

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**A dopaminerg neurotranszmisszió in vivo voltammetriás
vizsgálata emlős agyban**

OTDK dolgozat

Készítette:

Nagy Lili Veronika

Biológus BSC hallgató

Témavezetők:

Bali Zsolt és Dr. Hernádi István

Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék

és PTE Szentágotthai Kutatóközpont

Tartalomjegyzék:

1. Általános bevezető	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A dopaminerg-rendszer	4
2.1.1. Mezulimbikus útvonal	5
2.1.2. Mezőkörtikális útvonal	5
2.1.3. Tuberoinfundubuláris útvonal	5
2.1.4. Nigrostriatális útvonal	5
2.2. A dopamin bioszintézise, felszabadulásának, valamint eliminálódásának módja Dopamin receptorok	6
2.3 Dopamin receptorok	9
2.4. Dopamin mérésére használható elektroanalitikai módszerek	10
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1. Műtéti eljárások	13
4.2. Elektromosan stimulált dopamin-felszabadulás in vivo mérése	15
4.3. Hisztológiai munkálatok	16
4.4. Elektródok kalibrálása	16
5. Eredmények és megbeszélésük	17
5.1. Mérések validálása nomifensine-nel	17
5.2. Tájékoztató mérések, további farmakonok	21
5.4. Hisztológiai eredmények	22
6. Összefoglalás	24
7. Köszönetnyilvánítás	26
8. Irodalomjegyzék	27

1. Általános bevezető

A neurotranszmitterek hatásmechanizmusának ismerete fontos kiindulópont a bonyolultabb agyi folyamatok megértésében, így a hibás működések kezelésében is létfontosságú. A központi idegrendszer funkcionális, valamint anatómiai feltérképezésének egyik alapja a jelátvivő vegyületek és a hozzájuk köthető receptorok vizsgálata. A dopamin-neurotranszmisszió több fontos agyi funkcióhoz is köthető. Szerepe lehet a magatartás szabályozásában, a mozgás koordinálásában, a motiváció és a függőség kialakulásában, valamint az agy jutalmazásközpontjával is szoros kapcsolatba hozható. A széles körű és változatos hatásának köszönhetően több egészségügyi vonatkozása is van a molekulának. Kapcsolatba hozták különböző neurológiai kórképekkel például a Parkinson-kórral, a skizofréniával, az ADHD-val (figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar), valamint a mániás depresszió is a rendszer hibás működéséhez köthető. Így a dopaminerg-rendszer működését, részletesebb megismerését többféle elektrofiziológiai módszerrel próbálták már feltérképezni. Az egyik erre alkalmas technika a gyors pásztázású ciklikus voltammetria, amely segítségével a transzmitterekről mennyiségi és minőségi információt egyaránt nyerhetünk, így nyomon követhetjük az általunk vizsgált agyi területeken a dopamin koncentráció megváltozását különböző farmakonok, gyógyszerjelölt vegyületek hatását vizsgálva. Fontos megemlíteni, hogy a voltammetriás technika segítségével *in vivo* detektálható egy-egy transzmitter koncentrációja, igen jó időbeli felbontóképességgel.[3., 21.,31].

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A dopaminerg-rendszer

Az emlős agyban található dopaminerg sejtek legnagyobb hányada a középagy és a köztiagy területén található, de elszórtan egyéb területeken is előfordulhatnak az agyban, például a bulbus olfactoriusban [2.- 4.]. A dopaminerg sejteket különböző sejtcsoportokba, magokba (A8-A16) tudjuk besorolni. A középagyban, a ventrális tegmentális area és a substantia nigra területén leginkább A8, A9 és A10 jelzésű sejtcsoportokat találunk, míg a köztiagyi régióban A11-A15 jelzésűeket. Ezek sejtcsoportok négy fő dopaminerg pályarendszert alkotnak: nigrostriatalális, tuberoinfundibuláris, mezolimbikus és mezokortikális útvonalakat. A mezokortikális és mezolimbikus útvonalak több helyen is átfedik egymást, így a szakirodalom egy közös néven mezokortikolimbikus pályaként is megemlíti őket. Funkció szerint ezek fontos elemei az izomtónus és a mozgások szabályozásának, valamint egy részük az emocionális hajtóerővel rendelkező mozgások szabályozásának. Ezen kívül fontos szerepet kaphatnak az affektív és kognitív funkciókhoz köthető agyi tevékenységekben és az emlékezés mechanizmusában [5., 6., 10., 17].

2.1.1. Mezolimbikus útvonal

A mezolimbikus útvonal fő kapcsolata a ventrális tegmentális area (VTA) és a nucleus accumbens (NAcc) közötti pálya. A NAcc azonban nem csak a dopaminerg beidegzésű, hanem limbikus területekről (amygdala, hippocampus, mediális-prefrontális kortex (mPFC)) glutamáterg beidegzést is kap. A NAcc két fő kimenettel rendelkezik, az egyik ezek közül GABAerg projekciókat küld a ventrális pallidum irányába, a másik pedig a ventrális tegmentális area és substantia nigra komplex (VTA/SN) felé visszacsatolásként. A dorzális-mediális thalamusból induló, mPFC-be tartó glutamáterg rostok zárják a mezolimbikus útvonalat. Így a VTA területén levő dopaminerg sejtek közvetlen hatással vannak a NAcc, az amygdala, a hippocampus, mPFC és a ventrális pallidum működésére, valamint a megváltozott dopamin transzmisszió hatással van a mezolimbikus útvonalon történő szinaptikus jelátvitelre. A mezolimbikus pálya leginkább a motiváció, az ösztönös magatartások és az érzelmek kialakításában vesz részt [30, 36.]. A pálya egységei közül két fontosabb központ a NAcc és a VTA területe. A NAcc elhelyezkedését tekintve egy bazális előagyi struktúrának tekinthető. Szerkezeti szempontból heterogén agyi struktúra, három részét különíthetjük el: „héj” (shell), „mag” (core), elülső régió (rostrális régió). A héj és a mag régiók funkció szempontjából is eltérőek [4.]. A NAcc glutamát, dopaminerg, noradrenerg és hisztaminerg beidegzéssel is rendelkezik [32.]. A VTA az agytörzsben, azon belül a középagy területén

elhelyezkedő agyi struktúra. A vörös mag és a SN között helyezkedik el. Hibás működése a skizofrénia pozitív tüneteivel is kapcsolatba hozható [1., 11].

2.1.2. Mezokortikális útvonal

A mezolimbikus útvonalhoz hasonlóan a VTA-ból indul ki, és a kérgi területekre küld projekciókat. Leginkább a prefrontális, perirhinális és cinguláris kérgi területekre. A mezokortikális pálya leginkább a kognitív funkciókban játszik fontos szerepet. [17.]

2.1.3. Tuberoinfundibuláris útvonal

A tuberoinfundibuláris pálya a hipotalamusz dorzális mediális részén elhelyezkedő nucleus arcuatusból indul ki és az agyalapi mirigyen (hipofízis) belül, az eminentia mediana területére küld dopaminerg rostokat. A dopamin így gátló „hormonként” (régebbi szakirodalom prolaktin inhibitoros faktorként is említi) az adenohipofízis hormonok felszabadulását gátolja hipotalamo-hipofizeális rendszeren keresztül. így a prolaktin (PRL) szekréciót szabályozza. A dopamin a lakotrop sejteken levő D2 típusú receptorokon keresztül hat, a sejt cAMP szintjét csökkentve gátolja a PRL képződését és szekrécióját [27].

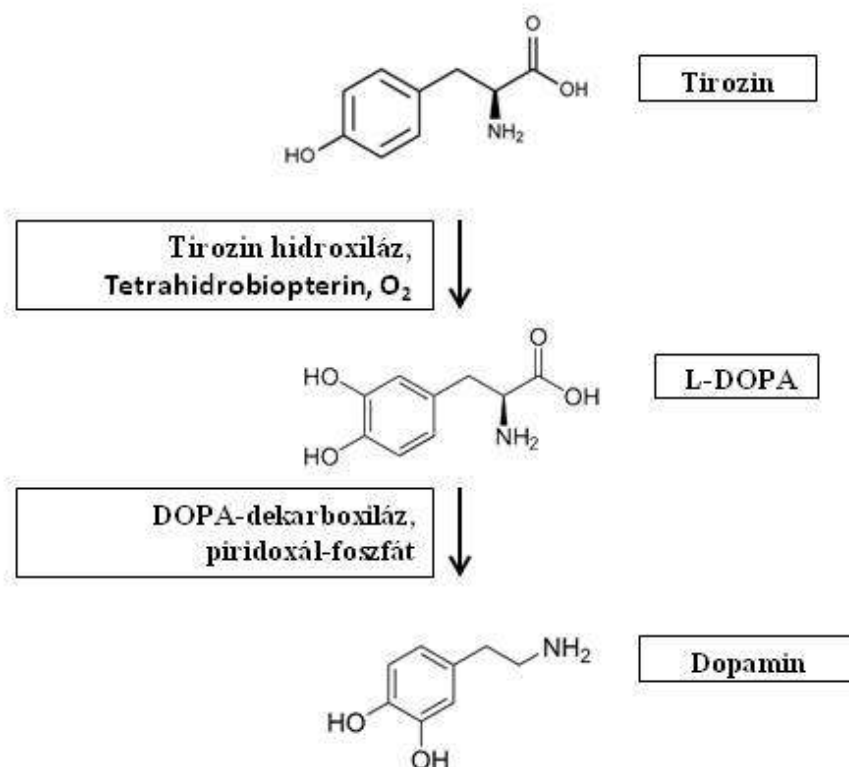
2.1.4. Nigrostriatális útvonal

Ez az útvonal a substantia nigra pars compacta területéről indul ki és a nucleus caudatus és a putamen (dorzális striátum) területére küld projekciókat. A pálya fő funkciója a bazális ganglionok működésének a szabályozása. A globus pallidus interna és a substantia nigra irányába tartó projekciók a bazális ganglionok közvetlen útvonalán keresztül fejtik ki hatásukat. A dorzális striátum aktivitása így hatással van a kéreg által létrejövő mozgások szabályozásában. A globus pallidus externa és a substantia nigra felé haladó projekciós sejtek negatív, gátló hatással vannak a kéreg által indított mozgások szabályozására a bazális ganglionok közvetett útvonalán keresztül. A dopaminerg projekciók így fontos szerepet kapnak a kortikális területekről érkező bemenetek szabályozásában. A magasabb kognitív funkciókhoz köthető folyamatok, a döntéshozatal, munkamemória, és a célirányos mozgások szabályozását is befolyásolja a nigrostriatális dopaminerg rendszer. A Parkinson-kór tünetei közé sorolható mozgászavarok például az akinézia, tremor és testtartási problémák, a striátum és a substantia nigra területei között elhelyezkedő dopaminerg neuronok elhalásával magyarázható.[5].

2.3. A dopamin bioszintézise, felszabadulásának, valamint eliminálódásának módja

A dopamin bioszintézise elsődlegesen a tirozinból indul ki, amit a tirozin-hidroxiláz O_2 felhasználásával alakít át egy L-DOPA nevű molekulává. A tirozin-hidroxiláz enzim minden katekolaminokat szintetizáló sejtben megtalálható. A tirozin mellett fenilalaninból is kiindulhat a dopamin szintézise. Ebben az esetben a tirozin-hidroxiláz először tirozin molekulává alakítja a fenilalanint, ezután L-DOPA-vá (**1. ábra**). Így bizonyos betegségek például a fenilketonúria összefüggésbe hozható a dopamin transzmitterek mennyiségével. A szintézis következő lépésében egy aromás aminosav dekarboxiláz enzim, a DOPA dekarboxiláz alakítja dopaminná az L-DOPA-t piridoxin jelenlétében. A DOPA-dekarboxiláz elszórtan, több helyen is előfordul a szervezetben, így katekolamin és szerotonin tartalmú neuronokban, de más nem neuronális szervekben is megtalálható, mint a vesékben, vagy bizonyos vérerekben [26].

Mivel a dopamin a katekolaminok közé sorolható vegyület, egyéb, ebbe a családba tartozó neurotranszmitterek szintézisében prekursorként is szerepelhet. Az adrenalin és a noradrenalin vegyületek kiindulási vegyületeként is hasznosítja a szervezet más katekolaminerg sejtekben. Ezt azért fontos megemlítenünk, mert a dopamin extracelluláris koncentrációja így hatással van egyéb neurotranszmitterek mennyiségére is [26].



1. ábra Katekolaminok bioszintézise [26.]

Az idegsejtekben szintetizálódott neurotranszmittert a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT2) membrán határral rendelkező szinaptikus vezikulákba csomagolja egy proton-átmenettel járó reakció segítségével. A reakció során egy monoamin, egy protonnal transzportálódik együtt, ellentétes irányban (antiranzsport). A transzporternek két fajtáját tudjuk elkülöníteni a patkány szervezetében. Az egyik a VMAT1, amely a mellékvesében található legfőképp, a másik a VMAT2, amely az állat agyában expresszálódik. A dopaminon kívül a szerotonint, a noradrenalint és a hisztamint is szinaptikus vezikulákba csomagolja a VMAT2. A VMAT2 működése szoros összefüggésben áll az extracelulláris térben levő transzmitter szinttel, mivel hatással van a preszinaptikus membránon történő Ca^{2+} függő vezikuláris transzportra. Több farmakon is hatással lehet a VMAT2-ra, ilyen vegyületek például a különböző amfetamin származékok, amelyek eltolják a proton-gradienst a szinaptikus vezikulák között, ezzel megszüntetve a VMAT2 működéséhez szükséges feltételeket. A transzporter működését gátolva, ezek a vegyületek megemelik a monoamin koncentrációt a citoplazmában és Ca^{2+} függő, nem vezikuláris monoamin

felszabadulásra készítetik az idegsejteteket. A különböző amfetamin származékokon kívül a rezerpin, a tetraabenazin és a ketanszerin is gátló hatással van a VMAT2-re [19., 20., 37.].

Ha az adott receptort megfelelő elektromos inger éri, a sejt exocitózissal a szinaptikus részbe üríti neurotranszmitter tartalmát. A dopamin ezután diffundálhat az extraceulluláris térbe, ingerületbe hozhat dopaminerg receptorokat, vagy a dopamin kotranszporter fehérje (DAT) segítségével eliminálódhat az extracelluláris térből. A dopamin kotranszporter fehérje fontos szerepet játszik a dopamin extracelluláris térben való mennyiségének szabályozásában. Az idegrendszer különböző területein eltérő számban fordul elő a DAT, így az extracelluláris dopamin koncentráció nem azonos mindenhol. A kotranszporter ezen keresztül tudja szabályozni a dopamin modulálta területeket. A Na^+ -függő dopamin kotranszporterek az agy különböző területein eltérő sebességgel működnek, eltérő számban fordulnak elő. A neostriátum területén (nucleus caudatus és putamen) igen gyorsan, minden másodpercben $4\mu\text{M}$ -nyi dopamint távolítanak el. Ezt azért fontos kiemelni mivel kisebb DAT tartalmú területekről távolabbi receptorokig is eljuthat a dopamin, mivel így több időbe telik eliminálni a transzmittert az extracelluláris térből. A dopamin miután visszakerült az idegsejtbe többféle úton hasznosítható újra. A VMAT2 újból szinaptikus vezikulákba csomagolja, vagy különböző enzimek, például monoamin-oxidáz (MAO) vagy a katekolamin-o-metil transzferáz (COMT) elbontja. A végtermék általában homovanillinsav (HVA) [19.,29.].

A dopaminerg idegsejtek két féle tüzelési mintázatot mutatnak. Az egyik egy tónusos mintázat, amely 2-5 Hz közötti frekvenciával jellemezhető és egy állandó alap extracelluláris dopamin szintet tart fent. A másik tüzelési mintázat, a fázisos tüzelés, amely rövid ideig tart, 15-100 Hz tüzelési frekvenciát vehet fel és igen nagy mértékben megnöveli a dopamin koncentrációt az alap dopamin szinthez képest. A két különböző mintázat eltérő receptorokat hoz ingerületbe és eltérő dopamin koncentrációs csúcsokat idéz elő az extracelluláris térben, így funkciójukban is eltérnek.

A NAcc-ben található dopaminerg neuronok közepes méretű tuskés neuronokkal alakítanak ki kapcsolatokat. A tuskés neuronok GABA-erg beidegzéssel rendelkeznek (VTA, hipotalamusz, amygdala területéről kapnak projekciókat. Az egysejtelvezetéses fiziológiai vizsgálatok során felfedezték, hogy ezek a dopaminerg neuronok egy 5 Hz-es alapfrekvenciával tüzelnek (tónusos aktivitás) a NAcc területén, de több neuron egyidejű tüzelésével nagy mértékű tranziens DA-felszabadulást (fázisos tüzelés) is létrehozhatnak (15-30 Hz). A fázisos tüzelés a VTA-ból származó excitátoros aminosav felszabadulás hatására alakul ki. Több sejt egyidejű tüzelése során a neuronok egymáshoz képest szinkronban tüzelnek a köztük levő gap junction-ok (szinaptikus rések) miatt. A

fázisos tüzelésre különböző molekulák negatív hatással lehetnek, például az amfetamin hosszabb ideig tartó, csökkent tüzelési mintázatot idéz elő. Ezzel szemben a neuroleptikumok nagyobb frekvenciával jellemezhető fázisos tüzelési mintázatot hoznak létre. [43., 32, 47.].

2.2. A dopamin receptorok

A dopamin receptorokat csoportosítva, két fő receptorcsaládot tudunk elkülöníteni, a D1-szerű receptorokat és a D2-szerű receptorokat. A D1 család két tagja a D1 receptor és a D5 receptor. A D2-szerű receptorok közé a D2-es receptoron kívül a D3-as és a D4-es receptor sorolható. A dopamin receptorok több hasonló tulajdonsággal is rendelkeznek. Mindegyik típus metabotrop, G proteinhez kapcsolódó receptorféleség, és mindegyik esetén elmondható, hogy hét transzmembrán domént tartalmaz. A G-proteinek három csoportja közül (G_s , G_i , G_o) a D1-szerű receptorok G_s -típusú proteincsalád hatásmechanizmusát követik, vagyis az adenilát-cikláz enzimet aktiválva intracelluláris cAMP emelkedéshez vezethet a dopamin receptorhoz kapcsolódása. A D2-es, D3-as és D4-es receptorok a G_i/G_o fehérjén keresztül szintén a cAMP szintre vannak hatással, de ellentétesen hatnak rá, mint a G_s -fehérjék. A D1-szerű receptorok legnagyobb számban a nigrostriális rendszer végpontjain (nucleus caudatus, putamen, a ventrális pallidum és az amygdala területén találhatóak, specifikus agonistája a receptornak például a fenoldopam. A dopamin és az apomorphine általánosan minden receptorra agonistaként hatnak, míg a quinpirol, raclopride a D2-es típusú receptorok egyik specifikus agonistája. A D2-es típusú dopamin receptorok legismertebb antagonistái közé sorolható a spiperon és a sulpirid, ezzel szemben a clozapine általános hatású dopamin-receptor antagonist [11.].

	D1-szerű receptorok családja	D2-szerű receptorok családja
G-fehérje típus	G_s	G_i vagy G_o
receptor típusok	D1 és D5	D2, D3 és D4
antagonista vegyület	clozapine	
	fenoldopam	sulpirid, spiperon
agonista vegyület	dopamin, apomorphine	
		quinpirol

2. ábra A D1 és D2 receptorcsaládok általános jellemzése

2.4. Dopamin mérésére használható elektroanalitikai módszerek

Elektrofiziológiai technikák közül a különböző elektrokémiai alapokon nyugvó elektroanalitikai technikák alkalmasak a dopamin koncentráció gyors változásának detektálására. A dopamin szint megfelelő méréséhez igen érzékeny módszerek szükségesek, mivel igen kis koncentrációban szabadul fel, mint a legtöbb neurotransmitter, valamint igen gyorsan eliminálódik az extracelluláris térből. A monoamin típusú neurotranszmitterek hasonló szerkezettel rendelkeznek, fontos, hogy valamilyen módon el tudjuk őket különíteni egymástól. Így a vizsgálati eljárásnak gyorsnak, érzékenynek és a dopamin vegyületre szelektívnek kell lenni.

A mikrodialízis technikája igen jól használható a gyógyszerjelölt vegyületek, gyógyszerhatású vegyületek dopamin-szintben létrejövő változások detektálására. Azonban ez a módszer nem rendelkezik jó időbeli felbontással, nem használható valós idejű mérések elvégzésére. [45., 32.].

A voltammetriás technikák közül a gyors pásztázású ciklikus voltammetriát (fast scan cyclic voltammetry, FSCV) alkalmaztuk kísérleteink során, így ezt a technikát jellemezném részletesebben.



3. ábra Dopamin-dopamin-ortokinon átalakulás mechanizmusa [Phillips és mts, et Wightman_TrendsAnalChem (2003) XX.kiadás]

A voltammetriás mérések során használható két és háromelektrodos rendszer. A háromelektrodos rendszer egy munkaelektrodból, egy referenciaelektrodból és egy segédelektrodból áll. A munkaelektrod elektródpotenciálja a stabil potenciálú referenciaelektroddhoz (pl. Ag/AgCl) képest változtatható, míg a segédelektrod szerepe az áramkör zárása a földpont felé. Kételektrodos mérések esetén a segédelektrod szerepét is a referenciaelektrod tölti be. A voltammetriás mérések során a vizsgált elektroaktív komponens azon tulajdonságát használjuk ki, hogy az általunk ismert oxidációs/redukciós potenciálon redoxi átalakuláson megy keresztül. Esetünkben a dopamin – a munkaelektrod megfelelő elektródpotenciálja mellett – dopamin-ortokinonná alakul át miközben 2 elektront ad le. Az ellenkező irányban lejátszódó redukciós reakcióban pedig visszaalakul dopaminná, 2 elektron felvételével. A fenti átalakulások következtében létrejövő elektrontranszport áram formájában visszamérhető a munkaelektrodon keresztül. A ciklikus voltammetria esetében háromszög alakú hullámforma szerint változtatjuk az elektródpotenciált, így az oxidációs és redukciós reakciók egyaránt lejátszódnak a mérések során. Először növeljük a potenciál értékét az alapvonaltól számítva egy bizonyos szélsőértékig, majd ugyanazzal a sebességgel (általában 300V/s) csökkentjük a potenciál értékét a negatív szélsőértékig. A háromszög felszálló ágában az oxidációs folyamatok játszódnak le, míg a leszálló ágban a molekula redukciója. Ezzel párhuzamosan a visszamért áramgörbén egy oxidációs és egy redukciós csúcsot tudunk elkülöníteni. A vizsgált vegyület csak a meghatározott potenciál értéken fog redoxi átalakuláson átmenni, így minőségi információt nyerhetünk, ha összehasonlítjuk a vizsgált vegyületekhez tartozó potenciál értékeket, az általunk alkalmazott potenciál értékekkel. A biológiai mérések során kis molekulatömegű, elektroaktív vegyületek vizsgálatát végezhetjük az FSCV segítségével. A megfelelő potenciálértéken megjelenő áramerősség amplitúdó egyenes arányosságba hozható az extracelluláris dopamin koncentráció nagyságával. Az FSCV során gyors, egymásután készített felvételeket készítünk, így a vizsgált transzmitter pillanatnyi mennyiségéről pontos információkat nyerhetünk. A technika vizsgált molekulák felszabadulásának és kinetikájának pontos elemzését teszi lehetővé.

In vivo mérések során más elektroaktív komponensek is megjelenhetnek a voltammogrammon, amelyek átfedésbe kerülnek a dopamin csúcsával. Ilyen vegyületek például az aszkorbinsav, különböző dopamin metabolitok (pl.: L-DOPA), noradrenalin. [32., 33.].

3. Célkitűzés

A laboratóriumi munka során célunk egy olyan kísérleti elrendezés kialakítása volt, melynek segítségével a különböző gyógyszerjelölt vegyületek dopamin felszabadulásra és dopamin visszavételre gyakorolt hatásának vizsgálatát tehetjük lehetővé. A kísérletek során egy olyan vegyületet kerestünk, mely segítségével validálni tudjuk méréseinket a dopaminra vonatkoztatva. A nomifensine, mint dopamin visszavétel gátló vegyület várhatóan megemeli majd a dopamin koncentrációt, ez a vegyület ezért alkalmas lehet más farmakonok tesztelése során pozitív kontrollnak [28.]. Továbbá, egyéb vegyületek hatását is vizsgáltuk, melyek hatással lehetnek a mezolimbikus rendszer dopaminerg neurotranszmissziójára (PHA-543613- $\alpha 7$ receptor agonista, sibutramine-monoamin-visszavétel gátló). A PHA-543613 $\alpha 7$ receptor agonista hatásának vizsgálata azért lehet érdekes, mert magatartás-kísérletekben javítja a memória-működéseket, amiben szerepe lehet a dopaminerg rendszernek is [26.]. A sibutramine, ami egy monoamin-visszavétel gátló, nagy valószínűséggel megemeli a dopamin tranziensek értékét, mivel a transzmitter nem tud eliminálódni az extracelluláris térbe [24.].

4. Anyagok és módszerek:

4.1. Műtéti eljárások

A kísérletek során használt állatok albinó Wistar típusú patkányok voltak, melyek súlya 270 és 310 gramm közé volt tehető, mivel a patkány atlasz 290 gramm súlyú referencia patkányához próbáltunk hasonló fejlettségű egyedeket választani.

A sztereotaxiás műtétet és a voltammetriás méréseket klorál-hidrát (400 mg/ttk) altatásban végeztük.

A műtétek során az állat fejét a sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a koponya felszínéről eltávolítottuk a bőr, az izom és a kötőszövet rétegeit. Fertőtlenítés és a finomabb rétegek eltávolítása, valamint a vérzés csillapításának érdekében hidrogén-peroxidot cseppentettünk a koponya felszínére. A műtét minden lépése során bizonyos időközönként fiziológiás sóoldattal tisztítottuk le a koponyát és az agyfelszínét. A sztereotaxiás készülékhez stabilan rögzített mikromanipulátor segítségével a bregmához viszonyítva jelöltük meg a koponya felszínén a vizsgálathoz használt elektródok pontos helyét. Ezután a koponyán a megjelölt helyeken 2-3 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk, majd egy finom csipesz segítségével megtisztítottuk a nyílásokat, eltávolítottuk az apróbb csont darabokat, és a kemény agyhártyát. Ezután a mikromanipulátor segítségével pozicionáltuk a három elektród (szénszálas munkaelektrod, Ag/AgCl referencia elektród, stimuláló elektród) pontos helyzetét. Munka elektródként egy szénszálas, Carbostar üvegelektrodot (100nm hegy) használtunk, míg stimuláló elektródként sodort rozsdamentes acél bipoláris elektródot (MS303-2-B, PlasticsOne, Roanoke, VA, USA). Az Ag/AgCl referencia elektródot az agy felszínére helyeztük, majd a stimuláló elektródot a lambdához viszonyítva, a munkaelektrodot a bregmához viszonyítva helyeztük a dura felszínére a célzott agyterületek felé. Majd egy adott kiindulási mélységig bevezettük őket az agyba lásd.: **4.ábra**. A sikeres kísérletek végén, ellenőrzésképp visszamértük az elektródok helyzetét. Az elektódok helyzetének a pontos koordinátái a következő táblázatban vannak összefoglalva:

	Munka elektród	Stimuláló elektród
AP	1,0-1,2 mm (Br)	0,7-1,0 mm (L)
ML	1,0-1,2 mm (Br)	3,2-3,6 mm (L)
DV₀	3 mm	5 mm

4.ábra Az elektródok helyzetének pontos koordinátái

A referencia elektród helyzetét nem határoztuk meg pontosan, a koponya ellenkező oldalára fűrt lyukba, a kemény agyhártya (dura) felszínére helyeztük.

4.2. Elektromosan stimulált dopamin-felszabadulás in vivo mérése

A ventrális tegmentális területet a stimuláló elektród segítségével körülbelül három percenként ingereltük elektromosan, négyszögimpulzusok segítségével (bifázisos sorozatingerlés, 50-75 pulzus/sorozat, 200-300 μ A, 50 Hz, 4 ms pulzusszélesség), ennek hatására a nucleus accumbensben nagy mértékű tranziens dopamin felszabadulást (a dopaminerg sejtek fázisos tüzelését) detektálhattunk a szénszálas mikroelektród segítségével. Az ingerlések során alkalmazott frekvenciája nagyságával arányosan a NAcc-ben megemelkedett dopamin koncentráció követhető nyomon, míg az ingerlés után a dopamin visszavételért felelős enzimek aktivitásának köszönhetően a transzmitter koncentrációja csökken. Az alacsony frekvenciával történő ingerlések esetén tónusos tüzelési mintázatot mutatnak a dopaminerg sejtek, az ingerlések között a dopamin-kotranszporter könnyen eliminálja a transzmittereket az extracelluláris térből. Ezzel szemben, ha nagyobb intenzitással ingereljük a VTA-t fázisos tüzelési mintázatot válthatunk ki, amely nagyobb extracelluláris dopamin koncentrációval jár [47.].

A felvételek hossza 20 másodperc volt, egy felvételen belül az ötödik másodpercnél történtek az ingerlések. A kontroll felvétele után nomifensin (Sigma-Aldrich) PHA-543613 (Tocris), sibutramine (Tocris) beadása történt intraperitoneálisan. Mindegyik mérés során a nomifensint (monoamin-visszavétel-gátló vegyület) alkalmaztuk pozitív kontrollként. Adagolása minden esetben 5 mg/ttk volt. A két vizsgált vegyületet intraperitoneálisan adtuk be az állatoknak, a sibutramine-t 3 mg/ttkg, míg a PHA-t 1 és 3 mg/ ttkg dozissal. A különböző vegyületek injektálása után is megvizsgáltuk az elektromosan kiváltott a dopamin-felszabadulás mértékét.

A voltammetriás rendszert felépítő többi műszer egy Dagan Chem-Clamp potenciosztát, National Instruments A/D konverterek alkották. A mérések során alkalmazott értékek szabályozását és az adatok kiértékelését Demon Voltammetry and Analysis Software (LabView) segítségével hajtottuk végre. A nomifensine hatásának statisztikai tesztelésekor ismétléses varianciaanalízist (rANOVA) alkalmaztunk, a nomifensine beadása után mért adatokat Dunnett post-hoc teszttel hasonlítottuk össze a kontrollal.

4.3. Hisztológiai munkálatok

Az elektródok pontos helyzetéről később szövettani metszetek segítségével nyertünk bővebb információt. A kísérletek után a munkaelektrod pozíciójának meghatározásához elektromos léziót alkalmaztunk. Monopolárisan 20 μ A konsans árammal, 5 percig hajtottuk végre a léziót a munkaelektrod esetében. A stimuláló elektrod esetében erre nem volt szükség, mivel az elektrod által okozott szöveti károsodás is elegendő volt a pozíció megjelöléséhez. A lézió után az állatot dekapiláltuk, majd a kivett agyat 2%-os paraformaldehidben tároltuk a későbbi hisztológiai munkálatokig. Félvékony, 50 μ m vastagságú metszeteket készítettünk Vibratome segítségével. A metszeteket hagytuk száradni, majd fixálás után neutrálvörös festékkel festettük őket. Egy reprezentatív mérés eredményét választottuk ki, bemutatás céljából, amit fénymikroszkóp alatt fényképeztünk le.

4.4. Az elektródok kalibrálása

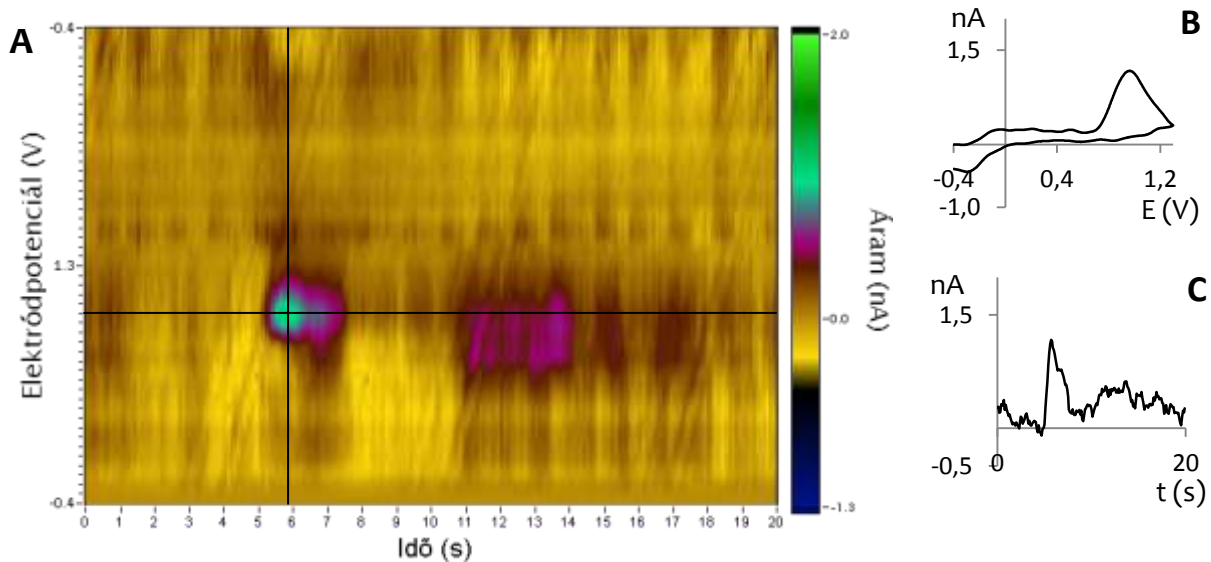
A pontos koncentráció értékeket az elektrod utólagos kalibrálásával határoztuk meg, melyet áramlási cellában végeztünk. A kalibrálások során a puffer áramlási sebessége 1 ml/perc volt. Az 1-1,5 ismert koncentrációjú standard dopamin oldatokat a 10 másodpercnél injektáltuk az áramló puffer oldathoz. Pufferként PBS puffert alkalmaztunk (0,01M NaH₂PO₄ + 0,01M NaHPO₄ + 0,9% NaCl) A következő koncentrációkban állítottuk össze a dopamin oldatokat a kalibráció során: 500nM; 250nM; 125nM; 62,5nM; 31,25nM; 15,625nM; 7,8125nM. A sorozatot 4 μ M –os standard dopamin oldat pufferrel való hígításával készítettük el. A kalibráció során egy speciális, 6-portos injektáló berendezést használtunk (V-451, IDEX LLC, Oak Harbor, WA, USA), amely segítségével injektáltuk a pufferhez a vizsgált dopamin oldatokat.

5. Eredmények és értékelésük

A vizsgált farmakonok között megemlíthetjük a nomifensinet, ami monoamin-visszavétel gátló vegyület, a PHA-t, ami egy $\alpha 7$ receptor agonista farmakon, valamint a sibupramine-t, amely fő hatása a szerotonin, a noradrenalin és a dopamin visszavételének a gátlása.

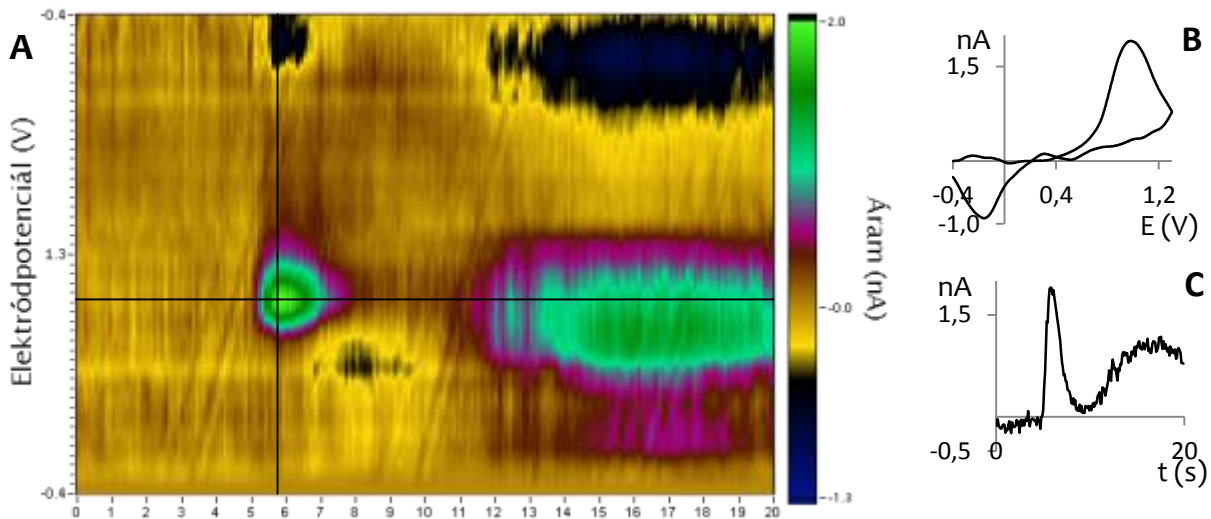
5.1. Mérések validálása nomifensine-nel

Kezdeti kísérleteink során a nomifensine, mint monoamin visszavétel gátló vegyület hatását teszteltük. Egy kísérletsorozat során történt egyedi mérés eredményét figyelve, azt láthatjuk, hogy a nomifensine jelentős hatással volt a DA tranziensek nagyságára [8. ábra]. A felvételeken a vízszintes tengely az egy mérésen belüli időt, a függőleges tengely az alkalmazott elektródpotenciált, a színtengely pedig az áramerősség értékeket jelöli. A 3 dimenziós diagramokon jól látszódik, hogy az ingerlés után, ami az 5. másodpercben történt) jelent meg a detektálható dopamin felszabadulás. A tranziens megjelenését a dopaminra jellemző oxidációs potenciál tartományban mért áram jelezte. A kiegészítő diagramokon (5.B-C, 6B-C) a háromdimenziós diagramon a vízszintes ill. függőleges vonallal jelzett síkok láthatóak. A 5.A és 6.A ábrákon látható függőleges vonal által meghatározott voltammetriás görbét ábrázolja a 5.B és 6. B diagram, míg a 5.C és 6.C diagramok a dopamin oxidációs potenciáljánál (vízszintes vonal jelöli a 5.A és 6.A ábrákon) mért oxidációs áram nagysága látható. A 5.A ábrán látható felvétel a vegyület beadása előtt történt 9 perccel. Az elektromosan kiváltott dopamin tranziens nagysága a mért oxidációs áram csúcsával arányos. A 5.B ábrán látható felvétel a nomifensine beadása után 18 perccel készült. A felvételen jól látható, hogy a farmakon hatására jelentősen megnövekedett az elektromosan kiváltott dopamin tranziens nagysága. Az alábbi két nyers voltammogrammot összehasonlítva majdnem kétszeres koncentrációnövekedést láthatunk. Nomifensine hatására nem csak időleges tranziens emelkedést tapasztalhattunk, hanem hosszú távon fennmaradt a nagy extracelluláris dopamin koncentráció.



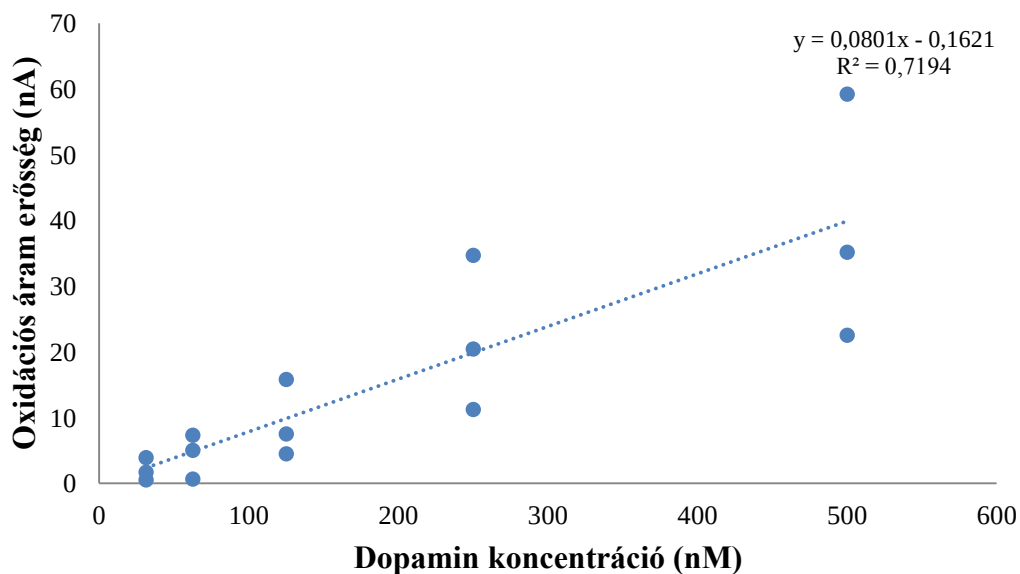
5. ábra

- A:** A nomifensine beadása előtt 9 perccel készített felvétel
B: A 5.A ábrán látható függőleges vonal által meghatározott voltammetriás görbét ábrázolja
C: A dopamin oxidációs potenciáljánál (vízszintes vonal jelöli a 5.A ábrán) mért oxidációs áram nagyságát ábrázolja

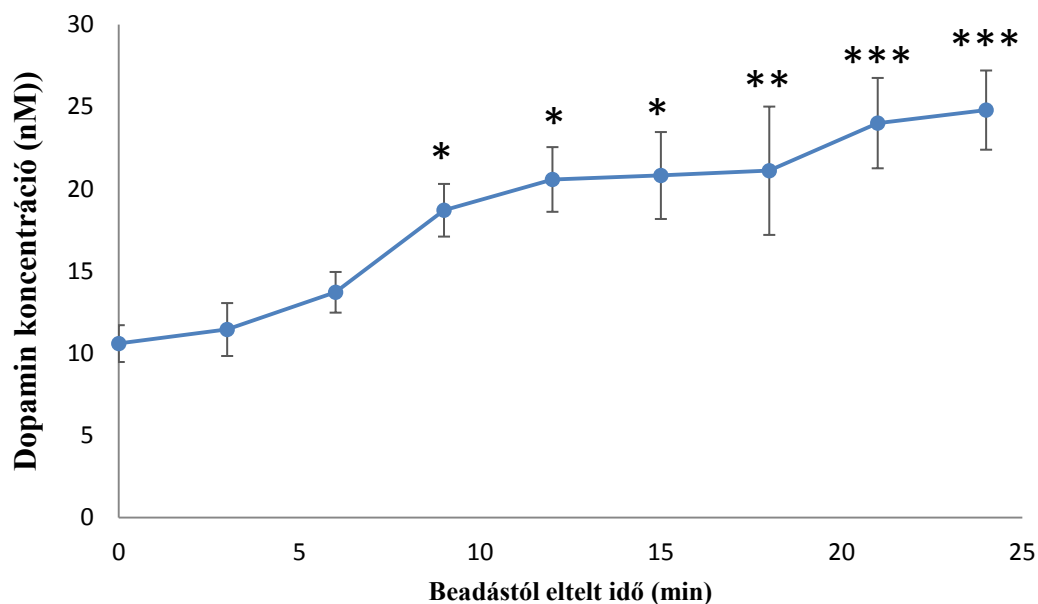


6. ábra

- A:** A nomifensine beadása után 18 perccel készített felvétel
B: A 6.A ábrán látható függőleges vonal által meghatározott voltammetriás görbét ábrázolja
C: A dopamin oxidációs potenciáljánál (vízszintes vonal jelöli a 6.A ábrán) mért oxidációs áram nagyságát ábrázolja



7. ábra Az alábbi diagrammon az áramlási cellában végzett mérések során kalibrációs eredményeket ábrázoltuk (n=3 elektród).



8. ábra Az alábbi diagramon több mérés átlagából számított, a nomifensine hatására megemelkedett dopamin csúcsokat ábrázoltuk az idő függvényében százalékos értékekben megadva (szignifikáns különbség a kontrolltól:

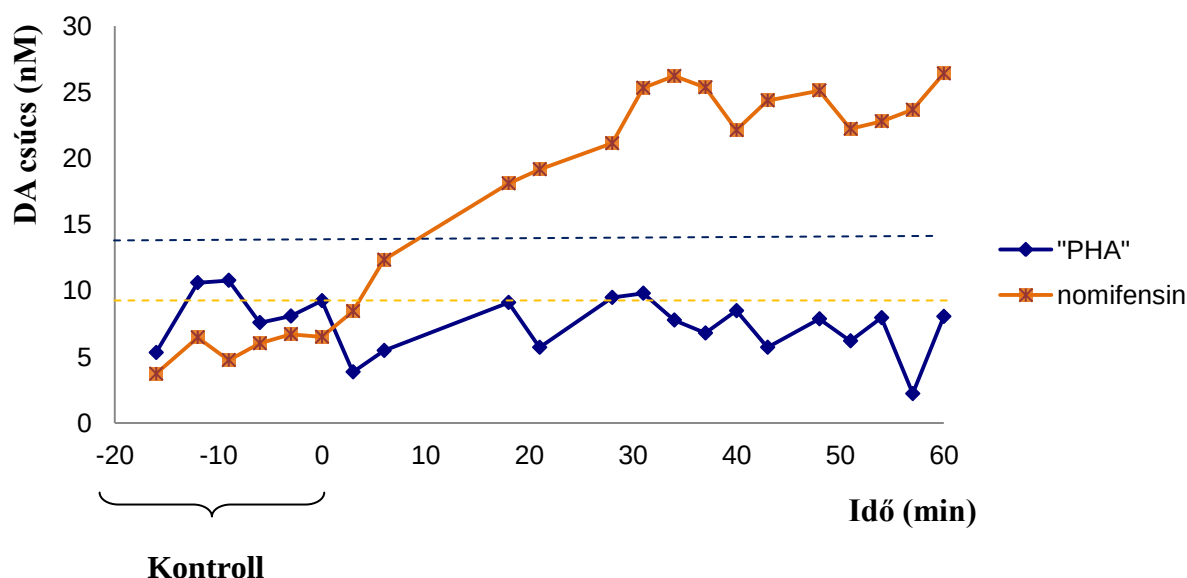
* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

Több kalibrációs mérésből ($n=3$) származó átlag koncentráció értékek a **7. ábrán** láthatóak. *In vivo* méréseink során az egyes elektródokhoz tartozó kalibrációs egyenesek alapján következtettünk a koncentráció értékekre az oxidációs áram erőssége alapján.

A **8. ábrán** látható grafikonon négy kísérlet ($n=4$) eredményét összegeztük. Az egyes mérési időpontokban detektált oxidációs áramerősség értékekből számított koncentráció értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. A grafikonon jól látszódik, hogy a nomifensine több mint kétszeres emelkedést idézett elő az elektromosan kiváltott dopamin-tranziens értékekben (rANOVA: $F(8, 24)=9,113$; $p<0.0001$). A kontrollhoz képest szignifikáns különbséget a kilencedik perc után tapasztaltunk. A nomifensine így kiválóan alkalmazható pozitív kontrollként a NAcc-ben felszabauló dopamin tranziensek validálásra. További kísérleteink során validálás céljából ezt a farmakont alkalmaztuk.

5.2. Tájékozódó mérések, további farmakonok

5.2.1. PHA hatása



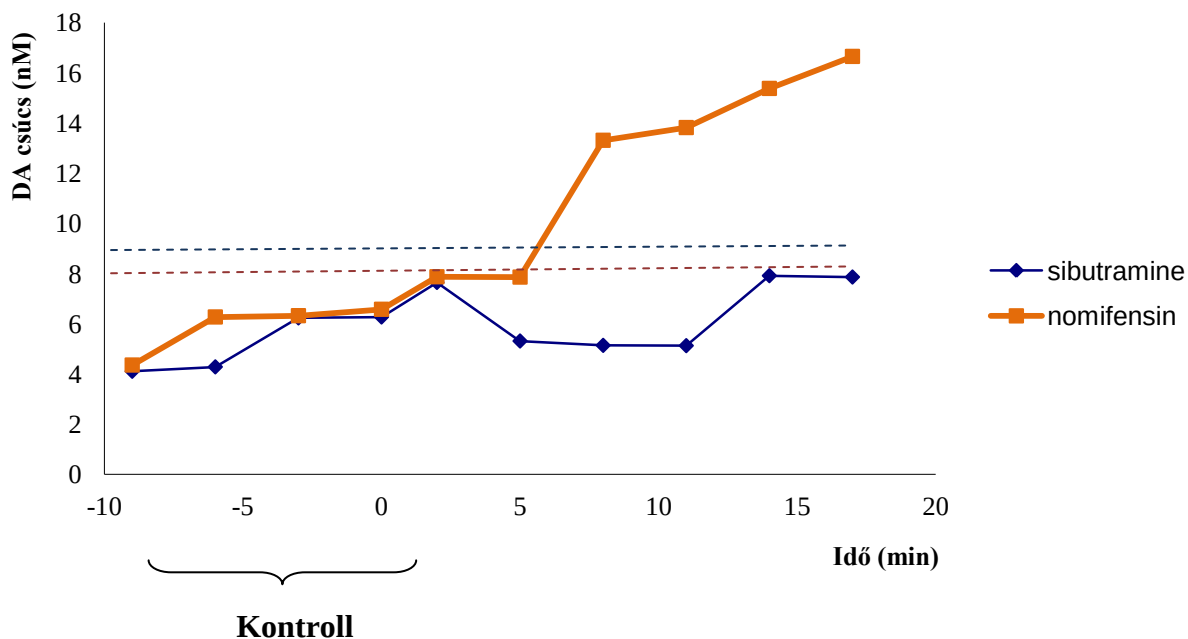
9. ábra Az alábbi diagrammon a nomifensine és a PHA hatására létrejött dopamin csúcsokat ábrázoltuk az idő függvényében

A PHA tranziensekre gyakorolt hatásának vizsgálatokor a kontroll felvételek után történt a vegyület beadása. A **9. ábrán** látható grafikonon ábrázolt eredmények egy kísérlet során mért összegzett adatokból származtathatóak. A PHA-val kapcsolatos mérések után nomifensine alkalmaztunk referenciaként. Az ábrán látható szaggatott sávok a kontroll mérések átlagából és szórásából (SD) számolt küszöbértéket jelölik, ami fölötti értékeket szignifikáns növekedésnek tekintettünk (számolása: $\text{átlag} + 3,3 \cdot \text{SD}$). Ezen elő kísérletben a PHA hatására nem detektáltunk változást a tranziensek nagyságában, de további mérések szükségesek a vegyülettel kapcsolatban.

A nomifensine segítségével a PHA-után végeztük a validálási méréseket. A **9. ábrán** jól látszódik, hogy a vegyület hatására jelentős tranziens emelkedést volt tapasztalható. A nomifensine esetében is egy szaggatott vonallal jelöltük a küszöbértéket (számolása: $\text{átlag} + 3,3 \cdot \text{SD}$). A

nomifensine mint dopamin reuptake inhibitor hatására nagy mértékben és gyorsan növekedett a dopamin a csúcs, míg PHA-543613 hatására ezen elő kísérletben nem tapasztalhattunk jelentősebb emelkedést.

5.2.2. Sibutramine hatása

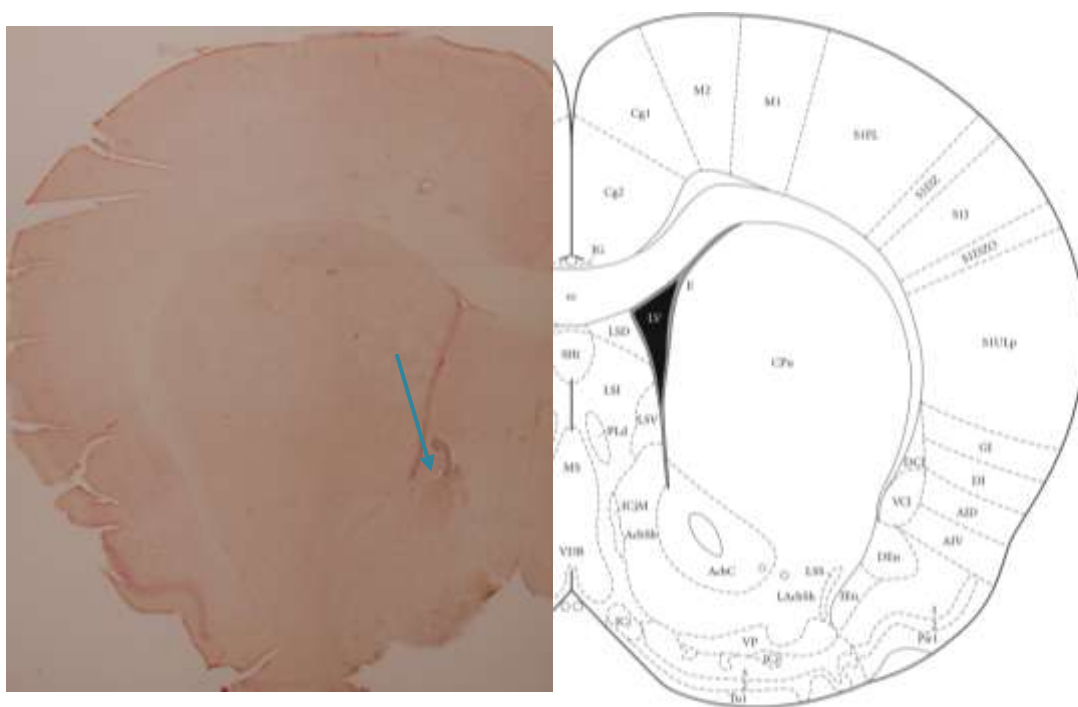


10. ábra Az alábbi diagrammon a nomifensine és a sibutramin hatására létrejött dopamin csúcsokat ábrázoltuk az idő függvényében

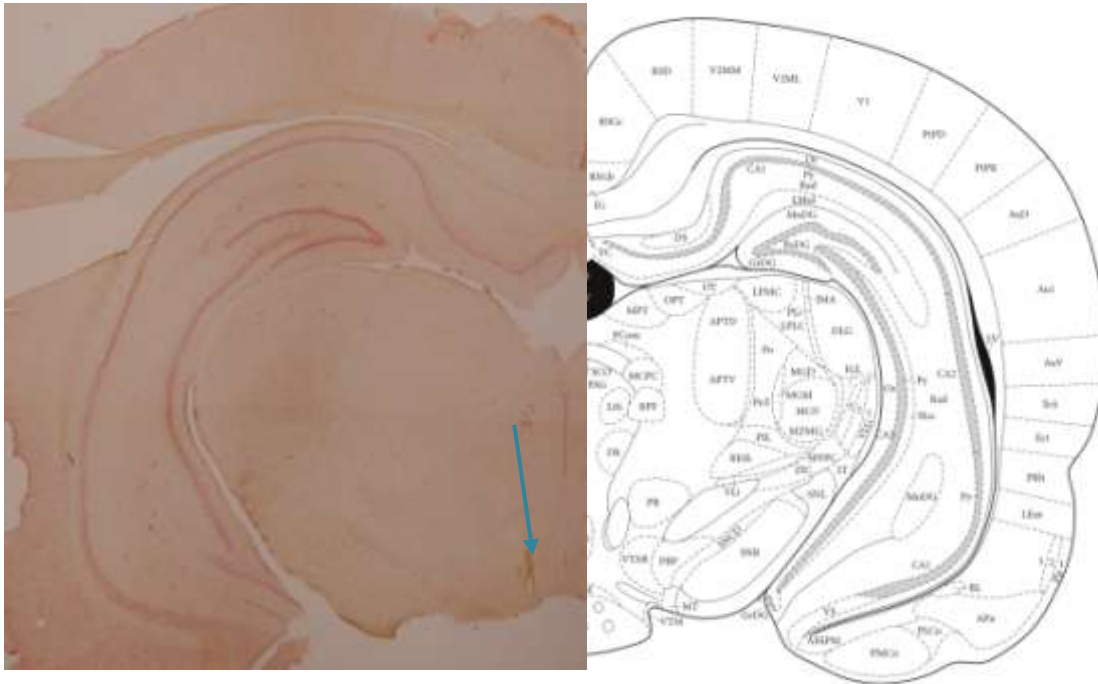
A sibutramine tranziensekre gyakorolt hatásának vizsgálatakor, a PHA-s mérésekhez hasonlóan a kontroll felvételek után történt a vegyület beadása. Egy kísérlet során mért eredményeket a **10. ábrán** összegeztük. Referenciaként a nomifensine-t alkalmaztuk. Az **10. ábrán** látható szaggatott sávok a kontroll mérések átlagából és szórásából (SD) számolt küszöbértéket jelölik, ami fölötti értékeket szignifikáns növekedésnek tekintettünk (számolása: átlag + $3,3 \cdot SD$). Tájékoztató kísérletünkben a sibutramine nem volt jelentős hatással a dopamin tranziensek nagyságára. A vegyülettel kapcsolatban további méréseket tervezünk.

5.3. Hisztológiai eredmények

A szövettani vizsgálatok során igazolódott, hogy az elektrofiziológiai kísérleteket a célterületen, a nucleus accumbens és VTA területén hajtottuk végre (**11-12. ábra**)



11. ábra Az alábbi ábrán a munkaelektrod helye látható (kék nyíllal jelölve), amit a nucleus accumbens területére pozícionáltunk [25.]



12. ábra Az alábbi ábrán a stimuláló elektród helye látható (kék nyíllal jelölve), amit a ventrális tegmentális area területére pozícionáltunk [25.]

6. Összefoglalás

Munkánk során sikerült egy olyan kísérleti elrendezést összeállítanunk, mely segítségével in vivo detektálható a dopamin tranziensek változása. Mérésink során altatott állatban detektálni tudtuk a dopamin tranziensek tüzelési aktivitásában, így a dopamin-szintben bekövetkező változásokat a vizsgált farmakonok hatására.

A voltammetriás technika lehetőséget ad arra, hogy valós időben tudjuk detektálni a dopamin csúcsokban bekövetkező változást. A mezolimbikus dopaminerg rendszer vizsgálata fontos kiindulópont több élettani funkció megismerésében. Komoly, egyre több embert érintő betegségnek számítanak az idős korban megjelenő demenciák, az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór.

Munkánk során sikerült egy olyan kísérleti elrendezést összeállítanunk, mely segítségével in vivo detektálható a dopamin tranziensek változása. Mérésink során altatott állatban detektálni tudtuk a dopamin tranziensek tüzelési aktivitásában, így a dopamin-szintben bekövetkező változásokat a vizsgált farmakonok hatására.

Eredményeink alapján a nomifensine nevű vegyületet későbbi kísérleteink során is tudjuk majd alkalmazni, mint pozitív kontrollt, mivel igen jelentős, több mint kétszeres emelkedést idézett elő a dopamin csúcsok nagyságában (6. ábra). Ez annak köszönhető, hogy a vegyület gátolja a dopamin visszavételéért felelős dopamin kotranszportert működését, így a molekulák nem tudnak megfelelő időben és intenzitással eliminálódni az extracelluláris térből. A vegyület mezolimbikus dopaminerg rendszerre gyakorolt hatását vizsgáltuk az alkalmazott kísérleti összeállításban. A nomifensine-t kezdetben antidepresszásként alkalmazták, de a kezelt személyek egy részénél súlyosabb mellékhatások léptek fel például: koncentrációzavarok, memóriazavarok, tehetetlenség, valamint némely esetben ingerültség, agresszió és öngyilkossági kísérletek is előfordultak [18., 48.]. A pszichés tüneteken kívül használatát több esetben összefüggésbe hozták nagy mértékű vörösvértest pusztulással, vérszegénység kialakulásával. 1986-ban biztonsági okokból kivonták a forgalomból [28.]. A Parkinson-kórt és a figyelemhiányos hiperaktivitás zavarát is próbálták vele kezelni [12.].

A PHA-543613 nevű vegyület nem emelte meg szignifikánsan a dopamin koncentrációt. [10. ábra] A PHA-val korábban a skizofrénia és az Alzheimer-kór bizonyos tüneteit próbálták kezelni, mivel $\alpha 7$ -es nikotinos acetilkolin receptor agonista [39.]. A vegyület közvetett úton hatva a dopaminerg neurotranszmisszióra, nem emelte meg a tranziensek mennyiségét, nem volt hatással a mezolimbikus rendszeren keresztül történő neurotranszmisszióra.

A sibutramine nevű vegyület sem volt meghatározó hatással a dopamin tranziensekre előkísérletünkben [9. ábra]. A kontroll felvételekhez képest nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést a dopamin csúcsok nagyságában. A sibutramine fő élettani hatása a dopamin, a szerotonin és a noradrenalin visszavétel gátlása, így több kísérletben is tesztelték antidepresszáns hatását. Releváns eredményt ezzel kapcsolatban még nem publikáltak [46.]. A vegyületet azonban nagy sikerrel alkalmazzák különböző elhízás elleni kutatásokban. Az amfetaminhoz hasonló vegyület forgalomba hozását 2010-ben betiltották, mivel a vizsgálatok során súlyos szív- és érrendszeri betegségekkel hozták összefüggésbe használatát. [47.]

A voltammetriás technika kitűnően alkalmazható a dopamin felvétel és leadás kinetikájának a vizsgálatára. Munkánk során több vegyületet dopamin tranziensekre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk, további terveink között szerepel az eddig vizsgált farmakonok további tesztelése, valamint egyéb, gyógyszerjelölt vegyületek dopamin szintre gyakorolt hatásának a vizsgálata ezzel a technikával.

7. Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Hernádi István, egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek az általa vezetett kísérletekben. Külön köszönetet mondanék Bali Zsolt, egyetemi tanársegédnek, aki segített elsajátítani a laboratóriumi munka minden apró lépését, valamint igen sokat segített az adatok kiértékelésében és a voltammetriás mérések során felmerülő technikai problémák megoldásában.

8. Felhasznált irodalom:

1. Bagetta G, De Sarro G, Priolo E, Nistico G, Ventral Tegmental Area: Site Through Which Dopamine D2-Receptor Agonists Evoke Behavioural And Electrocortical Sleep In Rats. *Br J Pharmacol* 95: 860-866. (1988)
2. Bali Zk, Inkeller J, Csurgók R, Bruszt N, Horváth H, Hernádi I. Differential Effects Of A7 Nicotinic Receptor Agonist Pha-543613 On Spatial Memory Performance Of Rats In Two Distinct Pharmacological Dementia Models. *Behav Brain Res* 278: 404–410. (2015)
3. Bánki M. Cs. Agyunk Fogságában. Prodie Kiadó, Budapest (2006)
4. Berendse Hw, Groenewegen Hj. Restricted Cortical Termination Fields Of The Midline And Intralaminar Thalamic Nuclei In The Rat. *Neuroscience* 42(1):73-102. (1991)
5. Björklund A És Dunnett Sb. Dopamine Neuron Systems In The Brain: An Update. *Trends Neurosci* 30: 194-202. (2007)
6. Björklund A, Dunnett S.B. Fifty Years Of Dopamin Research. *Trends Neurosci* 30(5): 185-187. (2007)
7. Csoknya M. Neurobiológia Jegyzet, Pécsi Tudományegyetem, Pécs (2003)
8. Csoknya M, Lengvári I. Biológiai Szabályozó Rendszerek. Szaktudás, Budapest (1993)
9. Csoknya M, Hámori J. Az Idegrendszer Összehasonlító Anatómiája. Dialóg Campus, Pécs (1996)
10. Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence For The Existence Of Monoamine-Containing Neurons In The Central Nervous System. *Acta Physiol Scand* 62: 1–55. (1964)
11. Fehér O. Pszichofarmakológia, Jatepress, Szeged (2003)
12. Park Dm, Findley Lj, Teychenne Pf. Nomifensine In Parkinsonism. *Br J Clin Pharmacol* 4(Suppl 2): 185s–186s (1977)
13. Park Dm, Findley Lj, Hankst G, Sandler M. Nomifensine: Effect In Parkinsonian Patients Not Receiving Levodopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44: 352-354. (1981)
14. Garris Pa, Budygin Ea, Phillips Pem, Venton Bj, Robinson Dl, Bergstrom Bp, Rebec Gv, Wightman Rm. A Role For Presynaptic Mechanisms In The Actions Of Nomifensine And Haloperidol. *Neuroscience* 118(3): 819-829. (2003)

15. Gottfried Ja (Szerk), *Neurobiology Of Sensation And Reward*, Crc Press, Boca Raton (Fl) (2011)
16. A.M. Gray, P.S.J. Spencer & R.D.E. Sewell. The Involvement Of The Opioidergic System In The Antinociceptive Mechanism Of Action Of Antidepressant Compounds. *British Journal Of Pharmacology* (1998), 124
17. Haber Sn. The Place Of Dopamine In The Cortico-Basal Ganglia Circuit. *Neuroscience* 282:248-257. (2014)
18. Habermann W. A Review Of Controlled Studies With Nomifensine, Performed Outside The Uk. *Br J Clin Pharmac* 4: 237s-241s (1977).
19. Henry Jp, Botton D, Sagne C, Isambert Mf, Desnos C, Blanchard V, Raisman-Vozari R, Krejci E, Massoulie J, Gasnier B. Biochemistry And Molecular Biology Of The Vesicular Monoamine Transporter From Chromaffin Granules. *J Exp Biol* 196: 251–262 (1994)
20. Henry Jp, Botton D, Sagne C, Isambert Mf, Desnos C, Blanchard V, Raisman-Vozari R, Krejci E, Massoulie J, Gasnier B. Biochemistry And Molecular Biology Of The Vesicular Monoamine Transporter From Chromaffin Granules. *J Exp Biol* 196: 251–262 (1994)
21. Van Den Heuvel Dma, Pasterkamp Rj. Getting Connected Dopamine System. *Prog Neurobiol* 85(1): 75-93. (2008)
22. Jones Sr, Gainetdinov Rr, Jaber M, Giros B, Wightman Rm, Caron Mg. Profound Neuronal Plasticity In Response To Inactivation Of The Dopamine Transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(7): 4029–4034. (1998)
23. .Gilbert W. Kim, Jieru E. Lin, Erik S. Blomain, And Scott A. Waldman. New Advances In Models And Strategies For Developing Anti-Obesity Drugs. *Expert Opin Drug Discov*. Jun 2013; 8(6): 655–671.
24. King Dj, Devaney N. Clinical Pharmacology Of Sibutramine Hydrochloride (Bts 54524), A New Antidepressant In Healthy Volunteers. *Br J Clin Pharmac* 26: 607-611. (1988)
25. D.N. Kiortsis, S. Tsouli, T.D. Filippatos, S. Konitsiotis, M.S. Elisaf. Effects Of Sibutramine And Orlistat On Mood In Obese And Overweight Subjects: A Randomised Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18:207–210.
26. Kuhar Mj, Couceyro Pr, Lambert Pd. Biosynthesis Of Catecholamines. In: Siegel Gj (Szerk). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular And Medical Aspects*. 6th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)

27. Liang Sl, Hsu Sc, Pan Jt. Involvement Of Dopamine D2 Receptor In The Diurnal Changes Of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neuron Activity And Prolactin Secretion In Female Rats. *J Biomed Sci* 21(3): 37. (2014)
28. Morton Ar, Yu R, Waldek S, Holmes Am, Mundy K. Withdrawal Of Nomifensine. *Br Med J*. 293(6544): 452-453. (1986)
29. Paxinos G., Watson C. (2005). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, 5th Edn San Diego, Elsevier Academic Press
30. Pierce Rc, Kumearesman V. The Mesolimbic Dopamine Sysytem: The Final Common Pathway For The Reinforcing Effect Of Drugs Of Abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30(2): 215-38. (2006).
31. Pléh Cs, Kovács Gy, Gulyás B. *Kognitív Idegtudomány*. Osiris, Budapest (2003)
32. Robinson Dl, Venton Bj, Heien Mlav, Wightman Rm. Detecting Subsecond Dopamine Release With Fast-Scan Cyclic Voltammetry In Vivo. *Clinical Chemistry* 49(10): 1763–1773 (2003)
33. Robinson Dl, Wightman Rm. Rapid Dopamine Release In Freely Moving Rats. In: Michael Ac, Borland Lm (Szerk). *Electrochemical Methods For Neuroscience*. Crc Press, Boca Raton (Fl) (2007)
34. Schultz W. Behavioral Dopamine Signals. *Trends Neurosci* 30(5): 203-210. (2007)
35. Gilbert W. Kim, Jieru E. Lin, Erik S. Blomain, And Scott A. Waldman. New Advances In Models And Strategies For Developing Anti-Obesity Drugs. *Expert Opin Drug Discov*. Jun2013; 8(6): 655–671.
36. Smith Sm, Burbach Jph, Smidt Mp. Developmental Origin And Fate Of Meso-Diencephalic Dopamine Neurons. *Prog Neurobiol* 78(1): 1-16. (2006)
37. Takahashi N, Miner Ll, Sora I, Ujike H, Revay Rs, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl Gr. Vmat2 Knockout Mice: Heterozygotes Display Reduced Amphetamine-Conditioned Reward, Enhanced Amphetamine Locomotion, And Enhanced Mptp Toxicity. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 94(18): 9938-43. (1997)
38. Taylor M, Jaquins-Gerstl A, Sesack Sr, Michael Ac. Domain-Dependent Effects Of Dat Inhibition In The Rat Dorsal Striatum. *J Neurochem*. 122(2): 283–294. (2012)
39. Toyohara J, Hashimoto K. A7 Nicotinic Receptor Agonists: Potential Therapeutic Drugs For Treatment Of Cognitive Impairments In Schizophrenia And Alzheimer's Disease. *Open Med Chem J* 4: 37–56. (2010)
40. Trimble Mr, Meldrum Bs, Anlezark G. Effect Of Nomifensine On Brain Amines And Epilepsy In Photosensitive Baboons. *Br J Clin Pharmac* 4: 101s-107s (1977)

41. Tziomalos K, Krassas Ge, Tzotzas T. The Use Of Sibutramine In The Management Of Obesity And Related Disorders: An Update. *Vasc Health Risk Manag.* 5: 441–452. (2009)
42. Sass M, Zboray G. Összehasonlító Anatómiai Előadások: Az Idegrendszer. Eötvös Kiadó, Budapest (1996)
43. Venton Bj, Wightman Rm, Psychoanalytical Electrochemistry: Dopamine And Behavior. *Anal Chem* 75(19): 414a-421a (2003)
44. Voorn P, Gerfen Cr, Groenewegen Hj. Compartmental Organization Of The Ventral Striatum Of The Rat: Immunohistochemical Distribution Of Enkephalin, Substance P, Dopamine, And Calcium-Binding Protein. *J Comp Neurol* 289(2):189-201. (1989)
45. Westerink Bh. Brain Microdialysis And Its Application For The Study Of Animal Behaviour. *Behav Brain Res* 70(2):103-24. (1995)
46. Wimalasena K. Vesicular Monoamine Transporters: Structure-Function, Pharmacology, And Medicinal Chemistry. *Med Res Rev* 31(4): 483-519. (2011)
47. Wightman, R.M. & Robinson, D.L. Transient Changes In Mesolimbic Dopamine And Their Association With “Reward”. *Journal Of Neurochemistry* 82, 721-35 (2002).
48. Yakabow Al, Hardiman S, Nash Rj. An Overview Of Side Effects And Long-Term Experience With Nomifensine From United States Clinical Trials. *J Clin Psychiatry.* 45(4 Pt 2):96-101. (1984)