

**A CRF ÉS AZ UROKORTINOK HATÁSA
AZ AMYGDALA-HIPOTHALAMUSZ-HIPPOKAMPUSZ RENDSZERRE**

Dr. Pintér Dávid
Kórélettan Intézet, Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Ph.D. Tézis
Összefoglaló

Témavezető: Dr.habil. Bagosi Zsolt Ph.D.
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolája, Szegedi Tudományegyetem

RÖVIDÍTÉSJEYZÉK

[³H] = trícium

ACH = acetilkolin

ACTH = adrenokortikotróp hormon

AHH = amygdala – hipothalamusz - hippocampus

CNS = központi idegrendszer

CRF = kortikotróp-releasing faktor

CRF-BP = kortikotróp-releasing faktor kötő fehérje

CRFR1 = kortikotróp-releasing faktor receptor 1-es típus

CRFR2 = c kortikotróp-releasing faktor receptor 2-es típus

CRH = kortikotróp-releasing hormon

GABA = gamma-amino-vajsav

GLU = glutamát

GPCRs = G fehérje-kapcsolt receptorok

HPA = hipothalamusz-hipofízis-mellékvese

ICV = intracerebroventrikuláris

SCP = stresszkopin

SRP = stresszkopin-szerű fehérje

UCN1= urokortin I

UCN2= urokortin II

UCN3= urokortin III

1. BEVEZETÉS

1.1. CRF

A kortikotróp-releasing hormon (corticotropin-releasing hormone - CRH) eredeti nevén kortikotróp-releasing faktor (corticotropin-releasing factor - CRF), és melyet kortikotropinnak is neveznek, a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (hypothalamic-pituitary-adrenal - HPA) tengely szignifikáns neurohormonja, és ezen felül az emlősök hipotalamikus és extrahipotalamikus magjaiból felszabaduló neurohormon.

A CRF centrálisan főleg a hipotalamusz paraventriculáris magjában, az amygdala központi magjában és az agytörzsi régiókban, míg a perifériákon a belekben, a bőrben és a mellékvesében található meg.

1.2. Az urokortinok

A CRF első leírása óta, számos, a családjába tartozó ligandok és receptorok kerültek felfedezésre. Az emlősökben megtalálható családba tartozik a CRF, az urokortin I (UCN1), az urokortin II (UCN2), másnéven stresszkopin-szerű fehérje (stresscopin-related peptide - SRP), és az urokortin III (UCN3), másnéven stresszkopin (stresscopin - SCP), ide sorolható még két CRF receptor CRFR1 és CRFR2 és a CRF kötő fehérje (CRF-binding protein - CRF-BP).

Ezeknek az egy családba tartozó fehérjék figyelembe véve aminosav-összetételüket és intracelluláris jelzésüket közös vonásokat mutatnak, de anatómiai eloszlásukat és élettani funkcióikat tekintve különböző aspektusaikat láthatjuk.

Az UCN1 túlnyomórészt az Edinger-Westphal mag sejtjeiben expresszálódik. A periférián a gyomor-bél traktusban, a herékben, a szívizomsejtekben, a csecsemőmirigyben, a bőrben és a lépben található meg. UCN2 expressziót írtak le a hipotalamuszban, agytörzsben és gerincvelőben, valamint perifériálisan a szívben, a vérsejtekben és a mellékvesékben. UCN3 expressziót a hipotalamuszban és az amygdalában írtak le, ezen felül a gasztrointesztinális traktusban és hasnyálmirigyben. Míg a CRF-nek tízszer nagyobb az affinitása a CRFR1-hez, mint a CRFR2-hez, addig az UCN1-nek egyenlő az affinitása mindkét receptorhoz. Mind a CRF, mind az UCN1 megtalálható a CRF-BP-hez csatolva. Bár az UCN2 és az UCN3 szelektívnek tűnik a CRFR2-re, magasabb koncentrációban is aktiválhatják a CRFR1-et. Az UCN2 és az UCN3 nem kötődik a CRF-BP-hez.

Korábban felmerült, hogy a CRF-hez kapcsolódó peptidek fontos szerepet játszhatnak a stresszre adott endokrin, autonóm és viselkedési válaszok szabályozásában. A CRF

aktiválva a CRFR1-et, stimulálja a stresszválaszt, míg az UCN2 és az UCN3, a CRFR2-re hatva, gátló hatásúnak tűnik a stresszérzékenységre.

Az egyetlen mindkét receptorhoz egyforma nagy affinitással kötődő receptorként, az UCN1 szerepe kettős lehet. Az utóbbi időben felmerült, hogy ezeknek a neuropeptideknek a beadása után megfigyelt stresszserű hatások stresszorfüggőek (fizikai és pszichológiai) és fajspecifikusak (egerek és patkányok).

A közelmúltban új élettani funkciókat tulajdonítottak a CRF-hez kapcsolódó peptideknek és receptoroknak, beleértve az étkezés és a jóllakottság, a gyomor- bélrendszer motilitásának szabályozását, a szív- és érrendszer védelmét és az értágulatot.

1.3. A CRF receptorok

A CRFR-ek a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (G protein-coupled receptors - GPCR) osztályának B altípusába tartoznak. A CRFR1 és a CRFR2 különböző génekből expresszálódnak, és számos variánst tartalmaznak különböző központi és perifériás szövetekben. A CRFR1 a c-h jelű altípusokon kívül α és β izoformákat is tartalmaz, amelyeket humán és rágcsáló szövetekben fedeztek fel. A CRFR2 három funkcionális altípusban fejeződik ki: α , β és γ . Ezek az izoformák különböznek N-terminális szekvenciájukban, valamint eloszlásukban mind a szövetekben, mind a fajokban. Mind a CRFR2 α -t, mind a CRFR2 β -t kimutatták emberben és rágcsálókban. A CRFR2 γ -t azonban eddig csak emberekben írták le. Közel 70% -os azonosság van a CRFR1 és a CRFR2 között az aminosav szintben a CRFR transzmembrán és intracelluláris doménjeivel, amelyek a legnagyobb homológiát mutatják (több mint 80% -os azonosság). A harmadik intracelluláris hurok a receptor régió, amelyről úgy gondolják, hogy a legtöbb GPCR esetében kölcsönhatásba lép a G-fehérjével. A CRFR családban a harmadik intracelluláris hurok azonos a receptorok között. A CRFR-ekre gyakorolt ligandumhatás specifikus helyeit mutagenézis és kiméra-receptor vizsgálatok segítségével azonosították, amelyekben az N-terminális, a második és a harmadik extracelluláris domén, valamint az N-terminális juxtamembrán régió fontosnak bizonyult a ligandumkötés és a receptor-specifitás meghatározásában.

Ezen receptorok anatómiai eloszlása lehetővé teszi ligandjaik élettani funkcióinak levonását. Mindkét receptor megtalálható a központi idegrendszerben és a periférián is egyaránt, de a CRFR1 a központi idegrendszerben, a CRFR2 pedig a periférián gyakoribb. A CRFR1 elterjedt az agykéregben, a kisagyban, a szaglógumó mediális szeptumában, a hippokampuszban, az amygdalában és az agyalapi mirigyben. A központi CRFR2 csak az

oldalsó szeptum és a hipotalamusz helyszíneire korlátozódik, de széles körben kifejeződik a perifériás szövetekben, beleértve a szívet, a gyomor-bélrendszert, a tüdőt, a vázizmokat és az érrendszert. A choroid plexus szintén a CRFR2 expresszió egyik fő helye.

A membránhoz kötött CRF receptorok mellett van egy oldható, CRF-BP nevű, amely képes kötődni a CRF-hez és az UCN1-hez, és amelyről feltételezik, hogy modulálja ezen peptidek endokrin aktivitását. A CRF-BP egy 37 kDa N-kapcsolt glikoprotein, amelyet rágszáló és főemlős agyban és agyalapi mirigyben expresszálnak. Emberben a CRF-BP perifériálisan megtalálható a májban és a keringésben, és feltételezik, hogy megakadályozza a nem megfelelő hipofízis-mellékvese stimulációt a terhesség alatt. Kimutatták, hogy a rekombináns CRF-BP gátolja a CRF által indukált adrenokortikotróp hormon (adrenocorticotrophic hormone - ACTH) szekrécióját patkány elülső agyalapi mirigy sejtjeiből. A CRF-BP-t olyan agyi régiókban is kimutatták, amelyek nem kapcsolódnak a CRF aktivitásához, ami arra utal, hogy CRF-től független hatásai is lehetnek.

A CRFR1 és CRFR2 fiziológiai, farmakológiai és terápiás szerepének vizsgálata érdekében először nem szelektív, majd szelektív CRFR antagonistákat fejlesztettek ki. Az első szintetizált és vizsgált CRFR antagonista az α -helikális CRF 9-41 volt, amely hatékonyan gátolta a CRF által kiváltott ACTH szekréciót és a stressz által kiváltott mozgásszervi aktivációt, majd a D-Phe CRF 12-41, a CRF hatásosabb antagonistája, mint az α -helikális CRF 9-41. Az új CRFR antagonista, Astressin különösen hatékonyan gátolja a HPA-tengelyt. Megfordíthatja a CRF vagy a stressz által kiváltott szorongásszerű viselkedést, de nem tudja megakadályozni a CRF-et vagy a stressz által kiváltott mozgásszervi hiperaktivitást. Mind az α -helikális CRF 9-41, mind a D-Phe CRF 12-41, mind az astressin a CRF kompetitív és nem szelektív antagonistái, bár úgy tűnik, hogy az astressin eltérő farmakológiai profillal rendelkezik. A CP-154 526 és szerkezetileg rokon analóg antalarmin szelektív nem peptid CRFR1 antagonisták, amelyeket különösen a CRFR1-ek központi hatásának jellemzésére használnak. Mindkét vegyület képes volt átjutni a vér-agy gáton, és antagonizálni a CRF, UCN1 vagy stresszorok endokrin és viselkedési hatásait. Bár a CP-154 526-tal kapott eredmények zavarosnak tűnhetnek, az antalarminnal végzett vizsgálatok ígéretesnek bizonyulhatnak a jövőbeni szorongásgátló és antidepresszáns kutatások szempontjából. Az antisauvagine 30 és az astressin 2B, amelyek szerkezetileg a sauvagine-ből és az astressin-ből származnak, szelektív peptid CRFR2 antagonisták, amelyeket elsősorban a CRFR2-k perifériás funkcióinak vizsgálatára használnak. A szelektív antagonista vizsgálatok azt sugallták, hogy a CRF- és stressz-indukált ellentétes hatásokat az egerek felső és alsó bélszakaszaikban különböző CRF-receptor altípusok közvetítik: a CRFR1-receptorok

aktiválása fokozza a vastagbél motilitását, míg a CRFR2-receptorok aktiválása gátolja a gyomor kiürülését stressz közben. Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a CRF receptor antagonisták terápiás potenciállal rendelkeznek a bél-agy tengely rendellenességeiben, például gyulladásos bélbetegségekben vagy irritábilis bél szindrómában.

1.4. A hipotalamusz – hipofízis - mellékvese (HPA) rendszer

CRF egy hipotalamusz neurohormon és egy extrahipotalamikus neurotranszmitter, amely közvetíti a stresszre adott endokrin, autonóm és viselkedési válaszokat. Hipotalamikus neurohormonként a CRF aktiválja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengelyt. A CRF a hipotalamusz paraventriculáris magjából (PVN) választódik ki, és az eminentia medianában kerül a keringésbe; az elülső agyalapi mirigyben serkenti az ACTH szekrécióját, amely végül serkenti a glükokortikoidok termelését a mellékvesekéregben. A plazma glükokortikoid-koncentrációjának növekedése nemcsak a HPA-tengely aktiválását tükrözi, hanem negatív visszacsatolási hatásokat fejt ki a hipotalamuszra, az elülső agyalapi mirigyre és a hippocampusra, valamint pozitív visszacsatolási hatást gyakorol az amygdalára.

1.5. Az amygdala – hipotalamusz – hippocampusz (AHH) rendszer

A HPA-tengelyt a CRF extrahipotalamikus neurotranszmitterként is módosíthatja. A CRF az amygdala központi magjában (Central amygdala - CeA) is szintetizálódik, amely az amygdala mediális magjának (Medial amygdala - MeA) és a hippocampusz ventrális subiculum (Ventral subiculum - vSub) régiójának közelében található. Az ezekből a régiókból származó neuronok (különösen a MeA és a vSub) GABAerg vagy glutamaterg kapcsolatokat küldenek a stria terminalis beágyazott magjához (bed nucleus of stria terminalis - BNST) és a peri-paraventriculáris magok (peri-PVN) GABAerg neuronjaihoz, amelyek tónusos GABAerg gátlást fejtenek ki a paraventriculáris CRF szintézisre. Így az amygdala GABAerg-GABAerg gátlás révén fokozza, míg a hippocampusz glutamatergikus-GABAerg gátlás révén a csökkenti a HPA-tengely aktivitását.

1.6. CRF, urokortinok, CRF-receptorok és a hippocampusz

A stresszválaszok szabályozása mellett a CRF és az urokortinok más neuropeptidekkel együtt fontos szerepet játszanak a kognitív folyamatok modulációjában. Ezt a szerepet számos bizonyíték támasztja alá: A CRF-pozitív neuronok és azok kivételései megtalálhatók a kognitív funkciókhoz kapcsolódó különböző agyi régiókban is, beleértve a hippocampuszt, valamint a prefrontális és cinguláris kérget. Az UCN1 expresszió túlnyomórészt az Edinger-

Westphal magban van jelen, de expressziójáról az egyik kolinerg agytörzsi magban, a latero-dorzális tegmentális magban is beszámoltak, amely a CRF/urokordin rendszer és a kolinerg rendszer kölcsönhatásának fő helyszíne lehet. Az UCN2 – többek között – a noradrenerg locus coeruleusban is kifejeződik, amely a kolinerg latero-dorzális tegmentális maggal együtt részt vesz az ingerület közvetítésében. UCN3 expresszióról nem számoltak be a kognitív folyamatokban részt vevő régiókban, de az UCN3 expresszióban gazdag (hipotalamusz perifériás területei MeA, BNST) régiókból származó, a tanulás folyamataiban részt vevő területek (hippokampusz) felé vezető pályák létezése nem zárható ki. Ezenkívül mind a CRFR1, mind a CRFR2 receptorok mérsékelten vagy erősen expresszálódnak a szaglógyümölcsökben, a hippokampuszban, az entorhinalis kéregben, és a BNST-ben, valamennyi ezek közül részt vesz a figyelemhez, tanuláshoz és memóriához kötődő ingerületek vezetésében. Ezek a megfigyelések felvetik annak lehetőségét, hogy a CRF receptorok aktiválása vagy gátlása befolyásolhatja az ezekhez a folyamatokhoz köthető viselkedést.

2. CÉLKITŰZÉS

Előző *in vitro* vizsgálataink kimutatták, hogy a CRF és az UCN1 patkányokban stimulálja a hipotalamikus és amygdaláris GABA-elválasztást, és ez a hatás CRFR1-en és nem CRFR2-n keresztül érvényesül.

Jelenlegi kísérleteink célja, hogy megvizsgáljuk a CRF és az urokordinok hatását a hippokampális glutamát és acetilkolin elválasztásra, a korábbiakhoz hasonló *in vitro* körülmények között patkányokban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A kísérlet során felhasznált CRFR agonisták:

Kortikotropin-releasing hormon, CRH (Bachem, Svájc); Urokordin I (Bachem, Svájc), nem-szelektív CRFR agonista; Urokordin II (Bachem, Svájc), szelektív CRFR2 agonista; Urokordin III (Bachem, Svájc), szelektív CRFR2 agonista.

A kísérlet során felhasznált CRFR agonisták:

Antalarmin (Sigma-Aldrich, Ausztria), szelektív CRFR1 antagonist; Asstressin2B (Sigma-Aldrich, Ausztria), szelektív CRFR2 antagonist

A kísérlet során felhasznált egyéb anyagok

[³H]ACH (Amersham, USA), trícium jelzett acetilkolin; [³H]GLU (Amersham, USA), trícium jelzett glutamát; Krebs oldat: NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, glukóz, KH₂PO₄ és CaCl₂

(Reanal, Magyarország); Saline oldat (NaCl injekció 0.9 %, Biogal, Magyarország); Ultima Gold (Perkin Elmer, USA), szkincillációs folyadék; 5 % CO₂ és 95 % O₂ keveréke a szövetek folyamatos oxigén ellátására; Nembutal (CEVA-Phylaxia, Magyarország) a patkányok általános anesztéziájához.

3.2. Állatok

Kísérleteink során 150-250 g tömegű hím Wistar patkányokat (Animal Husbandry Services, Domaszék, Magyarország) használtunk. A kísérletek ideje alatt az állatok a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága által, a kísérleti állatok védelme érdekében kiadott útmutató szerint (mely tartalma összhangban van az Európai Unió Tanácsának 1986 november 24.-i direktívájával – 86/609/EEC) voltak tartva és kezelve.

3.3. Műtét

A neuropeptidek intracerebroventrikuláris (intracerebroventricular - ICV) alkalmazhatósága érdekében a patkányokba 10 mm hosszú, rozsdamentes acélé Luer-kanül került beültetésre Nembutal anesztéziában, megcélózva a jobb laterális agykamrát. A kanülok rögzítése fogászati cement és akril ragasztóval kerültek rögzítésre. A műtét után a patkányok legalább 5 napos lábadozási idő után kerültek további használatra. A kanül beültetése és az agyi régiók izolálása a Pellegrino-féle patkányagy sztereoaxiális atlasz alapján történt, az alábbi koordináták szerint: laterális agykamra: 0,2 mm poszterior irány a bregmától, 1,7 mm laterálisan a bregmától és 3,7 mm mélyen a durális felszín alatt; hipotalamusz: rosztro-kaudális, RC +2,6 - -2,6 mm, medio-laterális, ML +1,5 - -1,5 mm, dorzo-ventrális, DV +7 - +10 mm; striátum RC +4 - -1 mm, ML +1 - +5 mm, DV +3 - +8 mm; amygdala: RC 0 - -2 mm, ML +3 - +6 mm, DV +7 - +10 mm a bregmát számolva viszonyítási pontként.

3.4. Kezelés

A CRF agonisták és antagonisták *in vivo* adminisztrációja ICV történt a beültetett kanülon keresztül a laterális agykamrába, 30 perccel az állatok leölése előtt. Az anyagok *in vitro* adminisztrációját az *in vitro* szuperfúziós kísérlet részletezése során kerül leírásra.

3.5. Módszerek

3.5.1. *In vitro* szuperfúziós kísérlet

A hippokampális glutamát- és acetilkolin-felszabadulás mérése *in vitro* szuperfúziós rendszer alkalmazásával történt. Elsőként az állatok dekapitációja történt meg, ezt követte az

agy eltávolítása és disszekciója jéghideg Krebs-oldattal töltött Petri-csészében. A hippocampusz izolálása az alábbi sztereotaxiás koordináták alapján történt: rostro-kaudális – 4,0 - - 6,0 mm, medio-laterális + 2,0 - + 5,0 mm, dorzo-ventrális + 3,0 - + 8,0 mm, a bregmát számolva viszonyítási pontként. Az agyi szövet 3 µm vastag szeletekre lett vágva egy szövet szeletelővel (McIlwain Inc., USA). A szeletek 30 percig 8 ml Krebs-oldatban inkubálódtak, 37 °C-os vízfürdőben, miközben 5% CO₂ és 95% O₂ összetételű gáz-elegy áramlott keresztül az oldaton. Az inkubáció közben, 15 mM [³H]-glutamát (PerkinElmer Inc., USA) vagy [³H]-acetilkolin (PerkinElmer Inc., USA) került hozzáadásra az inkubációs közeghez. Az inkubációs idő letelte után a trícium-jelzett agyi szeletek elhelyezésre kerültek a szuperfúziós rendszer mind a négy hengeres kamrájában. Arany elektródákon keresztül, a kamrák mindkét oldalához egy ST-02 elektromos stimulátor kapcsolódott a rendszerhez. Több csatornás perisztaltikus pumpát alkalmaztunk, hogy konstans 300 µl/perc sebességgel történjen a szeletek áramoltatása. A szeletek szuperfúziója 30 percen keresztül történt, ezzel lehetővé téve a szövetek egyensúlyát, ezt követően több csatornás frakció gyűjtőn keresztül Eppendorf-csővekbe begyűjtésre került a folyadék.

A hippocampusz szeletek előkezelése 0,1 nM szelektív CRFR1 antagonistával antalarminnal vagy 1 nM szelektív CRFR2 antagonistával astressin₂B-val történt, majd 100nM nem szelektív CRFR agonistával (CRF és UCN1) vagy 100 nM szelektív agonistával (UCN2 és UCN3) történt meg a kezelés. A CRF és az urokortinok nem befolyásolták az alap szintű acetilkolin-elválasztást, így a hippocampusz stimulációjára került sor, mely a stressz indukálta hippocampális acetilkolin-elválasztást hívatott utánozni. Ezáltal két perc elteltével minden kamrába bevezetésre került egy 2 percen át tartó, 100 V-os, 5 ms-os, 10 Hz frekvenciájú négyzet-hullám feszültség. A teljes minta gyűjtési idő 32 percig tartott (4x16 minta, mindegyik 2 percen keresztül), a frakcióelválasztás csúcsa a 14. percben figyelhető meg.

A mintagyűjtés befejezése után a szövetek begyűjtésre kerültek a kamrákból és 200 ml Krebs-oldattal ultrahangos homogenizálás történt. A mintákhoz a folyékony szcincillációs mérés elvégzése előtt 3 ml Ultima Gold szcincillációs folyadék került hozzáadásra. A frakciós elválasztás a minták radioaktivitása és a maradék agyi szövet radioaktivitása közötti arányban került meghatározásra.

3.5.2. *In vivo* viselkedés tesztek

3.5.2.1. Emelt keresztpalló teszt

30 perccel az ICV kezelést követően a patkányok megfigyelésre kerültek a Lister és Rodgers által validált emelt-keresztpalló tesztben, melynek célja a szorongásos viselkedés

vizsgálata. A berendezés tartalmaz egy kereszt alakú fa platformot 50 centiméter magasan a padlótól, 4 darab 50 x 10 cm hosszúságú és szélességű karral. Két ellentétes irányú kar 40 cm magas fallal határolt (zárt kar), míg a másik kettő nem rendelkezik falakkal (nyitott kar).

A teszt elve az, hogy a nyitott karok szorongást keltenek, így a nyitott és a zárt karban töltött idő aránya, vagy a nyitott és zárt karba való belépés aránya tükrözi a zárt karok relatív biztonságát, összehasonlítva a tárt karok relatív veszélyével. Mindegyik egeret a palló 10 cm × 10 cm -es középső területére helyeztük, szemben az egyik nyitott karral. Minden állat esetében a megfigyelés 5 percig tart, a megfigyelés a pallótól 1 méterre ülve történik. Az alábbi paraméterek kerültek rögzítésre: a. a nyitott karba történő belépések százalékos aránya, az összes belépés számához viszonyítva, b. a nyitott karban eltöltött idő százalékos aránya a kísérlet egész idejéhez viszonyítva, c. a belépések teljes száma mind a nyitott, mind a zárt karokba. Két állat között a pallók nátrium hipoklorit oldattal kerültek tisztításra.

3.5.2.2. Porsolt-féle kényszerített úszás teszt

Párhuzamosan az egerek a Porsolt-féle kényszerített úszás tesztben is megfigyelésre kerültek, a depresszióhoz köthető viselkedés tanulmányozása céljából. A felszerelés egy 50 centiméter magas és 20 cm széles asztalon álló felül nyitott, alul zárt, átlátszó plexi csőből áll. A cső 25 ± 1 °C hőmérsékletű vízzel kerül feltöltésre, félig. A teszt elve az, hogy egy ilyen helyzetben, amelyből nem tudnak elmenekülni, az állatok gyorsan mozdulatlanok válnak, azaz függőleges helyzetben lebegtek, és csak apró mozdulatokat tettek, hogy fejüket a víz felett tartsák. Eközben a mászással vagy úszással történő menekülési kísérlet ideje csökken vagy teljesen el is tűnik. Minden patkányt egyenként helyeztek a vízbe. Minden állat esetében a megfigyelés 5 percig tart, a megfigyelés a pallótól 1 méterre ülve történik. Az alábbi paraméterek kerültek rögzítésre: a. mászás ideje, b. úszás ideje, c. mozdulatlanság ideje. 3 másodperces időszak számít időegységnek, így a mászás, az úszás, valamint a mozdulatlanság időegységben fejezhető ki. A víz minden állat között kicserélésre került.

3.5.2.3. Morris-féle vízi labirintus teszt

A CRFR1 antagonisták és CRFR2 agonisták térbeli tájékozódás memóriájára gyakorolt hatásának vizsgálata céljából az állatok a Morris-féle vízi labirintus tesztben lettek vizsgálva. Röviden, az állatok tréninget kaptak arra, hogy megtaláljanak egy rejtett platformot egy 1.8 m² területű nyílt vízben (25 ± 1 °C), 30 perccel az ICV antalarmin, UCN2 vagy UCN3 kezelést követően. A víz alatt lévő platform (10x10 cm, 1 cm-el a felszín alatt) az észak-keleti kvadránsban került elhelyezésre. A helyiséget gyengén megvilágította a labirintus pereme

alatt elhelyezkedő négy fényszóróból visszaverődő szórt fény, és a medence kiemelkedő jelzésekkel volt felszerelve, jelölve az égtájakat. A tesztet egy 1 m távolságban tartózkodó megfigyelő ellenőrizte. A következő 3 paraméter került rögzítésre: a. a platform eléréséhez szükséges idő, b. a platform eléréséhez megtett út, c. a platformtól való kumulatív távolság. Az úszás sebessége a teljes megtett útból és a teszt hosszából került kiszámolásra.

Az állatok 3 napos tréningen estek át a vizsgálat előtt. Az alanyok minden nap egy véletlenszerűen meghatározott iránytűpont (É, K, D, Ny) felé nézve kezdtek, kivéve az első napi első kísérletet, amikor a platformtól első legtovábbi kezdőpontra korlátozódtak. (D-Ny). A kísérletek a platform megtalálásakor fejeződtek be, ezt követően az alanyok 30 másodpercet töltöttek a platformon.

3.6. Statisztikák

Az *in vitro* kísérleteink statisztikai analízise során a glutamát és az acetilkolin frakcionális elválasztásának kalkulációja és analízise variancia-analízissel történt (ANOVA). A csoportok közti különbségek egy-utas ANOVÁval került tesztelésre, melyeket Tukey-féle post-hoc összehasonlító teszt követett. A homogenizált szövetek és a minták közti különbségek két-utas ANOVÁval kerültek meghatározásra. A szignifikáns különbség jelzésére, a 0,05 -ös vagy annál kisebb valószínűségi szint került elfogadásra.

Az *in vivo* viselkedés tesztek eredményeinek statisztikai analízise varianciaanalízissel történt. A csoportok közti különbség elemzése egy-utas ANOVÁval történt, melyet Holm-Sidak-féle poszt hoc teszt követett. A szignifikáns különbség jelzésére, a 0,05 -ös vagy annál kisebb valószínűségi szint került elfogadásra.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A CRF és az urocortinok hatásai a hippocampális glutamát-elválasztásra.

A CRF és az UCN1 (100 nM-os koncentrációban) szignifikánsan csökkentette az elektromos stimuláció kiváltotta hippocampális [^3H]-glutamátfelszabadulást. Ezzel ellentétben az UCN2 és UCN3 (100 nM-os koncentrációban) nem befolyásolta szignifikánsan az elektromos stimuláció kiváltotta hippocampális [^3H]-glutamátfelszabadulást. A CRF hatását az ekvimoláris dózisban (100 nM) alkalmazott antalarmin jelentősen visszafordította, az astressin 2B azonban nem. Az UCN1 hatását ugyancsak visszafordította az ekvimoláris dózisban (100 nM) alkalmazott antalarmin, azonban az astressin 2B nem. A CRF, UCN1, UCN2 vagy UCN3 a [^3H]-glutamát bazális felszabadulását nem változtatta meg.

Mindazonáltal, az antalarmin és az astressin 2B önmagában nem változtatta meg a [³H]-glutamát stimulált felszabadulását.

4.2 A szelektív CRFR1 antagonisták és a szelektív CRFR2 agonisták szorongásra és depresszióra kifejtett hatásai

A CRFR1 antagonistá antalarmin (100 nM koncentrációban) szignifikánsan megnövelte a nyitott karban töltött időt és az oda történő belépést. Ezzel ellentétben az UCN2 és UCN3 (mindkettő 100 nM-os koncentrációban) nem befolyásolta szignifikánsan sem a nyitott karban töltött időt, sem pedig a nyitott karba történő belépést a kontrollcsoportéhoz viszonyítva.

A CRFR1 antagonistá antalarmin (100 nM koncentrációban) jelentősen megnövelte az úszással és mászással töltött időt, miközben jelentősen csökkentette az immobilitás idejét. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 (mindkettő 100 nM koncentrációban) nem befolyásolta szignifikánsan sem az úszással és mászással töltött időt, sem az immobilitás idejét a kontrollcsoportéhoz képest.

4.3. A CRF és az urokortinok hatása a hippokampális acetilkolin-felszabadulására

A CRF és az UCN1 jelentősen növelte, míg az UCN2 és az UCN3 jelentősen csökkentette a stimulált hippokampális acetilkolin-felszabadulást. A CRF és az UCN1 növelő hatását jelentősen csökkentette az antalarmin, az astressin 2B azonban nem. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 csökkentő hatását a szelektív CRFR2 jelentősen megfordította, a szelektív CRFR1 antagonistá azonban nem.

4.4. A szelektív CRFR1 antagonistá és a szelektív CRFR2 agonisták hatása a kognitív funkciókra

A második napon a CRFR1 antagonistá antalarmin (100 nM koncentrációban) és a CRFR2 agonistá (UCN2 és UCN3) jelentősen csökkentették a késleltetési időt a kontrollcsoportéhoz képest. Eközben a harmadik napon csak az antalarmin csökkentette jelentősen a késleltetési időt a kontrollcsoportéhoz képest.

A 4. napon a CRFR1 antagonistá antalarmin (100 nM koncentrációban) jelentősen megnövelte az É-K negyedben töltött időt. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 (mindkettő 100 nM koncentrációban) nem befolyásolta jelentősen az É-K negyedben töltött időt.

A 4. napon a CRFR1 antagonistá antalarmin (100 nM koncentrációban) szignifikánsan növelte a „crossover”-ek számát. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 (mindkettő 100 nM koncentrációban) nem befolyásolta szignifikánsan a „crossover”-ek számát.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A CRF és az urokortinok hatása a hippocampalis glutamátfelszabadulására

Eredményeink alapján a CRF és az UCN1 gátolja a glutamát felszabadulását a hippocampusban a CRFR1-en keresztül, mivel a szelektív CRFR1-antagonista képes volt fokozni a nem szelektív CRFR1-agonisták által korábban csökkentett hippocampális glutamátfelszabadulást. A CRFR2 nem vesz részt ebben a folyamatban, mivel a szelektív CRFR2 antagonistá nem fordította vissza a CRF vagy az UCN1 hatását, és a szelektív CRFR2 agonisták, az UCN2 és az UCN3 sem befolyásolták a hippocampalis glutamátfelszabadulását.

Korábbi *in vitro* szuperfúziós vizsgálatunk arról számolt be, hogy a CRF és az UCN1 a CRFR1-en keresztül stimulálja az amygdaláris GABA-felszabadulást, de nem a CRFR-t. Azt feltételezzük, hogy ez az amygdaláris GABA felszabadul mind a MeA-ból, mind a CeA-ból, amelyek különböző stresszorokra reagálnak, és eltérő szerepük van a HPA szabályozásában. A MeA neuronjai érzelmi stresszhatásokat (ragadozó, társadalmi interakció, forszírozott úszás) követően aktiválódnak, és főleg GABAerg projekciókat küldenek a BNST és a peri-PVN GABAerg neuronjaihoz, amelyek közvetlenül beidegzik a PVN-t, amely aktivációhoz – valójában gátláshoz – vezet a HPA-tengelyen. Ezzel szemben a CeA a homeosztatikus stresszoroknak (vérzés, immunrendszeri provokáció) való kitettség után aktiválódik, és az agytörzsben lokalizált interneuronokon keresztül fejt ki előremutató hatását a HPA-tengelyre.

Ezek az eredmények kiegészítik kutatásunkat azzal a megfigyeléssel, hogy a CRF és az UCN1 gátolja a hippocampális glutamát felszabadulását a CRFR1-en keresztül, nem pedig a CRFR2-n keresztül. Feltételezzük, hogy hasonló folyamat fordulhat elő különböző stresszorok hatására a hippocampus vSub régiójában, ami szerepet játszik a HPA-tengely szabályozásában. A vSub-ot érintő hippocampális elváltozásokról kimutatták, hogy túlzott HPA-válaszokat okoznak immobilizáció és nyílt terepi expozíció, de nem hypoxia vagy éter expozíció esetén, amely arra utal, hogy a hippocampális neuronok különböző stresszmódszerekre reagálnak. Ebből a régióból származó neuronok többnyire glutamáterg jeleket küldenek a BNST és a peri-PVN GABAerg neuronjaihoz, amelyek közvetlenül beidegzik a PVN-t, ami végül gátolja a HPA-tengelyt.

A CRF és az urokortinok glutamáttal való kölcsönhatását más *in vitro* körülmények között is vizsgálták. Egy korábbi tanulmány azt állapította meg, hogy a CRF és az UCN1 eltérően modulálja a gerjesztő glutamáterg szinaptikus transzmissziót a kölcsönösen beidegzett CeA-ban és oldalsó septumban. Egy másik tanulmány arra a következtetésre jutott, hogy az UCN1, de nem az UCN2, még a CRFR-nél is hatékonyabban védi a tenyésztett hippocampális neuronokat az oxidatív stressztől és a glutamáterg excitotoxicitástól. Úgy gondoljuk, hogy a CRF-glutamát és az UCN1-glutamát kölcsönhatások a neurotranszmisszióban és a neuroprotekción kívül részt vesznek a HPA-tengely szabályozásában is. A korábbi és a jelenlegi eredmények alapján az állapítható meg, hogy a CRFR1 agonisták nem csak közvetlenül aktiválják a HPA-tengelyt az agyalapi mirigy ACTH és következésképpen a mellékvese glükokortikoid szekréciójának stimulálásával, hanem közvetve az amygdaláris GABA felszabadulás fokozásával és a hippocampális glutamátfelszabadulásának csökkentésével is.

5.2. Terápiás hatások szorongás és depresszió esetén

A CRF és az urokortinok fő szerepe a neuroendokrin, autonóm és viselkedési stresszválaszok szabályozása, beleértve a HPA-tengely szabályozását, amely a hipotalamusz paraventriculáris magjából (PVN), az agyalapi mirigy elülső szegmenséből és a mellékvesekéregből áll. A CRF és az UCN1 intracerebroventrikuláris (ICV) beadása a HPA-tengely aktiválását okozza, amelyet a plazma kortikoszteron koncentrációjának emelkedése, szorongás- és depressziószerű viselkedés tükröz egerekben és patkányokban. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 ICV adagolása szorongásgátló és antidepresszáns hatásokat vált ki rágcsálókban. Feltételezzük, hogy fiziológiai körülmények között a CRF és az UCN1 kezdeményezi a válaszokat a stresszt aktiváló CRFR1-re az agyalapi mirigy elülső szegmensében, míg az UCN2 és az UCN3 megszünteti ezeket a válaszokat, amelyek aktiválják a CRFR2-t a PVN-ben. Következésképpen a CRFR1 és CRFR2 feltételezésünk szerint antagonista hatásokat közvetít a stressz, a szorongás és a depresszió tekintetében. Korábbi *in vivo* vizsgálataink azonban azt sugallták, hogy a CRFR2 szerepe a HPA-tengely szabályozásában gátló vagy stimuláló lehet az agonisták tényleges koncentrációjától függően. Ezenkívül a CRF- és UCN1-indukált amygdaláris GABA-felszabadulás stimulálása és a hippocampális glutamát-felszabadulás gátlása a CRFR1-en keresztül, de nem a CRFR2-n, szintén módosíthatja a HPA-tengely aktivitását. Ezt a hipotézist alátámasztja az a megfigyelés, hogy a PVN mellett a CRF az amygdala (CeA) központi magjában és a hippocampusz hasi subiculumában (vSub) is kifejeződik. A túlzott stressz a CRF/CRFR1

rendszer kóros stimulációját idézheti elő az agykéregben és az amygdalában az urocortin/CRFR2 rendszerrel szemben az oldalsó septális magban és a hippocampusban, ami a HPA-tengely hiperaktivitását, szorongást és depressziót okozhat. Ezen gondolat mentén haladva a szelektív CRFR1 antagonisták, például antalarmin és/vagy szelektív CRFR2 agonisták, például az UCN2 és az UCN3 használata ígéretes terápia lehet a stressz okozta rendellenességek, például a szorongás és a depresszió kezelésében.

Legutóbbi *in vivo* viselkedési vizsgálataink alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. Az emelt keresztpalló tesztben a CRFR1 antagonistá beadása szorongást okozott, mivel az antalarminnal kezelt patkányok lényegesen több időt töltöttek a labirintus nyitott karjában. Ezenkívül a kényszerúszás tesztben a CRFR2 agonistákkal kezelt patkányok esetében megnövekedett úszási és mászási időt, valamint csökkent mozdulatlanságot figyeltünk meg, ami depresszióellenes hatásokat jelez. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 beadása nem befolyásolta sem az emelt keresztpalló tesztben, sem a kényszerúszás tesztben megfigyelt paramétereket. Ez összhangban van *in vitro* eredményeinkkel, amelyek szerint a CRFR1, de nem a CRFR2, gátolja a hippocampális GLU felszabadulását, ami szorongást és depressziót válthat ki a hipotalamikus CRF felszabadulásának GLUerg és GABAerg stimulálása és ennek következtében a HPA-tengely aktivációjának köszönhetően.

Mindazonáltal egy közelmúltbeli hipotézis szerint a CRFR1 és a CRFR2 hatása nem egyszerű dualizmus kérdése, hanem az aktivált agyi régióktól és neuronpopulációktól függ. Az ígéretes preklinikai eredmények ellenére a CRFR1 antagonisták klinikai alkalmazása nem járt terápiás hatással, azonban mellékhatások (pl.: májtoxicitás) megjelentek.

5.3. A CRF és az urocortinok hatása a hippocampális acetilkolin felszabadulására

Eredményeink azt is bizonyítják, hogy a CRF és az UCN1 növeli a hippocampális acetilkolin felszabadulását a CRFR1 révén, míg az UCN2 és az UCN3 csökkenti a hippocampális acetilkolin felszabadulását a CRFR2 révén. Korábbi eredmények már jelezték, hogy a CRF ICV beadása serkenti a hippocampális acetilkolin felszabadulását, és hogy ezt a folyamatot a CRFR1 közvetíti. Mindazonáltal ez a tanulmány az első, amely bemutatja, hogy az UCN1 a CRFR1 aktiválása révén stimulálja a hippocampális acetilkolin felszabadulását, míg az UCN2 és az UCN3 a CRFR2 aktiválása révén gátolja a hippocampális acetilkolin felszabadulását.

A stressz befolyásolja a tanulási és memóriefunkciókat, amelyeket főleg a hippocampális acetilkolin közvetít. Ezt a stresszhatást a CRF/CRFR1 rendszer modulálhatja, amelynek jelenlétét a hippocampusz piramis sejtrétegeiben jelezték. Továbbá, a szisztémás,

távolról felszabaduló CRF hippokampális neuronokra gyakorolt hatását már korábban is kimutatták. Azonban a natív, helyileg felszabaduló CRF és az urokortin/CRFR2 rendszer szerepe a hippokampális szinaptikus funkció stressz által kiváltott fokozásában még nem tisztázott.

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a CRF a GABAerg terminálokban tárolódik, míg a CRFR1 a hippokampusz glutamatergikus szinapszisaiban található. Ez elég érdekes, tekintve, hogy az endogén CRF gátló interneuronokra lokalizálódott, ugyanakkor az exogén CRF gerjesztő neurotranszmitterként működik. Azonban az nem világos, hogy a CRF hogyan éri el és aktiválja a receptort. Az a megállapítás, hogy a stressz növeli a CRF-immunreaktivitást a piramis sejtekkel szomszédos extracelluláris terekben, azt sugallja, hogy a helyi CRF felszabadulhat a hippokampális interneuronok elektromos stimulációjával, majd lassan diffundál a piramisajt-dendritikus tuskékhez. Bár fiziológiai körülmények között nem zárható ki az extrahippokampális forrás és a CRF gyors szállítása a távoli agyi helyekről, amelyet az urokortinok használnak. Ezenkívül a korábbi vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a CRF által indukált hippokampális acetilkolin-felszabadulás oka lehet az acetilkolin fokozott felszabadulása a mediális septális magból kiálló neuronok termináljairól, vagy a nagy affinitású kolin felvételének csökkenése a hippokampuszban.

5.4. Terápiás megfontolások a mentális betegségek esetén

A hippokampális acetilkolin kritikus szerepet játszik a kognitív funkciókban, beleértve a figyelmet, a tanulást és a memóriát, azonban ezt a szerepet vizsgáló tanulmányok ellentmondásos eredményekre jutottak, az acetilkolin agyi tevékenységeinek összetettsége miatt. A neuropeptid-acetilkolin kölcsönhatások összetettségének megértése lehetővé teheti számunkra, hogy jobban megértsük az acetilkolin fiziológiai szerepét a kognitív funkciókban, és segíthessünk jobb kezelési lehetőségek kialakításában demenciával járó neurodegeneratív rendellenességekben, például Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban és Huntington-kórban.

Összességében ezek a vizsgálatok azt sugallják, hogy a hippokampuszban két látszólag ellentétes CRF-rendszer létezik, amelyeken keresztül a CRF és az urokortinok módosíthatják a kolinerg aktivitást és ezáltal a kognitív funkciókat. Továbbá feltételezzük, hogy a CRF és az UCN1 megkönnyítené az affektív negatív információk feldolgozását és tárolását azáltal, hogy aktiválja a mediális septális magban és a hippokampuszban bőségesen expresszált CRFR1-et, míg az UCN2 és az UCN3 segítene elhanyagolni ezt az információt azáltal, hogy aktiválja a oldalsó septális magban és a hippokampuszban expresszáldó CRFR2-t. Fiziológias körülmények között a CRF/CRFR1 és az urokortin/CRFR2 rendszerek

között kényes egyensúlynak kell fennállnia a normális HPA-tengely aktivitás és a kognitív működés biztosítása érdekében. Azonban kóros állapotokban, mint például szorongás, depresszió és poszttraumás stressz, előfordulhat a CRF/CRFR1 rendszer túlstimulációja, ami a HPA-tengely hiperaktivitását és a kognitív funkciók romlását eredményezi. Ebben a gondolati sorrendben a szelektív CRFR1 antagonisták, például antalarmin és/vagy szelektív CRFR2 agonisták, például az UCN2 és az UCN3 beadása csökkentheti a HPA-tengely hiperaktivitását, valamint a szorongással, depresszióval és más stresszel kapcsolatos rendellenességekkel összefüggésbe hozható figyelem-, a tanulás és a memória zavart.

Legutóbbi *in vivo* viselkedési vizsgálataink is alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. A Morris víz-labirintus tesztben a CRFR1 antagonisták és a CRFR2 agonisták hasonlóan befolyásolta a kognitív paramétereket, valamint a tanulás/memória folyamatát. Ugyanis az antalarmin, az UCN2 és az UCN3 a 2. napon csökkentette a késleltetési időt, míg a 3. napon csak az antalarmin csökkentette a késleltetési időt, amely megkönnyíti a tanulást. Ezenkívül a 4. napon csak az antalarmin (100 nM) növelte jelentősen az É-K negyedben töltött időt és az áthaladások számát, ami a memória javulását jelzi. Ezek a megállapítások részben egybeesnek, de biztosan nem mondanak ellent azoknak az *in vitro* eredményeinknek, amelyek szerint a CRFR1 antagonisták növelték, míg a CRFR2 antagonisták csökkentették a hippocampális ACH felszabadulását, ami a CRF/CRFR1 és az urokortin/CRFR2 rendszerek dualisztikus hatására utal.

Annak ellenére, hogy az állatkísérletek eredményei nagyon ígéretesek, a legtöbb klinikai vizsgálat arra a következtetésre jutott, hogy a CRF-antagonisták nem hatékonyak a szorongás és depresszió affektív tüneteinek kezelésében. Mindazonáltal a CRFR1 antagonisták kognitív hatásait önmagukban vagy CRFR2 agonistákkal együtt nem vizsgálták kifejezetten, ezért további állat- és humán vizsgálatokra van szükség ezen gyógyszerek hatékonyságának igazolására ezen betegségek kezelésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1 Vizsgálataink azt mutatják, hogy a CRF és az UCN1 gátolja a hippocampális glutamát felszabadulását a CRFR1-en keresztül, és hogy az UCN2 és az UCN3 és a CRFR2 nem vesz részt ebben a folyamatban. Az előző és a jelenlegi eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a CRFR1 agonisták nem csak közvetlenül az agyalapi mirigy ACTH-felszabadulásának stimulálásával, hanem közvetve is növelhetik az amygdaláris GABA-felszabadulást és csökkenthetik a hippocampális glutamátfelszabadulást.

6.2 Az elvégzett *in vivo* viselkedési vizsgálataink alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. Az emelt-keresztpalló teszt során a CRFR1 antagonistá beadása szorongást okozott, mivel az antalarminnal kezelt patkányok lényegesen több időt töltöttek a labirintus nyitott karjában. Ezenkívül a kényszerített úszás tesztben a CRFR2 agonistákkal kezelt patkányok megnövekedett úszási és mászási időt, valamint csökkent mozdulatlanságot jeleztek, ami depresszióellenes hatásokat jelez. Ezzel szemben az UCN2 és az UCN3 beadása nem befolyásolta sem az emelt keresztpalló tesztben, sem a kényszerített úszás tesztben megfigyelt paramétereket.

6.3 Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a CRF és az UCN1 a CRFR1-en keresztül stimulálja a hippocampusz acetilkolin felszabadulását, míg az UCN2 és az UCN3 a CRFR2 révén gátolja a hippocampusz acetilkolin felszabadulását. A jelenlegi eredmények alapján az a következtetés vonható le, hogy két látszólag ellentétes CRF-rendszer létezik a hippocampuszban, amelyeken keresztül a CRF és az urokortinok módosíthatják a kognitív funkciókat, például a figyelmet, a tanulást és a memóriát.

6.4 Legutóbbi *in vivo* viselkedési vizsgálataink is alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. A Morris-féle vízi-labirintus tesztben mind a CRFR1 antagonistá antalarmin, mind az UCN2 és az UCN3 CRFR2 agonisták csökkentették a várakozási időt a 2. napon, míg a 3. napon csak az antalarmin csökkentette a várakozási időt, ami a megkönnyített tanulásra utal. Ezenkívül a 4. napon csak az antalarmin növelte jelentősen az É-K negyedben eltöltött időt és a „crossover”-ek számát, ami a memória javulását jelzi.

KÖZLEMÉNYEK

1. A disszertáció témájához kapcsolódó eredeti közlemények:

I. Bagosi Z, Balangó B, **Pintér D**, Csabafi K, Jászberényi M, Szabó G, Telegdy G: The effects of CRF and urocortins on the hippocampal glutamate release (Neurochemistry International, 2015 Nov; 90:67-71.) **IF: 3,385**

II. **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; 88: 102147) **IF: 2,411**

2. A disszertációban idézett egyéb közlemények:

I. 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; 1652:21-29.) **IF: 3,033**

II. 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 CRFR1, but not CRFR2, receptors (Brain Research, 2019 Mar; 1706: 41-47) **IF: 3,370**

III. Bagosi Z, Csabafi K, Balangó B, **Pintér D**, Szolomájer-Csikós O, Bozsó Z, Tóth G, Telegdy G, Szabó G. Anxiolytic- and antidepressant-like actions of Urocortin 2 and its fragments in mice (Brain Research, 2018 Feb 1; 1680:62-68.) **IF: 3,103**

3. A disszertáció témájához kapcsolódó poszter prezentációk:

I. 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)

II. 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)

ÖSSZESÍTETT IMPAKT FAKTOR: 15,302

IDÉZŐK SZÁMA ÖSSZESEN: 28