

Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a környezeti kihívásokra és traumára adott válaszreakciók szabályozásában

Doktori tézisek

Balogh Zoltán

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Aliczki Manó, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Haller József, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Timár Júlia, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Varga Balázs, Ph.D., kutató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zachar Gergely, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Tarnawa István, Ph.D., kutató

Budapest
2018

BEVEZETÉS

A központi idegrendszerben az endokannabinoid (eCB) rendszert mai felfogásunk szerint az eCB receptorok (CB₁R, CB₂R) és az ezeken biológiai hatást kifejtő endogén ligandok, az anandamid (AEA), 2-arachidonoil-glicerín (2-AG) alkotják, kiegészülve az endokannabinoidok szintéziséhez és degradációjához szükséges enzimgarnitúrával. Az eCB rendszerben ún. retrográd jelátvitelt valósul meg, mely során a poszt-szinaptikusan felszabaduló eCB-ok a preszinaptikus membránban elhelyezkedő CB₁R-en fejtik ki biológiai hatásukat. A retrográd jelátvitel révén a neuronok képesek a saját bemeneteiket szabályozni, csökkenteni a szinaptikus résbe kerülő neurotranszmitter mennyiségét. Ezen eCB alapú szignalizációnak alapvető szerepe van rövid- és hosszútávú, valamint a tüzelés időzítésétől függő szinaptikus depresszió kiváltásában, ezáltal a tanulási és memória folyamatok molekuláris alapjának tekintett szinaptikus plaszticitás szabályozásában.

Farmakológiai megközelítésből az eCB jelátvitel befolyásolása két fő módon történhet: a CB₁R aktivációjának szabályozása (pl.: receptor agonista, antagonistá, allosterikus modulátor) vagy az endogén ligandok metabolizmusának (szintézis, degradáció, transzport) manipulálása révén. E két fő típusba sorolható farmakológiai manipulációk eltérő hatást fejtenek ki, ezáltal eltérő funkciók felderítésére alkalmasak. A receptor aktiválódásának kiváltásával vagy gátlásával megismerhetőek a CB₁R-ra jellemző specifikus hatások, míg az eCB-ok metabolizmusának manipulálásával, pl. az AEA és a 2-AG lebontásának gátlásával a nem feltétlenül CB₁R-on megvalósuló ligand specifikus hatások deríthetőek fel. Utóbbi megközelítés prominens képviselői – a saját kutatásainkban is alkalmazott – az AEA jelátvitel specifikus fokozására

alkalmas zsírsav-amid-hidroláz gátló URB597 és a 2-AG jelátvitel specifikus fokozására használható monoacil-glicerol-lipáz gátló JZL184.

Az eCB rendszernek alapvető szerepe van az emóciók és a hozzájuk kötődő magatartási válaszok szabályozásában: elemei jelen vannak minden, az emocionális magatartás szabályozásáért felelős agyterületen (pl.: prefrontális kéreg, hippokampusz, amigdala), e szerep azonban sokkrétű is. A sokrétűség forrása a CB₁R jelentős denzitású expressziója számos agyterületen és egyidejű jelenléte serkentő és gátló szinapszisokban egyaránt, melyek az emocionális magatartás szabályozásában eltérő funkcióval és eltérő mértékben vesznek részt. Általánosságban kijelenthető, hogy viselkedés farmakológiai tesztekben averzív körülmények között az CB₁R aktivációja anxiolitikus hatású, azonban a szakirodalomban több egymásnak ellentmondó eredmény található. Ezen ellentmondások feloldására szolgálnak azon megfigyelések, melyek szerint az endokannabinoid jelátvitel nem egy specifikus magatartás kiváltásáért vagy gátlásáért felelős, sokkal inkább a környezeti kihívásokra adott magatartási válasz jellegét modulálja. Tehát kontextus függő módon a környezeti ingerek interpretációját befolyásolja, így potenciálisan szerepe van egyebek mellett a megküzdési stratégia, az agresszív interakció és a félelmi tanulás szabályozásában egyaránt. Jelen ismeretnek döntő többsége a CB₁R-hoz kötött jelátvitelnek a receptor agonisták ill. antagonisták által kiváltott magatartási hatásaira terjednek ki, míg a két endokannabinoid, az AEA és a 2-AG specifikus szerepéről, lehetséges interakciójáról csekély ismeretekkel rendelkezünk. Munkánk során ezért az AEA-ra és 2-AG-re specifikus magatartási hatásokat, lehetséges interakciókat kívántuk felderíteni, vizsgálva a megküzdési stratégiát, a territoriális agressziót és az akut és hosszú távon fennmaradó félelmi választ.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során vizsgálatainkkal az alábbi kérdéseket kívántuk célzottan megválaszolni:

- 1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatásása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken**
 - 1.1. A fokozott anandamid jelátvitel módosítja-e a megküzdési stratégiát a hátrafordítás tesztben?
 - 1.2. A fokozott anandamid jelátvitel befolyásolja-e az akut vagy a hosszú távon fennmaradó kondicionált félelmi választ?

- 2. A MAGL enzim szisztémás gátlásával fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken**
 - 2.1. A fokozott 2-AG jelátvitel befolyásolja-e a territoriális agressziót, valamint a stressztengely aktiválódását agresszív konfliktus során?
 - 2.2. A fokozott 2-AG jelátvitel befolyásolja-e a fajtárs territóriumára betolakodó egyed agresszióját és a stressztengely aktiválódását agresszív konfliktus során?
 - 2.3. A fokozott 2-AG jelátvitelnek az agresszióra gyakorolt hatása a betolakodó egyedekben a kortikoszteron szint emelkedésével összefüggésben alakult ki?
 - 2.4. A fokozott 2-AG jelátvitelnek az agresszióra gyakorolt hatása a rezidens egyedekben az egyes típusú kannabinoid receptor aktiválásával összefüggésben valósul meg?

- 3. A szisztémásan és lokálisan, a FAAH és a MAGL enzimek gátlása által fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi**

válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon

- 3.1. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
 - 3.2. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk kivált-e analgézikus hatást?
 - 3.3. A fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a prelimbikus kéregben befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
 - 3.4. A fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a ventrális hippocampusban befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
 - 3.5. A fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a bazolaterális amigdalában befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
- 4. A szisztémásan a FAAH és a MAGL enzimek gátlása által fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon**
- 4.1. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk befolyásolja-e a traumatikus emlék kioltódását?

MÓDSZEREK

Kísérleti alanyok

Kísérleti alanyainak 2-3 hónapos, 30-35 g tömegű hím CD1 egerek valamint 3 hónapos, átlagosan 250 g tömegű hím Wistar patkányok voltak. Táplálék és víz *ad libitum*

elérhető volt a tartás teljes ideje alatt. A hőmérséklet $22 \pm 2^\circ\text{C}$, a relatív páratartalom $60 \pm 10\%$ volt az állattartó és kísérleti szobákban. Kísérleti alanyainkat egymástól izoláltan, 12:12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, a lámpák reggel 7:00-kor kapcsolódtak fel. A kísérleteket az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC), a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával, az állatkísérletekre vonatkozó engedélyek birtokában végeztünk el.

Farmakonok, dózisok és agyterület specifikus kezelések

A monoacil-glicerol-lipáz (MAGL) gátló JZL184, a CB_1R antagonistá AM251 és a zsírsav-amid-hidroláz (FAAH) gátló URB597 1,5 % dimetil-szulfoxid (DMSO) és 0,4 % metil-cellulóz tartalmú fiziológiás sóoldatban került feloldásra. Egerek esetén az URB597-et 0 (vivőanyag), 0,3 mg/kg, a JZL184-et 0 (vivőanyag), 8 és 16 mg/kg, a metirapont 0 (vivőanyag), 30 mg/kg, az AM251-et 0 (vivőanyag), 0,5 és 1 mg/kg dózisokban, 10 ml/kg térfogatban intraperitoneálisan (i.p.) adtuk be 40 perccel a kísérletet megelőzően. Patkányok esetében az URB597-et 0,3 mg/kg, a JZL184-et 16 mg/kg, 1 ml/kg térfogatban i.p. adtuk be 40 perccel a kísérletet megelőzően szisztémás kezelések esetén. Agyterület specifikus adagolás során a 1,5 % DMSO tartalmú fiziológiás sóoldatban feloldott URB597-et 1 ng/0,5 μl , és a JZL184-et pedig 1 μg /0,5 μl koncentrációban, 0,5 μl térfogatban, 30 perccel a kísérletet megelőzően Hamilton fecskendővel bilaterálisan adtuk be.

Magatartástesztek és elemzésük

A magatartásteszteket a fény-sötét ciklus világos periódusának első 4 órájában végeztük, az állattartó helyiségtől elkülönített szobában. A tesztek során videokamerával rögzítettük az állatok magatartását, majd a H77 eseményrögzítő szoftverrel manuálisan, illetve az

EthoVision XT viselkedéskövető szoftver segítségével automatizáltan elemeztük a felvételeket.

Hátrafordítás teszt CDI egereken

A teszt folyamán az egereket kézzel a hátukra fordítottuk és egy percig fixen tartottuk. A tesztben mutatott menekülési kísérleteket tekintettük az aktív, míg az inaktív megadást a passzív megküzdési stratégia megjelenésének.

Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető CDI egereken

Az egerek egy plexiüveg ketrecben az acélrácsos padlón keresztül 5 perc alatt 10 alkalommal 100 V feszültségű 3 mA áramerősségű, 1 másodperc időtartamú elektromos sokk-sorozatot kaptak 30 másodperces időközönként. A kontextuális emlékeztető folyamán az egyedek a kondicionálásra használt ketrecbe kerültek vissza a sokkot követően 14 nappal, egy alkalommal 5 percre.

Rezidens-betolakodó teszt CDI egereken

A tesztben egy kisebb méretű ún. betolakodó egyedet helyeztünk 10 percre a rezidens egyed saját ketrecébe. Támadó magatartási formákként összegeztük az agresszív kurkászást, a farokrázást és birkózást, míg védekező magatartásként összegeztük a védekező hátrálást, az elkerülést és a menekülést. Az adott és kapott harapásokat megszámoztuk.

Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető Wistar patkányokon

A teszt során a patkányokat egy plexiüveg ketrecbe helyeztük, majd 3 perc habituációt követően az acélrácsos padlón keresztül 3 alkalommal 2,4 mA áramerősségű, 2 másodperc hosszúságú elektromos sokk-sorozatot kaptak 30 másodperces időközönként. A kontextuális emlékeztető során a kondicionálást követően egy héten át naponta 5 perc

időtartamra és 28 nappal később még egyszer visszahelyeztük az egyedeket a sokkolásra használt apparátusba.

Forró lap teszt Wistar patkányokon

Az állatokat az IITC Hot Plate Analgesia Meter apparátus 30 °C hőmérsékletű acél lapjára helyeztük. Az acél lap egyenletesen, 6 °C/perc sebességgel melegedett fel 55 °C maximális hőmérsékletig. Ha az állat a legenyhébb fájdalomra utaló magatartást mutatta az apparátus hevítése megszakadt és az aktuális hőmérséklet feljegyzésre került.

Vérvétel és kortikoszteron szint mérés

A kortikoszteron hormon szintjének mennyisége a törzsvérből nyert plazmából került meghatározásra radioimmunoesszé módszerrel.

Kanül implantáció agyterület specifikus beadáshoz

Anesztéziát követően a patkányok fejét sztereotaxiás keretben fixáltuk, majd két vezető kanült bilaterálisan implantáltuk a célzott agyterületek fölé. A kanült mikrocsavarok és fogászati cement segítségével rögzítettük a koponyafelszínhez. Műtét után az állatok visszakerültek ketrecükbe majd fiziológiás sóoldatot, illetve 1 mg/kg Gentamicine kezelést kaptak. A műtét után legalább 7 nap telt el az első kísérleti napig.

Perfúzió és a kanül lokalizációjának ellenőrzése

A magatartástereszteket követően az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk a felszálló aortán keresztül. Az agyat kiemeltük a koponyából majd szánkamikrotómmal 30 µm vastag szeletekre metszettük. A metszeteket tárgylemezre húztuk fel és fénymikroszkóppal meghatároztuk a kanülok hegyének anatómiai koordinátáit.

Statisztikai analízis

Adatainkat egyutas, faktoriális és ismételt méréses varianciával (ANOVA) értékeltük. Az ANOVA kritériumainak teljesülését Levenne-tesztel ellenőriztük, szükség esetén az adatokat négyzetgyök-transzformáltuk. Többszörös összehasonlítások esetén Bonferoni-Holm korrekciót végtünk. Szignifikáns hatás esetén a csoportok páros összehasonlítására *post-hoc* a Fisher-féle LSD és a Duncan-tesztet alkalmaztuk. A tesztnapok során mutatott magatartások közötti korreláció kiszámításához lineáris regressziót alkalmaztunk Minden statisztikai számítás esetén abban az esetben tekintettük szignifikánsnak a mért hatást, ha a p -érték 0,05-nél alacsonyabb volt. A statisztikai számításokat a Statistica 13 szoftverrel végeztük.

EREDMÉNYEK

1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra CD1 egereken

1.1. A fokozott anandamid jelátvitel hatása a hátrafordítás tesztben a megküzdési stratégiára

A 2. tesztnapon mutatott magatartásuk alapján az egyedeket megküzdési stratégiáik szerint csoportosítottuk. Mivel a kezelés, a megküzdési stratégia és a tesztnap között szignifikáns interakció állt fenn (Wilk's lambda=0,174; $F_{\text{interakció}}(4, 66)=22,97$; $p<0,0001$), lehetőségünk volt további elemzésben a kezelési csoportokon belüli magatartási változást vizsgálni. A 2. és 3. tesztnapon a vivőanyaggal kezelt egyedek magatartását a megküzdési stratégia határozta meg ($F_{\text{megküzdési stratégia}}(2, 32)=9,41$, $p=0,0006$; $F_{\text{tesztnap}}(1, 32)=0,75$, $p=0,39$; $F_{\text{interakció}}(2, 32)=0,66$, $p=0,52$). Mindhárom megküzdési stratégiát mutató vivőanyag kezelt csoport esetén a 2. és 3. tesztnapot összevetve a menekülési kísérletekkel

töltött idő nem különbözött szignifikánsan ($p > 0,5$). Ezzel szemben a 3. tesztenapon URB597 kezelt egyedek magatartására a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ($F_{\text{megküzdési stratégia} * \text{teszt nap}}(2, 32) = 8,63, p = 0,001$). A 2. tesztenapon passzív stratégiát mutató egyedek a 3. tesztenapon URB597 kezelést követően az aktív megküzdési stratégiát mutattak ($p = 0,02$). A megküzdési stratégiát befolyásoló URB597 hatás a 2. tesztenapon kevert és az aktív megküzdési stratégiát mutató egyedek esetén nem jelentkezett.

1.2. A fokozott anandamid jelátvitel hatása a kondicionált félelem tesztben az akut és hosszú távon fennmaradó félelmi válaszra

A félelmi kondicionálást megelőzően adott URB597 kezelés hatására az elektromos sokkok közötti intervallumokban az egyedek lokomotoros aktivitása szignifikáns mértékben növekedett ($F_{\text{kezelés}}(1, 12) = 7,07; p < 0,03$) és a dermett viselkedéssel töltött idő szignifikánsan alacsonyabb volt ($F_{\text{kezelés}}(1, 12) = 5,32; p < 0,05$). A ketrec alját képező fémrácsot az URB597 kezelt egyedek szignifikánsabban többet explorálták ($F_{\text{kezelés}}(1, 12) = 4,77; p < 0,05$). 14 nappal később a kontextuális emlékeztető folyamán az URB597 kezelt csoport dermett viselkedéssel töltött ideje marginálisan különbözött a vivőanyag kezelt csoporttól ($F_{\text{kezelés}}(1, 12) = 3,37; 0,1 > p > 0,05$).

2. A MAGL enzim szisztémás gátlásával fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakció során a rezidens-betolakodó tesztben CDI egereken

2.1. A fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens egyed territoriális agressziójára és a stressztengely aktivitására

A rezidens egerek JZL184 kezelése szignifikáns hatást fejtett ki az egyedek harapásszámára ($F_{\text{kezelés} * \text{harapás irányultsága}}(2, 27) = 5,94; p = 0,007$) és magatartási válaszuk jellegére

($F_{\text{kezelés*magatartás természet}}(2, 27)=3,41; p=0,047$). A JZL184 kezelés 16 mg/kg dózisban szignifikánsan csökkentette a betolakodó egyedek célzó harapások számát és az offenzív magatartással töltött időt. A JZL184 kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a kortikoszteron szintre ($F_{\text{kezelés}}(2,27)=2,93; p>0,07$).

2.2. A fokozott 2-AG jelátvitel hatása a fajtárs territóriumára betolakodó egyed agressziójára és stressztengely aktivitására

A JZL184-gyel kezelt betolakodó egyedek harapásszámára ($F_{\text{kezelés*harapás irányultsága}}(2,25)=4,29; p=0,025$) és magatartási válaszána jellegére a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ($F_{\text{kezelés*magatartás természet}}(2,27)=3,41; p=0,047$). A JZL184-kezelt betolakodó egyedek szignifikánsan több harapást szenvedtek el és defenzív magatartással töltött idő is szignifikánsan megnőtt. A betolakodó egerek kortikoszteron szintje JZL184 kezelés hatására szignifikánsan megnőtt ($F_{\text{kezelés}}(2, 24)=4,51; p=0,02$).

2.3. A MAGL enzim és a kortikoszteron szintézis egyidejű szisztémás gátlásának hatása a fajtárs territóriumára betolakodó egyed agressziójára és stressztengely aktivitására

A 30 mg/kg dózisban alkalmazott metirapon kezelés önmagában és 16 mg/kg dózisban adott JZL184 kezeléssel együttesen is szignifikánsan csökkentette a kortikoszteron szintet ($F_{\text{interakció}}(1, 35)=10,07; p=0,003$). A metirapon, a JZL184 kezelés és kombinációjuk egyaránt szignifikánsan csökkentették az adott harapások számát és e kezelési csoportokban nőtt az elszenvedett harapások száma ($F_{\text{interakció}}(1, 35)=5,09; p=0,03$). Mindhárom kezelési csoportban szignifikánsan csökkent az offenzív magatartással töltött idő mennyisége ($F_{\text{interakció}}(1, 35)=6,41; p=0,015$). A defenzivitást a metirapon és a JZL184 kezelés önmagában fokozta, e hatás a kombinált kezelés esetén nem jelentkezett.

2.4. A MAGL enzim és a CB₁R egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

A CB₁R antagonistá AM251 1 mg/kg dózisban a rezidens egyedek agresszív magatartását önmagában szignifikánsan befolyásolta: csökkentette a harapások számát ($F_{\text{interakció}}(1, 33)=7,79$; $p=0,009$) és az offenzív magatartással töltött időt ($F_{\text{interakció}}(1, 33)=5,92$; $p=0,02$). Ezen agresszió csökkentő hatás JZL184 önálló ill. AM251-gyel együtt történő beadásakor is jelentkezett. Az AM251 0,5 mg/kg dózisban sem önmagában, sem más faktorokkal interakcióban nem befolyásolta az egyedek magatartását. Azonban szignifikáns interakció figyelhető meg a JZL184 kezelés és a harapások irányultsága ($F_{\text{JZL184*harapás irányultsága}}(1,34)=14,32$; $p=0,005$) valamint a magatartási válasz jellege között ($F_{\text{JZL184*magatartás természete}}(1,34)=15,35$; $p>0,0004$). A JZL184 kezelés hatására a rezidens egyedek által adott harapások száma és az offenzív magatartással töltött idő szignifikánsan csökkent, míg az elszenvedett harapások száma és a defenzív magatartással töltött idő mennyisége nőtt. A 0,5 mg/kg ($F_{\text{AM251}}(1, 34)=4,57$; $p<0,04$) ill. 1 mg/kg AM251 kezelés ($F_{\text{AM251}}(1, 30)=11,10$; $p<0,003$) egyaránt szignifikánsan megemelte a kortikoszteron szintet.

3. A szisztémásan és lokálisan, a FAAH és a MAGL enzimek gátlása által fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

3.1. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára

A kondicionálást megelőzően adott URB597 és JZL184 az első sokkot megelőző habituációs időszakban nem volt hatással a vonaltálepések számára ($F(4,43)=1,82$; $p=0,14$). A

dermedt viselkedéssel töltött idő mennyiségére mind a kondicionálás, mind a kontextuális emlékeztetők során a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ($F_{\text{kezelés}}(4, 38)=10,55$; $p<0,01$; $F_{\text{napok}}(8, 302)=64,7178$; $p<0,01$; $F_{\text{kezelési csoport}*napok}(32, 304)=6,91$; $p<0,01$). A JZL184 kezelt csoport szignifikánsan csökkent akut félelmi választ mutatott a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva. Az első kontextuális emlékeztető során egyik farmakológiai kezelés nem fejtett ki szignifikáns hatást. A 7. kontextuális emlékeztetőre minden kezelési csoport dermedt viselkedéssel töltött ideje a nem sokkolt kontroll egyedek által mutatott szintre tért vissza. A kondicionálást követő 28. napon történt kontextuális emlékeztető során az URB597 és az URB597+JZL184 kezelt csoport a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan több időt töltött dermedt viselkedéssel.

3.2. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben

A farmakológiai kezelések nem fejtettek ki szignifikáns hatást a fájdalomküszöbre ($F_{\text{kezelési csoport}}(2, 19) = 0,08$; $p=0,92$; $F_{\text{kezelési csoport}*napok}(2, 19) = 2,1$; $p=0,15$).

3.3. A lokálisan a prelibikus kéregben (PrL) fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára

A kondicionálást megelőzően a PrL-be beadott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időt a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikánsan befolyásolta ($F_{\text{kezelés}}(4, 26)=6,44$; $p<0,01$; $F_{\text{napok}}(8, 208)=46,29$; $p<0,01$; $F_{\text{kezelési csoport}*napok}(32, 208)=5,72$; $p<0,01$). A farmakológiai kezelések nem fejtettek ki hatást a kondicionálás és az első kontextuális emlékeztető során a dermedt magatartásra. A 7. és 28. napi kontextuális emlékeztető során az URB597 kezelésen átesett csoport a

nem sokkolt és a sokkolt kontroll csoportokhoz viszonyítva egyaránt több időt töltött dermedt viselkedéssel. A JZL184 önmagában adagolva ilyen hatást nem mutatott, de szimultán kezelés esetén eltörölte az URB597 hatását.

3.4. A lokálisan a ventrális hippokampuszban (vHC) fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára

A kondicionálást megelőzően a vHC-ba adott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időre a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikáns hatást fejtett ki ($F_{\text{kezelés}}(4, 20)=5,33$; $p<0,01$; $F_{\text{napok}}(8, 160)=14,34$; $p<0,01$; $F_{\text{kezelési csoport*napok}}(32, 160)=4,34$; $p<0,01$). Az URB597 kezelés hatására az akut félelmi válasz a sokkolt kontroll csoporttal összevetve szignifikánsan csökkent. Az első kontextuális emlékeztető során a farmakológiai kezelések egyike sem mutatott hatást a félelmi válaszra. A 7. és 28. napi kontextuális emlékeztetők során az URB597 kezelésen átesett csoport a nem sokkolt és a sokkolt kontroll csoporttól is szignifikánsan különbözött, fokozott félelmi választ mutatott. Kombinált kezelés esetén a JZL184 megátolta az URB597 önállóan kifejtett hatását.

3.5. A lokálisan a bazolaterális amigdalában (BLA) fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára

A kondicionálást megelőzően a BLA-ba adott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időre a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikáns hatást fejtett ki ($F_{\text{kezelés}}(4, 22)=6,23$; $p<0,01$; $F_{\text{napok}}(8, 176)=9,95$; $p<0,01$; $F_{\text{kezelési csoport*napok}}(32, 176)=1,73$; $p=0,01$). A *post-hoc* összehasonlítások alapján a kondicionálás és az első kontextuális emlékeztető során minden kezelési csoport szignifikánsan több időt töltött

dermedt viselkedéssel, mint a nem sokkolt kontroll csoport A farmakológiai kezeléseknek azonban sem a kondicionálás, sem a kontextuális emlékeztetők folyamán nem volt szignifikáns hatása a félelmi válaszra a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva.

4. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által fokozott anandamid és 2-AG jeltávitel hatása a traumatikus emlék kioltódására a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

4.1. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása traumatikus emlék kioltódására

Az első kontextuális emlékeztetőt megelőzően adott JZL184 és URB597 kezelés szignifikáns hatással volt a kontextuális emlékeztetők során mutatott dermedt viselkedésre ($F_{\text{kezelés}}(4, 42)=7,57; p<0,01; F_{\text{napok}}(8, 336)=23,35; p<0,01; F_{\text{kezelés}*\text{napok}}(32, 336)=4,94; p<0,01$). Az első kontextuális emlékeztető folyamán a JZL184-gyel kezelt csoport szignifikánsan kevesebb félelmi választ mutatott a sokkolt csoporttal összehasonlítva. A URB597 kezelés meggátolta a JZL184 e hatását. A sokkolt kontroll csoport dermedt viselkedéssel töltött ideje a 6. kontextuális emlékeztető napján már nem különbözött szignifikánsan a nem sokkolt kontroll csoporttól. A JZL184 és az URB597 kezelt csoportok esetén a szignifikáns különbség a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva már a 4., kombinált kezelés esetén a 3. kontextuális emlékeztető során megszűnt. Hét és 28 nappal a kondicionálást követően egyik kezelési csoport sem mutatott szignifikáns különbséget sem a nem sokkolt, sem a sokkolt kontroll csoportokkal összehasonlításban.

KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám során az endokannabinoidok lebontásáért felelős két fő enzim, a FAAH és a MAGL farmakológiai gátlásával kívántam felderíteni az AEA-ra és 2-AG-re specifikus magatartási hatásokat, lehetséges interakcióikat. A disszertációban bemutatott eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A fokozott AEA jelátvitel a proaktív megküzdési stratégia megjelenését propagálja, mely a környezetből érkező averzív ingerek intenzitásától függő módon jelentkezik.
2. A fokozott 2-AG jelátvitel felelős specifikusan a territoriális agressziót csökkentő endokannabinoid hatásokért. Azonban a 2-AG agresszió csökkentő hatása nem a CB₁R-hoz kötött szignalizáció révén jön létre és a fokozott defeznivitást részben a megemelkedett kortikoszteron szint eredményezi a betolakodó egerekben.
3. Az akut félelmi válasz és félelmi memória kialakításában a fokozott AEA és 2-AG jelátvitel eltérő szerepet tölt be és egymással interakcióban fejtik ki élettani hatásukat.
 - 3.1. Az akut félelmi válasz csökkenéséért szisztémásan specifikusan a 2-AG, míg a vHC-ban AEA jelátvitel a felelős.
 - 3.2. Az akut félelmi válaszra kifejtett szisztémás 2-AG hatást az AEA, míg a lokális AEA hatást a vHC-ban a 2-AG képes eltörölni.
 - 3.3. A fokozott AEA jelátvitel a PrL-ben és a vHC-ban elősegíti a robusztus, hosszan fennmaradó félelmi memória létrejöttét.

- 3.4. Az AEA jelátvitel hatását a traumatikus memória hosszútávú fennmaradására a PrL-ben és a vHC-ban a 2-AG képes eltörölni, azonban önmagában e jelenségekre a két agyterületen nem fejt ki hatást.
4. A traumatikus emlék kioltódását a 2-AG, az AEA és a két endokannabinoid együttesen is fokozza. A félelmi válasz expresszióját az első kontextuális emlékeztető során a 2-AG jelátvitel csökkenti, mely hatást az AEA képes megszüntetni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az endokannabinoid (eCB) rendszer elemei – a kannabinoid receptorok, a két eCB, az anandamid (AEA) és a 2-archidonoil-glicerín (2-AG) – jelentős mennyiségben vannak jelen az emocionális magatartás szabályozásáért felelős agyterületeken. Jelen ismereteink szerint az eCB jelátvitel a környezeti ingerekre adott magatartási válasz jellegét modulálja és nem egy specifikus magatartási válasz kiváltásáért vagy gátlásáért felel. Doktori munkám célja az AEA és a 2-AG specifikus szerepének, lehetséges interakciójának vizsgálata volt eltérő környezeti kihívásokat reprezentáló tesztekben, vizsgálva a megküzdési stratégiát, az agresszív interakciót, valamint a traumatikus memória akvizícióját és kioltódását. Vizsgálatainkban az eCB AEA és 2-AG jelátvitelét fokoztuk a lebontásukért specifikusan felelős enzimek, a zsírsav-amid-hidroláz és a monoacil-glicerol-lipáz gátlása révén. A fokozott AEA jelátvitel hatására CD1 egerek proaktív megküzdési stratégiát mutattak a hátrafordítás és kondicionált félelem tesztekben. Míg a hátrafordítás tesztben a korábban reaktív megküzdési stratégiát mutató egerek stratégiáját módosította proaktívra a kezelés, addig a félelmi kondicionálás során a proaktív stratégia általános megjelenése volt megfigyelhető. A territoriális agressziót CD1 egereken vizsgáló rezidens-

betolakodó tesztben a fokozott 2-AG jelátvitel a rezidensek és a betolakodók agresszióját egyaránt robusztusan csökkentette. Wistar patkányokon a kondicionált félelem tesztben az akut félelmi választ a szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel és a lokálisan a ventrális hippokampuszban (vHC) fokozott AEA jelátvitel csökkentette. Az akut félelmi választ csökkentő hatása ellenére az AEA jelátvitel fokozása lokálisan a vHC-ban és a prelimbikus kéregben is permanens félelmi emléknym kialakulását eredményezte. A 2-AG-nek önmagában e jelenségekre nem volt hatása, de az AEA által kiváltott hatásokat képes volt eltörölni. A traumatikus emlék kioltódását a 2-AG, az AEA és a két endokannabinoid együttesen is fokozza. Összefoglalva, sikerült bebizonyítanunk, hogy a két eCB specifikusan, bizonyos esetekben egymással interakcióban befolyásolja az eltérő környezeti kihívásokat modellező tesztekben megjelenő magatartásformákat. Az AEA a proaktív megküzdési stratégia kialakításában, míg a 2-AG az agresszió csökkentésében játszik szerepet, továbbá az akut félelmi választ, a hosszú távon fennmaradó félelmi memória létrejöttét és kioltódását e két eCB együttesen szabályozza.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Balogh, Z., Szente, L., Biro, L., Varga, Z.K., Haller, J., Aliczki, M., (2019). Endocannabinoid interactions in the regulation of acquisition of contextual conditioned fear. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 90: 84-91. **IF: 4,185**
2. Aliczki, M., Varga, Z.K., Balogh, Z., Haller, J., (2015). Involvement of 2-arachidonoylglycerol signaling in social challenge responding of male CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 232: 2157-2167. **IF: 3,540**

3. Haller, J., Aliczki, M., Pelczer, K.G., Spitzer, K., Balogh, Z., Kantor, S., (2014). Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 593-601. **IF: 3,875**

A szerző egyéb közleményei:

1. Aliczki, M., Fodor, A., Balogh, Z., Haller, J., Zelena, D., (2014). The effects of lactation on impulsive behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Horm Behav*, 66: 545-551. **IF: 4,632**
2. Fodor, A., Barsvari, B., Aliczki, M., Balogh, Z., Zelena, D., Goldberg, S.R., Haller, J., (2014). The effects of vasopressin deficiency on aggression and impulsiveness in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 47: 141-150. **IF: 4,944**
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 Pharmacol*, 23: 348-357. **IF: 2,301**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Aliczki Manónak, aki már kilenc éve töretlenül támogatja és segíti szakmai fejlődésemet. Az ő iránymutatása nélkül nem sajátíthattam volna el a tudományos munka alapvetéseit és különösen hálás vagyok azért, hogy minden esetben, bármilyen kérdéssel, bizalommal fordulhattam hozzá az évek folyamán. Mentorom volt a szó legnemesebb értelmében, segítsége nélkül nem tarthatnék ott, ahol most.

Hálás vagyok témavezetőmnek Dr. Haller Józsefnek, hogy a kutatócsoportjában zajló munkába már másodéves egyetemi hallgatóként becsatlakozhattam.

Szeretném megköszönni és nagyon hálás vagyok Dr. Mikics Évának, hogy megadta a lehetőséget és biztosította az időt disszertációm elkészítéséhez kutatócsoportjában.

A disszertációban bemutatott eredményeket nem érhattük volna el Biró László, Sente László és Varga Zoltán hallgatótársaim és barátaim közreműködése nélkül, akik egyedi meglátásaikkal és áldozatos munkájukkal nagyban hozzájárultak az elért eredményekhez. Szeretném továbbá megköszönni az MTA-KOKI Magatartásélettan és Stressz, valamint Transzlációs Magatartás Idegtudomány kutatócsoportjaiban dolgozó minden munkatársamnak, hogy olyan légkör jöhetett létre, melyben élmény volt dolgozni és közösen új felfedezéseket tenni, legyenek azok bármilyen aprók vagy nagyok.

Nagyon hálás vagyok és köszönettel tartozom családomnak, akik minden támogatást megadtak annak érdekében, hogy azzal foglalkozhassak, amit szeretek. Különösen hálás vagyok feleségemnek, Annának, hogy biztatásával a holtponatokon átsegített és mindvégig mellettem állt.