rodgers és mtsai., 2003). Szintén egy hasonló receptor létét sugallja, hogy Haller és munkatársai tanulmányában a rimonabant hasonlóképpen szorongásoldó hatást fejtett ki, mely CB₁ KO egerekben is tapasztalható volt (Haller és mtsai., 2002), tehát CB₁R-független hatás volt.

Számos tanulmányban az endokannabinoid rendszer magatartási hatásait eltérő kísérleti körülmények között vizsgálták, hogy fényt derítsenek a humán kannabiszfogyasztásnál is tapasztalható jelenség hátterére, miszerint sok esetben a kannabinoidok eltérő módon modulálják a magatartást (D'Souza és mtsai., 2004; Hall és Solowij, 1998), mely tapasztalatok szerint az eltérő környezeti körülményekkel állhat összefüggésben. Emellett a korábban említett interakció az endokannabinoid jelátvitel és a HPA-tengely működése között is befolyásolhatja a kannabinoidok magatartási hatásait, révén a HPA-tengely eltérő környezetben eltérő mértékben aktiválódik. CB₁ KO egereket vizsgálva érdekes módon a kísérleti apparátus megvilágítottsága több esetben befolyásolta a magatartást. Haller és munkatársai szerint a CB₁ KO állatok a számukra averzív, intenzív megvilágításban szorongó fenotípust mutattak, míg az állatok számára kevésbé averzív, gyenge megvilágításban a KO állatok magatartása nem különbözött a vad típusú állatokétól (Haller és mtsai., 2004a). Ugyanebben a tanulmányban a CB₁ KO állatok szociális magatartása is a környezettől függően változott, míg az ismert környezetben végrehajtott rezidens-betolakodó tesztben nőtt a

territoriális agresszió mértéke a CB₁R gén kiütésének hatására, addig egy másik szociális tesztben, a szociális interakcióban az ismeretlen környezet hatására csökkent CB₁ KO állatok szociális interakcióval töltött ideje a vad típusú egerekhez képest (Haller és mtsai., 2004a). Egy másik tanulmányban a CB₁ KO egerek csak abban az esetben mutattak emelkedett szorongást, ha a tesztprocedúra lehetővé tette az állatok számára averzívabb, erősebben megvilágított területek elkerülését. Ezzel szemben ha a procedúra ezt nem tette lehetővé, a génkiütött egerek csak averzív megvilágítás alatt mutatták a fenti fenotípust, kevésbé averzív körülmények között nem (Jacob és mtsai., 2009). Érdekes módon a CB₁ KO egerek – ellentétben a CB₁R gén kiütésének általános szorongásfokozó hatásaival – a shock probe tesztben csökkent szorongást mutatnak, mely jelenség szintén a kísérleti kontextustól való függésként magyarázható, az averzív környezeti stimulusra megváltozott választ adnak a CB₁ KO egerek (Degroot és Nomikos, 2004). Elmondható tehát, hogy a CB₁R gén kiütésének szorongáskeltő hatásai alapvetően inkább averzív környezetben mutatkoznak meg, kevésbé averzív környezetre az állatok a vad típusú állatokhoz hasonlóan reagálnak. Az endokannabinoid jelátvitel farmakológiai manipulációi is gyakran a kísérleti kontextus függvényében befolyásolják a magatartást. A CB₁R rimonabanttal való gátlása például Rodgers és munkatársai tanulmányában teszt-naív állatok esetében nem befolyásolta a szorongást a megemelt keresztpalló tesztben, azonban ha az állatokat újra alávetették a tesztnek, a rimonabant oldotta a szorongást (Rodgers és mtsai., 2003). A rimonabant példájához hasonlóan, a HU210 CB₁R agonista is általános szorongásoldó hatásaival ellentétesen hat bizonyos körülmények között: az ágens, krónikus stressz után adagolva fokozza a szorongást (Hill és Gorzalka, 2004). Az endokannabinoid metabolizmus gátlása is gyakran csak bizonyos körülmények között fejt ki hatást az emocionális magatartásra. Naidu és kollégái például csak akkor tapasztaltak anxiolitikus hatást a FAAH-aktivitás gátlása után, ha a megemelt keresztpalló nyílt és zárt karjai közötti megvilágítottságbeli kontrasztot növelték (Naidu és mtsai., 2007). Hasonlóképpen kutatócsoportunk is kimutatta, hogy a FAAH inhibíciója eltérő mértékben averzív körülmények között nem csupán eltérő mértékű, de akár eltérő irányú magatartási hatást is okozhat: averzív körülmények között a fokozott AEA jelátvitel csökkenti a szorongást, míg enyhébben averzív körülmények között növelte azt (Haller és mtsai., 2009). A FAAH gátlásával fokozott AEA jelátvitel hatásaihoz hasonlóan a JZL184-indukált MAGL-inhibícióval

fokozott 2-AG jelátvitel szorongásoldó hatása is egy tanulmány szerint csak averzív környezetben mutatkozott meg (Sciolino és mtsai., 2011). Érdekesség emellett, hogy bár a MAGL inhibitorkezelés után a 2-AG szint kb. 30 perccel jelentősen megemelkedik (Long és mtsai., 2009a), magatartási hatásokat csak valamivel később, kb. 120 perccel a kezelés után írtak le (Kinsey és mtsai., 2011; Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b; Long és mtsai., 2009c), mely azt sugallja, a MAGL inhibitorkezelés magatartási hatásai jóval később alakulnak ki biokémiai hatásainál. Több esetben annak ellenére, hogy a kísérleti körülmények megegyeztek a különböző vizsgálatok során, a későbbi tanulmányokban nem tudták reprodukálni egyes kannabinoid manipulációk magatartási hatásait. Például a FAAH gátlásával Moreira és munkatársai csökkentették a szorongást a megemelt keresztpalló tesztben (Moreira és mtsai., 2008), míg egy későbbi tanulmányban ez a hatás nem volt kimutatható (Scherma és mtsai., 2008). Más esetekben a korábban tapasztalt hatást csak a FAAH-inhibitor URB597 nagyobb dózisban való adagolásával lehetett elérni (Micale és mtsai., 2009). Moise és kutatócsoportja pedig csak egyes tesztekben volt képes reprodukálni a FAAH gátlás anxiolitikus hatásait, míg más tesztekben a kezelés nem befolyásolta a szorongást (Moise és mtsai., 2008). Feltételezhetően az endokannabinoid jelátvitel érzékeny az egészen apró, sok esetben kontrollálhatatlan környezeti változásokra, melyek befolyásolhatják a hatásokat. A környezeti stimulusok ilyen mértékű hatása a magatartás endokannabinoid kontrolljára arra enged következtetni, hogy az endokannabinoid jelátvitel inkább egy finomhangoló szerepet tölthet be az emocionális magatartás szabályozásában, mintsem specifikus hatásai lennének egyes magatartásformákra, magatartási állapotokra.

3.6. Az endokannabinoid rendszer szerepe a környezeti kihívásokra adott válaszreakciók szabályozásában

A fenti megfigyelések, illetve az endokannabinoid jelátvitel neurokémiai funkciói alapján feltételezhető, hogy a rendszer valójában a környezeti ingerekre adott túlzott válaszadást tompítja, így például az endokannabinoid jelátvitel fokozása csak averzívabb körülmények között csökkenti a szorongást vagy a depressziót, ahogy a CB₁R-aktivitás genetikai vagy farmakológiai gátlása is csak bizonyos körülmények

között növeli azt. A fenti feltevés alapján az endokannabinoid-funkció befolyásolhatja a kihívásokkal való megküzdés stratégiáit. Ezt a feltevést alátámaszthatja az a megfigyelés is, hogy averzív környezeti ingerek hatására *on-demand* módon endokannabinoidok szintetizálódnak (Marsicano és mtsai., 2002a; Walker és mtsai., 1999), illetve egy visszacsatoló mechanizmuson keresztül csökkentik a kihívások által előidézett neuronális aktivációt (Gerdeman és Lovinger, 2001; Hohmann és mtsai., 2005). Továbbá bizonyos, hogy a FAAH-aktivitás gátlása által fokozott AEA jelátvitel a kényszerített úszás tesztben fokozza az aktív válaszadást (úszás) a passzív válaszadás (lebegés) ellenében (McLaughlin és mtsai., 2012; Realini és mtsai., 2011). Ugyanakkor ugyanez a kezelés csökkenti a passzív megküzdési stratégia egyik jellemző tünetét, a magatartási flexibilitást is (Sokolic és mtsai., 2011). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a fokozott endokannabinoid jelátvitel hatására a kihívással szembesülő egyedek inkább aktív stratégiát mutatva küzdenek meg a szituációval. A fent bemutatott elszórt adatok, illetve közvetett bizonyítékok alapján feltételezhető, hogy az endokannabinoid jelátvitel befolyásolja a környezeti kihívásokkal való megküzdés stratégiáit, azonban erről egyelőre kevés adat áll rendelkezésre, ilyen irányú vizsgálatok elvégzése szükséges lehet a jövőben.

3.7. Megküzdési (*coping*) stratégiák

Az endokannabinoid jelátvitel manipulációinak emocionális magatartásra gyakorolt hatásai alapján feltételezhető, hogy a kannabinoidok befolyásolják azokat az ún. megküzdési stratégiákat, melyeket az állatok a környezeti kihívásokkal való megfeleléskor követnek. Ha egy egyed környezeti kihívásokkal szembesül, egészsége megőrzése érdekében meg kell küzdenie a kihívással. E megküzdés hatékonysága nagyban befolyásolja, hogy az egyes averzív környezeti ingerek mekkora hatást gyakorolnak az egyed életére (Ursin, 1998). Egyes állatfajok környezeti kihívásokkal való megküzdését vizsgálva azt a jelenséget figyelték meg, hogy az egyedek jól karakterizálható, egymástól elkülönülő fenotípusokat mutatnak a kihívásokkal való megfelelés során. Ha rácsálókat territoriális agressziójuk alapján egy alacsonyabb, illetve egy magasabb támadási latenciájú csoportba sorolunk, megfigyelhető, hogy az így kialakított csoportok egyéb magatartási sajátosságok alapján is jól elkülönülnek

egymástól (Benus és mtsai., 1989; Bohus és mtsai., 1987; Sluyter és mtsai., 1996; van Oortmerssen és Bakker, 1981). Ezeket a jól elkülöníthető, környezeti kihívásokkal szemben mutatott mintázatokat nevezik megküzdési stratégiáknak (Koolhaas és mtsai., 2007; Koolhaas és mtsai., 1999). Tradicionálisan két alapvető megküzdési stratégia különíthető el, mely időben konzisztens módon, alapvetően jellemző az adott egyedre. Az ún. aktív (proaktív) stratégia esetében a kihívásokkal való szembesülés esetén mutatott magatartás elsősorban belülső motivációk, rutin által vezérelt, problémaorientált, az egyedek környezeti kihívásra adott magatartási válasza kevésbé a környezet változásaira reagál, kevésbé flexibilis. Míg ezzel szemben a másik, ún. passzív (reaktív) stratégiát a környezet stimulusaira adott válaszok vezérlik, és leginkább az inaktivitás, az elkerülő magatartás jellemző rá. A magatartási elkülönülés mellett a két stratégia élettani karaktereit tekintve is élesen elkülönül egymástól. Míg az aktív stratégiára jellemző a HPA-tengely mérsékelt bazális és stresszindukált aktivitása, illetve a fokozott szimpatikus túlsúly és tesztoszteron aktivitás, addig a passzív stratégia HPA-tengelye fokozottan aktiválódik stressz esetén és elsősorban paraszimpatikus túlsúllyal jellemezhető (de Ruiter és mtsai., 1992; Hessing és mtsai., 1994; Korte és mtsai., 1997; Korte és mtsai., 1996; Ruis és mtsai., 2000).

Állatokban a megküzdési stratégiák fontosak a kihívásokkal való hatékony megbírkózás tekintetében (Koolhaas és mtsai., 2007; Koolhaas és mtsai., 1999), míg ember esetében az aktív (A-típusú), illetve passzív (C-típusú) stratégiák az egyes betegségekre, zavarokra való fogékonyságban játszhatnak szerepet (Temoshok, 2000). Az aktív stratégia kialakítása, mely nagyobb valószínűséggel jár együtt a betegségekkel szemben való ellenállással, komoly terápiás lehetőséget jelentene több pszichiátriai zavar klinikai kezelésében is (Cooke és mtsai., 2007; Westerhuis és mtsai., 2011). Ezt belátva az aktív megküzdési stratégiát előtérbe helyező fokozott endokannabinoid jelátvitel rendkívül fontos eszköz lehet terápiás szempontokból, jövőbeli vizsgálata szükséges ebből a megközelítésből.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiekben bemutattuk, hogy az endokannabinoid jelátvitel emocionális magatartásra gyakorolt hatásai erősen függenek a környezeti körülményektől, feltehetőleg a hatásokat komplex mechanizmusok interakciói alakítják ki. A hatások környezeti kontextustól való függése arra enged következtetni, hogy az endokannabinoid rendszer valójában nem gyakorol specifikus hatásokat meghatározott magatartásformákra, magatartási állapotokra, inkább a környezeti változások magatartásra gyakorolt hatásait szabályozza. Ez a hatás elképzelhetően annak lehet a következménye, hogy az endokannabinoid jelátvitel magát a stratégiát befolyásolja, mely szerint az egyes egyedek küzdenek meg a környezeti kihívásokkal. Munkánk során az endokannabinoid jelátvitel magatartási hatásait ebből a megközelítésből vizsgáltuk.

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 magatartástesztek alkalmazásával.

Vizsgálataink végzése közben vált elérhetővé a monoacil-glicerol-lipáz (MAGL), a másik endokannabinoid, a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) bontóenzimének specifikus inhibitora, a JZL184 (Long és mtsai., 2009a), 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 (lásd 3.3.). Továbbá a glükokortikoid stresszválasz fontos szerepet játszik a megküzdési stratégiák szabályozásában is (Sgoifo és mtsai., 1996). A magatartásvizsgálatok mellett több élettani paramétert is

megfigyeltünk, pl. a testhőmérséklet változásait, illetve a vérplazma kortikoszteron koncentrációját.

Az egyes vizsgálataink kérdései részletesen az alábbiakban olvashatóak:

4.1. A FAAH-gátlás hatása a környezeti változásokra adott magatartási reakciókra és megküzdési stratégiákra patkányokban

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 igénybe?
7. Megváltoztatja-e a FAAH enzim gátlása egerek magatartási stratégiáit a hátrafordítás tesztben?

4.2. A FAAH-gátlás hatása a környezeti változásokra adott magatartási reakciókra és megküzdési stratégiákra egerekben

1. Befolyásolja-e a FAAH-aktivitás gátlása a környezeti ingerekre adott magatartási válaszreakció jellegét egy új modellállatban, illetve vizsgálati paradigmában?
2. Megváltoztatja-e a FAAH enzim gátlása a magatartási stratégiákat egy specifikusan a megküzdési stratégiákat vizsgáló tesztben egy új modellállatban, illetve vizsgálati paradigmában?

4.3. A MAGL gátlás magatartási hatásainak idődinamikája eltérő mértékben averzív környezetben egerekben

3. 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?
4. A fenti hatások függenek-e az alkalmazott modellállattörzstől?
5. 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?

4.4. A MAGL-gátlás hatása a HPA-tengely működésére és a HPA-tengelyfüggő magatartási hatásokra egerekben

6. Befolyásolja-e a MAGL-aktivitás gátlása a bazális, illetve stresszindukált kortikoszteron-szintet, illetve a hatások milyen idődinamikával alakulnak ki?
7. A MAGL gátlásának korábban kimutatott hatásai a lokomotoros aktivitásra, illetve a szorongásra HPA-tengelyfüggő módon alakulnak-e ki?

5. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

5.1. 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 állattartó és kísérleti szobákban a hőmérséklet egységesen $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, a relatív páratartalom $60\pm 10\%$ volt. Az állatokat 12:12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, a lámpák 07:00-kor kapcsolódtak fel. Csapvíz és rágcsáló táplálék (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország) *ad libitum* elérhető volt. Az alanyok a kísérletek előtt minimum egy héten át akklimatizálódhattak az állattartási körülményekhez. A patkányokat 4 egyedből álló csoportokban 1354G Eurostandard Type IV ketrecekben (595 x 380 x 200 mm), míg az egereket izoláltan, 1284L Eurostandard Type II L ketrecekben (365 x 207 x 140 mm) tartottuk. Erre azért volt szükség, mert míg a patkányok szociális életmódot folytatnak, az egér ezzel ellentétben szoliter állatfaj (Arndt és mtsai., 2009; Benton és Brain, 1981; Capanna és mtsai., 1984). Továbbá az egerek csoportban való tartáskor erőteljes szociális hierarchiát alakítanak ki, mely befolyásolhatja a későbbi magatartásvizsgálatok eredményeit (Capanna és mtsai., 1984; Poshivalov, 1980). A szociálisan tartott patkányokat magatartási teszteléskor a teszt nap előtt 3 nappal 1291H Eurostandard Type III H ketrecekben (425 x 266 x 185 mm) izoláltuk, így egyrészt elkerülhető volt, hogy a közvetlenül a teszt előtti kezelés (állattartó doboz kinyitása, kezelendő állat eltávolítása, injekció) megzavarja a dobozban a többi, még tesztelés előtt álló állatot, másrészt hogy az állatok teszt előtt mutatott szociális interakciói befolyásolják a kísérleti alanyok teszt során mutatott magatartását. Kísérleti alanyaink kísérleteink előtt drogkezelésen nem estek át, kísérletben nem vettek részt, minden egyes alanyt csak egy kísérletben használtunk fel. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Bizottságának előírásai szerint (86/609/EEC) és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával zajlottak le.

5.2. Drogok és dózisok

Mind a FAAH-inhibitor URB597-et ([3-(3-karbamoil-fenil)-fenil]-N-ciklohexilkarbamát; Sigma Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA), mind a MAGL-inhibitor JZL184-et (4-nitrofenil-4-[bisz-(1,3-benzodioxol-5-il)-(hydroxi)-metil]-piperidin-1-karboxilát; Cayman Chemical Company Inc., Ann Arbor, MI, USA) dimetil-szulfoxidban, majd 0,4% metilcellulózt tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk föl úgy, hogy a dózisok az URB597 esetében 0 (vivőanyag), 0,1, illetve 0,3 mg/kg-nak, míg a JZL184 esetében 0 (vivőanyag), 4, 8, illetve 16 mg/kg-nak adódnak. Az alkalmazott dózisokat mindkét drog esetében korábbi irodalmi adatok alapján választottuk ki (Haller és mtsai., 2009; Kathuria és mtsai., 2003; Long és mtsai., 2009a; Sciolino és mtsai., 2011). Egerek esetében az állatok 10 ml/kg, míg patkányok esetében 1 ml/kg térfogatú folyadékot kaptak intraperitoneális (i.p.) injekció formájában. Az URB597-et minden kísérletünkben 40 perccel a magatartásteszt előtt adtuk be a kísérleti alanyoknak, a JZL184 beadását az adott kísérlettől függően 40, 80, 120 vagy 240 perccel követte a magatartásteszt, illetve vérvétel. A kortikoszteron-szintézis inhibitor metyrapont (2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanon; Sigma Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA) 5% Tween80-at tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és 0 (vivőanyag), illetve 30 mg/kg-os dózisban, 5 ml/kg térfogatban i.p. adagoltuk a magatartásteszt, illetve vérvétel előtt 40 perccel. Az alkalmazott dózist korábbi irodalmi adatok (Mikics és mtsai., 2004) és egy előkísérlés mtsaiapján állapítottuk meg (lásd 6.2.4. fejezet).

5.3. Magatartástesztek és elemzésük

Magatartástesztjeinket a világos periódus első 3 órájában végeztük egy erre a célra elkülönített kísérleti szobában 400 lx fényerősségű megvilágítás mellett (kivéve, ha a kísérlet eltérő erősségű megvilágítást követelt meg, lásd: 5.6.1.1. fejezet). A tesztek során a kísérleti alanyok magatartását egy Sony DCR-SR75 (Sony Electronics, San Diego, CA, USA) digitális videokamerával rögzítettük. A videofelvételek utólagos elemzését a H77 eseményrekorder szoftverrel végeztük (Haller József, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest). A szoftver működési elve szerint az egyes

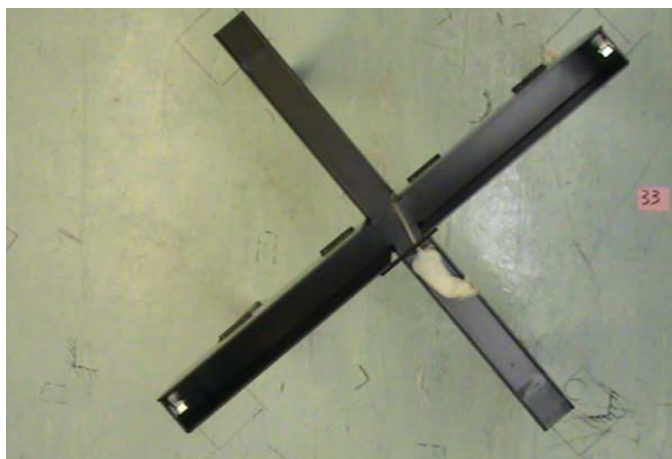
vizsgált magatartási paramétereknek a számítógép klaviatúráján megfeleltetünk egy-egy billentyűt, majd a videofelvételt és az elemzőszoftver számlálóját egyszerre elindítva, az elemző a megfelelő billentyű lenyomásával regisztrálja a videofelvételen látott magatartási paramétert. Ezáltal megállapítható az egyes paraméterek előfordulása (frekvencia), latenciája, illetve az adott magatartással töltött idő mértéke. Egy kísérletet minden esetben kizárólag egy elemző, a kísérleti csoportok ismerete nélkül elemzett. Az egy elemzõn belüli elemzési eltérés kevesebb volt, mint 5%.

5.3.1. Megemelt keresztpalló teszt egereken és patkányokon (EPM, *elevated plus-maze*)

A megemelt keresztpalló teszt (Pellow és mtsai., 1985) az egyik legelterjedtebben alkalmazott magatartásteszt laboratóriumi rágcsálók szorongásának vizsgálatára orvosbiológiai kutatásokban. A teszt alapja a rágcsálók ismeretlen környezetben való explorációs motivációja és a nyílt, kitett helyektől való félelme közötti csereviszony. A tesztapparátus feketére festett alumíniumból készült, két zárt karból (patkányok esetében használt apparátus: 50 x 17 cm, 30 cm magas fallal körülvéve; egerek esetében használt apparátus: 30 x 7 cm, 30 cm magas fallal körülvéve) és két nyílt karból áll (50 x 17 cm patkányok, illetve 30 x 7 cm egerek esetében), melyet egy centrum platform köt össze (patkányok esetében 17 x 17 cm, míg egereknél 7 x 7 cm). Az apparátus a földtől 80 cm-re magasan helyezkedik el (3. ábra). A teszt során a kísérleti alanyt orrával az egyik zárt kar felé fordítva a centrum platformra helyeztük, majd magatartását 5 percen át az apparátus fölött 2 méterrel, a mennyezeten rögzített digitális videokamerával rögzítettük. A tesztapparátust két teszt között csapvízzel alaposan lemostuk és papírvattával szárazra töröltük.

A megemelt keresztpalló teszt során mutatott magatartást az utólagos elemzéskor két nagy csoportba sorolt paraméterek szerint vizsgáltuk. Elsőként vizsgáltuk az ún. spaciotemporális paramétereket. Itt meghatároztuk, hogy az alany az apparátus egyes kompartmentjeibe hányszor lép be és mennyi időt tölt ott. Belépésként konvencionálisan azt definiáltuk, ha az állat az apparátus adott kompartmentjébe legalább 3 lábával belépett. Ez alapján meghatároztuk a szorongás mértékével fordított arányban álló nyílt kari belépések számát, a nyílt kari belépések az összes kari belépésekhez viszonyított arányát (*Nyílt kari belépések %*), illetve a nyílt karban töltött

idő arányát (*Nyílt kar idő %*). A lokomotoros aktivitás és szorongás jellegű magatartások interferenciájának kizárása miatt vizsgáltuk a zárt kari belépések számát, mint a szorongástól független lokomotoros aktivitás mértékét. A spaciotemporális paraméterek mellett ún. etológiai paraméterekként egerekben vizsgáltuk az alanyok kockázatbecslő magatartását is (Cole és Rodgers, 1993). Két fő indikátort vizsgáltunk, a lenézést (HD, *head dipping*; explorációs mozgás, melynek során az alany feje az apparátus szélén túlnyúlik), illetve a feszült figyelmi testhelyzetet (SAP, *stretched attend posture*; explorációs mozgás, melynek során a test előre nyúlik, majd visszahúzódik az eredeti pozícióba előre irányuló helyváltoztató mozgás nélkül). A két magatartási paraméter előfordulását (frekvencia) és időarányát (idő %) is mértük. Mivel az apparátus ún. védett területein (centrum platform, zárt karok) mutatott SAP korábbi tanulmányok szerint negatív korrelációt mutat a nyílt kari explorációval, míg a nyílt kari SAP pozitívan korrelál a zárt kari belépésekkel (Cole és Rodgers, 1993; Fernandez Espejo, 1997; Rodgers és Johnson, 1995), a védett területeken látott SAP-beli növekedés a szorongás mértékének növekedését jelezheti. Hasonlóképpen a védett területeken mutatott HD pozitívan, míg a nyílt karban mutatott HD negatívan korrelál a szorongással (Cruz és mtsai., 1994; Fernandez Espejo, 1997; Rodgers és Johnson, 1995). Mindezek alapján a megemelt keresztpalló védett területein mutatott SAP-ot és HD-t a szorongás etológiai indikátoraiként vizsgáltuk, több korábbi tanulmányhoz hasonlóan (Bradley és mtsai., 2007; Cruz és mtsai., 1994; Navarro és mtsai., 2006; Rodgers és Cole, 1993, 1994; Rodgers és mtsai., 1992; Wall és mtsai., 2003).



3. ábra. A megemelt keresztpalló teszt (EPM)

5.3.2. Nyílt-tér teszt egereken (porond teszt, OF, *open-field*)

A nyílt-tér teszt (Hall, 1932) az egyik legszélesebb körben alkalmazott teszt a laboratóriumi rágcsálók lokomotoros aktivitásának mérésére. A procedúrával emellett az újdonsággal kapcsolatos szorongás is tanulmányozható, bár a nyílt-tér teszt érzékenysége a szorongásoldó vegyületekre elmarad a megemelt keresztpalló tesztétől (Prut és Belzung, 2003). A megemelt keresztpalló teszthez hasonlóan ennek a paradigmának az alapja is az ismeretlen környezet explorációjára irányuló motiváció és a nyílt területektől való félelem csereviszonya rágcsálókban. A nyílt-tér apparátus egy 45 x 45 x 25 cm méretű fehér műanyag doboz, átlátszó plexilapokkal (Deodesign Werbetechnik, Frankenthal, Germany) lefedve (4. ábra). A kísérleti alanyt az apparátus egyik sarkába helyeztük, majd 5 percen keresztül rögzítettük viselkedését egy, a menyezetre erősített digitális videokamerával. A tesztapparátust két teszt között csapvízzel alaposan lemostuk és papírvattával szárazra töröltük.



4. ábra. A nyílt-tér teszt (OF)

A rögzített videofelvétel elemzésekor az apparátus területére utólagosan egy 4x4-es négyzetrácsot vetítünk, a lokomotoros aktivitás indikátora az egyes négyzetrácsvonalak átlépéseinek száma. Átlépésként azt definiáltuk, ha az alany mind a négy lábával átlépte a négyzetrács adott vonalát. Emellett a szorongás mértékét a középső 2x2-es centrum területen való exploráció időarányával (*Centrum idő %*) jellemeztük, az itt mutatott exploráció fordítottan arányos a szorongással.

5.3.3. Kényszerített úszás teszt egereken (FST, *forced swimming*)

A kényszerített úszás teszt (Porsolt és mtsai., 1977) egy széles körben elterjedt procedúra laboratóriumi rágcsálók depressziójellegű magatartásainak vizsgálatára. A teszthez használt apparátus egy csapvízzel feltöltött üveghenger (átmérő: 12 cm; magasság: 18 cm, vízszint: 12 cm) (5. ábra). Jelen tanulmányban a tesztet az eredeti procedúrától (mely szerint az állatok első nap egy 15, illetve másnap egy 5 perces teszten esnek át) eltérően alkalmazva, nem a kezelés depresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk, hanem azt, hogy eltérő körülmények között (eltérő hőmérsékletű víz, lásd 5.6.1.3. fejezet) eltérő magatartást mutatnak-e a kísérleti alanyok, és ez a környezeti eltérésekre adott válasz befolyásolható-e a FAAH enzim gátlásával. Ennek érdekében alanyainkat csak egyszer vizsgáltuk a kényszerített úszás paradigmában. Az alanyt a vízbe helyeztük, és magatartását 6 percen át rögzítettük. A tesztapparátus vizét két teszt között kiöntöttük, az apparátust csapvízzel átöblítettük, majd a következő kísérleti alany számára tiszta csapvizet töltöttünk a hengerbe.



5. ábra. A kényszerített úszás teszt (FST)

A felvételek elemzésekor három magatartási paraméter időarányát (idő %) vizsgáltuk: a lebegést (az állat nem mutat mozgást azon kívül, ami szükséges a test vízszint fölött való tartásához), a küzdést (erőteljes végtagmozgás, a mellső végtagok megtörik a vízfelszín, az alany megkísérli a henger falán való felmászást), illetve az úszást (koordinált, mind a négy végtagot igénybevevő helyváltoztató mozgás, a végtagok nem törnek meg a vízfelszín).

Egyes vizsgálataink során a kényszerített úszást nem magatartástesztként, hanem stresszorként alkalmaztuk (lásd 5.6.2.3. fejezet). A procedúra során mutatott magatartást ebben az esetben is megvizsgáltuk, de a fő cél ebben az esetben a stressz kiváltása volt, 6 perc kényszerített úszás után az alanyt eltávolítottuk a hengerből, majd vérmintát vettünk tőle (lásd 5.5. fejezet).

5.3.4. Farokcsípés teszt patkányokon (*tail pinch test*)

Patkányok megküzdési stratégiáinak vizsgálatára a farokcsípés tesztet (Giorgi és mtsai., 2003) alkalmaztuk. A teszt során az alany farkára egy binder csipeszt (szélesség: 2 cm, oldalhossz: 1, 0,7, illetve 1 cm) helyeztünk. A csipesz az állat farkára $1,47 \pm 0,16$ Pa nyomást fejtett ki, ezt az alapján határoztuk meg, hogy mekkora erőre volt szükség ahhoz, hogy a csipeszt a patkány farkának vastagságára kinyissuk. Ez a nyomás a patkányok számára nem tekinthető fájdalmasnak, a kísérleti alanyok 30-40%-a a csipesz eltávolítására irányuló próbálkozás nélkül explorálta környezetét. Ugyanakkor a nyomás elegendő volt ahhoz, hogy a teszt alatt az állatok a csipeszt ne tudják farkukról eltávolítani. A teszt során a csipeszt az állat farkára csíptettük majd magatartását rögzítettük 5 percen keresztül. A tesztprocedúrát a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra. A farokcsípés teszt.

A videofelvételek elemzésekor részletes etológiai elemzést végeztünk, mely során 9 különböző magatartási változót figyeltünk meg: *Ásás* (ásás az alomban), *Exploráció/lokomóció* (helyváltoztatás vagy a talajra, a ketrecfalra, illetve a levegőbe irányuló szaglás); *Rágás* (a csipesz harapdálása, rágcsálása); *Mosakodás* (mellső lábakkal való mosakodás, illetve hátulsó lábakkal való vakarózás), *Mozdulatlanság*

(apró mozgásokon kívül nincs mozgás); *Ugrás* (szökési kísérletek); *Csipeszhúzás* (csipesz húzása foggal); *Pihenés* (fekvő vagy álló helyzet mozgás nélkül, kivéve apró helyzetváltoztató, illetve fejmozgásokat); *Forgolódás* (a csipesz körbe forogva való „üldözése”). A változók közül csupán az *Exploráció/lokomóció*, illetve a *Rágás* jelent meg konzisztens módon, a többi változó csupán szórványosan (1. táblázat). Az ezzel a két változóval eltöltött idő töltötte ki a teszt 85%-át, emellett a változók között erős negatív korreláció állt fent, amely jelezte, hogy együtt kevésbé fordultak elő (*Rágás*Exploráció*, 1. Vivőanyag nap: Spearman $R = -0,890$; $p < 0,01$; *Rágás*Exploráció*, 2. Vivőanyag nap: $R = -0,886$; $p < 0,01$). A teszt idejének 10%-át kitevő mozdulatlanság esetében hasonló korrelációt nem tapasztaltunk. A fenti megfigyelések alapján feltételezhetően a farokcsípés tesztben adott fő magatartási válasz a csipesz rágása, illetve a környezetorientált exploráció, mely két változó kölcsönösen kizárja egymást. Mivel előbbi paraméter „probléma-orientált” vagy aktív válasznak, míg a másik paraméter „problémát mellőző” vagy passzív, elkerülő válasznak tekinthető, vizsgálataink során ezt a két paramétert vettük figyelembe, és az állatokat az alapján soroltuk elsődlegesen aktív, illetve elsődlegesen passzív megküzdési stratégiát mutató csoportokba, hogy a két magatartási paraméterrel töltött idő milyen arányban állt egymással (lásd 5.6.1.2.).

1. táblázat. Magatartási változók a 2. Kísérletben.

Változó	Frekvencia	Idő %
<i>Asás</i>	3,38±0,57	0,82±0,23
<i>Exploráció/lokomóció</i>	25,40±1,41	32,19±2,63
<i>Rágás</i>	19,28±1,41	52,22±3,02
<i>Mosakodás</i>	0,03±0,03	0,01±0,01
<i>Mozdulatlanság</i>	12,78±0,93	11,97±1,02
<i>Ugrás</i>	1,28±1,08	0,19±0,15
<i>Csipeszhúzás</i>	3,45±1,25	0,16±0,06
<i>Pihenés</i>	0,98±0,27	1,17±0,42
<i>Forgolódás</i>	0,83±0,18	0,07±0,02

5.3.5. Hátrafordítás teszt egereken (*back test*)

A hátrafordítás tesztet eredetileg malacokra fejlesztették ki (Ruis és mtsai., 2001), majd később kezdték alkalmazni laboratóriumi rágcsálókra (Hawley és mtsai., 2010; Lambert és mtsai., 2006). A teszt során az alanyokat 1 percig manuálisan a

hátukra fordítva tartottuk, majd magatartásukat rögzítettük. A tesztprocedúrát a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra. A hátrafordítás teszt

Vizsgálataink során átfogó elemzést végeztünk a teszt alatt mutatott magatartásról, mely szerint az alanyok 4 magatartáformáját tudtuk megkülönböztetni. Az idő legjavában az állatok a hátukra fordított helyzetből való szökési kísérleteket mutattak, melyet heves test és végtagmozgással definiáltunk. A fennmaradó időben az állatok mozdulatlanok voltak, azaz légző- és apró fejmozgáson kívül nem mutattak mozgást. Ezen a két magatartáson kívül rövid ideig az állatok testének elcsavarodása, illetve a kísérletező keze felé irányuló harapások is megfigyelhetőek voltak. Utóbbi ritkán fordult elő, az 1., 2., illetve harmadik napon a megfigyelt harapások száma csupán $2,2 \pm 0,6$, $0,33 \pm 0,14$, illetve $0,44 \pm 0,15$ volt. A test elcsavarása rendkívül gyors magatartás volt, rövidebb ideig tartott, mint egy másodperc, azonban gyakrabban előfordult, az 1., 2., illetve 3. kísérleti napon $8,8 \pm 1,9$, $6,3 \pm 1,3$, illetve $10,1 \pm 1,5$ alkalommal fordult elő. A napok közti eltérések marginális szignifikanciát mutattak ($F(2,34) = 2,73$; $p < 0,08$). Az 1. és 2. napon a test elcsavarása korrelált (Spearman $R = 0,521$; $P < 0,03$), a 3. napon mért érték azonban egyik korábbi alkalommal mért értékkel sem mutatott összefüggést (Spearman $R = 0,308$, $P > 0,2$, illetve $R = 0,267$, $P > 0,2$ az 1., illetve a 2. nap esetében). Mivel a test elcsavarása és a harapások pontszerű viselkedésformák voltak, illetve a szökési kísérletek és a mozdulatlanság időtartama kiegészítette egymást a teszt teljes ideje alatt, a megküzdési stratégiák meghatározásakor a két utóbbi változó arányát vettük figyelembe (lásd 5.6.1.4.).

5.3.6. Forró lap teszt patkányokon (*hot plate test*)

A forró lap teszt (Eddy és Leimbach, 1953) egy széles körben alkalmazott magatartási teszt az állatok fájdalomküszöbének vizsgálatára. A teszt során a kísérleti alanyt egy melegíthető lapra helyeztük, melyet egy átlátszatlan plexiből készült doboz vesz körül (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Az állatok 3 percen át habituálódtak a dobozhoz, majd a lap melegedni kezdett. A lap kiinduló hőmérséklete 30°C, mely 6°C/perc sebességgel 55°C hőmérsékletig melegedett. Amint az állat megnyalta valamelyik hátulsó végtagját, a melegítés abbamarad, és a hőmérsékletérték rögzítésre kerül.

5.4. *In vivo* biotelemetriás vizsgálatok egerekben

Egerek testhőmérsékletének és saját ketrecükben való mozgásaktivitásának mérésére *in vivo* biotelemetriás e-mittereket (HR E-Mitter, PDT-4000; Mini Mitter Company, Bend, OR, USA) implantáltunk a kísérleti alanyokba.

5.4.1. *In vivo* biotelemetriás e-mitter implantáció egerekbe

Az alanyokat a bemetszés helyén a hason ketamine–xylazine–pipolphen anesthesia (50–10–5 mg/kg i.p. injekció 10ml/kg térfogatban) alatt megborotváltuk. A terület fertőtlenítése után 1-2 cm hosszú, a test hosszanti vonalával párhuzamos medialis bemetszést ejtettünk a processus xyphoideustól caudalisan. A bemetszésen át a hasüregbe behatolva az e-mittert a hasüregbe juttattuk, a hasfalat 2-3 felszívódó öltéssel, a bőrt 3-4 nem felszívódó öltéssel összevarrtuk. Az állatok minimum 7 napos posztoperatív gyógyulás után estek át a kísérleteken, a gyógyulás alatt állapotukat folyamatosan monitoroztuk.

5.4.2. *In vivo* biotelemetriás mérések

Az *in vivo* biotelemetriás e-mitter által továbbított testhőmérséklet és mozgásaktivitási adatokat az alanyok ketrece alatt található jellevő detektálta és továbbította egy számítógépre, amelyen a VitalView Data Acquisition System szoftver (Mini Mitter Company, Bend, OR, USA) regisztrálta. A testhőmérsékletet és a mozgásaktivitást a teszt napokon a kezelés előtt 120, a kezelés után 240 percen át

monitoroztuk. A kezelést megelőző 20 perces periódus átlaga alapján megállapítottunk egy bazális szintet mindkét vizsgált paraméterből, a kezelés után az ettől való eltérést regisztráltuk 10 perces periódusokra. A mozgásaktivitás mértékegysége a VitalView System „konvencionális egysége” volt, a testhőmérsékletváltozásé °C. A mozgásaktivitás alapszintjétől való eltérés mellett vizsgáltuk az alanyok mozgásának finom mintázatát is. Meghatároztuk, hogy a vizsgált 10 perces periódusokban hány olyan fél perces periódus volt (a mozgásaktivitás esetében a legnagyobb használt időfelbontási egység), ahol az állatok immobilisek voltak (mozgásuk 0 konvencionális egység volt). Ezeket a periódusokat összegeztük és időarányban (idő%) fejeztük ki az adott 10 perces periódusra. Hasonlóképp megállapítottuk a „gyors mozgással” töltött idő arányát is, melyet a fenti módon számoltunk ki azok alapján a 30 másodperces periódusok alapján, ahol az alanyok minimum 10 konvencionális egységnyi mozgást mutattak.

5.5. Vérvétel és hormonmérések

Farokból vett vérminta esetében az állatokat egy plastik csőbe húztuk, melyben nem voltak képesek hely- és helyzetváltoztató mozgásra és melyből csak a farkuk lógott ki. Az alanyok farkán szikével ferde bemetszést ejtve etilén-diamin-tetraecetsavat tartalmazó kapillárisokban fogtuk fel a vért. A törzsvérből származó vérminta esetében az állatokat műtéti ollóval dekapitáltuk, a törzsvért etilén-diamin-tetraecetsavat tartalmazó 2 ml térfogatú Eppendorf csövekben fogtuk fel. A vérmintákat 4°C-on lecentrifugáltuk, majd a a vérplazmát hormonmérésig -20°C-on tároltunk.

A plazma kortikoszteronszintjét radioimmunoassay (RIA) módszerrel mértük meg (Gomez-Sanchez és mtsai., 1977), minden vizsgálatot kétszer végeztünk el. A mérés előtt a kortikoszteront alacsony pH-n elválasztottuk a kortikoszteron-kötő globulintól. Az antiszérumot nyúlban állították elő kortikoszteron-karboximetiloxim bovine serum albumin ellen (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest). 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 (a mérés időpontjától függően ettől enyhén eltérhetett). Egy kísérlet minden mintáját mindig ugyanabban az RIA-ban mértük meg.

5.6. Kísérleti elrendezés

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

5.6.1.1. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a megemelt keresztpalló tesztben

Az 1. Kísérletben a FAAH gátlásának magatartási reaktivitásra gyakorolt hatásait tanulmányoztuk eltérően averzív körülmények között, Wistar patkányokban. A procedúrát egy korábbi tanulmányban leírtakhoz hasonlóan hajtottuk végre (Haller és mtsai., 2009). Az alanyokat a kísérlet előtt napi 2-3 percen át kézhez szoktattuk. A patkányok egy csoportját a tesztek előtt 2 órára saját ketrecében a kísérleti szobába szállítottuk habituáció céljából, míg a nem-habituált állatok a tesztig az állattartó szobában maradtak. A kísérleti szobát 4 db fehér neoncsővel (a fényintenzitás 300 lx fölött volt a tesztapparátus szintjén), illetve 1 db vörös neoncsővel (<5 lx) világítottuk meg. Az állatokat a tesztkörülmények alapján a következő csoportokban vizsgáltuk: (1) habituált állatok gyenge megvilágítású szobában (a legkevésbé averzív tesztelési eljárás); (2) habituált állatok intenzív megvilágítású szobában; (3) nem-habituált állatok intenzív megvilágítású szobában (a legaverzívabb tesztelési eljárás). Az alanyok 40 perccel a tesztelés előtt intraperitoneális (i.p.) injekció formájában 0, 0,1, illetve 0,3 mg/kg URB597-kezelésen estek át, majd 5 perc megemelt keresztpalló tesztnek vetették alá őket. A kísérletben a mintaelemszám csoportonként 10-12 volt.

5.6.1.2. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok megküzdési stratégiáira a farokcsípés tesztben

A 2. Kísérletben Wistar patkányokon vizsgáltuk, hogy a FAAH enzim milyen hatással van a megküzdési stratégiák alakulására. A kísérlet során összesen 40 állatot használtunk fel.

40 perccel a kezelés után (kezelési csoportok: 0, 0,1, illetve 0,3 mg/kg URB597 a *2a. Kísérletben*; 0, illetve 1 mg/kg rimonabant, 0,3 mg/kg URB597, illetve 1 mg/kg rimonabant és 0,3 mg/kg URB597 kombinálva a *2b. Kísérletben*; 0, 5, illetve 10 mg/kg klórdiazepoxid a *2c. Kísérletben*) az állatokat farokcsípés tesztnek vetettük alá. A tesztet egy állaton háromszor hajtottuk végre, a tesztek között 3-4 napot kihagyva. Minden állat legalább két kezelést kapott a fentiek közül, de különböző napokon. Az első vivőanyagkezelési napon megállapított rágás/exploráció-arány alapján három csoportot különítettünk el. Az első csoportba azokat az alanyokat soroltuk, melyek az idő legalább 60%-át a csipesz rágásával töltötték, és kevesebb mint 40%-át a környezet explorációjával, így ebben a csoportban a rágás/exploráció-arány 1,5-nél magasabb volt, a csoport tagjait aktív megküzdési stratégiát mutató állatoknak tekintettük. Ezzel szemben a másik csoportban lévő állatok csupán az idő 40%-át töltötték rágással, míg minimum 60%-át explorációval. Ebben a csoportban a rágás/exploráció-arány kevesebb volt, mint 0,66, a csoport tagjait passzív megküzdési stratégiát mutató egyedeknek tekintettük. Az összes kísérleti alanyt tekintve az állatok 75%-a egyértelműen inkább a csipesz rágásával (aktív) vagy explorációval (passzív) töltötte idejét. A többi állat esetében a rágás/exploráció-arány 0.66 és 1.5 közé esett, ezeket az egyedeket kevert megküzdési stratégiájúnak tekintettük. A továbbiakban a megküzdés konzisztenciáját vizsgáltuk az így felállított kategóriák megfigyelésével. A kezeléseket sorrendjét a tesztnapok között kiegyensúlyoztuk, pl. az állatok fele, melyet 0,3 mg/kg URB597-vel kezeltünk az előző alkalommal vivőanyagot kapott, míg az állatok másik fele URB597-t. Minden kezelésre ugyanezt az elrendezés alkalmaztuk.

A *2d. Kísérletben* a forró lap tesztben vizsgáltuk, hogy a *2a.*, illetve *2b. Kísérletben* tapasztalt FAAH-gátlásindukált magatartási hatások nem a kezelés, illetve a megküzdési stratégiákbeli különbségek által okozott, fájdalomküszöb-beli eltérések miatt jelentek-e meg. Az alanyok 0 (vivőanyag), illetve 0,3 mg/kg URB597-kezelést kaptak, majd 40 perc múlva forró lap teszten estek át. A későbbiekben a fent ismertetettekkel megegyező módon megállapítottuk az állatok megküzdési stratégiáit, majd 3 nap múlva az állatok újabb forró lap teszten estek át.

5.6.1.3. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a kényszerített úszás tesztben

A 3. Kísérletben a FAAH-inhibíció magatartási és endokrin hatásait vizsgáltuk CD1 egerekben, eltérő körülmények között. A kísérletben a mintaelemszám csoportonként 10-12 volt.

A 3a. Kísérletben az alanyokat fiziológiás sóoldattal kezeltük, majd 40 perccel később 6 perc kényszerített úszásnak vetettük őket különböző hőmérsékletű vízben ($15\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, illetve $35\pm 1^\circ\text{C}$). A teszt után az állatokat dekapitáltuk, törzsvérükből pedig mintát vettünk melyből RIA-val megállapítottuk a kortikoszteronszintet.

A 3b. Kísérletben az alanyokat 0 (vivőanyag), 0,1, illetve 0,3 mg/kg URB597-tel kezeltünk, majd teszteltünk a fent ismertetett módon 25, illetve 35 °C hőmérsékletű vízben.

A 3c. Kísérletben a 3b. Kísérlethez hasonlóan jártunk el, kivéve, hogy ez esetben a víz hőmérséklete 15 °C-ra volt beállítva.

5.6.1.4. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek megküzdési stratégiáira a hátrafordítás tesztben

A 4. Kísérletben CD1 egereken vizsgáltuk a FAAH-gátlás hatásait a megküzdési stratégiákra. A kísérletben 40 egeret használtunk fel.

A 4a. Kísérletben a hátrafordítás teszt ismételhetőségét vizsgáltuk. Az alanyokat 7 napon át naponta egyszer teszteltük, teszt előtt 40 perccel minden állat vivőanyag-injekciót kapott (N=18). Az 1. tesztet a tesztkörnyezethez, illetve -procedúrához való habituációnak tekintettük. A 2. teszt után az alanyok viselkedését kielemeztük, majd a szökési kísérletekkel, illetve mozdulatlansággal töltött idő alapján azokat kategorizáltuk. A farokcsípés tesztel ellentétben, ahol a vizsgált passzív, illetve aktív magatartási változó aránya megközelítőleg egyenlő volt (az összesített arányuk kb. 1 volt), a hátrafordítás tesztnek alávetett egerek az idő 60-70%-át szökési kísérletekkel töltötték. Ez alapján azokat az egereket, amelyek szökési kísérlet/mozdulatlanság aránya 1,5 alatt volt, passzívnak, míg azokat, melyek esetében az arány 3 fölött volt aktívnak tekintettük. Azokat az alanyokat, amelyeknél az arány az 1,5 és 3 közötti tartományba

esett, kevert megküzdésű állatként kategorizáltuk. A 3. teszten a megküzdés stabilitását vizsgáltuk a 2. teszten felállított kategóriák megfigyelésével.

A 4b. Kísérlet a fentiekben leírtak szerint zajlott, azzal a különbséggel, hogy itt az állatok fele URB597-kezelést kapott 0,3 mg/kg dózisban a harmadik teszt előtt, míg az állatok másik felét ismét vivóanyaggal kezeltük.

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

5.6.2.1. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája averzív környezetben CD1 és C57BL/6J egerekben

Az 5. Kísérletben a MAGL-gátlás lokomotoros aktivitásra és szorongásra gyakorolt hatásait és ezek idődinamikáját vizsgáltuk ismeretlen körülmények között CD1 és C57BL/6J egerekben. A kísérletben a mintaelemszám csoportonként 7-10 volt. A kísérlet protokollját a 2. táblázat foglalja össze.

Az alany CD1 egerek JZL184-kezelést kaptak (0, 4, 8, illetve 16 mg/kg dózisban i.p.), majd 40, 80, illetve 120 perccel később 5 perc nyílt-tér, majd közvetlenül utána 5 perc megemelt keresztpalló teszten estek át (5a., 5b., illetve 5c. Kísérlet). Minden dózishoz és előkezelési időhöz más-más alanyt használtunk.

Előzetes eredmények alapján a kísérletet hasonló körülmények között 120 perces előkezelési idővel megismételtük C57BL/6J egerekben is a hatások egértörzsfüggését vizsgálva (5d. Kísérlet).

2. táblázat. Az 5. Kísérlet kísérleti protokollja

Kezelés	40, 80, illetve 120 perc előkezelési idő után	Rögtön az OF után
Vivóanyag		
4 mg/kg JZL184	5 perc OF	5 perc EPM
8 mg/kg JZL184		
16 mg/kg JZL184		

5.6.2.2. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája kevésbé averzív környezetben CD1 egerekben

A 6. *Kísérletben* az CD1 egerekben vizsgáltuk a MAGL-gátlás magatartási hatásait és ezek idődinamikáját kevésbé averzív körülmények között. A kísérlet során a mintaelemszám csoportonként 7 volt.

A 6a. *Kísérletben* az alanyokat az *in vivo* biotelemetriás e-mitterek implatációja és a posztoperatív felépülés után 3 kezelésnek és tesztnek vetettük alá saját ketrecükben, a kezeléseket között 3 nap szünettel. Tesztnapokon az állatokat 0, 8, illetve 16 mg/kg JZL184-el kezeltünk, olyan elrendezésben, hogy minden állat mindhárom kezelést kapott, de sorrendben más-más napokon. Az agy 2-AG-szintje 24 órával a JZL184-kezelés után visszatér a bazális értékre (Long és mtsai., 2009a) a kezelés továbbá nem befolyásolja a CB₁R ligandkötési képességét (Long és mtsai., 2009a), és habár bizonyos, hogy CB₁R agonisták receptorinternalizációt idéznek elő, ezek a hatások gyorsan lecsengenek (Hsieh és mtsai., 1999; Wu és mtsai., 2008), így valószínűsíthetően az ismételt kezelések nem befolyásolják egymást.

A 6b. *Kísérletben* szintén kevésbé averzívnek tekinthető, olyan idegen környezetben vizsgáltuk a MAGL-inhibíció hatásait a magatartásra, melyhez az állatokat előzetesen hozzászoktattuk. Habitúció céljából 4 napon át, napi 30 percre a nyílt-tér apparátusra helyeztük az alanyokat, majd az ötödik napon 0, 8, illetve 16 mg/kg JZL184-kezelés után 120 perccel vizsgáltuk magatartásukat egy 30 perces nyílt-tér tesztben.

5.6.2.3. A MAGL-gátlás hatása a HPA-tengely bazális és stressz-indukált aktivitására CD1 egerekben

A 7. *Kísérletben* a MAGL gátlás hatásait vizsgáltuk a bazális és stresszindukált kortikoszteronszintre CD1 egerekben. Az alanyok 0, 8, illetve 16 mg/kg JZL184-kezelést kaptak, majd 40, 120, illetve 240 perccel később (7a., 7b., illetve 7c. *Kísérlet*) farokvénájukból vérmintát vettünk. Ezután 6 perc kényszerített úszásnak vetettük alá őket, majd dekapitáció után újabb vérmintát vettünk a stresszindukált kortikoszteronszint méréséhez. A kísérletek során minden alanytól vettünk bazális és posztstressz vérmintát is, azonban minden dózishoz és előkezelési időhöz külön

állatokat használtunk. A kísérletben a mintaelemszám csoportonként 6-9 volt. A 7. *Kísérlet* protokollját a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. A 7. *Kísérlet* kísérleti protokollja

Kezelés	40 (7.a.), 120 (7.b.), illetve 240 (7.c.) perc		
	előkezelési idő után	Rögtön a vérvétel után	Rögtön az FST után
Vivőanyag			
8 mg/kg JZL184	Vérvétel farokból	6 perc FST	Vérvétel törzsvérből
16 mg/kg JZL184			

5.6.2.4. A MAGL-gátlás HPA-tengelyfüggő magatartási hatásai CD1 egerekben

A 8. *Kísérletben* a MAGL-gátlás korábban leírt magatartási hatásainak kortikoszteron-függését tanulmányoztuk CD1 egerekben. Ennek vizsgálatára alanyainkat kombináltan kezeltük a MAGL-inhibitor JZL184-el és a kortikoszteron-szintézis gátló metyraponnal. A kísérlet során a mintaelemszám kezelési csoportonként 8-10 volt.

A 8a. *Kísérletben* meghatároztuk az alkalmazandó metyrapon dózist. Ehhez CD1 egereket 0 (vivőanyag), 30, 50 illetve 70 mg/kg metyraponnal kezeltünk (a dózisokat korábbi irodalmi eredmények alapján választottuk) (Mikics és mtsai., 2004), majd 20 perccel később 5 perc nyílt-tér tesztnek vetettük alá őket. A teszt után az alanyokat dekapitáltuk, vérmintát vettünk törzsvérükből, melyből megállapítottuk a kortikoszteronszintet. A metyrapon minden dózisa jelentősen csökkentette a vérplazma kortikoszteronszintjét, a lokomotoros aktivitást egyik dózis sem befolyásolta (lásd 6.2.4. fejezet), ez alapján további vizsgálatainkban a metyrapont a legkisebb hatékony, 30 mg/kg-os dózisban alkalmaztuk a drogbevitel minimalizálásának érdekében.

A 8b. *Kísérletben* megvizsgáltuk, hogy a kortikoszteron-szintézis gátlása tompítja-e a MAGL-inhibíció bazális kortikoszteron-növelő hatását, melyet a 7. *Kísérletben* tapasztaltunk. Ehhez az állatok 0, 8, illetve 16 mg/kg JZL184-kezelésen estek át, mellyel kombinálva 0, illetve 30 mg/kg dózisban kortikoszteron-szintézis gátló metyraponnal is kezeltük őket, majd 40 perccel később dekapitáció után vérmintákat gyűjtöttünk a kortikoszteronszint meghatározásához. Az előkezelési időt a 7. *Kísérlet* eredményei alapján választottuk, ahol 40 perc után a JZL184-kezelés növelte

a bazális kortikoszteront, jelen kísérletünkben ezt a hatást akartuk kivédeni a metyraponnal.

A *8c. Kísérletben* az alanyok a *8b. Kísérletben* leírtakkal megegyező kezelést kaptak, azonban az előkezelési idő után itt 5 perc nyílt-tér, majd 5 perc megemelt keresztpalló teszten estek át az állatok. A magatartástereszték után az állatokat dekapitáltuk, majd vérmintákat gyűjtöttünk a kortikoszteronszint megállapításához. A *8c. Kísérlet* protokollját a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat. A *8c. Kísérlet* kísérleti protokollja

Kezelés	40 perc előkezelési idő után	Rögtön az OF után	Rögtön az EPM után
Vivőanyag			
8 mg/kg JZL184	5 perc OF	5 perc EPM	Vérvétel törzsvérből
16 mg/kg JZL184			

5.7. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm SE-ként ábrázoltuk. A magatartás adatokat, illetve a kortikoszteronszintet varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. Az ANOVA kritériumainak teljesülését Levenne-teszttel ellenőriztük, amennyiben arra szükség volt, a kritériumok teljesülésének érdekében az adatokat négyzetgyök-transzformáltuk. Kétfaktoros ANOVA-t alkalmaztunk olyan esetekben, ahol az állatok kombinált kezeléseket kaptak (*2b.*, *8b.*, illetve *8c. Kísérlet*), illetve amikor egy adott kezelés és a megküzdési stratégiák hatásai közötti interakciókat vizsgáltuk (*2.*, illetve *4. Kísérlet*). Ezekben az esetben a két vizsgált faktor a két különböző kezelés, illetve a megküzdési stratégia és a kezelés volt. Mivel a *7. Kísérletben* a bazális és stresszindukált kortikoszteronszint megállapításához a vérmintákat ugyanazokból az állatokból vettük, az adatsort ismételt mérések (*repeated measures*) ANOVA-val elemeztük, az ismételt mérési faktor az úszásstressz, a nem ismételt faktor a kezelés volt. Az *in vivo* biotelemetriás vizsgálatoknál (*6a. Kísérlet*) szintén ismételt mérések ANOVA-t alkalmaztunk a testhőmérséklet és a lokomóció adatainak elemzésére, az ismételt mérési faktor ez esetben az idő volt, a nem ismételt faktor a kezelés. Ha az ANOVA szignifikáns kezelési hatást mutatott, *post-hoc* Duncan tesztet alkalmaztunk a csoportok páros összehasonlítására. Két változó közötti korrelációt minden esetben a Spearman-féle korrelációs teszttel, míg az eloszlásuk közötti különbségeket a χ^2 -

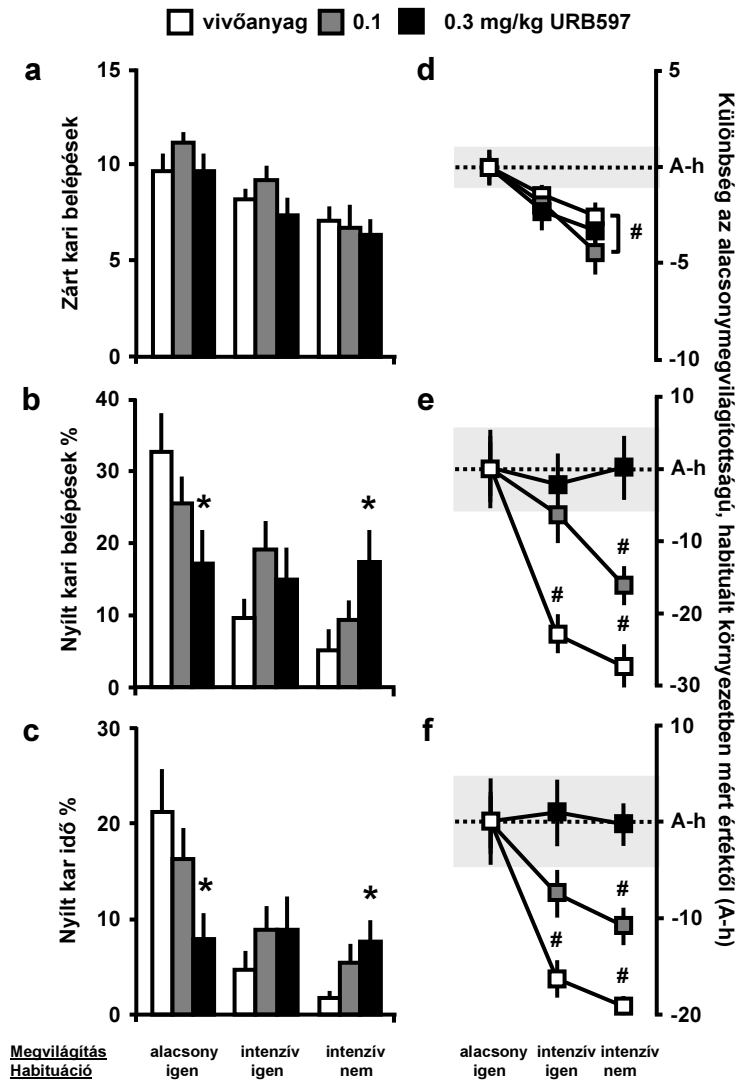
próbával vizsgáltuk. A változók eloszlása közötti különbségeket, közöttük fenálló korrelációkat, a kezelések hatását, illetve a csoportok közötti különbségeket minden esetben akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték 0,05-nél alacsonyabb volt. A statisztikai vizsgálatokat a Statistica 11 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük.

6. EREDMÉNYEK

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

6.1.1. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a megemelt keresztpalló tesztben

Az 1. Kísérletben a FAAH-aktivitás gátlásával fokozott AEA jelátvitel csökkentette a patkányok magatartási reaktivitását, melyet a kísérleti környezet averzivitásának változásaival szemben mutattak. A zárt kari belépések számát a megemelt keresztpalló tesztben egyedül a kísérleti körülmények befolyásolták statisztikailag szignifikáns módon ($F_{\text{kísérleti körülmény}}(2,110) = 12,95$; $p < 0,01$) (8a. ábra). Ezzel szemben a nyílt kari explorációt szignifikánsan befolyásolta az URB597-kezelés és a kísérleti körülmények interakciója (Nyílt kari belépések %: $F_{\text{URB597} * \text{Kísérleti körülmények}}(4,110) = 3,71$; $p < 0,01$; Nyílt kari idő %: $F_{\text{URB597} * \text{Kísérleti körülmények}}(4,110) = 3,59$; $p < 0,01$) (8b-c. ábra). Korábbi megfigyeléseknek megfelelően az URB597 nem befolyásolta a szorongást közepesen averzív körülmények között (habituált állatok, intenzív megvilágítás), azonban csökkentette erősen averzív körülmények között (nem habituált állatok, intenzív megvilágítás). Meglepő módon az URB597 anxiogén hatást fejtett ki a kevésbé averzív kontextusban (habituált állatok, gyenge megvilágítás). Ez a meglepő megfigyelés akár ahhoz a következtetéshez is vezethet, hogy a fokozott AEA jelátvitel anxiogén, illetve anxiolitikus hatásokat is okozhat a környezeti körülmények függvényében. Megfigyelhető azonban, hogy az URB597-tel kezelt állatok mindhárom kísérleti kontextusban hasonló mértékű szorongást mutattak, míg a vivőanyagkezelt állatok szorongása a közepesen és erősen averzív körülmények között magasabb volt (8e-f. ábra). Ez a megfigyelés az eredmények egy alternatív interpretációjára ad lehetőséget, miszerint a vivőanyagkezelt állatok a környezet averzivitásának növekedésére fokozott szorongással reagáltak, míg az URB597-kezelés ezt a válaszreakciót tompította. Az URB597 ezen hatása valószínűsíthetően nem abból ered, hogy a kezelés csökkenti a környezet információira való érzékenységet, ugyanis a három kísérleti csoportban hasonlóan alakultak a kontextusindukált lokomotoros aktivitásbeli változások (8d. ábra).



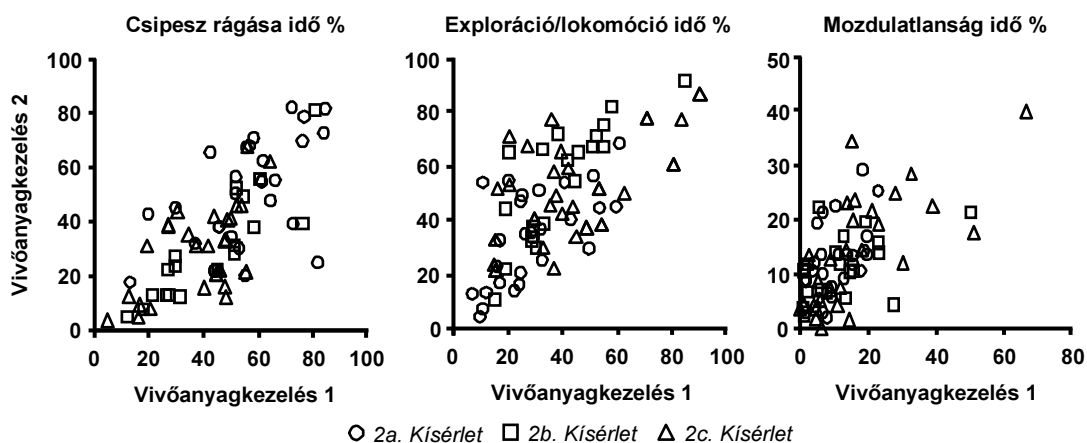
8. ábra. Az URB597-kezelés hatása a magatartásra az EPM-en, eltérően averzív körülmények között. A bal oldalon a zárt kari belépések számát (a), a nyílt kari belépések arányát (Nyílt kari belépések %, nyílt kari belépések/összes kari belépés) (b), illetve a nyílt karban töltött idő arányát (Nyílt kari idő %) (c) ábrázoltuk az EPM-en különbözően averzív körülmények között. A jobb oldalon az egyes magatartási változókban talált különbségek láthatóak az adott változó alacsony megvilágítású, habituált kontextusban (A-h) mért értékétől (d-e). A szürke vízszintes sávok az A-h kontextusban mért átlag standard hiba tartományát jelölik. *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelte csoporttól ($p < 0,05$); #, szignifikáns különbség a különbözően averzív körülményekben vizsgált csoportok között ($p < 0,05$). A statisztikai elemzéseket a nyers adatokon végeztük, a d-e ábrák csak az eredmények megértését segítik.

6.1.2. A FAAH-gátlás hatása Wistar patkányok megküzdési stratégiáira a farokcsipés tesztben

A 2. Kísérletben a FAAH-inhibíció oly módon befolyásolta a patkányok megküzdési stratégiáinak alakulását, hogy a passzív megküzdési stratégiát mutató

állatok kevert, míg a kevert stratégiát mutató állatok aktív stratégiát mutattak, azaz összességében az aktívabb stratégiák kerültek előtérbe.

A 2a. Kísérletben legelőször a megküzdési stratégiákat karakterizáló magatartási paraméterek időbeli stabilitását tanulmányoztuk, megvizsgálva a rágás és az exploráció tesztek közötti korrelációját vivőanyag-kezelés után. Két farokcsípés tesztet végeztünk vivőanyagkezelést követően, a második teszt 3 nappal követte az elsőt. Mindkét változót tekintve erős korreláció volt felfedezhető (rágás: Vivőanyag 1*Vivőanyag 2: Spearman $R=0,57$, $p<0,01$; exploráció: Vivőanyag 1*Vivőanyag 2: $R=0,60$, $p<0,01$). A változók egyes tesztnapokon mért értékei között a 2b., illetve 2c. Kísérlet során is szignifikáns korrelációt találtunk vivőanyagkezelést követően (2b. Kísérlet: rágás: $R=0,92$; $p<0,01$; exploráció: $R=0,85$; $p<0,01$; 2c. Kísérlet: rágás: $R=0,61$, $p<0,01$; exploráció: $R=0,40$; $p<0,04$). A fenti eredmények alapján kijelenthető, hogy a patkányok magatartása időben stabil volt (a 2a., 2b., illetve 2c. Kísérletek során során során végzett korrelációs vizsgálatok eredményeit a 9. ábra foglalja össze).



9. ábra. A magatartási változók korrelációi vivőanyagkezelés után a 2a., 2b., illetve 2c. Kísérletben. A kísérletek eredményeit a 3a., 3b., illetve 3d. Ábrák mutatják be.

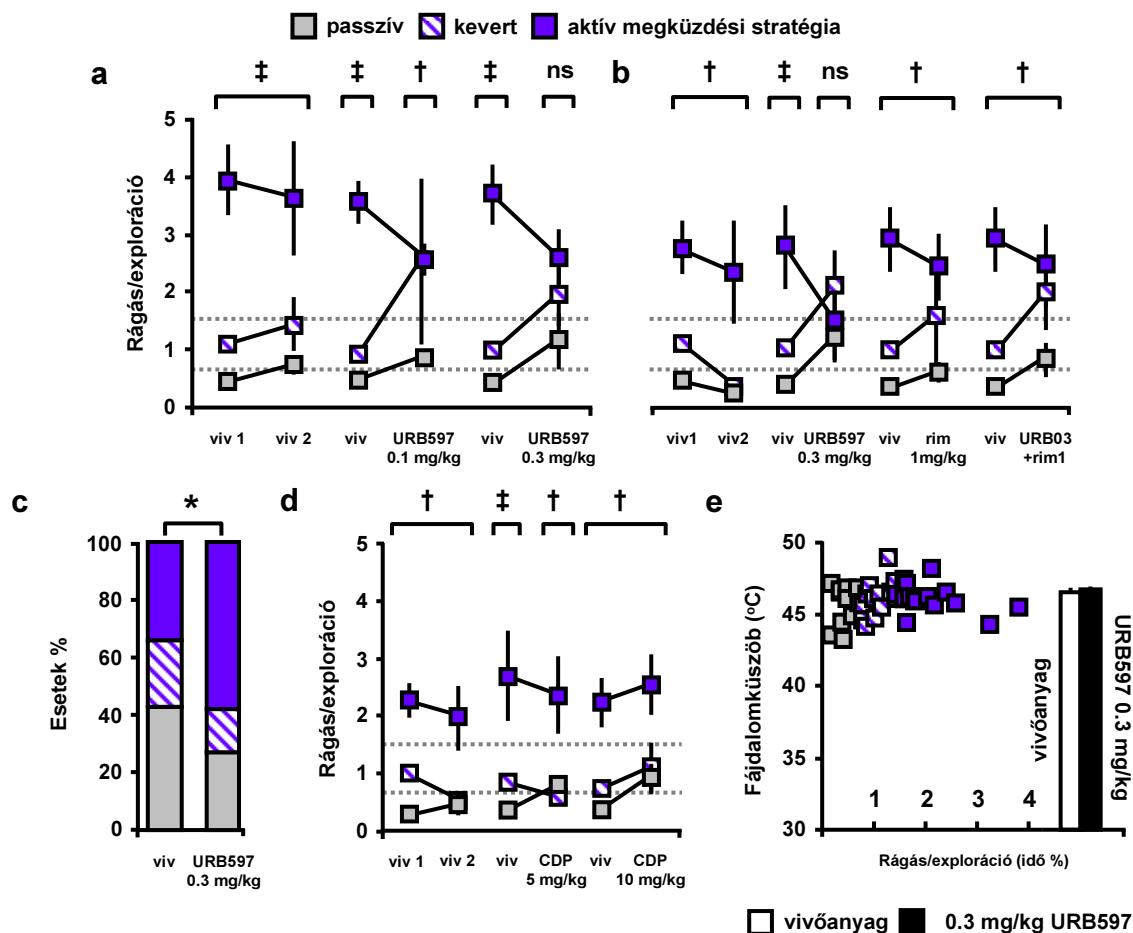
A 2a. Kísérletben statisztikailag szignifikáns interakció volt kimutatható az URB597-kezelés és a megküzdési stratégiák hatásai között ($F_{\text{Megküzdési stratégia*URB597}}(2,70)=8,00$; $p<0,01$). Ismételt vivőanyagkezelés esetében az egyes egyedek magatartási profilja állandó volt ismételt teszteléskor (10a. ábra). Ezzel szemben az URB597 dóziszfüggő változást idézett elő a megküzdési stratégiák eloszlásában, a passzív, kevert és aktív stratégiák közti különbségek eltűntek (10a. ábra). Az URB597 általánosan eltolta a passzív és kevert megküzdőket egy aktívabb stratégia felé, míg az

aktív megküzdők aktívak maradtak, habár a rágás/exploráció-arány gyenge, nem szignifikáns csökkenést mutatott.

A *2b. Kísérletben* a CB₁R antagonistá/inverz agonista rimonabant eltörölte az URB597 megküzdési stratégiákra kifejtett hatásait, ha olyan dózisban adagoltuk, melynek önmagában nem volt hatása ($F_{\text{Megküzdési stratégia}*\text{Rimonabant}}(2,68)= 5,68$; $p < 0,01$) (10b. ábra). Újból kimutattuk, hogy egy ismételt vivőanyagkezelés nem befolyásolja az első vivőanyagkezelésénél kialakított megküzdési stratégia csoportokat, míg a 0,3 mg/kg-os URB597-dózis az aktív stratégia felé tolt az állatoknak a megküzdési stratégiáját, akik az első kezeléskor passzív, illetve kevert stratégiát mutattak. Az aktívan megküzdő egyedek között a rágás/exploráció-arány ebben a kísérletben is csökkent, habár ez a csökkenés a *2a. Kísérletben* tapasztaltnál is enyhébb volt, illetve nem volt statisztikailag szignifikáns. A rimonabant önmagában nem hatott a megküzdési stratégiákra, de eltörölte az URB597-kezelés hatásait. Habár az aktív megküzdés irányába egy gyenge tendencia volt felfedezhető a kevert és passzív megküzdési stratégiát mutató csoportoknál a rimonabantkezelés után, a stratégiák közti különbségek statisztikailag szignifikánsak maradtak.

Az URB597-kezelés a megküzdési stratégiák eloszlására gyakorolt hatásait a *2a.*, illetve *2b. Kísérletek* során egy közös analízisben vizsgáltuk. Az URB597-kezelés hatására a megküzdési stratégiák eloszlása az aktív stratégia felé tolódott ($\chi^2 = 11,16$; $p = 0,04$) (10c. ábra).

A *2c. Kísérletben* a benzodiazepin szorongásoldó vegyület klórdiazepoxid nem befolyásolta a megküzdési stratégiákat ($F_{\text{URB597}}(2,71)= 0,24$; $p = 0,78$; $F_{\text{Megküzdési stratégia}*\text{URB597}}(4,71)= 0,41$; $p = 0,78$), illetve a stratégiák közti különbségek ismételt teszteléskor sem változtak ($F_{\text{Megküzdési stratégia}}(2,71)= 55,94$; $p < 0,01$) (10d. ábra).



10. ábra. Az URB597-kezelés hatása a megküzdési stratégiákra a farokcsípés tesztben. A vivőanyag-, 0,1, illetve 0,3 mg/kg URB597-kezelés hatása a rágás/exploráció arányára passzív, kevert, illetve aktív megküzdési stratégiájú patkányokban (a); az URB597, a CB₁R antagonistá rimonabant, illetve a rimonabant és az URB597 kombinált kezelés hatása a megküzdési stratégiákra (b); a megküzdési stratégiák eloszlása vivőanyag-, illetve 3 mg/kg URB597-kezelést követően (c); a benzodiazepin szorongásoldó klórdiazepoxid hatása a megküzdési stratégiákra (d); a megküzdési stratégiák, illetve az URB597-kezelés hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben (a). A pontozott vonalak a különböző megküzdési stratégiákat elkülönítő rágás/exploráció-arányokat jelzik. Viv, vivőanyag; rim, rimonabant; CDP, klórdiazepoxid; ‡, szignifikáns különbség mindhárom megküzdési stratégia között ($p < 0,05$); †, szignifikáns különbség az aktív és a passzív megküzdési stratégia között ($p < 0,05$); ns, nincs szignifikáns különbség a megküzdési stratégiák között; *, szignifikáns különbség az eloszlások között ($p < 0,05$).

A 2d. Kísérlet eredményei szerint sem a megküzdési stratégia, sem az URB597-kezelés nem befolyásolta a fájdalomküszöböt ($F_{\text{Megküzdési stratégia}}(2,37) = 0,92$; $p > 0,4$; illetve $F_{\text{URB597}}(1,18) = 0,26$; $p > 0,6$), azaz feltételezhetően a 2a., illetve 2b. Kísérletben látott hatások nem a csipesz által okozott diszkomfortra való érzékenység megváltozásának másodlagos hatásai voltak (10e. ábra).

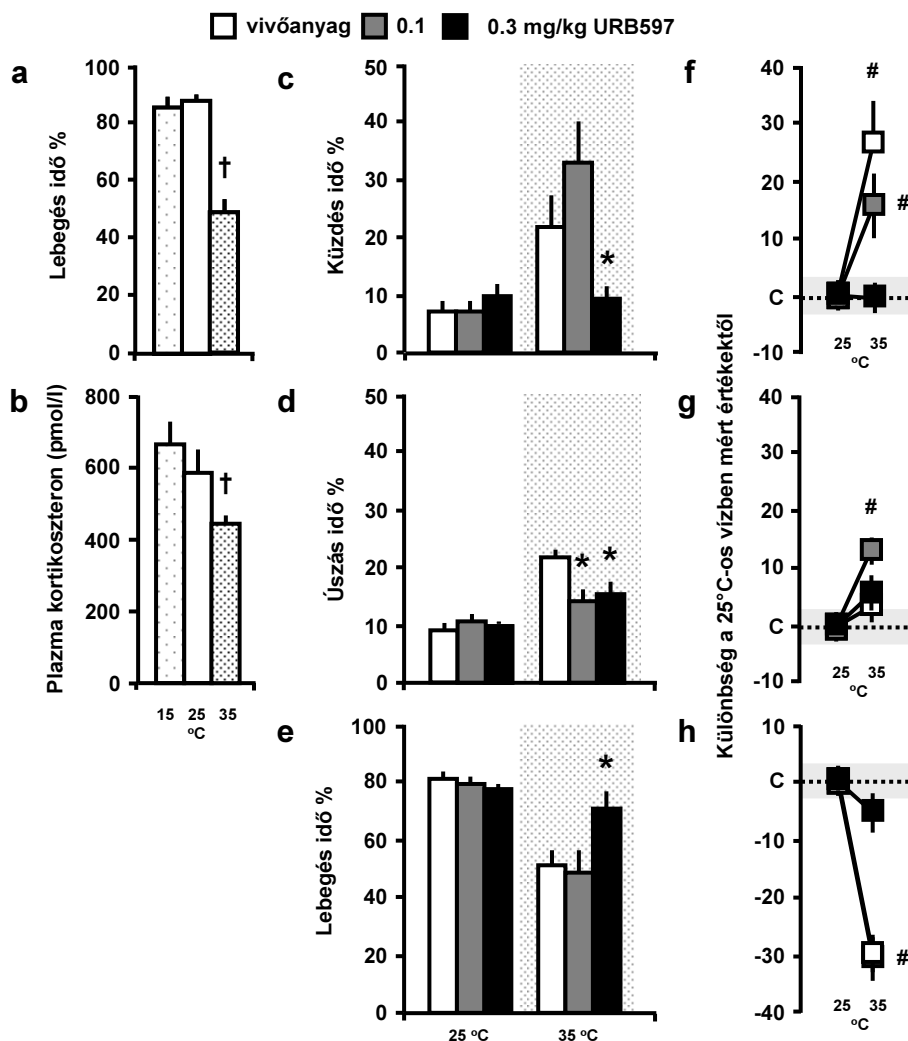
6.1.3. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek környezeti változásokra adott magatartási reakcióira a kényszerített úszás tesztben

A 3. *Kísérletben* a FAAH-aktivitás gátlása tompította az egerek magatartási reakcióit, melyet a kísérleti körülmények változásaival szemben mutattak.

A 3a. *Kísérletben* korábbi megfigyelésinkkel összhangban az alanyok szignifikánsan kevesebbet lebegtek melegebb (35°C), mint hidegebb (15 vagy 25°C) vízben ($F(2,27) = 30,16$; $p = 0,0001$) (11a. ábra). Ezzel párhuzamosan melegebb vízben a kortikoszteron-válasz is enyhébb volt ($F(2,27) = 4,54$; $p < 0,02$), mely szintén azt jelzi, hogy az egerek kényelmesebben érezték magukat a melegebb vízben (11b. ábra).

A 3b. *Kísérletben* az URB597-kezelés 25°C-os vízben nem befolyásolta az alanyok magatartását, azonban növelte a lebegés, illetve csökkentette a küzdés időarányát 35°C-on ($F_{\text{Víz hőmérséklet} \cdot \text{URB597}} = 4,11$; $p < 0,03$) (11c-e. ábra). Feltételezhető azonban, hogy az irodalomban antidepresszáns hatásúként leírt URB597-kezelés után tapasztalt depresszív hatás csak a víz hőmérsékletére való érzékenység csökkenésének másodlagos hatása. Míg a vivőanyagkezelte egerek erősen reagáltak a meleg vízre, az URB597-kezelés tompította ezt a reakciót (11f-h. ábra).

A 3c. *Kísérletben* a 25 és 35°C-ban való vizsgálatok után az URB597-kezelés 15°C-os vízben kifejtett hatásait is vizsgáltuk, azonban nem találtunk statisztikailag szignifikáns magatartási hatásokat (5. táblázat).



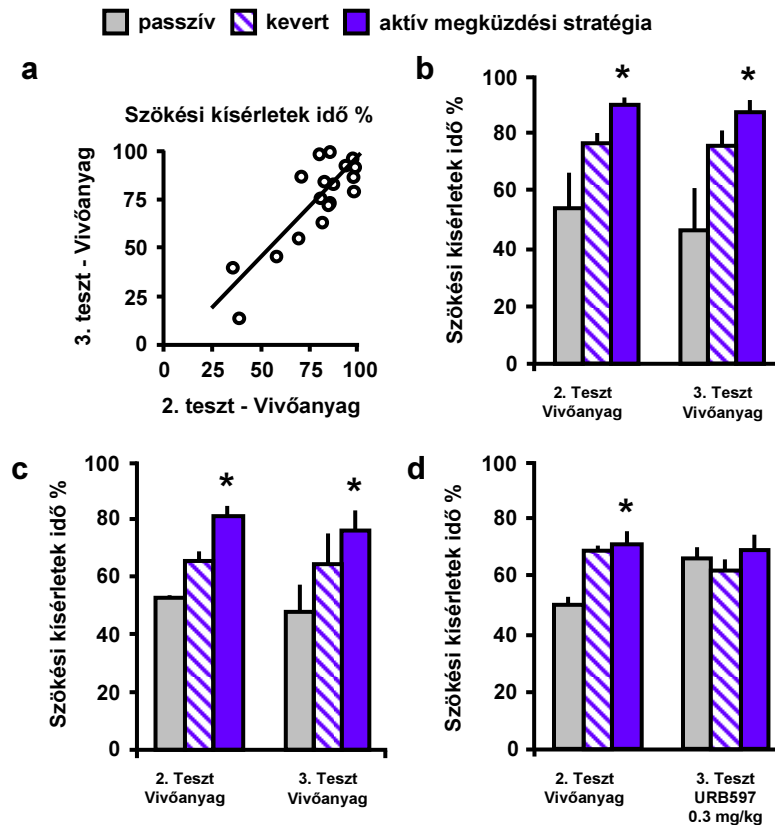
11. ábra. Az URB597-kezelés magatartási hatásai az FST-ben eltérő víz hőmérsékleten. A víz hőmérséklet hatása a lebegéssel töltött időre (a); a víz hőmérséklet hatása a kortikoszteronszintre (b); az URB597-kezelés magatartási hatásai 25, illetve 35°C-os vízben (c-e); a magatartási változások 35°C-os vízben a 25°C-os vízben tapasztaltakhoz viszonyítva (f-h). A szürke vízszintes sávok az átlag standard hiba tartományát jelölik 25°C-os vízben. †, szignifikáns különbség a 15°C-on mért értéktől ($p < 0,05$); *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelte csoporttól ($p < 0,05$); #, szignifikáns különbség a 25°C-os vízben vizsgált csoporttól. A statisztikai elemzéseket a nyers adatokon végeztük, az f-h ábrák csak az eredmények megértését segítik.

5. táblázat. Magatartási változók a 3c. Kísérletben.

Változó	Vivőanyag	0.1 mg/kg URB597	0.3 mg/kg URB597	ANOVA F- és p-érték
Lebegés idő %	70,75±4,72	64,96±3,67	75,85±2,72	F(2,32)= 2,19; p= 0,13
Küzdés idő %	14,92±3,44	19,34±2,95	11,44±1,55	F(2,32)= 2,17; p= 0,13
Úszás idő %	11,85±1,57	13,18±1,58	10,65±1,39	F(2,32)= 0,72; p= 0,49

6.1.4. A FAAH-gátlás hatása CD1 egerek megküzdési stratégiáira a hátrafordítás tesztben

A 4. Kísérletben a FAAH-inhibíció hatására azok az alanyok, amelyek alapvetően passzív megküzdési stratégiát mutattak, aktív stratégia szerint küzdöttek meg a teszt kihívásaival.



12. ábra. Az URB597-kezelés hatása a megküzdési stratégiákra a hátrafordítás tesztben. Korrelációs ábra a szökési kísérletekre a 2. és 3., egy hét időkülönbséggel elvégzett, vivóanyagkezelést követő teszt során (a). A szökési kísérletek alakulása vivóanyagkezelés utáni ismételt tesztelés során (b). A vivóanyag-, illetve URB597-kezelés hatása a megküzdési stratégiákra (c-d). *, szignifikáns különbség a passzív stratégiát mutató alanyokhoz képest ($p < 0,05$).

A 4a. Kísérletben az ismételt vivóanyagkezelés után végrehajtott tesztelés során az egyes alanyok szökési kísérletekkel töltött ideje konzisztensnek bizonyult. Ezt a konzisztenciát egyrészt a 2., illetve 3. teszt során a szökési kísérletekkel töltött idő esetében látott korreláció (Spearman $R > 0,6$; $p < 0,01$) (12a. ábra), illetve a megküzdési stratégiák stabilitása is mutatta ($F_{\text{Megküzdési stratégiák}}(2,30) = 16,87$; $p < 0,01$) a teszt nap, illetve a teszt nap és a megküzdési stratégiák közötti interakció hatása nem volt

szignifikáns (12b. ábra). Ez alapján kijelenthető, hogy a hátrafordítás teszt, akárcsak a patkányokon alkalmazott farokcsípés teszt, alkalmas a megküzdési stratégiák vizsgálatára.

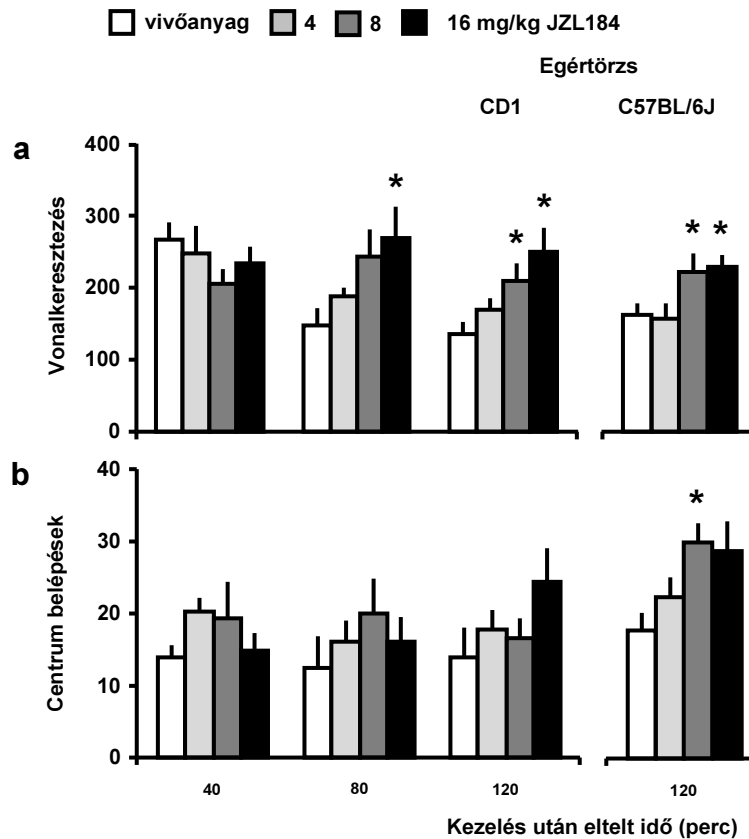
A 4b. Kísérletben korábbi tapasztalatainkhoz hasonlóan az ismételt vivőanyag-kezelés utáni tesztelés során a megküzdési stratégiák konzisztensek maradtak (12c. ábra), ha azonban az állatokat a második tesztelés előtt URB597-tel kezeltük, azok az egyedek, melyek az első teszt vivőanyag-kezelése után passzívan küzdöttek meg a teszt kihívásával, aktív stratégiát választottak ($F_{\text{Megküzdési stratégia*URB597}}(2,18) = 3,42; p = 0,04$) (12d. ábra).

6.2. A MAGL-gátlás hatásai a magatartási és endokrin stresszválaszra

6.2.1. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája averzív környezetben CD1 és C57BL/6J egerekben

Az 5. Kísérletben a MAGL-aktivitás gátlásával fokozott 2-AG jelátvitel ismeretlen környezetben hosszabb előkezelési idő után növelte a lokomotoros aktivitást, illetve oldotta a szorongást. A hatások függetlenek voltak az alkalmazott egértörzstől.

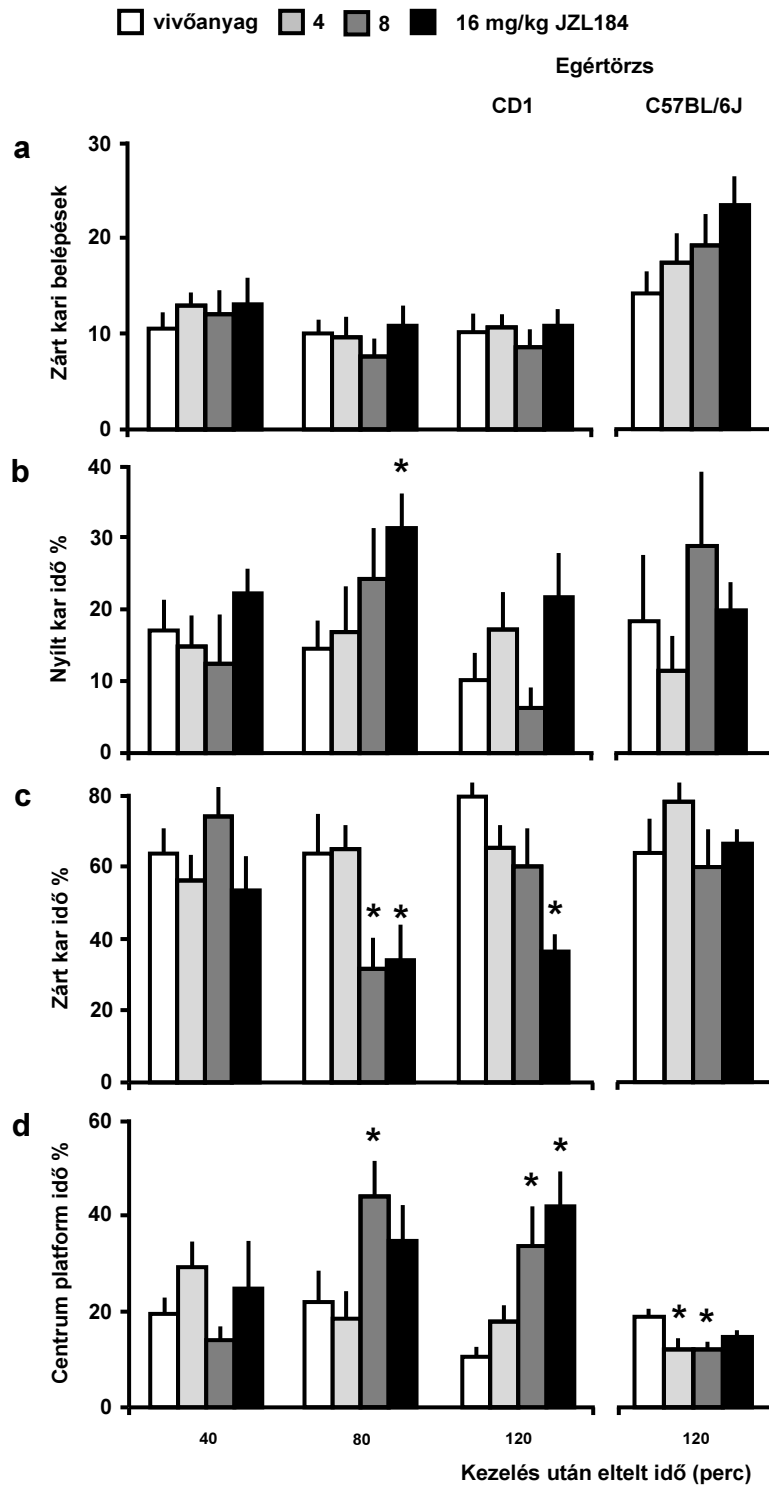
A kísérlet során a JZL184 40 perccel a kezelés után nem befolyásolta a lokomotoros aktivitást ($F(3,22) = 0,24; p = 0,86$), de 80, illetve 120 perces előkezelési idő után szignifikáns növekedést okozott (80 perc: $F(3,35) = 3,14; p = 0,03$; 120 perc: $F(3,35) = 4,21; p = 0,01$) (13a. ábra). A centrum területre való belépések száma a kezelés után nem mutatott szignifikáns változást (40 perc: $F(3,22) = 1,64; p = 0,21$; 80 perc: $F(3,35) = 0,59; p = 0,62$; 120 perc: $F(3,35) = 1,01; p = 0,4$) (13b. ábra). Hasonlóképpen a centrum területen töltött idő sem változott a kezelésekre hatására (40 perc: $F(3,22) = 1,95; p = 0,15$; 80 perc: $F(3,35) = 0,92; p = 0,44$; 120 perc: $F(3,35) = 1,22; p = 0,31$). A CD1 egerekben tapasztalt lokomotoros aktivitásbeli változások C57BL/6J egerekben is láthatóak voltak, a JZL184-kezelés növelte a nyílt-tér teszt során mutatott vonalkeresztetések számát ($F(3,22) = 2,76; p < 0,06$), ugyan a hatás csak marginális volt (131a. ábra). Ebben a törzsben a centrumba való belépések száma is növekedett ($F(3,23) = 3,26; p = 0,04$) (13b. ábra), a centrumban töltött idő aránya azonban nem változott ($F(3,23) = 1,22; p = 0,33$).



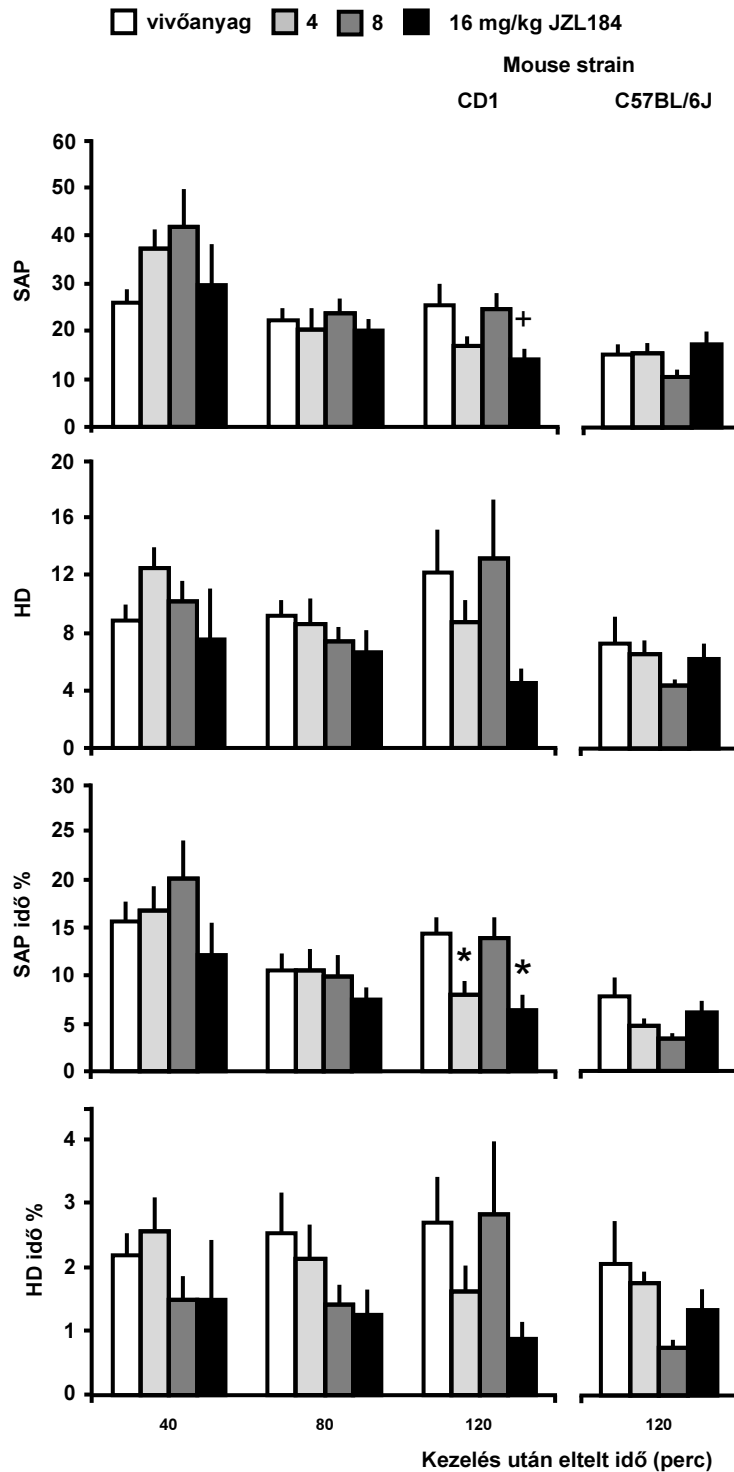
13. ábra. A JZL184-kezelés hatásai a lokomotoros aktivitásra (a) és a szorongásra (b) az OF-en. *, szignifikáns különbség a vivőanyag kezelt csoporttól ($p < 0,05$).

A JZL184-kezelés nem befolyásolta a zárt kari belépések számát az EPM-en, mely alapján valószínűleg a kezelés nem befolyásolja a lokomóciót ebben a tesztben (40 perc: $F(3,18) = 0,36$; $p = 0,78$; 80 perc: $F(3,34) = 0,32$; $p = 0,81$; 120 perc: $F(3,33) = 0,75$; $p = 0,52$) (14a. ábra). A nyílt karban töltött időt a kezelések nem befolyásolták 40perces előkezelési idő után ($F(3,18) = 0,84$; $p = 0,49$). 80, illetve 120 perc esetében azonban egy tendencia mutatkozott a kezelés hatásában ($F(3,34) = 2,36$; $p = 0,9$, illetve $F(3,33) = 2,49$; $p = 0,8$), a post-hoc összehasonlítás során láthatóvá vált, hogy a JZL184 legmagasabb dózisa növelte a nyílt karban töltött idő arányát ($p < 0,02$) (14b. ábra). A nyílt karban töltött idő arányával szemben a zárt karban töltött idő aránya szignifikánsan csökkent 80 és 120 perc előkezelési idő után, 40 perc után azonban nem változott (40 perc: $F(3,18) = 1,13$; $p = 0,36$; 80 perc: $F(3,34) = 4,26$; $p = 0,01$; 120 perc: $F(3,33) =$

3,55; $p= 0,02$) (14c. ábra). A zárt karban töltött idő arányának csökkenése a centrum platformon töltött idő arányának növekedésével járt együtt 80, illetve 120 perces előkezelési idő esetében (40 perc: $F(3,18)= 1,65$; $p= 0,21$; 80 perc: $F(3,34)= 3,69$; $p= 0,02$; 120 perc: $F(3,33)= 6,42$; $p< 0,01$) (14d. ábra). A C57BL/6J egértörzsben a JZL184 hasonló változásokat idézett elő 120 perces előkezelési idő esetében. A zárt kari belépések, a nyílt, illetve zárt kari explorációval töltött idő aránya statisztikailag szignifikáns módon nem változott, a centrum platformon töltött idő arányát a 4, illetve 8 mg/kg dózisban adagolt JZL184 csökkentette (Zárt kari belépések: $F(3,23)= 1,2$; $p= 0,33$; Nyílt kari idő %: $F(3,23)= 1,22$; $p= 0,32$; Zárt kari idő %: $F(3,23)= 0,83$; $p= 0,49$; Centrum platform idő %: $F(3,23)= 3,69$; $p= 0,02$) (14a-d. ábra). A megemelt keresztpalló védett területein mutatott kockázatbecslő magatartás 40 és 80 perces előkezelési idő után nem változott (Frekvencia: 40 perc: SAP: $F(3,18)= 1,62$; $p= 0,22$; HD: $F(3,18)= 1,65$; $p= 0,21$; 80 perc: SAP: $F(3,34)= 0,4$; $p= 0,75$; HD: $F(3,34)= 0,94$; $p= 0,43$; Idő %: 40 perc: SAP: $F(3,18)= 1,07$; $p= 0,39$; HD: $F(3,18)= 1,27$; $p= 0,32$; 80 perc: SAP: $F(3,34)= 0,54$; $p= 0,66$; HD: $F(3,34)= 1,67$; $p= 0,19$) (15. ábra). 120 perccel a kezelés után azonban a JZL184 szignifikánsan csökkentette a SAP-pal töltött idő arányát ($F(3,33)= 4,39$; $p= 0,01$) (15. ábra). A HD-val töltött idő aránya ezzel szemben nem változott ($F(3,33)= 1,42$; $p= 0,25$) (15. ábra). 120 perces előkezelési idő esetében a SAP frekvenciája marginális csökkenést mutatott a JZL184-kezelés hatására ($F(3,33)= 2,83$; $p= 0,5$), a HD frekvenciája azonban nem változott ($F(3,33)= 2,17$; $p= 0,11$) (15. ábra). C57BL/6J egerekben a kockázatbecslő magatartási változók frekvenciája és időaránya nem változott a kezelés után (Frekvencia: SAP: $F(3,23)= 0,68$; $p= 0,57$; HD: $F(3,23)= 0,71$; $p= 0,56$; Idő %: SAP: $F(3,23)= 1,48$; $p= 0,24$; HD: $F(3,23)= 2,29$; $p= 0,10$) (15. ábra).



14. ábra. A JZL184-kezelés hatásai a spatiotemporális magatartási változókra az EPM-en. *Nyílt kar idő %*, a nyílt karban töltött idő aránya; *Zárt kar idő %*, a zárt karban töltött idő aránya; *Centrum platform idő %*, a centrum platformon töltött idő aránya; *, szignifikáns különbség a vivóanyagkezelt csoporttól ($p < 0,05$).

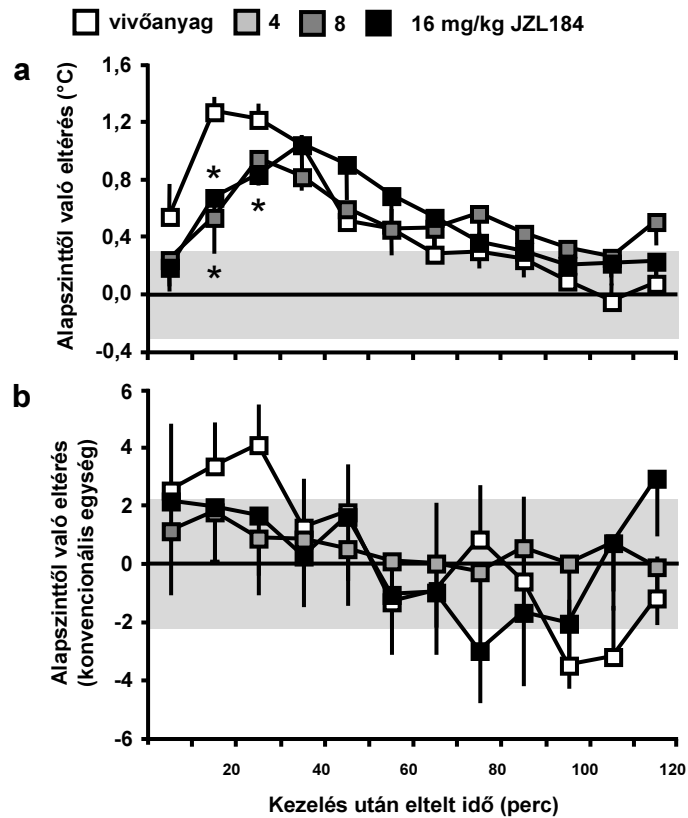


15. ábra. A JZL184-kezelés hatása a kockázatbecslő magatartásra az EPM-en. SAP, feszült figyelmi testhelyzet; HD, lenézés; SAP idő %, feszült figyelmi testhelyzetben töltött idő aránya; HD idő %, lenézéssel töltött idő aránya; *, szignifikáns különbség a vivóanyagkezelt csoporttól ($p < 0,05$); +, szignifikáns különbség a vivóanyagkezelt csoporttól, marginális kezelési hatás esetén ($p < 0,05$).

6.2.2. A MAGL-gátlás magatartási hatásainak idődinamikája kevésbé averzív környezetben CD1 egerekben

A 6. Kísérletben a MAGL inhibíciója ismert környezetben rövid idő alatt tompította az injekció-indukált testhőmérséklet növekedés, illetve eltüntette az injekció által kiváltott változásokat a mozgásmintázatokban.

A 6. Kísérletben az első, második és harmadik kísérleti napokon mért bazális testhőmérséklet-értékek statisztikailag szignifikáns módon nem különböztek ($36,3 \pm 0,23$, $36,1 \pm 0,23$, illetve $36,1 \pm 0,22$ °C; $F_{\text{Kísérleti napok}}(2,21) = 0,2$; $p = 0,81$). Ez alapján valószínűsíthetően a különböző kezelések az adott napokon nem hatottak a következő napi vizsgálatokra. A kezelések után, a JZL184-kezelés hatása és a mérés során eltelt idő hatása között szignifikáns interakciót találtunk ($F_{\text{JZL184*Idő}}(22,165) = 2,02$; $p = 0,007$), mely azt mutatta, hogy a JZL184-kezelés hatásai időfüggőek voltak. A kísérleti nap (azaz a kezelések sorrendje) önmagában nem befolyásolta a testhőmérsékletet ($F_{\text{Kísérleti napok}}(1,15) = 0,566$; $p = 0,4$). Emellett sem a JZL184-kezelést, sem a JZL184-kezelés és a mérés során eltelt idő közötti interakciót nem befolyásolta a kísérleti nap ($F_{\text{Kísérleti nap*JZL184}}(2,15) = 0,203$; $p = 0,8$, illetve $F_{\text{Kísérleti nap*JZL184*Idő}}(22,165) = 0,897$; $p = 0,6$). Maga a kezelés során kapott injekció körülbelül $1,3$ °C-al növelte a testhőmérsékletet, ezt a hatást a JZL184 tompította (16a. ábra). A későbbiekben a csoportok között nem volt látható különbség.

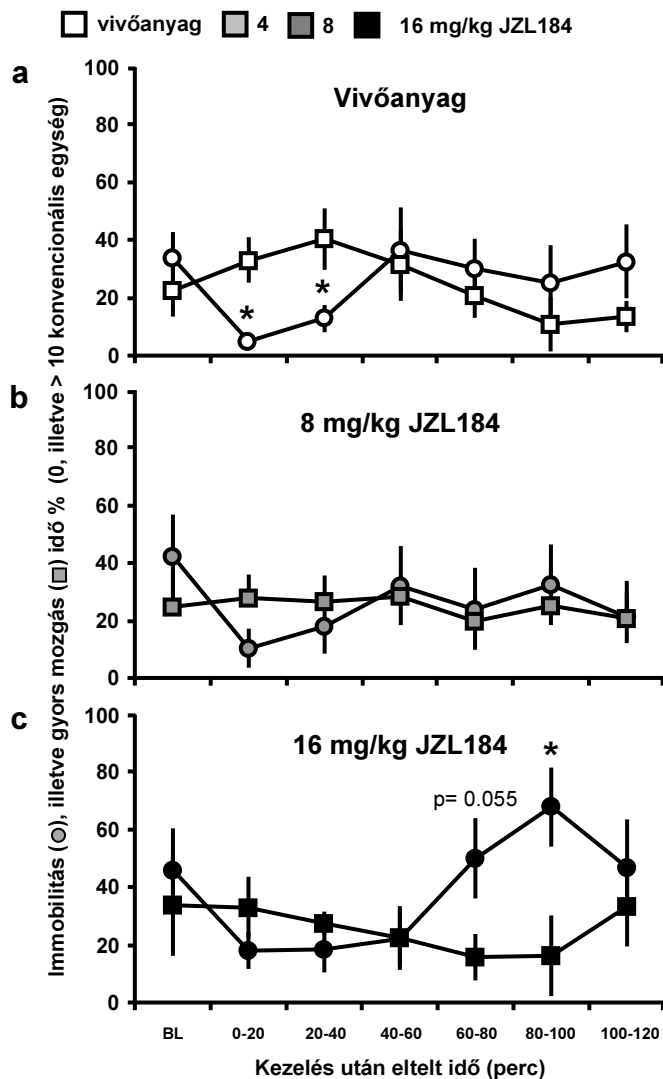


16. ábra. Testhőmérséklet (a), illetve lokomotoros aktivitásbeli változások (b) JZL184-kezelést követően. Az adatokat az alapszinttől való eltérésként ábrázoltuk. *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelte csoporttól ($p < 0,05$)

A saját ketrecben mért bazális lokomotoros aktivitás értékek között nem volt különbség a különböző kísérleti napokon ($5,3 \pm 1,17$, $6,3 \pm 1,73$, illetve $6,7 \pm 2,04$ konvencionális egység az első, második, illetve harmadik kísérleti napokon; $F_{\text{Kísérleti napok}}(2,21) = 0,1$; $p = 0,9$). A vizsgált időszakban a lokomotoros aktivitás szignifikánsan változott ($F_{\text{Idő}}(11,198) = 2,24$; $p = 0,014$), azonban a JZL184 ezeket a változásokat szignifikánsan nem befolyásolta ($F_{\text{JZL184}}(2,18) = 0,013$; $p = 0,98$; $F_{\text{JZL184*Idő}}(22,198) = 0,81$; $p = 0,7$) (16b. ábra). Hogy a saját ketrecben, illetve a nyílt-tér tesztben mért lokomotoros aktivitás adatok összevethetőek legyenek, egy külön elemzést végeztünk a 40 és 45, a 80 és 85, illetve a 120 és 125 perces időszakokban, azaz azokban az intervallumokban, melyekben a nyílt-tért tesztben vizsgáltuk a lokomotoros aktivitás

hatásait (5. *Kísérlet*). A JZL184-kezelés nem befolyásolta a mozgásaktivitást ezekben a periódusokban (40-45 perc: $F(2,21) = 0,03$; $p = 0,98$; 80-85 perc: $F(2,21) = 0,46$; $p = 0,79$; 120-125 perc: $F(2,21) = 0,31$; $p = 0,85$).

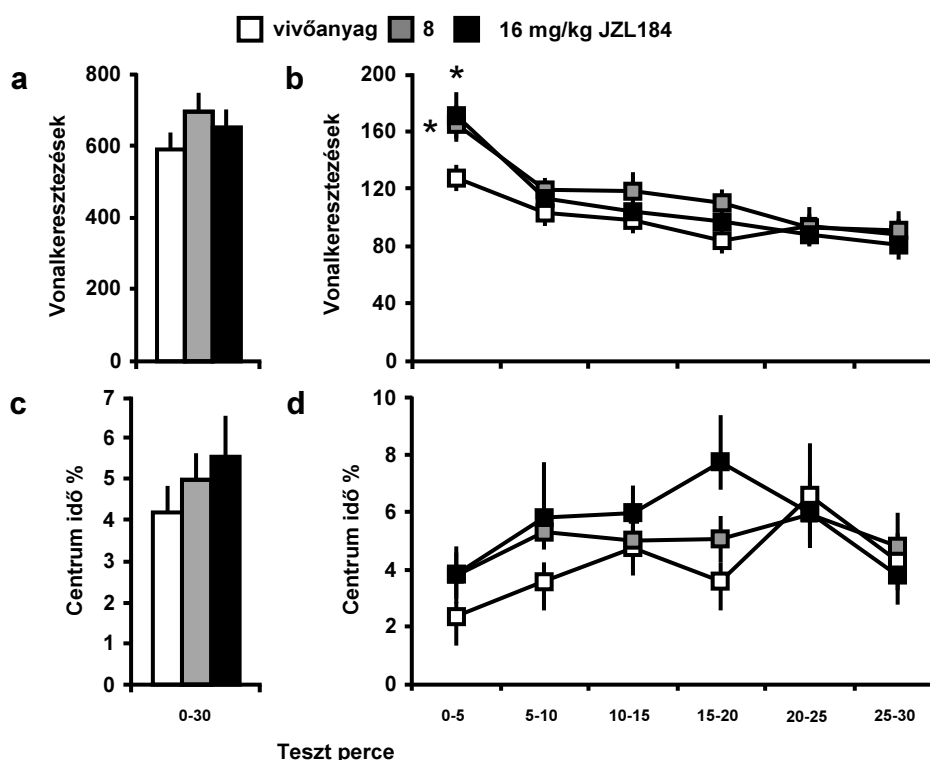
Az immobilis, illetve gyors mozgással töltött periódusokat vizsgálva azt találtuk, hogy a vivőanyaginjekciók hatására a mozgásaktivitás nőtt a gyors mozgással töltött időszakok arányának növekedésével, illetve az immobilis időszakok arányának csökkenésével ($F_{\text{Mozgás típus} \times \text{Idő}}(6,84) = 2,90$; $p = 0,013$; 17a. ábra). Ez a változás 8 mg/kg JZL184-el való kezelés után nem volt látható ($F_{\text{Idő}}(6,84) = 0,31$; $p = 0,9$; $F_{\text{Mozgás típus}}(1,84) = 1,13$; $p = 0,29$; $F_{\text{Mozgás típus} \times \text{Idő}}(6,84) = 0,82$; $p = 0,6$; 17b. ábra). 16 mg/kg JZL184-kezelés után, a két faktor közötti interakció statisztikailag szignifikáns volt ($F_{\text{Mozgás típus} \times \text{Idő}}(6,84) = 2,23$; $p = 0,04$), így a kezelési csoportokat páronként összehasonlítottuk. Az összehasonlítások alapján láthatóvá vált, hogy a vizsgált periódus végén a 16 mg/kg JZL184-kezelés növelte az immobilisan töltött periódusok arányát, míg csökkentette a gyors mozgással töltött időszakok arányát (17c. ábra). Megvizsgáltuk továbbá a kezelési sorrend hatásait is, azonban statisztikailag szignifikáns hatást nem tapasztaltunk (az ANOVA F-értékei az „Idő” faktor tekintetében 0,19 és 0,96, míg a p-értékek 0,45 és 0,97 között változtak; a „Kezelési sorrend” tekintetében az F-értékek 0,02 és 1,11, a p-értékek 0,29 és 0,88 között alakultak; a két faktor interakciója esetében, az F- és p-értékek 0,11 és 0,49, illetve 0,81 és 0,99 között változtak).



17. ábra. A lokomotoros aktivitás nélküli (immobilitás), illetve a 10 konvencionális egységet meghaladó (gyors mozgás) periódusok mértéke a *6a. Kísérletben*. Az immobilitást, illetve a gyors mozgást 10 perces időintervallumonként összegezve adtuk meg az x-tengelyen. *BL*, bazális szint; *körök*, immobilitással töltött időszakok összege az adott időintervallumban; *négyzetek*, gyors mozgással töltött időszakok összege az adott időintervallumban; *, szignifikáns különbség a gyors mozgáshoz képest ($p < 0,05$).

A *6b. Kísérletben* lokomotoros aktivitást a JZL184-kezelés nem befolyásolta ($F(2,30) = 2,25$; $p = 0,32$) (18a. ábra). Ellenben, a teljes vizsgált időszak 5 perces periódusokban való elemzése során láthatóvá vált, hogy a JZL184 a teszt első 5 percében növelte a lokomotoros aktivitást ($F_{Idő*JZL184}(10,135) = 2,16$; $p = 0,02$) (18b.

ábra). A szorongást indikáló változók a kezelés után nem mutattak statisztikailag szignifikáns változást (*Teljes teszt időszak*: Centrum belépések: $F(2,30) = 1,98$; $p = 0,37$; Centrum idő %: $F(2,30) = 0,59$; $p = 0,74$); *5 perces szakaszok elemzése*: Centrum belépések: $F_{JZL184}(2,27) = 1,38$; $p = 0,26$; $F_{JZL184*Idő}(10,135) = 1,22$; $p = 0,28$; Centrum idő %: $F_{JZL184}(2,27) = 0,73$; $p = 0,48$; $F_{JZL184*Idő}(10,135) = 1,29$; $p = 0,24$) (18c-d. ábra).

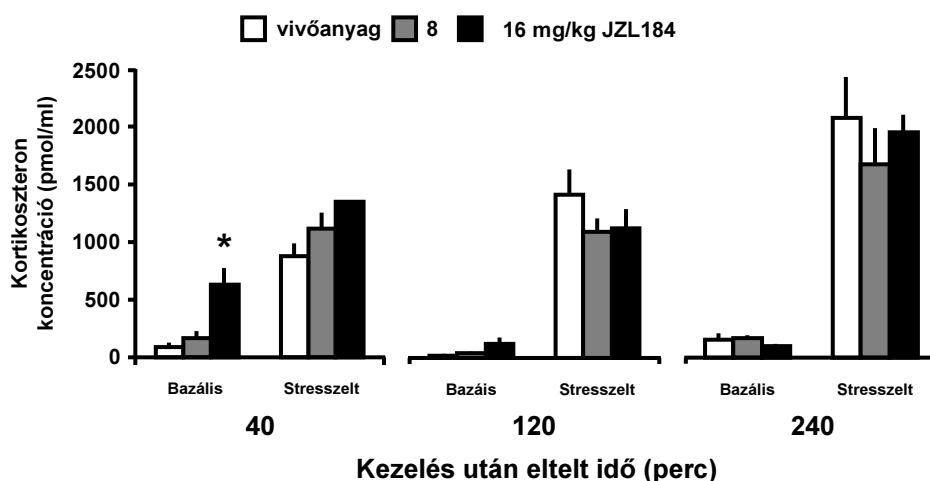


18. ábra. A JZL184-kezelés magatartási hatásai az OF-en 4 napos habituációt követően. A lokomotoros aktivitás változása a teszt teljes ideje alatt (a). A lokomotoros aktivitás változása a teszt során 5 perces periódusokra lebontva (b). A szorongás a teszt teljes ideje alatt (c). A szorongás a teszt során 5 perces periódusokra lebontva (d). *Centrum idő %*, a centrumban töltött idő aránya; *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól ($p < 0,05$).

6.2.3. A MAGL-gátlás hatása a bazális és stressz-indukált HPA-tengely aktivitásra CD1 egerekben

A 7. Kísérletben a MAGL-aktivitás gátlása rövid idő alatt növelte a bazális kortikoszteronszintet, a stressz-indukált szintet ellenben nem befolyásolta.

A 7a. Kísérletben statisztikailag szignifikáns interakció volt látható a JZL184-kezelés és az úszás stressz hatása között ($F_{JZL184*Stressz} (2,45) = 4,71; p = 0,013$). A JZL184 legmagasabb dózisa 40 perccel a kezelés után növelte a bazális kortikoszteronszintet, ezzel szemben a stressz-indukált szintet szignifikánsan nem befolyásolta annak ellenére, hogy gyenge növekedés volt látható a kezelés hatására (19. ábra). A 7b., illetve a 7c. Kísérletben a JZL184-kezelés nem befolyásolta a kortikoszteron alapszintet (120 perc: $F_{JZL184} (2,16) = 0,76; p = 0,48$; $F_{JZL184*Stressz} (2,16) = 1,30; p = 0,29$; 240 perc: $F_{JZL184} (2,20) = 0,43; p = 0,65$; $F_{JZL184*stressz} (2,20) = 0,58; p = 0,56$). Az úszás stressz minden előkezelési idő esetében növelte a kortikoszteronszintet (40 perc: $F_{Stressz} (1,45) = 227,21; p < 0,01$; 120 perc: $F_{Stressz} (1,16) = 118,35; p < 0,01$; 240 perc: $F_{Perc} (1,20) = 117,53; p < 0,01$) (19. ábra). A kényszerített úszás alatti magatartást a JZL184-kezelés nem befolyásolta (6. táblázat).



19. ábra. A JZL184-kezelés hatásai a bazális és stresszindukált kortikoszteronszintre 40, 120, illetve 240 perccel a kezelés után. *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól ($p < 0,05$).

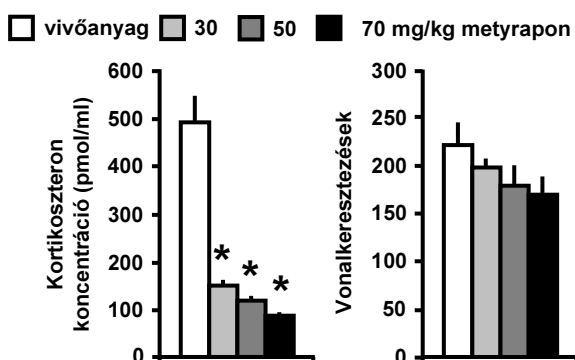
6. táblázat. Magatartási változók a 7. Kísérletben.

Előkezelési idő	Változó	Vivőanyag	8 mg/kg JZL184	16 mg/kg JZL184	ANOVA F- és p-érték
40 min	Lebegés idő %	60,21±6,52	68,54±4,34	54,11±10,14	$F(2,21) = 0,85; p = 0,44$
	Küzdés idő %	12,56±2,86	10,2±2,41	12,58±4,11	$F(2,21) = 0,16; p = 0,84$
	Úszás idő %	22,57±4,66	17,22±2,21	28,36±7,01	$F(2,21) = 1,07; p = 0,35$
120 min	Lebegés idő %	72,36±5,12	64,91±5,07	57,55±10,55	$F(2,16) = 0,90; p = 0,42$
	Küzdés idő %	7,48±1,7	9,08±1,61	10,25±3,58	$F(2,16) = 0,28; p = 0,75$
	Úszás idő %	16,8±3,62	21,51±3,96	27,72±6,48	$F(2,16) = 1,19; p = 0,32$
240 min	Lebegés idő %	83,88±1,72	73,91±3,84	80,4±3,41	$F(2,18) = 1,04; p = 0,37$
	Küzdés idő %	4,82±0,68	10,13±2,57	5,77±1,59	$F(2,18) = 0,11; p = 0,89$
	Úszás idő %	8,57±1,02	12,38±1,87	10,87±1,67	$F(2,18) = 1,28; p = 0,30$

6.2.4. A MAGL-gátlás HPA-tengely függő magatartási hatásai CD1 egerekben

A 8. Kísérletben a MAGL-gátlás növelte a bazális kortikoszteron szintet. A kortikoszteronszint-növelő hatás másodlagosan szorongásoldó hatást okozott. A MAGL-gátlás emellett növelte a lokomóciót, illetve csökkentette a kockázatbecslő magatartást, ezek a hatások azonban függetlenek voltak a kortikoszteronszintre gyakorolt hatástól.

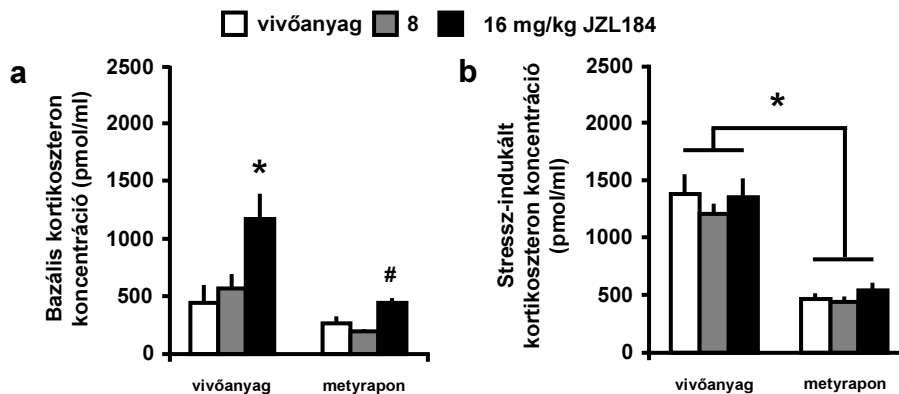
A 8a. Kísérletben a metyrapon az összes alkalmazott dózisban jelentősen csökkentette a vérplazma kortikoszteronszintjét ($F(3,20) = 44,62$; $p < 0,01$), míg a lokomotoros aktivitást nem befolyásolta ($F(3,20) = 0,145$; $p = 0,26$) (20. ábra). Tapasztalataink alapján további kísérleteinkhez a drogbevitel minimalizálásának érdekében a metyrapont a legkisebb dózisban (30 mg/kg) alkalmaztuk, mely még képes a kortikoszteronszint hatékony csökkentésére.



20. ábra. A metyrapon-indukált kortikoszteron-szintézis gátlás hatása a bazális kortikoszteronszintre, illetve a lokomotoros aktivitásra az OF-en. *, szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporthoz képest ($p < 0,05$).

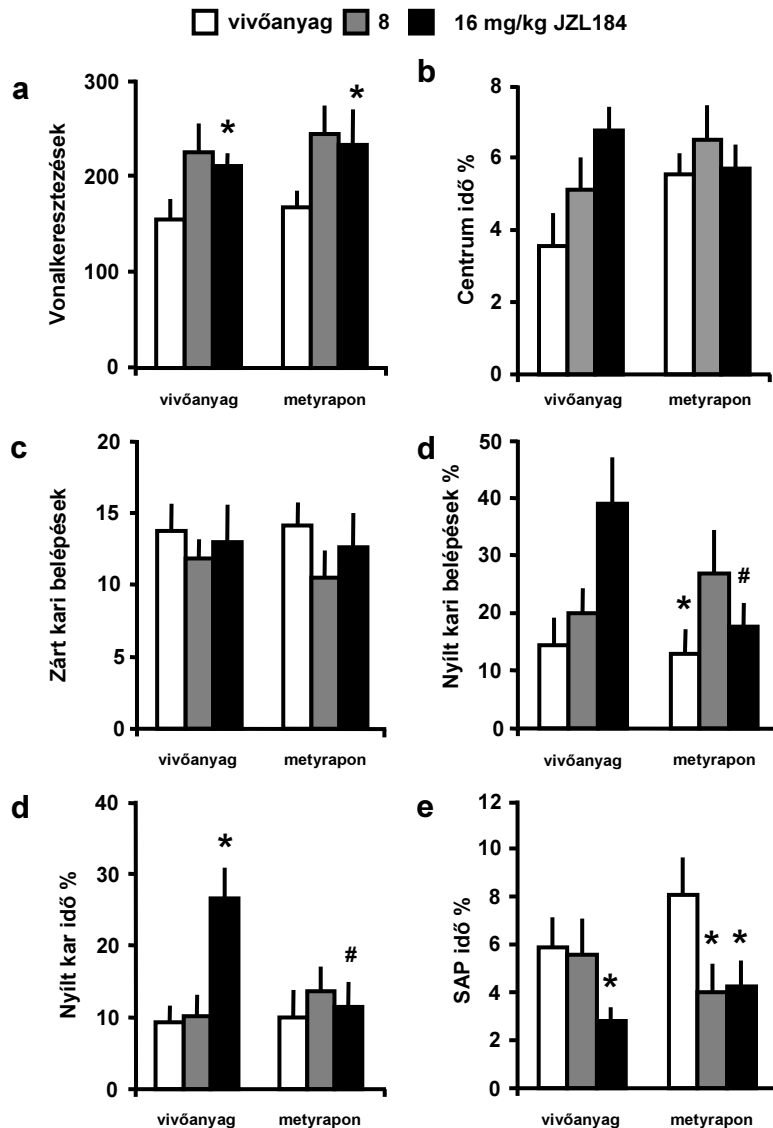
A 8b. Kísérletben a JZL184-kezelés 40 perccel az injekció után növelte a kortikoszteron alapszintet ($F_{JZL184}(2,52) = 13,38$; $p < 0,01$). Ezzel szemben a metyraponkezelés minden kezelési csoportban csökkentette a kortikoszteronszintet ($F_{Metyrapon}(1,52) = 32,67$; $p < 0,01$). A JZL184 és a metyraponkezelés között hatása között statisztikailag szignifikáns interakció volt ($F_{JZL184 * Metyrapon}(2,52) = 4,44$; $p = 0,01$), ugyanis a metyraponkezelés képes volt kivédeni a JZL184-kezelés kortikoszteron-növelő hatását (21a. ábra). A stressz-indukált kortikoszteronszintet a JZL184 nem befolyásolta, azokat csak a metyraponkezelés csökkentette ($F_{JZL184}(2,50) = 0,73$; $p =$

0,48; $F_{\text{Metyrapone}}(1,50) = 75,73$; $p < 0,01$; $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,50) = 0,19$; $p = 0,82$) (21b. ábra).



21. ábra. A JZL184-, illetve metyraponekezelés hatásai a bazális (a) és a stressz-indukált kortikoszteronszintre (b). *, szignifikáns különbség a vivőanyag kezelt csoporttól ($p < 0,05$)

A 8c. Kísérletben a JZL184-kezelés szignifikánsan megnövelte a lokomotoros aktivitást a nyílt-tért tesztben ($F_{\text{JZL184}}(2,48) = 4,09$; $p = 0,02$). A hatás kortikoszteron-szintézistől független módon zajlott le, ugyanis a metyraponekezelés nem befolyásolta a JZL184 hatását ($F_{\text{Metyrapone}}(1,48) = 0,14$; $p = 0,70$; $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,48) = 0,21$; $p = 0,80$) (21b. ábra). A megemelt keresztállás tesztben sem a JZL184, sem a metyraponekezelés nem befolyásolta a zárt kari belépések számát ($F_{\text{JZL184}}(2,48) = 1,04$; $p = 0,35$; $F_{\text{Metyrapone}}(1,48) = 0,08$; $p = 0,75$; $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,48) = 0,09$; $p = 0,91$) (21c. ábra). A legnagyobb alkalmazott dózisban a JZL184 mind a nyílt kari belépések arányát ($F_{\text{JZL184}}(2,48) = 3,29$; $p = 0,04$) (21d. ábra), mind a nyílt karban töltött idő arányát növelte ($F_{\text{JZL184}}(2,48) = 3,81$; $p = 0,02$) (21e. ábra). A hatások kortikoszteron-szintézis függőnek bizonyultak, ugyanis a metyraponeval kezelt csoportok esetében ezek a változások nem voltak láthatóak (Nyílt kari belépések %: $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,48) = 3,27$; $p = 0,04$; Nyílt kari idő %: $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,48) = 4,04$; $p = 0,02$). (21d-e. ábra). A JZL184-kezelés emellett csökkentette a megemelt keresztállás védett területein mutatott kockázatbecslő magatartást is (SAP idő %: $F_{\text{JZL184}}(2,48) = 3,55$; $p = 0,03$; HD idő %: $F_{\text{JZL184}}(2,48) = 2,62$; $p = 0,08$, marginális tendencia), ezek a változások azonban függetlenek voltak a kortikoszteron-szintézistől (SAP: $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,30) = 1,30$; $p = 0,28$; HD: $F_{\text{JZL184} * \text{Metyrapone}}(2,30) = 0,14$; $p = 0,86$) (21f. ábra). A 8c. Kísérletben vizsgált változók kezelési csoportonkénti értékeit az 7. táblázat foglalja össze.



22. ábra. A JZL184-, illetve metyraponkezelés hatásai a magatartásra az OF-en (a-b) és az EPM-en (c-f). *Centrum idő %*, centrumban töltött idő aránya; *Nyílt kari belépések %*, nyílt kari belépések aránya (nyílt kari belépések/összes kari belépés); *Nyílt kar idő %*, nyílt karban töltött idő aránya; *SAP idő %*, feszült figyelmi testhelyzet időaránya. Minden panelen a bal oldali három oszlop a három vivőanyag-, míg a jobboldali három oszlop a három 30 mg/kg metyraponkezelést jelöli. *, szignifikáns különbség a vivőanyag kezelt csoporttól ($p < 0.05$); #, szignifikáns különbség a metyrapon vivőanyagával és a 16 mg/kg-os JZL184 dózissal kombináltan kezelt csoporttól ($p < 0,05$).

7. táblázat. Változók csoportonkénti értékei a 8c. Kísérletben. A statisztikailag szignifikáns kezelési hatást félkövéren szedett szöveg jelzi

Változó	Vivőanyag- Vivőanyag	Vivőanyag - JZL184 8 mg/kg	Vivőanyag - JZL184 16 mg/kg	Metyrapon- Vivőanyag	Metyrapon- JZL184 8 mg/kg	Metyrapon- JZL184 16 mg/kg	ANOVA F és p érték
<i>Kortikoszteron alapszint</i>	475.37±19.29	617.44±23.27	1445.05±37.39	267.47±14.81	153.03±11.66	465.2±21.25	F _{JZL184} (2,54)= 17.43; p< 0.01 F _{Metyrapone} (1,54)= 31.08; p< 0.01 F _{JZL184*Metyrapone} (2,52)= 4.44; p= 0.01 F _{JZL184} (2,50)= 0.73; p= 0.48 F _{Metyrapone} (1,50)= 75.73; p< 0.01 F _{JZL184*Metyrapone} (2,50)= 0.19; p= 0.82
<i>Stressz-indukált kortikoszteron</i>	1374.95±175.4	1206.76±87.62	1348.87±164.14	464.91±52.79	439.76±48.15	542.31±64.02	F _{JZL184} (2,48)= 4.09; p= 0.02 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.14; p= 0.70 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.21; p= 0.80 F _{JZL184} (2,48)= 1.04; p= 0.35 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.08; p= 0.75 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.09; p= 0.91
<i>Vonalkeresztések</i>	154±22.03	223.8±30.17	209.75±13.1	167.77±16.01	242.6±30.89	231.55±36.66	F _{JZL184} (2,50)= 3.08; p= 0.05 F _{Metyrapone} (1,50)= 0.15; p= 0.69 F _{JZL184*Metyrapone} (2,50)= 1.26; p= 0.29 F _{JZL184} (2,48)= 1.15; p= 0.32 F _{Metyrapone} (1,48)= 1.35; p= 0.25 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.79; p= 0.45
<i>Zárt kari belépések</i>	13.75±7.91	11.8±1.38	13±2.54	14.11±1.61	10.5±1.84	12.55±2.41	F _{JZL184} (2,48)= 3.21; p= 0.04 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.14; p= 0.71 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.03; p= 0.96 F _{JZL184} (2,48)= 2.26; p= 0.11 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.81; p= 0.37 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 1.68; p= 0.19
<i>Zárt kar idő %</i>	73.53±5.99	72.29±6.29	56.43±7.33	52.81±8.83	54.64±7.82	69.9±5.61	F _{JZL184} (2,48)= 3.81; p= 0.02 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.87; p= 0.35 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 4.04; p= 0.02 F _{JZL184} (2,48)= 3.29; p= 0.04 F _{Metyrapone} (1,50)= 0.64; p= 0.42 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 3.27; p= 0.04 F _{JZL184} (2,48)= 1.73; p= 0.18 F _{Metyrapone} (1,48)< 0.01; p= 0.99
<i>Centrum platform belépések</i>	16.25±2	16.88±2.2	15.4±1.73	14.7±2.49	21.1±2.04	15.88±3.1	F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 1.23; p= 0.29 F _{JZL184} (2,48)= 3.55; p= 0.03 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.31; p= 0.57 F _{JZL184*Metyrapone} (2,30)= 1.30; p= 0.28 F _{JZL184} (2,48)= 1.78; p= 0.18 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.05; p= 0.82 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.54; p= 0.58 F _{JZL184} (2,48)= 2.62; p= 0.08 F _{Metyrapone} (1,48)< 0.01; p= 0.97 F _{JZL184*Metyrapone} (2,30)= 0.14; p= 0.86
<i>Centrum platform idő %</i>	16.68±4.49	17.16±7.06	33.01±6.74	33.15±9.17	21.17±4.26	18.05±4.56	F _{JZL184} (2,48)= 0.64; p= 0.53 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.25; p= 0.61 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 1.08; p= 0.34 F _{JZL184} (2,48)= 0.19; p= 0.82 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.93; p= 0.33 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 2.16; p= 0.12 F _{JZL184} (2,48)= 1.63; p= 0.2 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.69; p= 0.41 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.74; p= 0.48 F _{JZL184} (2,48)= 1.57; p= 0.21 F _{Metyrapone} (1,48)= 0.98; p= 0.32 F _{JZL184*Metyrapone} (2,48)= 0.31; p= 0.73
<i>Nyílt kari belépések</i>	2.25±0.79	3.2±0.91	7.5±1.7	2.66±0.94	4±1.22	3±0.95	
<i>Nyílt kar idő %</i>	9.18±2.51	10.01±3.2	26.5±4.27	9.33±3.78	13.48±3.44	11.46±3.41	
<i>Nyílt kari belépések %</i>	0.14±0.04	0.2±0.04	0.39±0.08	0.13±0.04	0.27±0.07	0.18±0.04	
<i>Védett SAP</i>	13.25±3.2	15.77±2.61	16.1±3.39	11.3±2.06	9.1±1.2	10.78±2.12	
<i>Védett SAP idő %</i>	5.86±1.29	5.58±1.47	2.83±0.69	8.05±1.54	4.03±1.14	4.28±1.01	
<i>Védett HD</i>	15.37±2.45	14.55±3.86	11.2±2.64	10.4±1.77	8.9±1.66	12.33±2.55	
<i>Védett HD idő %</i>	4.66±0.7	3.07±0.66	2.67±0.54	4.25±0.87	3.33±0.78	2.98±0.71	
<i>Nyílt kari SAP</i>	0.5±0.38	0.33±0.33	0.2±0.13	1.6±1.08	0.7±0.3	0.89±0.56	
<i>Nyílt kari SAP idő %</i>	0.12±0.08	0.11±0.11	0±0	0.48±0.29	0.16±0.09	0.13±0.07	
<i>Nyílt kari HD</i>	4.37±1.59	4±1.55	6.8±2.22	7.7±2.52	9.9±2.03	5.33±1.85	
<i>Nyílt kari HD %</i>	0.95±0.34	0.85±0.42	1.37±0.42	1.22±0.36	2.06±0.51	1.32±0.53	

7. MEGVITATÁS

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

A környezet averzivitásának 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 (Koolhaas és mtsai., 2007; Koolhaas és mtsai., 1999). Ezt a feltevést bizonyították megfigyeléseink a megküzdést vizsgáló farokcsípés 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, akár csak 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.

Eredményeink alapján több az irodalomban leírt, ellentmondó és kontextusfüggő kannabinoidhatás is magyarázható. Naidu és kollégái például csak averzív körülmények között találtak szorongásoldó hatást fokozott AEA jelátvitel esetében (Naidu és mtsai., 2007), illetve kutatócsoportunk is leírta egy korábbi munkájában, hogy a FAAH-aktivitás gátlása eltérően averzív tesztkörülmények között eltérő irányban befolyásolja a szorongást (Haller és mtsai., 2009). Jelen munkánk szerint is hasonló a FAAH-inhibíció EPM-en mutatott magatartásra kifejtett hatása, kevésbé averzív körülmények között a kezelés anxiogén hatású, míg averzívabb kontextusban ezzel ellentétesen, oldja a

szorongást. Valószínűleg azonban a kezelés hatásai csak látszólagosan ellentmondásosak: a FAAH-aktivitás gátlása valójában nem specifikusan a szorongás mértékét befolyásolta, hanem azt egy köztes szintre állította be, függetlenül a környezeti körülményektől. Másképp fogalmazva a kezelés tompította a magatartási választ, amelyet az állatok a környezet averzivitásának változásaira adtak, és ez a hatás – tévesen – a szorongásra kifejtett ellentmondó hatásokként is detektálható. A hatást egerekben is kimutattuk, az kényszerített úszás paradigmában az alanyok kevésbé reagáltak a környezet averzivítására FAAH-inhibíció esetén. A hatás ez alapján feltehetőleg többé-kevésbé általános, ugyanis eltérő rágcsálómódellekben is jelentkezik. Ez különösen annak a fényében érdekes tapasztalat, hogy az egerek és patkányok emocionális magatartását, elsősorban szorongását szabályozó agyterületek kannabinoid érzékenysége fajfüggő módon eltérő, mely megegyező kannabinoidkezelést követően ellentmondó hatásokhoz vezethet a két faj között (Haller és mtsai., 2007). A FAAH inhibíciója által indukált, tompult környezeti reaktivitásért feltehetőleg nem az érzékek tompultsága felel. Ez egyrészt az alapján feltételezhető, hogy az megemelt keresztpallón a lokomotoros aktivitást nem befolyásolta a fokozott AEA jelátvitel, illetve azt a környezeti averzivitás változása a kezelési csoporttól függetlenül enyhén csökkentette. Továbbá az egereken végzett vizsgálat esetében a környezet változásait az alanyok egy másik érzékszervükkel tudták detektálni, mint a korábbi, patkányokon végzett kísérletben (látásuk helyett hőérzékelésükkel), a hatás pedig ebben az esetben is fennállt. Mindez alapján valószínű, hogy a FAAH-aktivitás gátlása a kísérletekben nem egyes érzékeket befolyásolt, és nem ez által tompította a kontextus változásaira adott magatartási választ.

Figyelembe véve az endokannabinoid jelátvitel neurobiológiai funkcióját, azaz az egyes neuronok túlzott aktivációjának tompítását (Wilson és Nicoll, 2001), akár az is feltételezhető, hogy az endokannabinoid rendszer nagyobb léptékben tekintett funkciója a környezeti stimulusok által kiváltott túlzott reakciók tompítása lehet, azaz a környezeti reaktivitás csökkentése, mely hatására inkább belülről vezérelt mechanizmusok kerülnek előtérbe az egyed magatartásának kialakítása során. Ezt a feltevést egyes korábbi vizsgálatok is erősíthetik, melyek szerint az endokannabinoid jelátvitel hozzájárul az emocionális homeosztázishoz (Marco és Viveros, 2009), illetve egyfajta

emocionális puffrendszerként funkcionál, ami biztosítja az averzív környezeti ingereknek megfelelő válaszadást (Ruehle és mtsai., 2012).

A környezeti stimulusokra adott válaszok intenzitásában kialakult csökkenés, a válaszok kialakításakor a belülről vezérelt folyamatok jelentőségének növekedése elképzelhető, hogy a megküzdési stratégiákban bekövetkezett változásokkal magyarázható, ugyanis az aktív megküzdési stratégia egyik fontos jellemzője a csökkent magatartási flexibilitás, illetve hogy a magatartási választ rutin vezérli, a környezet pedig kevésbé befolyásolja (Bohus és mtsai., 1987; Koolhaas és mtsai., 2007; Koolhaas és mtsai., 1999). Elképzelhető tehát, hogy a fokozott AEA jelátvitel aktív megküzdési stratégiát alakít ki. Egyes korábbi tanulmányok indirekt bizonyítékai alapján is feltételezhetjük, hogy a fokozott endokannabinoid-funkció az aktív stratégia felé tolja a magatartási választ. Például a gátolt endokannabinoid jelátvitelű CB₁ KO egerek képtelenek a félelmi kondicionálás során a passzív válaszmintázatról átállni az aktív mintázatra, mely átállás az endokannabinoid-funkció Δ^9 -THC-kezeléssel történő fokozásával előidézhető (Metna-Laurent és mtsai., 2012). Továbbá McLaughlin és munkatársai vizsgálatai szerint a FAAH-aktivitás gátlásának hatására az aktív magatartási válasz erősödik a kényszerített úszás tesztben (McLaughlin és mtsai., 2012). Vizsgálataink is a fenti feltevést igazolták, ugyanis a FAAH inhibíciója a környezeti változásokra adott magatartási válasz tompítása mellett problémaorientált megküzdést alakított ki, ha az alany kihívással szembesült. Ezek a hatások mind az jelzik, a FAAH aktivitás gátlásával fokozott AEA jelátvitel hatására a rágcslók elsősorban aktív megküzdési stratégiát választva felelnek meg a környezeti kihívásoknak. A hatások feltehetőleg valóban specifikusan a megküzdési stratégiákra irányulnak, ugyanis vizsgálatainkban azok nem a fájdalomérzet változásaival függtek össze, még ha a FAAH-aktivitás befolyásolja is a fájdalomküszöböt egyes tanulmányok szerint (Jayamanne és mtsai., 2006; Maione és mtsai., 2006). Hasonlóképpen a hatások specificitását sugallja az a megfigyelés is, hogy bár a FAAH-aktivitás gátlása anxiolitikus hatást is kifejtethet (Bambico és mtsai., 2012; Kathuria és mtsai., 2003; Lisboa és mtsai., 2008; Moise és mtsai., 2008; Moreira és mtsai., 2008; Patel és Hillard, 2006; Piomelli és mtsai., 2006; Rubino és mtsai., 2008b; Scherma és mtsai., 2008), vizsgálatainkban az aktív stratégia nem a kezelés másodlagos hatásaként, a szorongás mértékének csökkenése miatt erősödött. A hatások továbbá nem csak a megküzdési

stratégiára való specificitását bizonyították be, hanem azt is, hogy azok a CB₁R aktiválódásán keresztül valósulnak meg.

Alapkutatási 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 (Kessler és mtsai., 1985; Koolhaas, 2008). Több pszichiátriai zavar esetében az aktív megküzdési stratégia előtérbe helyezése fontos eleme a terápiának (Cooke és mtsai., 2007; Westerhuis és mtsai., 2011). 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 (Breslau, 2009; Kessler és mtsai., 2005), 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 (Bastien, 2010; Cukor és mtsai., 2009).

7.2. 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 egértörzsben 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 eltüntette 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 röviddel 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 kortikoszteronszintézistől, míg szorongásoldó hatásaiért részben a MAGL inhibíció által megnövelt kortikoszteron alapszint lehet felelős, ugyanis ezek a hatások a kortikoszteron-szintézis gátlásakor nem jelentkeztek.

A MAGL-aktivitás gátlása tanulmányainkban növelte a lokomotoros aktivitást az OF tesztben, ha a tesztkörnyezethez előzetesen nem szoktattuk hozzá az alanyokat. Előzetes hozzászoktatás esetében bár a kezelés nem befolyásolta a mozgásaktivitást, a teszt korai szakaszában rövid ideig tartó emelkedést okozott a lokomócióban. Nagy valószínűség szerint a tapasztalt lokomotoros hatások általánosnak tekinthetők egerekben, ugyanis mindkét vizsgált egértörzsből, mind a CD1, mind a C57BL/6J törzsekben kialakultak. Az OF-en tapasztalt lokomotoros hatások némiképp ellentmondanak egyes irodalmi adatoknak, miszerint a MAGL-aktivitási inhibíciója hipolokomóciós hatást okoz (Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b; Long és mtsai., 2009c). Long és munkatársai több tanulmányukban is tapasztalták ezt a hatást a MAGL enzim inhibícióját követően, mely mellett a fájdalomcsillapító és a hypothermikus hatást is kimutatták, mint „klasszikus” kannabinoid hatásokat (Long és mtsai., 2009a). A kezelés lokomotoros hatásai azonban korántsem egyértelműek tanulmányaikban: míg az említett vizsgálatban a JZL184 16 mg/kg-os dózisa által indukált MAGL-gátlás hatására az egerek a tesztelés idejének mintegy 50%-át mozdulatlanul töltötték, addig ugyanennek a kutatócsoportnak egy későbbi publikációjában a kezelés már hasonló kataleptikus hatást nem váltott ki, a hipolokomóciós hatás csupán a nyílt-tér teszt vonalkeresztezéseinek számában bekövetkezett csökkenésként volt tetten érhető (Long és mtsai., 2009b). Ugyanennek a kutatócsoportnak egy harmadik vizsgálatában a kezelés által kiváltott kataleptikus hatást már csak a MAGL és a FAAH enzimek közös gátlásával lehetett elérni, JZL184-indukált MAGL-inhibícióval nem (Long és mtsai., 2009c). Látható tehát, hogy akár egy laboratóriumon belül végzett vizsgálatok esetében is csak irányukban konzisztensek a

hatások, ugyanannak a kezelésnek a lokomotoros aktivitásra gyakorolt hatásait illetően eltérő megfigyelések születhetnek. Árnyalja a MAGL-inhibíció lokomotoros hatásait az a tény is, hogy a hipolokomóciós hatásokat egyelőre csupán egy tanulmányban tudták reprodukálni, ahol a JZL184 egy relatíve magas, 40 mg/kg-os dózisban immobilitást indukált a gyöngytemetés tesztben, ám a tanulmányainkban használt legmagasabb, 16 mg/kg-os JZL184 dózis hatástalannak bizonyult a mozgásaktivitásra (Kinsey és mtsai., 2011). További vizsgálatok egyelőre nem erősítették meg a fenti hipolokomóciós hatásokat (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Sciolino és mtsai., 2011), illetve nem tudtak kimutatni kataleptikus hatást a rotarod tesztben sem (Schlosburg és mtsai., 2009). Továbbá a MAGL genetikai, illetve farmakológiai gátlása nem mutatott kereszttoleranciát a CB₁R agonista WIN55,212-2 kataleptikus hatásaival, míg annak fájdalomcsillapító és hypothermikus hatásaival igen (Schlosburg és mtsai., 2009). Méginkább megkérdőjelezhetőek a JZL184-indukált MAGL-gátlás hipolokomotoros hatásai az alapján, hogy maga a Δ^9 -THC, mely köztudottan csökkenti a mozgásaktivitást (Johnson és mtsai., 1984), egyes tanulmányokban nemfüggő módon hyperlokomóciós hatásokat fejt ki vagy trifázikus hatást gyakorol a lokomotoros aktivitásra (Sanudo-Pena és mtsai., 2000; Wiley, 2003). A lokomotoros hatásokat kevésbé averzív környezetben, az alanyok saját ketrecében vizsgálva hasonlóan érdekes jelenséget tapasztaltunk. Míg a MAGL-aktivitás gátlása a vizsgált időintervallum alatt nem befolyásolta a teljes mozgásaktivitást, tompította az injekció által kiváltott, rövid idő alatt jelentkező lokomotoros aktivációt, míg a vizsgált időszak végén katalepsiára emlékeztető hatásokat okozott. Utóbbi hatás körülbelül abban az időpontban jelentkezett, melyben korábbi tanulmányok is írtak le hasonló hatásokat a MAGL inhibícióját követően (Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b). A JZL184-kezelés ilyen jellegű hatása kontextusfüggőnek tekinthető abban az értelemben, hogy vizsgálataink során ugyanebben az időintervallumban nézve ismeretlen környezetben, az OF tesztben a kezelés ezzel ellentétesen fokozta a mozgásaktivitást. Habár a JZL184-kezelés a vizsgált időszak végén kataleptikus hatásokat okozott, a MAGL-aktivitásban gátolt alanyok általános mozgásaktivitása feltehetőleg azért nem tért el a vivőanyagkezelt állatokétól, mert a MAGL-gátlás hatására az egerek valamivel intenzívebben mozogtak azokban az időszakokban, amikor nem voltak immobilisak ($6,41 \pm 1,52$, illetve $9,60 \pm 2,71$ konvencionális egység a vivőanyag-, illetve 16 mg/kg

JZL184-kezelt alanyoknál). Érdekes kérdéseket vet fel a lokomotoros hatások idődinamikája is. Míg eredményeink szerint ismert környezetben a MAGL-aktivitás gátlása rövid idő alatt tompítja a stressz által indukált, mozgásmintázatokban bekövetkezett változásokat, addig ismeretlen, averzívabb környezetben a lokomotoros hatások csak jóval később jelentkeztek. Mindezzel szemben, későbbi vizsgálatunkban, ahol a MAGL-inhibíció magatartási hatásainak HPA-tengelyműködéssel való interakcióit tanulmányoztuk, ezt a hatást nem sikerült reprodukálnunk, a kezelés által kiváltott hiperlokomóciós hatások ismeretlen környezetben is rövid idő alatt kialakultak. Ezt a jelenséget jelen pillanatban nehéz magyarázni. Elképzelhető, hogy a 2-AG jelátvitel olyan finoman hangolja a környezet által kiváltott magatartási választ, hogy egyes apró, kontrollálhatatlan körülmények is befolyásolhatják a hatások idődinamikáját. Megjegyzendő, egy laboratóriumon belül más kutatócsoportok is tapasztaltak eltéréseket a MAGL-aktivitás gátlásának lokomotoros hatásaiban, ahogy azt a fentiekben részletesebben is olvasható (Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b; Long és mtsai., 2009c). A MAGL inhibíciójának lokomotoros hatásai tehát egyelőre még nem teljesen tisztázottak, a jövőben több ilyen irányú vizsgálatra lesz szükség a 2-AG jelátvitel mozgásaktivitás-szabályozásban betöltött szerepének teljes megértésére.

Vizsgálataink során a MAGL-aktivitás gátlása oldotta a szorongást az EPM tesztben, mely hatás összhangban áll korábbi tanulmányok tapasztalataival (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Kinsey és mtsai., 2011; Sciolino és mtsai., 2011). A hatás azonban nem teljesen egyértelmű. Ugyan 80 perccel a kezelés után a MAGL-inhibíció növelte a nyílt kari explorációval töltött idő arányát, ezt a hatást 2 órával a kezelés után nem tudtuk kimutatni. Ennél az időpontnál, csak a centrum platformon töltött idő arányának növekedését tapasztaltuk, mellyel párhuzamosan csökkent a nyílt karban töltött idő aránya. Utóbbi hatást 80 perc előkezelési idő után is tapasztaltuk. Egyes tanulmányok szerint a centrum terület averzívabbnak tekinthető a zárt karnál, így az itt töltött idő növekedése is a szorongás mértékének csökkenését indikálhatja (Espejo, 1997; Faria és mtsai., 2006; Haller és mtsai., 2007). Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy a kezelés centrumban töltött időre gyakorolt hatása is szorongásoldó hatásként fogható fel, még ha enyhébb hatásról is lehet szó, mint a rövidebb előkezelési idő esetében, ahol a nyílt kari aktivitás mértéke is megemelkedett. A kockázatbecslő

magatartás vizsgálata erősíti ezt a feltételezést, ugyanis a 2 órás előkezelési időnél, ahol a nyílt kari aktivitás nem, csak a centrum platformon mutatott exploráció mértéke növekedett, csökkent egyes kockázatbecslő paraméterek mértéke, mely szintén egy szorongásoldó hatás indikátora. Akárcsak a MAGL-aktivitás gátlásának lokomotoros hatásai, a szorongásra kifejtett hatások is általános hatások lehetnek eltérő egértörzsek között, ugyanis a CD1 törzsbe tartozó alanyaink mellett a C57BL/6J egerek kockázatbecslő magatartásának mértéke is csökkent a JZL184-kezelés hatására, habár a nyílt kari, illetve centrum platformon mutatott exploráció mértéke ebben a törzsben a kezelés után változatlan maradt. Mindezen tapasztalatok alapján feltételezhető, hogy a MAGL aktivitása csökkenti az egrek szorongását az EPM tesztben, bár ez a hatás egyes esetekben enyhe volt és nem volt kimutatható a szorongás összes vizsgált paraméterét tekintve. Sciolino és munkatársai tanulmánya alapján, melyben a MAGL-aktivitás gátlása csak abban az esetben fejtett ki szorongásoldó hatást, ha a tesztkörnyezet averzivitását intenzív megvilágításával növelték, feltételezhető, hogy a vizsgálataink során észlelt hatások erőteljesebbé válnának, ha vizsgálatainkat az alanyok számára averzív körülmények között végeznénk el (Sciolino és mtsai., 2011). A MAGL inhibíciója által fokozott 2-AG jelátvitel szorongásra gyakorolt hatásai hasonló idődinamikával jelentkeztek, mint lokomotoros hatásai, a kezelés után meglehetősen későn alakultak ki, de hosszantartóak voltak. Meglepő módon második vizsgálatunkban, ahol a hatások HPA-tengelyfüggését vizsgáltuk, a szorongásoldás ettől eltérő idődinamikával, előbb jelentkezett. Feltételezhetően ennek a jelenségnek is olyan apró, kísérleti körülmények közti különbségek állhatnak a háttérben, melyek befolyásolhatják a kezelés szorongásra gyakorolt hatásait, de jelen pillanatban nem tudjuk körülhatárolni őket.

A testhőmérséklettel kapcsolatosan tapasztalt hatások kis eltéréssel, de alapvetően összhangban vannak az irodalomban leírtakkal. A JZL184-kezelés a „klasszikus” kannabinoidhatások közül a hypothermiát is előidézte az általunk jelen tanulmányban is alkalmazott dózisban (16 mg/kg JZL84) (Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b). A mi vizsgálatainkban ugyan a bazális testhőmérsékletet nem csökkentette a JZL184-indukált MAGL-inhibíció, azonban *in vivo* biotelemetriás méréseink során tompította az injekció által okozott stressz testhőmérsékletnövelő hatását. Feltételezhető akár az is, hogy a Long és munkatársai által leírt hatások nem is

feltétlenül a bazális testhőmérséklet változásai voltak, hanem az igen averzív rektális hőmérsékletmérés által előidézett hőmérséklet-növekedést tompító hatások, melyet a szerzők hypothermikus hatásként írtak le (Long és mtsai., 2009a; Long és mtsai., 2009b). Ebben az esetben az általunk leírt hatás teljes összhangban van a korábbi megfigyelésekkel.

Az irodalomban elsőként mutattuk be, hogy a MAGL-aktivitás gátlása növeli a kortikoszteron alapszintet. Ez a hatás összhangban áll több eddigi irodalmi adattal is, mely szerint a CB₁R különböző agonistákkal (Δ^9 -THC) való aktiválása, illetve a FAAH enzim gátlásával indukált fokozott AEA jelátvitel bazális körlmények között megemeli a kortikoszteronszintet (Johnson és mtsai., 1978; Weidenfeld és mtsai., 1994; Wenger és mtsai., 1997; Wenger és mtsai., 2003; Zuardi és mtsai., 1984). Ezzel szemben a MAGL-inhibíció nem befolyásolta a stresszreaktivitást, a kortikoszteronszint nem változott úszásstressz, illetve az OF és az EPM tesztek után. Figyelembe véve, hogy a stresszválaszt egyes vizsgálatokban CB₁R agonisták fokozták (Sano és mtsai., 2009), illetve a fokozott AEA jelátvitel tompította (Hill és mtsai., 2010; Hill és mtsai., 2009), megfigyelésünk alapján feltételezhető, hogy a 2-AG jelátvitel összességében eltérő módon befolyásolja a stresszválaszt, mint az AEA jelátvitel vagy a CB₁R-ok globális aktiválása, ugyanis a bazális HPA-tengely működését úgy befolyásolja, mint az utóbbi manipulációk, míg a stresszindukált szintet mindkét típusú manipulációtól eltérő módon. A HPA-tengely alapszintű működésének MAGL-inhibíció által előidézett fokozása felelhet a korábban kimutatott szorongásoldó hatásokért, ugyanis a kortikoszteron szintézis farmakológiai gátlásával a MAGL-gátlás anxiolitikus hatásai részben gátolhatóak voltak. Eredményeink alapján az EPM tesztben a szorongás egy fontos indikátorára, a nyílt kari explorációra gyakorolt 2-AG hatás a fokozott 2-AG jelátvitel másodlagos, a HPA-tengely fokozott alapszintű működésén keresztül megvalósuló hatása. Ezzel szemben a kockázatbecslő magatartást a MAGL-aktivitás gátlása a HPA-tengely működésétől függetlenül csökkentette, így feltehetőleg ez a hatás egy közvetlen 2-AG mechanizmuson át zajlik le. Ez a tapasztalat különösen érdekes annak a fényében, hogy kutatócsoportunk egy korábbi munkájában, patkányokban éppen a kockázatbecslő magatartás és HPA-tengely aktivitása között mutatott ki hasonló interakciót, míg a nyílt kari aktivitás esetében nem (Mikics és mtsai., 2005). Ennek ellenére a MAGL-aktivitás gátlásának HPA-tengelyen keresztül kialakuló

szorongásoldó hatásai összhangban állnak egyes korábbi megfigyelésekkel, miszerint az akut stressz a kihívásokkal való azonnali megküzdést segíti elő, az akut kortikoszteronszint-növekedés a szorongás mértékének csökkenéséhez vezet, ezzel szemben a krónikus stressz fokozza a szorongást (Haller és mtsai., 1998). A lokomotoros aktivitás a szorongásnál tapasztaltakkal szemben kortikoszteronfüggetlen módon változott a MAGL-aktivitás inhibíciójának hatására. Megfigyelésünk összhangban áll kutatócsoportunk egy korábbi vizsgálatában tapasztaltakkal, miszerint az akut kortikoszteronszintnövekedés nem befolyásolta a mozgásaktivitást patkányokban (Mikics és mtsai., 2005).

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a MAGL-aktivitás gátlásával indukált fokozott 2-AG jelátvitel rövid idő alatt tompítja a stressz által kiváltott mozgásmintázatbeli változást, illetve testhőmérsékletnövekedést. Elképzelhetően kevésbé averzív körülmények között fázikus, gyors, 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. Ismeretlen környezetben részben ellentmondásos hatásokat tapasztaltunk vizsgálataink során az idődinamikával kapcsolatban, elképzelhetően a 2-AG jelátvitel olyan finom módon szabályozza a környezeti stimulusok agyi interpretációját és az ez által kialakuló magatartási válaszokat, hogy egész apró, nem kontrollálható kísérleti körülmények is befolyásolják a MAGL-inhibíció hatásait. Ennek a jelenségnek feltétlenül szükséges jövőbeni vizsgálata a háttérben álló mechanizmusok tisztázásának érdekében. Vizsgálataink tisztázták, hogy a 2-AG jelátvitel fokozása serkenti a HPA-tengely alapszintű működését. Feltételezhetően ez a fokozott működés felel azért, hogy eltérő mértékben averzív környezeti kontextusokban, melyekben amúgy is eltérő mértékben aktiválódik a stressztengely, különböző módon, eltérő idődinamikával változik a magatartás a MAGL aktivitás gátlásának hatására. A jelenség háttérében feltehetőleg több kisebb mechanizmus komplex interakciója állhat, ugyanis az endokannabinoid jelátvitel bizonyítottan több, az emocionális magatartást szabályozó agyterület (McLaughlin és mtsai., 2007; Rubino és mtsai., 2008a; Rubino és mtsai., 2008b; Zarrindast és mtsai., 2008), illetve a HPA-tengely több pontjának működését is befolyásolja (Cota és mtsai., 2007; Di és mtsai., 2003; Di és mtsai., 2005). A MAGL-

inhibíció által befolyásolt egyes mechanizmusok részleteit, kapcsolatait, különös képpen a hatások CB_1R -tól való függését a jövőben szükséges lesz vizsgálni. Feltételezhető azonban, hogy a kortikoszteronszintézistől független magatartási hatások egyes neurális folyamatokon lezajló direkt 2-AG hatások eredményeként jönnek létre.

7.3. 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 válaszára gyakorolt hatásait teljes részleteiben még nem volt módunk feltárni. Ennek ellenére demonstráltuk, hogy a környezet averzivitása 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.

8. 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 fájdalomérzékelésben, illetve a szorongásban bekövetkezett változások 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 alapműködését, 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.

9. 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 függttek 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 stresszválasszal való interakciókon keresztül valósul meg.

10. SUMMARY

Endocannabinoid signaling plays a crucial role in the modulation of emotional behavior. This role is, however, still unclear, as the emotional effects of cannabinoid manipulations depend on the aversivity of the environmental context in a number of reports. The aim of this study was to clarify the context-dependency of cannabinoid effects on emotional behavior. We enhanced endocannabinoid signaling by the inhibition of endocannabinoid catabolism and investigated its behavioral and physiological effects in differentially aversive contexts.

Enhanced anandamide signaling by the blockade of fatty acid amide hydrolase dampened behavioral reactivity to changes in environmental aversiveness and also promoted problem-oriented coping patterns when the individual faced environmental challenges. These changes are reminiscent of an active coping strategy, as the behavioral response to challenges is problem-oriented, based on routines and weakly influenced by environmental stimuli in active copers.

In the second part of our study, we used a newly developed pharmacological compound to enhance 2-arachidonoylglycerol (2-AG) signaling by the inhibition of monoacylglycerol lipase activity, and then we studied the behavioral effects of this treatment in different testing contexts. The treatment decreased anxiety and increased locomotion in aversive environments, but dampened stress-induced changes in locomotion and body temperature in a less aversive contexts. Intriguingly, the temporal-dynamics of these effects were context-dependent, as in less aversive environments they occurred in a rapid, phasic manner, while they developed in a rather slow, tonic manner in aversive context. In addition, we showed that enhanced 2-AG signaling increased basal HPA-axis activity, which was partly responsible for the anxiolytic actions.

Taken together, endocannabinoid signaling modulates the neural interpretation of environmental stimuli and the behavioral response rather than specifically affecting emotions. This regulatory role is mediated through the promotion of active coping strategy and interactions with the stress response.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adamczyk, P., Golda, A., McCreary, A.C., Filip, M., Przegalinski, E., 2008. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol* 59, 217-228.
2. Arevalo, C., de Miguel, R., Hernandez-Tristan, R., 2001. Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 123-131.
3. Arndt, S.S., Laarakker, M.C., van Lith, H.A., van der Staay, F.J., Gieling, E., Salomons, A.R., van't Klooster, J., Ohl, F., 2009. Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav* 97, 385-393.
4. Ashton, J.C., Friberg, D., Darlington, C.L., Smith, P.F., 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396, 113-116.
5. Auclair, N., Otani, S., Soubrie, P., Crepel, F., 2000. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83, 3287-3293.
6. Bambico, F.R., Hattan, P.R., Garant, J.P., Gobbi, G., 2012. Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on behavioral despair and on pre- and postsynaptic serotonergic transmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38, 88-96.
7. Barna, I., Csabai, K., Makara, G.B., Zelena, D., 2009. Cannabinoid-mediated regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats: age dependent role of vasopressin. *Endocr Regul* 43, 13-21.
8. 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 Sci* 75, 2959-2970.
9. Bastien, D.L., 2010. Pharmacological treatment of combat-induced PTSD: a literature review. *Br J Nurs* 19, 318-321.

10. Beltramo, M., di Tomaso, E., Piomelli, D., 1997a. Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. *FEBS Lett* 403, 263-267.
11. Beltramo, M., Piomelli, D., 2000. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 11, 1231-1235.
12. Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997b. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094-1097.
13. Benton, D., Brain, P.F., 1981. Behavioral and adrenocortical reactivity in female mice following individual or group housing. *Dev Psychobiol* 14, 101-107.
14. Benus, R.F., Bohus, B., Koolhaas, J.M., van Oortmerssen, G.A., 1989. Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in active shock avoidance. *Behavioural Processes* 20, 1-12.
15. Beyer, C.E., Dwyer, J.M., Piesla, M.J., Platt, B.J., Shen, R., Rahman, Z., Chan, K., Manners, M.T., Samad, T.A., Kennedy, J.D., Bingham, B., Whiteside, G.T., 2010. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis* 39, 148-155.
16. Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., Doherty, P., 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163, 463-468.
17. Bisogno, T., MacCarrone, M., De Petrocellis, L., Jarrhian, A., Finazzi-Agro, A., Hillard, C., Di Marzo, V., 2001. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268, 1982-1989.
18. Bisogno, T., Melck, D., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 1999. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J Neurochem* 72, 2113-2119.

19. Bitencourt, R.M., Pamplona, F.A., Takahashi, R.N., 2008. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 18, 849-859.
20. Bohus, B., Benus, R.F., Fokkema, D.S., Koolhaas, J.M., Nyakas, C., van Oortmerssen, G.A., Prins, A.J., de Ruiter, A.J., Scheurink, A.J., Steffens, A.B., 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Prog Brain Res* 72, 57-70.
21. 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.
22. Bortolato, M., Mangieri, R.A., Fu, J., Kim, J.H., Arguello, O., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2007. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* 62, 1103-1110.
23. Bradley, B.F., Starkey, N.J., Brown, S.L., Lea, R.W., 2007. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *J Ethnopharmacol* 111, 517-525.
24. Braidia, D., Limonta, V., Malabarba, L., Zani, A., Sala, M., 2007. 5-HT_{1A} receptors are involved in the anxiolytic effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* 555, 156-163.
25. Breslau, N., 2009. The epidemiology of trauma, PTSD, and other posttrauma disorders. *Trauma Violence Abuse* 10, 198-210.
26. 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. *Biol Psychiatry* 70, 479-486.
27. Capanna, E., Corti, M., Mainardi, D., Parmigiani, S., Brain, P.F., 1984. Karyotype and intermale aggression in wild house mice: ecology and speciation. *Behav Genet* 14, 195-208.
28. Casarotto, P.C., Terzian, A.L., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimaraes, F.S., Wotjak, C.T., Moreira, F.A., 2012. Opposing roles for cannabinoid receptor

- type-1 (CB(1)) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 478-486.
29. Cassano, T., Gaetani, S., Macheda, T., Laconca, L., Romano, A., Morgese, M.G., Cimmino, C.S., Chiarotti, F., Bambico, F.R., Gobbi, G., Cuomo, V., Piomelli, D., 2011. Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase-deficient mice. *Psychopharmacology* 214, 465-476.
 30. Chhatwal, J.P., Davis, M., Maguschak, K.A., Ressler, K.J., 2005. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30, 516-524.
 31. Coddington, E., Lewis, C., Rose, J.D., Moore, F.L., 2007. Endocannabinoids mediate the effects of acute stress and corticosterone on sex behavior. *Endocrinology* 148, 493-500.
 32. Cole, J.C., Rodgers, R.J., 1993. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 4, 573-580.
 33. Compton, D.R., Aceto, M.D., Lowe, J., Martin, B.R., 1996. In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 586-594.
 34. Compton, D.R., Gold, L.H., Ward, S.J., Balster, R.L., Martin, B.R., 1992. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 1118-1126.
 35. Cooke, M., Peters, E., Fannon, D., Anilkumar, A.P., Aasen, I., Kuipers, E., Kumari, V., 2007. Insight, distress and coping styles in schizophrenia. *Schizophr Res* 94, 12-22.
 36. Cota, D., Steiner, M.A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J.P., Grubler, 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.

37. Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87.
38. Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49, 171-176.
39. Cukor, J., Spitalnick, J., Difede, J., Rizzo, A., Rothbaum, B.O., 2009. Emerging treatments for PTSD. *Clin Psychol Rev* 29, 715-726.
40. D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y.T., Braley, G., Gueorguieva, R., Krystal, J.H., 2004. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology* 29, 1558-1572.
41. Das, S.K., Paria, B.C., Chakraborty, I., Dey, S.K., 1995. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4332-4336.
42. Day, T.A., Rakhshan, F., Deutsch, D.G., Barker, E.L., 2001. Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol* 59, 1369-1375.
43. de Ruiter, A.J.H., Koolhaas, J.M., Keijser, J.N., van Oortmerssen, G.A., Bohus, B., 1992. Differential testosterone secretory capacity of the testes of aggressive and nonaggressive house mice during ontogeny. *Aggressive Behavior* 18, 149-157.
44. Degroot, A., Nomikos, G.G., 2004. Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test. *Eur J Neurosci* 20, 1059-1064.
45. Denedy, M.C., Friel, A.M., Houlihan, D.D., Broderick, V.M., Smith, T., Morrison, J.J., 2004. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 190, 2-9.
46. Devane, W.A., Breuer, A., Sheskin, T., Jarbe, T.U., Eisen, M.S., Mechoulam, R., 1992a. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35, 2065-2069.

47. Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613.
48. Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992b. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.
49. Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., Tasker, J.G., 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23, 4850-4857.
50. 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* 146, 4292-4301.
51. Dono, L.M., Currie, P.J., 2012. The cannabinoid receptor CB(1) inverse agonist AM251 potentiates the anxiogenic activity of urocortin I in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 62, 192-199.
52. Eddy, N.B., Leimbach, D., 1953. Synthetic analgesics. II. Dipthienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 107, 385-393.
53. Egertova, M., Elphick, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422, 159-171.
54. El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., Ross, S., 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 434-442.
55. Espejo, E.F., 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res* 87, 233-238.
56. Faria, R., Magalhaes, A., Monteiro, P.R., Gomes-Da-Silva, J., Amelia Tavares, M., Summavielle, T., 2006. MDMA in adolescent male rats: decreased serotonin

- in the amygdala and behavioral effects in the elevated plus-maze test. *Ann N Y Acad Sci*, 643-649.
57. Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48, 443-450.
 58. Fernandez Espejo, E., 1997. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res* 86, 105-112.
 59. Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., 2012. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63, 202-210.
 60. Fride, E., Foux, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., Blau, H., Mechoulam, R., 2003. Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol* 461, 27-34.
 61. Fride, E., Suris, R., Weidenfeld, J., Mechoulam, R., 2005. Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. *Behav Pharmacol* 16, 431-440.
 62. Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232, 54-61.
 63. Ganon-Elazar, E., Akirav, I., 2009. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *J Neurosci* 29, 11078-11088.
 64. Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86, 1646-1647.
 65. Gately, S.J., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Lan, R., Makriyannis, A., 1996. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 307, 331-338.

66. Gerard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279, 129-134.
67. Gerdeman, G., Lovinger, D.M., 2001. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85, 468-471.
68. Giorgi, O., Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., Corda, M.G., 2003. Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Eur J Neurosci* 17, 2716-2726.
69. Giuffrida, A., Beltramo, M., Piomelli, D., 2001. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 7-14.
70. Giuliani, D., Ferrari, F., Ottani, A., 2000. The cannabinoid agonist HU 210 modifies rat behavioural responses to novelty and stress. *Pharmacol Res* 41, 47-53.
71. Glaser, S.T., Abumrad, N.A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K.M., Deutsch, D.G., 2003. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4269-4274.
72. Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D., 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18620-18625.
73. 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.
74. Griebel, G., Stemmelin, J., Scatton, B., 2005. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57, 261-267.

75. Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boscia, F., Freund, T.F., 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20, 441-458.
76. 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. *Mol Pharmacol* 65, 665-674.
77. Hajos, N., Ledent, C., Freund, T.F., 2001. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106, 1-4.
78. Hall, C., 1932. *A Study of the Rat's Behavior in a Field, a Contribution to Method in Comparative Psychology*, by Calvin Hall and E. L. Ballachey. University of California Press.
79. Hall, W., Solowij, N., 1998. Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352, 1611-1616.
80. 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. *Eur J Neurosci* 16, 1395-1398.
81. Haller, J., Barna, I., Barsvari, B., Gyimesi Pelczer, K., Yasar, S., Panlilio, L.V., Goldberg, S., 2009. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology* 204, 607-616.
82. Haller, J., Halasz, J., Makara, G.B., Kruk, M.R., 1998. Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 337-344.
83. Haller, J., Matyas, F., Soproni, K., Varga, B., Barsy, B., Nemeth, B., Mikics, E., Freund, T.F., Hajos, N., 2007. Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 25, 2445-2456.

84. 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. *Eur J Neurosci* 19, 1906-1912.
85. 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. *Behav Pharmacol* 15, 299-304.
86. Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., Mechoulam, R., 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3662-3665.
87. Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R.G., Ross, R.A., Mechoulam, R., Fride, E., 1999. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14228-14233.
88. Hawley, D.F., Bardi, M., Everette, A.M., Higgins, T.J., Tu, K.M., Kinsley, C.H., Lambert, K.G., 2010. Neurobiological constituents of active, passive, and variable coping strategies in rats: integration of regional brain neuropeptide Y levels and cardiovascular responses. *Stress* 13, 172-183.
89. 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. *J Neurosci* 11, 563-583.
90. Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 1932-1936.
91. Hession, M.J., Hagelso, A.M., Schouten, W.G., Wiepkema, P.R., van Beek, J.A., 1994. Individual behavioral and physiological strategies in pigs. *Physiol Behav* 55, 39-46.
92. Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2004. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol* 499, 291-295.

93. Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol* 15, 593-599.
94. Hill, M.N., Hillard, C.J., McEwen, B.S., 2011. Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex* 21, 2056-2064.
95. Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Bingham, B., Shrestha, L., Lee, T.T., Gray, J.M., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., Viau, V., 2010. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9406-9411.
96. Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Viau, V., Floresco, S.B., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2009. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 34, 2733-2745.
97. Hogestatt, E.D., Jonsson, B.A., Ermund, A., Andersson, D.A., Bjork, H., Alexander, J.P., Cravatt, B.F., Basbaum, A.I., Zygmunt, P.M., 2005. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 280, 31405-31412.
98. Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435, 1108-1112.
99. Hollis, D.M., Coddington, E.J., Moore, F.L., 2006. Neuroanatomical distribution of cannabinoid receptor gene expression in the brain of the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. *Brain Behav Evol* 67, 135-149.
100. Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161-202.
101. Howlett, A.C., Qualy, J.M., Khachatrian, L.L., 1986. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29, 307-313.

102. Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., Mackie, K., 1999. Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 73, 493-501.
103. Jacob, W., Marsch, R., Marsicano, G., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2012. Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem* 98, 47-55.
104. Jacob, W., Yassouridis, A., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2009. Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav* 8, 685-698.
105. Jarai, Z., Wagner, J.A., Varga, K., Lake, K.D., Compton, D.R., Martin, B.R., Zimmer, A.M., Bonner, T.I., Buckley, N.E., Mezey, E., Razdan, R.K., Zimmer, A., Kunos, G., 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14136-14141.
106. Jayamanne, A., Greenwood, R., Mitchell, V.A., Aslan, S., Piomelli, D., Vaughan, C.W., 2006. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol* 147, 281-288.
107. Johnson, J.M., Lemberger, L., Novotny, M., Forney, R.B., Dalton, W.S., Maskarinec, M.P., 1984. Pharmacological activity of the basic fraction of marihuana whole smoke condensate alone and in combination with delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 72, 440-448.
108. Johnson, K.M., Dewey, W.L., Ritter, K.S., Beckner, J.S., 1978. Cannabinoid effects on plasma corticosterone and uptake of 3H-corticosterone by mouse brain. *Eur J Pharmacol* 47, 303-310.
109. Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, 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. *Nat Med* 9, 76-81.
110. Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T.F., 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21, 9506-9518.

111. Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., Freund, T.F., 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19, 4544-4558.
112. Kerr, D.M., Burke, N.N., Ford, G.K., Connor, T.J., Harhen, B., Egan, L.J., Finn, D.P., Roche, M., 2012. Pharmacological inhibition of endocannabinoid degradation modulates the expression of inflammatory mediators in the hypothalamus following an immunological stressor. *Neuroscience* 204, 53-63.
113. Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O., Merikangas, K.R., Walters, E.E., 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62, 617-627.
114. Kessler, R.C., Price, R.H., Wortman, C.B., 1985. Social factors in psychopathology: stress, social support, and coping processes. *Annu Rev Psychol* 36, 531-572.
115. Kinsey, S.G., O'Neal, S.T., Long, J.Z., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2011. Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav* 98, 21-27.
116. Koolhaas, J.M., 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain Behav Immun* 22, 662-667.
117. Koolhaas, J.M., de Boer, S.F., Buwalda, B., van Reenen, K., 2007. Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain Behav Evol* 70, 218-226.
118. Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 925-935.
119. Korte, S.M., Beuving, G., Ruesink, W., Blokhuis, H.J., 1997. Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. *Physiol Behav* 62, 437-441.
120. Korte, S.M., Meijer, O.C., de Kloet, E.R., Buwalda, B., Keijser, J., Sluyter, F., van Oortmerssen, G., Bohus, B., 1996. Enhanced 5-HT_{1A} receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res* 736, 338-343.

121. Kreitzer, A.C., Regehr, W.G., 2001. Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 21.
122. Kupferschmidt, D.A., Newman, A.E., Boonstra, R., Erb, S., 2012. Antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. *Neuroscience* 204, 125-133.
123. Kuster, J.E., Stevenson, J.I., Ward, S.J., D'Ambra, T.E., Haycock, D.A., 1993. Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 264, 1352-1363.
124. Lambert, K.G., Tu, K., Everette, A., Love, G., McNamara, I., Bardi, M., Kinsley, C.H., 2006. Explorations of coping strategies, learned persistence, and resilience in Long-Evans rats: innate versus acquired characteristics. *Ann N Y Acad Sci*, 319-324.
125. Lan, R., Liu, Q., Fan, P., Lin, S., Fernando, S.R., McCallion, D., Pertwee, R., Makriyannis, A., 1999. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 42, 769-776.
126. Landsman, R.S., Burkey, T.H., Consroe, P., Roeske, W.R., Yamamura, H.I., 1997. SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* 334, R1-2.
127. Lau, T., Schloss, P., 2008. The cannabinoid CB1 receptor is expressed on serotonergic and dopaminergic neurons. *Eur J Pharmacol* 578, 137-141.
128. Lazary, J., Juhasz, G., Hunyady, L., Bagdy, G., 2011. Personalized medicine can pave the way for the safe use of CB(1) receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 32, 270-280.
129. Lee, S., Kim, D.H., Yoon, S.H., Ryu, J.H., 2009. Sub-chronic administration of rimonabant causes loss of antidepressive activity and decreases doublecortin immunoreactivity in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 467, 111-116.
130. Lenz, R.A., Wagner, J.J., Alger, B.E., 1998. N- and L-type calcium channel involvement in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *J Physiol* 512, 61-73.

131. Lichtman, A.H., Leung, D., Shelton, C.C., Saghatelian, A., Hardouin, C., Boger, D.L., Cravatt, B.F., 2004. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 441-448.
132. Lin, H.C., Mao, S.C., Gean, P.W., 2006. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. *Learn Mem* 13, 316-321.
133. Lisboa, S.F., Resstel, L.B., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., 2008. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Eur J Pharmacol* 593, 73-78.
134. Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.Y., Kunos, G., 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13345-13350.
135. Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavon, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., Lichtman, A.H., Cravatt, B.F., 2009a. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5, 37-44.
136. Long, J.Z., Nomura, D.K., Cravatt, B.F., 2009b. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem Biol* 16, 744-753.
137. Long, J.Z., Nomura, D.K., Vann, R.E., Walentiny, D.M., Booker, L., Jin, X., Burston, J.J., Sim-Selley, L.J., Lichtman, A.H., Wiley, J.L., Cravatt, B.F., 2009c. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20270-20275.
138. Lutz, B., 2002. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 123-142.
139. Maccarrone, M., Cecconi, S., Rossi, G., Battista, N., Pauselli, R., Finazzi-Agro, A., 2003. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 144, 20-28.

140. Maccarrone, M., Valverde, O., Barbaccia, M.L., Castane, A., Maldonado, R., Ledent, C., Parmentier, M., Finazzi-Agro, A., 2002. Age-related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *Eur J Neurosci* 15, 1178-1186.
141. Mackie, K., Devane, W.A., Hille, B., 1993. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44, 498-503.
142. Mackie, K., Hille, B., 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3825-3829.
143. Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R., 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15, 6552-6561.
144. Maione, S., Bisogno, T., de Novellis, V., Palazzo, E., Cristino, L., Valenti, M., Petrosino, S., Guglielmotti, V., Rossi, F., Di Marzo, V., 2006. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 969-982.
145. Marco, E.M., Viveros, M.P., 2009. The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem* 9, 1407-1415.
146. Marsicano, G., Lutz, B., 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11, 4213-4225.
147. Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B., Behl, C., 2002a. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80, 448-456.
148. Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Lutz, B., 2002b. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530-534.

149. Martin-Calderon, J.L., Munoz, R.M., Villanua, M.A., del Arco, I., Moreno, J.L., de Fonseca, F.R., Navarro, M., 1998. Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *Eur J Pharmacol* 344, 77-86.
150. Martin, B.R., Compton, D.R., Thomas, B.F., Prescott, W.R., Little, P.J., Razdan, R.K., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Mechoulam, R., Ward, S.J., 1991. Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 471-478.
151. Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2002. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology* 159, 379-387.
152. Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
153. McCallum, N.D., Yagen, B., Levy, S., Mechoulam, R., 1975. Cannabinol: a rapidly formed metabolite of delta-1- and delta-6-tetrahydrocannabinol. *Experientia* 31, 520-521.
154. McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Bambico, F.R., Stuhr, K.L., Gobbi, G., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2012. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 22, 664-671.
155. McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Morrish, A.C., Gorzalka, B.B., 2007. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol* 18, 431-438.
156. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., és mtsai., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90.
157. Mechoulam, R., Braun, P., Gaoni, Y., 1967. A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J Am Chem Soc* 89, 4552-4554.

158. Mechoulam, R., Lander, N., University, A., Zahalka, J., 1990. Synthesis of the individual, pharmacologically distinct, enantiomers of a tetrahydrocannabinol derivative. *Tetrahedron: Asymmetry* 1, 315-318.
159. Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O., 2007. Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers* 4, 1678-1692.
160. Metna-Laurent, M., Soria-Gomez, E., Verrier, D., Conforzi, M., Jego, P., Lafenetre, P., Marsicano, G., 2012. Bimodal control of fear-coping strategies by CB(1) cannabinoid receptors. *J Neurosci* 32, 7109-7118.
161. Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G.M., Drago, F., Di Marzo, V., 2009. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology* 34, 593-606.
162. Michoulam, R., Shvo, Y., 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19, 2073-2078.
163. 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-field. *Horm Behav* 48, 152-162.
164. Mikics, E., Dombi, T., Barsvari, B., Varga, B., Ledent, C., Freund, T.F., Haller, J., 2006. The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav Pharmacol* 17, 223-230.
165. Mikics, E., Kruk, M.R., Haller, J., 2004. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 29, 618-635.
166. 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 Pharmacol* 20, 265-272.
167. 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.
168. Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., 2007. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52, 958-965.

169. Moreira, F.A., Crippa, J.A., 2009. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr* 31, 145-153.
170. Moreira, F.A., Kaiser, N., Monory, K., Lutz, B., 2008. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54, 141-150.
171. Moreira, F.A., Wotjak, C.T., 2010. Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2, 429-450.
172. Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
173. Naderi, N., Haghparast, A., Saber-Tehrani, A., Rezaii, N., Alizadeh, A.M., Khani, A., Motamedi, F., 2008. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 89, 64-75.
174. 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.
175. Navarro, J.F., Buron, E., Martin-Lopez, M., 2006. Anxiolytic-like activity of SB-205384 in the elevated plus-maze test in mice. *Psicothema* 18, 100-104.
176. Navarro, M., Hernandez, E., Munoz, R.M., del Arco, I., Villanua, M.A., Carrera, M.R., Rodriguez 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.
177. Niyuhire, F., Varvel, S.A., Thorpe, A.J., Stokes, R.J., Wiley, J.L., Lichtman, A.H., 2007. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacology* 191, 223-231.
178. Nunez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R.M., Romero, J., 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208-213.

179. Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M., 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729-738.
180. Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N., 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279, 5298-5305.
181. Pamplona, F.A., Bitencourt, R.M., Takahashi, R.N., 2008. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90, 290-293.
182. 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. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 304-311.
183. 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.
184. 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. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
185. Pertwee, R.G., 2001. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48, 859-867.
186. Petitet, F., Donlan, M., Michel, A., 2006. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des* 67, 252-253.
187. Petitet, F., Jeantaud, B., Reibaud, M., Imperato, A., Dubroeuq, M.C., 1998. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63, L1-6.
188. Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., Putman, D., 2006. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev* 12, 21-38.

189. Porcella, A., Casellas, P., Gessa, G.L., Pani, L., 1998. Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana. *Brain Res Mol Brain Res* 58, 240-245.
190. Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
191. Poshivalov, V.P., 1980. The integrity of the social hierarchy in mice following administration of psychotropic drugs. *Br J Pharmacol* 70, 367-373.
192. Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.
193. Rabinak, C.A., Angstadt, M., Sripada, C.S., Abelson, J.L., Liberzon, I., Milad, M.R., Phan, K.L., 2013. Cannabinoid facilitation of fear extinction memory recall in humans. *Neuropharmacology* 64, 396-402.
194. Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., Parolaro, D., 2011. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology* 60, 235-243.
195. Resstel, L.B., Lisboa, S.F., Aguiar, D.C., Correa, F.M., Guimaraes, F.S., 2008. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology* 198, 405-411.
196. Rinaldi-Carmona, M., Pialot, F., Congy, C., Redon, E., Barth, F., Bachy, A., Breliere, J.C., Soubrie, P., Le Fur, G., 1996. Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci* 58, 1239-1247.
197. Rodgers, R.J., Cole, J.C., 1993. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav* 53, 383-388.
198. Rodgers, R.J., Cole, J.C., 1994. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT1A receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol* 261, 321-325.
199. Rodgers, R.J., Cole, J.C., Cobain, M.R., Daly, P., Doran, P.J., Eells, J.R., Wallis, P., 1992. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse

- elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol* 3, 621-634.
200. Rodgers, R.J., Evans, P.M., Murphy, A., 2005. Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol* 16, 405-413.
201. Rodgers, R.J., Haller, J., Halasz, J., Mikics, E., 2003. 'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci* 17, 1279-1286.
202. Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 297-303.
203. Romero, E.M., Fernandez, B., Sagredo, O., Gomez, N., Uriguen, L., Guaza, C., De Miguel, R., Ramos, J.A., Viveros, M.P., 2002. Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. *Brain Res Dev Brain Res* 136, 85-92.
204. Romero, J., Garcia-Palomero, E., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M.L., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., 1997. Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse* 26, 317-323.
205. Roohbakhsh, A., Keshavarz, S., Hasanein, P., Rezvani, M.E., Moghaddam, A.H., 2009. Role of endocannabinoid system in the ventral hippocampus of rats in the modulation of anxiety-like behaviours. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105, 333-338.
206. Roohbakhsh, A., Moghaddam, A.H., Massoudi, R., Zarrindast, M.R., 2007. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 223-229.
207. Rossato, M., Ion Popa, F., Ferigo, M., Clari, G., Foresta, C., 2005. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 984-991.

208. Rubino, T., Guidali, C., Vigano, D., Realini, N., Valenti, M., Massi, P., Parolaro, D., 2008a. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54, 151-160.
209. Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Vigano, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., Parolaro, D., 2008b. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18, 1292-1301.
210. Ruehle, S., Rey, A.A., Remmers, F., Lutz, B., 2012. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol* 26, 23-39.
211. Ruis, M.A., te Brake, J.H., Engel, B., Buist, W.G., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M., 2001. Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiol Behav* 73, 541-551.
212. Ruis, M.A.W., te Brake, J.H.A., van de Burgwal, J.A., de Jong, I.C., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M., 2000. Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Applied Animal Behaviour Science* 66, 31-47.
213. Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152, 1092-1101.
214. Saber-Tehrani, A., Naderi, N., Hosseini Najarkolaei, A., Haghparast, A., Motamedi, F., 2010. Cannabinoids and their interactions with diazepam on modulation of serum corticosterone concentration in male mice. *Neurochem Res* 35, 60-66.
215. Saghatelian, A., Trauger, S.A., Want, E.J., Hawkins, E.G., Siuzdak, G., Cravatt, B.F., 2004. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry* 43, 14332-14339.
216. Sano, K., Koushi, E., Irie, K., Higuchi, S., Tsuchihashi, R., Kinjo, J., Egashira, N., Oishi, R., Uchida, N., Nagai, H., Nishimura, R., Tanaka, H., Morimoto, S., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2009. Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances an increase of plasma corticosterone levels induced by forced swim-stress. *Biol Pharm Bull* 32, 2065-2067.

217. Sanudo-Pena, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernandez-Ruiz, J.J., Walker, J.M., 2000. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol* 391, 269-274.
218. Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64, 193-198.
219. 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.
220. Schlosburg, J.E., Carlson, B.L., Ramesh, D., Abdullah, R.A., Long, J.Z., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2009. Inhibitors of endocannabinoid-metabolizing enzymes reduce precipitated withdrawal responses in THC-dependent mice. *Aaps J* 11, 342-352.
221. Sciolino, N.R., Zhou, W., Hohmann, A.G., 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. *Pharmacol Res* 64, 226-234.
222. Sgoifo, A., de Boer, S.F., Haller, J., Koolhaas, J.M., 1996. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol Behav* 60, 1403-1407.
223. Sharir, H., Console-Bram, L., Mundy, C., Popoff, S.N., Kapur, A., Abood, M.E., 2012. The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 856-865.
224. Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281, 26465-26472.

225. Sink, K.S., Segovia, K.N., Sink, J., Randall, P.A., Collins, L.E., Correa, M., Markus, E.J., Vemuri, V.K., Makriyannis, A., Salamone, J.D., 2010. Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 112-122.
226. Sluyter, F., Korte, S.M., Bohus, B., Van Oortmerssen, G.A., 1996. Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 113-116.
227. Sokolic, L., Long, L.E., Hunt, G.E., Arnold, J.C., McGregor, I.S., 2011. Disruptive effects of the prototypical cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol and the fatty acid amide inhibitor URB-597 on go/no-go auditory discrimination performance and olfactory reversal learning in rats. *Behav Pharmacol* 22, 191-202.
228. Song, Z.H., Slowey, C.A., Hurst, D.P., Reggio, P.H., 1999. The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol Pharmacol* 56, 834-840.
229. Steiner, M.A., Wanisch, K., Monory, K., Marsicano, G., Borroni, E., Bachli, H., Holsboer, F., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2008. Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* 8, 196-208.
230. Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D., 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773-778.
231. Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H.J., Maguire, G., 1999a. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14565-14570.
232. Straiker, A.J., Maguire, G., Mackie, K., Lindsey, J., 1999b. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2442-2448.
233. Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., Ishima, Y., 1999. Evidence that the

- cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 274, 2794-2801.
234. Sugiura, T., Waku, K., 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108, 89-106.
235. Sumislawski, J.J., Ramikie, T.S., Patel, S., 2011. Reversible gating of endocannabinoid plasticity in the amygdala by chronic stress: a potential role for monoacylglycerol lipase inhibition in the prevention of stress-induced behavioral adaptation. *Neuropsychopharmacology* 36, 2750-2761.
236. Sun, Y.X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., Ueda, N., 2004. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 380, 749-756.
237. Temoshok, L.R., 2000. Complex coping patterns and their role in adaptation and neuroimmunomodulation. Theory, methodology, and research. *Ann N Y Acad Sci* 917, 446-455.
238. Thiemann, G., Watt, C.A., Ledent, C., Molleman, A., Hasenohrl, R.U., 2009. Modulation of anxiety by acute blockade and genetic deletion of the CB(1) cannabinoid receptor in mice together with biogenic amine changes in the forebrain. *Behav Brain Res* 200, 60-67.
239. Tsou, K., Nogueron, M.I., Muthian, S., Sanudo-Pena, M.C., Hillard, C.J., Deutsch, D.G., Walker, J.M., 1998. Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 254, 137-140.
240. Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K., 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78, 43-50.
241. Uriguen, L., Perez-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.
242. Ursin, H., 1998. The psychology in psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 23, 555-570.

243. van Oortmerssen, G.A., Bakker, T.C., 1981. Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav Genet* 11, 115-126.
244. Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-332.
245. Varvel, S.A., Wise, L.E., Niyuhire, F., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2007. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology* 32, 1032-1041.
246. Vizi, E.S., Katona, I., Freund, T.F., 2001. Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 431, 237-244.
247. Wagner, J.A., Varga, K., Jarai, Z., Kunos, G., 1999. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 33, 429-434.
248. Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K., Sanudo-Pena, M.C., 1999. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12198-12203.
249. Wall, P.M., Blanchard, R.J., Yang, M., Blanchard, D.C., 2003. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 395-410.
250. 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.
251. Wenger, T., Jamali, K.A., Juaneda, C., Leonardelli, J., Tramu, G., 1997. Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 724-728.
252. Wenger, T., Ledent, C., Csernus, V., Gerendai, I., 2001. The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 363-368.

253. Wenger, T., Ledent, C., Tramu, G., 2003. The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Neuroendocrinology* 78, 294-300.
254. Westerhuis, W., Zijlmans, M., Fischer, K., van Andel, J., Leijten, F.S., 2011. Coping style and quality of life in patients with epilepsy: a cross-sectional study. *J Neurol* 258, 37-43.
255. Wiley, J.L., 2003. Sex-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on locomotor activity in mice. *Neurosci Lett* 352, 77-80.
256. Williams, C.M., Kirkham, T.C., 1999. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* 143, 315-317.
257. Williams, C.M., Rogers, P.J., Kirkham, T.C., 1998. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol Behav* 65, 343-346.
258. Wilson, R.I., Nicoll, R.A., 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588-592.
259. Wu, D.F., Yang, L.Q., Goschke, A., Stumm, R., Brandenburg, L.O., Liang, Y.J., Holtt, V., Koch, T., 2008. Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J Neurochem* 104, 1132-1143.
260. Yoshida, T., Uchigashima, M., Yamasaki, M., Katona, I., Yamazaki, M., Sakimura, K., Kano, M., Yoshioka, M., Watanabe, M., 2011. Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3059-3064.
261. Zarrindast, M.R., Sarahroodi, S., Arzi, A., Khodayar, M.J., Taheri-Shalmani, S., Rezayof, A., 2008. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. *Behav Pharmacol* 19, 716-723.
262. Zuardi, A.W., Teixeira, N.A., Karniol, I.C., 1984. Pharmacological interaction of the effects of delta 9-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on serum corticosterone levels in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 269, 12-19.

12. 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 CD1 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.**, Gyimesiné 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., Heishman, 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**

13. 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 segítségével nélkül a tudományos gondolkodás, a tudományos munka alapjait sem sajátíthattam volna el.

Hálás vagyok kollégámnak, Dr. Mikics Évának a kimagasló elméleti és gyakorlati segítségével, 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 Zoltán Kristófnak, Venczkóné Bakos Nikolettának és Dr. Zelena Dórának 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.