

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az adenoszin receptorokon ható farmakonok vizsgálata az impulzivitás állatkísérletes modelljében patkányban

OTDK pályamunka

Készítette:

CSURGYÓK ROLAND LAJOS

biológus MSc I. évf. hallgató

Témavezető:

DR. HERNÁDI ISTVÁN

PTE-TTK Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék



Pécs, 2012

TARTALOM

1.	BEVEZETÉS	4
1.1	Az adenoszin: az A1 és A2A típusú receptorok természetes agonistája.....	4
1.2	Az adenoszin receptorok jellemzése	5
1.3	Az A1 és A2A receptorok a központi idegrendszerben	6
1.4	Az impulzív magatartás és állatkísérletes modellezése	8
1.5	A koffein mint a legismertebb adenoszin receptor antagonistája	9
2.	CÉLKITŰZÉSEK	13
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
3.1	A kísérleti állatok elhelyezése és tartása	14
3.2	A késleltetett jutalom leértékelődési paradigma.....	14
	Kondicionálás	16
	A tesztprotokoll.....	17
3.3	Anyagbeadások.....	18
3.4	Az adatok feldolgozása, statisztikai próbák	20
4.	EREDMÉNYEK	21
4.1	Motoros impulzivitás.....	21
	Az A1 receptor agonista CHA hatása a motoros impulzivitásra	21
	Az A1 receptor agonista CHA és a koffein együttes hatása a motoros impulzivitásra	22
	Az A2A receptor agonista CGS hatása a motoros impulzivitásra.....	22
	Az A2A receptor agonista CGS hatása a motoros impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva	23
4.2	Választási impulzivitás	25
	Az A2A receptor agonista CGS hatása a választási impulzivitásra.....	25
	Az A1 receptor agonista CHA hatása a választási impulzivitásra	26
	Az A1 receptor agonista CHA hatása a választási impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva	27
	Az A2A receptor agonista CGS hatása a választási impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva	27
5.	AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	29
5.1	Az adenoszin receptorok és a motoros impulzivitás kapcsolata	29
5.2	Az adenoszin receptorok és a választási impulzivitás kapcsolata.....	30
5.3	Kitekintés.....	32

6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. IRODALOMJEGYZÉK	34
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
9. NYILATKOZAT	38
9.1 Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez.....	38

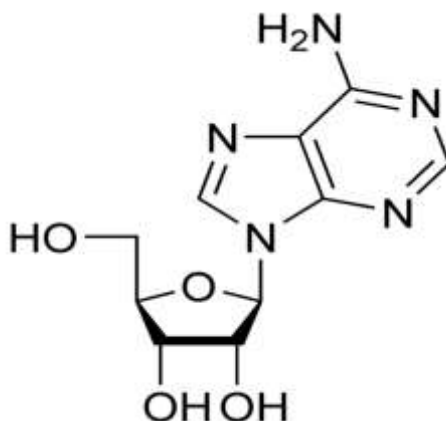
1. BEVEZETÉS

Az embereknek és a fejlettebb élőlényeknek életük során számtalan döntést kell meghozniuk. Ezek közül sok kihatással lehet a döntéshozó elkövetkező egész életére vagy létfontosságú lehet az adott helyzetben. A helyes döntések meghozása érdekében elkerülhetetlen a rendelkezésre álló információk megismerése és értelmezése. Ezen információk származhatnak a szervezeten kívüli környezetből vagy magából a szervezetből, amiket az élőlények receptorok segítségével detektálnak és dolgoznak fel, ezért a különféle receptorok nélkülözhetetlen szerepet töltenek be az élőlények viselkedésének kialakításában. Ilyenek például a legtöbb élőlényben jelentős számban előforduló adenosin receptorok.

Az adenosin receptorok az összes sejt felszínén megtalálhatók. Fontos szerepet töltenek be többek között az alvás és ébrenlét szabályozásában, valamint jelentős szerepet játszhat a magatartás szabályozásában is. Ennek ellenére kevés tanulmány irányul ezen receptorok viselkedésben betöltött szerepének vizsgálatára. Tanulmányunk az adenosin receptorok illetve a rájuk ható farmakonok impulzív viselkedésben betöltött szerepének vizsgálatát tűzte ki célul.

1.1 Az adenosin: az A1 és A2A típusú receptorok természetes agonistája

Az adenosin fontos szerepet tölt be a normál fiziológiás működés fenntartásában. Szabályozza az alvást és ébrenlétet a neuronok ingerlékenységének csökkentésével (DUNWIDDIE és MASINO, 2001), ami önmagában hatással lehet a magatartásra. Macskákon végzett mikrodialízis segítségével sikerült kimutatni az endogén adenosin szint növekedését tartós ébrenlét esetén és csökkenését az ezt követő alvás során (PORKKAHEISKANEN és mtsai., 1997), ezen kívül farmakológiai kísérletekkel bizonyították, hogy az adenosin agonista vegyületek elősegítik (PORTAS és mtsai., 1997) míg az antagonisták csökkentik az alvás mennyiségét (LIN és mtsai., 1997).



1. ábra. Az adenzin molekula szerkezeti képlete (forrás:Wikipedia.com).

Az adenzin (**1. ábra**) a P1 típusú purinerg receptorok természetes agonistája. Extracelluláris (pl. ATP) és intracelluláris (pl. 5'-AMP) adenin nukleotidokból képződik (DUNWIDDIE és MASINO, 2001). Endogén purinnukleozid, fontos szereppel bír a DNS felépítésében és működésében, az energiaraktározásban (az ATP alkotóeleme), valamint az extra- és intracelluláris információ átadásban. A perifériás és központi idegrendszerben egyaránt megtalálható. Az adenzin receptorokon keresztül szinte az összes transzmitter kibocsátását csökkenti és negatívan modulálja a központi neuronok működését. Ezen hatásai ellenére nem sorolhatjuk a neurotranszmitterek közé, mivel nem rendelkezik az szinaptikus részből történő aktív újrafelvevő rendszerrel és ürülése nem a preszinaptikus vezikulákból történik. Ezek alapján az adenzint a neuromodulátor hatású anyagok közé sorolják (DUNWIDDIE és MASINO, 2001).

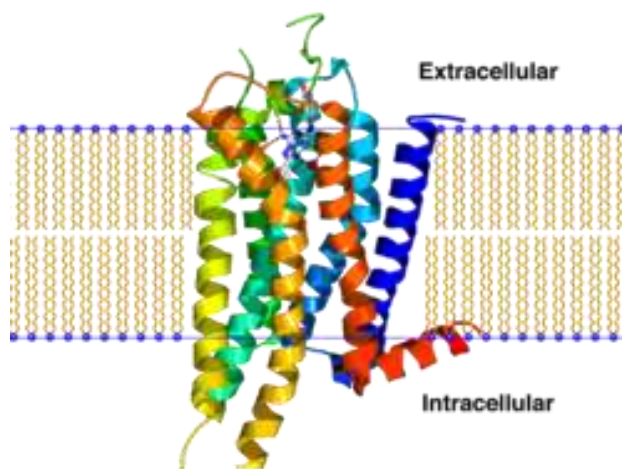
1.2 Az adenzin receptorok jellemzése

A purinerg receptorok vagy más néven purinoceptorok, melyek ligandumai purin-nukleotidok és purin-nukleozidok közé tartoznak. Ligandum-receptor kölcsönhatásai alapján megkülönböztethetünk adenzinra érzékeny P1 típusú és adenzin-trifoszfát szenzitív P2 típusú purinerg receptorokat.

Az adenzin szenzitív P1 receptorok G fehérjéken keresztül befolyásolják a cAMP szintet. Az adenzin receptorok többsége hét darab α -hélix transzmembrán doménnel rendelkezik (**2. ábra**). Az aminosav szekvenciájuk és az adenzinnal analóg vegyületekre

való szenzitivitásuk alapján további négy alosztályra oszthatók, ezek az A1, A2A, A2B és A3 receptor típusok (FREDHOLM és mtsai., 1994).

Az A1 receptorok a Gi és G0 fehérje kapcsoltak, (FREISSMUTH és mtsai., 1991) és gátolják az adenilát-cikláz működését, ezáltal csökkentik a cAMP mennyiségét (van CALKER és mtsai., 1978). Ezzel ellentétben az A2A és A2B alosztályba tartozó receptorok a Gs proteinek segítségével növelik a cAMP szintet. Az A3 receptorok az A1-esekhez hasonlóan csökkentik az adenilát-cikláz aktivitását és Gi fehérjékhez kapcsoltak (FREDHOLM és mtsai., 1994).



2.ábra. Az adenosin A2A típusú receptor sematikus szerkezeti (3D) rekonstrukciója (forrás: <http://en.wikipedia.org>).

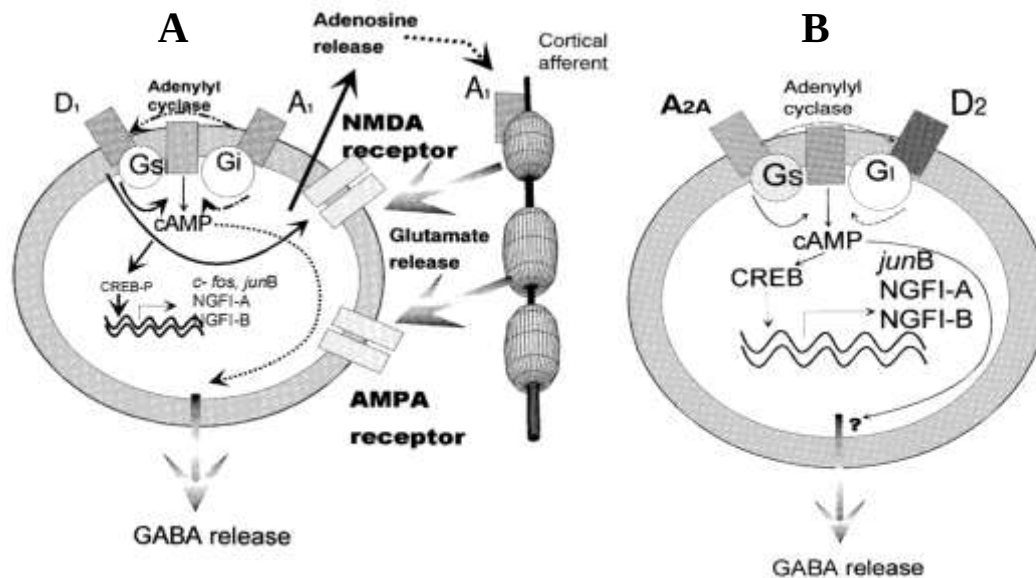
1.3 Az A1 és A2A receptorok a központi idegrendszerben

Az adenosin gátló hatását a transzmitter felszabadulásra először a perifériás idegrendszerben jegyezték fel, de ez a hatás a központi idegrendszerben is hamar bebizonyosodott (FREDHOLM és DUNWIDDE, 1988). Az adenosin receptorok szinte az összes neurotranszmitter felszabadulását gátolják, úgy mint a glutamát, gamma-amino-vajsav, acetilkolin és a 5-hydroxytryptamin (DUNWIDDIE és MASINO, 2001) és szerepet játszanak a központi neuronok aktivitásának csökkentésében (PHILLIS és EDSTROM, 1976). Ezen hatást feltételezhetően mindaz A1 és A2 típusú receptorok a K⁺ csatornák aktiválásával és a Ca²⁺ csatornák gátlásával váltják ki (DUNWIDDIE és MASINO, 2001).

Az A1 receptorok nagy számban megtalálhatók a hippocampusban, az agyi- és kisagyi kéregben, néhány thalamikus magban valamint a nucleus accumbens-ben (FASTBOM és mtsai., 1987; FREDHOLM és mtsai., 1999). Számos bizonyíték alátámasztja az A1 adenosin

és a D1 típusú dopamin-receptorok kapcsolatát **(3./A ábra)** (FERRÉ és mtsai. 1997), ezáltal csökkenti a D1-es -receptorok agonistáinak lokomotoros aktiváló hatását, valamint közvetett kapcsolata valószínűsíthető az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokkal (FREDHOLM és mtsai., 1999). Sikerült bizonyítani, hogy a D1-es dopamin és az NMDA receptorok stimulálása növeli az adenosin kibocsátást, ami csökkenti a serkentő neurotranszmitterek ürülését. (HARVEY és LACEY 1997). Ezen felül bizonyítást nyert az A1 és D1 receptorok interakciója a ventrális tegmentális areában (BONCI és WILLIAMS, 1996).

Az A2A receptorok az agy néhány dopaminban gazdag területén fordulnak elő, ezek: striatum, nucleus accumbens és a tuberculum olfactorium. Valamint az A2A receptorok a D2 receptorokkal kolokalizálódva **(3./B ábra)** megtalálhatók a közepes méretű tüskés GABAerg neuronok alappopulációjában, amely a globus pallidusba ad kimenetet (FREDHOLM és mtsai., 1999) és bizonyítottan csökkenti a D2 típusú dopamin receptorok dopaminnal szemben való érzékenységét, de nem antagonizálja azt (FERRÉ és mtsai. 1997). Megfigyelték, hogy ezen kölcsönhatások az A2A adenosin és D2 dopamin receptorok között, in vitro funkcionálisan korrelálnak ép striátumban (FREDHOLM és mtsai., 1999). Kimutatták, hogy a striátumba adott dopamin blokkolja a GABA ürülést a globus pallidus-ban (FERRÉ és mtsai. 1993) és ezt a hatást az endogén adenosin csökkenti (FREDHOLM és mtsai., 1999). Továbbá az A2A receptorok aktivitása növeli a GABA felszabadulást a pallidumból (MAYFIELD és mtsai., 1993). Ezek alapján valószínűsíthetjük az A2A típusú receptorok anxiolitikus hatását.



3. ábra. Az adenosin és dopamin receptorok interakcióinak központi idegrendszeri sematikus ábrája Fredholm (1999) alapján. **A:** A1 és D1 típusú receptorok hatása a cAMP-re. **B:** A2A és D2 típusú receptorok hatása a cAMP-re.

Amint láthattuk az adenosinreceptorok fontos és széleskörű szerepet töltenek be a központi idegrendszerben úgy, mint a központi neuronok aktivitásának csökkentése, a neurotranszmitterek kibocsátásának gátlása (beleértve a dopamint), ami bizonyítottan fontos szerepet tölt be pl. az impulzív viselkedésben). Mindezek ellenére kevés olyan tanulmány létezik mely az adenosin-receptorok valamint az azokra ható farmakonok szerepét vizsgálják az impulzivitás állatkísérletes modelljeiben.

1.4 Az impulzív magatartás és állatkísérletes modellezése

Impulzivitás alatt több a viselkedésben megjelenő rendellenességet értünk. Ezek a rendellenességek számos pszichiátriai szindróma során (pl.: figyelemhiányos hiperaktivitási szindróma, mánia, drogfüggőség) tünetként jelentkeznek, ami indokolja az iránta való jelentős tudományos érdeklődést. Mivel az impulzivitás a magatartásban nagyon sokféle formában megjelenhet (mint például: gátlástalanság, erőszakos vagy agresszív viselkedés, a cselekvés és a cselekvés végkimenete közötti késés tolerálásának hiánya, túlzott mértékű kockázatvállalás stb.) ezért nagyon nehéz rá egységes definíciót alkotni. Ilyen meghatározás lehet, hogy az impulzív egyén nem képes vagy nem hajlandó a rendelkezésére álló információk alapján mérlegelni cselekvésének hatását és annak következményeit. Számos szerző az impulzivitáson belül megkülönböztet motoros illetve kognitív impulzivitást (WHITE és mtsai., 1994). Motoros impulzivitás estén a cselekvő képtelen kontrolálni egy rá jellemző

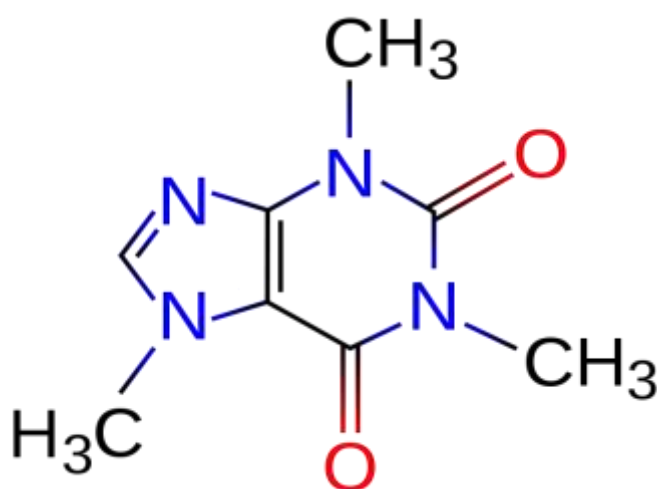
viselkedési formát, ami gyors és pontatlan válaszokat eredményez. Kognitív vagy választási impulzivitás alatt pedig az alternatív végkimenet rossz megítélését, és a jutalom hosszú távon való leértékelődését értjük (BASAR és mtsai., 2010). Evenden szerint az impulzív viselkedés három komponensből tevődik össze, ezek : felkészülés a választásra, a cselekvés végrehajtása és az eredmény értékelése (EVENDEN, 1999). Chambers és Potenza ehhez hasonló háromkomponensű modellel jellemzi az impulzív viselkedést úgy, mint: 1. bemenet: külső és belső szenzoros információk felhalmozódása 2. feldolgozás: a rendelkezésre álló információk figyelembevétel, a lehetséges opciók számbavétel és kiválasztása 3. kimenet: a cselekvés megtervezése és végrehajtása (CHAMBERS és POTENZA, 2003).

Az impulzivitást összetettsége és bonyolult neurobiológia háttere miatt meglehetősen nehéz vizsgálni és modellezni. Ennek ellenére több módszert is kidolgoztak ennek megoldására. Humán vizsgálatok esetén elterjedtek a különböző kérdőívek és tesztek, illetve ugyan csak embereken valamint majmokon végzett ún. szerencsejáték tesztek (ún. gambling task-ok). Utóbbit a kockázatvállalás mértékének meghatározására használják, amihez bizonytalan jutalmakat alkalmaznak. A motoros impulzivitás mérésére alkalmazott legismertebb modell az „5 választásos reakcióidő teszt” (five choice serial reaction time task, 5CSRT) (ROBBINS, 2002). Ebben a tesztben általában patkányokat használnak. Az állatoknak 5 lehetőség közül kell kiválasztani a megfelelőt, ezután várakozási idő következik, ami alatt az állatnak kontrolálnia kell önmagát. A választási impulzivitás vizsgálatára az egyeik legeredményesebb módszer az általunk is alkalmazott késleltetett jutalom leértékelődési paradigma (KJL, angolul: delay discounting, DD) (EVENDEN és RYAN, 1996), melynek segítségével a jutalom késésének tolerálását tudjuk vizsgálni. Ebben a tesztben az állatoknak a kis értékű azonnali és a nagy értékű késleltetett jutalmak közül kell választania.

1.5 A koffein mint a legismertebb adenozin receptor antagonist

A koffein a legelterjedtebb pszichostimuláns, amit széles körben használnak, egyes népcsoportok kultúrájának szerves részévé vált és a világon szinte mindenhol, mint élvezeti cikket fogyasztják kávé, tea, kóla, kakaó és különféle energitalok formájában, amit legális és könnyű hozzáférhetősége tesz lehetővé. Tudományos neve az 1,3,7-trimetil-xantin (**4. ábra**), több növény alkaloidjaként fordul elő úgy, mint a kávé vagy a tea. Ezen kívül a gyógyászatban is használják különböző gyógyszerek például: fájdalomcsillapítók és megfázás elleni készítmények hatóanyagaként. A mérsékelt koffeinfogyasztás (napi 2,4-4 mg/testtömeg

kg) pozitívan hat a magatartásra (FREDHOLM és mtsai. 1999; NEHLIG 1999), de nagyobb mennyiségben esetenként kedvezőtlen hatásai is megfigyelhetők úgy, mint az alvászavar, szorongás és nyugtalanság (NEHLIG 1999). Szájon át történő fogyasztás esetén a koffein mint egy 99%-a a gasztrointesztinális traktuson keresztül 20-45 perc alatt felszívódik (ARNAUD, 1993; BLANCHARD és SAWERS, 1983; CHVASTA és COOKE, 1971; FREDHOLM és mtsai. 1999). Metabolizációja elsősorban a májon keresztül történik (ARNAUD, 1993). Felezési ideje a fiatal és idős szervezetben nem különbözik, viszont a rendszeresen dohányzók szervezetében ez az érték 30 vagy akár 50 százalékkal csökkenhet a nem dohányzóknál megfigyelt értékhez képest (FREDHOLM és mtsai. 1999).



4. ábra. A koffein (1,3,7-trimetil-xantin) molekula szerkezeti képlete (forrás: <http://hu.wikipedia.org>).

A koffein serkenti az idegrendszert, ezáltal fokozza az éberséget és a koncentrációs képességet (DALY és FREDHOLM, 1998; FLORA és DIETZE, 1993). Nagyobb mennyiségben növeli a testhőmérsékletet és a pulzusszámot, valamint serkenti a vizelet kiválasztást. Bebizonyították, hogy a koffein rendszeres fogyasztása felerősíti más stimulánsok hatását (GASIOR és mtsai., 2000), és képes befolyásolni például a nikotin, az amfetamin és a kokain pszichomotoros hatásait (CAULI és MORELLI, 2005). Ezen hasonlóságok alapján valószínűsíthetjük a koffein egyéb pszichomotoros stimulánsokhoz (például: az amfetamin vagy a kokain) hasonló hatását a különböző magatartástani tesztekben. Ezt bizonyítja, hogy a koffein az amfetaminhoz és kokainhoz hasonlóan képes indukálni a dopamin valamint a noradrenalin felszabadulását a nucleus accumbensben (CAULI és MORELLI, 2005; CARDINAL, 2006; CARDINAL és mtsai., 2001; EVERITT és WOLF, 2002). A koffein, mint adenosin antagonistája negatívan modulálja az adenosin receptorok

működését, ez által növeli a monoaminerg neurotranszmissziót és több tanulmány által igazoltan szerepet játszik a megerősítő hatás létrejöttében, amit a mezolimbikus jutalmazó útvonalakon keresztül ér el (BERRIDGE, 2006; CARDINAL és mtsai., 2001). Az A1 és A2A receptorokhoz közel azonos affinitással kötődik, főként ezeket antagonizálja. Az A2B és A3 típusú adenosin receptorok gátlásához nagyobb koffein koncentráció szükséges. A koffein az A1 és A2A receptorok antagonizálásával fokozza a dopamin ürülés mértékét (CAULI és MORELLI, 2005; CARDINAL, 2006; CARDINAL és mtsai., 2001; DALY és FREDHOLM, 1998; EVERITT és WOLF, 2002), másrészt az A1 receptorokon keresztül indirekt dopamin agonistaként dózisfüggően növeli a extracelluláris dopamin szintjét a striátumban (MORGAN és VESTAL 1989; OKADA és mtsai., 1997). A dopaminerg valamint kisebb mértékben a noradrenerg neurotranszmisszió befolyásolja az impulzív viselkedést és hatással vannak a késleltetett jutalom értékelésében (CARDINAL, 2006; CARDINAL és mtsai., 2000, 2001; VAN GAALEN és mtsai., 2006), valamint kimutatták a csökkent előagyi dopaminszint növeli, a dopamin szintjét növelő drogok és gyógyszerek pedig csökkentik az impulzivitás mértékét (CARDINAL és mtsai., 2000; WINSTANLEY és mtsai., 2003, 2005). A fent említettek azt bizonyítják, hogy az A1 és A2A típusú adenosin receptorok fontos szerepet játszanak az impulzív viselkedés szabályozásában.

A fent említettek ellenére nagyon keveset vizsgálták a koffein impulzivitásra gyakorolt hatását. (FLORA és DIETZE, 1993) egy emelt T keresztpallós kísérletben vizsgálta a koffein hatását, ahol az állatok a keresztpalló két „karja” közül választhattak. Az egyik karba történő behatolás esetén kicsi, de azonnali a másik karban nagy, de 15 másodperccel késleltetett jutalmat kaptak. Eredményeik azt mutatták, hogy azok az állatok amelyekkel a kísérlet előtt koffein tartalmú vizet itattak, többször választották a kis jutalmat a kontrollhoz képest. Egy másik kísérletben (J. W. DILLER és mtsai., 2008), az Evenden és Ryan munkáján (1996) alapuló KJL procedúrát használták a koffein akut és krónikus hatásának vizsgálatához, ahol az állatok pedálok lenyomásával választhattak a kis azonnali és a nagy késleltetett jutalom között. Itt a koffein alkalmazása intraperitoneálisan (i.p.) történt, valamint a nagy jutalom késleltetése nem volt konstans. Eredményeik alapján a koffein nagy dózisban adva növelte a késleltetett nagy jutalom választásának arányát a kontrollhoz képest. Az ismételt beadások során e hatás csökkent, de a kontrollhoz képest így is magasabb volt. Ez valószínűleg a koffeinnel szembe kialakult enyhe toleranciának köszönhető, mivel a koffein megvonás után a kontrollhoz hasonló eredményeket figyeltek meg, majd ismételten alkalmazva a koffeint a nagyjutalom választásának aránya az akut beadást követően mért eredményhez közeli volt.

Kísérletünk során melyben a koffein impulzivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, mi is a késleltetett jutalom leértékelődési paradigmát (KJL paradigma) használtuk. Eredményeinkkel sikerült igazolnunk a koffein dóziszfüggő választási impulzivitást csökkentő hatását (KARDOS, 2009).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján láthattuk, hogy az adenosin receptorok és a rájuk ható farmakonok fontos szerepet tölthetnek be a magatartásban, azon belül pedig hatással lehetnek az impulzivitás mértékére. Ennek ellenére kevés olyan tanulmány létezik melyben az adenosinnak vagy agonistáinak illetve antagonistáinak impulzivitást befolyásoló hatását vizsgálták.

Mivel a koffein az egyik legismertebb adenosin antagonistá, legálisan beszerezhető és szinte az egész világon széles körben fogyasztják, ezért elsőként a koffein hatását vizsgáltuk az impulzivitás egyik állatkísérletes modelljében. Tanulmányunkban a jutalom leértékelődési (KJL) paradigmát használtuk, hogy megtudjuk a koffein impulzív viselkedésre kifejtett hatását.

A koffein fő támadáspontja az A1 és A2A típusú receptorok, ezért célunk ezen receptorok impulzivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata volt a KJL paradigma segítségével. Ehhez A1 és A2A receptor agonista vegyületeket használtunk önmagukban alkalmazva, valamint koffeinnel együtt injektálva.

Konkrét kérdéseink:

- Az A1 és A2A receptorok agonistái hogyan befolyásolják a motoros impulzivitás mértékét?
- Milyen változást idéznek elő az állatok motoros aktivitásában az A1 illetve A2A receptor agonisták koffeinnel együtt alkalmazva?
- Milyen hatással vannak az impulzív választásra az A1 illetve az A2A típusú adenosin receptorokon ható agonisták a KJL paradigmában?
- Az A1 és A2A receptor agonista vegyületek koffeinnel együtt való alkalmazása, eredményez-e változást az impulzív választások arányában?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A kísérleti állatok elhelyezése és tartása

Az állatok laboratóriumi tartásánál és a vizsgálatok ideje alatt a PTE Munkahelyi Állatetikai Bizottság (MÁB) által 2000-ben kiadott állatetikai kódex szabályait szem előtt tartva jártunk el.

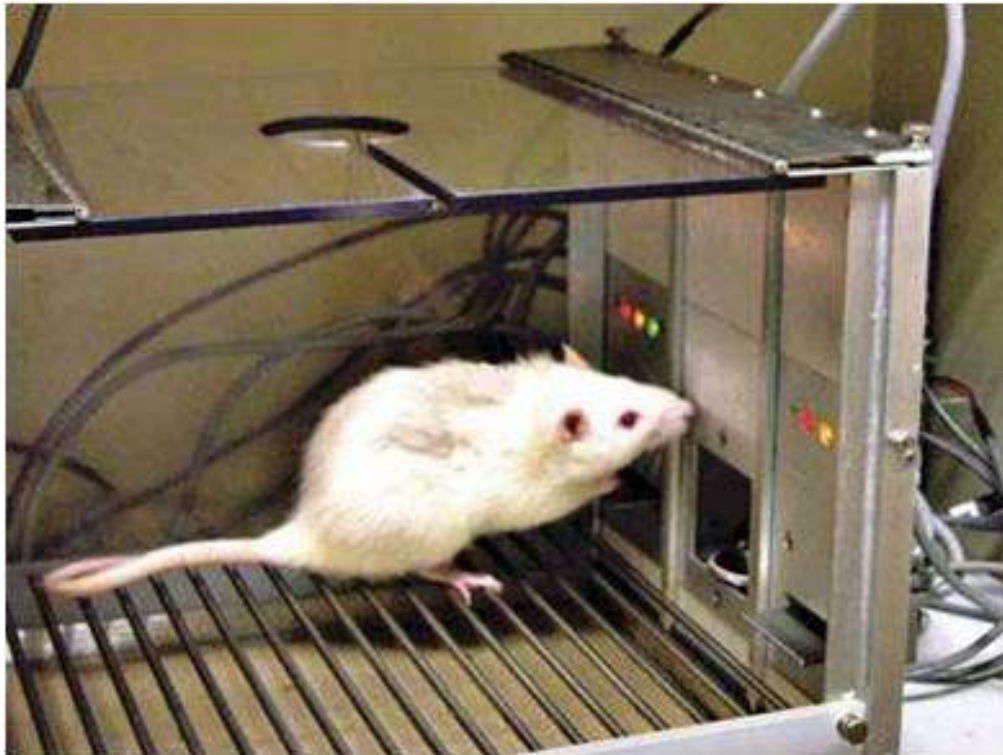
Kísérleteink során 12db hím Wistar patkánnyal dolgoztunk, melyek tömege 250 és 350g között változott. Az állatokat a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék állatházában egyenként hozzávetőleg 150cm² alapterületű ketrecekben elhelyezve tartottuk. Az állatházban a természetes fényhez közeli spektrumú megvilágítást biztosítottunk, ahol 12 órás sötét és 12 órás világos periódus automatikusan váltotta egymást. A világos szakasz reggel 7 órától este 19 óráig, a fénymentes időszak este 19 órától reggel 7-ig tartott. Az állatházban klímaberendezés segítségével állandó, 22 +/- 2°C hőmérsékletet biztosítottunk állataink számára. A patkányok táplálékként standard laboratóriumi patkánytápot (CRLT/N egységes rágcsálótáp, Charles River Kft, Budapest) alkalmaztunk. Az állatok testtömegét a kísérlet kezdete előtt az eredeti testsúlyuk 80-85%-ára csökkentettük a kellő motiváció elérése érdekében. Ezt kísérlet teljes ideje alatt részleges táplálékmegvonással tartottuk fent. A testsúlyt naponta méréssel ellenőriztük. Vízzel az állatok részére korlátlan mennyiségben állt rendelkezésre.

3.2 A késleltetett jutalom leértékelődési paradigma

Az általunk alkalmazott késleltetett jutalom leértékelődési (delay discounting) paradigma (KJL) Evenden és Ryan (1999) munkáján alapszik. A kísérlet során az állatokat moduláris operáns kondicionáló dobozokba ún. Skinner-boxokba (COULBOURN INSTRUMENTS), (5. ábra) helyeztük ahol az volt a feladatuk, hogy pedállennyomás segítségével válasszanak az azonnali kicsi (1 drazsé) és a késleltetett nagy (4 drazsé) jutalom között. Jutalom gyanánt az állatok szacharóz tartalmú táplálék drazsét (45 mg-os pormentes precíziós drazsé, BIOSERV, USA) kaptak. A kísérletet minden héten hétfőtől péntekig végeztük.

Az operáns kondicionáló dobozokban egy etető található, amely jobb és bal oldalán helyezkednek el a pedálok, ezen kívül lámpák segítségével fénystimulusokat alkalmaztunk. A stimulusokat 3 féle lámpa szolgáltatta: az egész dobozt bevilágító házmegvilágítás (house light), az etető lyukban található etetőlámpa (magazine light), valamint a pedálok felett lévő három különböző (piros, sárga, zöld) színű LED izzók (cue light). Az állatokban az operáns kondicionálás segítségével a különböző fénystimulusokat társítottuk a különböző cselekvésekkel úgy, mint fejbedugás, pedálynomás amelyhez a véletlen cselekvés megerősítése érdekében táplálék drazsét használtunk jutalomként. A kísérleti szobában a kísérlet ideje alatt teljes sötétséget biztosítottunk, valamint a szellőztetésre és a külső hangingerek kiküszöbölésére monoton zajt keltő ventilátorokat alkalmaztunk.

A protokoll teljes sötétséggel kezdődött, majd kis idő múlva a házlámpa és a lyuklámpa is világítani kezdett. A lámpák felkapcsolódásától számítva az állatoknak 10 másodpercük volt arra, hogy fejüket bedugják az etetőlyukba. Ez a fejbedugás vagy más néven nose poke (NP). A sikeres NP után a ház és lyuklámpa kialudt és a pedálok felett lévő LED-ek kapcsoltak be 10 másodpercre, ami alatt az állatoknak pedált kellett nyomniuk. Az egyik pedál lenyomása esetén azonnali kis jutalmat (1 drazsét) kaptak, a másik pedál pedig a késleltetett nagy jutalmat (4 drazsét) jelentette. Az egyes ketrecekben változott, hogy a jobb vagy bal oldali pedál jelenti a kis illetve nagy jutalmat. Ha az állat sikeresen végrehajtotta a feladatot és elfogyasztotta a jutalom drazsét vagy drazsékat, újabb fázis kezdődött teljes sötétséggel. Ha hibázott, vagyis nem hajtotta végre a fejbedugást vagy nem nyomta le a pedált a 10 másodperces időkereten belül, előlről kellett kezdenie a feladatot. A protokollokat a Graphic State 1.013-00 (COULBOURN INSTRUMENTS) számítógépes szoftver segítségével írtuk, és ugyan ez a program vezérelte az egyes ketrecek is.



5. ábra. Az operáns kondicionáló berendezés elrendezése a „Késleltetett Jutalom Leértékelődési” (KJL) paradigmában.

Kondicionálás

Mivel a fent leírtak meglehetősen bonyolultak a patkányok számára, ezért a végső protokoll alkalmazása előtt az állatoknak fokozatosan tanítottuk meg az egyes fázisokat. A betanulási időszak alatt az egyszerűbb elsajátítás érdekében csak kis azonnali jutalmat (1 drazsét) alkalmaztunk. Egy nap csak egyféle protokollt tanítottunk az állatoknak elősegítve ezzel a feladatok könnyebb megértését és megjegyzését. A következő fázisba akkor léphettek az állatok, ha teljesítették az előző feladat kritériumait.

Elsőként a fejbedugást kellett megtanulniuk, ami abból állt, hogy a házlámpa és lyuklámpa felvillanását követően 10 másodpercen belül a fejüket az etetőlyukba kellett dugniuk. Ha ez sikerült jutalmat kaptak. Erre a feladatra 40 perc állt a patkányok rendelkezésére. A kritériumot akkor teljesítették az állatok, ha ez alatt az idő alatt 50 sikeres fejbedugást csináltak.

Ezután a pedálynomás tanulása következett. A bal és jobb pedál használatát naponta felváltva gyakoroltattuk. Hogy elkerüljük az állatok összezavarását mindig csak az adott napon tanult pedál volt jelen a ketrecben. Ebben a fázisban a ház- és lyuklámpa működése

után 10 másodperc alatt a fejüket az etetőlyukba kellett helyezniük, és ha ez sikerült a pedál felett világítani kezdett az ún. CueLight 10 másodpercig, ami alatt az állatnak le kellett nyomnia a pedált. A feladat akkor volt sikeres, ha 40 perc alatt legalább 40 pedálynymást teljesítettek az állatok.

A végső protokoll előtti utolsó fázisban mind két pedált visszahelyeztük az operáns kondicionáló berendezésekbe. A sikeres fejbedugás után random az egyik pedál felett felkapcsolódtak a LED-ek, ami után az állatnak 10 másodperc alatt kellett lenyomnia ezt a pedált. A kritérium teljesítésére ez alkalommal is 40 perc állt rendelkezésre, ami alatt 40 sikeres pedálynymást kellett végrehajtaniuk.

A tesztprotokoll

A végső protokoll 5 blokkból tevődött össze. A különböző blokkokban a nagy jutalom késleltetése változott. A késleltetés időtartama az elsőtől az ötödik blokkig a következő képen nőtt: 0, 5, 10, 20 és 40 másodperc. Az azonnali kis jutalomra az állatoknak nem kellett várniuk. A pedál lenyomását itt is a ház és lyuklámpa felkapcsolódása utáni fejbedugásnak kellett megelőznie. Minden blokk egy bemutató fázissal kezdődik, ahol az állatoknak nincs lehetősége a pedál kiválasztására. Először a kis jutalmat eredményező pedál felett lévő LED-ek villantak fel és az állatnak ezt kellett lenyomnia, majd a következő fejbedugás után a nagy jutalmat adó pedált kellett választania, ahol a pedál lenyomását a nagy jutalom az adott blokkra jellemző késéssel követte. Ezt az adott blokkban 9 szabad választás követte, ahol a patkánynak a sikeres fejbedugás után választania kellett a kis azonnali jutalmat (1 draszt) és a késleltetett nagy jutalmat (4 draszt) reprezentáló pedálok között. Csak akkor léphetett a következő fázisba illetve blokkba, hogyha hibátlanul teljesítette az előző fázis kritériumait. Előfordult, hogy az állatok nem fejezték be a feladatot, ezért teljesítettnek tekintettük, ha a szabad választások 80%-át azaz 9-ből 7-et teljesítettek.

Hibátlan teljesítés esetén, és ha a reakcióidőket nullának vesszük az egész protokoll teljesítése 100 percig tart. Hibák esetén is lehetőség volt a feladat teljesítésére, de a program 120 perc után automatikusan leállította a protokollt, függetlenül attól, hogy az állat meddig jutott el a teljesítésében. Az anyagbeadások előtt addig gyakoroltattunk az állatokkal, míg hibátlan többnyire egységes teljesítményt nem nyújtottak. A tesztprotokoll összefoglalása az **6. ábrán** látható.

<u>1.pedál</u> - kis jutalom (1drazsé)	
<u>2.pedál</u> - nagy jutalom (4drazsé)	
<u>5 blokk</u> : 1.blokk <u>2.pedál</u> →0 sec vagy <u>1.pedál</u> 0sec	} 120 min
2.blokk <u>2.pedál</u> →5 sec vagy <u>1.pedál</u> 0sec	
3.blokk <u>2.pedál</u> →10 sec vagy <u>1.pedál</u> 0sec	
4.blokk <u>2.pedál</u> →20 sec vagy <u>1.pedál</u> 0sec	
5.blokk <u>2.pedál</u> →40 sec vagy <u>1.pedál</u> 0sec	
• Minden blokk elején 1 bemutató fázis majd 10 szabad választás	

6. ábra. A tesztprotokoll összefoglalása.

3.3 Anyagbeadások

A tesztprotokoll megfelelő teljesítése után az anyagbeadások következtek. Minden anyag beadása intraperitoneális (i.p.) injekcióval történt 1 ml-es tuberculin fecskendő segítségével, 1 ml/kg-os végtérfogattal. A beadási térfogatokat minden nap az állatok aktuális testsúlyából számoltuk ki. Minden esetben az akut hatást vizsgáltuk, ezért két anyagbeadás közti napon az adott anyag oldószerét használtuk kontrollként a testtömegüknek megfelelő térfogatban. A hét első napján minden esetben az azon a héten injektált anyag oldószerét kapták az állatok. Az anyagbeadás kezdete előtt a patkányok egy hétig minden nap fiziológiás sóoldatot kaptak az injekciózással járó stresszhez való szoktatás érdekében.

Elsőként koffeint (50 m/m%-os koffein tartalmú koffein-nátrium-benzoát, Egyetemi Gyógyszertár, Pécs) alkalmaztunk fiziológiás sóoldatban oldva. A koffeinre számolva 10, 25 és 50 mg/kg dózisokkal dolgoztunk. A beadást követően 5 percet vártunk a magatartási teszt indításáig.

Ezt követően az A2A agonista CGS21680-at (CGS) (Sigma) alkalmaztuk önmagában, valamint 25 mg/kg dózisú koffeinnel együtt, 0,01; 0,03 és 0,1 mg/kg dózisokat használva. Oldószerként polietilén-glikolt (PEG) használtunk. A beadás után 15 percet vártunk, majd ezután injektáltuk a koffeint.

A CGS-t követően az A1 agonista N6-ciklohexil adenozint (CHA) (Sigma) vizsgáltuk önmagában és koffeinnel (25 mg/kg) együtt injektálva. A CHA-t szintén három dózisban alkalmaztuk, ezek: 0,00313 mg/kg; 0,00625mg/kg és 0,0125mg/kg. A CHA feloldására fiziológiás sóoldatot (Salsol A) használtunk. A CHA beadását követően 15 percet vártunk a koffein injektálásával.

Az A1 és A2A receptor agonistákkal együtt a közepes 25 mg/kg dózisú koffeint választottuk, mivel ez a dózis még szignifikánsan csökkenti az impulzivitást a kontrollhoz képest, és feltehetően nem volt túl magas ahhoz, hogy leszorítsa a másik vizsgált anyagot az adott receptorról.

Az összes farmakon esetében mindhárom dózist háromszor injektáltuk és eredményeinket ezen beadások átlagából számítottuk. Az anyagbeadások összefoglalása a **7. ábrán** látható.

• Koffein (KOFF):	10mg/ttkg 25mg/ttkg 50mg/ttkg	
• CGS21680 (CGS):	0,01 mg/ttkg 0,03 mg/ttkg 0,1 mg/ttkg	} + koffein 25 mg/ttkg
• N6-cyclohexyl adenozin (CHA):	0,00313 mg/ttkg 0,00625 mg/ttkg 0,0125 mg/ttkg	

7. ábra. Az anyagbeadások összefoglalása.

3.4 Az adatok feldolgozása, statisztikai próbák

A kísérlet során mért adatokat a Graphic State programból exportáltuk és a MATLAB (7.9 R2009b, The MathWorks, 2009) numerikus programrendszer segítségével értékeltük ki. Az eredmények statisztikai értékeléséhez az SPSS nevű szoftvert használtuk, azon belül pedig párosított varianciaanalízis (repeated measures ANOVA, rANOVA) tesztekét végeztünk. A csoportátlagokat szignifikánsan különbözőnek tekintettük a $p < 0,05$ valószínűség alatt, amit az ábrákon csillaggal, jelöltünk.

Az eredmények értékelése során a késleltetett jutalom %-os választási arányát ábráztuk, ezáltal megkaptuk a késleltetett jutalom leértékelődési alapgörbét. Ezután a görbe alatti területeket számoltuk, amit az impulzivitás jellemzésére szolgáló mérőszámnak tekintettünk. Ennek előnye, hogy egy mérőszámmal képes kifejezni az impulzivitás mértékét, szemben az egyes késleltetések külön elemzésével. Minél nagyobb a görbe alatti terület annál nagyobb a késleltetett jutalom választási aránya, tehát kisebb az impulzív választások száma. Az egyes farmakonokhoz tartozó területek átlagát a MATLAB környezetben írt saját fejlesztésű szoftver segítségével számoltuk ki. A csoportátlagokat $\pm$ az átlag standard hibája (standard error of mean, S.E.M) oszlopdiagramokon ábráztuk.

Általános motoros aktivitás alatt az összes végrehajtott fejbedugást, valamint a bal és a jobb pedálnyomások összegének átlagát értjük. Mivel ez tartalmazza a helytelen (nem időben végrehajtott) válaszokat is ezért tekinthetjük a motoros impulzivitás mérőszámának. A beadásokhoz tartozó cselekvésszámok csoportátlagát ($\pm$ S.E.M) oszlopdiagramokon ábráztuk.

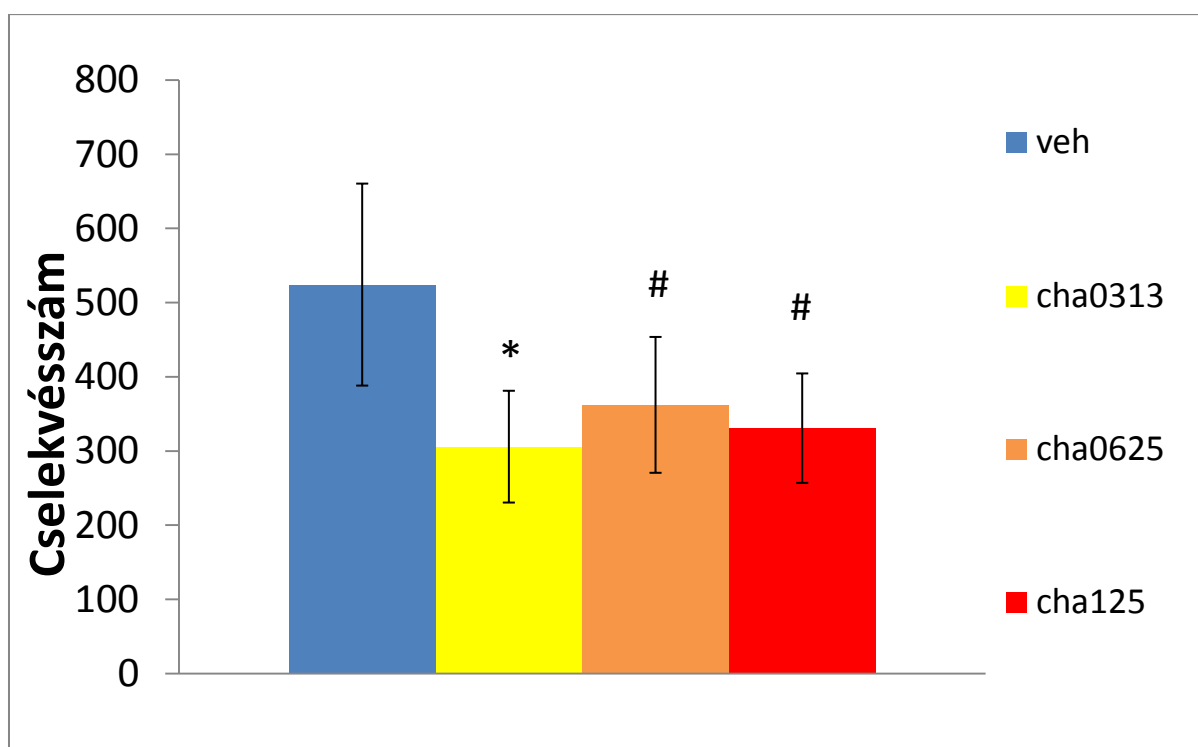
4. EREDMÉNYEK

4.1 Motoros impulzivitás

A következő ábrák az állatok motoros aktivitását ábrázolja, amit a cselekvésszám segítségével fejeztünk ki. Cselekvésszám alatt a protokoll folyamán végrehajtott fejbedugások és pedálynnyomások (mind két pedálon) összegét értjük. Mivel ideális esetben (ha az állat csak is a megfelelő időben és számban végzi el a fenti cselekvéseket) ennek az értéknek minden ülés esetén egyeznie kellene, ezért az ezt meghaladó értékek felfoghatók a motoros impulzivitás mérőszámaként.

Az A1 receptor agonista CHA hatása a motoros impulzivításra

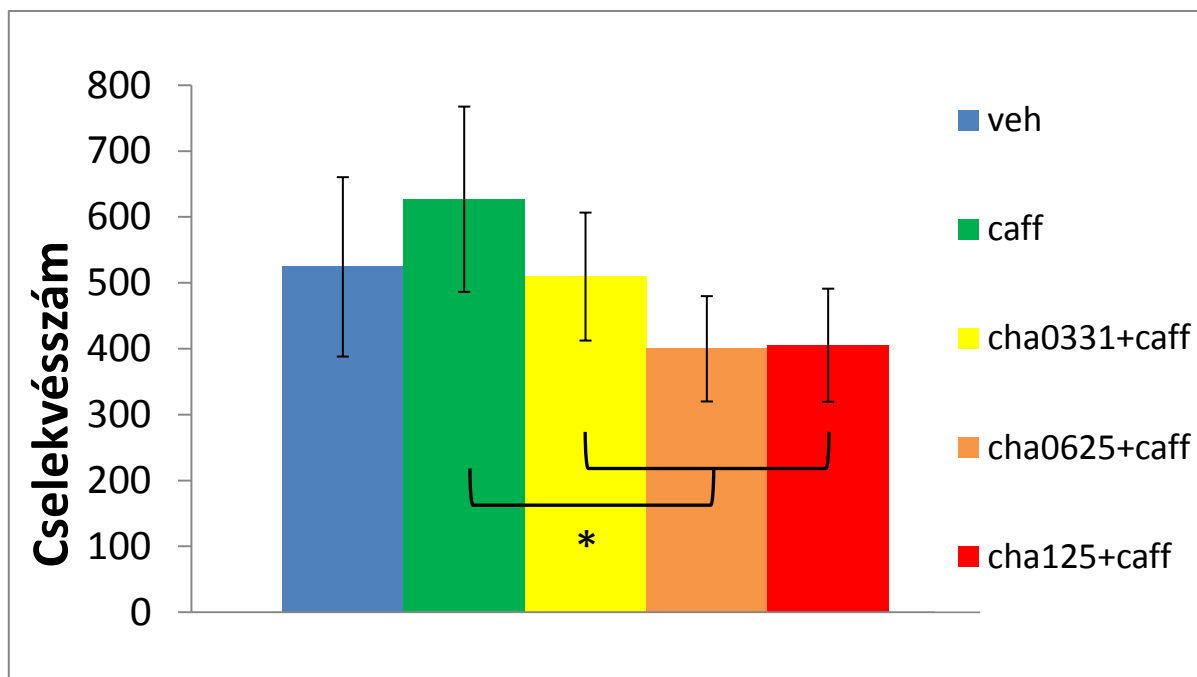
Az A1 receptor agonista CHA mindhárom dózisban való alkalmazása esetén szignifikánsan csökkentett a motoros impulzivitást a kontrollnál tapasztalhoz képest ($p < 0.05$, $\#p = 0.05$) (8. ábra).



8. ábra. Az A1 receptor agonista N6-ciklohexil adenzin (CHA) a mindhárom dózisban csökkentette a cselekvésszámot a kontrollhoz képest ($n=12$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(3,105)=3,966$; $*p < 0,05$; $\#p = 0,058$) (átlag $\pm$ S.E.M).

Az A1 receptor agonista CHA és a koffein együttes hatása a motoros impulzivitásra

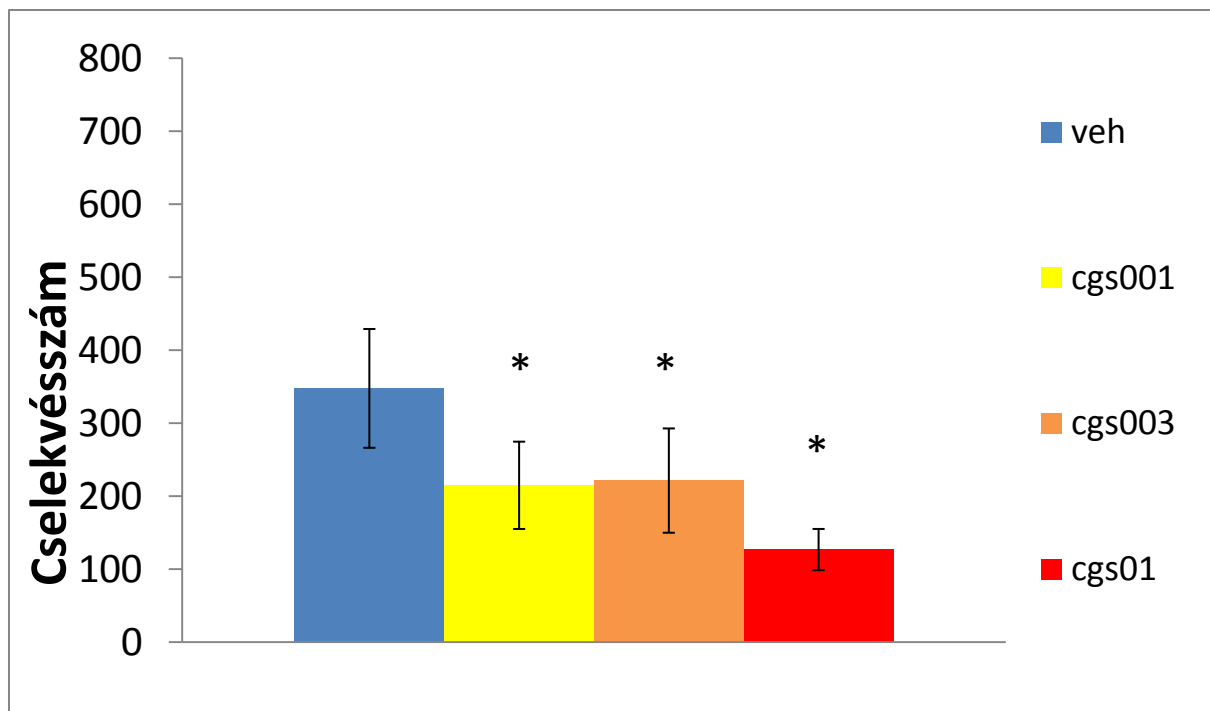
Az A1 receptor agonista CHA koffeinnel együtt alkalmazva mindhárom dózisa esetén szignifikánsan csökkentette a koffein okozta motoros impulzivitást, de a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns a különbség ($p < 0,05$). (9. ábra).



9. ábra. A koffein csökkentette az A1 receptor agonista CHA hatását a motoros impulzivitásra ($n=12$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(4,140)=5,126$; $*p < 0,05$) (átlag $\pm$ S.E.M.).

Az A2A receptor agonista CGS hatása a motoros impulzivitásra

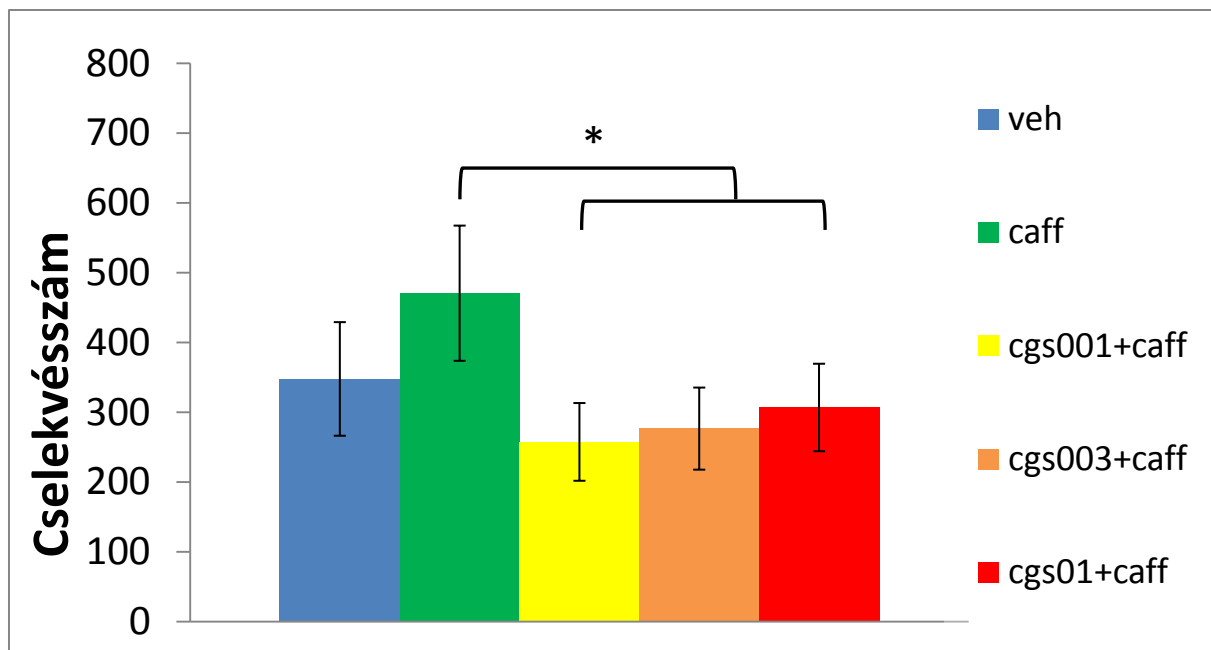
Az A2A receptor agonista CGS önmagában alkalmazva szignifikánsan csökkentette az állatok motoros impulzivitását a kontrollhoz képest ($p < 0,05$) (10. ábra).



10. ábra. Az A2A receptor agonista CGS szignifikánsan csökkentette a motoros impulzivitást a kontrollhoz képest. ($n=8$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(3,51)=6,920$; $*p<0,05$) (átlag $\pm S.E.M$).

Az A2A receptor agonista CGS hatása a motoros impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva

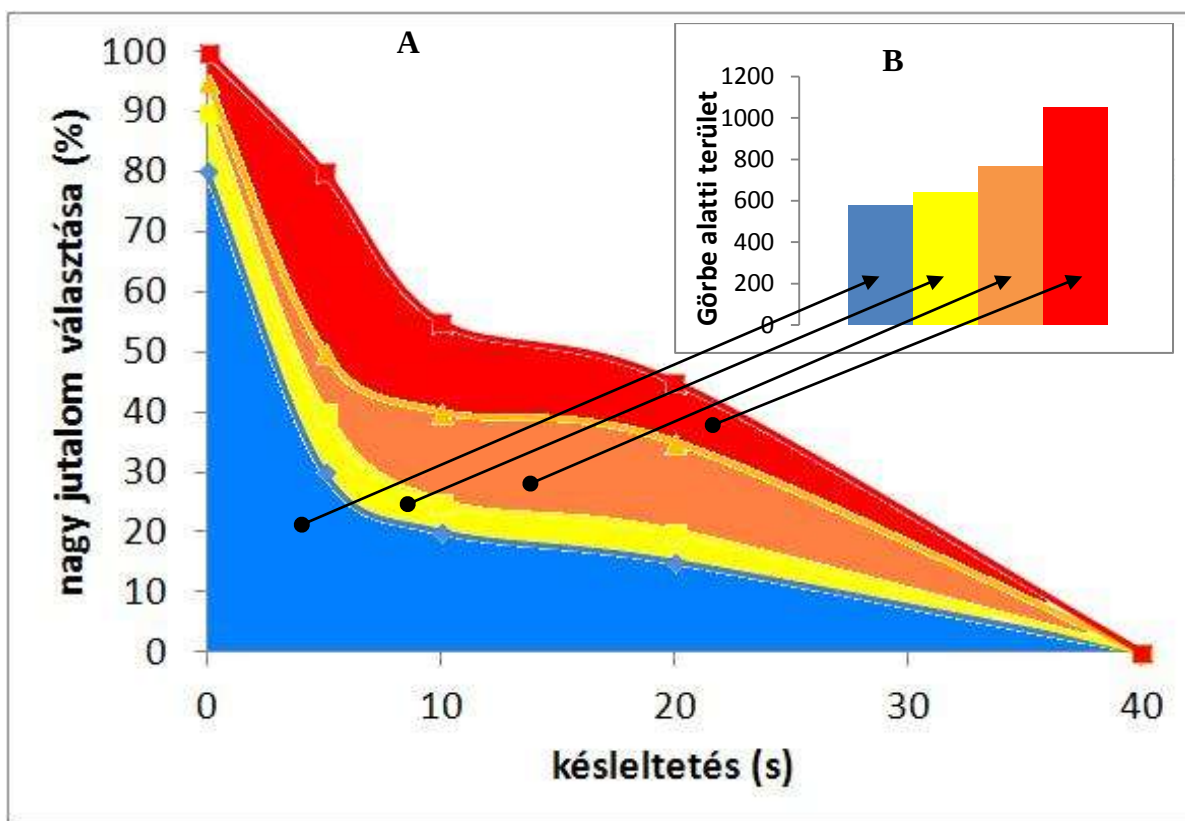
A A2A receptor agonista CGS és koffein együtt alkalmazva mindhárom alkalmazott dózisban szignifikánsan csökkentette a koffein hatását a motoros impulzivitásra, de a vehiculumhoz képest nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p<0,05$). Tehát a koffein rontotta a CGS motoros impulzivitást csökkentő hatását mindhárom CGS dózis esetén (**11. ábra**).



11. ábra. A koffein csökkentette az A2A receptor agonista CGS hatását a motoros impulzivitásra ($n=8$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(3,51)=3,415$; $*p<0,05$) (átlag $\pm S.E.M$).

4.2 Választási impulzivitás

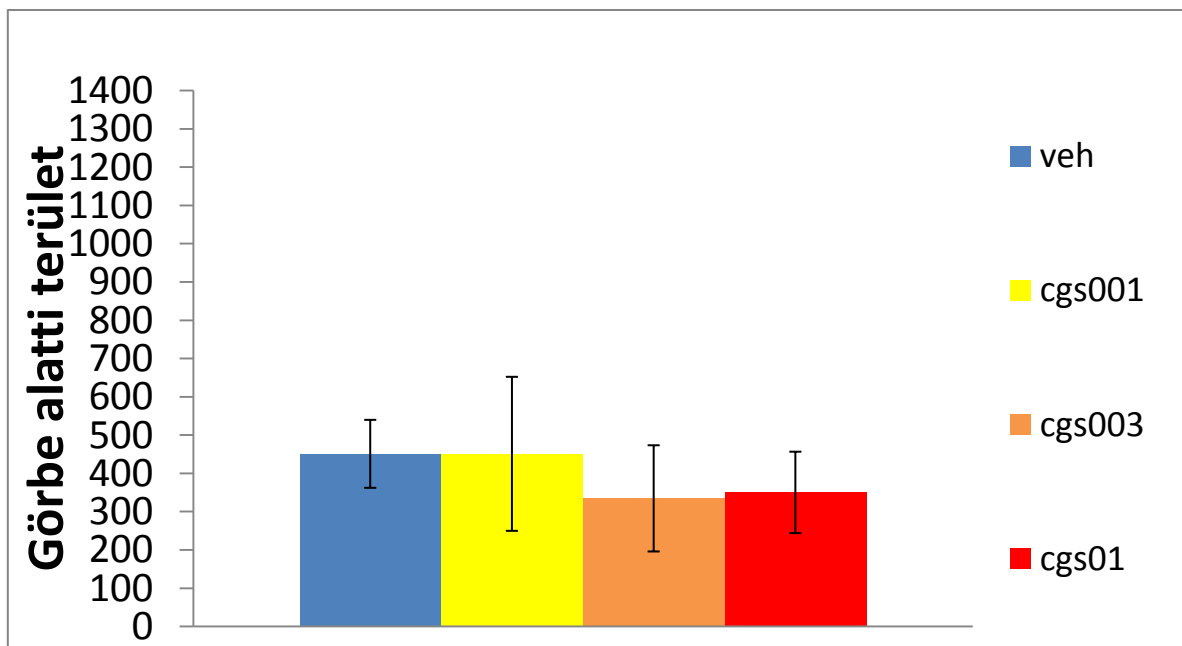
A 12./A ábrán a jutalom leértékelődési alapgörbe látható. Az x tengelyen a nagy jutalom blokkonkénti késleltetése szerepel, az y tengelyen pedig a nagy jutalom választásának %-os átlaga. Az új ábrázolási módszerünk segítségével, miszerint a jutalom leértékelési alapgörbe alatti területeket oszlopdiagramokon ábrázoljuk (12./B ábra), egy értékkel ki tudjuk fejezni az impulzivitás mértékét, szemben az egyes késleltetések külön elemzésével. A terület növekedésével arányosan következtethetünk a nagy jutalom választási arányának növekedésére, vagyis a választási impulzivitás csökkenésére.



12. ábra. Hipotetikus jutalom leértékelési alapgörbék (A) és a görbe alatt lévő területek oszlopdiagramos ábrázolása (B).

Az A2A receptor agonista CGS hatása a választási impulzivításra

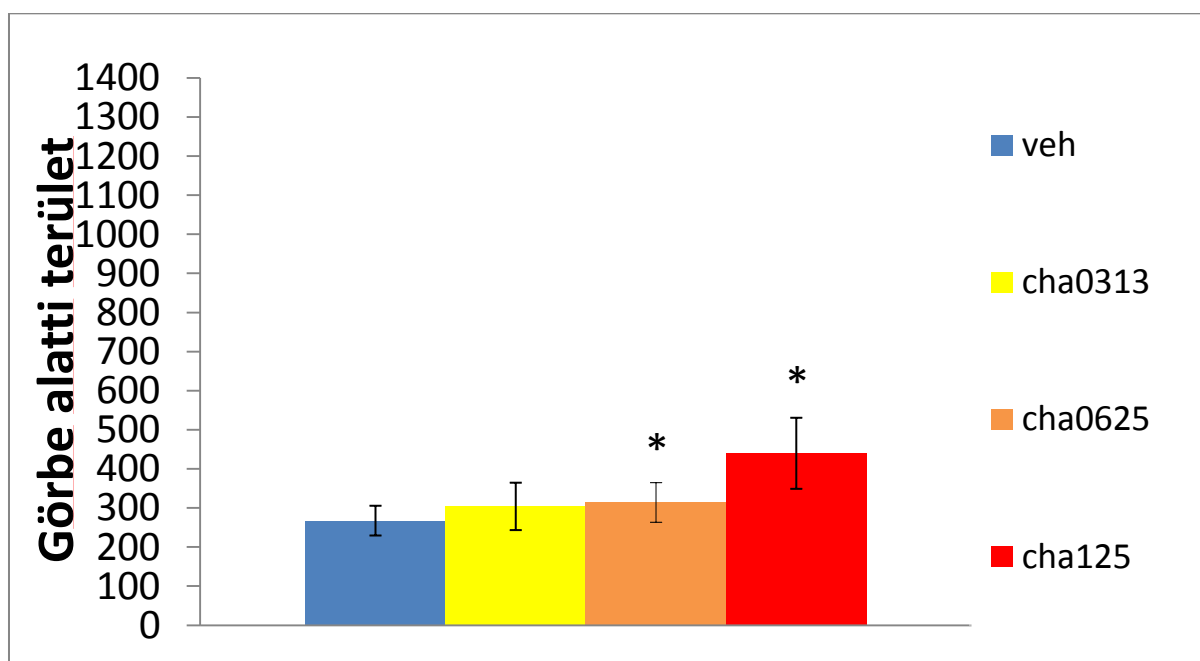
Az A2A receptor agonista CGS önmagában alkalmazva egyik alkalmazott dózis esetén sem volt szignifikáns hatással a választási impulzivításra a KJL paradigmában (13. ábra).



13. ábra. Az A2A receptor agonista CGS önmagában alkalmazva nem változtatta meg a görbe alatti területet ($n=8$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(3,21)=0,972$; N.S.) (átlag $\pm$ S.E.M.).

Az A1 receptor agonista CHA hatása a választási impulzivitásra

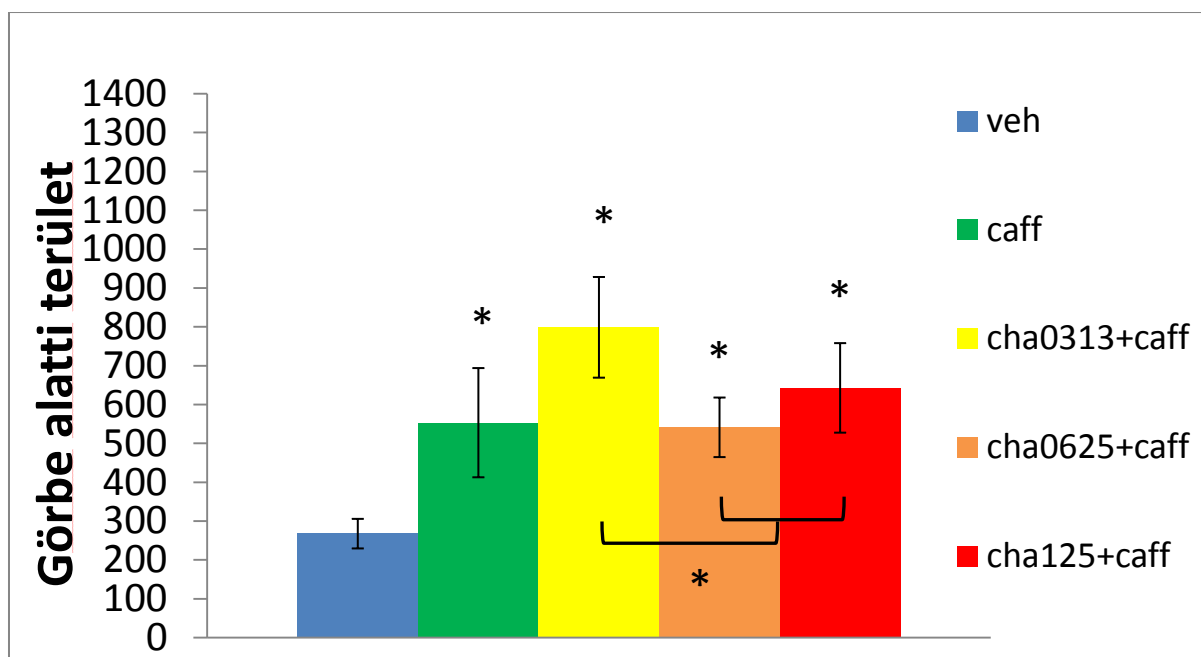
Az A1 receptor agonista CHA a közepes és nagy dózis esetén szignifikánsan növelte a görbe alatti területet, tehát csökkentette a választási impulzivitás mértékét a kontrollhoz képest ($p<0,05$) (14. ábra).



14. ábra. Az A1 receptor agonista CHA önmagában alkalmazva csökkentette a választási impulzivitást ($n=12$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(3,33)=7,288$; $*p<0,05$) (átlag $\pm$ S.E.M.).

Az A1 receptor agonista CHA hatása a választási impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva

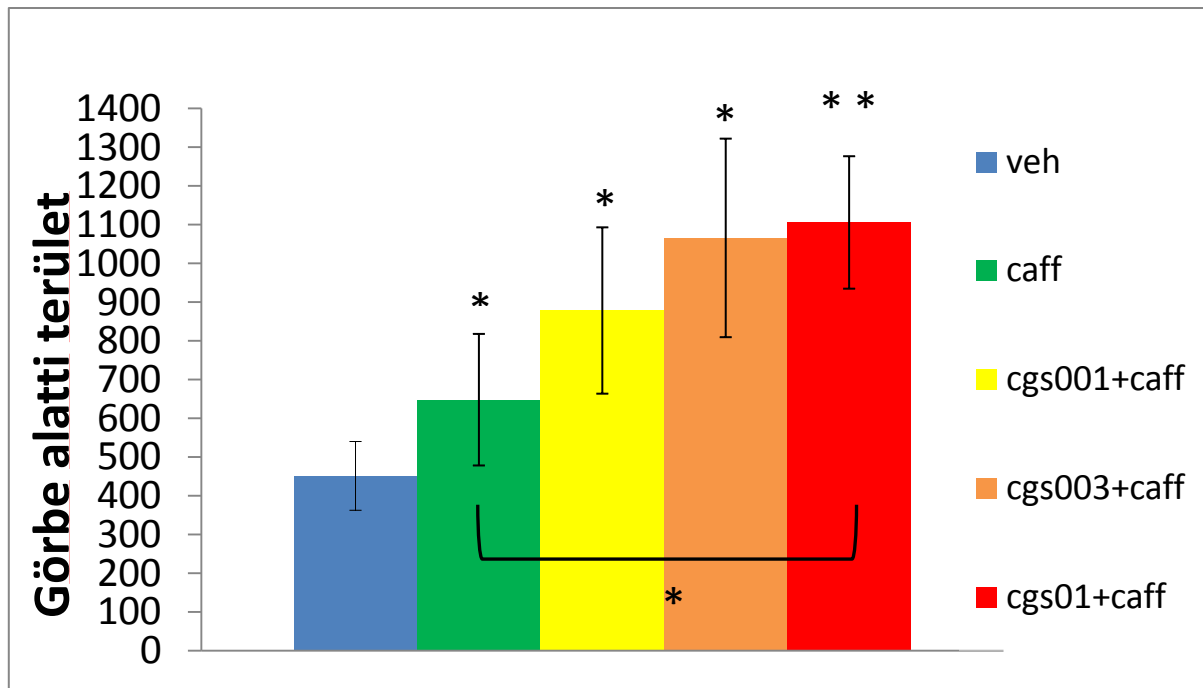
Az A1 receptor agonista CHA-t koffeinnel együtt alkalmazva mindhárom dózisban szignifikánsan csökkentette a választási impulzivitást ($p < 0,05$), valamint a koffein szignifikánsan növelte a CHA legkisebb dózisának hatását a választási impulzivitásra a közepes és nagy dózisokhoz képest ($p < 0,05$) (15. ábra).



15. ábra. Az A1 receptor agonista CHA koffeinnel együtt alkalmazva is növelte a görbe alatti területet. Leghatékonyabbnak a 0,313 mg/kg-os dózis bizonyult. ($n=12$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(4,44)=9,069$; $*p < 0,05$) (átlag $\pm$ S.E.M).

Az A2A receptor agonista CGS hatása a választási impulzivitásra koffeinnel együtt alkalmazva

Az A2A receptor agonista CGS koffeinnel együtt alkalmazva növelte a koffein hatását a választási impulzivitásra. A legnagyobb dózis alkalmazása esetén a görbe alatti terület jelentősen nagyobb a kontrollhoz képest ($p < 0,01$), valamint a koffein önmagában mért hatásától is szignifikánsan különbözik ($p < 0,05$) (16. ábra).



16. ábra. Az A2A receptor agonista CGS koffeinnel együtt alkalmazva dóziszfüggően növelte a koffein antiimpulzív hatását. ($n=8$; $rANOVA$, kezelés főhatás: $F(4,28)=5,181$; $*p<0,05$; $**p<0,01$) (átlag $\pm S.E.M$).

5. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Jelen kísérleteink során az adenzin receptorokra, ezen belül főként az A1 és A2A receptorokra ható farmakonokat vizsgáltuk az impulzivitás állatkísérletes modelljében, amihez hím Wistar típusú patkányokat használtunk. Ezen vizsgálatokhoz a késleltetett jutalom leértékelődési paradigmát alkalmaztuk, melyben az állatoknak pedálok lenyomásával választaniuk kellett az azonnali kis jutalom és a késleltetett nagy értékű jutalom között.

Az állatokat a kondicionálás után anyagbeadás nélkül vizsgáltuk, mely vizsgálatok során az összes állatnál megfigyelhettük, mind a motoros mind a választási impulzivitást. Jelentős különbségeket figyelhettünk meg az egyes állatok impulzív választásainak aránya, valamint a motoros impulzivitás mértéke között.

5.1 Az adenzin receptorok és a motoros impulzivitás kapcsolata

Az A1 receptor agonista CHA önmagában alkalmazva mindhárom dózisban szignifikánsan csökkentette a motoros impulzivitást a kontrollhoz képest, ami valószínűleg annak volt köszönhető, hogy negatív moduláló hatást fejt ki a központi neuronokra valamint csökkenti a D1 típusú dopamin receptorokra ható agonisták ismert lokomotoros (pszicho motoros) aktivitást előidéző hatását (FREDHOLM és mtsai., 1999).

Az A1 receptor agonista CHA koffeinnel együtt alkalmazva mindhárom dózisa esetén szignifikánsan csökkentette a koffein okozta motoros impulzivitást, de a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns a különbség. Ebből következik, hogy a CHA csökkentette a koffein motoros impulzivitást serkentő hatását, mely hatást valószínűleg az A1 receptorok gátlásával ért el.

Az A2A receptor agonista CGS önmagában való alkalmazása során a motoros impulzivitás csökkenését figyelhettük meg a CGS mind három alkalmazott dózisa esetén. Ez a hatás feltehetőleg annak köszönhető, hogy az A2A receptorok csökkentik a D2 típusú dopamin receptorok dopaminnal szemben való érzékenységet, de nem antagonizálják azt (FERRÉ és mtsai. 1997).

Az A2A receptor agonista CGS és koffein együtt alkalmazva mindhárom alkalmazott dózisában szignifikánsan csökkentette a koffein által megnövelt motoros impulzivitást, a kontrollhoz képest azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Ezen eredmények

alapján arra következtethetünk, hogy a koffein rontott a CGS motoros impulzivitást csökkentő hatásán, ami azzal magyarázható, hogy az A2A receptorok antagonizálása gyengítheti ezen receptorok hatását a D2 típusú dopamin receptorok dopaminnal szemben való érzékenysége (FERRÉ és mtsai. 1997).

5.2 Az adenosin receptorok és a választási impulzivitás kapcsolata

Korábbi kísérleteinkben a koffein vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy dózisfüggően csökkenti az impulzív választások arányát. E szerint a koffein három dózisa közül a 10 mg/kg kisebb, a 25 mg/kg jelentősebb, míg az 50 mg/kg dózis a legnagyobb mértékben volt antiimpulzív hatással az állatokra (KARDOS, 2009). Ezen hatást valószínűleg azzal éri el, hogy az adenosin receptorokon keresztül serkenti a dopamin ürülést, mivel korábban megfigyelték, hogy koffein az A1 és A2A receptorok antagonizálásával fokozza a dopamin ürülés mértékét (CAULI és MORELLI, 2005; CARDINAL, 2006; CARDINAL és mtsai., 2001; DALY és FREDHOLM, 1998; EVERITT és WOLF, 2002). Másrészt az A1 receptorokon keresztül indirekt dopamin agonistaként dózisfüggően növeli az extracelluláris dopamin szintjét a striátumban (MORGAN és VESTAL 1989; OKADA és mtsai., 1997). A dopaminerg valamint kisebb mértékben a noradrenerg neurotranszmisszió befolyásolja az impulzív viselkedést és hatással vannak a késleltetett jutalom leértékelésében (CARDINAL, 2006; CARDINAL és mtsai., 2000, 2001; VAN GAALEN és mtsai., 2006). Valamint kimutatták a csökkent előagyi dopaminszint növeli, a dopamin szintjét növelő farmakonok (gyógyszerek és egyes kábítószeresek) pedig csökkentik az impulzivitás mértékét (CARDINAL és mtsai., 2000; WINSTANLEY és mtsai., 2003, 2005). Jelenlegi kísérletünk ezen eredmények háttérének részletesebb megismerésére irányult. Mivel a koffein a magatartási hatását főként az adenosin receptorok antagonizálásával éri el, és legnagyobb affinitással az A1 és az A2A receptorokhoz kötődik, ezért kísérletünk célja ezen receptorok impulzív viselkedésben betöltött szerepének megismerése volt.

Az A1 receptor agonista CHA önmagában alkalmazva a közepes és nagy dózis esetén szignifikánsan növelte a nagy jutalom választási arányát a kontrollhoz képest.

Az A2A adenosin receptorokra ható agonista CGS három dózisának önmagában való alkalmazása során nem volt megfigyelhető a görbe alatti területek szignifikáns változása a kontrollhoz képest, tehát nem volt hatással az állatok választási impulzivitására.

A CHA a koffeinnel együtt alkalmazva mindhárom alkalmazott dózis esetén szignifikánsan csökkentette az állatok által produkált impulzív választások számát. Ezen felül a koffein szignifikánsan növelte a CHA legkisebb dózisának hatását a választási impulzivitásra a közepes és nagy dózisokhoz képest

A CGS és koffeint együtt injektálva azt figyelhettük meg, hogy a CGS jelentős mértékben növelte a koffein impulzív választást csökkentő hatását. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a koffein választási impulzivitást csökkentő hatásáért nem az A2A receptorokon kifejtett antagonist hatása felelős. Valamint a koffein motoros aktiváló hatásának csökkentése, szintén elősegíti a választási impulzivitás csökkentését. Felvetődik még, hogy a koffeinnak az A2A receptorokról való részleges leszorítása (CGS alkalmazása) következtében a szorongáskeltő hatás is csökken, ezáltal javul a késleltetett jutalom választási aránya.

Eredményeink tudományos szempontból újak számítanak, mivel jelenleg nem található az A1 és A2A receptorok illetve azokon ható vegyületek hatását KJL paradigmával vizsgáló tanulmányok.

5.3 Kitekintés

Kísérletünk hozzá járult az A1 és A2A típusú receptorok, valamint a rájuk ható farmakonok impulzív viselkedésben betöltött szerepének megismeréséhez. Eredményeink felhasználhatóak a gyógyszerkutatás terén, valamint segítséget nyújthatnak a pszichiátriai szindrómák tüneteként jelentkező impulzív viselkedés kezelésében.

Felvetődött a kérdés, hogy a késleltetett jutalom növelése milyen mértékben csökkentené az impulzív választásokat a KJL paradigmában, ezért tervezzük a nagyobb késleltetett jutalom (5-6 draszté) alkalmazását és hatásának vizsgálatát az impulzív választások arányára. Valamint szeretnénk megvalósítani elképzelésünket, miszerint a KJL paradigmát elektrofiziológiai illetve pszichofiziológiai módszerekkel kombináljuk, ami jelentős mértékben segítené a központi idegrendszeri folyamatok impulzív viselkedésben betöltött szerepének vizsgálatát.

Terveink között szerepel az A1 és A2A receptorok és a rájuk ható farmakonok (az A1 és A2A receptorokon ható szelektív antagonisták) vizsgálata. Továbbá szeretnénk vizsgálni az A2B és A3 típusú adenosin valamint a P2 receptor családba tartozó receptorokon ható vegyületeket a KJL paradigma segítségével.

Ezekon kívül egyéb magatartási, jelleg-vizsgálati tesztek (porondteszt, emelt keresztpalló teszt, feszélyezett úszás teszt, stb.) alkalmazásával, tervezzük feltárni, hogy az impulzivitás összefüggésbe hozható-e más magatartási rendellenességekkel, mint például a depresszió vagy a szorongás.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Impulzivitás alatt több a viselkedésben megjelenő motoros és kognitív (választási impulzivitás, kockázatvállalás) rendellenességet értünk. Az impulzív viselkedés számos pszichiátriai szindróma során (pl.: figyelemhiányos hiperaktivitási szindróma, mánia, függőség) tünetként jelentkezik, ami indokolja az iránta való jelentős tudományos érdeklődést. Hatását főként az adenosin receptorok antagonizálásával fejtí ki. Korábbi kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a koffein a szorongást és motoros impulzivitást növelő hatása ellenére dóziszfüggően csökkenti a választási impulzivitást patkányban.

Célunk az adenosin receptoroknak a koffein választási impulzivitást csökkentő hatásában betöltött szerepének részletesebb megismerése volt.

A kísérletekhez hím Wistar patkányokat (n=27) használtunk, melyeknek az azonnali kicsi (1draszé) és a késleltetett nagy (4draszé) jutalom közül kellett választaniuk a késleltetett jutalom leértékelődési paradigmában. A kísérlet során i.p. injektáltuk az A1 receptor agonista N6-cyclohexyl-adenozint (CHA, 0.00313, 0.00625, 0.0125 mg/kg) vagy az A2A receptor agonista CGS21680-at (CGS, 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg) koffeinnel (10, 25, 50 mg/kg) együtt és önmagukban. Mind két agonista önmagában, valamint koffeinnel együtt alkalmazva is csökkentette a motoros impulzivitást.

A CHA egyedüli alkalmazása szignifikánsan csökkentette a választási impulzivitást, viszont a CGS önmagában nem volt hatással a választási impulzivitásra. Az A2A agonista CGS koffeinnel együtt adva dóziszfüggően erősítette annak hatását.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a koffein választási impulzivitást csökkentő hatásáért nem az A2A receptorokon kifejtett antagonist hatás felelős. Valamint a koffein motoros aktiváló hatásának csökkentése, szintén elősegíti a választási impulzivitás csökkentését. Felvetődik még, hogy a koffeinnek az A2A receptorokról való részleges leszorítása (CGS alkalmazása) következtében a szorongáskeltő hatás is csökken, ezáltal javul a késleltetett jutalom választási aránya.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Arnaud, M.J. 1993. Metabolism of caffeine and other components of coffee In: Garattini S, ed. Caffeine, Coffee and Health, pp 43–95. Raven Press, New York
- Basar K, Sesia T, Groenewegen H, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V, Temel Y. 2010. Nucleus accumbens and impulsivity. *Prog Neurobiol* 92:533-57
- Berridge CW. 2006. Neural substrates of psychostimulant-induced arousal. *Neuropsychopharmacology* 31:2332-40
- Blanchard J, Sawers SJ. 1983. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 24:93-8
- Bonci A, Williams JT. 1996. A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. *Neuron* 16:631-9
- Cardinal RN. 2006. Neural systems implicated in delayed and probabilistic reinforcement. *Neural Netw* 19:1277-301
- Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ. 2001. Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 292:2499-501
- Cauli O, Morelli M. 2005. Caffeine and the dopaminergic system. *Behav Pharmacol* 16:63-77
- Chambers RA, Potenza MN. 2003. Neurodevelopment, impulsivity, and adolescent gambling. *J Gambl Stud* 19:53-84
- Chvasta TE, Cooke AR. 1971. Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology* 61:838-43
- Daly JW, Fredholm BB. 1998. Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51:199-206
- Diller JW, Saunders BT, Anderson KG. 2008. Effects of acute and repeated administration of caffeine on temporal discounting in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 89:546-55
- Dunwiddie TV, Masino SA. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55
- Evenden JL. 1999. Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* 146:348-61
- Evenden JL, Ryan CN. 1996. The pharmacology of impulsive behaviour in rats: the effects of drugs on response choice with varying delays of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 128:161-70
- Everitt BJ, Wolf ME. 2002. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22:3312-20

- Fastbom J, Pazos A, Probst A, Palacios JM. 1987. Adenosine A1 receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 22:827-39
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-7
- Ferre S, O'Connor WT, Fuxe K, Ungerstedt U. 1993. The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J Neurosci* 13:5402-6
- Flora, S.R., Dietze, M.A. (1993). Caffeine and impulsiveness in rats. *Bull Psychon Soc*, 31, 39–41.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, et al. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-56
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83-133
- Freissmuth M, Schutz W, Linder ME. 1991. Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J Biol Chem* 266:17778-83
- Gasior M, Jaszyna M, Peters J, Goldberg SR. 2000. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1101-11
- Harvey J, Lacey MG. 1997. A postsynaptic interaction between dopamine D1 and NMDA receptors promotes presynaptic inhibition in the rat nucleus accumbens via adenosine release. *J Neurosci* 17:5271-80
- Kardos P, 2009. Az impulzív viselkedés neurobiológiai hátterének kísérletes vizsgálata patkányban. Szakdolgozat PTE-TTK Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék,
- Lin AS, Uhde TW, Slate SO, McCann UD. 1997. Effects of intravenous caffeine administered to healthy males during sleep. *Depress Anxiety* 5:21-8
- Mayfield RD, Suzuki F, Zahniser NR. 1993. Adenosine A2A receptor modulation of electrically evoked endogenous GABA release from slices of rat globus pallidus. *J Neurochem* 60:2334-7
- Nehlig A. 1999. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563-76
- Okada M, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, et al. 1997. Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by in vivo microdialysis. *Eur J Pharmacol* 321:181-8
- Phillis JW, Edstrom JP. 1976. Effects of adenosine analogs on rat cerebral cortical neurons. *Life Sci* 19:1041-53

- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. 1997. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265-8
- Portas CM, Thakkar M, Rainnie DG, Greene RW, McCarley RW. 1997. Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79:225-35
- Robbins TW. 2002. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)* 163:362-80
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B. 1978. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276:839-41
- van Gaalen MM, van Koten R, Schoffemeer AN, Vanderschuren LJ. 2006. Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. *Biol Psychiatry* 60:66-73
- Winstanley CA, Baunez C, Theobald DE, Robbins TW. 2005. Lesions to the subthalamic nucleus decrease impulsive choice but impair autoshaping in rats: the importance of the basal ganglia in Pavlovian conditioning and impulse control. *Eur J Neurosci* 21:3107-16
- Winstanley CA, Dalley JW, Theobald DE, Robbins TW. 2003. Global 5-HT depletion attenuates the ability of amphetamine to decrease impulsive choice on a delay-discounting task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 170:320-31

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Hernádi Istvánnak a munkámban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és útmutatásáért, Horváth Hajnalkának és Kardos Péternek a kísérlet során nyújtott segítségért, Trunk Attilának és Kovács-Bálint Zsófiának az adatok kiértékelésében végzett munkájáért, Antal Jánosnének, Gödri Zoltánnak, Jacsó Ildikónak az állatok gondozásáért, valamint a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék minden munkatársának.

9. NYILATKOZAT

9.1 Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Csurgók Roland Lajos a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- az állatok gondozása,
- a patkányok kísérlethez szoktatása (kondicionálás),
- a tesztprotokoll felügyelete,
- az alkalmazott farmakonok injektálása,
- az adatok feldolgozása,
- az eredmények értékelése,

végeztem el.

.....

aláírás

Pécs, 2012 január 09.