

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Biológia Intézet, Ökológia Tanszék

**Szintetikus cathinonok ("designer drogok") hatása a tanulásra és a korai
neurogenезisre**

Készítette: Zsedényi Csilla Karina

Témavezető: Dr. Ádám Ágota, tudományos munkatárs
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet

Belső konzulens: Dr. Kabai Péter, egyetemi docens
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Ökológiai Tanszék

Budapest

2012

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzék	4
Bevezetés	5
1. Szintetikus cathinonok, mint designer-drogok	7
2. Madármodellek	7
2.1. <i>A madármodellek használata a központi idegrendszeri és az embriológiai kutatásokban</i>	7
2.2. <i>Az addikció és idegrendszeri alapja</i>	9
2.3. <i>A passzív ízelkerüléssel tanulás</i>	9
2.4. <i>A passzív ízelkerüléssel tanulásban résztvevő agyterületek és a memória kialakulásának folyamata</i>	10
2.5. <i>Distress Call</i>	11
3. Neurogenesis	12
Célkitűzések	13
Anyagok és módszerek	14
1. A mephedron neurogenesisre gyakorolt hatásának vizsgálata neuroanatómiai módszerekkel	14
1.1. <i>Embriónális és poszt-embriónális kezelés</i>	14
1.2. <i>Fénymikroszkópos immunhisztokémia</i>	14
2. A szintetikus cathinonok viselkedésére gyakorolt hatásának vizsgálata	15
3. A striatummal kapcsolatos tanulási képességek vizsgálata a passzív elhárító tanulás módszerével	16
Eredmények	17
1. A mephedron neurogenesisre gyakorolt hatása	17
2. A mephedron hatása a viselkedésre	19
2.1. <i>Distress call</i>	19
2.2. <i>Mephedron és butylon összehasonlítása</i>	21
3. A mephedron hatása a tanulási képességekre	21
Megbeszélés	22
Összefoglaló	24
Summary	25

Irodalomjegyzék	26
Köszönetnyilvánítás	32

Rövidítések jegyzéke

Ac – nucleus accumbens
DA – dopamin
DC – distress call
GABA - γ -amino-vajsav
LSt – lateralis striatum
MeA – metilantranilát
MSt – medialis striatum
NCAM – neurális-sejt adhéziós molekula
NgCAM – neurális-glia sejt adhéziós molekula
NGS – normál kecskeszérum
NMDA – N-metil-D-aszpartát
NPY – neuropeptid-Y
NO – nitrogén-monoxid
PAL – passzív elhárító (ízelkerüléses) tanulás
PB – foszfát puffer
PBS – foszfát puffer és sóoldat
VTA – ventral tegmental area
VL – ventriculus lateralis

Bevezetés

1. Szintetikus cathinonok mint "designer drogok"

A szintetikus pszichoaktív szereknek egy olyan csoportját, amelyek farmakológiailag és szerkezetileg is nagyon hasonlóak egy kábítószerként nyilvántartott vegyülethez „designer drogként”, vagy a köznyelvben „party-drogként” ismernek. Ezek a szerek könnyen beszerezhetőek az Internet adta lehetőségek által, így rohamosan terjednek, hatásukról azonban ez idáig csak nagyon kevés állatkísérletes eredmény, ill. humán vizsgálati adat áll rendelkezésre (Karila és Reynaud, 2011). Mindemellett a rendelkezésre álló adatok is többnyire kérdőíves felmérésekből, a szert használók saját bevallásán alapuló vizsgálatokból származnak.

A mefedron nevű szer, amit a köznyelvben 'Kati', 'miáú-miáú', 'növénytápszer' és 'fürdősó' néven ismernek a 2010-es év legnépszerűbb designer drogja volt (EMCDAA = European Monitoring Centre for Drugs and Addiction, 2010). 2011-ben a marihuána (cannabis), az extasy és a kokain után a negyedik leggyakrabban használt party-drog. (EMCDAA, 2011). Annak ellenére, hogy a szer 2011. január 1-től Magyarországon is az illegális szerek listájára került, továbbra is könnyen hozzáférhető az Internet által biztosított illegális online piacon; a mefedront árusító oldalakon 'növénytápszer' vagy 'fürdősó'-ként bárki számára könnyedén beszerezhető (Winstock és mtsai, 2010; Tóth és mtsai, 2011). A mefedron (4-methylmethcathinone) egy olyan szintetikus előállított farmakológiailag aktív cathinon, amely szerkezetileg hasonló a methcathinonhoz, az Afrikában őshonos khat cserjéből (*Catha edulis*) nyerhető aktív alkaloidhoz (Wood és mtsai, 2010). Az utóbbi időben a szerrel való visszaélés drámaian növekedett, ezáltal jelentős közegészségügyi problémává vált Európa-szerte és az USA-ban is. A helyzet súlyosságát bizonyítja, hogy több, a mefedronhoz köthető haláleset történt külföldön (Gustavson és mtsai, 2009; Wood és mtsai, 2010), majd a 2012-es év folyamán Magyarországon is, amelyet a Híradó és napilapok is közöltek.

Freeman és munkatársai, akik a mefedron által kiváltott pszichoaktív hatásokat, és a különböző viselkedési elváltozásokat kutatták, azt találták, hogy a mefedron nagy dózisu használata memóriakárosító hatással bír, miközben serkentő/élénkítő hatást vált ki a fogyasztójából (Freeman és mtsai, 2012). Az eddig elkészült tanulmányok súlyos

kardiovasculáris és neurotoxikus mellékhatásokat írtak le, amelyek szintén a mefedron használatával hozhatók összefüggésbe (James és mtsai, 2010; Maskell és mtsai, 2011; Wood és mtsai, 2010, 2011). Ezen kívül sok enyhébb mellékhatást is felsorol több szerző, akik önkéntes kérdőív-kitöltésen alapuló vizsgálatokat végeztek. A leggyakoribb mellékhatások közt említhető a túlzott izgatottság, az izzadás, a hányinger, akaratlan rágómozgások miatt a száj sebesre rágása (Wood és mtsai, 2012). Nyilvánvaló az agyat károsító hatás a fiatal felnőttek körében, továbbá a droghasználók jelentős része fogamzó képes fiatal nő, így az is belátható, hogy a mefedron potenciális veszélyt jelent a növekedő embrióra is.

A mefedron egy központi idegrendszer stimuláns, amely hatását azáltal feje ki, hogy a monoamin neurotranszmitterek felszabadulását serkenti, majd gátolja azok visszavételét (Feyissa és Kelly, 2008; Hadlock és mtsai, 2011; Schifano és mtsai, 2011), így a fogadó neuronok tovább maradnak aktív állapotban. Ez a serkentő hatás hasonló az amfetamin-szerű pszicho-stimulánsokéhoz is, mint amilyen például az extasy (3,4 methylene-dioxy-methamphetamine, MDMA) (Winstock és mtsai, 2010; Brunt és mtsai, 2011). Egy nemrég elkészült tanulmány kimutatta, hogy a mefedron növeli az extracelluláris dopamin és 5-HT szintet patkány telencephalon nucleus accumbens-ében (Kehr és mtsai, 2011). Baumann és társai azt találták, hogy a mefedron az agy monoamin transzportereire gyakorol hatást, és az MDMA-hoz hasonló módon transzmitter-felszabadító hatással bír (Baumann és mtsai, 2011). A mefedron és a methylon dopaminerg hatása magyarázhatja az addiktív potenciáljukat, de ez a hipotézis még megerősítésre vár.

Miután 2011-ben a legtöbb országban a mefedront betiltották, alternatív változatai, mint a butylon (MBDB, N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine hydrochloride), methylon (β k-MDMA, 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone), MDPV (3,4-methylenedioxypropylone) jelent meg a piacon. Az EMCDA tanulmánya alapján 2010-ben a 40 újonnan megjelent pszichoaktív szerből 15 bizonyult cathinone származéknak, vagy azok izomerjeinek (*1. ábra*).

Jelen vizsgálatban a felsorolt szintetikus cathinonok közül a mefedron neurogenesisre, majd a tanulási képességekre való hatását, valamint a mefedron és a butylon viselkedésre gyakorolt hatásait vizsgáltuk.



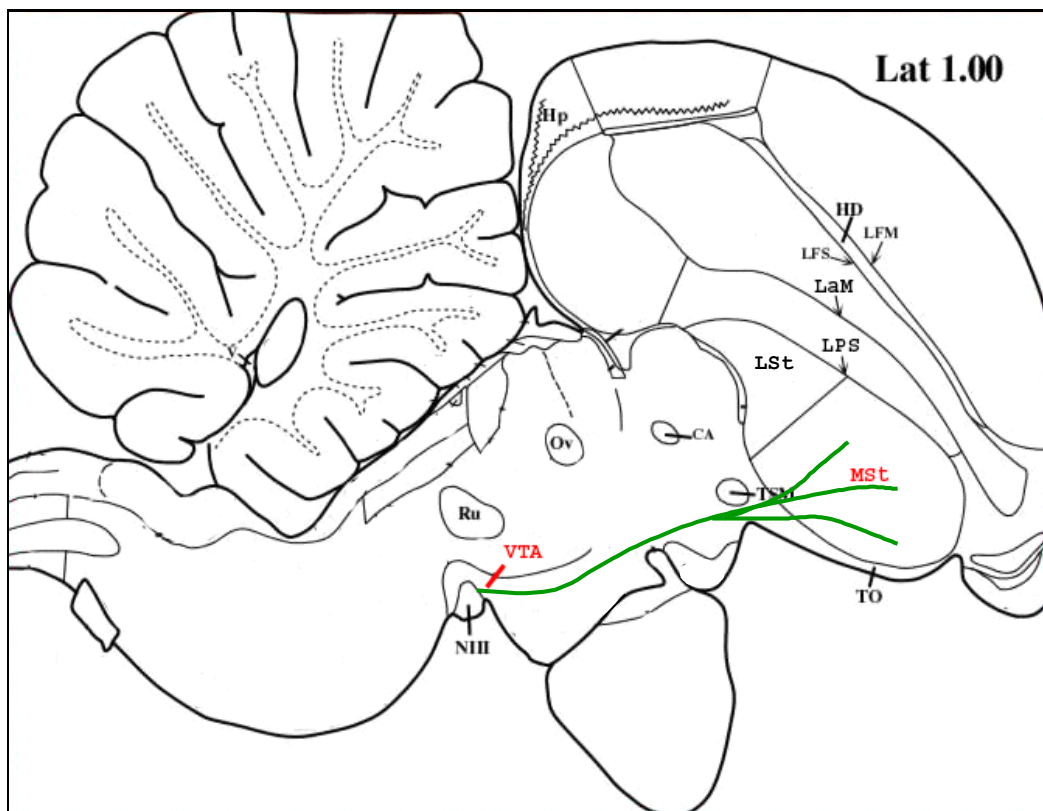
1. ábra: Az extasy, a metamfetamin, és a szintetikus cathinonok kémiai szerkezete, ill. a mefedron kereskedelmi forgalomba hozott formái: kapszula, növénytápszer, kristály.

2. Madármodellek

2.1. A madármodellek használata a központi idegrendszeri és az embriológiai kutatásokban

Az emlősök mellett a madarak rendelkeznek a legfejlettebb agyi struktúrával, s bár fejlődésük eltérően zajlott, így szerveződésében sok mindenben különbözik a két rendszer; mégis az egyes funkciókhoz köthető struktúrák megfeleltethetők az emlősökben leírtaknak. A madarak agya nem rendelkezik rétegzett kéreggel, mint az emlősöké, de a magas szintű vizuális képességek, valamint bizonyos fajok esetében (pl. a papagájok) a fejlett asszociációs képességek alapján elmondható, hogy a madár telencephalon is képes ugyanolyan magas szintű funkciókat ellátni, mint az emlősé. A madarak előagyában viszonylag jól körülhatárolt magok látják el azokat a funkciókat, amelyeket az emlősök agyában a rétegesen szerveződött kéreghez köthetők.

A házicsirke ill. naposcsirke kísérleti állatként való alkalmazása számos előnnyel jár: a tojás könnyen manipulálható; az embrió aktuális fejlettségi stádiuma – a keltetés kezdeti időpontját ismerve – teljes biztonsággal megállapítható; az anyai hatás – mint a méhlepény áteresztő képessége, vagy az anya egyedi drogérzékenysége – teljesen kiküszöbölhető; fészekhagyó madár lévén az egyed viszonylag fejlett, de még meglehetősen plasztikus az idegrendszere, mutatja a felnőtt állat viselkedési formáinak jelentős részét, de az állat korábbi élete során szerzett tapasztalati nem befolyásolják a viselkedését. A naposcsirkére kidolgozott tanulási modellek idegi háttere jól ismert, ezáltal az esetleges hatások agyi háttere jól körülírható. A madármodellek használatának további előnye, hogy a drog által kifejtett embrionális- és posztembrionális hatás egymással jól összevethető.



2. ábra: A madár jutalmazásos tanulásban és addikcióban szerepet játszó mesolimbikus rendszerének sematikus rajza. Az area ventralis tegmentalisból (VTA) kiinduló dopaminerg neuronok a medialis striatum területére projicionálnak (MSt). Rövidítések: CA = commissura anterior, Hp = hippocampus, HD = hyperpallium densocellulare, LaM = lamina mesopallialis, LFM = lamina frontalis suprema, LFS = lamina frontalis superior, LSt = lateralis striatum, N III. – nervus oculomotorius, Ov = nucl ovoidalis, Ru = nucl. ruber, TO = tuberculum olfactorium, TSM = tractus septomesencephalicus.

2.2. Az addikció és idegrendszeri alapja

A középagy area ventralis tegmentalis és a nucleus accumbens (Ac) – mint a ventorbasalis előagy része – közötti összeköttetést létesítő mesolimbikus dopaminerg (DAerg) pálya a jutalmazási rendszer alapvető komponense (2. ábra). Ez a pályarendszer közvetíti a kokain, a heroin, vagy az alkohol addiktív hatásait (Wise és Bozarth 1982, Di Chiara és Imperato 1988, Samson és Harris 1992); a viselkedés pozitív megerősítése által. Az addikció alapja a jutalmazási rendszer félresiklása, melynek hatására az egyed kényszeresen végrehajt egy bizonyos cselekvést, - még akkor is, ha az negatív következményekkel jár - amelyet megerősítés, azaz jutalom kísér.

A függőséget okozó drogok többsége DA felszabadulást vált ki a Ac-ben (Imperato és mtsai 1986, Pidoplichko és mtsai 1997), amely a DA addikcióban betöltött szerepére utal. A DA további jelentőséggel bír bizonyos tanulási folyamatokban (Schultz és mtsai 1997, Schultz 2002) és pszichoaktív szerek kényszeres használatában is (Philips és mtsai 2003).

2.3. A passzív ízelkerüléssel tanulás

A naposcsibék spontán rácsípnek mindenre, ami bizonyos mérethatárok között mozog (kritikus periódus 2-7 nap). Így tanulják meg azt, hogy mi ehető és mi az, amit el kell kerülniük. Ezt nevezzük passzív elhárító (vagy ízelkerüléssel) tanulásnak (Passive Avoidance Learning = PAL), amely egy korai bevésődéssel tanulási forma. Ennek mintájára dolgozta ki A. Cherkin a PAL paradigmáját (Cherkin, 1969), amelyet a mai napig is használunk laboratóriumi tesztek során, némi változtatással, melyek S.P. Rose nevéhez fűződnek (Rose, 1991).

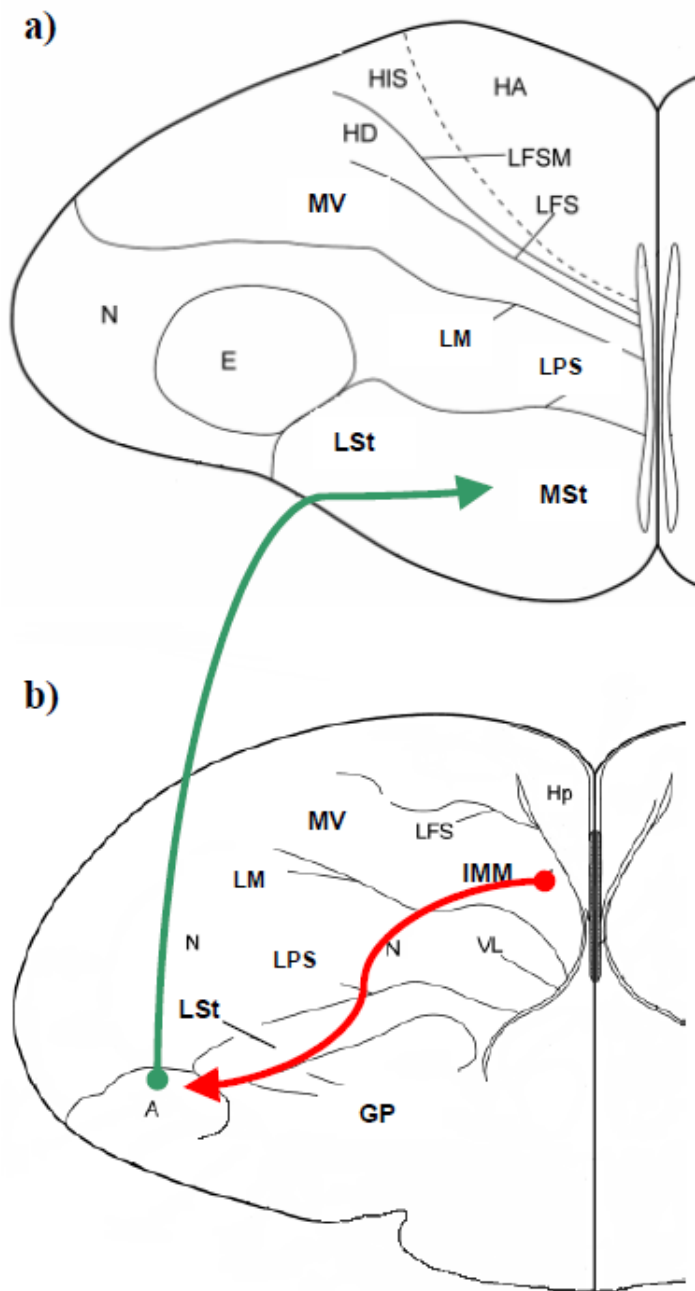
A laboratóriumi kísérlet során a naposcsirkéknek olyan gyöngyöt kínálunk fel, amely egy nagyon kellemetlen, keserű ízű anyagba, metilantranilátba (MeA) van mártva. A csirke rácsíp a gyöngyre, majd jellegzetes undorreakciót mutat: hátrál, miközben rázza a fejét, lábával csőréről igyekszik lekaparni a kellemetlen ízt okozó anyagot, esetleg a földre vagy falba törli csőrét. Ez az egy próba elég ahhoz, hogy a vizuális stimulus és a rossz íz között kialakuljon az asszociáció, és megtanulja szelektíven elkerülni az adott színű gyöngyöt, azaz többé nem csíp rá. Ha újra találkozik hasonló kinézetű tárggyal, tartózkodik a csípéstől, és gyakran az undorreakció bizonyos elemeit mutatja, elsősorban hátrál (Johnston és Burne, 2008).

A teszt előnye, hogy az állat természetes viselkedésén alapul; az asszociáció napokig fennmarad, a memórianyom előhívható (Gibbs és mtsai, 2008); továbbá a kísérlet egyszerűen, gyorsan végrehajtható; és jól reprodukálható. A tanulási folyamat hatására a különböző agyterületeken végbemenő változások azonnal nyomon követhetők, időben szinte teljesen pontosan detektálhatók, ezért a memória kialakulásának folyamatáról releváns információt szerezhetünk (Rose, 2000).

2.4. A passzív ízelkerüléssel tanulásban résztvevő agyterületek és a memória kialakulásának folyamata

A passzív ízelkerüléssel tanulásban résztvevő három fő agyi régió: az intermedialis medialis mesopallium (IMM), az amygdaloid arcopallium és a medialis striatum (MSt). Rose és Csillag (1985) az agy különböző területeinek aktivitás változásainak vizsgálata során jelentős molekulaszintű változásokat figyeltek meg az IMM és MSt régiókban a tanulást követően.

A PAL során létrejövő memórianyom kialakulásának folyamata élettani, biokémiai és morfológiai változások alapján időben három szakaszra különíthető el (áttekintő irodalom: Rose és mtsai, 1999). A rövidtávú memória kialakulása során magasabb glutamát (Glu) transzmisszó (Daisley és mtsai, 1994), NMDA receptor kötése erősség növekedés, GABA transzmisszió csökkenés, Ca^{++} -beáramlás, NO átvitel és emelkedett plazma kortikoszteron-szint figyelhető meg. Tehát tranziens szinaptikus események és membránhoz kapcsolt folyamatok bekövetkezésére van szükség a memórianyom kialakulásához, amely a tanulási folyamatot követő 5 – 10 percen keresztül tárolja az információt (Sandi és mtsai, 1994a, 1994b). A tanulást követő 15 - 55 perces (középtávú memória) időtartam alatt beindul azon gének aktivációja, melyek géntermékei a *de novo* képződött fehérjék és elindítják a hosszú távú memória kialakulásához szükséges fehérjeszintézis második hullámát (pl. NCAM és NgCAM szintézis) (Scholey és mtsai, 1993; 1995). Ez fogja a továbbiakban az alapját képezni a neurális hálózat hatékonyság növelésének, a már meglévő szinapszisok megerősödésének és új szinaptikus kapcsolatok létrejöttének is (Ng és Gibbs, 1991), melyek feltehetően a memórianyomok hosszabb ideig való tárolásának morfológiai hátterét biztosítják (3. ábra). A PAL-t követő szignifikáns DA D1-receptor kötődés a DA közvetlen szerepére utal (Stewart és mtsai, 1996).



3. ábra. A passzív ízelkerüléses tanulás tanulásban részt vevő főbb agyterületek elhelyezkedése és az intermedialis-medialis-mesopallium – arcopallium – medialis striatum kapcsolatrendszerének házicsirkében. (A = arcopallium, E = entopallium, GP = globus pallidus, HA = hyperpallium apicale, HD = hyperpallium densocellulare, HIS = hyperpallium intercalatum, Hp = hippocampus, IMM = intermedialis medialis mesopallium, LFS = lamina frontalis superior, LFSM = lamina frontalis suprema, LM = lamina mesopallialis, LPS = lamina pallio-subpallialis, LSt = lateralis striatum, MSt = medialis striatum, MV = mesopallium ventrale, N = nidopallium, VL = ventriculus lateralis.

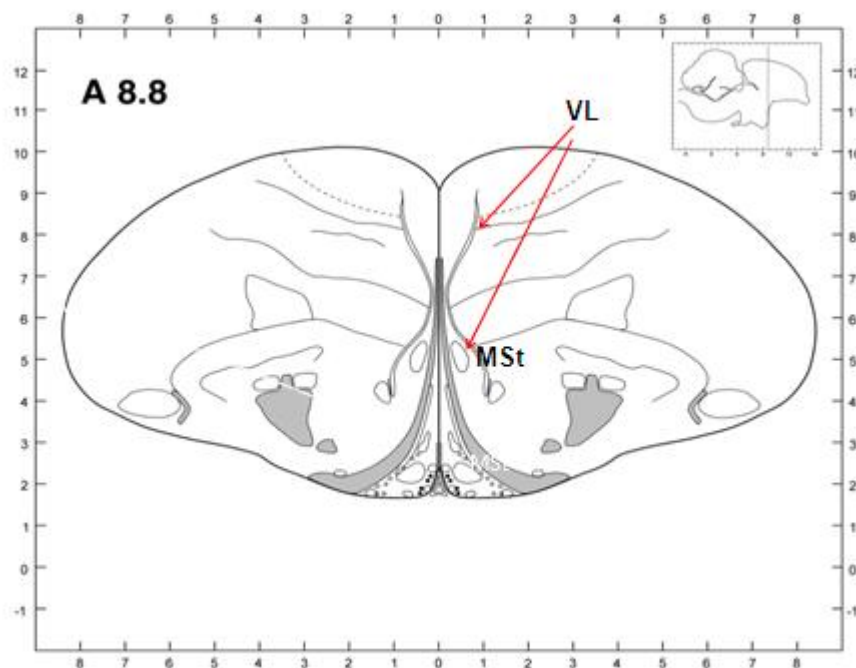
2.5. Distress Call

A szociális izoláltság vész hívások ún. distress call (DC) hallatására ösztönzi a neonatális egyedeket több emlős- és madárfajban, így a házicsirkében is. A fajtársaktól, szülőktől való izoláltság az utódok számára ijesztő - azaz stressz-indikátor -, mert azon túl, hogy könnyen prédává válhatnak, alapvető igényüket sem tudják kielégíteni (táplálék,

megfelelő hőmérséklet, stb.). A vészhívások megszámlálásával információt nyerhetünk az egyed stressz-tűrő képességéről. Az stressz tűrő képességet különböző – az adott vizsgálatnak megfelelő - szerekkel befolyásolni lehet, melyek hatása laboratóriumi körülmények között jól mérhető (Matthew és mtsai, 2002; Winslow és mtsai, 1991).

3. Neurogenesis

Az embrionális fejlődés során a csirke telencephalon fejlődése a negyedik és a kilencedik nap között történik, ám a struktúrák kialakulása időben nem egyenletes. Az agy bizonyos régióinak sejtjei egy nap alatt fejlődnek ki, míg más területek kialakulásához több napra van szükség. Jelen dolgozatban vizsgált agyi régió, a MSt neuronjai az embrionális fejlődés 6. és 10. napja közt differenciálódnak, a keletkezésük csúcsa a 8. és 9. napon van (Tsai és mtsai, 1981). Az újonnan keletkező neuronok a ventriculus lateralis mellett, az ún. subventricularis zónában képződnek (4. ábra).



4. ábra: A csirke telencephalon subventrikularis zónájának sematikus ábrája.

MSt = medialis striatum, VL = ventriculus lateralis.

Újabban kimutatták, hogy a methamphetaminnak negatív hatása van a neurogenesisre korai posztnatális egerekben vizsgálva (Bento és mtsai, 2011). A methamphetamin

neurotoxikus dózisa striatális neuron vesztését okoz. Mindazonáltal, felnőtt egerekben a methamphetamin indukált apoptózis hatására elvesztett neuronok helyét azonnal újonnan keletkező neuronok vették át (Tulloch és mtsai, 2011.b). 24-48 órával az akut neurotoxikus dózisú methamphetamin használat után az egerek striatumában spontán új sejtek keletkeznek. Dopamin előkezelés hatására a D1 receptor antagonistá megszüntette a citogenezist (Tulloch és mtsai, 2011.a).

A proliferáló neuronokat jelzett nukleozid bromo-deoxy-uridin (BrdU) beépülése alapján láthatóvá tehetjük, kihasználva az uridinnak azt a tulajdonságát, hogy beépül a keletkező sejtek DNS-ébe (a timidint helyettesíti) (Miller és mtsai, 1988).

Célkitűzések

Jelen dolgozatban a vizsgálat fő céljával a „designer-drogok” agyfejlődésre gyakorolt, valamint neurotoxikus hatásainak megismerését tűztük ki. Az adatok gyűjtéséhez elsősorban madár modellrendszer, közelebbről a házi csirke (*Gallus domesticus*) - mint vizsgált állat - segítségével elvégzett különböző kísérleti megközelítéseket alkalmaztunk.

Kérdéseink a következők voltak:

1. Milyen hatásuk van ezeknek a drogoknak a fejlődő embrióra, különös tekintettel a neurogenezisre?
2. Milyen viselkedési hatásokat fejtenek ki a cathinonok családjába tartozó designer drogok?
3. Hogyan befolyásolják ezek az ágensek a striatummal kapcsolatos tanulási képességet?

Anyagok és módszerek

A dolgozatban szereplő kísérletet a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa (22.1/3453/003/2009-es számú határozata) és a Budapest Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás állatkísérleti engedélyével az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény (243/1998) 32. § (3) alapján folytattuk.

1. A mefedron neurogenesisre gyakorolt hatásának vizsgálata neuroanatómiai módszerekkel.

Jelen kísérletben megvizsgáltuk a házicsirke striatum ill. pallium régióiban a BrdU pozitív idegelemek eloszlását konfokális mikroszkópiával, majd elvégeztük a jelölt sejtek kvantitatív elemzését torzítatlan sztereológiai módszer segítségével.

1.1. Embriionális és poszt-embriionális kezelés:

A kísérlethez 90 db termékenyített tyúktojást használtunk (Bábolna), melyeket helyben keltettünk ki keltetőgéppel. A tojások légkamrájába a 6. ill. a 10. keltetési napon mefedront (2 mg/tojás kg fiziológiás sóoldatban, *in ovo*) injektáltunk. Kontrollként azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk. A kezelési csoportok elkülönítésére a 12. keltetési napon ételfestéket injektáltunk a belső héjhártya alá. A továbbiakban a keltetés zavartalan lefolyását biztosítottuk.

A kelés utáni első napon a vizsgált egyedekbe *i. p.* 0,1 mg/ttg. (5 mg/csirke) BrdU-t fecskendeztünk (fiziológiás sóoldatban), majd a kezelést követő második napon transzkardiálisan perfundáltuk őket.

1.2. Fénymikroszkópos immunhisztokémia:

A naposcsirkéket ketaminnal és xylazinnal történő mélyaltatás után transzkardiálisan perfundáltuk 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M Na-foszfát pufferrel (PB, pH: 7,4). Az agyat a koponyából eltávolítottuk, majd egy éjszakán át 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M PB-ben utófixáltuk.

Vibratómmal 60 µm vastagságú coronalis metszeteket készítettünk. A szabadon úszó metszeteket 4x10 percig sóoldatot tartalmazó foszfát pufferben (PBS) átmostuk, majd sósavval (3N HCL, desztillált vízben) 30 percig kezeltük. Ezt követően újra PBS-ben 3x10 percig mostuk, majd 1% normál kecskeszérummal (NGS; PBS-ben 30 percig, szobahőmérsékleten) történő kezelés után egérben termeltetett anti-BrdU antitesttel (*Sigma*; 1:300 hígítás; 0,1 % Triton-X-et és 1% NGS-t tartalmazó PBS-ben) - pár órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 1 éjszán át 4°C-on – inkubáltuk. A következő napon újbóli PBS-sel (4x10 perc) történő átmosás után 3 órán át Alexa 488 anti-egér szekunder antitesttel (*Molecular Probes*; Eugene, OR; 1:250 hígítás, PBS-ben) kezeltük. Végül az így kezelt metszeteket 3x10 percig PBS-ben átmostuk. Ezután a metszeteket tárgylemezre húztuk és PBS:glicerín 1:1 arányú keverékével fedtük le.

A jelölt sejteket konfokális mikroszkópiával (Bio-Rad Rainbow 2000 konfokális lézer scanning mikroszkóp) vizsgáltuk. Az immunreaktív sejtmagokat manuálisan számoltuk meg a kiválasztott régióról készült egymást követő optikai felvételeken, ImageJ program segítségével. A kapott értékek statisztikai elemzésére Wilcoxon-tesztet használtunk, amelyet SPSS 10.0 szoftver segítségével hajtottunk végre.

2. A szintetikus cathinonok viselkedésre gyakorolt hatásának vizsgálata

A vizsgálathoz 40 db 1 napos házicsirkét használtunk. Az állatokat a kísérlet kezdetéig párosával nyitott tetejű dobozokban helyeztük el. A vizsgálatot két részben hajtottuk végre. Először a mephedrone, majd a butylone hatásait vizsgáltuk. Mindkét esetben kontrollként fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk.

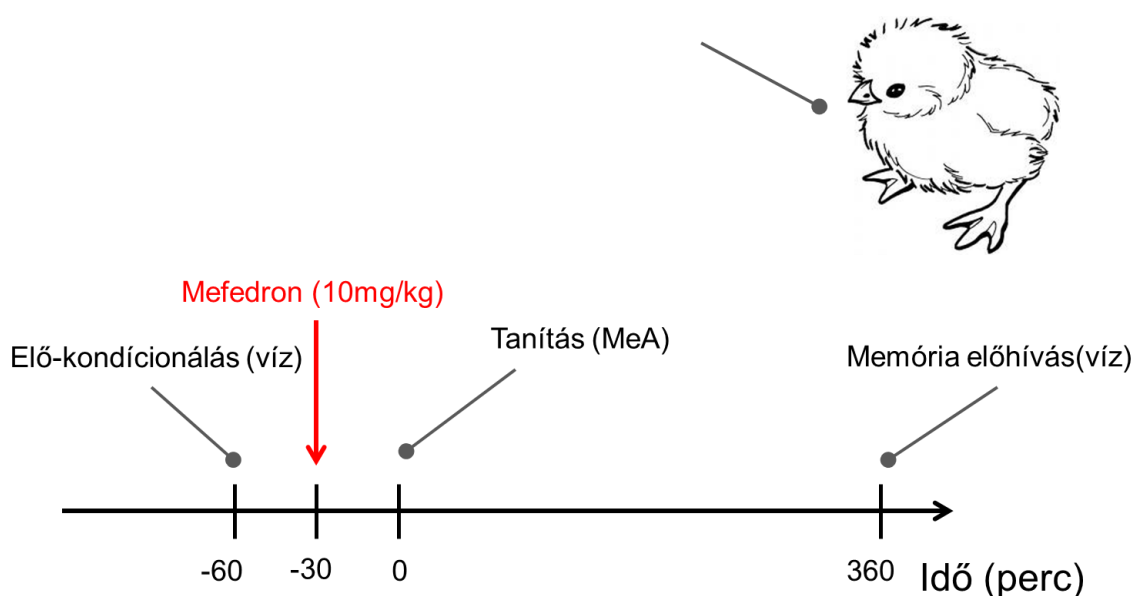
A vizsgált egyedekbe 10 mg/kg mephedront, ill. butylont injektáltunk *i.p.*, majd az injektálás időpontjától számított 60 perc múlva elkezdtük a DC tesztet. A teszt során az állatokat a fajtársaiktól izoláltuk és egy, a kondicionálás során is használt dobozba helyeztük. A vizsgálat során 10 percen át 20 másodperces időintervallumokban mértük a vész hívások

számát. A DC teszttel egyidejűleg az állatok általános fizikai állapotára, mozgáskoordinációjára és éberségére vonatkozóan megfigyeléseket végeztünk.

A megfigyeléseinket Kruskal-Wallis próbát alkalmazva elemeztük, post-hoc teszt gyanánt Mann-Whitney U tesztet végeztünk.

3. A striatummal kapcsolatos tanulási képességek vizsgálata a passzív elhárító tanulás módszerével

A kísérlet során 40 db 1 napos házicsirkét használtunk. A kísérletet a tanítás előtt 60 perccel az elő-tréningezéssel kezdtük, amelyhez vízbe mártott metálszínű gyöngyöt használtunk. Ezután a naposcsibéket 30 perccel a tanítás előtt mephedronnal (10 mg/ttkg *i.p.*) kezeltük. A tanításhoz az előzőtől eltérő színű, MeA-ba mártott gyöngyöt használtunk. A tanítás után 6 órával a memória előhíváshoz ismételten vízbe mártott gyöngyöt használtunk. Azokat az állatokat tekintettük tanultnak, amelyek a memória előhívása során a vízbe mártott gyönggyel szemben elkerülő magatartást mutattak (5. ábra).

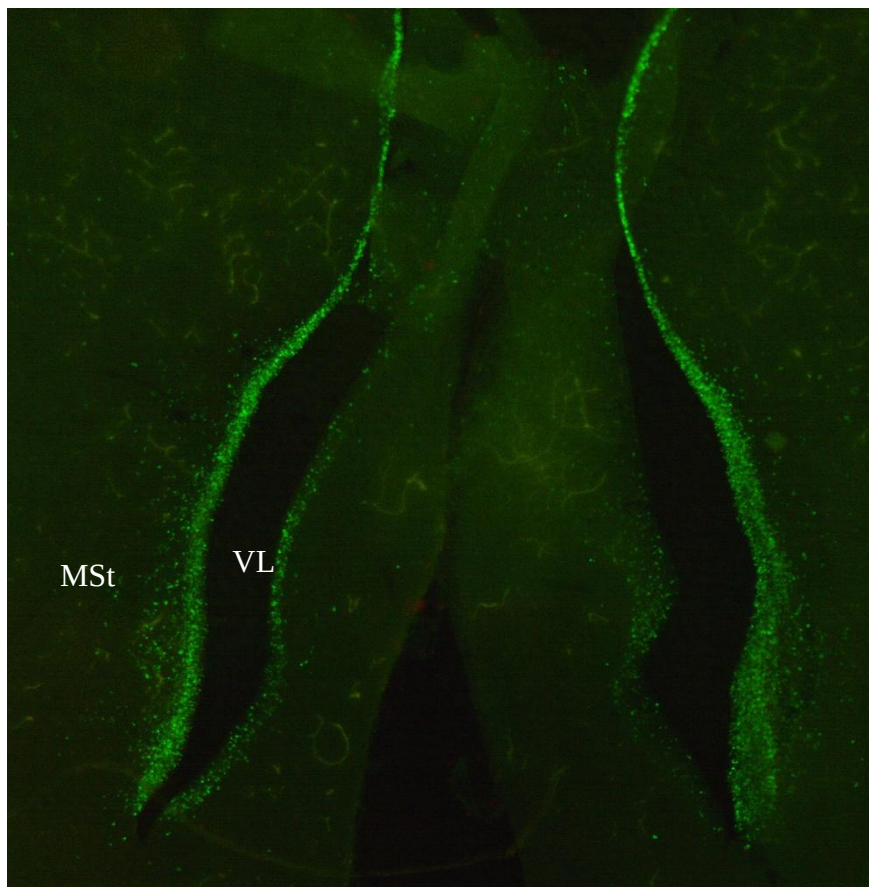


5. ábra: A passzív ízelkerüléssel tanulás paradigmájának sematikus ábrázolása.

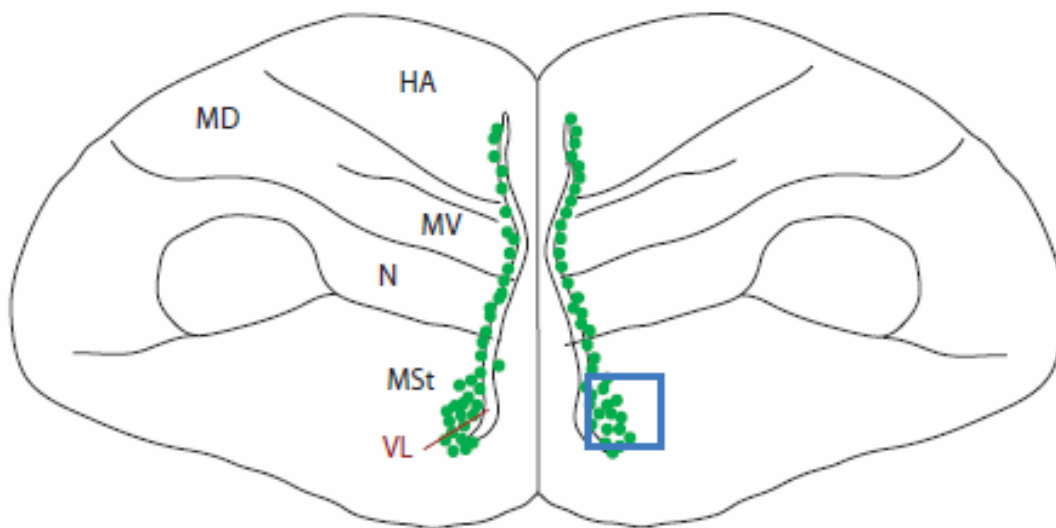
Eredmények

1. A mefedron neurogenesisre gyakorolt hatása

A BrdU pozitív idegelemek a ventriculus lateralis mentén jelentek meg, a legnagyobb tömegben a ventrobasis telencephalon subventricularis zónájában voltak megfigyelhetők (6.a, 6.b és 7. ábra). A 10. embrionális napon kezelt állatok (N=6) esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a subventricularis zóna újonnan keletkező neuronjainak számában. Ugyanez a csökkenés a 6. embrionális napon kezelt egyedek (N=5) esetében nem volt kimutatható (8. ábra).

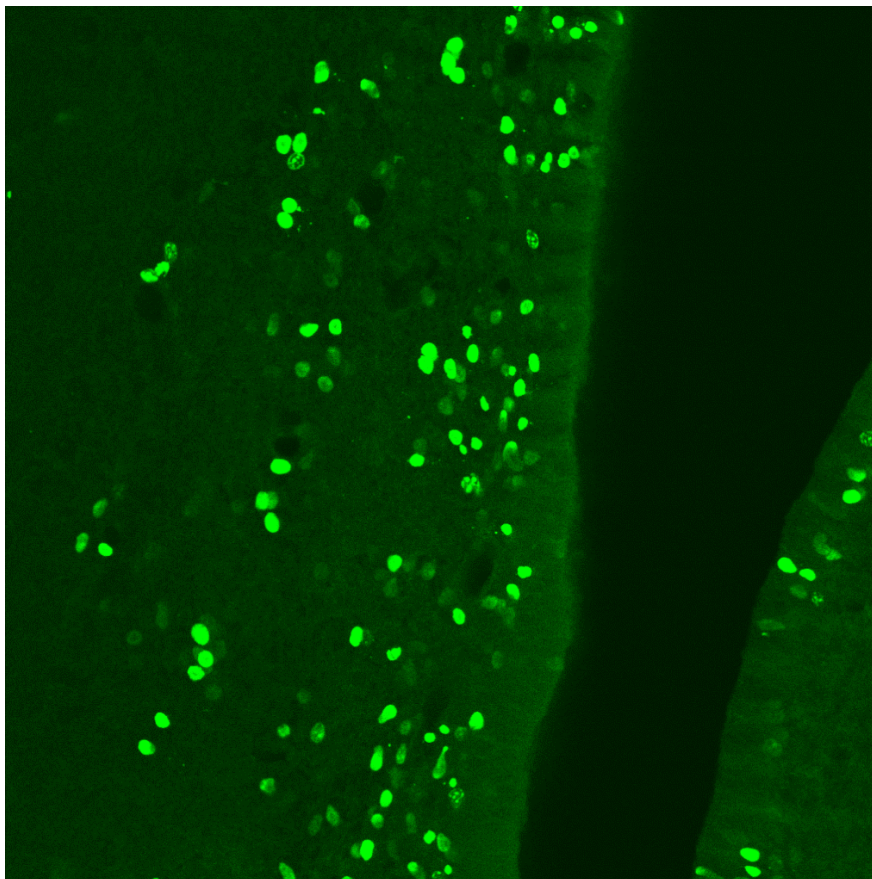


6.a ábra BrdU-pozitív idegelemek a csirke telencephalon subventricularis zónájában. Fluoreszcens mikroszkópos felvétel.
MSt = medialis striatum
VL = ventriculus lateralis



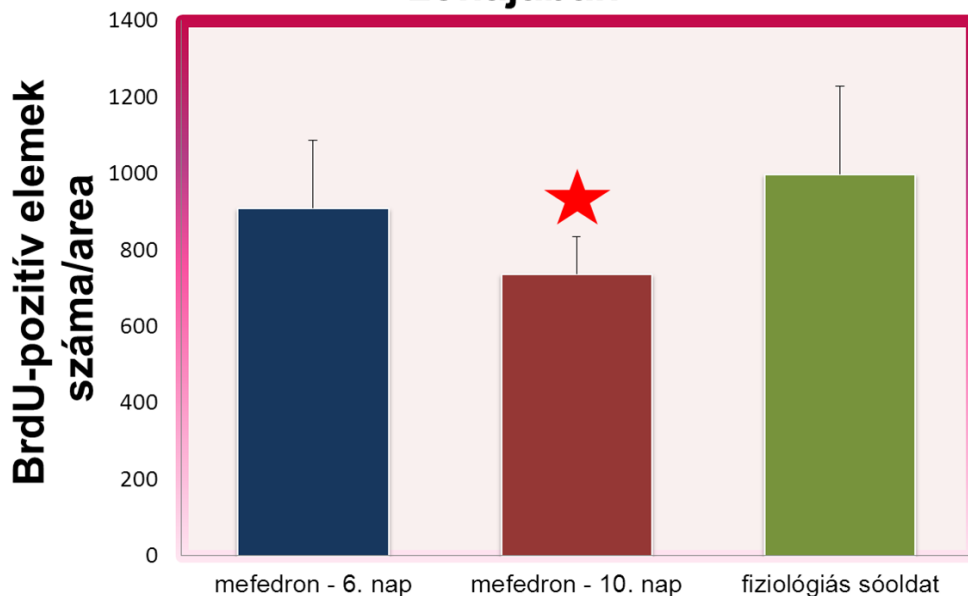
6.b ábra: A BrdU-pozitív idegelemek eloszlásának sematikus ábrája. Azon területet, amelyről a számolást végeztük, kék keret jelöli.

HA = hyperpallium apicale, MD = mesopallium dorsale, MSt = medialis striatum, MV = mesopallium ventrale, N = nidopallium, VL = ventriculus lateralis.



7. ábra. Konfokális mikroszkóppal készült felvétel, a csirke ventrobasalis telencephalonjának subventricularis zónájáról, a 6.b ábrán bemutatott keret területéről. A BrdU immunpozitív sejtmagok zöld színben látszanak.

In ovo mefedron kezelés hatása az újonnan proliferáló sejtek számára a csirke telecephalon subventrikularis zónájában



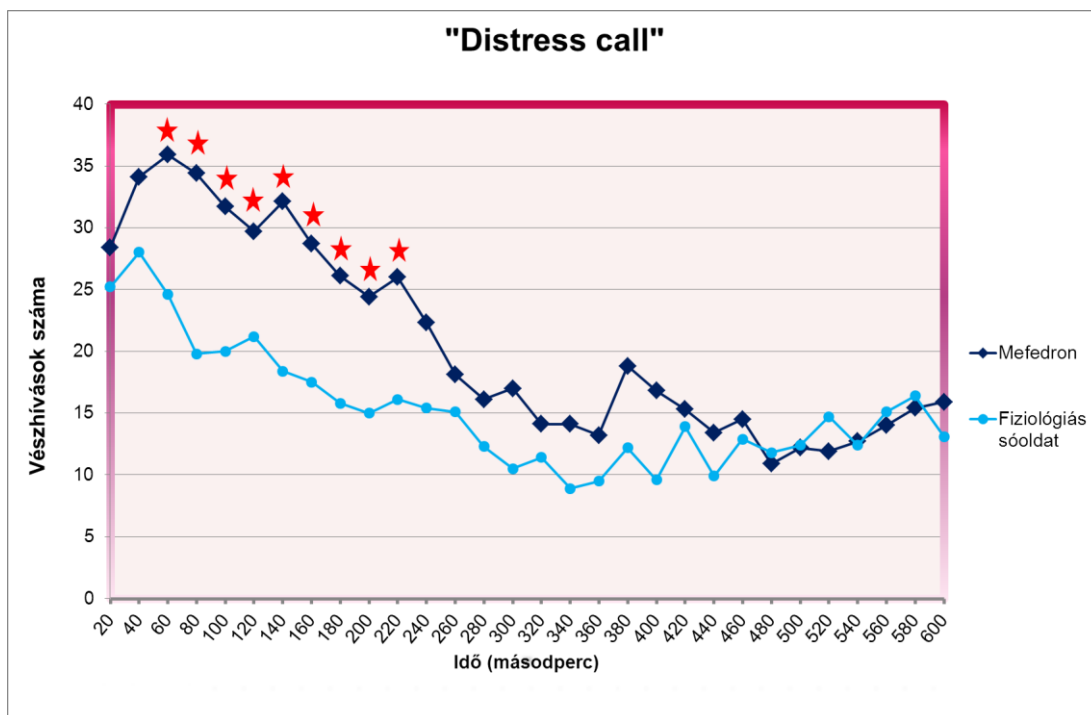
8. ábra: A medialis striatum fejlődésének kritikus szakaszaiban alkalmazott mefedron (2 mg/tojás kg fiziológiás sóoldatban, *in ovo*) kezelés hatása a neurogenézisre. A 10. embrionális napon újonnan keletkező sejtek számának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk (Mann-Whitney U-teszt, $p < 0.05$).

2. A mefedron hatása a viselkedésre

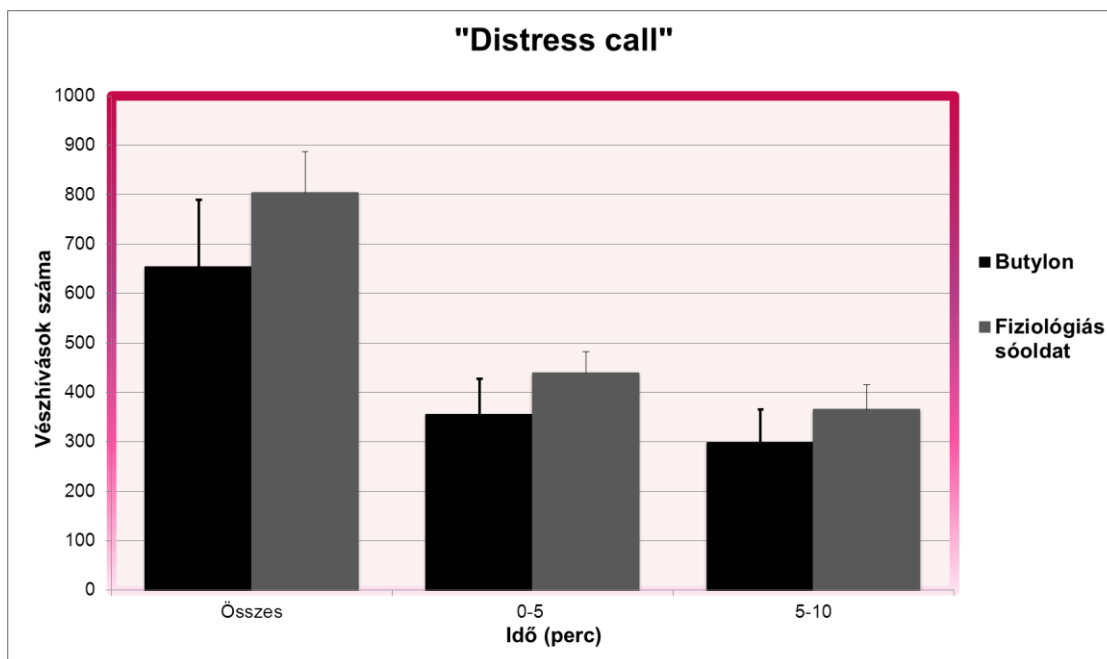
2.1. Distress call

A mefedron befolyásolta az csibék izolációs stresszre adott válaszát, ti. a mefedronnal (10mg/ttkg i.p.) kezelt állatok ($N = 10$) a vizsgálat első 5 percében szignifikánsan több ($p = 0,042$) vészhívást hallattak, mint a kontroll csoport ($N = 10$) egyedei (9. ábra).

A butylon (10 mg/ttkg i.p.) esetében szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, de a kezelt állatok általános fizikai állapota nem tette lehetővé az izolációs teszt zavartalan lebonyolítását (10. ábra)



9. ábra: Akut mefedron kezelés (10mg/ttkg i.p.) hatása a csirke izolációs stressz során adott vész hívásainak („distress call”) számára. A mefedronnal kezelt állatok (N=10) esetében a vizsgálat első 5 percében a vész hívások száma szignifikánsan meghaladta a kontroll csoport (N=10) egyedeinél tapasztaltat (páros t-próba, $p < 0.05$).



10. ábra: Akut butylon kezelés (10mg/ttkg i.p.) hatása a csirke izolációs stressz során adott vész hívásainak („distress call”) számára. A butylonnal kezelt állatok (N=10) esetében a vizsgálat során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kísérlet első- és második 5 percében, a vész hívásaik száma alapján a kontroll csoport (N=10) egyedeivel összehasonlítva (páros t-próba, $p < 0.05$).

2.2. Akut mefedron és butylon kezelés hatásának összehasonlítása

A 10 mg/ttkg i.p. butylonnal kezelt csirkéken a kezelést követően koordinációs zavarokat figyeltünk meg, amely a poszturális kontroll elvesztésével, valamint erős hiperventillációval járt együtt. Ugyanilyen dózisban adott mefedronnál ezek a hatások nem voltak megfigyelhetők.

3. A mefedron hatása a tanulási képességekre

Megállapítottuk, hogy a mefedronnak nem volt hatása a tanulásra, ha a tanítás előtt volt a kezelés, de a kezelt állatok 6 órával később a memória előhívás idején izolációs stressz nélküli hiperaktivitást mutattak. Azonos dózisban adott butylon kezelést követően az állatok általános állapota nem tette lehetővé a PAL lebonyolítását.

Megbeszélés

Az embrionális fejlődés 10. napján in ovo adott mefedron az újonnan keletkező sejtek számának csökkenését okozta a csirke subpallialis telencephalonjának subventricularis zónájában. Ugyanezen kezelés a fejlődés 6. napján alkalmazva nem volt hatással az újonnan keletkező sejtek számára. A két kezelés közti hatásbeli különbség abból adódhat, hogy az általunk vizsgált drog esetlegesen a ventrobasis striato-pallidális sejtpopuláció egy olyan, késői sejtcsoportjára hat, mely differenciációja az embrionális fejlődés 6. és 10. napja közé esik, tehát a mefedron kezelés hatása csak abban az esetben szembetűnő, ha már a kérdéses striato-pallidális neuronok megszülettek és elkezdődtek. További kísérleteinkben annak pontosítására, hogy a mephedrone pontosan melyik sejtcsoportra hatott, az adott régióra jellemző embrionális szabályozó gének (Pax6, Nkx2.1, Islet1; Abellán és Medina, 2009 alapján) expresszióját tervezzük vizsgálni a BrdU-pozitivitást mutató idegelemekben.

A hasonló kémiai szerkezetük alapján (*1. ábra*) várható, hogy az egyes cathinonok nagyon hasonló hatást fejtenek ki (Schifano és mtsai, 2011). Vizsgálatunk során e hipotézisnek ellentmondóan azt tapasztaltuk, hogy a mefedron kezelést kapott egyedek szociális izolációra adott válaszreakciója, a kísérlet első 5 percében szignifikánsan erősebb, mint a teszt második felében a kontroll egyedek esetében, de az állatok általános állapotát nem befolyásolta. A butylonnal kezelt egyedek vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll csoport egyedeihez viszonyítva, de a vizsgált csirkék általános állapota nem tette lehetővé a kísérlet zavartalan lefolyását. A butylon injekció beadását követően 1-2 percen belül megjelent a poszturális kontroll elvesztését igazoló „szétcsúszó alsó végtagok”, majd percekkel később az állat már felállni sem bírt. Koordinációs zavarokat, vagy a koordináció teljes hiányát is megfigyeltük. A leírt tünetegyüttest hyperventilláció és általános apathia kísérte.

Indokolt lenne megvizsgálni a distress call során aktiválódó agyterületek közti kapcsolatrendszer, mert több szerző is leírja, hogy a patkányokon végzett vizsgálatok során a Ac core régiója, a basolateralis amygdala és a prefrontális cortex is érintett (Wang és mtsai, 2012). A DAerg rendszerhez ugyan a mefedron mutatott nagyobb affinitást, de mégis azt gondolom, hogy a mefedron és a butylon vizsgálata során tapasztalt nagy vokalizációs képesség-beli különbségek nem csak az általános állapot és a hyperventilláció miatt alakult ki, hanem a két drog eltérő hatásmechanizmusának következményeként.

Kutatásaink során a két drog által kifejtett eltérő hatásokat más kutatók is leírták. Egereken végzett vizsgálatokkal igazolták, hogy a butylon és a mefedron is 5-HT_{2A} receptorok aktivációja és extracelluláris DA koncentráció növelésével hat, míg a butylon esetében az 5-HT_{1B} típusú szerotonin receptorok aktivációja is meghatározó. A kísérlet során a dózis meghatározó szerepet játszott, nagy dózisban (25 mg/kg) a hatás 4 órán át tartott (López-Arnau és mtsai, 2012). Ez alapján feltételezhető, hogy a butylon inkább a szerotoninerger rendszerre fejt ki hatását, de ez a hipotézis még megerősítésre vár.

Vizsgálatunk alapján elmondható, hogy a mefedron kezelés - az adott dózisban -, ha azt az egyed a tanítás előtt kapta, a memórianyom kialakulását nem befolyásolta. További kísérleteinkben tervezzük megvizsgálni a mefedron tanulási képességre kifejtett hatását, ha azt a csirke a tanulás után kapja. Pontosítani szeretném a hatásos dózis meghatározását is, így a vizsgálat megismétlését tervezem nagyobb dózisban adott mefedronnal. Ezen túlmenően, a tesztet butylonnal is indokolt megismételni; annak alapján, hogy a két ágens nagyon eltérő hatást váltott ki a viselkedési tesztek során, várható, hogy a tanulási képességre gyakorolt hatásuk is különböző lesz.

Összefoglaló

A szintetikus pszichoaktív szereknek egy olyan csoportját, amelyek farmakológiailag és szerkezetileg is nagyon hasonlóak egy kábítószerként nyilvántartott vegyülethez „designer-drogként” vagy a köznyelvben „party-drogként” ismernek. Ezek a szerek könnyen beszerezhetőek az Internet adta lehetőségek által, így rohamosan terjednek, hatásukról azonban ez idáig csak nagyon kevés állatkísérletes eredmény, ill. humán vizsgálati adat áll rendelkezésre. Jelen kutatásban a szintetikus cathinonok csoportjába tartozó mefedron és butylon (MBDB, N-Metil-1-(3,4-metiléndioxi-fenil)-2-butánamin-hidroklorid) nevű szerek neurotoxikus és az agyfejlődésre, különös tekintettel a neurogenesisre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Kísérleteinkben madár modellrendszer segítségével az alábbi kérdésekre kerestük a választ: 1. Milyen hatásuk van ezeknek a drogoknak a fejlődő embrióra, különös tekintettel a neurogenesisre? 2. Milyen viselkedési hatásokat fejtenek ki a cathinonok családjába tartozó designer drogok? 3. Hogyan befolyásolják ezek az ágensek a striatummal kapcsolatos tanulási képességet?

A mefedron neurogenesisre gyakorolt hatásának vizsgálatához termékenyített tyúktojásokat kezeltünk mefedronnal (2 mg/tojás kg, *in ovo*) a 6. ill. a 10. embrionális napokon. A posztembrionálisan proliferáló neuronokat a striatum szubvetrikuláris zónájában kvantitatívan elemeztük jelzett nukleozid, bromo-deoxi-uridin (BrdU) beépülése alapján, amelyet immunhisztokémiai módszerekkel láthatóvá tettünk. A 10. embrionális napon kezelt állatok esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a keletkező idegelemek számában.

A 10mg/ttkg i.p. butylonnal kezelt csirkéken a kezelést követően koordinációs zavarokat figyeltünk meg, amely a poszturális kontroll elvesztésével, valamint erős hyperventillációval járt együtt. Ugyanilyen dózisban adott mefedronnal ezek a hatások nem voltak megfigyelhetőek.

A szociális izoláció által kiváltott stresszre adott választ (ún. „distress call” mérése) a mefedron befolyásolta, ti. a mefedronnal (10mg/ttkg i.p.) kezelt állatok a vizsgálat első 5 percében szignifikánsan több vészhívást hallattak, mint a kontroll csoport egyedei. A butylon (10mg/ttkg i.p.) esetében szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, de a kezelt állatok általános fizikai állapota nem tette lehetővé az izolációs teszt zavartalan lebonyolítását.

A striatummal kapcsolatos tanulási képességek vizsgálatához passzív elhárító tesztet alkalmaztunk, amelynek során a naposcsibéket 30 perccel a tanítás előtt mefedronnal (10mg/ttkg ip) kezeltük. Megállapítottuk, hogy a mefedronnak nem volt hatása a tanulásra, ha a tanítás előtt volt a kezelés, de a kezelt állatok 6 órával később a memória előhívás idején izolációs stressz nélküli hiperaktivitást mutattak.

Summary

The term 'designer drug' or 'party drug' refer to a group of synthetic substances that are pharmacologically and structurally very similar to an illegal substance. Due to the easy accessibility via the Internet, they spread rapidly among teenage people and young adults. Although widely abused, there is a conspicuous lack of epidemiological, animal and clinical data concerning designer drugs. Here we present data on the effect of the synthetic cathinone derivatives mephedrone and butylone (MBDB, N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanoic hydrochloride) on neurogenesis, behavior and early adaptive learning of domestic chicks.

The key questions in our experiment were as follows: 1. What are the effects of these drugs on the developing embryo, particularly on neurogenesis? 2. What are the effects of synthetic cathinones on behavior? 3. Do the exposure to these drugs affect the learning ability in tasks focused on striatal brain regions?

To investigate the effect of prenatal exposure of mephedrone on neurogenesis we injected mephedrone (2 mg/kg egg weight) into incubated chicken eggs at critical stages (day 6 or 10) of striatal development. This was followed by quantitative analysis of post-embryonic proliferating neurons in the subventricular zone of the striatum, based on incorporation of the labeled nucleoside bromo-deoxy-uridine (BrdU), visualized by immunohistochemistry, and quantified by stereological method. A decrease in the density of BrdU-labeled cells in the subventricular zone of ventrobasal telencephalon was observed primarily in those birds injected in ovo in the later phase of striatal neurogenesis (day 10 of incubation).

To investigate the effect of mephedrone and butylone on resistance to stress, we implied social isolation and counted the number of distress vocalizations. The birds injected with mephedrone (10 mg/kg b.w. i.p.) elicited an increase in the number of distress calls in the first 5 min of the test, as compared to the control group. In the case of butylone (10 mg/kg b.w.) no significant difference was observed, but the general physical status of the animals did not allow the undisturbed execution of the isolation test. Butylone (10 mg/kg b.w. i.p.) caused coordination disorders with loss of postural control and was accompanied by strong hyperventilation. Applying the same dose of mephedrone these effects were not observed.

To investigate the effect of mephedrone on learning ability, one-day old chicks injected with mephedrone (10 mg/kg b.w. i.p.) were tested for the passive avoidance learning task. No impairment of memory retention was evident when the drug was administered 30 min prior to training. The drug-injected birds showed hyperactivity without apparent distress at the time of recall.

Irodalomjegyzék

Abellán A, Medina L. (2009) Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. *J Comp Neurol*, 515(4):465-501.

Baumann MH, Ayestas MA Jr, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho AE, Cozzi NV. (2011) The Designer Methcathinone Analogs, Mephedrone and Methylone, are Substrates for Monoamine Transporters in Brain Tissue. *Neuropsychopharmacology*, 2011 Dec 14. doi: 10.1038/npp.2011.304.

Bento AR, Baptista S, Malva JO, Silva AP, Agasse F. (2011) Methamphetamine exerts toxic effects on subventricular zone stem/progenitor cells and inhibits neuronal differentiation. *Rejuvenation Res*, 14(2):205-14.

Brunt TM, Poortman A, Niesink RJ, van den Brink W. (2011) Instability of the ecstasy market and a new kid on the block: mephedrone. *J Psychopharmacol*, 25(11):1543-7.

Cherkin A., 1969. Kinetics of memory consolidation. Role of amnesic treatment parameters. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 63:1094-1 101

Daisley JN. and Rose SPR. (1994) The effect of a passive avoidance task on the release of amino acids in vitro from the left IMHV of the day old chick. *Biochem. Trans.* 22: 1608.

Di Chiara G, Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 85: 5274–5278.

Feyissa AM, Kelly JP. (2008) A review of the neuropharmacological properties of khat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(5):1147-66.

Freeman TP, Morgan CJ, Vaughn-Jones J, Hussain N, Karimi K, Curran HV. (2012) Cognitive and subjective effects of mephedrone and factors influencing use of a 'new legal high'. *Addiction*, 2012 Jan 18. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03719.x

Gibbs M.E., Johnston A.N.B., Mileusnic R., Crowe S.F., 2008. A comparison of protocols for passive and discriminative avoidance learning tasks in the domestic chick. *Brain Res. Bull.* 76(3):198-207

Gustavsson D, Escher C. Mephedrone Internet drug which seems to have come and stay. Fatal cases in Sweden have drawn attention to previously unknown substance. *Lakartidningen* 2009;106:2769e71.

Hadlock GC, Webb KM, McFadden LM, Chu PW, Ellis JD, Allen SC, Andrenyak DM, Vieira-Brock PL, German CL, Conrad KM, Hoonakker AJ, Gibb JW, Wilkins DG, Hanson GR, Fleckenstein AE. (2011) 4-Methylmethcathinone (mephedrone): neuropharmacological effects of a designer stimulant of abuse. *J Pharmacol Exp Ther*, 339(2):530-6.

Imperato A, Mulas A, and Di Chiara G. (1986) Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol*, 132: 337–338.

James D, Adams RD, Spears R, Cooper G, Lupton DJ, Thompson JP, Thomas SH; National Poisons Information Service. (2010) Clinical characteristics of mephedrone toxicity reported to the U.K. National Poisons Information Service. *Emerg Med J*, 28(8):686-9.

Johnston A.N.B., Burne T.H.J., 2008. Aposematic colouration enhances memory formation in domestic chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res. Bull.* 76(3):313-316

Karila L, Reynaud M. (2011) GHB and synthetic cathinones: clinical effects and potential consequences. *Drug Test Anal*, 3(9):552-9.

López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. (2012) Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol*. 167(2):407-20

Maskell PD, De Paoli G, Seneviratne C, Pounder DJ (2011) Mephedrone (4-methylmethcathinone)-related deaths. *J Anal Toxicol*, 35(3):188-91.

Matthew W. Feltensteina, Nathan G. Forda, Kevin B. Freeman, Kenneth J. Sufka (2002) Dissociation of stress behaviors in the chick social-separation-stress procedure. *Physiology & Behavior*, 675– 679

Miller M. W, Nowakowski R. S. (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 457:44-5

Ng KT, Gibbs ME. (1991) Stages in memory formation: a review. In R. J. Andrew (Ed.), *Neural and Behavioural Plasticity: The Use of the Domestic Chick as a Model*. (pp. 351-369.). Oxford, UK: Oxford University Press.

Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM. (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422: 614–618.

Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, and Dani JA. (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, 390: 401–404.

Rose SPR. (1991b) Biochemical mechanisms involved in memory formation in the chick. *In* R. J. Andrew (Ed.), *Neural and Behavioural Plasticity: The Use of the Domestic Chick as a Model*. (pp. 277-304.). Oxford: Oxford University Press.

Rose SPR. and Stewart MG. (1999) Cellular correlates of memory formation in the chick following passive avoidance learning. *Behav. Brain Res.* 98: 237-243.

Rose SPR. (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem*, 7: 1-17.

Rose SPR, Csillag A. (1985) Passive avoidance training results in lasting changes in deoxyglucose metabolism in left hemisphere regions of chick brain. *Behav Neural Biol*, 44: 315-324.

Sandi C. and Rose SPR (1994a) Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur. J. Neurosci*. 6: 1292-1297.

Sandi C. and Rose SPR. (1994b) Corticosterone enhances long-term retention in one day old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res*. 647: 106-112.

Samson HH, Harris RA. (1992) Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 13: 206–211.

Schifano F, Albanese A, Fergus S, Stair JL, Deluca P, Corazza O, Davey Z, Corkery J, Siemann H, Scherbaum N, Farre' M, Torrens M, Demetrovics Z, Ghodse AH; Psychonaut Web Mapping; ReDNet Research Groups. (2011) Mephedrone (4-methylmethcathinone; 'meow meow'): chemical, pharmacological and clinical issues. *Psychopharmacology (Berl)*, 214(3):593-602.

Scholey AB., Mileusnic R., Schachner M. and Rose SPR. (1995) A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task. *Learn. Mem*. 2: 17-25.

Scholey AB., Rose SPR., Zamani MR., Bock E. and Schachner M. (1993) A role for the neural cell adhesion molecule in a late consolidating phase of glycoprotein synthesis 6 h following passive avoidance training of the young chick. *Neurosci*. 55: 499-509.

Schultz W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36: 241–263.

Schultz W, Dayan P, and Montague PR. (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275: 1593–1599.

Tóth AR, Hideg Z, Institóris L. (2011) Mephedrone -- an old-new drug of abuse. *Orv. Hetil*, 152(30):1192-6.

Tsai HM, Garber BB, Larramendi LM. (1981) 3H-thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo: I. Neuronal birthdates of telencephalic compartments in situ. *J Comp Neurol*, 198(2):275-92.

Tulloch I, Ghazaryan N, Mexhitaj I, Ordonez D, Angulo JA. (2011.a) Role of neurokinin-1 and dopamine receptors on the striatal methamphetamine-induced proliferation of new cells in mice. *Brain Res*, 1399:33-9.

Tulloch IK, Afanador L, Zhu J, Angulo JA. (2011.b) Methamphetamine induces striatal cell death followed by the generation of new cells and a second round of cell death in mice. *Curr Neuropharmacol*, (1):79-83.

Winslow JT, Insel TR. (1991) Endogenous opioids: do they modulate the rat pup's response to social isolation? *Behav Neurosci*, 105(2):253-63.

Winstock A, Mitcheson L, Marsden J. (2010) Mephedrone: still available and twice the price. *Lancet*, 376(9752):1537.

Wise RA, Bozarth MA. (1982) Action of drugs of abuse on brain reward systems: An update with specific attention to opiates. *Pharmacol Biochem Behav*, 17: 239-243.

Wood DM, Davies S, Puchnarewicz M, Button J, Archer R, Ovaska H, Ramsey J, Lee T, Holt DW, Dargan PI. (2010) Recreational use of mephedrone (4-methylmethcathinone, 4-MMC) with associated sympathomimetic toxicity. *J Med Toxicol*, 6(3):327-30.

Wood DM, Greene SL, Dargan PI. (2011) Emergency department presentations in determining the effectiveness of drug control in the United Kingdom: mephedrone (4-methylmethcathinone) control appears to be effective using this model. *Emerg Med J*, 2011 Oct 27.

Wood DM, Greene SL, Dargan PI. (2012) Clinical pattern of toxicity associated with the novel synthetic cathinone mephedrone. *Emerg Med J*, 2012 Jul 20.

Wang YC, Ho UC, Ko MC, Liao CC, Lee LJ. (2012) Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after postweaning social isolation. *Brain Struct Funct*, 217(2):337-51.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Ádám Ágotának szeretnék köszönetet mondani, aki időt és energiát nem sajnálva segítette munkámat. Nem csak kiváló szakmai segítséget kaptam Tőle, hanem olyan emberi támogatást is, amely nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönöm.

Szeretnék még köszönetet mondani Prof. Csillag Andrásnak, aki fél szemét mindig rajtam tartotta, és ötleteivel, tanácsaival igyekezett előbbre vinni munkámat. Köszönöm. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a 'Csillag labor' munkatársainak, akik szeretettel fogadtak, amikor megérkeztem, és derűs, baráti környezetet biztosítottak számomra munkám során. Köszönöm Nekik.

Köszönettel tartozom még Dr. Szabó Péternek és Dr. Zachar Gergőnek, akik a statisztika sötét útvesztőiben nyújtottak segítséget. Köszönöm.

Szeretném kifejezni hálámat és szívből jövő szeretetemet családtagjaim iránt: édesanyámnak, aki mindig biztatott és hitt bennem, gyermekeimnek türelmüket és megértésüket, és hogy minden nap lelkesítettek, és új erőt adtak a nehéz napokon is. Köszönöm.

A kutatást az OTKA: PD-105251 számú pályázat támogatta.