

**A SZELEKTÍV CRF RECEPTOR AGONISTÁK ÉS ANTAGONISTÁK
SZEREPE NIKOTIN ADDIKCIÓBAN**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Buzás András
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Kórleltani Intézet
Sebészeti Klinika
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

2019
Szeged

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

[³H] = trícium

ACTH = adrenocorticotrop hormon

AVP = arginin-vazopresszin

BNST = bed nucleus of the stria terminalis – a stria terminalis beágyazott magja

CeA = nucleus centralis amygdalae

CRF = corticotropin-releasing faktor

CRF-BP = corticotropin-releasing faktor-kötő fehérje

CRFR = corticotropin-releasing faktor receptor

CRFR1 = corticotropin-releasing faktor receptor 1

CRFR2 = corticotropin-releasing faktor receptor 2

CRH = corticotropin-releasing hormon

DSM-5 = Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition

– Mentális Betegségek Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve, Ötödik Kiadás

EWN = Edinger-Westphal nucleus

GABA = gamma-amino-vajsav

GI = gasztrointesztinális

GPCR = G-proteinhez kapcsolt receptor

HPA = hypothalamic-pituitary-adrenal – hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg

IBD = inflammatory bowel diseases – gyulladásos bélbetegségek

IBS = irritable bowel syndrome – irritábilis bél szindróma

ICV = intracerebroventrikuláris

IP = intraperitoneális

KIR = központi idegrendszer

LC = locus coeruleus

NA = noradrenalin

NAcc = nucleus accumbens

nAChR = nicotinos acetilkolin receptor

PVN = nucleus paraventricularis hypothalami

SC = szubkután

UCN = urokortin

VTA = ventrális tegmentális area

1. BEVEZETÉS

1.1. A CRF és a receptorai

A corticotropin-releasing hormon (CRH) vagy corticotropin-releasing faktor (CRF) egy 41 aminosavból álló neuropeptid. A CRF az adrenocorticotrop hormon (ACTH) felszabadulását serkentő fontos neurohormon, mely a szinergista hatású arginin-vasopresszinnel (AVP) együtt a hypothalamus paraventriculáris magjából (PVN) szabadul fel. A CRF azonban ezen kívül egy fontos extrahypothalamikus neurotransmitter is, amely a nyúltvelőből és az amygdala centralis magjából (CeA) is felszabadul. Ezek alapján a CRF főként a központi idegrendszerben (KIR) található meg, de a periférián is előfordul: a gasztrointesztinális (GI) rendszerben, a bőrben és a mellékvesében. A CRF fő feladata, hogy beindítsa a neuroendokrin, autonóm idegrendszeri és viselkedési stresszválaszokat. A neuroendokrin válasz a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (HPA) tengely aktiválásából áll, melyet elsődlegesen a paraventriculáris CRF mediál. A CRF felszabadulását a PVN-ből az ACTH elülső hypophysisből való felszabadulása, majd a glükokortikoidok mellékvesekéregben való fokozott elválasztása követi. Az autonóm választ a szimpatikus idegrendszer aktiválódása jelenti, melyet a nyúltvelőből felszabaduló CRF mediál. A CRF serkenti a locus coeruleus (LC)- noradrenalin (NA) rendszert, illetve az adrenalin elválasztást a mellékvesevelőben. A viselkedési stresszválaszt a fokozott lokomotor aktivitás, csökkent táplálék-és folyadékbevitel, csökkent szociális és szexuális aktivitás reprezentálja. Ezeket a változásokat többek közt az amygdaláris CRF közvetíti.

A CRF hatásai két különböző CRF receptoron (CRFR), a CRFR1-en és a CRFR2-n keresztül jönnek létre. Ezek a receptorok a G-proteinhez kapcsolt receptorok (GPCR) szupercsaládjának a B osztályába tartoznak és különböző variánsokkal rendelkeznek, melyek eltérő módon expresszálódnak a test különböző szöveteiben. A CRFR1-nek α és β izoformája van a c-h-val jelölt altípusokon kívül, melyket mind rágcsálókban, mind emberben is kimutattak. A CRFR2 három, α , β és γ altípus formájában van jelen. A CRFR2 α és CRFR2 β megtalálható rágcsálókban, főemlősökben és emberekben egyaránt, ezzel szemben a CRFR2 γ -t csak emberekben mutatták ki. A CRFR1 nagyobb mennyiségben fejeződik ki a KIR-ben, míg a CRFR2 főként a

periférián található meg. A KIR-ben a CRFR1 az agykéregben, a kisagyban, a bulbus olfactoriusban, a medialis septumban, a hippocampusban, az amygdalában és az elülső hypophysisben expresszálódik. A CRFR2 expressziója központilag a szubkortikális agyrégiókra, a laterális septumra, hippocampusra, amygdalára, hypothalamusra és a hypophysis hátsó lebenyére korlátozódik. Ezekon kívül mindkét CRFR megtalálható a ventrális és a dorsalis striatumban. A klasszikus elmélet szerint a CRFR1 és a CRFR2 ellentétes hatásokat közvetít a KIR-ben: a CRFR1 aktivációja a HPA-tengely aktivációját, szorongást, depressziót és lokomotoros hyperaktivitást vált ki, míg a CRFR2 aktivációja szorongásoldó, antidepresszáns és lokomóciót szuprimáló hatást fejt ki.

1.2. CRF receptor agonisták

A CRF izolálása óta több CRF-szerű peptidet is felfedeztek, melyeket urokortinoknak neveztek el. Ma a CRF-hez kapcsolódó peptidek családjába három ligand, az urokortin I (UCN I), az urokortin II (UCN II) és az urokortin III (UCN III), valamint két receptor (CRFR1, CRFR2) és egy kötő fehérje (CRF-BP) tartozik. A CRF-hez képest az urokortinoknak hasonló a kémiai struktúrájuk, azonban különböző az anatómiai előfordulásuk, eltérő farmakológiai tulajdonságaik és élettani funkcióik vannak. A CRF főként a PVN-ben és CeA-ban expresszálódik, de megtalálható a periférián is, a GI traktusban, a bőrben és a mellékvesekéregben. Ezzel szemben az UCN I főként az Edinger-Westphal magban (EWN), a rostro-ventrális középagyban, a hypothalamus supraopticus magjában és a felső laterális olivában található meg. A periférián az UCN I a GI rendszerben, a herékben, a szívizomban, a thymusban, a bőrben és a lépben mutatható ki. Az UCN II a PVN-ben, a nucleus arcuatusban és az LC-ban expresszálódik. A periférián az UCN II a szívben, a vörösvértetekben és a mellékvesében található meg. Az UCN III centrálisan az előagyban, a nucleus preopticusban, a hypothalamus perifornicális régiójában és a medialis amygdalában léhető fel, míg a periférián a GI traktusban és a pancreasban.

A CRF-nek tízszer nagyobb az affinitása a CRFR1-hez, mint a CRFR2 iránt. Ezzel szemben az UCN I egyforma affinitást mutat mindkét CRFR irányába.

Az UCN II és az UCN III azonban ezerszeres affinitással kötődik a CRFR2-höz, ezért ezeket a peptideket a CRFR2 szelektív agonistáinak tartják.

A CRF és az UCN I központi beadása kísérleti állatokban a HPA-tengely aktiválódását, szorongás-és depresszió-szerű viselkedést vált ki, míg az UCN II és III központi adása szorongásoldó és antidepresszáns hatásokat von magával. Ennek megfelelően főként az agykéregben és az elülső hypophysisben expresszálandó CRFR1 aktivációja feltehetőleg beindítja az endokrin, autonóm idegrendszeri és viselkedési stresszreakciókat, míg a hypothalamusban és a laterális septumban expresszálandó CRFR2 aktivációja lezárja ezeket a stresszválaszokat. Mindamellert a CRFR1-nek és CRFR2-nek fontos szerepe van a stresszválaszban, azonban a stresszhez köthető viselkedésben betöltött szerepe nem teljesen tisztázott, hiszen korábbi egér és patkány kísérletekben ellentétes eredmények születtek.

1.3. CRF receptor antagonisták

Annak érdekében, hogy kiderüljön a CRF szerepe a neuroendokrin, autonóm idegrendszeri és viselkedési stresszválaszokban, nem-szelektív CRFR antagonistákat fejlesztettek ki. Az első ilyen antagonistista az α -helikális CRF 9-41, a második pedig a D-Phe CRF volt; melyek mind peptidszármazékok és a CRF kompetitív antagonistái. Mindkét antagonistista a CRF-ből ered és sikeresen blokkolta a CRF és a stressz-indukálta ACTH felszabadulást és lokomotoros aktivációt. A harmadik CRFR antagonistista, amit szintetizáltak, az astressin volt, ami különösen hatékonyan gátolta a HPA-tengely aktivitást. Ez az antagonistista ugyancsak csökkentette a CRF és a stressz-indukált szorongásszerű viselkedést, azonban nem csökkentette a CRF-és stressz-indukált lokomotoros hyperaktivitást.

Ahhoz, hogy a CRFR1 és CRFR2 a stresszválaszban betöltött pontos szerepét meghatározzák szelektív CRFR antagonistákat fejlesztettek ki. Az első szelektív CRFR1 antagonistista a CP-154,526 volt, melyet az antalarmin követett. Ezek nem peptid eredetű kompetitív antagonisták, melyek áthatolnak a vér-agy gáton és gátolják a stressz-indukált neuroendokrin viselkedési választ. Ezért arra jutottak, hogy a szelektív CRFR1 antagonisták a jövőben a stresszhez köthető pszichiátriai betegségek kezelésére

használhatók lehetnek. Az első szelektív CRFR2 antagonisták az antisauvagine-30 és astressin2B voltak; az előbbi békából származó sauvagineből, az utóbbit a nem szelektív CRF antagonisták astressinből szintetizálták. Ezek az antagonisták peptid eredetűek, tehát nem penetrálnak a vér-agy gáton. Ezért ezeket jellemzően perifériásan adták, annak érdekében, hogy megtudják a CRFR-ok szerepét a vastagbél motilitásában és a gyomor ürülésében. Arra a következtetésre jutottak, hogy a CRFR1 fokozza a vastagbélmotilitást, míg a CRFR2 csökkenti a gyomorürülést. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a szelektív CRFR2 antagonisták alkalmazhatók lehetnek, mint potenciális gyógyszerek a stresszhez köthető GI betegségekben, úgy mint gyulladásos bélbetegségekben és (IBD) és irritábilis bél szindrómában (IBS).

1.4. Nikotin és receptorai

A stresszválaszokban betöltött szerepén kívül a CRF szerepet játszik a nikotin addikcióban is. Ezt több megfigyelés is alátámasztja. Először is a nikotin akut adása a HPA-tengely dózis-függő aktivációjához vezet, melyet a hypothalamikus CRF mediál. Másodszor, a nikotinmegvonás tünetegyüttese a viselkedési stresszválaszhoz hasonlít és az extrahypothalamikus CRF által mediált. Harmadszor, a stresszorok a leggyakoribb oka a relapsusznak nikotin függőkben, melyek ugyan csak a CRF-rendszerek aktivációját feltételezik. Ráadásul a nikotin akut és krónikus hatásaiban és a nikotin megvonásban mindkét CRFR szerepet vállal.

A nikotin a dohány fő pszichoaktív komponense, mely addikcióhoz vezet. A nikotin addikció fenntartja a dohányzás káros szokását, mely világszerte magas morbiditással és mortalitással jár. Ez a leggyakoribb szerfüggőség az összes addiktív szer közül, mely évente 7 millió ember halálához vezet. A nikotin egy alkaloida, melyet a dohány növényből vonnak ki; minden e növényből készített szál cigarettában kb. 1 mg nikotin található. A cigaretta elszívása során a nikotin bekerül a tüdőbe, felszívódik a vérbe és 8 másodpercen belül eléri az agyat. A pszichostimuláns hatásán kívül a felszabadított adrenalin révén a nikotin növeli a szívfrekvenciát, artériás és vénás összehúzódást okoz, valamint az ugyancsak felszabadult acetilkolin révén pedig a váz-és simaizmok összehúzódását okozza. A nikotin hatásait a nikotinerger acetilkolin receptorok

(nAChR) közvetítik. Ezek a receptorok ligand-kapcsolt ioncsatornák, melyek α és β alegységek pentamer kombinációjából épülnek fel és normálisan acetilkolinra reagálnak. Ezekhez a pentamer ligand-kapcsolt ioncsatornához kötődve a nikotin a receptor forgását okozza, amely a kation-csatorna kinyitásához vezet. Az nAChR-ok aktivációja fokozza a Na^+ és Ca^{2+} iránti permeabilitást, mely lokális depolarizációt és következetes neurotranszmitter felszabadulást okoz. Az elsődleges expressziójuknak megfelelően az nAChR-okat két altípusba sorolják: az izom-típusú nAChR-ok a neuromuskuláris junctionban, míg az ideg-típusú nAChR-ok a neuronokban és idegvégződésekben találhatók. Az agyban a neuronális α -alegységnek kilenc izoformája ($\alpha 2$ - $\alpha 10$), a β -alegységnek három altípusa ($\beta 2$ - $\beta 4$) létezik. Maguk a receptorok két α - és három β -, vagy öt $\alpha 7$ -alegységből állnak és különböző farmakológiai tulajdonságokkal bírnak, ami a nikotin érzékenységet és a deszenzitizáció fokát illeti. A leggyakoribb neuronális nAChR típus az $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ és az $\alpha 7$, amelyek mind prae-és postszinaptikusan megtalálhatók és melyek aktivációja az acetilkolinon kívül más neurotranszmitterek, mint például a dopamin, glutamát és gamma-amino-vajsav (GABA) felszabadulását befolyásolják.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az eredeti elmélet szerint a CRFR1 és CRFR2 főként egymással ellentétes hatást fejt ki a KIR-ben. Így a nikotin addikció kezelését tekintve két különböző terápiás lehetőség adódik: vagy a CRFR1 szelektív antagonistáit – mint például az antalarmin – alkalmazzuk, vagy a CRFR2 szelektív agonistáit – mint például az UCN II és UCN III – alkalmazzuk potenciális terápiának.

Jelen tanulmány célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szelektív CRFR1 és CRFR2 antagonisták és CRFR2 agonisták hatásait krónikus nikotin kezelésnek majd azt követő akut nikotin megvonásnak kitett rágcslókban. Egyrészt az antalarmin és astressin 2B hatásait vizsgáltuk a dorsális és a ventrális striatumból felszabaduló dopamin transzmisszióra, valamint a vertikális és horizontális mozgási aktivitás változásaira nikotinnal kezelt patkányokban. Másrészt az UCN II és az UCN III szorongás-és depressziószerű viselkedésre és a HPA-tengely aktivitására kifejtett hatásait is kimutattuk nikotinnal kezelt egerekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. ANYAGOK

UCN II (Bachem, Svájc), szelektív CRFR2 agonista;

UCN III (Bachem, Svájc), szelektív CRFR2 agonista.

Antalarmin (Sigma-Aldrich, UK), szelektív CRFR1 antagonistá;

Astreszin 2B (Sigma-Aldrich, UK), szelektív CRFR2 antagonistá;

[³H]dopamin (Amersham, USA), tríciummal jelölt excitatoroikus neurotranszmitter;

Krebs.oldat: NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, glükóz, KH₂PO₄ és CaCl₂ (Reanal, Magyarország);

Fiziológiás sóoldat (0.9 %-os NaCl oldat, Biogal, Magyarország);

Nikotin oldat (1.4-2 mg/kg, Biogal, Magyarország);

Ultima Gold szcintillációs folyadék (Perkin Elmer, USA);

Karbogén gáz (5 % CO₂ és 95 % O₂);

Euthasol (Pentobarbitál, CEVA-Phylaxia, Magyarország) a patkányok altatásához;

Etil-alkohol, metilén-klorid, kénsav (Reanal, Magyarország) a plazma kortikoszteron koncentráció meghatározásához.

3.2. Állatok

Kísérleteinkben 150-250 g tömegű hím Wistar patkányokat, illetve 24-30 g tömegű CFLP egereket használtunk. Kísérleti állatainkat megfelelő ketrecben, állandó szobahőmérsékleten (23°C), 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok között tartottuk (6:00-tól világosban, 18:00-tól sötétben). Táplálásuk közöséges táppal és csapvízzel történ *ad libitum*. Az állatoknak hét napnyi időt biztosítottunk a műtét előtti akklimatizációra és a napi kezelés stressz hatásainak minimalizálására. Állataink tartása és kezelése a Szegedi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Tanács elvárásainak megfelelően történt.

3.3. Műtét

Patkányok esetén 10 mm hosszú rozsdamentes acél Luer kanül történt beültetésre általános altatásban – 60 mg/kg pentobarbitál oldat felhasználásával – a jobb oldali

agykamrának megfelelően. A kanül behelyezését és az egyes agyi régiók izolálását a Pellegrino-féle patkányagy sztereotaxiás atlasz alapján végeztük. A kanüloket fogorvosi cement és akrilát segítségével a koponyához rögzítettük. Ezt követően a patkányoknak 7 napnyi lábadozási időt biztosítottunk a kezelés megkezdése előtt. A kísérletek végeztével, 10 µl metilén kék festéket fecskendeztünk a kanülon keresztül a kísérleti állatok oldalkamrájába, mellyel a kanül megfelelő helyzetét ellenőriztük. Az egerek esetében 6 mm-es polietilén Luer kanül történt behelyezésre a jobb oldalkamrába a megfelelő sztereotaxiás koordinátákat szem előtt tartva, 60 mg/kg-os pentobarbitállal történő altatás alatt. A kanüloket a koponyához cianoakrilát pillanatragasztó segítségével rögzítettük. Az egereknek szintén 7 napot biztosítottunk lábadozásra a műtét után. A kísérletek végén, dekapitációt követően 2 µl metilén kék festék került a kanülon keresztül beadásra, annak megfelelő pozíciójának ellenőrzése céljából. Azon állatok, amelyeknél a festék nem jutott a megfelelő helyre, kizárásra kerültek a statisztikai analizisből.

3.4. Kezelés

A patkányokat 1.4 mg/kg töménységű nikotin oldattal vagy fiziológiás sóoldattal kezeltük intraperitoneálisan (IP), 7 napon keresztül, naponta kétszer (8:00-kor és 20:00-kor). A patkányok felét 0.1 µg/2µl antalarminnal vagy 1 µg/2µl astressin 2B-vel vagy 2 µl 0.9% NaCl oldattal kezeltük intracerebroventriculárisan (ICV) a nyolcadik napon (12 órával az utolsó nikotinos kezelést követően). A patkányok másik csoportja ehhez hasonlóan került ICV kezelésre a kilencedik nap reggelén (24 órával az utolsó nikotinos kezelést követően). Az egereket 2 mg/kg töménységű nikotin oldattal vagy 10 ml/kg-os fiziológiás sóoldattal kezeltük IP, 7 napon keresztül, naponta 4 alkalommal (8:00-kor, 12:00-kor, 16:00-kor és 20:00-kor). Az egerek felét 2 µg/2µl UCN II-vel, 2 µg/2µl UCN III-mal vagy 2 µl fiziológiás sóoldattal kezeltük ICV a nyolcadik napon, míg a másik felét a kilencedik nap reggelén.

3.5. *In vivo* conducta rendszer

Harminc perccel az ICV kezelést követően, a horizontális és a vertikális lokomotoros aktivitást *in vivo* conducta rendszer (MDE, Ltd, Németország) használatával

határoztuk meg, mely rendszer az open-field teszt alapelvi alapján került elkészítésre a korábbi tanulmányok által leírtak szerint. A horizontális mozgási aktivitás, mely az összaktivitás és fokozott éberségi állapotnak felel meg, és a vertikális mozgási aktivitás, mely a felfedező, sztereotipikus viselkedést jelenti, 30 percen keresztül történt regisztrálásra.

3.6. *In vitro* szuperfúzió

A patkányok dekapitációját követően a dorsális és ventrális striatális dopamin transzmisszió változásai *in vitro* szuperfúziós rendszer (MDE, Ltd, Németország) használatának segítségével kerültek meghatározásra.

3.7. Emelt keresztpalló teszt

Harminc perccel az ICV kezelés után a szorongás-szerű tünetek vizsgálatára a Lister és Rodgers által leírt, úgynevezett emelt keresztpalló tesztet végeztük. Ennek során 5 percen keresztül egy, a pallótól 100 cm-re helyet foglaló megfigyelő szakasszisztens kísérte figyelemmel az állatok mozgását, a következő paraméterekre tekintettel: a. a nyitott karokba történt belépések száma és az összes belépés számának százalékos aránya; b. a nyitott karokban töltött idő és az összydő százalékos aránya; c. a nyitott és a zárt karokba történt belépések száma. Az adott karba – nyitott vagy zárt – történt belépés akkor került rögzítésre, ha az állat mind a négy mancsa az adott karon helyezkedett el. A kísérleti berendezés az egyes kísérleti alanyok között nátrium-hipoklorit oldattal került minden alkalommal tisztításra.

3.8. Erőltetett úszás teszt

Ezzel párhuzamosan állatainkat a Porsolt és mtsai által leírt erőltetett úszás tesztnek vetettük alá a depresszió-szerű viselkedés megfigyelésére. Az 5 perces megfigyelés szintén 100 cm távolságra történt a kísérleti eszköztől, amely során a következő paramétereket regisztráltuk: a. mászással töltött idő (az állat az üveghenger falán próbál kimászni, hogy kiszabaduljon abból); b. úszással töltött idő (az állat úszást kísérel meg, mellyel próbál a víz felszínén maradni) és c. mozdulatlansággal töltött idő (az

állat kiegyenesedett pozícióban, az elülső mancsait összefogva a víz felszínén lebeg). Vizsgálatunk során 5 másodperc számított egy időegységnek, így a mászási, úszási, illetve mozdulatlansági paramétereket ezen időegység segítségével adtuk meg.

3.9. Plazma kortikoszteron koncentráció meghatározás

Az egerek dekapitációját követően, az állatok törzsvérének összegyűtése után a vér kortikoszteron koncentrációjának meghatározását kemo-fluoreszcens eljárás segítségével végeztük a Zenker és Bernstein által leírtak, majd Purves és Sierett által módosított kémiai eljárás szerint.

3.10. Statisztikai analízis

Az eredményeink statisztikai elemzését variancia analízissel végeztük (Prism 7 Statistics, GraphPad Inc., USA). A csoportok közötti különbségeket kétutas ANOVA teszttel végeztük, melyet követően Tukey-féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk a páronkénti összehasonlításhoz. Statisztikailag szignifikáns különbségként a 0.05-ös vagy annál kisebb értékeket fogadtunk el.

4. EREDMÉNYEK

4.1. 12 órás megvonást követően

A nyolcadik napon a horizontális és a vertikális mozgási aktivitás szignifikánsan fokozódott a nikotinnal kezelt patkányokban a fizioológias sóoldattal kezeltékhez képest. Ezzel párhuzamosan a dorsális és a ventrális striatumból felszabaduló dopamin szignifikánsan fokozódott a fizioológias sóoldattal kezelt állatokéhoz képest. Minden, a nyolcadik napon megfigyelt változást az antalarminnal való kezelés szignifikánsan csökkentett, ellentétben az astressin 2B-vel, melynek adása hatástalannak bizonyult.

A nyolcadik napon a nyitott karban töltött idő szignifikánsan megnőtt, azonban a nyitott karba való belépések száma, valamint az összes belépés száma nem változott meg szignifikánsan a nikotinnal kezelt egerekben, a kontrollhoz képest. Az UCN II és az UCN III kezelés hatására az első két paraméter tovább nőtt a nikotinnal kezelt csoportban, de szignifikáns növekedés csak a nyitott karban töltött idő nőtt meg szignifikánsan. Az

úszással és a mászással töltött idő szignifikánsan lecsökkentek a nikotinnal kezelt egerekben a kontroll csoporthoz képest, azonban a mozdulatlansággal töltött idő nem változott meg jelentősen. Az UCN II és az UCN III kezelés hatására az úszással és a mászással töltött idő tovább csökkent a nikotinnal kezelt csoportban, mindkettő szignifikánsan, azonban a mozdulatlansággal töltött idő változatlan maradt. A plazma kortikoszteron koncentráció észrevehetően, de nem szignifikánsan emelkedett a nikotinnal kezelt csoportban, a kontrollhoz képest, és ezt az emelkedést az UCN II és UCN III ICV adása szignifikánsan csökkentette.

4.2. 24 órás megvonást követően

A kilencedik napon a horizontális mozgási aktivitás és a dorsális striátumból felszabaduló dopamin szignifikánsan megnőtték a nikotinnal kezelt patkányokban a fiziológias sóoldattal kezeltékhez képest. Ezzel ellentétben a vertikális mozgási aktivitás és a ventrális striátumból felszabaduló dopamin szignifikánsan csökkentek a nikotinnal kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Minden, a kilencedik napon mért változást az antalarmin adása teljesen megfordított, míg az astressin 2B bizonyult hatékonynak.

A kilencedik napon a nyitott karba történt belépések száma és a nyitott karban töltött idő szignifikánsan lecsökkentek a nikotinnal kezelt egerekben a fizsóval kezeltékhez képest, azonban az összes belépés száma nem változott jelentősen egyik csoportban sem. Ezek a csökkenő hatások az UCN II és UCN III kezelés hatására jelentősen megváltoztak, de csak a nyitott karba történt belépések száma emelkedett szignifikánsan, az összes belépések száma azonban nem változott meg a nikotinnal kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Az úszással és a mászással töltött idő szignifikánsan lecsökkent a nikotinnal kezelt egerekben a fiziológias sóoldattal kezeltékhez képest, a mozdulatlansággal töltött idő ezzel együtt szignifikánsan megnőtt. Az UCN II és az UCN III adását követően a mászással és az úszással töltött idő szignifikánsan megnőtt, a mozdulatlansággal töltött idő pedig szignifikánsan lecsökkent a nikotinnal kezelt csoportban, a kontrollhoz képest. A plazma kortikoszteron koncentráció észrevehetően és szignifikánsan megemelkedett a nikotinnal kezelt csoportban a kontrollhoz képest, de ez az emelkedés teljesen megszűnt az UCN II és az UCN III kezelés után.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A krónikus nikotin kezelés hatásai

A nikotin addikció binge/intoxikáció fázisának megfelelően a hét napos nikotin kezelésnek kitett patkányokban (12 órával az utolsó nikotin kezelést követően) mind a horizontális és vertikális mozgási aktivitás, mind pedig a dorsális és a ventrális striátumból felszabaduló dopamin fokozódása volt megfigyelhető. Ez az eredmény összhangban van korábbi tanulmányokkal, amelyek a krónikus nikotin kezelés negyedik és tizedik napján lokomóciós hyperaktivitást írt le. Ezeknek a tanulmányoknak a szerzői azt sugallták, hogy a nikotinnal kezelt patkányokban először a striatális dopamin receptorok (D1 és D2) denzitásának és a dopamin koncentrációnak a növekedése miatt, később pedig a striatális dopamin receptor szuperszenzitivitása miatt fokozódik a mozgási aktivitás. A krónikus nikotin kezelés hatására fellépő viselkedési változások értelmezését némileg megnehezíti az a megfigyelés, miszerint ezen változások a nem, a kor és a tartási körülményektől is függhetnek. Ezeknek a faktoroknak a vizsgálata kívánatos lenne, azonban ez egy jóval bonyolultabb kísérleti protokollt és statisztikai analízist kívánna.

A hét napos nikotin kezelésnek kitett egerekben (12 órával az utolsó nikotin kezelést követően) szorongásoldásra utaló jeleket véltünk felfedezni, mivel a nikotinnal kezelt egerek több időt töltöttek az emelt keresztpalló teszt nyitott karjában, mint a fiziológias sóoldattal kezelt egerek. Ezt az eredményt egy korábbi tanulmány is megerősíti, ami bizonyította, hogy a nikotinnal való szubkrónikus kezelés (0.1 mg/kg szubkután = SC, 6 napig) szorongásoldó hatással van egerekre. Ennek viszont ellentmondanak más tanulmányok, amik azt sugallják, hogy szubkrónikus (0.3 mg/kg/nap nikotin SC adása 4 napon át) vagy krónikus (25 mg/kg/nap nikotin infúziója minipumpán keresztül 14 napon át) nikotin adás 0.1mg/kg felett anxiogén hatást gyakorol az egerekre. Depresszió jelei ugyancsak láthatók voltak, mivel a nikotinnal kezelt egerek kevesebb időt töltöttek úszással és mászással, mint a fiziológias sóoldattal kezelték. Ezt az eredményt korábbi tanulmányok is alátámasztják, melyek szerint ismételt IP nikotin kezelés (0.3 mg/kg/nap IP, 4 napon át) depresszió-szerű viselkedést okoz. Mégis a saját kísérletünkben az úszással és a mászással töltött idő erőteljes csökkenése ellenére a mozdulatlansággal

töltött idő nem változott meg szignifikánsan – ez a depresszióra utaló tipikus tünet az erőltett úszás tesztben – a nikotinnal kezelt állatokban, ezért az eredményinket inkább úgy kellene értelmezni, mint a nikotin által okozott lokomóciót szupresszálo hatás következményét, sem mint egy látszólag egyidőben jelen lévő anxiolitikus és depressziós viselkedést. Ráadásul ezekhez a viselkedési változásokhoz nem társult a plazma kortikoszteron koncentráció szignifikáns emelkedése sem.

5.2. Az akut nikotin megvonás hatásai

A nikotin addikció megvonás/negatív érzelmi fázisának megfelelően az egy napos nikotin megvonásnak kitett patkányokban (24 órával az utolsó nikotin kezelést követően) az általános mozgási aktivitás és a globális striatális dopamin felszabadulás csökkenését vártuk, melyet egy korábbi tanulmány is hangsúlyoz, amelyben 14 napos nikotin kezelés és 24 óra nikotin megvonást követően ezt tapasztalták. Érdekes módon jelen kísérletekben csak a vertikális mozgási aktivitás és a ventrális striatális dopamin felszabadulás csökkent, míg a horizontális mozgási aktivitás és a dorsális striatális dopamin koncentráció emelkedett maradt egy napos nikotin megvonást követően. A magyarázatát ennek az eredménynek más korábbi tanulmányok adhatják, melyekben a D2 receptor maximális számának a csökkenését mutatták ki a NAcc-ben, mely azonban nem volt tapasztalható a putamenben és a nucleus caudatusban sem, akár a dopamin receptorok (D1 és D2) denzitását, akár annak kötési affinitását vesszük figyelembe. Ezen kívül a nikotin dózisában és kezelési protokolljában fellelhető különbségek ugyancsak hozzájárulhatnak a korábbi és jelen eredmények közötti diszkrepanciához. Így például miközben a nikotin iránti tolerancia inkább kialakul egy folyamatos nikotin infúziós kezelés következtében (mint a korábban említett tanulmányban), a viselkedési szenzitizáció gyakran a szakaszos injekciós nikotin kezelés következtében alakul ki (mint a jelen tanulmányban). Ezen felül a folyamatos nikotin kezelés olyan dózisban, mely tolerancia kialakulásához vezet, a nikotin-indukált szenzitizációra maga is szenzitizációt válthat ki, melynek a hatása akkor érvényesül, amikor ez a tolerancia elmúlik. Ilyen szempontból a toleranciára és a szenzitizációra úgy kell tekinthetünk mint két egymástól különálló adaptív változásra, melyekhez általában eltérő körülmények kellene, mégis mindkettő előfordulhat

ugyanolyan dózisu és protokolu krónikus nikotin kezelést követően is. Ugyanakkor az akut nikotin megvonás során ez a két egymással versengő jelenség különbözően manifesztálódhat a striátum két részében és ennek megfelelően a mozgási aktivitás két aspektusában. Ami a viselkedési és a neurokémiai paramétereket illeti, az akut nikotin megvonás során tapasztalt változásokra magyarázat lehet a nigrostriális és mesolimbikus dopaminerg rendszerben található eltérő nikotinerg szabályozás. Így például nyilvánvaló különbségek vannak a dorsális és a ventrális striátum között a különböző nAChR altípusok előfordulásának és funkciójának tekintetében is, mely mind alátámaszthatja az így kialakuló dopamin diszregulációt akut nikotin megvonásban.

Az egy napos nikotin megvonásnak kitett egerekben (24 órával az utolsó nikotin kezelést követően) szorongásra utaló tüneteket is kimutattunk, mivel az emelt keresztpalló nyílt karjába történő belépések száma és az ott töltött idő megnőtt a nikotinnal kezelt csoportban a fizioiogiás sóoldattal kezelhez képest. Ez az eredmény egyetértésben van korábbi tanulmányokkal, melyek igazolták, hogy a krónikus nikotin adást követő akut megvonás (0.1 mg/kg/nap kezelés 14 napig vagy 12-24-48 mg/kg/nap kezelés minipumpa segítségével 14 napig és azt követő 1 napos megvonás) szorongásszerű viselkedést vált ki egerekben. Az egy napos nikotin megvonásnak kitett egerek depresszió tüneteit is mutatták, mivel az úszással és mászással töltött idő megnőtt és ezzel párhuzamosan a mozdulatlansággal töltött idő lecsökkent a nikotinnal kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest. Ez az eredmény megegyezik egy korábbi tanulmányéval, mely ugyanazt a kezelési protokollt használta (2 mg/kg nikotin IP adása négyszer naponta), és melynek során depresszió jelei mutatkoztak akut és krónikus nikotin megvonásnak kitett egerekben egyaránt. Ráadásul ezekkel a viselkedési válaszokkal párhuzamosan a plazma kortikoszteron koncentráció is megemelkedett, amely a HPA-tengely hiperaktivására utal. Valójában a HPA-tengely hiperaktivitása gyakran társul a nikotin megvonási szindrómához és általánosságban a szorongás és a depresszió állapotához. Az UCN II és az UCN III ICV adása a kilencedik napon azonban fokozta az akut nikotin megvonás során csökkent aktivitást az emelt keresztpalló nyílt karjában. Továbbá az UCN II és UCN III ICV adása megváltoztatta az úszás és mászás, valamint a mozdulatlanság idejét, hiszen az első kettő fokozódott, a harmadik pedig csökkent akut nikotin megvonás

hatására. Ami azt illeti, az urokortinok anxiolítikus és antidepresszív hatását már korábbi, hasonló módszereket alkalmazó tanulmányok is bizonyították. Ráadásul az UCN II és III egyszeri adása csökkentette a plazma kortikoszteron szintjét, mely a kilencedik napon a nikotinnal kezelt állatokban szignifikánsan megemelkedett.

6. KÖVETKEZTETÉS

Összességében ezek a kísérletek bebizonyították, hogy mind a szelektív CRFR1 antagonisták, mint az antalarmin, mind pedig a szelektív CRFR2 agonisták, mint az UCN II és UCN III terápiás hatásúak lehetnek nikotin függőségben.

Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a CRFR1 blokkolása megakadályozza az affektív tünetek (dysphoria és reward deficit) létrejöttét, míg a CRFR2 blokkolása csökkenti a szomatikus tünetek (túlzott táplálékbevitel és fokozott testsúly) kialakulását, melyek jellemzőek nikotin megvonási szindrómában. A jelenlegi tanulmány az első, amelyik bizonyítja, hogy a szelektív CRFR1 antagonisták – mint például az antalarmin – csökkentik mind a krónikus nikotin kezelés jutalmazó, pozitív megerősítést jelentő hatásait, mind pedig az akut nikotin megvonás averzív negatív hatását.

Korábbi tanulmányok ugyancsak kimutatták, hogy a CRFR2 aktiválódása csökkenti az alkohol megvonás során megfigyelt szorongás-és depresszió-szerű viselkedést. Azonban jelen tanulmány az első, mely bizonyítja, hogy a szelektív CRFR2 agonisták – mint például az UCN II és UCN III – adása enyhíti a krónikus nikotin kezelés és az azt követő akut nikotin megvonás következtében fellépő szorongás-és depresszió-szerű tüneteket, valamint az ezekhez kapcsolódó HPA-tengely hyperaktivitást.

KÖZLEMÉNYEK

1. A Ph.D. tézis alapját képező közlemények:

I. **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; 1706: 41–47.) **IF: 3.125**

II. 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; 1652:21-29.) **IF: 2.746**

2. A Ph.D. tézishoz köthető előadások:

I. **Buzás A**, Bokor P, Bagosi Z, Palotai M, Jászberényi M, Csabafi K, Szabó G: The effects of selective CRF receptor antagonists in alcohol-treated rats (HMAA, 2013, Balatonfüred, Hungary)

II. Bokor P, **Buzás A**, Bagosi Z, Palotai M, Jászberényi M, Csabafi K, Szabó G: The effects of urocortin II and urocortin III on the anxiety- and depression-like symptoms in nicotine-treated mice (HMAA, 2013, Balatonfüred, Hungary)

3. A Ph.D. tézishoz köthető posztterek:

I. Bagosi Z, Palotai M, **Buzás A**, Bokor P, Csabafi K, Szabó G. The effects of selective CRF receptor antagonists in rats following chronic alcohol treatment and acute alcohol withdrawal (MITT, Budapest, Hungary, 2013)

II. Bagosi Z, Bokor P, **Buzás A**, Palotai M, Jászberényi M, Csabafi K, Szabó G. The effects of urocortin II and urocortin III on the anxiety- and depression-like symptoms in nicotine-treated mice (MÉT, Budapest, Hungary, 2013)

III. Bagosi Z, Palotai M, **Buzás A**, Bokor P, Jenei A, Csabafi K, Jászberényi M, Telegdy G, Szabó G. Role of the hypothalamic CRF and AVP in mediating the activation of the HPA axis in alcohol-treated and alcohol-deprived rats (FEPS, Budapest, Hungary, 2014)

IV. 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, Hungary, 2016)

V. Bagosi Z, Bokor P, **Buzás A**, Balangó B, Pintér D, Csabafi K, Szabó G. The effects of the selective CRF2 receptor agonists in mice exposed to chronic nicotine treatment and consequent acute withdrawal (FAMÉ, Pécs, Hungary, 2016)

VI. Bagosi Z, Balangó B, Pintér D, Bokor P, **Buzás A**, Csabafi K, Szabó G. The effects of selective CRF receptor antagonists in rats exposed to chronic nicotine treatment and consequent acute withdrawal (FENS, Pécs, Hungary, 2017)

VII. Bagosi Z, Karasz G, **Buzás A**, Csabafi K, Telegdy G, Szabó G. The effects of selective CRF receptor antagonists on the affective signs of binge drinking (MÉT, Szeged, Hungary, 2018)

ÖSSZES IMPAKT FAKTOR: 5.871

IDÉZÉSEK: 5 (ÖNIDÉZÉS NÉLKÜL: 4)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori dolgozatom végén szeretném megragadni az alkalmat és kifejezni hálámát és messzemenő köszönetemet feletteseimnek, kollégáimnak és mindazon személynek, akik segítségemre voltak tézisem elkészítésében és támogatták kutatói munkámat az évek során.

Elsőként, köszönettel tartozom szakmai vezetőmnek, Dr. Lázár György Professzor Úrnak, a Sebészeti Klinika Igazgatójának, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a Kóréletani Intézetben végzett kutatómunkám eredményeit jelen értekezésben kidolgozhassam és Ph.D. tézisemet elkészíthessem.

Hálás vagyok továbbá Prof. Dr. Szabó Gyulának, a Kóréletani Intézet vezetőjének, hogy mind diákkörösként, mind szakdolgozóként, majd posztgraduális éveim során a laborjában dolgozhattam és vezetése alatt értékes tapasztalatokkal gazdagodhattam az alap kutatás területén, melyek lehetővé tették jelen dolgozat létrejöttét.

Külön köszönetet szeretnék mondani egyetemi szaktársamnak, jó barátomnak, Dr. Bokor Péternek, akivel egyetemi éveink alatt közösen végeztük a fenti kutatások és kísérletek jó részét és aki mindvégig támogatott Ph.D. értekezésem megalkotásában. Továbbá köszönettel tartozom a Kóréletani Intézet minden munkatársának, aki támogatta munkámat, melyek közül név szerint ki szeretném emelni Dr. Csabafi Krisztinát, Dr. Szakács Júliát és Dr. Jászberényi Miklóst, akik mind hasznos tanácsokkal láttak el és segítették kutatási munkánkat és kísérleteink sikerét az intézetben.

Mindenek felett mégis témavezetőmnek, Dr. Bagosi Zsoltnak tartozom leginkább hálával, aki megtisztelt bizalmával és az évek során megosztotta velem kifinomult kutatói érzékét és látásmódját, valamint derűs, inspiráló közeget és feledhetetlen hangulatot biztosított közös kutató munkánk minden fázisában.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak; szüleimnek, ikerhúgomnak Annának és bátyáimnak Baláznak és Péternek, akik munkájukkal lehetővé tették számomra, hogy tanulhassak és orvosi diplomát szerezhsek és támogattak engem életem nehéz időszakaiban, amikor másra nem számíhattam és a segítségükre, megértésükre és gondoskodásukra szorultam.