

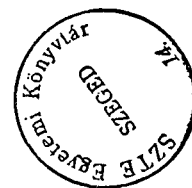
**CORTICOTROPIN-RELEASING FAKTOR RADIOIMMUNOASSAY
KIDOLGOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA A NEUROENDOKRIN SZABÁLYOZÁS
VIZSGÁLATÁBAN**

Egyetemi doktori értekezés

Készítette:

GARDI JÁNOS
okleveles vegyész

a



Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratóriumában.
Szeged, 1996.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	3.
ÁLTALÁNOS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.
A CRF RADIOIMMUNOASSAY KIDOLGOZÁSA.....	16.
<i>Felhasznált anyagok és módszerek.....</i>	<i>16.</i>
<i>CRF kivonása patkány agyi területeiből.....</i>	<i>17.</i>
<i>A CRF-antiszérum jellemzői.....</i>	<i>18.</i>
<i>¹²⁵I-CRF előállítás.....</i>	<i>21.</i>
<i>Elválasztási módszer.....</i>	<i>24.</i>
<i>A RIA módszer leírása, kalibrációs görbéje és minőségi mutatói.....</i>	<i>26.</i>
A CRF RIA ALKALMAZÁSA: A KOKAIN HATÁSA	
A PATKÁNY KÜLÖNBÖZŐ AGYTERÜLETEINEK	
CRF-TARTALMÁRA.....	27.
<i>Irodalmi előzmények.....</i>	<i>27.</i>
<i>Célkitűzés.....</i>	<i>29.</i>
<i>A kísérletek kivitelezése.....</i>	<i>30.</i>
<i>Eredmények és megbeszélésük.....</i>	<i>32.</i>
ÖSSZEFOGLALÁS-AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI.....	45.
RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK JEGYZÉKE.....	47.
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	49.
IRODALOMJEGYZÉK.....	50.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A corticotropin-releasing faktor (CRF) fontos szerepet játszik a szervezet szabályozási folyamataiban. Serkenti az adrenocorticotropin (ACTH) és a β -endorphin felszabadítását a hypophysisből, és fő közvetítője a stressz által kiváltott változásoknak a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (HPA) tengelyben. 1981-ben izolálták birka hypothalamusából. Azóta kimutatták, hogy a hypothalamuson kívül más agyterületekben és különféle perifériás szövetekben is megtalálható.

A disszertáció célja:

1. a hormon mérésére alkalmas, érzékeny analitikai eljárás (radioimmunoassay, RIA) kidolgozása,
2. a módszer alkalmazása neuroendokrin kutatásokban: modell a kokainnal kiváltott CRF-koncentráció-változás különböző agyterületekben.

Az ehhez szükséges laboratóriumi háttérrel és technikai felkészültséget, jelenlegi munkahelyem, a SZOTE Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratórium, valamint a Kórélettani Intézet biztosította.

ÁLTALÁNOS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1955-ben Shafran és Schally [1], valamint Guillemin és Rosenberg [2] egymástól függetlenül szolgáltatva az első bizonyítékot arra, hogy a hypothalamus termel egy olyan faktort, amelyik ép patkány hypophysiséből ACTH-t szabadított fel [3,4]. Az anyagot corticotropin-releasing faktornak (CRF-nek) nevezték el. Bár a CRF volt az első feltételezett, hypothalamikus neurocrin, kémiai szerkezetének feltárása rendkívüli nehézségbe ütközött [3,4], és így más hypothalamikus felszabadító hormonok szerkezetét hamarabb ismerték meg. Végül 1981-ben Vale és munkatársai meghatározták a juh CRF szerkezetét [5]. Rivier szintetizálta a peptidet e feltételezett szerkezet szerint, majd Vale bizonyította be, hogy a szintetizált molekula hatása megegyezik a tisztított, természetes hormonéval [5]. Ismerjük az ember (1.a. ábra), a juh (1.b. ábra), a patkány, a kecske és a tehén CRF-et. Mindegyik 41 aminosavat tartalmaz, és hasonló primer szerkezetük van [6].

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-
His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-
Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-
Leu-Met-Glu-Ile-Ile-amid.

a., a CRF (human, patkány) primer szerkezete

Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-
 His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-
 Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-
 Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-amid.

b., a CRF (juh) primer szerkezete:

1. ábra

Ma már teljesen elfogadott, hogy a Vale által szintetizált 41 aminosavból álló peptid a fő endogén ACTH felszabadító hormon, bár emellett egyéb faktorok (például vasopressin (VP), catecholaminok) is képesek ACTH-t felszabadítani [6,7,8]. A szintetikus CRF és az ellene termelt ellenanyagok alkalmazása elősegítette a CRF biológiai hatásainak megismerését. CRF-antiszérummal végzett szövettani vizsgálatok rámutattak arra, hogy CRF-szerű immunoreaktivitás (CRF-IR) a hypothalamuson kívüli agyterületekben is található, és a hypothalamikus neuronok axonjai az eminentia medianán kívüli agyterületekre is eljutnak [9,10]. Jelentős koncentrációban található CRF-IR az agykéregben, a limbikus rendszerben, és néhány bazális előagyi magban [11,12]. CRF nem csak az agyban fordul elő. Kimutatható például a hasnyálmirigy endokrin sejteiben, a gastrointestinalis rendszerben, a májban, a hypophysisben, a mellékvesében, a placentában, a tüdőben, és néhány endokrin tumorban [13,14].

Mind kvantitatív autoradiográfiát, mind membránkötési technikát alkalmazva, a CRF nagy affinitású kötőhelyei megegyeznek a CRF-IR lokalizációjával [15,16]. Nagy

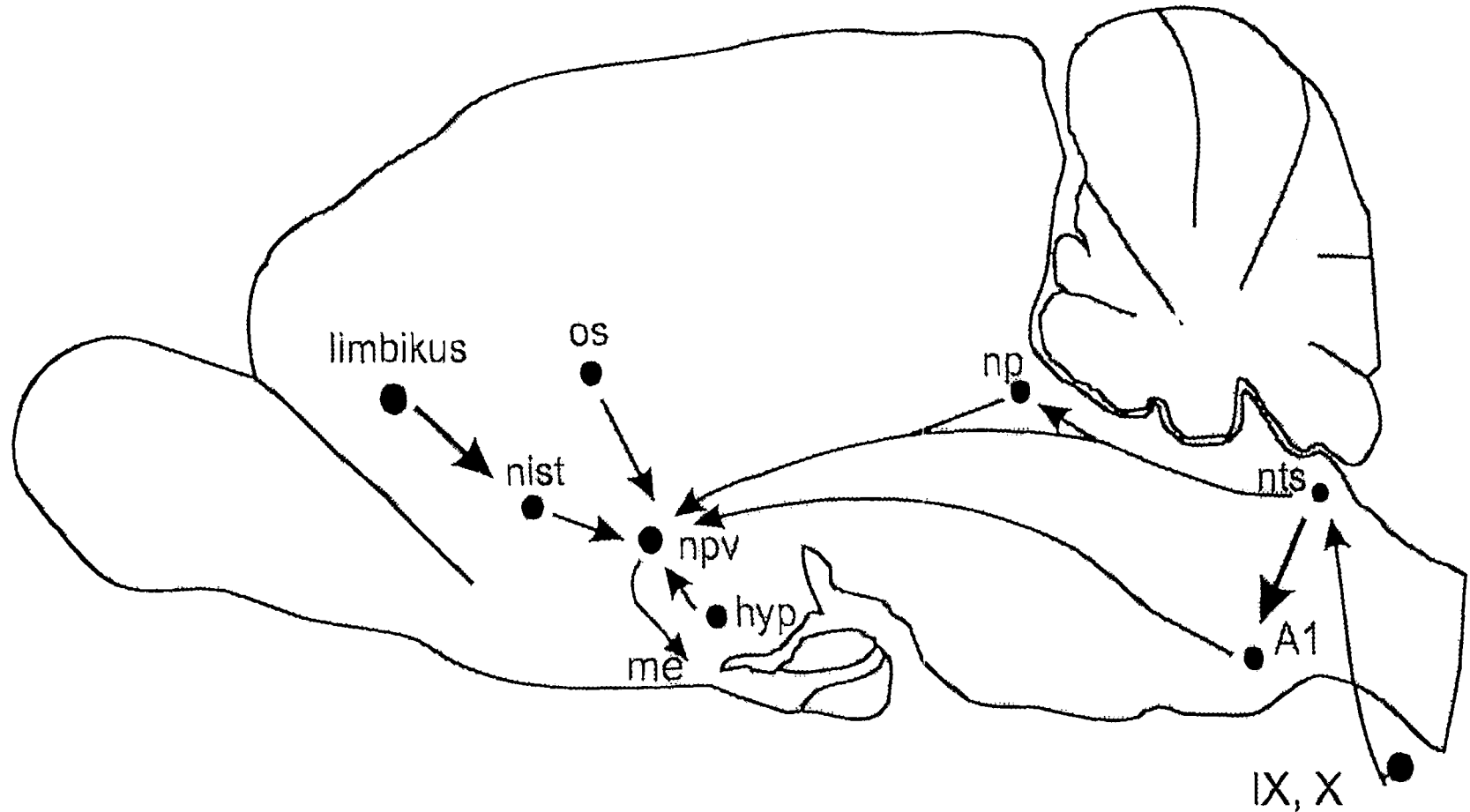


affinitású CRF-receptorok vannak a neocortexben; legnagyobb sűrűségben az I. és IV. rétegben. CRF-kötőhelyek vannak a központi idegrendszeren kívül a szimpatikus ganglionokban, a mellékvese chromaffin sejtjein, valamint a bél, a pancreas és a lép szöveteiben [17].

A CRF elsősorban a hypothalamus nucleus paraventricularisának (NPV) úgynevezett parvocellularis sejtjeiben termelődik, de más agyterületekben (agytörzs, agykéreg, középgagy, striatum, hippocampus), sőt egyes perifériás szövetekben (placenta, here, mellékvese) is találtak CRF-mRNS-t [18], amely CRF-szintézisre utal. A CRF-szintézis szabályozásában számos idegi struktúra szerepel. Ezek közül talán a legfontosabbak a IX. és a X. agyidegek afferensei. A CRF felszabadulására ható másik idegi afferens az organon subfornicale-ból jut el az NPV-be. Fokozott emóció, pszichogén események a limbikus rendszeren keresztül befolyásolják a hormon szintézisét. Az NPV-ben szintetizálódott CRF az eminentia medianában szabadul fel és a portális keringés révén jut az adenohypophysisbe (2.ábra). Az NPV-ben a CRF más peptidekkel fordul elő; így az arginin-vasopressinnel [19] az enkephalinnal, a neurotensinnel, a peptid-hisztidin-izoleucin-amiddal, valamint az oxytocinnal [10].

A CRF-et úgy tekintjük, mint a HPA tengely elsődleges aktiválóját. Bár más faktorokat is ismerünk, amelyek rendelkeznek ACTH-felszabadító aktivitással, a CRF a legpotensebb [6]. Úgy tűnt, hogy a CRF mérése elősegítheti

A patkány npv parvocelluláris afferensei: CRF-rendszer



npv = n. paraventricularis
 os = organon subfornicale
 np = n. parabrachialis
 nist = n. interstitialis
 striae terminalis

nts = n. tractus solitarii
 hyp = hipotalamikus sejtcsoport
 me = eminentia mediana
 A1 = NA sejtek a nyúltagy ventrális részén

a HPA tengely működésének klinikai vizsgálatát. Ám ez a várakozás hiábavalónak bizonyult, mert a perifériás vér CRF-koncentrációja nem reprezentálja a hypothalamo-hypophysealis rendszer portális keringésének CRF tartalmát, mivel a perifériás szövetekből (például placenta, mellékvesevelő, pancreas) is kerül CRF a keringésbe. A meghatározást ezen kívül zavarja az is, hogy nagy kötőkapacitású és affinitású CRF-kötő globulin fordul elő a perifériás vérben [20].

A CRF legfontosabb hatása a szervezetben a stressz által kiváltott adaptív válaszok mediálása. Ez részben a hypothalamo-hypophysealis rendszeren keresztül mediálódik, részben a CRF centrális hatásainak tulajdonítható. A CRF központi idegrendszeri hatásainak szerepe van a depressziós, szorongásos állapotok kiváltásában és fenntartásában. Ezt bizonyítják azok a beszámolók, amelyek kimutatták, hogy a CRF agyi koncentrációja hogyan változik meg stressz hatására. A CRF koncentrációja duplájára emelkedik, ha a patkány lábára 15 percig tartó hősokkot adunk [21]. Chappell és munkatársai a patkányban 32 agyi régióban vizsgálták a CRF-IR mennyiségét, 3 órás hidegben történt mozgáskorlátozás (akut stressz), vagy 13 napig tartó random stressz-ingerek (krónikus stressz) hatására [22]. Szignifikáns CRF-koncentráció-növekedést figyeltek meg a locus coeruleusban akut és krónikus stressz hatására, illetve az NPV-ben és az elülső hypothalamikus areában krónikus stressz hatására. CRF-csökkenést tapasztaltak az

eminentia medianában és a nucleus arcuatusban akut és krónikus stressz esetén, az elülső preoptikus areában akut stressz alkalmával, és a dorsalis vagus-magkomplexben krónikus stressz hatására. Az akut stressz után bekövetkező CRF-IR-csökkenés feltételezhetően a megnövekedett felszabadulás eredménye; a CRF-növekedést viszont nehéz magyarázni. A krónikus stressz utáni csökkenés tartós felszabadulást jelenthet, míg a növekedés a felszabadulást kompenzáló fokozott szintézisre utalhat. Deutch és munkatársai szerint, tartós stressz szükséges ahhoz, hogy ilyen hatások létrejöhessenek, mivel számos dopaminban gazdag agyi területen változatlan marad a CRF-IR-tartalom 20 perces lábsokk után [23]. Owens és munkatársai pedig azt találták, hogy az alprazolam (1 mg/kg) vagy adinazolam (10 mg/kg) egyszeri dózisa után 1 órával növekszik a hypothalamus CRF-tartalma, és csökken a locus coeruleus CRF-koncentrációja [24]. Ezek a hatások ellentétesek azokkal, amit az akut és a krónikus stressz után Chappell és munkatársai találtak [22].

Ezen túlmenően, specifikus CRF-antagonistákkal végzett vizsgálatok azt is jelzik, hogy a CRF-nek döntő jelentősége van a stressz alatti plazma ACTH-növekedésben. Rivier és munkatársai bizonyították, hogy az endogén CRF antiszérummal történő szisztémás immunoneutralizációja gátolja az éter-stressz-okozta ACTH-szekréciót [25]. Ezt a megfigyelést erősítették meg Ono és munkatársai [26], Nakane és munkatársai [27] és mások is, akik bizonyították,

hogy az immunoneutralizáció kivédi a hideg vízben való úszás, immobilizáció, csonttöréssel járó trauma, formalin injekció [28] által okozott ACTH-felszabadulást. Rivier és munkatársai arról számoltak be, hogy a plazma ACTH-szintjének éter-indukálta növekedése blokkolható szisztémásan adott α -helikális CRF₉₋₄₁-gyel [29]. (Az α -helikális CRF a CRF kompetitív antagonistája). Conte-Devolx és munkatársai [30] kimutatták, hogy nem stresszelt patkányokban a CRF elleni szérum csökkentette az ACTH és a β -endorphin szekrécióját, de nem befolyásolta a plazma α -melanocyta-stimuláló hormon (α -MSH)-szintjét, jelezve, hogy a CRF csak a hypophysis elülső lebenyében serkenti az opiomelanocortin sejteket, a középső lebenyben nem.

A VP potens szinergistája a CRF által kiváltott ACTH-elválasztásnak [8,29]. Bár a VP maga is serkenti az ACTH-szekréciót [28,29], hatása nagymértékben függ a CRF jelenlététől [6,31]. Linton és munkatársai [28] azt tapasztalták, hogy a VP immunoneutralizációja csökkenti a formalin- és az immobilizáció-okozta ACTH-szekréciót, de a gátlás mértéke elmarad a CRF elleni szérum hatásától. Az antiszérumok kombinált kezelése esetén a VP-antiszérum fokozza a CRF-antiszérum ACTH-szekréciót csökkentő hatását.

A hypophysis elülső lebenye kívül van a vér-agy gáton, ezért a HPA tengely a CRF szisztémás adásával aktiválható. Mindamellett az intracerebroventricularisan (i.c.v.) adagolt CRF is hatásos patkányban, egérben és majomban [32,33,34,35]. Nem világos, hogy ez azért van-e, mert a CRF

kijut az agykamrákból a perifériára, vagy azért, mert a CRF-nek direkt hatása van a központi idegrendszeren belül. De Souza és munkatársai felvetették, hogy a CRF-nek lehet direkt adrenális hatása [36]. Ono és munkatársai szerint [37] elképzelhető, hogy van egy ultrarövid, pozitív visszacsatolási kör, mely révén az i.c.v. adott CRF stimulálja az endogén CRF felszabadulását. Negatív visszacsatolásra szintén van néhány adat in vitro vizsgálatokból [38], de ezek ellentmondóak [6].

A CRF az ACTH és a β -endorphin felszabadításán kívül egyéb hormonok elválasztását is befolyásolja. 0,5-10 μ g CRF i.c.v. adagolása gátolja a luteinizáló (LH) [32,39,40] és növekedési hormon (GH) [32,41,42] elválasztását, de hatástalan a folliculus-stimuláló hormon (FSH) [39,40], a thyreoidea-stimuláló hormon (TSH) [32], vagy a prolactin (Prl) [26,40] szekréciójára. Mások szerint tartós i.c.v. CRF-adagolás hím patkányokban csökkenti az LH és a testoszteron szintjét [43], míg egyszeri CRF dózis i.c.v. adása hatástalan az LH [39] és a GH [41,42] plazmaszintjére. Petefészek-írtott Rhesus majmokban [44], vagy nőkben [45], az intravénás (i.v.) CRF gátolja az LH és az FSH szekrécióját. Krónikus i.v. CRF patkányokban (5 μ g/nap) csökkenti a plazma LH-koncentrációját, de nem befolyásolja a testoszteron- és Prl-szintet [46]. Az LH-ra gyakorolt krónikus hatás közvetítésében a mellékvese-szteroidok játszanak szerepet, hiszen ez a jelenség ACTH adásával is kiváltható, míg adrenalektómizált állatokban a

jelenség kiesik [46]. Szemben az i.c.v. adott CRF-fel, az i.v. CRF növeli a Prl szekrécióját ovárium-írtott Rhesus majmokban (100 μ g) [47] és patkányokban (10 μ g) [48]. Az effektus majmokban blokkolható előzőleg adott naloxonnal, ami arra utal, hogy az endogén opiátok fontos mediáló szerepet játszanak a hatás közvetítésében. A CRF gátolja a gonadotropin (GnRH)-felszabadulást hypothalamikus szövetselektékből in vitro [49,50], és a GnRH-szekréciót a portális keringésbe in vivo [50], ezért az i.c.v. adott CRF hatása az LH-szekrécióra patkányokban centrális eredetű lehet. A CRF-nek a GH elválasztására gyakorolt hatása egyesek szerint a somatostatinon (SS) keresztül mediálódik, mivel a SS elleni szérum kivédte a GH-szekréció CRF-okozta gátlását [41,51]. A CRF valóban stimulálja az SS felszabadulását az eminentia medianából in vitro [52].

A CRF csekély hatással rendelkezik az insulin és a glukagon elválasztására. Karlsson és Ahren szerint az insulin plazmakoncentrációja enyhén emelkedik kettő perccel az i.v. adott CRF után. Tíz perccel később az insulinszint csökken [53].

A fent említett hormonszekrécióbéli változások jellemzőek stresszre [54,55]. A CRF élettani szerepét a stressz-indukált hormonszekréció-változásban több megfigyelés támasztja alá. Az α -helikális CRF-antagonista képes blokkolni vagy csökkenteni a stresszorok hatását. Elektromos shock csökkenti a plazma GH- [51] és LH-szintet hím patkányban [56], s ez a csökkenés i.c.v. α -helikális

CRF-antagonistával kivédhető. Ezek a hatások valószínűleg centrális hatások, mert szisztémásan adott α -helikális CRF nem befolyásolja azokat [26,56]. Ono és munkatársai [26] kimutatták, hogy i.c.v. (de nem i.v.) adott CRF-antitest kivédi az éter-indukálta GH-szekréció-csökkenést. A CRF-antiszérum nem változtatja az alap LH-elválasztást, vagy a stressz-indukálta változásokat. Az i.c.v. adott antiszérum nem csökkenti a stressszel kapcsolatos plazma Prl-szint-emelkedést [26].

Az i.c.v. adott CRF növeli a noradrenalin és az adrenalin plazmakoncentrációját patkányban (35 μg) [57] és kutyában (120 μg) [58]. Ezzel együtt a plazma glükózkoncentráció és az oxigénfogyasztás is emelkedik [57,59], valamint az artériás középnyomás és szívritmus fokozódik [60]. Grosskreutz és Brody [61] azt találta, hogy az i.c.v. CRF (0,15-3,4 μg) növeli a szívritmust és a vascularis ellenállást; mindkettőt a peptid által kiváltott szimpatikus aktiváció okozhatja. Ezekben a változásokban az adrenomedulláris rendszer részvételét az igazolja, hogy az i.c.v. adott CRF (0,4-40 μg) fokozza a nucleus splanchnicus tüzelését [62]. A szimpatikus idegrendszer aktivációját támasztja alá, hogy a ganglionblokkoló klórizondamin gátolja a CRF-indukált (10 μg i.c.v.) vércukorszint-emelkedést, a noradrenalin és az adrenalin [59] szintjének emelkedését, és csökkenti, vagy meg is szünteti az artériás középnyomás és a szívritmus növekedését [60,63]. A CRF hatásainak nagy része minden bizonnyal centrálisan mediált,

mert hypophysectomia vagy adrenalectomia nem befolyásolja a CRF-fel kiváltott vércukorszintváltozást [59], és nincs hatással - a dexamethason előkezeléssel együtt sem - az artériás középnyomás vagy a szívritmus CRF-okozta emelkedésre [63]. Az i.v. adott CRF (35 μ g) ezen felül reflexesen csökkenti az artériás középnyomást [63]. A szisztémásan adott CRF-antiszérum, amely blokkolja a plazma ACTH növekedését, nem befolyásolja az i.c.v. CRF-fel kiváltott noradrenalin- vagy adrenalin-szekréció serkentését [64].

Brown [65], hogy a CRF intracerebrális hatóhelyeit feltérképezze, 1 μ g CRF-et injektált 50 különböző agyi területre. A plazma noradrenalin szintjét az agykamrába juttatott CRF növeli a legnagyobb mértékben.

A CRF mind centrálisan, mind perifériásan adva rendelkezik gastrointestinalis hatásokkal. A CRF-antagonisták használata alapján arra lehet következtetni, hogy ezek az effektusok függetlenek egymástól. A CRF csökkenti a gyomortartalom ürülését, a gyomorsavszekréciót és a vékonybélürülést, míg növeli a vastagbélürülést és a székletürülést [66,67,68,69,70,71,]. Ez alól az egér kivétel, ahol a gyomortartalom ürülése nő CRF hatására [72,73]. A legtöbb esetben azonban a CRF hatásai megfelelnek a különböző stresszhatásoknak.

Tekintettel a CRF biológiai jelentőségére több eljárást használnak biológiai mintákból történő mérésére. Legelterjedtebb és legérzékenyebb meghatározási módszerek a

különböféle immunoassay-k. A CRF biológiai mintákból történő meghatározására jelenleg is kevés helyen áll rendelkezésre érzékeny RIA. A mérés elvét Berson és Yalow 1959-ben [74], Ekins 1960-ban [75], egymástól függetlenül dolgozta ki. E módszer alapja az antigének és az azokat reverzibilisen kötő antitestek közötti, egyensúlyra vezető komplexképződési reakciók. A nagy affinitású és szelektív antitesteket megfelelő koncentrációban (vagyis az azokat tartalmazó antiszérumot alkalmas hígításban) felhasználva, az immunkémiai reakció révén a szabad, illetve a komplexben kötött antigének egymással összemérhető koncentrációban vannak jelen, s arányuk az úgynevezett kötési százalék az antigén összkoncentrációjának függvénye. A kétféle antigénfrakció elválasztásával, azok igen kis mennyiségeik quantitativ mérését lehetővé tevő nyomjelzők - peptidek esetén leggyakrabban jódozott antigén "tracer" - alkalmazásával, valamint ismert dózisoskat tartalmazó kalibrációs görbe kötési százalékhöz való viszonyítással ismeretlen minták antigénkoncentrációi is nagy érzékenységgel és specifitással határozhatók meg. A CRF RIA több változatát fejlesztették ki, amelyek a hormonnak a biológiai mintákból történő kinyerésében, és a RIA kivitelezésének egyes részleteiben különböznek egymástól [76,77,78,79].

A CRF RADIOIMMUNOASSAY KIDOLGOZÁSA

Felhasznált anyagok és módszerek

A RIA-hoz standard készítményként szintetikus human CRF-et (Bachem, Bubendorf, Svájc) alkalmaztunk.

Az antiszérumot Paul Vecsei (Heidelberg, Németország) bocsájtotta rendelkezésünkre.

A RIA-hoz, a homogenizáláshoz és a nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) tisztításokhoz felhasznált anyagok: (az összes anyag analitikai tisztaságú volt)

humán szérum albumin, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Triton-X-100, NaHCO_3 , sósav, L-aszkorbinsav (Reanal, Budapest), 12 v/v% polyetilénglikol (PEG) 6000 (Ferak, Berlin, Németország), nyúlsavó (Humán oltóanyag, Gödöllő), nyúl IgG ellen birkában termelt szérum, hordozómentes Na^{125}I (IZINTA, Budapest), jodogén (Pierce, USA), trifluorecetsav (TFA; Riedel-de Haen, Seelze, Németország), SEP-PAK C_{18} minioszlop (Waters, Milford, USA).

Desztillált víz: az ioncserélt vizet elektromos vízdesztillálón (Jena Glass, Jena, Németország) desztilláltuk és frissen használtuk.

HPLC tisztításokhoz és karakterizáláshoz használt leoldók: metanol, acetonitril (HPLC céljára, Merck, Darmstadt, Németország), desztillált víz (frissen desztillált, használat előtt $0,45 \mu\text{m}$ Millipore (Molsheim, Franciaország) HAWP 047 típusú szűrőn szűrt víz).

RIA puffer: 0,05 M foszfát puffer, pH=7,4, amely 0,25 % humán szérum albumint és 0,1 % Triton-X-100-at tartalmaz.

SEP-PAK C₁₈ minioszlop aktiválása: a minioszlopot használat előtt 5 ml metanollal, 5 ml desztillát vízzel és 5 ml 1 %-os TFA-val mostuk.

CRF kivonása patkány agyi területeiből

Dekapitálás után az agyakat gyorsan kivettük, és Glowinski és Iversen [80] által leírt módon száraz jégen izoláltuk a különböző agyterületeket, majd a mintákat a további feldolgozásig -70 °C-on tároltuk. Mindegyik agyterületet ultrahangos homogenizátorral (Soniprep 150 MSE, Nagy-Britannia), 2 ml 1 mM aszkorbinsavat tartalmazó, 100 mM sósavban [81], 25-30 másodpercig homogenizáltuk. Mindegyik mintából aliquotot vettünk ki fehérjeméréshez [82]. A maradék homogenizátumot 6000 g gyorsulással 4 °C-on, 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóból RIA céljára 1 ml-t liofilizáltunk.

A CRF-antiszérum jellemzői

A RIA módszer bevezetésekor fontos meghatározni az antiszérum titerét, affinitási konstansát, és specifitását.

a., Az antiszérum paraméterei a következők voltak:

- titer: 1:10000.
- affinitási konstans: $K = 9,0 \times 10^{10}$ l/mol;
- elméletileg számolt antitestkoncentráció:

$$[At] = 6,5 \times 10^{-12} \text{ mol/l.}$$

b., Specificitás

- Keresztreakciók:

A CRF-antiszérum a CRF₄₁ molekula C-terminális részére specifikus. Nem ad keresztreakciót a CRF₁₋₂₀ és a CRF₆₋₃₃ fragmensekkel. A CRF₂₁₋₄₁-gyel a keresztreakció 2,1 % [83].

Más vizsgált peptidekkel (VP, oxytocin, α -MSH, ACTH, β -endorphin) a keresztreakció nem számottevő (<0,01%).

- Az antiszérum specificitásának meghatározása biológiai mintából:

Biológiai mintából történő mérések során a polyclonális antiszérumok reakcióba léphetnek általunk nem ismert szerkezetű, a meghatározást zavaró fehérje-fragmensekkel és más anyagokkal. Ezért ismernünk kell, hogy az általunk vizsgált biológiai mintában jelenlevő immunoreaktív anyag megegyezik-e a mérendő peptiddel. Ezt a



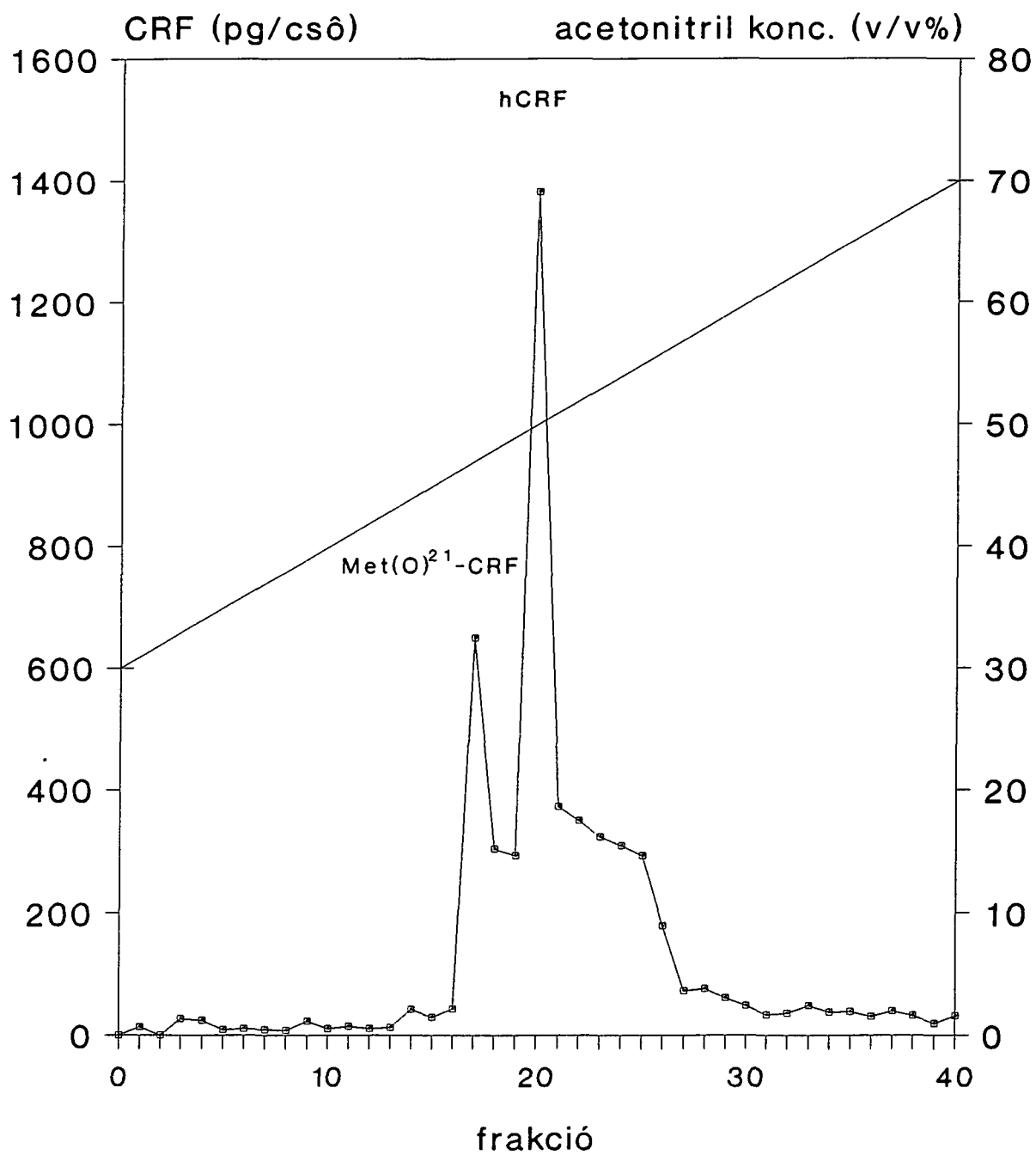
vizsgálatot peptidek esetén legegyszerűbben HPLC/RIA módszerrel lehet elvégezni, melynek lényege, hogy a biológiai minta előkészítése után nyert anyagot HPLC vizsgálatnak vetjük alá, és a kapott frakciók immunoreaktivitását RIA-val meghatározzuk. Ezt összevetjük a standard készítmény HPLC/RIA vizsgálati eredményével.

A vizsgálatot a következő módon hajtottuk végre:

5 darab hím, Wistar patkány hypothalamusát az előzőekben leírtak szerint homogenizáltuk, majd liofilizáltuk. A liofilizátum visszaoldása és szűrése (Millipore) után HPLC-vel, Nucleosil 5C₁₈ 300Å oszlopon, 0.1% trifluorecetsav (TFA):70% acetonitril-0.1% TFA rendszerben, 30-70% lineáris koncentrációgradienssel (acetonitrilre), 40 percig, 1 ml/perc átfolyási sebességgel kromatografáltuk, és 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A frakciókat 40°C-on N₂ áramban bepároltuk, majd meghatároztuk a bennük levő immunoreaktivitást.

A HPLC oszlopon kromatografált immunoreaktív anyag két fő összetevőből áll (3.ábra). A nagyobbik csúcs a human CRF-nek, míg a kisebbik csúcs valószínűleg [13] Met(O)²¹CRF-nek, a CRF oxidált formájának felel meg.

A CRF-antiszérum fajlagossága biológiai mintából



3.ábra

^{125}I -CRF előállítása

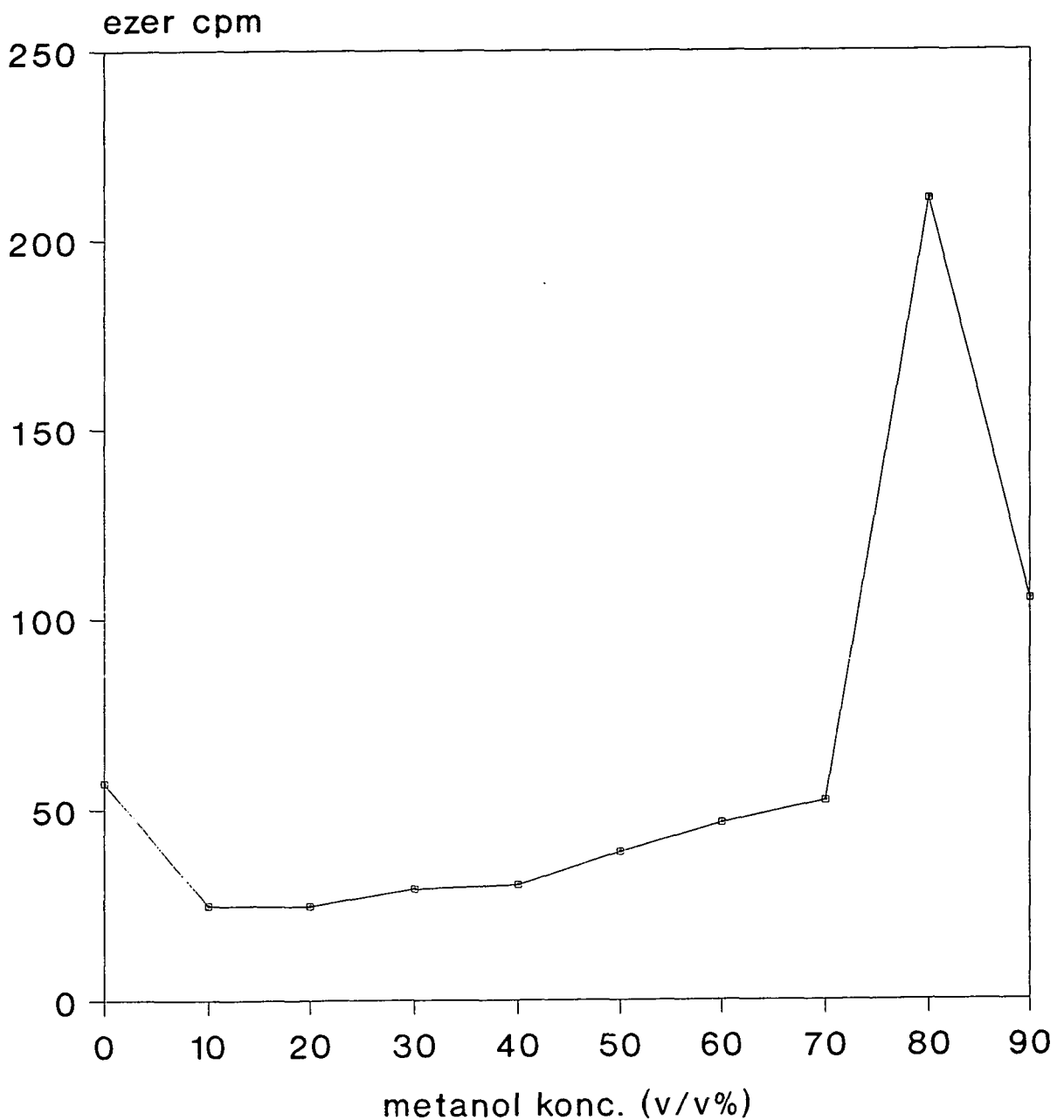
A jelölés céljára szánt szintetikus CRF-et $2\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ -es részletekben $0,2\ \text{N}$ ecetsavban oldva, -70°C -on tároltuk. Az előállításhoz Linton és Lowry módszere szolgált alapul [84], melynek lényege, hogy a Na^{125}I -ot a jelölendő anyaggal történő elegyítése előtt jodogénnel aktiváljuk. Azért választottuk ezt a módszert, mert a CRF molekulában könnyen oxidálható csoportok (2 metionin) is találhatóak, így enyhe oxidációs körülményeket biztosító metodikát kellett alkalmaznunk.

A következő módon végeztük a jelölést: $4\ \mu\text{g}$ jodogénhez $40\ \mu\text{l}$ $0,2\ \text{M}$ Na_2HCO_3 -ot és $20\ \mu\text{l}$ (2mCi) Na^{125}I -ot mértünk. Ezt 5 perc keverés után, $10\ \mu\text{l}$ -es részletekben adtuk hozzá a peptidhez. Minden részlet után 2 percig kevertük az elegyet. A reakciót $900\ \mu\text{l}$ $0,1\ \%$ -os TFA-oldattal állítottuk le.

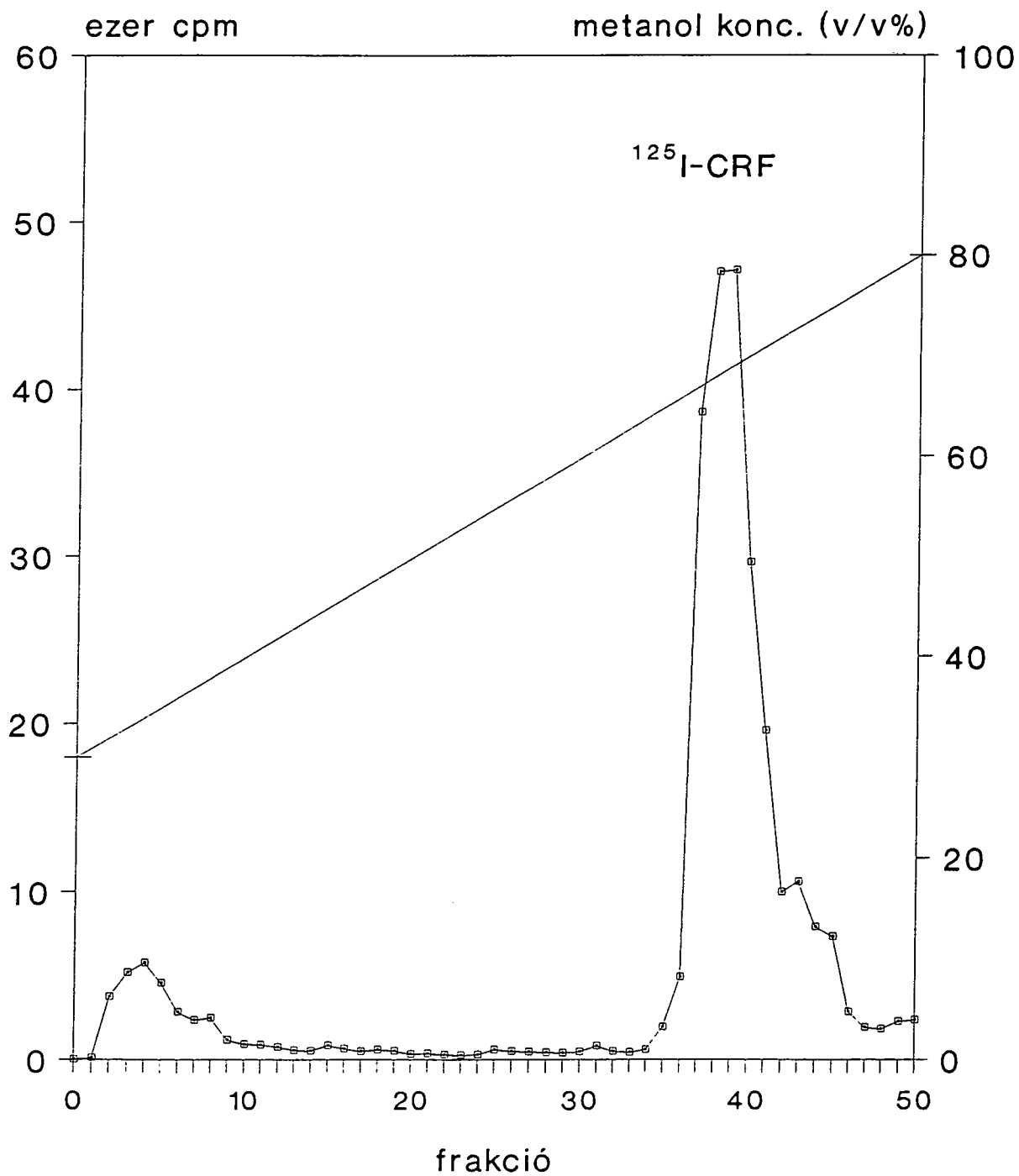
A jelzett peptid tisztítása két egymást követő lépésben történt [85]. A reakcióelegyet először SEP-PAK C_{18} oszlopon $10\ \%$ -onként növekvő koncentrációjú metanol és $0,1\ \%$ TFA tartalmú eluenssel kromatografáltuk. Az elúció során $1\ \text{ml}$ -es frakciókat gyűjtöttünk. A ^{125}I -CRF a $80\ \%$ metanolkoncentrációjú frakcióval eluálódott (4. ábra). Az így nyert terméket C_{18} fordított fázisú HPLC oszlopon ($260\ \text{mm} \times 4\ \text{mm}$) $30\text{-}80\ \%$ metanol koncentrációgradienssel tisztítottuk tovább (50 percig, $1\ \text{ml}/\text{perc}$). Ekkor is $1\ \text{ml}$ -es frakciókat gyűjtöttünk. Az elúciós görbe csúcsát

adó frakcióban Morris módszerével [86] meghatároztuk a tisztított ^{125}I -CRF specifikus aktivitását, amely 1900 Ci/mmol-nak adódott, közel az elméleti 2200 Ci/mmol értékhez. (5. ábra).

^{125}I -CRF tisztítása SEP-PAK C_{18} oszlopon



4.ábra

^{125}I -CRF tisztítása HPLC-vel

5.ábra

Elválasztási módszer

Az elválasztási módszer kiválasztásakor egy frakcionált fehérjekicsapási, és egy adszorpciós eljárással próbálkoztunk. Az előző a kettős antitest szeparációs eljárás (DAB/PEG módszer), amely a radioimmunanalitikában használt elválasztási módszerek közül a leguniverzálisabb. Ez az elválasztás egy második immunreakción alapul, melyben a primer antitest-antigén komplex egy második antitesttel precipitátumot képez. Ehhez rendelkezésünkre állt, egy a laboratóriumunkban előállított második antitest. Mindegyik csőhöz 50 μ l 1:100 hígítású normál nyúlszérumot és 50 μ l 1:10 hígítású második antitestet (nyúl IgG ellen birkában termelt szérum) adtunk, majd 2 órás, 4 °C-on történő inkubálás után 1 ml 12 %-os PEG-oldatot mértünk a csövekbe, és összerázás után 4 °C-on, 20 percig, 2500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, és a csapadék (kötött frakció) radioaktivitását mértük.

Az adszorpción alapuló eljárásnál aktivált szenet és dextránt használtunk. E módszer lényege, hogy a nagy felületű szénpor méret- és töltésnagyság alapján különbséget tesz a szabad és az antitesthez kötött antigén között. A dextrán - feltételezések szerint - molekulánagyság szerinti szűrőhatásával csökkenti az antigén-antitest komplex szénhez való kötődési lehetőségét, valamint összefogja a szén szemcséket és ezáltal reprodukálhatóbb a kötött és a szabad frakciók elkülönítése. 100 μ l szénsuszpenziót (20 mg szén és 5 mg

dextrán 1 ml RIA-pufferben oldva) adtunk egy-egy cső tartalmához, majd összerázás és 10 perc állás után 4 °C-on, 20 percig, 2500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk és a szénhez kötődött szabad antigén-frakció radioaktivitását mértük. Ebben az esetben a nem specifikus kötés magasabb volt, mint a második antitesttel történő elválasztáskor, valamint a RIA érzékenysége is csökkent, ezért az előző módszert választottuk a szabad és a kötött frakció elkülönítésére (1. táblázat).

1. táblázat

Elválasztási módszer	Nem specifikus kötés	Érzékenység
kettős antitest		
szeparációs (DAB/PEG)	3%	7,8 pg/cső
adszorpciós		
(szén+dextrán)	17%	31,2 pg/cső

A kidolgozott RIA módszer leírása, kalibrációs görbéje és minőségi mutatói

Az assay során minden hígítást RIA pufferrel végeztünk. A kalibrációs görbét 7,8-500 pg/cső koncentráció-tartományban készítettük. A RIA csövek 200 μ l CRF standardot, vagy mintát, 100 μ l 1:10000 hígítású antiszérumot tartalmaztak, melyhez 16-24 órás, 4 °C-on történő előinkubáció után, 100 μ l 125 I-CRF-t (10000 cpm) adtunk. Ezután 24 órás inkubálás következett 4 °C-on. A kötött és a szabad frakciók elválasztását az előzőekben már ismertetett DAB/PEG módszerrel végeztük. A kötött frakció radioaktivitását 1470 Wizard (Wallac) típusú automatikus mintaváltón mértük le. Az ismeretlen minták koncentrációit a MultiCalc V1.50 RIA számítási program segítségével határoztuk meg.

A RIA megbízhatóságáról, reprodukálhatóságáról az intra- és interassay együtthatók nyújtanak felvilágosítást. Meghatározásukhoz különböző koncentrációjú ellenőrző CRF mintákat alkalmaztunk. Az intraassay koefficiens a méréstartomány közepes koncentrációjú szakaszára eső minta esetén $[123,6 \pm 9,8 \text{ pg/cső } (\bar{X} \pm \text{S.E.}, n=5)]$ 4,0 %, a méréstartomány magas koncentrációjú szakaszára eső ellenőrző minta esetén $[494 \pm 26,5 \text{ pg/cső } (\bar{X} \pm \text{S.E.}, n=5)]$ 7,7 %. Ugyanezekből az ellenőrző mintákból meghatározott interassay koefficiens a közepes koncentrációjú mintáknál 13,8 %, a magas koncentrációjú mintáknál 10,7 %.

A CRF RIA ALKALMAZÁSA: A KOKAIN HATÁSA A PATKÁNY KÜLÖNBÖZŐ AGYTERÜLETEINEK CRF-TARTALMÁRA

Irodalmi előzmények

Régóta vizsgálat tárgya a kábítószereknek az élő szervezetre gyakorolt hatása, a velük szemben kialakuló testi és lelki függőség jelenségének kutatása. A kábítószernek közé tartozik a kokain.

A kokain az Erythoxylon Coca cserjében található a természetben. Régóta ismert helyi érzéstelenítő, napjainkban azonban az új, szintetikus helyi érzéstelenítők megjelenésével használata beszűkült. Társadalmi veszélyessége azonban óriási, mert illegálisan igen elterjedt a kokain forgalmazása.

A kokain az úgynevezett pszichostimulánsok közé tartozik. A kokain eufória nem nagyon különböztethető meg az amfetamin eufóriától. Alkalmazása során viszonylag kisfokú tolerancia és enyhe mértékű fizikai függőség alakul ki; a pszichikai vágy a szer után viszont rendkívül erős. A kokain hatására felszabadulttá, oldottá válnak az emberek, növekszik a fizikai teljesítőképesség. A nagyagykéreg aktivitásának fokozódása áll a pszichostimuláns hatás hátterében. A szer hosszabb alkalmazásának hatására erős depresszió és gyakran öngyilkosság következhet be.

A biokémiai vizsgálatok próbáltak magyarázatot adni a szer által kiváltott fizikai és pszichikai hatásokra. A

kutatások szerint a kokain akut alkalmazása, illetve tolerancia, dependencia kialakulása megváltoztatja a központi idegrendszerben a klasszikus neurotranszmitterek és azok metabolitjainak szintjét, a neurotranszmitterek receptorainak érzékenységét és az átvivő anyagok metabolizmusát. A kokain legfontosabb hatása az, hogy a központi idegrendszerben gátolja a szerotonin, a noradrenalin, de legfőképpen a dopamin visszavételét, a "reuptake"-ot [87,88,89], növeli az agy acetilcolin tartalmát [90], befolyásolja a muscarin típusú receptorok aktivitását [91]. Krónikus alkalmazásának hatására megváltozik az agy dopaminmetabolizmusa és utilizációja [92,93], és régióspecifikus eltérések tapasztalhatóak a centrális dopamin- és benzodiazepim-receptorok aktivitásában [94,95,96]. A szer megváltoztatja a szérum testosteron [97], a Prl és az LH koncentrációját [98,99]. A krónikus kokainadagolás stimulálja a thyreotropin-releasing hormon (TRH)-TSH rendszeren keresztül a pajzsmirigy működését [100]. A szer ismételt adagolása során megváltozik különböző agyterületek dynorphin- és neurotensinkoncentrációja [101]. Addikt egyéneknél csökkenti a plazma Prl-, és növeli a GH-koncentrációját [102]. Egyszeri alkalmazása megváltoztatja az α -MSH koncentrációját mind a plazmában, mind az agy különböző területein [103].

Sok hasonlóság van a CRF és a kokain hatásában: mindkettő aktiválja, serkenti az ACTH és a corticosteron

(CORT) szekrécióját, fokozza a lokomotoros aktivitást és a sztereotip viselkedést. Patkányokban a CRF és kokain kezelés után megfigyelhető a fájdalomérzet, a táplálékfelvétel, a szexuális aktivitás, valamint a sejtes immunfunkciók csökkenése [18, 89, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111]. Az agyi CRF-rendszer aktivitásának növekedése következik be szorongásban, depresszióban és pánik betegségben, melyek az emberben a krónikus kokain használat fő pszichiátriai következményei [104, 112]. A kokain-indukálta ACTH- és CORT-elválasztás perifériáisan adott CRF-antiszérummal meggátolható [109]. I.c.v. adott CRF-antiszérum és CRF-receptor antagonistá, α -helikális CRF₉₋₄₁ is blokkolja a kokainnal kiváltott CORT-választ [110]. A kokain-okozta lokomotoros hiperaktivitás i.c.v. adott CRF-antiszérummal és CRF-receptor antagonistával szintén dóziszfüggően blokkolható [113]. A kokain in vitro stimulálja a CRF elválasztását a hypothalamusból [114], krónikus adásakor csökken a CRF-receptorok száma a mesolimbikus mesocorticalis régiókban [115]. Rivier és Lee [116] kimutatta, hogy kokain hatására nő az NPV CRF-mRNA-tartalma, valamint az NPV sérülése csökkenti patkányokban a kokain-indukálta plazma ACTH-szint emelkedését.

Célkitűzés

A fenti irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy az agyi CRF-nek döntő szerepe lehet a kokain által

kiváltott magatartási és neuroendokrin változások mediálásában. Ezért célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk - az általunk kidolgozott RIA segítségével - a kokain akut és krónikus adását követően a hypothalamus és néhány extrahypothalamikus terület (hippocampus, bazális előagyi struktúrák, frontális cortex, amygdala) CRF-tartalmának változását. Akut alkalmazást követően vizsgáltuk a változások dózis-, illetve időfüggését is. Azért választottuk ezeket a struktúrákat, mert ezeknek lehet szerepük a CRF centrális hatásainak közvetítésében [104]. Továbbá ezek a területek tartalmazznak immunoreaktív CRF-et, CRF-sejttesteket, -rostokat és -receptorokat.

A kísérletek kivitelezése

Vizsgálatainkhoz felnőtt, Wistar, hím, 180-220 g súlyú patkányokat (LATI, Gödöllő) használtunk. Az állatokat ötös csoportokban, szabad táplálék és vízfelvétel mellett, standard megvilágítási körülmények között (6⁰⁰-18⁰⁰ h között fény) tartottuk. A kísérletet megelőző hat egymást követő napon 5-10 percig kézbe vettük a patkányokat, hogy hozzászoktassuk őket az ember jelenlétéhez és minimálisra csökkentsük a nem specifikus stresszhatást.

I. Kísérlet: Az akutan adott kokain CRF-szintre kifejtett hatásának vizsgálata:

Az állatokat négy csoportra osztottuk: mindegyik csoportba 8-10 állat tartozott. Az első csoportba

(kontroll) tartozó állatok fiziológias sőt (0,9%-os NaCl) kaptak intraperitonálisan (i.p.). A másik három csoportba tartozó patkányoknak különböző dózisú kokaint adtunk (7,5; 15 és 30 mg/kg). A kezelés után 30 perccel az állatokat dekapitáltuk, az agyakat gyorsan kivettük, és mindkét agyféltekéből izoláltuk a különböző agyterületeket Glowinski és Iversen módszere [80] szerint. Elkülönítettük a teljes hypothalamust, az amygdalát, a teljes hippocampust, a frontális cortexet, és a bazális előagyi régiókat (beleértve a tuberculum olfaktoriumot, a nuclues accumbens és a középső septalis területet). Ezt követően RIA-val meghatároztuk az egyes agyterületek CRF-immunoreaktivitását az előzőekben már ismertetett módon.

II. Kísérlet: A krónikusan adott kokain, valamint a kokain-megvonás CRF-szintre kifejtett hatásának vizsgálata:

Az állatokat itt is négy csoportra osztottuk (n=8). Két csoport (kontroll) 0,2 ml 0,9 %-os NaCl oldatot, míg a másik két csoport 14 napon keresztül 20 mg/kg kokaint kapott intraperitonálisan. A patkányokat az utolsó kokain vagy só injekciót követően 30 perccel, illetve 48 órával dekapitáltuk, majd azon agyterületeket, amelyek az előző kísérlet során szerepeltek, az előzőekben említett módszerekkel izoláltuk, és meghatároztuk a CRF-koncentrációját.



III. Kísérlet: A kokain CRF-szintre gyakorolt hatásának időbeli lefutásának vizsgálata:

Az állatok egyik csoportját 0,9%-os NaCl oldattal, a másik csoportját kokainnal (7,5 mg/kg, i.p.) kezeltük. Az injekció beadása után 60, 90, 120, 180 perccel az állatokat dekaptáltuk (minden időpontban mindkét csoportból 6-10 állatot), és az I. kísérletben szereplő agyterületeket elkülönítettük, majd megmértük a CRF-szinteket.

Eredmények és megbeszélésük

Az adatokat mindhárom kísérlet esetében pg/mg protein egységben és $\bar{X} \pm S.E.$ formában adtuk meg. Az I. és III. kísérletnél az eredmények statisztikai értékelését egy-szemponos variancia analízissel végeztük, a csoportokat Dunnett-teszttel hasonlítottuk össze. A II. kísérlet esetében a CRF-szintek összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

I. Kísérlet:

Az akut kokainkezelés a CRF-szintben szignifikáns, dóziszfüggő csökkenést eredményezett a hypothalamusban ($F_{3,30}=6,66$; $p<0,002$) és a bazális előagy esetében ($F_{3,29}=18,09$; $p<0,0001$). A 7,5 mg/kg dózisú kokain csökkentette a CRF-szintet a hippocampusban ($F_{3,33}=5,47$; $p<0,005$) és a frontális cortexben ($F_{3,31}=4,54$; $p<0,01$). A kezelés hatására dóziszfüggő növekedés volt tapasztalható az amygdala CRF-koncentrációjában ($F_{3,32}=8,41$; $p<0,0005$) (2.táblázat).

2. táblázat

A kokain hatása különböző agyterületek CRF-IR-tartalmára

AGYTERÜLETEK	KOKAIN (mg/kg testsúly)			
	0	7,5	15	30
HYPOTHALAMUS	2427±711	866±156* (-64%)	648±131* (-73%)	624±75* (-74%)
BAZÁLIS ELŐAGY	593±42	294,5±25* (-50%)	273,3±28* (-54%)	188±22* (-68%)
HIPPOCAMPUS	26,8±3,3	12,7±3,1* (-52%)	19,8±1,7 (-27%)	19,5±2 (-27%)
FRONTÁLIS CORTEX	37,7±4	22,8±3,4* (-40%)	31,8±2 (-16%)	31,8±2 (-16%)
AMYGDALA	461±84	1518±185* (+229%)	2559±311* (+455%)	2785±597* (+504%)

* p<0,05 vs. kontroll

Jelen tanulmány eredményei szerint, a sóval kezelt, nem stresszelt patkányokban mért alap CRF-IR eloszlása, hasonló az előző tanulmányok RIA eredményeivel. Chappell és munkatársai [22] feltérképezték a CRF-IR-t patkány agyterületekben, melyeket Palkovits és Brownstein mikropunkciós módszerével [117] izoláltak. Ők 5054 ± 674 pg/mg protein CRF-IR-t találtak az eminentia mediana/ nucleus arcuatus komplexben. Néhány más hypothalamikus mag kb. 1200 pg/mg protein CRF-IR-t tartalmazott. A mi kísérletünkben a hypothalamus CRF-IR-tartalma 2427 ± 711 pg/mg protein-nek adódott. A limbikus előagyi struktúrákban (tuberculum olfaktorium, septum (laterális és mediális) és nucleus accumbens) körülbelül 350 pg/mg protein CRF-IR-t detektáltak. Jelen vizsgálatban a CRF-IR-szint a bazális előagyban (tuberculum olfaktorium, mediális septum és nucleus accumbens) körülbelül 600 pg/mg protein volt. Chappell és munkatársai az amygdala különböző területein összesen mintegy 600 pg/mg protein CRF-IR-mennyiségről számoltak be, míg mi 461 ± 84 pg/mg protein CRF-IR-t találtunk. Chappellék a ventrális és a dorsális hippocampusban 31 és 34 pg CRF-IR/mg proteint mértek, míg mi a teljes hippocampusban $26,8 \pm 3,3$ pg CRF-IR/mg proteint. Míg ők 22 pg/mg protein CRF-IR-t határoztak meg a mediális prefrontális cortexben, addig mi $37,7 \pm 4$ pg/mg protein CRF-IR-t mértünk a frontális cortexben. Ezek az összehasonlítások mutatják, hogy az előző adatok és a mi eredményeink az alap CRF-IR-szinteket tekintve különböznek

ugyanazon agyterületekben. Ezek az eltérések fennállhatnak az eltérő kísérleti körülmények miatt, amely megnyilvánulhat az agyi régiók izolálásának, az antiszérum és a RIA módszer használatának különbözőségében.

Az eredmények azt mutatják, hogy az egyszeri kokainkezelés csökkenti a CRF-szintet a hypothalamusban, a bazális előagyban, a hippocampusban és a frontális cortexben. Habár egyedül a peptidkoncentráció mérése nem tud különbséget tenni szintézis, axonális transzport, raktározás, felszabadulás és degradáció között, egy immunoreaktív peptidszintcsökkenés bizonyos agyterületben általában a peptid agyi felszabadulását, és az azt követő enzimatisz degradációját fejezheti ki. A kokain-indukálta hypothalamikus CRF csökkenése valószínűleg a hypothalamo-hypophysealis rendszerből a portális keringésbe szekretálódó CRF-nek köszönhető, melynek következtében aktiválódik a hypophysis-mellékvese tengely. Ezt a magyarázatot alátámasztja az az adat, miszerint a kokain azonos dózisokban és időintervallumban serkenti az ACTH és a CORT elválasztását [109,110]. Továbbá, *in vitro* kísérletek kimutatták, hogy a hypothalamusban a kokain CRF-felszabadulást vált ki [114]. Megfigyelésünk alapján feltételezzük, hogy a hypothalamusból felszabadult CRF közvetíti a kokain hatását a HPA tengelyben.

Az akut kokainkezelés szignifikáns csökkenést eredményez a bazális előagyi struktúrák és a hippocampus CRF-IR-szintjében. A bazális előagyban történő CRF és

kokain mikroinfúzió növeli az állatok lokomotoros aktivitását. Ugyanez tapasztalható a CRF-nek a hippocampusba történő mikroinjektálása után is [118]. A CRF kétoldali bejuttatása a hippocampus gyrus dentatusába intenzív lokomotoros aktivitásfokozódáshoz vezet [118]. A kokain-kiváltotta lokomotoros hiperaktivitás CRF antiszérum különböző hígításaival és CRF-antagonistával teljesen blokkolható [113]. Mindezen adatokat figyelembe véve feltételezhetjük, hogy a limbikus és bazális előagyi struktúrákból történő CRF-felszabadulás szerepet játszhat a kokain-kiváltotta lokomotoros válaszban.

A kisebb dózisú kokain hatására a frontális cortex CRF-szintje is csökken. A CRF-receptorok száma csökken ezen agyterületben a depressziós, öngyilkos betegekben [119]. Csökken a CRF-receptorok száma [115] és a CRF-IR-szint krónikus kokainadás után is [120]. Ez vezethet szorongáshoz és depresszióhoz, mind a kísérleti állatokban [120], mind az embereknél [121]. Mind a receptorszámcsökkenés, mind a CRF-szint csökkenése, CRF-felszabadulás-fokozódásra utal. Ez a hatás talán összefüggésbe hozható a kokain-indukálta érzelmi változásokkal. Ebből feltételezhetjük, hogy a frontális cortex endogén CRF-rendszere szerepet játszhat a kokain-kiváltotta érzelmi változásokban.

Akut kokainkezelés után a legdrámáibb változás az amygdala CRF-szintjében következik be. A növekvő kokain dózis kb. 2-, 4- és 5-szörös CRF-koncentráció-növekedést idéz elő. Egy neuropeptid koncentrációjának emelkedése

valamely agyterületben jelentheti: a., a szintézis fokozódását és/vagy b., a peptidfelszabadulás csökkenése miatt bekövetkező felhalmozódást. Kísérleteinkből nem állapítható meg az amygdalában a kokain-indukálta CRF-koncentráció-növekedés pontos mechanizmusa, de számos bizonyíték támasztja alá mindkét lehetőséget. Tény, hogy az amygdala nem csak CRF-rostokat tartalmaz, hanem CRF szintetizáló sejttesteket is. Igazolt, hogy az amygdala a félelem és a szorongás kapcsán kialakult neurobiológiai folyamatokban jelentős szereppel rendelkezik [122, 123]. A CRF i.c.v. bejuttatása a hangra adott megtorpanási reflex tartós aktiválásához vezet, igazolva, hogy a CRF-okozta magatartási változások hasonlítanak a félelemre, vagy a szorongásra. Az amygdala központi magjának sérülése gátolja a CRF hatását ezen reflexre. Emberben a kokain-hozzászokásnak, és/vagy -megvonásnak a legfontosabb pszichiátriai következménye az emberben a szorongás és a depresszió [121]. Jelen adataink szerint a kokain-kiváltotta amygdaláris CRF-változás a magatartási változások tükrében felvetik azt a lehetőséget, hogy az amygdalában lejátszódó CRF-felszabadulás fontos mediátor a kokain-indukálta neurobiológiai folyamatokban.

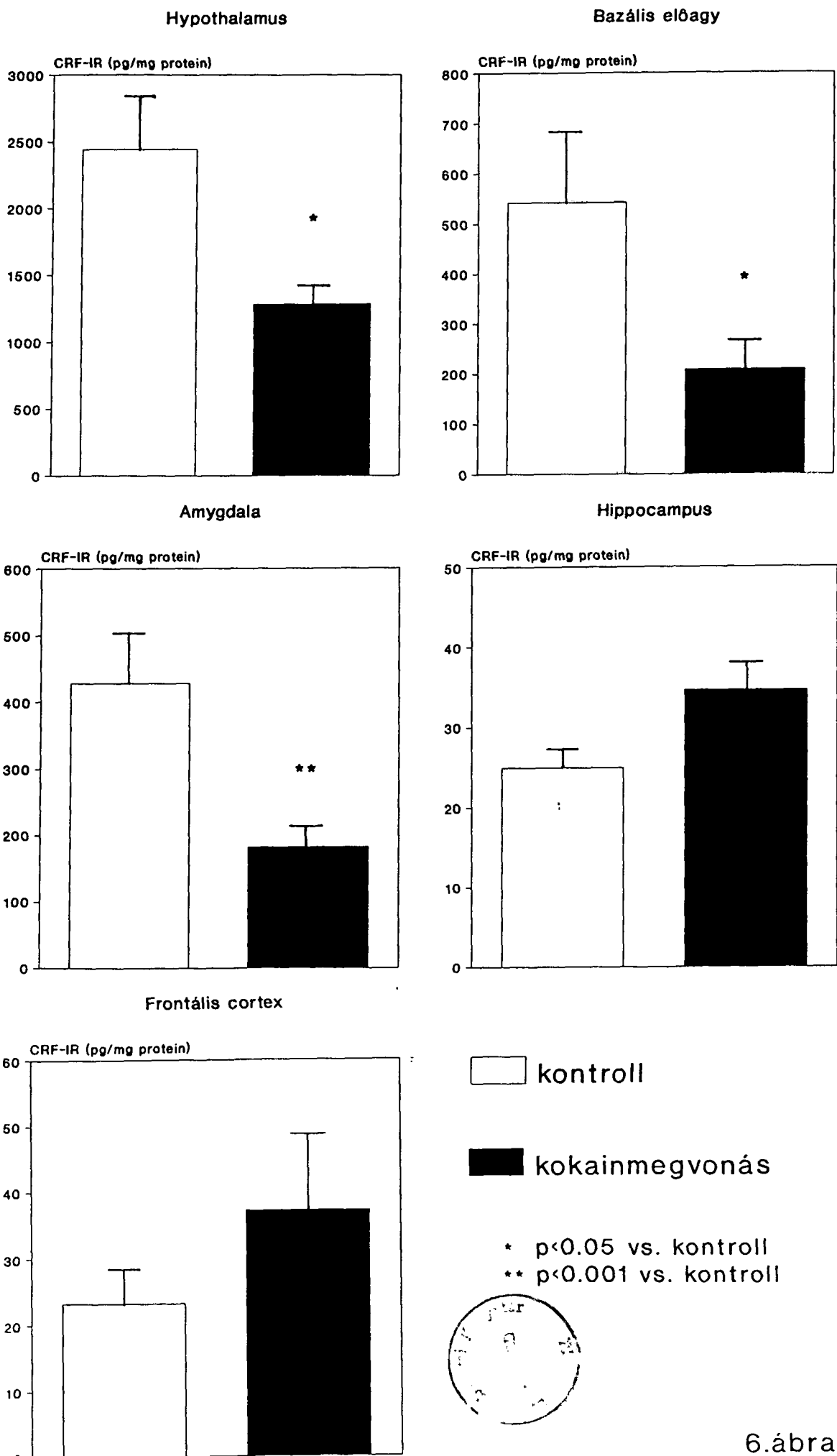
II. Kísérlet:

Egyik agyterületben sem találtunk szignifikáns eltérést a CRF-IR-szintben 30 perccel az utolsó só vagy kokain injekció beadása után.

Összehasonlítva a krónikusan kokain-kezelt állatokat a krónikusan só-kezelt kontrollokkal, 48 órával az utolsó kokain injekció után a CRF-IR-tartalom szignifikánsan csökkent a hypothalamusban ($p < 0,05$), a bazális előagyi régiókban ($p < 0,05$), és az amygdalában ($p < 0,005$). Statisztikailag nem szignifikáns, tendenciaszerű növekedést tapasztaltunk a CRF-IR-szintben a hippocampusban ($p = 0,093$) és a frontális cortexben ($p = 0,34$) (6. ábra).

Kokainmegvonás és az előzőek szerint akut kokain-kezelés hatására a hypothalamusban bekövetkező CRF-szint-csökkenés, valamint a korábbi megfigyelések, miszerint a kokain stimulálja a CRF-felszabadulást a hypothalamusból, *in vitro* [114], és növeli a hypothalamus NPV-nak CRF-mRNS-tartalmát *in vivo* [116], azt a feltevést látszik alátámasztani, hogy a hypothalamusban fokozott CRF-felszabadulás és ezt követő enzimatis degradáció játszódik le. A CRF-mRNA, *in vivo* CRF-felszabadulás és CRF-kötő fehérje koordinált mérése bizonyos agyi struktúrákban segíthetne megérteni a kokainmegvonás hatására bekövetkező változások pontos mechanizmusát. Az agyi CRF-rendszer feltételezett aktivitásfokozódása kokainmegvonás alatt megegyezik azzal az adattal, miszerint krónikus kokain-kezelés hatására csökken a CRF-receptorok száma a bazális előagy dopaminerg struktúráiban [115]. Ez a megfigyelés jelenthet fokozott CRF-felszabadulást, amit ezen receptorok down-regulációja kompenzál [115].

Az agyi CRF-IR változása kokainmegvonás hatására



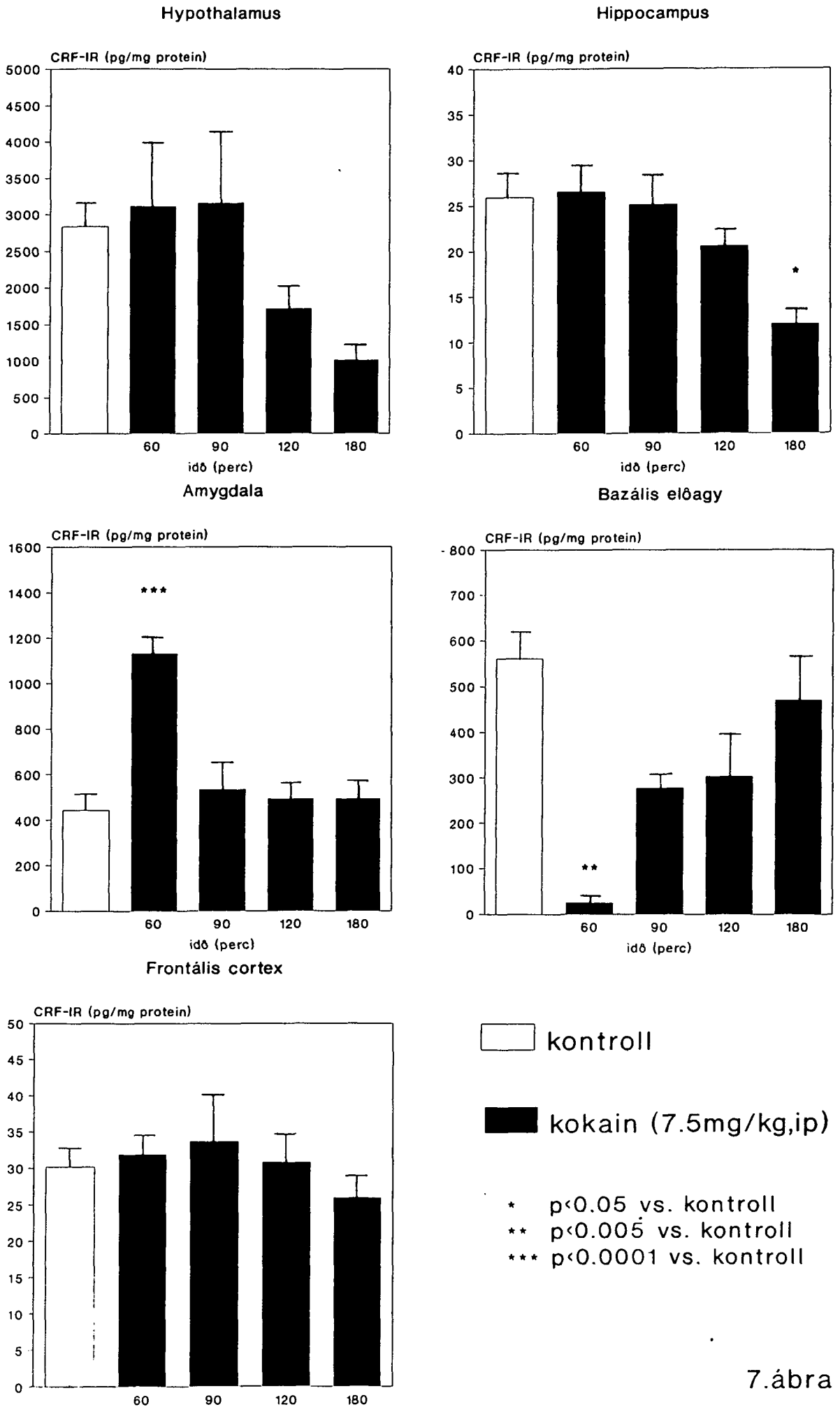
6.ábra

A kokainmegvonás után az amygdalában talált CRF-csökkenés valószínűleg a megnövekedett CRF-felszabadulás eredménye. A laterális agykamrába adott CRF infúzió szorongást idéz elő [124], továbbá a CRF-receptor antagonistá, α -helikális CRF₉₋₄₁ közvetlen bejuttatása az amygdala központi magjába csökkenti az etanolmegvonás által okozott szorongásos viselkedést [125]. In vivo mikrodialysissel végzett mérések azt mutatják [126], hogy a stressz is CRF-felszabadulást idéz elő a patkányok amygdalájában. Ezen adatok megerősítik azt a feltevést, hogy az amygdaláris CRF fontos szerepet tölthet be a drogmegvonás-okozta szorongásos állapotok mechanizmusában.

III. kísérlet:

Szignifikánsan csökkent a CRF-IR-szint a kokainkezelés után 60 perccel a bazális előagyi struktúrákban ($F_{4,56}=4,71$; $p<0,005$). Tendenciaszerű csökkenést tapasztaltunk 90 és 120 perc után ugyanezen agyterületben. Szignifikáns emelkedést találtunk az amygdala CRF-IR-tartalmában 60 perccel a kokain injekció után ($F_{4,55}=16,69$; $p<0,0001$). A hippocampus CRF-tartalma szignifikánsan csökkent 180 perccel a kezelés után. ($F_{4,55}=2,95$; $p<0,05$). Ugyanezen tendencia volt megfigyelhető a hypothalamusban is. ($F_{4,55}=2,20$; $p=0,08$). Egyik időpontban sem találtunk változást a frontális cortex CRF-szintjében ($F_{4,63}=0,44$; $p=0,78$) (7. ábra).

Az agyi CRF-IR időfüggő változása kokain hatására



7.ábra

Az I és a III. kísérlet együtt reprezentálja a hypothalamus, a hippocampus, az amygdala, a bazális előagy és a frontális cortex CRF-IR-szintjének változását, egyszeri kokainkezelést követő különböző időpontokban. A hypothalamus és a hippocampus esetében bifázisos választ kaptunk, azaz a kezdeti csökkenést követően a CRF-IR mennyisége visszatér a normálszintre, majd 180 perc után újra lecsökken. Az amygdala CRF-IR-tartalma nő mind 30, mind 60 perccel a kokainkezelés után, majd visszatér az alapértékre. A bazális előagyban a CRF-IR elkezd csökkenni a kezelés után 30 perccel, de a csúcs-hatás 60 perccel a kokain beadása után tapasztalható.

A kokain agyi farmakokinetikai változásai adhatnak magyarázatot a kokain CRF-szintekre gyakorolt hatásában lévő régió- és időspecifikus különbségekre. Javaid és munkatársai [127] 4 órán át vizsgálták i.p. kezelés után a kokainkoncentrációt patkány szérumban és diszkrét agyi területeken. Több mint 3-szoros különbségeket észleltek a kokain felhalmozódásában az egyes agyi struktúrák között. Azokban az agyterületekben (amygdala, bazális előagy), ahol a kokain akkumulációja nagyobb, ott - jelen eredményeink alapján - a kokain által okozott CRF-IR-szintek változása a kezelést követően szélesebb időintervallumban figyelhető meg. Valószínű, hogy a kokain eltérő hatása a különböző agyi régiók CRF-koncentrációjára részben ezen egyenetlen eloszlás eredménye.

A hypothalamikus és hippocampális CRF-IR hasonló irányú változását magyarázhatja az a megfigyelés, hogy csökken a hippocampális CRF-koncentráció a hypothalamus NPV-jének elektrolitikus roncsolása után [128]. Ez alapján Kogler-Muly és munkatársai feltételezték, hogy a hippocampus CRF-tartalmú rostjai a NPV-ből erednek. Ez a megfigyelés magyarázhatja, miért tapasztaltunk hasonló bifázisos csökkenést a hypothalamus és a hippocampus CRF-tartalmában kokain hatására.

Hipotézisünk szerint, a kokain injekció után 30 perccel bekövetkező CRF-IR-csökkenés, valószínűleg megnövekedett felszabadulás és azt követő enzimatis lebomlás eredménye. A kokainkezelés után 3 órával megfigyelhető CRF-IR-csökkenés, pedig a magas CORT-koncentráció negatív "feed back" hatása miatt bekövetkező CRF-szintézis-csökkenésre utalhat. Mások szerint az amygdala és a bazális előagy nem áll negatív "feed back" alatt [129], és ezen agyterületekben nem is találtunk CRF-IR-változást 3 órával a kokain adása után.

Mind a hypothalamikus, mind az extrahypothalamikus CRF aktiválódik stressz [22,130,131,132] és kokain [120] hatására patkányban. Eredményeink azt mutatják, hogy kokain hatására csökken a hypothalamus CRF-IR-tartalma a kezelést követően 30 és 180 perccel. Moldow és munkatársai [133] a hypothalamikus CRF-koncentráció hasonló bifázisos csökkenését találták stressz hatására. Ezen eredmények

felvetik, hogy az akut stressz és a kokainkezelés hatásmechanizmusa hasonló a HPA tengelyben.

Kísérleti eredményeink alapján feltételezzük, hogy a CRF központi idegrendszeri változásai döntően szerepet játszhatnak a kokain akut és krónikus adása által kiváltott neuroendokrin, magatartási és érzelmi változásokban.

ÖSSZEFOGLALÁS - AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A SZOTE Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratóriumában a CRF mérésére alkalmas RIA-t dolgoztunk ki. Az értekezés ismertette a rendelkezésünkre bocsájtott antiszérum tulajdonságait (titer, affinitási konstans, specificitás). Nagy tisztaságú, RIA céljára alkalmas, ^{125}I -izotóppal jelölt, nagy specifikus aktivitású CRF-et állítottunk elő. Eljárást dolgoztunk ki a CRF patkány agyi területeiből történő kivonására. HPLC/RIA vizsgálati módszerrel igazoltuk az antiszérum specificitását a CRF biológiai mintából történő mérésére.
2. Akut és krónikus kokainkezelést alkalmaztunk a különböző agyterületek CRF-tartalmának változtatására in vivo, és a változásokat az általunk kifejlesztett RIA-val követtük.
 - a., Megállapítottuk, hogy az akut kokainkezelés csökkenti a CRF-IR-szintet a hypothalamusban, a bazális előagyban, a hippocampusban, és a frontális cortexben. Jelentős CRF-IR-növekedést találtunk az amygdalában.
 - b., Kísérleteink szerint a kokain krónikus adását követően nem változik jelentősen a vizsgált agyterületek immunoreaktív CRF-tartalma. Ezzel szemben a szer megvonása esetén csökken a CRF-szint a hypothalamusban, a bazális előagyban és az amygdalában.

c., Vizsgáltuk az egyes agyterületek CRF-szint-változásainak időfüggését egyszeri kokainadás után. Megfigyeléseink szerint a hypothalamus és a hippocampus esetében bifázisos választ kapunk, azaz a kezdeti csökkenést követően a CRF-koncentráció visszatér a kiindulási szintre, majd 180 perc után újra lecsökken. Az amygdala CRF-tartalma nő mind 30, mind 60 perccel a kokainkezelés után. Csökken a peptid koncentrációja a bazális előagyban 30, 60, 90, 120 perccel a kokain beadását követően. A csökkenés mértéke 60 percnél a legnagyobb.

Kísérleti eredményeink alapján feltételezzük, hogy a CRF központi idegrendszeri változásai egyike azon mediátoroknak, melyek fontos szerepet játszanak a kokain által kiváltott neuroendokrin, magatartási és érzelmi változásokban.

3. Méréseink azt mutatják, hogy RIA módszerünk alkalmas az agyi CRF-IR-változások követésére, és ezáltal a CRF-nek a neuroendokrin szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatára.



RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK JEGYZÉKE

ACTH	-	adrenocorticotropin
α -MSH	-	alfa-melanocyta-stimuláló hormon
CORT	-	corticosteron
CRF	-	corticotropin-releasing faktor
CRF-IR	-	CRF-immunoreaktivitás
CRF-mRNS	-	CRF-hírvivő (massanger)-ribonukleinsav
F	-	Fisher-féle F-próba eredménye
FSH	-	folliculus-stimuláló hormon
GH	-	növekedési hormon
GnRH	-	gonadotropin
HPA	-	hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (hypothalamus-pituitary-adrenal)
HPLC	-	nagynyomású folyadékkromatográfia
HSA	-	human szérum albumin
i.c.v.	-	intracerebroventricularis
i.p.	-	intraperitonális
i.v.	-	intravénás
LH	-	luteinizáló hormon
NPV	-	nucleus paraventricularis
p	-	szignifikancia-szint
PEG	-	polyetilénglikol
Prl	-	prolactin
RIA	-	radioimmunoassay
S.E.	-	standard error (hiba), szórás
SS	-	somatostatin
TFA	-	trifluorecetsav

TRH - thyreotropin-releasing hormon
TSH - thyreoidea-stimuláló hormon
VP - vasopressin

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- 1./ Sarnyai, Z., Bíró, É., Gardi, J., Vecsernyés, M., Julesz, J., Telegdy, G.:
Alterations of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in different brain regions after acute cocaine administration in rats.
Brain Res. **616**, (1993) 315-319.

- 2./ Sarnyai, Z., Bíró, É., Gardi, J., Vecsernyés, M., Julesz, J., Telegdy, G.:
Brain corticotropin-releasing factor mediates "anxiety-like" behaviour induced by cocaine withdrawal in rats.
Brain Res. **675**, (1995) 89-97.

- 3./ **Gardi, J.**, Bíró, É., Sarnyai, Z., Vecsernyés, M., Julesz, J., Telegdy, G.:
Time-dependent alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in different brain regions after acute cocaine administration to rats.
Neuropeptides (közlésre elküldve)

IRODALOMJEGYZÉK

1. Saffran, M. and Schally, A.V.: The release of corticotropin by anterior pituitary tissue in vivo. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33** (1955) 408.
2. Gunion, M.W. and Taché, Y.: Intrahypothalamic microinfusion of corticotropin-releasing factor inhibits gastric acid secretion but increases secretion volume in rats. *Brain Res.*, **411** (1987) 156.
3. Saffran, M. and Schally, A.V.: The status of the corticotropin-releasing factor (CRF). *Neuroendocrinology*, **24** (1977) 359.
4. Yasuda, N., Greer, M.A. and Aizawa, T.: Corticotropin-releasing factor. *Endocrine Rev.*, **3** (1982) 123.
5. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J.: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, **213** (1981) 1394.
6. Rivier, C.L., and Plotsky, P.M.: Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adeno-hypophyseal hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.*, **48** (1986) 475.
7. Emeric-Sauval, E. Corticotropin-releasing factor (CRF) - a review. *Psychoneuroendocrinol.*, **11** (1986) 277.
8. Antoni, F.A.: Hypothalamic control of adrenocorticotropin-secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Rev.*, **7** (1986) 351.
9. Sawchenko, P.E.: Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res.*, **437** (1987) 253.
10. Sawchenko, P.E. and Swanson, L.W.: Localization colocalization and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Fed. Proc.*, **44** (1985) 221.
11. Fishman, A.J. and Moldow, R.L.: Extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactivity in the rat brain. *Peptides (Fayetteville)*, **3** (1982) 149.

12. Merchenthaler, I.: Corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides (Fayetteville)*, **5** (1984) 53.
13. Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Demura, H., Shizume, K., Mouri, T., Miura, Y. and Sasano, N.: Immunoreactive corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer and pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58** (1984) 919.
14. Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, H. and Shizume, K.: Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59** (1984) 861.
15. De Souza, E.B., Insell, T.R., Perrin, M.H., Rivier, J., Vale, W.W. and Kuhar, M.J.: Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographics study. *J. Neurosci.*, **5** (1985) 3189.
16. Wynn, P.C. Hauger, R.L. Holmes, M.C. Millan, M.A. Catt, K.J. and Aguilera, G.: Brain and pituitary receptors for corticotropin-releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. *Peptides*, **5** (1984) 1077.
17. Udelsman, R., Harwood, J.P., Millan, M.A., Chrousos, G.P., Goldstein, D.S., Zimlichmann, R. Cat, K.J. and Aguilera, G.: Functional corticotropin-releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature*, **319** (1986) 147.
18. Owens, M.J. and Nemeroff, C.B.: Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacological Rev.*, **43** (1991) 425.
19. Mouri, T., Itoi, K., Takahashi, K., Suda, T., Murakami, O., Yoshinaga, K., Andoh, N., Ohtani, H., Masuda, T. and Sasano, N.: Colocalization corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *Neuroendocrinology*, **57** (1993) 34.
20. Orth, D.N.: Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocrine Rev.*, **13** (1992) 164.
21. Britton, K.T., Lyon, M., Vale, W. and Koob, G.F.: Stress-induced secretion of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat cerebrospinal fluid. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **10** (1984) 94.

22. Chappell, P.B., Smith, M.A., Kilts, C.D., Bissette, G. Ritchie, J. Anderson, C. and Nemeroff, C.B.: Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J. Neurosci.*, **6** (1986) 2908.
23. Deutch, A.Y., Bean, A.J., Bissette, G., Nemeroff, C.B., Robbins, R.J. and Roth, R.H.: Stress-induced alterations in neurotensin, somatostatin and corticotropin-releasing factor in mesotelencephalic dopamine system regions. *Brain Res.*, **417** (1987) 350.
24. Owens, M.J., Bissette, G. and Nemeroff, C. B.: Acute effects of alprazolam and adinazolam on the concentrations of corticotropin-releasing factor in rat brain. *Synapse*, **4** (1989) 196.
25. Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W.: Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science*, **218** (1982) 377.
26. Ono, N., Samson, W.K., McDonald, J.K., Lumpkin, M.D., Bedran de Castro, J.C. and McCann, S.M.: Effects of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **82** (1985) 7787.
27. Nakane T., Audhya, T., Kanie, N. and Hollander, C.S.: Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing in cold, ether, immobilization and traumatic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (1985) 1247.
28. Linton, E.A., Tilders, F.J.H. Hodgkinson, S., Berkenbosch, F. Vermes, I. and Lowry, P.J.: Stress-induced secretion of adrenocorticotropin in rats is inhibited by administration of antisera to ovine corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Endocrinology*, **116** (1985) 966.
29. Rivier, J., Rivier, C. and Vale, W.: Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor effects on ACTH secretion in the rat. *Science*, **224** (1984) 889.
30. Conte-Devolx, B., Rey, M., Boudouresque, F., Giraud, P., Castanas, E., Millett, Y., Codaccioni, J.L. and Oliver, C.: Effects of 41-CRF antiserum on the secretion of ACTH, beta-endorphin and alpha-MSH in the rat. *Peptides*, **4** (1983) 301.

31. Rivier, C. and Vale, W.: Neuroendocrine interaction between corticotropin-releasing factor and vasopressin on adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat. In: Schrier, R.W. (Ed.): Vasopressin, Raven Press, New York, 1985, p.181.
32. Ono, N., Lumpkin, M.D., Samson, W.K., McDonald, J.K. and McCann, S.M.: Intrahypothalamic action of corticotropin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. *Life Sci.*, **35** (1984) 1117.
33. Veldhuis, H.D. and DeWied, D.: Differential behavioral actions of corticotropin-releasing factor (CRF). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **21** (1984) 707.
34. Dunn, A.J. and Berridge, C.W.: Corticotropin-releasing factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catecholaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **27** (1987) 685.
35. Insel, T.R., Aloji, J.A., Goldstein, D. Wood, J.H. and Jimerson, D.C.: Plasma cortisol and catecholamine responses to intracerebroventricular administration of CRF to rhesus monkeys. *Life Sci.*, **34** (1984) 1873.
36. De Souza, E.B. and Van Loon, G.R.: Corticotropin-releasing factor increases the adrenocortical responsiveness to adrenocorticotropin. *Experientia*, **40** (1984) 1004.
37. Ono, N., De Castro, J. C.B. and McCann, S.M.: Ultrashortloop positive feedback of corticotropin (ACTH)-releasing factor to enhance ACTH in stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (1985) 3528.
38. Calogero, A.E., Gallacci, W.T. Gold, F.W. and Chrousos, G.P.: Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion, potential clinical implications. *J. Clin. Invest.*, **82** (1988) 767.
39. Rivier, C. and Vale, W.: Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology*, **114** (1984) 914.
40. Taya, K. and Sasamoto, S.: Inhibitory effects of corticotropin-releasing factor and β -endorphin on LH and FSH secretion in the lactating rat. *J. Endocrinol.* **120** (1989) 509.

41. Katakami, H., Arimura, A. and Frohmann, L.A.: Involvement of hypothalamic somatostatin in the suppression of growth hormone secretion by central corticotropin-releasing factor in conscious male rats. *Neuroendocrinology*, **41** (1985) 390.
42. Rivier, C.L. and Vale, W.: Corticotropin-releasing factor (CRF) acts centrally to inhibit growth hormone secretion in the rat *Endocrinology*, **114** (1984) 2409.
43. Miskowiak, B., Janecki, A., Jakubowiak, A. and Limanowski, A.: Reproductive functions in the adult male rats after prolonged intraventricular administration of corticotropin-releasing factor (CRF). *Exp. Clin. Endocrinol.*, **88** (1986) 25.
44. Olster, D.H. and Ferin, M.: Corticotropin-releasing hormone inhibits gonadotropin secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65** (1987) 262.
45. Barbarino, A., De Marinis, L., Tofani, A. Della Cada, S. D'Amico, C. Mancini, A., Corsello, S.M., Sciuto, R. and Barini, A.: Corticotropin-releasing hormone inhibition of gonadotropin release and the effect of opioid blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **68** (1989) 523.
46. Rivier, C. and Vale, W.: Effects of the long-term administration of CRF on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rat. *J. Clin. Invest.*, **75** (1985) 689.
47. Vanvugt, D.A. Web M.Y. and Reid, R.R.: Naloxone antagonism of corticotropin-releasing hormone stimulation of prolactin secretion in rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **68** (1989) 1060.
48. Morel, G., Enjalbert, A., Proulx, L., Pelletier, G., Barden, N. Grossard, F. and Dubois, P.N.: Effects of corticotropin-releasing factor on the release and synthesis of prolactin. *Neuroendocrinology*, **49** (1989) 669.
49. Gambacciani, M., Yen, S.S.C. and Rasmussen, D.D.: GnRH release from the mediobasal hypothalamus: in vitro inhibition by corticotropin-releasing factor. *Neuroendocrinology*, **43** (1986) 533.

50. Petraglia, F., Supton, S., Vale, W. and Plotsky, P.: Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophyseal-portal circulation. *Endocrinology*, **120** (1987) 1083.
51. Rivier, C. and Vale, W.: Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **117** (1985) 2478.
52. Aguila, M.C. and McCann, S.M.: The influence of hGRF, CRF, TRH and LHRH release from median eminence fragments. *Brain Res.*, **348** (1985) 180.
53. Karlsson, A. and Ahren, B.: Effects of corticotropin-releasing hormone on insulin and glucagon secretion in mice. *Acta Endocrinol.*, **117** (1988) 87.
54. Dunn, A.J. and Kramarcy, N.R.: Neurochemical responses in stress: relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and acetylcholine systems. In: Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Snyder, S.H. (Eds.): *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 18, Plenum Press, New York, 1984, p. 455.
55. Mason, J. W.: Organisation of the multiple endocrine responses to avoidance in the monkey. *Psychosomat. Med.*, **30** (1968) 774.
56. Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W.: Stress-induced inhibition of reproductive functions role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science*, **231** (1986) 607.
57. Brown, M.R., Fisher, L.A. Rivier, J Spiess, J. Rivier, C. and Vale, W.: Corticotropin-releasing factor, effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. *Life Sci.*, **30** (1982) 207.
58. Brown, M.R. and Fisher, L.A: Central nervous system effects of corticotropin releasing factor in the dog. *Brain Res.*, **280** (1983) 75.
59. Brown, M.R., Fisher L.A., Spies, J., Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W.: Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*, **111** (1982) 928.
60. Fisher, L.A., Rivier, J. Rivier, C., Spies, J. Vale, W. and Brown, M.R.: Corticotropin-releasing factor (CRF): central effects on mean arterial pressure and heart rate in rats. *Endocrinology*, **110** (1982) 2222.

61. Groskreutz, C.L. and Brody, M.J.: Regional hemodynamics responses to central administration of corticotropin-releasing factor (CRF). *Brain Res*, **442** (1988) 363.
62. Kurosawa, M., Sato, A., Swenson, R.S. and Takahashi, Y.: Sympatho-adrenal medullary functions in response to intracerebroventricularly injected corticotropin-releasing factor in anesthetized rats. *Brain Res.*, **367** (1986) 250.
63. Fisher, L.A., Jessen, G. and Brown, M.R.: Corticotropin-releasing factor (CRF): mechanism to elevate mean arterial pressure and heart rate. *Regulat. Pept.*, **5** (1983) 153.
64. Brown, M.R. and Fisher, L.A.: Corticotropin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. *Fed. Proc.*, **44** (1985) 243.
65. Brown, M.: Corticotropin-releasing factor: central nervous system sites of action. *Brain Res.*, **399** (1986) 10.
66. Lenz, H.J., Burlage, M., Raedler, A. and Greeten, H.: Central nervous system effects of corticotropin-releasing factor on gastrointestinal transit in the rat. *Gastroenterology*, **94** (1988) 598.
67. Weis, J.M. and Simson, P.E.: Neurochemical and electrophysiological events underlying stress-induced depression in an animal model. In: Chrousos, G.P., Loriaux, D.L. and Gold, P.W. (Eds.): *Mechanisms of Physical and Emotional Stress*, Plenum Press, New York, 1988, p. 425.
68. Tahcé, Y., Maeda-Hagiwara, M. and Turkelson, C.M.: Central nervous system action of corticotropin-releasing factor to inhibit emptying in rats. *Am. J. Physiol.*, **253** (1987) G241.
69. Taché, Y., Goto, Y., Gunion, M.W., Vale, W., Rivier, J. and Brown, M.: Inhibition of gastric acid secretion in rats by intracerebral injection of corticotropin-releasing factor. *Science*, **222** (1983) 935.
70. Lanz, H.J., Leadler, A., Greeten, J., Vale, W.W. and Rivier, J.E.: Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology*, **95** (1988) 1510.
71. Williams, C.L., Peterson, J.M., Villar, R.G. and Burks, T.F.: Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress. *Am. J. Physiol.*, **253** (1987) G582.

72. Buéno, L. and Gué, M.: Evidence of the involvement of corticotropin-releasing factor in the gastrointestinal disturbances induced by acoustic and cold stress in mice. *Brain Res.*, **441** (1988) 1.
73. Gué, M., Fioramonti, J. and Buéno, L.: Comparative influences of acoustic and cold stress on gastrointestinal transit in mice. *Am. J. Physiol.*, **253** (1987) G124.
74. Berson, S.A. and Yalow, R.S.: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.*, **38** (1959) 1996.
75. Ekins, R.P.: The estimation of thyroxide in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta*, **5** (1960) 453.
76. Schurmeyer, T.H., Avgerinos, P.C., Gold, P.W., Gallucci, W.T., Tomai, T.P., Cuttler Jr., G.B., Loriaux, D.L. and Chrousos, G.P. Human corticotropin-releasing factor in man: pharmacokinetic properties and dose-response of plasma adrenocorticotropin and cortisol secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59** (1984) 1103.
77. Ellis, M.J., Livesey, J.H. and Donald, R.A.: Circulating plasma corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity. *J. Endocrinol.*, **117** (1988) 299.
78. Orth, D.N.: Adrenocorticotropic hormone (ACTH). In: Jaffe, B.M. and Behrman, H.R. (Eds): *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, ed 2, Academic Press, New York, 1979, p. 245.
79. Cunnah, D., Jessop, D.S., Besser, G.N. and Rees, L.H.: Measurement of circulating corticotropin-releasing factor in man. *J. Endocrinol.*, **113** (1987) 123.
80. Glowinski, J. and Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain - I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, **13** (1966) 655.
81. Beny, J.L. and Baerteschi, A.J. Corticotropin-releasing factor (CRF) secreted by rat median eminence in vitro in the presence or absence of ascorbic acid: quantitative role of vasopressin and catecholamines. *Endocrinology*, **109** (1981) 813.
82. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265.

83. Maser-Gluth, C. and Vecsei, P.: Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human 24h urine. *Clin. Endocrinol.*, **30** (1989) 405.
84. Linton, E.A. and Lowry, P.J.: Radioimmunoassay and chromatographic characterization of CRF-41-like immunoreactivity in hypothalami from several species. *Neuropeptides*, **3** (1982) 45.
85. Janáky, T., Tóth, G., Penke, B., Kovács K. and László, F.A.: Iodination of peptide hormones and purification of iodinated peptides. *J. Liquid Chromatography*, **5** (1982) 1499.
86. Morris, B.J.: Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. *Clin. Chim. Acta*, **73** (1976) 213.
87. Hertting, G., Axelrod, J., Kopin, I.J. and Whitby, G.L.: Lack of uptake of catecholamines after chronic denervation of sympathetic nerves. *Nature*, **189** (1961) 66.
88. Knapp, S. and Mandell, A.J.: Cocaine and lithium: neurobiological antagonism in the serotonin biosynthetic system in rat brain. *Life Sci.*, **18** (1976) 679.
89. Scheel-Krüger, J., Bastrup, C., Nielson, M., Golembrowska, K. and Mogilnicka, F.: Cocaine: discussion on the role of dopamine in the biochemical mechanism of action. In: Ellinwood, H.H. and Kilbey, M.M. (Eds.): *Advances in Behavioral Biology: Cocaine and other Stimulants*, Vol. 21, Plenum Press, New York, 1977, p. 373.
90. Liang, C.C. and Quastel, J.H.: Uptake of acetylcholine in rat brain cortex slices. *Biochem. Pharmacol.*, **18** (1969) 1169.
91. Flynn, D.D., Vaishnov, A.A. and Mash, D.C.: Interactions of cocaine with primary and secondary recognition sites on muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **41** (1992) 736.
92. Kalivas, P.W., Duffy, P.: Effects of daily cocaine and morphine treatment on somatodendritic and terminal field dopamine release. *J. Neurochem.*, **50** (1988) 1498.
93. Kalivas, P.W., Duffy, P., DuMars, C.A. and Skinner, C.: Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration on rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245** (1988) 485.

94. Kleven, M.S., Anthony, E.W. and Woolverton, W.L.: Pharmacological characterization of the discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254** (1990) 312.
95. Peris, J., Boyson, S.J., Cass, W.A., Curella, P., Dwoskin, L.P., Larson, G., Lin, L.H., Yasuda, R.P. and Zahniser, N.R.: Persistence of neurochemical changes in dopamine systems after repeated cocaine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253** (1990) 38.
96. Goeders, N.E.: Cocaine differentially affects benzodiazepine receptors in discrete regions of the rat brain: persistence and potential mechanisms mediating these effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259** (1991) 574.
97. Gordon, L.A., Mostofsky, D.I. and Gordon, G.G.: Changes in testosterone levels in the rat following intraperitoneal cocaine HCl. *Int. J. Neurosci.*, **11** (1980) 139.
98. Ravitz, A.J. and Moore, K.E.: Effects of amphetamine methylphenidate and cocaine on serum prolactin concentrations in the male rat. *Life Sci.*, **21** (1977) 267.
99. Steger, R.W., Silverman, A.Y., Johns, A. and Asch, R.H.: Interactions of cocaine and delta-9-tetrahydrocannabinol with the hypothalamic-hypophysial axis of the female rat. *Fert. Steril.*, **35** (1981) 567.
100. Dackis, C.A. and Gold, M.S.: New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **9** (1985) 469.
101. Hanson, G.R., Swiley, P., Johnson, M., Letter, A., Bush, L. and Gibb, J.W.: Response by the neurotensin systems of the basal ganglia to cocaine treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **160** (1989) 23.
102. Gawin, F.H. and Kleber, H.D.: Neuroendocrine findings in chronic cocaine abusers: a preliminary report. *Br. J. Psychiatry*, **147** (1985) 569.
103. Sarnyai, Z., Vecsernyés, M., Julesz, J., Szabó, G. and Telegdy, G.: Effects of cocaine and pimozide on plasma and brain alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in rats. *Neuroendocrinology*, **55** (1992) 9.

104. Dunn, A.J. and Berridge, C.W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses. *Brain Res. Rev.*, **15** (1990) 71.
105. Moldow, R.L. and Fischman, A.J.: Cocaine induced secretion of ACTH, beta-endorphin and corticosterone. *Peptides*, **8** (1987) 819.
106. Heffner, T.G., Zigmond, M.J. and Stricker, E.M.: Effects of dopaminergic agonists and antagonists of feeding in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **201** (1977) 386.
107. Lin, Y., Morrow, T.J., Kiritsy-Roy, J.A., Terry, L.C. and Casey, K.L.: Cocaine evidence for supraspinal, non-opiate analgesia. *Brain Res.*, **479** (1989) 306.
108. Post, R.M., Weiss, S.R.D., Pert, A. and Uhde, T.W.: Chronic cocaine administration: sensitization and kindling effects. In: Fischer, S., Raskin A. and Uhlenhuth, E.H. (Eds.): *Cocaine: Clinical and Biobehavioral Aspects*, Oxford University Press, New York, 1987, p. 109.
109. Rivier, C. and Vale, W.: Cocaine stimulates adrenocorticotropin (ACTH) secretion through a corticotropin-releasing factor (CRF) mediated mechanism. *Brain Res.*, **422** (1987) 403.
110. Sarnyai, Z., Bíró, É., Penke, B. and Telegdy, G.: The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone in mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. *Brain Res.*, **589** (1992) 154.
111. Watzl, B. and Watson, R.R.: Minireview: Immunomodulation by cocaine - A neuroendocrine mediated response. *Life Sci.*, **46** (1990) 1319.
112. Yang, X.M., Gorman, A.L., Dunn, A.J. and Goeders, N.E.: Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **41** (1992) 643.
113. Sarnyai, Z., Höhn, J., Szabó, G. and Penke, B.: Critical role of endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in the mediation of the behavioral action of cocaine in rats. *Life Sci.*, **51** (1992) 2019.
114. Calogero, A.E., Galluci, W.T., Kling, M.A., Chrousos, G.P. and Gold, P.W.: Cocaine stimulates rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res.*, **505** (1989) 7.

115. Goeders, N.E., Bienvenu, O.J. and De Sousa, E.B.: Chronic cocaine administration alters corticotropin-releasing factor receptors in the rat brain. *Brain Res.*, **531** (1990) 322.
116. Rivier, C. and Lee, S.: Stimulatory effect of cocaine on ACTH secretion: role of hypothalamus. *Mol. Cell. Neurosci.*, **5** (1994) 189.
117. Palkovits, M. and Brownstein, M.J.: Microdissection of brain areas by the punch technique. In: Cuello, A.D. (Ed.): *Brain Microdissection Techniques*, Wiley, New York, 1983, p. 1.
118. Lee, E.H.Y. and Tsai, M.J.: The hippocampus and amygdala mediate the locomotor stimulating effects of corticotropin-releasing factor in mice. *Behav. Neural. Biol.*, **51** (1989) 412.
119. Nemeroff, C.B.: New vistas in neuropeptide research in neuropsychiatry: focus on corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology*, **6** (1992) 69.
120. Sarnyai, Z., Bíró, É., Gardi J., Vecsernyés M., Julesz, J., Penke, B. and Telegdy, G.: Corticotropin-releasing factor (CRF) as an endogenous mediator of the behavioral and neuroendocrine actions of cocaine in rat. Abstract of the Hans Selye Symposia on Neuroendocrinology and Stress, CRF and Cytokines: Role in Stress Responses. Montreal, Canada, 1992, p. 13.
121. Gawin, F.H. and Ellinwood, E.H.: Cocaine dependence. *Annu. Rev. Med.*, **40** (1989) 149.
122. Davis, M.: The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton, J. (Ed.): *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*, Wiley, New York, 1992, p. 255.
123. Liang, K.C., Melia, K.R., Campeau, S., Falls, W.A., Miserendino, M.J.D. and Davis, J.: Lesions of the central nucleus of the amygdala but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.*, **12** (1992) 2313.
124. Liang, K.C., Melia, K.R., Miserendino, M.J.D., Falls, W.A., Campeau, S. and Davis, M.: Corticotropin-releasing factor: long-lasting facilitation of the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.*, **12** (1992) 2303.

125. Rassnick, S., Heinrichs, S.C., Britton, K.T. and Koob, G.F.: Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res.*, **605** (1993) 25.
126. Merlo-Pich, E., Koob, G.F., Heilig, M., Menzaghi, F., Vale, W., and Weiss, F.: Corticotropin-releasing factor release from the mediobasal hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Neuroscience*, **55** (1993) 95.
127. Javaid, J.L. and Davis, J.M.: Cocaine disposition on discrete regions of rat brain. *Drug Disposit.*, **14** (1993) 357.
128. Koegler-Muly, S.M., Owens, M.J., Ervin, G.N., Kilds, C.D. and Nemeroff, C.B.: Potential corticotropin-releasing factor pathways in the rat brain as determined by bilateral electrolytic lesions of the central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, **5** (1993) 95.
129. Sawchenko, P.E.: Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. *J. Neurosci.*, **7** (1987) 1093.
130. Haas, D. and George, S.R.: Single and repeated mild stress increases synthesis and release of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Brain Res.*, **461** (1988) 230.
131. Inoue, T., Koyama, T., Muraki, A. and Yamashita, I.: Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentration in discrete rat brain regions. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.*, **17** (1993) 161.
132. Merlo-Pich, E., Koob, G.F., Sattler, S.C., Menzaghi, F., Heilig, M., Heinrichs, S.C., Vale, W. and Weiss, F.: Stress-induced release of corticotropin-releasing factor in the amygdala measured by in vivo microdialysis. *Soc. Neurosci. Abstr.* **18** (1992) 225.17.
133. Moldow, R.L., Kastin, A.J., Graf, M. and Fischman, A.J.: Stress mediated changes in hypothalamic corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity. *Life Sci.*, **40** (1987) 413.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megköszönöm a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratórium, valamint a Kóréletteni Intézet vezető professzorainak, Dr. Szarvas Ferenc és Dr. Julesz János egyetemi tanároknak, és Dr. Telegdy Gyula akadémikus úrnak, hogy az intézetekben folyó kutatómunka keretén belül az értekezésem elkészítéséhez szükséges feltételeket biztosították és munkámat segítették.

Köszönettel tartozom Dr. Faredin Imre egyetemi tanárnak és Dr. Tóth István tudományos tanácsadónak, hogy hasznos tanácsokkal láttak el, és a disszertáció megírásához segítséget nyújtottak.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Vecsernyés Miklós tudományos munkatársnak, hogy pályakezdő koromtól kezdve a laboratóriumi munkákba bevezetett, a radioimmunoassay elméleti és gyakorlati tudnivalóit megismertette velem, és közvetlen munkatársként mindvégig segítségemre volt munkámban.

Köszönetet mondok a SZOTE Kóréletteni Intézet valamennyi dolgozójának, akik munkámat kooperációs együttműködésükkel segítették: Dr. Sarnyai Zoltán és Dr. Bíró Éva egyetemi tanársegédeknek.

Köszönöm Pamuk Józsefné és Ádok Róbertné asszisztensek értékes közreműködését.

Köszönetemet fejezem ki Tánczos Zsuzsannának a gondos szövegszerkesztési munkák elvégzéséért.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Paul Vecseinek, hogy biztosította számomra a CRF-antiszérumot.

Külön mondok köszönetet a "Magyar Tudományért" Alapítványnak a disszertáció megírásához nyújtott anyagi támogatásáért.

