

**A CRF ÉS A CRF RECEPTOROK SZEREPE
AZ ALKOHOL INTOXIKÁCIÓ ÉS MEGVONÁS HATÁSAIBAN**

Jelölt: Dr. Simon Balázs
Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Kórélettani Intézet

Ph.D. tézisfüzet

Témavezető: Dr. Bagosi Zsolt
Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

2023
Szeged

KÖZLEMÉNYEK

1. A PhD tézis alapját képező eredeti közlemények:

1.1. **Simon B**, Buzás B, Bokor P, Csabafi K, Ibos KE, Bodnár É, Török L, Földesi I, Siska A, Bagosi Z: The effects of alcohol intoxication and withdrawal on hypothalamic neurohormones and extrahypothalamic neurotransmitters (Biomedicines. 2023 Apr 27; 11:1288) Újság rangsor: Q1, impakt faktor: 4.757, idézetek száma: 0

1.2. **Simon B**, Thury AA, Török L, Földesi I, Csabafi K, Bagosi Z: The effects of alcohol immediately and a day after binge drinking (Alcohol. 2023 May 24; 112:17-24). Újság rangsor: Q2, impakt faktor: 2.558, idézetek száma: 0

2. A PhD tézishez kapcsolódó eredeti közlemények:

2.1. Bagosi Z, Palotai M, **Simon B**, Bokor P, Buzás A, Balangó B, Pintér D, Jászberényi M, Csabafi K, Szabó G. Selective CRF2 receptor agonists ameliorate the anxiety- and depression-like state developed during chronic nicotine treatment and consequent acute withdrawal in mice (Brain Research, 2016 Dec 1; 1652:21-29.). Újság rangsor: Q1, impakt faktor: 2.746, idézetek száma: 16

2.2. Buzás A, Bokor P, Balangó B, Pintér D, Palotai M, **Simon B**, Csabafi K, Telegdy G, Szabó G, Bagosi Z. Changes in striatal dopamine release and locomotor activity following acute withdrawal from chronic nicotine are mediated by CRF1, but not CRF2, receptors (Brain Research, 2019 Mar 1; 1706:41-47.). Újság rangsor: Q2, impakt faktor: 3.125, idézetek száma: 6

2.3. Pintér D, Balangó B, **Simon B**, Palotai M, Csabafi K, Dobó É, Ibos KE, Bagosi Z: The effects of CRF and the urocortins on the hippocampal acetylcholine release in rats (Neuropeptides. 2021 Aug 1; 88:102147). Újság rangsor: Q2, impakt faktor: 3.286, idézetek száma: 1

3. A PhD tézishez kapcsolódó konferencia előadások:

3.1. **Simon B**, Palotai M, Bagosi Z: The effects of binge drinking on anxiety-like, depression-like and social behaviors (HMAA, Balatonfüred, Magyarország, 2019)

4. A PhD tézishez kapcsolódó poszter előadások:

4.1. Bagosi Z, **Simon B**, Jászberényi M, Szabó G: The effects of nicotine withdrawal on the rat limbic system: increase of dopamine release in the striatum and increase of GABA release in the amygdala (MÉT, Szeged, Magyarország, 2010)

4.2. Bagosi Z, Palotai M, **Simon B**, Bokor P, Buzás A, Csabafi K, Szabó G: The effects of a selective CRFR1 antagonist in rats exposed to chronic nicotine treatment and consequent acute withdrawal (IBRO, Budapest, Magyarország, 2016)

4.3. Bagosi Z, **Simon B**, Karasz G, Csabafi K, Ibos K, Szakács J, Ibos KE, Szabó G: Binge drinking and hangover have different impacts on mood (FAMÉ, Budapest, Magyarország, 2019)

4.4. Bagosi Z, **Simon B**, Karasz G, Csabafi K, Ibos K, Szakács J, Ibos KE, Szabó G: Binge drinking has different effects on sociability and preference for social novelty (FEPS, Bologna, Olaszország, 2019)

4.5. Bagosi Z, **Simon B**, Karasz G, Ibos KE, Dobó É, Csabafi K: Different effects of binge drinking and hangover on mood are mediated by different CRF receptors (IBRO, Szeged, Magyarország, 2020)

Összes impakt faktor: 16.642

Összes idézetek száma: 23 (önidézetek nélkül: 19)

RÖVIDÍTÉSEK

[³H] = trícium
ACTH = adrenokorticotrop hormon
AVP = arginin vazopresszin
BAC = véralkoholkoncentráció
BNST = a stria terminalis beágyazott magja
CEA = az amygdala centrális magja
CNS = központi idegrendszer
CORT = kortikoszteron
CRF = corticotropin-felzabádító faktor
CRF-BP = corticotropin-felzabádító faktor-kötő fehérje
CRF1 = corticotropin-felzabádító faktor 1-es típusú receptora
CRF2 = corticotropin-felzabádító faktor 2-es típusú receptora
CRH = corticotropin-felzabádító hormon
DA = dopamin
ELISA = enzimhez kötött immunoszorbens módszer
EWP = Edinger-Westphall mag
GABA = gamma-aminovajsav
GLU = glutamát
GPCR = G-fehérjéhez kapcsolt receptor
HPA = hypothalamus-hypophysis-mellékvese
IBD = gyulladásoos bélbetegség
IBS = irritábilis bélbetegség
ICV = intracerebroventrikuláris
IP = intraperitoneális
IV = intravénás
LC = locus coeruleus
NACC = nucleus accumbens
PCR = polymeráz lánreakció
PTSD = poszttraumás stressz szindróma
PVN = a hypothalamus paraventrikuláris magja
SCP = stresscopin
SNS = szimpatikus idegrendszer
SRP = stresscopinnal kapcsolatos peptid
UCN1 = urocortin 1
UCN2 = urocortin 2
UCN3 = urocortin 3
VTA = ventrális tegmentális area

1. BEVEZETÉS

1.1. CRF és CRF receptorok

A kortikotropin-felszabadító faktor (CRF), más néven kortikotropin-felszabadító hormon (CRH) egy 41 aminosavból álló neuropeptid, amely hypothalamikus neurohormonként és extrahypothalamikus neurotranszmitterként is működik. A CRF-nek elsősorban a stresszre adott neuroendokrin, autonóm és viselkedési válaszok közvetítésében van szerepe. A neuroendokrin stresszválasz a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA) tengely aktiválását jelenti, amelyet a hypothalamus paraventriculáris magjából (PVN) felszabaduló CRF és/vagy a szinergista hatású argininin-vazopresszin (AVP) indít el, ez stimulálja az adrenokortikotrop hormon (ACTH) felszabadulását az anterior hypophysisből, ez utóbbi pedig a glükokortikoidok felszabadulását a mellékvesekéregből. A legfontosabb glükokortikoid emberekben a kortizol, rágcsálókban pedig a kortikoszteron (CORT). A plazma ACTH- és glükokortikoidszint emelkedése nemcsak a HPA-tengely aktiválódását tükrözi, hanem egyúttal negatív feedback hatást gyakorol a hypothalamikus CRF és/vagy AVP felszabadulásra, ezáltal csökkenti a HPA-tengely aktivitását. A vegetatív stresszválasz a szimpatikus idegrendszer (SNS) aktivációját jelenti, amelyet a medulla oblongatából felszabaduló noradrenalin és a mellékvesekéregből felszabaduló adrenalin közvetít. A viselkedési stresszválasz ismerős környezetben fokozott lokomóciós aktivitásként, ismeretlen környezetben csökkent lokomóciós aktivitásként jelentkezik, ezen kívül csökkent táplálék- és vízfelvétel, valamint csökkent szociális és szexuális interakció jellemzi.

A CRF hatásait két különböző CRF-receptor, a CRF1 és a CRF2 közvetíti. A CRF1 és a CRF2 a G-protein-csatolt receptor (GPCR) szupercsalád B osztályába tartoznak és 415, illetve 397-437 aminosavval rendelkeznek. Több variánsuk is van: A CRF1-nek a c-h altípusokon kívül α és β izoformái is vannak, amelyeket rágcsálókban és emberekben egyaránt kimutatták, míg a CRF2-nek három izoformája van, az α , β és γ . A CRF2 α és CRF2 β -t rágcsálókban, főemlősökben és emberekben is kimutatták, de a CRF2 γ csak emberekben található meg.

A kezdeti elmélet szerint a CRF1 és a CRF2 dualista hatásokat közvetít a központi idegrendszerben (CNS): a CRF1 aktiválódása beindítja a stresszválaszokat, majd a CRF2 aktiválódása befejezi azokat. Egy újabb elmélet szerint azonban, a CRF1 és a CRF2 szerepe a stresszválaszban nem egyszerű dualizmus kérdése, hanem az aktivált agyi régiók és neuronpopulációk függvénye.

A CRF 1981-es izolálása óta több CRF-szerű peptidet is felfedeztek, amelyeket urokortinoknak neveztek el. A CRF és az urokortinok hasonló aminosav-szekvenciákkal rendelkeznek és hasonló intracelluláris útvonalakat aktiválnak, azonban különböző anatómiai eloszlásuk és fiziológiai funkciójuk van.

Az urokortin 1 (UCN1) egy 40 aminosavból álló neuropeptid, amelyet először 1995-ben patkányok agyából izoláltak. Az urokortin a halak urotenzinjéről (63%-ban homológ a CRF-fel) és az emlősök kortikotropinjáról (pontosabban az azt felszabadító faktorról) (45%-ban homológ a CRF-fel) származik. A rágcsálók agyában az UCN1 leginkább az Edinger-Westphal magban (EWN) fejeződik ki. Ez a mag általában az

oculomotoros, pupilláris és auditív funkciókban vesz részt, de az UCN1 expresszió által valószínűleg a neuroendokrin és viselkedési stresszválaszokban is szerepet játszik.

Az urokortin 2 (UCN2) egy 38 aminosavból álló neuropeptid, amelyet 2001-ben először egér agyában azonosítottak. Emberekben stresscopin-related peptidként (SRP) is ismert (34%-ban homológ a CRF-fel). Az UCN2 fokozott expressziója a hypothalamus különböző magjaiban és a locus coeruleusban (LC) arra utal, hogy a viselkedési és autonóm stresszválaszokban játszhat szerepet, beleértve a táplálék- és a vízfelvételt, valamint a mozgás szabályozását.

Az urokortin 3 (UCN3) egy másik 38 aminosavból álló neuropeptid, ugyancsak amelyet 2001-ben egér agyában azonosítottak. Emberekben stresscopin (SCP) néven is ismert (36%-ban homológ a CRF-fel). Az UCN3 olyan agyi régiókban expresszálódik fokozottan, amelyek szoros kapcsolatban vagy kölcsönhatásban állnak a PVN-nel, ami arra utal, hogy az UCN3 hozzájárulhat a stresszhez történő neuroendokrin és viselkedési adaptációhoz, beleértve a táplálék- és vízfelvételt, valamint a mozgás szabályozását.

Az urokortinok, a CRF-hez hasonlóan, a CRF1-hez és a CRF2-hez kötődnek. Bár mindkét CRF-receptor megtalálható a központi idegrendszerben és a periférián is, a CRF1 nagyobb mennyiségben fejeződik ki a CNS-ben, míg a CRF2 predominantán a periférián jelenik meg. A CNS-ben a CRF1 leginkább a cortexben, a cerebellumban és az anterior hypophysisben fejeződik ki, míg a CRF2 a szubkortikális régiókra korlátozódik, mint például a hypothalamus, a hippocampus, az amygdala és a posterior hypophysis.

Ami a farmakológiai profilt illeti, a CRF nagyobb affinitással kötődik a CRF1-hez, mint a CRF2-hez és főként a CRF1-n keresztül fejti ki hatásait, ezzel szemben az UCN1 nagyobb affinitással kötődik a CRF1-hez és a CRF2-hez, mint maga a CRF, ráadásul mindkét CRF-receptort egyformán képes aktiválni. Ezért a CRF és az UCN1 a CRF1 nem-szelektív agonistáinak tekinthetők. Ezenkívül a CRF és az UCN1 a CRF-kötő fehérjéhez (CRF-BP) is kapcsolódik, ami egy 322 aminosavból álló fehérje, amely feltehetőleg gátolja a CRF és az UCN1 hatásait. Az UCN2 és az UCN3 sokkal nagyobb affinitással kötődik a CRF2-höz, mint a CRF1-hez, és közülük főként az UCN3 az, amely szelektíven aktiválja a CRF2-t. Mivel az UCN2 és az UCN3 sem kötődik a CRF-BP-hez, ezek a CRF2 szelektív agonistáinak tekinthetők.

Ami a fiziológiás funkcióikat illeti, a CRF és az UCN1 adása a CRF1 aktivációján keresztül a HPA tengely aktiválódását, valamint szorongás- és depresszió-szerű viselkedést vált ki, míg az UCN2 és az UCN3 adása a CRF2 aktivációján keresztül anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat vált ki patkányokban. A CRF túlexpressziója, valamint a CRF1 és CRF2 globális és lokális kiütése egerekben azonban eltérő eredményekhez vezetett a szorongás-szerű viselkedés tekintetében. Ezért a CRF1 és CRF2 a HPA tengely aktiválásában, a szorongásban és a depresszióban betöltött szerepe mai napig vita tárgyát képezi.

A CRF1 és CRF2 pontos szerepének meghatározásához állatkísérletekre és CRF receptor antagonistákra van szükség. Először nem-szelektív CRF-antagonistákat, mint például α -helical CRF 9-41-et és D-Phe CRF-et fejlesztettek ki. Ezek peptid-eredetű, kompetitív és nem-szelektív CRF receptor antagonisták, amelyek hatékonyan gátolták a CRF és a stressz által kiváltott ACTH felszabadulást és lokomóciós aktivitást. A következő antagonisták az astressin volt, amely különösen hatékonyan csökkentette a HPA-tengely aktivitását és az szorongás-szerű viselkedést, de nem tudta visszafordítani a CRF és a stressz

által kiváltott lokomóciós hyperaktivitást. Az első valóban szelektív antagonisták a CP-154,526 és strukturális analógja, az antalarmin voltak. Ezek nem-peptid-eredetű, kompetitív és szelektív CRF1 antagonisták, amelyek képesek voltak mérsékelni a stressz, a szorongás- és depressziószzerű viselkedést rágcsálókban. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy az olyan szelektív CRF1 antagonisták, mint a Pexacerfont és a Verucerfont, vagy a szelektív CRF2 agonistáknak tartott UCN2 és UCN3, alkalmasak lesznek a stressz okozta pszichiátriai betegségek, köztük a szorongás, a depresszió, a poszttraumás stressz szindróma (PTSD) és a pánikbetegség kezelésére. Ezután a szelektív CRF2 antagonisták következtek, mint például az antisauvagin-30 és az astressin2B, az elsőt a békákban található sauvaginból, a másodikat pedig az astressinből fejlesztették ki. Az antisauvagin és az astressin2B peptid-eredetű, kompetitív és szelektív CRF2 antagonisták, amelyeket általában perifériásan adnak be. Mivel a CRF1 növeli a vastagbél tranzitot, míg a CRF2 csökkenti a gyomorürítést, az eredmények azt sugallták, hogy az olyan szelektív CRF1 agonisták, mint a Stressin1-A vagy a szelektív CRF2 antagonisták, mint az említett antisauvagin és az astressin2B alkalmazhatók lesznek a stressz okozta gasztrointesztinális betegségek, köztük az irritábilis bél szindróma (IBS) és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) terápiájában.

Sajnos ezek az állatkísérletek alapján ígéretesnek tűnő szerek, emberekben többnyire hatástalanok voltak. Ennek oka az lehet, hogy a neuropeptidek orális adásakor gasztrointesztinális traktusban lévő enzimek lebontják ezeket, intravénás úton pedig nem képesek átjutni a vér-agy gáton. Mindazonáltal, mai napig folynak klinikai vizsgálatok, amelyek bizonyíthatják, hogy a szelektív CRF1 antagonisták hatékony gyógyszerek lehetnek többek közt az alkoholaddikció terápiájában.

1.2. Alkohol intoxikáció és megvonás

Az alkoholaddikció, amelyet újabban alkoholhasználati zavarnak hívnak, krónikus, visszaesésekkel tarkított betegség, amelyre a szer kényszeres beszerzése és fogyasztása, a bevitel korlátozására irányuló kontrollvesztés, valamint a szermegvonás esetén kialakult negatív érzelmi állapot jellemzők. Az alkoholaddikciónak három szakasza van: a rohamívás vagy intoxikáció, a megvonás vagy negatív érzelmek, valamint a sóvárgás vagy a preokkupáció és anticipáció. Mindegy egyes szakaszra a hypothalmikus neurohormonok, mint a CRF és az AVP, és az extrahypothalmikus neurotranszmitterek, mint a striatális dopamin (DA), az amygdaláris gamma-aminovajsav (GABA) és a hippocampális glutamát (GLU) specifikus változásai jellemzők.

Magát a rohamívást egyébként a nagy mennyiségű alkohol rövid idő alatt történő fogyasztását jelenti. A nagy mennyiségű alkohol alatt férfiaknál öt vagy több standard alkoholos italt, nőknél pedig négy vagy több standard alkoholos italt értenek, amely a definíció szerint fogyasztás után 2 órán belül 0,08 g/dl-re emeli a véralkoholkoncentrációt (BAC), és általában a motoros koordináció és a kognitív funkciók akut károsodásával jár. Ezt követi a másnaposság, ami egy átmeneti állapot, amelyet a rohamívás másnapján jelentkező kellemetlen hatások jellemzik. Ez az állapot definíciószéűen egy nagymennyiségű alkoholfogyasztás után alakul ki, amikor a BAC megközelíti a nullát, és testi tünetekből áll, mint például az ataxia, a lokomóciós és az explorációs zavarok, valamint olyan érzelmi tünetekből, mint például a félelem, a szorongás és a depresszió. Az

alkoholaddikciót leginkább az alkoholintoxikáció és a másnaposság váltakozó epizódjai jellemzik. Azok az emberek, akik nagy mennyiségben, de csak alkalmanként fogyasztanak alkoholt, nem felelnek meg az alkoholhasználati zavar diagnosztikai kritériumainak, azonban a serdülőkorban ismételt nagyívászatok fontos kockázati tényezőt jelentenek a felnőttkori alkoholaddikció kialakulásában. Ráadásul az ismétlődő rohamivási epizódok hozzátávon az akut alkoholmegvonásra jellemző negatív érzelmeket, szorongást és depressziót, továbbá a szociális viselkedés megváltozását vonhatják magukkal. Persze a szorongást, a depressziót és a másnaposságot úgy általában az embereknek tulajdonítják. Mivel jelenlegi tanulmányunkban hím Wistar patkányokat és C57BL/6 egereket használtunk, a továbbiakban szorongásszerű és depressziószerű jelekről vagy viselkedésről és másnaposság-szerű tünetekről fogunk beszélni.

A rohamivás vagy intoxikáció szakasza a HPA tengely aktiválódásával jár, amelyet a hypothalamikus CRF és/vagy AVP közvetít, ezenkívül a mezolimbikus és a nigrostriatális dopaminerg pályák is aktiválódnak. A HPA-tengely a PVN-ből, az anterior hypophysiból és a mellékveséből áll, amelyek működését különböző stresszorok serkentik, többek közt maga az alkoholintoxikáció is. A mezolimbikus pálya dopaminerg projekciókat küld a ventrális tegmentális areából (VTA) a nucleus accumbensbe (NACC), amely a ventrális striátumot teszi ki, míg a nigrostriatális dopaminerg pálya a substantia nigra-ból a putamenbe és a nucleus caudatusba projecilál, amely tulajdonképpen a dorzális striátum.

A megvonás vagy negatív érzelmei szakasza a kiterjesztett amygdala kör aktiválásával jár együtt, amelyet az extrahypothalamikus CRF és noradrenalin közvetít. A kiterjesztett amygdala kör az amygdala központi magjából (CEA), a stria terminalis beágyazott magjából (BNST) és a nucleus accumbens (NACC) kérgéből áll, és a jutalmazási és stresszrendszerek közötti interface-ként működik. Az alkoholintoxikáció során a jutalmazási rendszer aktiválódik. Az alkohol serkenti a dopamin (DA) felszabadulását a striátumban és a gamma-aminovajsav (GABA) felszabadulását az amygdalában, ezzel jutalmazó, anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat váltva ki. Az alkoholintoxikáció amnéziát is kiválthat, amely mögött a csökkent glutamát (GLU) felszabadulás állhat a hippocampusban. Az alkoholmegvonás során jutalomellenes mechanizmusként a stresszrendszer aktiválódik, ami alkoholmegvonási szindrómát eredményez, amely olyan tüneteket foglal magában, mint az anhedónia, a szorongás és az agresszió. Ezek a tünetek a striatális DA és az amygdaláris GABA felszabadulás csökkenésével, valamint a hippocampalis GLU felszabadulás fokozódásával magyarázhatók. Az alkoholmegvonási szindróma szomatikus (fizikai) tünetekből és affektív (érzelmi) tünetekből áll, amelyek közvetlenül az alkohol abbahagyása után jelentkeznek. A testi tünetek általában az alkoholmérgezést követő 24 órán belül megszűnnek (akut alkoholmegvonás), míg az érzelmi tünetek napokig vagy akár évekig is fennállhatnak (elhúzódó alkoholmegvonás), és olyan sóvárgást válhatnak ki, ami miatt az ember könnyen visszesik, főként stresszes időszakokban. A preokkupáció és anticipáció (sóvárgás) szakasza a hippocampus, az orbitofrontális cortex, a prefrontális cortex, az insula és a basolaterális amygdala aktiválódásával jár együtt, és feltehetően mind a hypothalamikus, mind pedig az extrahypothalamikus CRF szerepet játszik benne.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A jelenlegi tanulmány egyik célja az volt, hogy meghatározzuk, hogy a rohamivás és a másnaposság milyen hatásokat fejt ki a szorongásszerű, a depressziószerű és a szociális viselkedésre. E célból hím C57BL/6 egereket négy napon át sötétben itattunk, majd az alkoholt egy napon át megvontuk („a drinking in the dark” a rohamivás klasszikus módszere állatokban). Mivel a CRF és a CRF receptorok a szorongás és a depresszió pathogenezisében és a szociális viselkedés különböző aspektusaiban is szerepet játszhatnak, ezeket is megvizsgáltuk: ennek érdekében az egereket intracerebroventrikuláris (ICV) szelektív CRF1 antagonistákkal és szelektív CRF2 antagonistákkal is előkezeltek.

A tanulmány másik célja az volt, hogy az alkoholintoxikáció és az alkoholmegvonás hypothalamikus neurohormonokra és extrahypothalamikus neurotranszmitterekre gyakorolt hatásait is meghatározzuk. Ebből a célból hím Wistar patkányokat négy napon át ismételt intraperitoneális (IP) alkoholkezelésnek, majd 1 napos megvonásnak tettünk ki. Mivel a CRF-nek az alkoholaddikció mindhárom szakaszában szerepet játszik, a CRF-receptorok részvételét az alkoholintoxikációban és a megvonásban is megvizsgáltuk: ennek érdekében a patkányokat ICV szelektív CRF antagonistákkal is előkezeltek.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Állatok

Kísérleteinkhez hím C57BL/6 egereket (Charles River Laboratories Hungary Kft., Magyarország) használtunk, amelyek a kísérlet idejében 18-24 g súlyúak voltak. A kísérletek előtt az egereket egy ketrecben együtt, állandó hőmérsékleten, fordított napszaki beosztás szerint (18:00-tól világosban, 6:00-tól sötétben) tartottuk, kivéve amikor sötétben itattuk őket, amikor külön ketrecekben voltak. A kereskedelemben kapható takarmány és csapvíz tetszés szerint (*ad libitum*) állt a rendelkezésükre, azonban négy napig néhány órára (2, 2, 2 és 4) a vizes palackokat 20%-os alkoholos palackokra cseréltük. A nem-specifikus stressz minimalizálás érdekében az egereket naponta kézhez szoktatuk (“handling”). Minden vielkedési tesztet 9:00 és 12:00 között végeztünk.

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat (Charles River Laboratories Hungary Kft., Magyarország) is használtunk, amelyek a kísérlet idejében 150-250 g súlyúak voltak. A patkányokat egy ketrecben együtt, állandó hőmérsékleten, standard napszaki beosztás szerint (6:00-tól világosban, 18:00-tól sötétben) tartottuk. A kereskedelemben kapható takarmány és csapvíz tetszés szerint (*ad libitum*) állt a rendelkezésükre. A nem-specifikus stressz minimalizálás érdekében az egereket naponta kézhez szoktatuk (“handling”). Minden vielkedési tesztet 9:00 és 12:00 között végeztünk.

Minden állatot az ARRIVE-irányelveknek megfelelően kezeltünk, és a kísérleteket az állatkísérletekről szóló 2010/63/EU irányelvvel összhangban végeztük.

3.2. Műtét

Az egerek jobb oldali agykamrájába egy kisebb rozsdamentes acél Luer-kanült ültettünk be egy sztereotaxiás egéragy atlasznak megfelelően, amit pillantragasztóval rögzítettünk. A sztereotaxiás koordináták a bregmától 0,5 mm-re laterálisan és 0,5 mm-re posterior és a duralis felszíntől 3 mm-re mélyen voltak. A műtétet 60 mg/kg pentobarbitál-nátriummal altatás való előzte meg, és 7 nap pihenés követte.

A patkányok jobb oldali agykamrájába egy nagyobb rozsdamentes acél Luer kanüllel ültettük be egy sztereotaxiás patkányagy atlasznak megfelelően, a kanült pedig cementtel rögzítettük. A sztereotaxiás koordináták a bregmától 0,2 mm-re hátul és 1,7 mm-re laterálisab, a duralis felszíntől 3,7 mm mélyen voltak. A műtétet 35 mg/kg pentobarbitál-nátriummal való altatás előzte meg, és 7 nap pihenés követte.

3.3. Anyagok

A sötétben történő itatás előtt csapvizet, majd 20%-os alkoholos oldatot, az intraperitoneális (IP) kezeléshez fiziológiás sóoldatot és 20%-os alkoholos oldatot, az intracerebroventrikuláris (ICV) előkezeléshez fiziológiás sóoldatot, antalarmin és astressin2Bt használtunk. A viselkedési tesztekhez csapvíz és nátrium-hipoklorit-oldat, a laboratóriumi vizsgálatokhoz a kereskedelemben kapható kitéket (BAC-kimutatási kit, CRF, AVP és ACTH szendvics ELISA-kit, GeneJET RNS-tisztító kit és Maxima First Strand cDNS-szintézis kit) használtunk. A plazma CORT koncentráció meghatározásához

metilén-kloridot, kénsavat és alkoholos oldatot használtunk. A hypothalamus *in vitro* homogenizálásához ecetsavat, a striátum, az amygdala és a hippocampus *in vitro* szuperfúziójához pedig Krebs oldatot és tríciummal jelölt neurotranszmittereket, köztük [3H]DA-t, [3H]GABA-t és [3H]GLU-t, valamint Ultima Gold szcintilláló folyadékot használtunk.

3.4. Kezelés

Az egereket „drinking in the dark” módszernek megfelelően sötétben itattuk. Ehhez először az egerek napszaki ciklusát megfordítottuk vagyis 14 napon át 18:00-tól világosban, 6:00-tól pedig sötétben tartottuk őket, majd azonban négy napig néhány órára (2, 2, 2 és 4) a vizes palackokat 20%-os alkoholos palackokra cseréltük. A 4. napon (közvetlenül a rohamivás után) vagy az 5. napon (24 órával a rohamivás után) az egereket ICV szelektív CRF1 antagonistá antalarminnal vagy szelektív CRF2 antagonistá astressin2B-vel előkezeltük. Az antalarmin dózisa 0,1 µg/2 µl, az astressin2B dózisa pedig 1 µg/2 µl volt, mivel korábbi kísérleteinkben már bebizonyosodott, hogy ezek a dózisok hatékonyan, de a szociális viselkedés változása nélkül képes gátolni a neuroendokrin stresszválaszt. 30 perc elteltével az állatokat emelt keresztpalló tesztben vagy erőltetett úszás tesztben vizsgáltuk a szorongás, illetve a depresszió jeleinek kimutatására. Ezzel párhuzamosan szociális interakció tesztet is végeztünk, amelyben az egerek szociabilitását és a szociális újdonság iránti preferenciáját vizsgáltuk. Az egereket véletlenszerűen osztottuk be egyik vagy másik kezelésre, ugyanazon vagy két egymást követő napon nem voltak kitéve egynél több ICV adásnak. Az egereket a viselkedési tesztekre szintén véletlenszerűen osztottuk be ugyanazon vagy két egymást követő napon nem vizsgáltuk őket egynél több tesztben.

A patkányokat hím Wistar patkányokat négy napon át, 12 óránként ismételt IP alkoholkezelésnek, majd 1 napos megvonásnak tettünk ki. Az alkohol kezelés protokollja egy korábbi tanulmány alapján történt, amelyben a patkányoknak 12 óránként 20%-os alkoholt adtak 3 g/kg dózisban. Az 5. napon (közvetlenül az utolsó IP alkoholadás után) vagy a 6. napon (24 órával az utolsó IP alkoholadás után) a patkányoknak ICV 0,1 µg/2µl antalarmin vagy 1 µg/2µl astressin2B-t adtunk. A CRF1 és CRF2 antagonisták dózisa korábbi ugyancsak tanulmányokon alapultak, ezek ugyanis azt sugallták, hogy ezek a dózisok hatékonyan enyhítik a HPA tengely aktivitását és a striális DA felszabadulást akut nikotinmegvonás során. 30 perc elteltével az egereket lefejeztük, az agyukból különböző régiókat izoláltunk, a törzsükből pedig vért gyűjtöttük. Az egerek hypothalamusából CRF és AVP expressziót és koncentrációt, a striátumban DA, az amygdalában GABA, a hippocampusban pedig GLU felszabadulást mértünk. A vérben a plazma ACTH és CORT koncentrációját határoztuk meg.

3.5. Viselkedési tesztek

3.5.1. Emelt keresztpalló teszt

Az egereket az elsőként Lister által leírt emelt keresztpalló (elevated plus-maze) tesztben vizsgálták. Az emelt keresztpallótól 1 méter távolságra ülő megfigyelő 5 percen

keresztül a nyitott karokba való belépések (az összes belépésszámhoz viszonyított) számát és a nyitott karokban töltött (az összes időhöz viszonyított) időt regisztrálta.

3.5.2. Erőltetett úszás teszt

Az egereket az elsőként Porsolt által leírt erőltetett úszás (forced swim) tesztben is vizsgáltuk. Az asztaltól 1 méter távolságban ülő megfigyelő 5 percen keresztül a (vízben való) úszással és a (falon való) mászással töltött időt és a mozdulatlansággal vagy lebegéssel töltött időt regisztrálta.

3.5.3. Szociális interakció teszt

Az egereket a Crawley által feltalált (három kamrából álló) szociális interakció arénában is teszteltük. Kétféle tesztet végeztünk: az első tesztben a szociabilitást, a második tesztben a szociális újdonság iránti preferenciát vizsgáltuk. Az asztaltól 2 méter távolságban ülő megfigyelő 5 percen keresztül az idegen egér kamrájába való belépések (az összes belépésszámhoz viszonyított) számát és az idegennel való interakció (az összes időhöz viszonyított) idejét regisztrálta.

3.6. Laboratóriumi tesztek

3.6.1. Véralkoholkoncentráció (BAC) meghatározás

Az egerek által elfogyasztott alkohol mennyiségét az alkoholos palack súlya alapján számoltuk ki minden nap, de a véralkohol-koncentrációt (BAC) csak a 4. napon (közvetlenül a rohamivás után) és az 5. napon (24 órával a rohamivás után) határoztuk meg. Ehhez az egerek fejét a kísérlet után levágtuk és a törzsükből vért gyűjtöttünk. Korábbi kísérletek alapján a sötétben való itatás kb. 3,5-5,0 g/kg alkohol bevitelével jár, amely 2 órán belül 0,08 g/dl BAC értéket eredményez hím C57BL/6 egerekben. A jelenlegi kísérletek során azonban az egerek nem mindig érték el ezt az alkoholszintet, ezért a 0,08 g/dl-nél alacsonyabb BAC-értékekkel rendelkező egereket kizártuk a statisztikai elemzésből.

Az alkohol kezelés protokollja egy korábbi tanulmány alapján történt, amelyben a patkányoknak 12 óránként 20%-os alkoholt adtak 3 g/kg dózissal és ez 197,5±19 mg/dl BAC értéket eredményezett. Ehhez a patkányok fejét a mérések előtt levágtuk és a törzsükből vért gyűjtöttünk. Az BAC-ot a vér centrifugálásával nyert plazmából határoztuk meg, közvetlenül a mintavétel után, egy enzimatikus kit és egy cobas c502 analízátor segítségével.

3.6.2. Polimeráz lánreakció módszer (PCR)

A hypothalmikus CRF és AVP expresszió meghatározásához kvantitatív reverz transzkripciós polimeráz lánreakció módszert (PCR) alkalmaztunk. A hypothalamust a sztereotaxiás patkányagy atlasznak megfelelően izoláltuk, a sztereotaxiás koordináták rostro-caudalisán (RC) +2,6 - -2,6 mm, medio-laterálisán (ML) +1,5 - -1,5 mm, dorso-ventrálisán (DV) +7 - +10 mm voltak, majd a hypothalamust homogenizáltuk. Az RNS

mennyiség meghatározásához GeneJET RNS-tisztító kité és Maxima First Strand cDNA Synthesis kité használtunk és a gyártó utasításai szerint jártunk el.

3.6.3. Enzimhez kötött immunoszorbens módszer (ELISA)

A hypothalamikus CRF és AVP és a plazma ACTH koncentráció meghatározásához szendvics ELISA módszert alkalmaztunk. Ehhez hypothalamust a sztereotaxiás patkányagy atlasznak megfelelően, a fenti sztereotaxiás koordináták szerint izoláltuk, majd homogenizáltuk, illetve a törzsből a vért összegyűjtöttük. A hypothalamikus CRF és AVP és a plazma ACTH mennyiség meghatározásánál a gyártó utasításai szerint jártunk el és a koncentrációkat ng/ml-ben fejeztük ki.

3.6.4. Kemofluoreszcens módszer

A plazma CORT-koncentráció meghatározása kemofluoreszcens módszert használtuk. A kemofluoreszcens módszert eredetileg Purves és Sirett írta le, később Zenker és Bernstein módosított rajta. A plazma ACTH mennyiség meghatározásánál a szerzők utasításai szerint jártunk el és a koncentrációt $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ -ben fejezték ki.

3.6.5. Szuperfúzió

A striatális DA, az amygdaláris GABA és a hippocampalis GLU felszabadulását egy *in vitro* szuperfúzió módszer segítségével határoztuk meg. A szuperfúziós módszert eredetileg Gaddum írta le, később Harsing és Vizi fejlesztette tovább. A striátumot, az amygdalát és a hippocampust a sztereotaxiás patkányagy atlasznak megfelelően izoláltuk, a sztereotaxiás koordináták a striátum esetében RC + 4,0 - 1,0 mm, ML + 1,0 + 5,0 mm, DV + 3,0 + 8,0 mm; az amygdala esetében RC 0,0 - 2,0 mm, ML + 3,0 + 6,0 mm, DV + 7,0 + 10,0 mm; és a hippocampus esetében RC - 4,0 - 6,0 mm, ML + 2,0 + 5,0 mm, DV + 3,0 + 8,0 mm voltak. Ezután az agyrégiókat szeletekre vágtuk, az agyszeleteket pedig tríciummal jelölt neurotranszmitterekkel ([^3H]DA-t, [^3H]GABA-t és [^3H]GLU-t) inkubáltuk. A radioaktivitást folyékony szcintillációméterrel határoztuk meg és percenkénti ütések számában („count per minute, CPM) fejeztük ki.

3.7. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzéséhez ANOVA variancia analízist végeztük. Az egérkísérletek esetében a csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVÁ-val (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., USA) határoztuk meg, majd a páronkénti összehasonlításhoz Tukey-féle post-hoc tesztet használtunk. A patkánykísérletek esetében a csoportok közötti különbségeket kétutas ANOVÁ-val (SPSS Inc., USA) határoztuk meg, majd a páronkénti összehasonlításhoz Bonferroni-féle post-hoc tesztet használtunk. Statisztikailag szignifikáns különbségként mindkét esetben csak a 0,05-nél kisebb valószínűségi szintet ($p < 0.05$) fogadtuk el.

4. EREDMÉNYEK

A 4. napon (közvetlenül a rohamivás után) az emelt keresztpalló tesztben az alkoholt fogyasztó egerek szignifikánsan többször léptek be és többet is tartózkodtak a nyitott karokban, mint a kontroll állatok. Hasonlóképpen, az alkoholt fogyasztó egerek szignifikánsan több időt töltöttek úszással és mászással és szignifikánsan kevesebb időt mozdulatlanul vagy lebegéssel, mint a kontroll állatok. Az alkohol tehát anxiolitikus és antidepresszáns hatással volt az egerekre és ezeket a hatásokat az antalarmin nem, de az astressin2B szignifikánsan csökkentette. A szociális interakció tesztekben az alkohol szignifikánsan fokozta az idegen egérrel való szociális interakció idejét, de nem befolyásolta jelentősen az idegen egérhez való belépések számát, a kontrollhoz képest. Az alkohol okozta fokozott szociabilitást és szociális újdonság iránti preferenciát az antalarmin igen, az astressin2B azonban nem csökkentette.

Az 5. napon (24 órával a rohamivás után) az emelt keresztpalló tesztben a korábban alkoholt fogyasztó egereknél szignifikánsan kevesebbszer léptek be és kevesebbet is tartózkodtak a nyitott karokban, mint a kontroll állatok. Emellett, a korábban alkoholt fogyasztó egerek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek úszással és mászással és szignifikánsan több időt mozdulatlanul vagy lebegéssel, mint a kontroll állatok. Ezek a szorongásszerű és depressziószerű viselkedés jelei, amelyeket az antalarmin szignifikánsan enyhített, azonban az astressin2B nem változtatta meg. A szociális interakció tesztekben az 24 óra elteltével az alkohol már nem befolyásolta jelentősen sem az idegen egérrel való szociális interakció idejét, sem pedig az idegen egérhez való belépések számát, a kontrollhoz képest. Ennek megfelelően, sem az antalarmin, sem pedig az astressin2B nem változtatta meg a szociabilitást és a szociális újdonság iránti preferenciát.

Patkányokban a hypothalamikus CRF expresszió az alkoholintoxikáció és 24 órás alkoholmegvonás hatására is szignifikánsan fokozódott és ezeket a hatásokat csak az antalarmin, az astressin2B azonban nem volt képes jelentősen csökkenteni. Az alkoholintoxikáció és 24 órás megvonás hatására a hypothalamikus CRF koncentráció is szignifikánsan megemelkedett és ezeket a hatásokat az CRF1 antagonistá igen, a CRF2 antagonistá azonban nem gátolta jelentősen. Patkányokban a hypothalamikus AVP expresszió az alkoholintoxikáció és 24 órás alkoholmegvonás hatására is szignifikánsan csökkent, de ezeket a hatásokat sem az antalarmin, sem az astressin2B azonban nem csökkentette jelentősen. Ezzel szemben az alkoholintoxikáció és 24 órás megvonás hatására a hypothalamikus AVP koncentráció szignifikánsan megemelkedett és ezeket a hatásokat egyik CRF antagonistá sem gátolta meg jelentősen.

Az alkohollal kezelt patkányok plazma ACTH-szintje az 5. és a 6. napon is emelkedett volt és ezeket az emelkedéseket az antalarmin csökkentett, de az astressin2B nem volt képes rá. Ezzel párhuzamosan az alkohollal kezelt patkányok plazma CORT-szintje az 5. és a 6. napon is emelkedett volt, és ezeket a szinteket a CRF1-antagonistá volt képes mérsékelni, a CRF2-antagonistá nem.

Az alkoholintoxikáció növelte, míg az alkoholmegvonás csökkentette a striatális DA és az amygdaláris GABA felszabadulást és ezeket a hatásokat csak az antalarmin, az astressin2B nem fordította vissza. Ezzel szemben a hippocampalis GLU felszabadulás alkoholintoxikáció hatására csökkent, alkoholmegvonás hatására pedig nőtt, de ezeket a hatásokat is csak az antalarmin, az astressin2B nem volt képes megakadályozni.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az alkohol intoxikáció és megvonás hatásai

Eredményeink azt sugallják, hogy a rohamivás és a másnaposság eltérő hatást gyakorol a szorongásszerű, a depressziószerű és a szociális viselkedést illetően.

A rohamivás anxiolitikus és antidepresszáns hatást vált ki, amikor az egereket közvetlenül az sötétben való itatás után vizsgáljuk. Korábbi tanulmányok már utaltak arra, hogy a rohamivás egyetlen ciklusa nem feltétlenül jár szorongással és depresszióval. Ezt bizonyítja egy nemrégiben végzett vizsgálat is, amelyben a sötétben való itatás kissé módosított változatát alkalmazták, és amelyből kiderült, hogy a rohamivás rövid távon ugyan nincs hatással a serdülő C57BL/6 egerek viselkedésére, de hosszú távon, felnőttkorban szorongás- és depressziószerű viselkedést idézhet elő. A jelenlegi vizsgálat alapján úgy tűnik, hogy a serdülő C57BL/6 egereknél épp ellenkezőleg, az egyszeri rohamivás inkább anxiolitikus és antidepresszáns hatással van. Ezen túl pedig a rohamivás fokozza a hím egerek szociabilitását és a szociális újdonság iránti preferenciáját, legalábbis amikor közvetlenül a sötétben való ivás után vizsgálják ezeket, ami összefügghet az ekkor megfigyelt anxiolitikus és antidepresszáns hatásokkal. Viszonylag közismert tény, hogy az alkoholnak bifázisos hatása van a szociális viselkedésre, mivel alacsony dózisok fokozzák, magas dózisok pedig gátolják a szociális interakciók számát. Továbbá, az alkoholt fogyasztó egerek több időt töltenek interakcióban más egerekkel, mint egy idegen tárggyal, függetlenül az alkohol dóziséjától.

Ezzel szemben az alkoholt fogyasztó egerek 24 órával az alkoholfogyasztás után szorongásszerű és depressziószerű viselkedést produkáltak, amelyek az emberekben tulajdonképpen a másnaposágnak felelnek meg. A másnaposság egy olyan kellemetlen állapot, amely egyetlen nagy mennyiségű alkoholfogyasztás után jelentkezik, amikor a BAC megközelíti a nullát, és testi jeleket és érzelmi tüneteket foglal magába, beleértve a szorongást és a depressziót. A másnaposság érzelmi következményei - egyes szerzők ezt a kifejezést az akut alkoholmegvonással egyenértékűen használják - általában az alkoholfogyasztást követően 10 órával jelentkeznek és 24 óra elteltével is fennállhatnak. Egy korábbi tanulmány valóban arról számolt be, hogy a 30 napig tartó, nagy mennyiségű alkoholfogyasztás negatív affektív, leginkább szorongásszerű tüneteket vált ki egerekben, amelyek az elvonás után 24 órával jelentkeznek és az utolsó ivási epizódot követően legalább 21 napig fennállnak. Egy másik, korábban publikált tanulmányban azonban csak gyenge negatív affektív zavarról számolt be egerekben, beleértve a szorongásszerű és depressziószerű viselkedés néhány jelét, ráadásul a plazma CORT szintjének emelkedését sem mutatták ki egereknél. Ebben a vizsgálatban hím és nőstény, serdülő és felnőtt egereket 14 egymást követő napon át sötétben itattak, miközben az állatok több (vizes és alkoholos) palack is választhatnak. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a negatív affektív tünetek az alkoholmegvonás során jelentkeznek, de életkor-függő: a pubertéskor során lappanganak és csak felnőttkorban válnak klinikailag is jelentőssé, ugyanakkor azt is elismerték, hogy a rohamivás okozta más vizsgálatokhoz képest gyenge szorongásszerű és depressziószerű viselkedés a módszertani különbségeknek is betudható. Ezenfelül, a jelenlegi eredmények alapján 24 órával az sötétben való itatás után az alkohol nem

befolyásolja a hím egerek szociális interakcióját. Ennek megfelelően, egy nemrégiben végzett vizsgálat már beszámolt arról, hogy a nagymennyiségű alkoholvívás nincs hatással az egerek szociabilitására és a szociális újdonság iránti preferenciájára, legalábbis akkor, amikor azt 24 órával a rohamívás után vizsgálják. Egy másik, nemrégiben közzétett tanulmány a rohamívás szorongást okozó és a kognitív képességeket károsító hatását hangsúlyozta. Ebben a tanulmányban C57BL/6 egereket vizsgáltak, amelyeket 1 hónapon keresztül sötétben itatták, majd egy sor viselkedési tesztben vizsgálták, beleértve az emelt keresztpalló tesztet, az erőltetett úszás tesztet és a Morris-féle vízi labirintus tesztet. A szerzők a következő következtetésekre jutottak: mind az egerek neme, mind pedig az életkora olyan alapvető tényezők, amelyek nagyban befolyásolják az önkéntes alkoholfogyasztást idősebb korban; a rohamívás nemtől függetlenül negatív érzelmi állapotot vált ki idősebb korban; a rohamívás felnőttkorban és idős korban egyaránt károsítja a térbeli tanulást és a memóriát; a rohamívás felnőttkorban felgyorsítja a munkamemória romlását; valamint a rohamívás súlyosabb kognitív károsodást okoz felnőtt nőstényekben, mint felnőtt hímeiben.

Az utóbbi időben több tanulmány is vizsgálta a rohamszerű vagy nagy mennyiségű alkoholfogyasztás által kiváltott negatív hatásokat. Úgy véljük, hogy a mi vizsgálatunk és egyéb tanulmányok közötti különbségek a szorongásszerű, a depressziószerű és a szociális viselkedést illetően a sötétben való itatás módszerének apró változtatásaiban rejlenek. Kísérleteinkben a C57BL/6 egereket a sötétben való itatás klasszikus módszerének megfelelően egyszeri alkalommal 4 napon keresztül alkohollal itattuk az állatokat, még akkor is, ha azok nem mindig érték el a 0,08 g/dl BAC értéket 2 órán belül. Ehhez képest más vizsgálatokban az egereket több alkalommal, különböző időpontokban és hosszabb ideig itatták alkohollal, épp azért, hogy elérjék a rohamívásra jellemző alkoholszintet. Ami a mi esetünkben 24 órával az egyszeri rohamívás után megfigyelt robusztus negatív érzelmi hatást illeti, azt más szerzők több ciklusnyi rohamívás és megvonás után írták le, mi azonban azt feltételezzük, hogy ezek is az eltérő módszerekből adódhatnak. Például, saját kísérleteinkben a 0,08 g/dl-nél alacsonyabb BAC-értékkel rendelkező egereket kizártuk a statisztikai analízisből, ami az egyes csoportok esetében viszonylag kis elemszámhoz vezetett. Fontos megemlíteni azt is, hogy mások kísérleteiben a viselkedési tesztekhez az egereket nem az alkoholszintjük alapján választották ki (ráadásul a tesztek előtt nem alkalmaztak műtétet sem) és ez nagyobb elemszámú csoportot és komplexebb statisztikai megközelítést vont maga után, ami statisztikailag más eredményhez vezetett.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az alkoholintoxikáció során a HPA tengely aktivitását a hypothalamikus CRF indítja be és a plazma CORT és ACTH szintjének emelkedéseként tükröződik. A stressz-tengely mellett a jutalmazási rendszer is aktiválódik, ami elsősorban a striatális DA és az amygdaláris GABA felszabadulás fokozódásával és a hippocampális GLU felszabadulás csökkenésével jár. Eredményeink azt is bizonyítják, hogy az alkoholmegvonás során a HPA tengely továbbra is aktív marad, de ezúttal az aktivációt a striatális DA és az amygdaláris GABA felszabadulás csökkenése, valamint a hippocampális GLU felszabadulás növekedése kíséri, amelyeket valószínűleg az extrahypothalamikus CRF közvetít.

Korábbi tanulmányok is mutatták, hogy a rohamívás vagy intoxikáció és a megvonás vagy negatív érzelmek olyan változásokkal járnak, mint például a striatális DA, az amygdaláris GABA és a hippocampális GLU felszabadulás. Az akut alkoholfogyasztás

serkenti a striatális DA felszabadulást, ami a jutalmazás érzetet idézi elő, míg a krónikus alkoholfogyasztás a DA felszabadulásának csökkenéséhez vezet a striátumban, ami az alkoholmegvonás során a jutalmazási érzet hiányában nyilvánul meg. Ez az érzet hiány a jutalomküszöb növekedésével magyarázható, amelyet a pre-szinaptikus DA-receptorok down-regulációja okoz, de az extracelluláris DA-felszabadulás csökkenés is hozzájárulhat, amelyet a striatális DA-raktárak kimerülése miatt alakul ki, amely az alkoholmegvonás során válik nyilvánvalóvá. Az amygdaláris GABA feltehetően az alkohol pozitív, anxiolitikus hatásaiban játszik szerepet. Az akut alkoholfogyasztás elősegíti a GABA-erg neurotranszmissziót a CEA-ban mind pre-, mind poszt-szinaptikus mechanizmusokon keresztül, míg a krónikus alkoholfogyasztás fokozza az alap GABA-erg neurotranszmissziót, szemben a stimulált GABA felszabadulással. Ezzel szemben a hippocampális GLU-nak feltehetően az alkohol negatív, anxiogén hatásainak, különös tekintettel az alkoholmegvonás során megfigyelhető agresszió kialakulásában játszik szerepet. Általában az akut alkoholfogyasztás csökkenti a glutamaterg neurotranszmissziót a GLU-receptorok down-regulációja révén, míg a krónikus alkoholfogyasztás növeli a glutamaterg neurotranszmissziót a GLU-receptorok up-regulációja és a GLU felszabadulásának stimulálása révén, ami tovább fokozódhat minden egyes alkoholmegvonás során.

5.2. A CRF és a CRF receptorok szerepe

Eredményeink azt is sugallják, hogy a rohamivás által kiváltott anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat a CRF2, míg a másnaposság által okozott szorongás- és depressziószerű jeleket a CRF1 közvetíti. Eredményeink összhangban vannak a dualista elmélettel, miszerint a CRF1 és a CRF2 ellentétes szerepeket töltenek be az agyban, így például a CRF1 aktivációja a HPA tengely aktiválódását, szorongást és depressziót vált ki, míg a CRF2 aktivációja anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat közvetít. Ne felejtül el azonban azt sem el, hogy a legújabb hipotézis szerint azonban a CRF1 és a CRF2 szorongásban és depresszióban betöltött szerepe nem egyszerű dualizmus kérdése, hanem az aktíváló agyi régióktól és neuronpopulációktól függ, ez az elmélet azonban a modern megközelítésű módszerek hozománya lehet.

Egy korábbi tanulmány arról számolt be, hogy az alkohol önadagolása előtti előkezelés szelektív CRF1 antagonistával vagy szelektív CRF2 agonistával csökkenti a bevitt alkohol mennyiségét. A jelenlegi tanulmány ugyanezt az állatmodellt alkalmazza és azt a kiegészítést teszi, hogy a szelektív CRF1 antagonistával vagy szelektív CRF2 antagonistával való előkezelés mérsékelheti mind az alkohol pozitív, jutalmazó hatásait, mind pedig az alkoholmegvonás negatív, averzív hatásait. Ilyen értelemben, a szelektív CRF antagonisták együttes adása megakadályozhatja, hogy az ismétlődő rohamivási ciklusok átalakuljanak alkoholaddikcióvá. Ezen kívül a szelektív CRF2 agonisták, mint például az UCN2 és UCN3, adása szintén hasznosnak bizonyulhat az alkoholmegvonás terápiájában, mivel ezek szintén enyhítették a nikotinmegvonásban kialakult szorongás- és depressziószerű viselkedést és a HPA tengely aktiválódását.

Korábbi tanulmányok már egyértelműen alátámasztották a CRF szerepét az alkohol okozta HPA tengely aktiválódásban. Először is, CRF-antiszérum vagy CRF-antagonista adása gátolta az alkohol ACTH-szekrécióra gyakorolt serkentő hatását

patkányokban. Másodszer, a CRF-szekretáló paraventriculáris neuronok kétoldali kiirtása csökkentette, bár nem szüntette meg teljesen az alkohol által stimulált ACTH-szekréción. Harmadszer, az alkohol bevitel növelte a CRF heteronukleáris RNS és mRNS szintjét, valamint a c-Fos mRNS és a Fos fehérje expresszióját a PVN-ben. A jelenlegi vizsgálat aláhúzza a hypothalamikus CRF szerepét az alkoholintoxikáció és a megvonás okozta HPA tengely aktiválásában, mivel a hypothalamikus CRF expressziója és a koncentrációja a plazma ACTH és CORT szintjével párhuzamosan nőtt meg, közvetlenül és 24 órával az utolsó alkohol beadás után.

Korábbi tanulmányok már az AVP szerepére is találtak bizonyítékokat. Először, AVP-antiszérum vagy AVP-antagonista adása gátolta az alkohol ACTH-szekrécióna gyakorolt serkentő hatását patkányokban. Másodszer, a CRF-szekretáló paraventriculáris neuronok kétoldali kiirtása után az endogén AVP eltávolítása tovább csökkentette az alkohol által stimulált ACTH-szekréción. Harmadszer, az alkohol beadása növelte az AVP heteronukleáris RNS és mRNS szintjének expresszióját. A jelenlegi vizsgálat azonban megkérdőjelezi a hypothalamikus AVP szerepét az alkoholintoxikáció és a megvonás okozta HPA tengely aktiválásában, mivel a csökkent hypothalamikus AVP expresszió és a megnőtt koncentráció közvetlenül és 24 órával az utolsó alkoholbevitel után inkább a hypothalamikus AVP felszabadulás csökkenésére, semmint fokozott szintézisére utal. Ez a folyamat pedig a plazma glükokortikoidok és az ACTH negatív feedback hatásából adódhat vagy az AVP más funkciójával, például a vízvisszatartással állhat összefüggésben.

Ami a CRF1 szerepét illeti az alkohol okozta HPA-tengely aktiválásában, korábbi *in vivo* kísérletek már kimutatták, hogy a paraventricularis CRF1 expresszió up-regulációja az ACTH fokozott szekréción amit az alkohol bevitel okoz, nem-szelektív CRF receptor antagonistá a stressinnel és szelektív CRF1 antagonistá NBI 30775 segítségével meggátolható. Mindamellet az alkohol bevitel nem idézett elő CRF2 expresszió up-reguláción a PVN-ben, és a szelektív CRF2 antagonistá a stressin2B sem blokkolta az alkohol által kiváltott ACTH-szekréción.

Ami a CRF1 szerepét illeti az alkohol okozta striatális DA, amygdalális GABA és a hippocampalis GLU változásokban, korábbi *in vivo* kísérleteink már kimutatták, hogy a krónikus nikotin adást követő akut megvonás során megfigyelt változásokat a striatális dopamin felszabadulás és a lokomotoros aktivitásban a CRF1 és nem a CRF2 receptor közvetíti. Továbbá korábbi *in vitro* kísérleteinkből az derült ki, hogy a striatális DA és az amygdalális GABA felszabadulást a CRF1 agonisták serkentik, de szelektív CRF2 antagonisták nem befolyásolják. Emellet az is kiderült, a GLU és az acetilkolin felszabadulást a hippocampusban két, látszólag ellentétes CRF-rendszer (CRF1/CRF és CRF2/UCN2 és UCN3) szabályozza.

Összességében a jelen tanulmány a CRF és a CRF1 szerepét hangsúlyozza az alkoholintoxikáció és a megvonás okozta hypothalamikus neurohormon és extrahypothalamikus neurotranszmitter változásokban, ugyanakkor kizárja a CRF-receptorok alkohol okozta AVP változásokban betöltött szerepét. Ahhoz azonban, hogy az alkoholintoxikációban és a megvonásban részt vevő pontos agyrégiókra és útvonalakra is fény derüljön, a jövőben szükség lesz a CRF agonisták és antagonisták célzott beadására és modernebb technikák alkalmazására is, mint például a CRF túlexpresszióját és a globális vagy lokális CRF1 és CRF2 kiütésén alapuló állatmodellekre.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az alkoholaddikciónak három szakasza van: a rohamivás vagy intoxikáció, a megvonás vagy negatív érzelmek és a sóvárgás vagy preokkupáció és anticipáció.

Egérkísérleteink révén először bizonyítottuk, hogy az alkohol közvetlenül a rohamivás után anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat és nem szorongásszerű és depressziószerű viselkedést vált ki, ami közel áll az emberekre gyakorolt hatásokhoz. Ezenkívül elsőként vizsgáltuk a CRF-receptorok szerepét a rohamivás és a másnaposság érzelmi következményében, és kimutattuk, hogy a rohamivás által kiváltott anxiolitikus és antidepresszáns hatásokat a CRF2, míg a másnaposságra jellemző szorongásszerű és depressziószerű viselkedést a CRF1 közvetíti, amelynek klinikai jelentősége is lehet.

Emellett patkánykísérleteink révén először bizonyítottuk, hogy az alkoholintoxikáció és a megvonás által kiváltott neuroendokrin változásokat a CRF1, nem pedig a CRF2 közvetíti, kivéve a hypothalamikus AVP változásait, amelyeket nem a CRF-receptorok közvetítenek. Ezzel együtt új bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy az alkohol négy napos IP beadása, majd egy napos megvonása az alkoholintoxikáció és megvonás érvényes állatmodellje lehet, amelyet a hypothalamikus neurohormonok és az extrahypothalamikus neurotranszmitterek specifikus változásai jellemeznek, és amely terápiás célokra is felhasználható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálás köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Bagosi Zsoltnak, aki nélkül ez a szakdolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönetet mondok továbbá kollégáimnak is, Dr. Buzás Andrásnak, Dr. Bokor Péternek és Dr. Csabafi Krisztinának, valamint az asszisztenseknek, Kiss Gusztávnak és Fráter Zsuzsannának, akik főként az állatok gondozásában, a kezelésükben és mintavételében, valamint a statisztikai analízisben nyújtottak segítséget.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Rakonczay Zoltán professzor úrnak, a Kóréletani Intézet jelenlegi vezetőjének és Szabó Gyula professzor úrnak, a korábbi intézetvezetőnek, hogy az Intézetben lehetőséget biztosítottak a kutatómunkára.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok a családomnak is az anyagi és érzelmi támogatásért, amely nagyban hozzájárult az általános orvosi diploma, a sebészeti szakvizsga és remélhetőleg a PhD fokozat megszerzéséhez is.