

Szent István Egyetem – Állatorvos-tudományi Kar

Biológia Intézet – Ökológiai tanszék

A kannabinoidok szerepe a szociális kihívásokra adott válaszreakciók szabályozásában

OTDK dolgozat

Varga Zoltán Kristóf

SZIE – ÁOTK Biológus MSc II.évfolyam

Témavezetők:

Dr. Haller József, Ph.D., D.Sc.

osztályvezető, tudományos tanácsadó
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,
Magatartásneurobiológiai Osztály

Dr. Aliczki Manó, Ph.D.

tudományos munkatárs
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,
Magatartásneurobiológiai Osztály

Belső konzulens:

Dr. Fülöp Dávid, Ph.D.

tudományos segédmunkatárs
SZIE Állatorvos-tudományi Kar,
Ökológiai Tanszék

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés	3
2.2 A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer.....	3
2.3 A kannabinoidok és az agresszió	6
3. Célkitűzések	9
4. Anyag és módszer	10
4.1 Kísérleti alanyok.....	10
4.2 Drogok és dózisok	10
4.3 Magatartásvizsgálat és elemzés	11
4.4 Hormonmérés	12
4.5 Kísérleti elrendezés.....	12
4.6 Statisztikai analízis	14
5. Eredmények.....	15
6. Megvitatás.....	23
7. Összefoglalás.....	26
8. Summary	27
10. Köszönetnyilvánítás	33
11. Egyéni hozzáadott munka	34

1. Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonoil-glicerol
Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrokannabinol
ACTH	adrenokortikotróp hormon
AEA	2-arachidonolil-etanolamid (anandamid)
ANOVA	varianciaanalízis
CBR	kannabinoid receptor
CB₁R	1-es típusú kannabinoid receptor
CB₂R	2-es típusú kannabinoid receptor
CB₁RKO	1-es típusú kannabinoid receptor génkiütött (<i>knock-out</i>)
CBx	eddig ismeretlen kannabinoid receptor
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
DAG	1,2-diacil-glicerol
DMSO	dimetil-szulfoxid
eCB	endokannabinoid
FAAH	zsírsavamid-hidroláz (<i>fatty acid amid hydrolase</i>)
GABA	gamma-amino-vajsav (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
i.p.	intraperitoneális
MAGL	monoacil-glicerollipáz
MC	metilcellulóz
NArPE	N-arachidonoilfoszfát-etanolamin
RIA	radioimmuno-vizsgálat (<i>radioimmunoassay</i>)
TRPV₁	1-es típusú vanilloid receptor

2. Bevezetés

2.2 A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer

Az indiai kender (*Cannabis indica*) különböző származékainak élvezeti és gyógyászati célokra való tudatos felhasználása az ókori időkre tekint vissza. A történelem során egyes feljegyzésekben orvosságként, másokban kábítószerként említik, ennek megfelelően a használata iránti tolerancia is széles skálán változott. Bár mentális betegségek kezelésére, fájdalomcsillapításra, valamint nyugtatóként régóta alkalmazták, a kannabisz magas abúzuspotenciáljára és használatának egyéb káros hatásaira hivatkozva elsőként az Amerikai Egyesült Államokban, majd ezt követően a világ szinte összes országában betiltották. Jelenleg a marihuána hatásaiért felelős egyes kannabinoidokat tartalmazó szerek több országban legálisan alkalmazhatók AIDS, illetve daganatos megbetegedések kezelési mellékhatásainak enyhítésére (étvágytalanság, súlyvesztés, fájdalom) valamint glaukóma kezelésére (szemnyomás csökkentése). Ezen felül egyes országokban a marihuána rekreációs célokra való felhasználása is legalizált, illetve tolerált.

A *Cannabis* nemzetség tagjainak biológiailag aktív hatásai a fitokannabinoidokhoz köthetők, amelyekből jelenleg közel 60-at ismerünk (Fine és Rosenfeld, 2013). Ezek közül az egyik legjelentősebb, a marihuána pszichoaktív hatásaiért felelős Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC), amelynek pontos szerkezetét Gaoni és Mechoulam határozta meg 1964-ben (Gaoni és Mechoulam, 1964). A Δ^9 -THC és egyéb természetes valamint mesterséges exogénkannabinoidok hatásmechanizmusát tanulmányozva írták le 1988-ban az állati szervezetben működő kannabinoid receptorok (CBR) jelenlétét (Devane és mtsai., 1988), ezzel az endokannabinoid rendszer (eCB rendszer) első nyomaira bukkanva. Kannabinoid receptorból megkülönböztetünk 1-es (CB_1R) (Matsuda és mtsai., 1990), illetve 2-es (CB_2R) (Gérard és mtsai., 1991) típusút, valamint feltételezzük további, eddig ismeretlen receptorok létezését is (CB_X). A kannabinoid receptorok 7 helikális transzmembrán doménből álló, G-proteinhez kapcsolt fehérje komplexek. A CB_1R legnagyobb részben a központi idegrendszer neuronjaiban expresszálódik. Nagyobb mennyiségben megtaláljuk a szaglógumóban, kortikális, talamikus, hipotalamikus, kisagyi és agytörzsi területeken, illetve a fájdalomérzet pályáin

a gerincvelőben (Herkenham és mtsai., 1990), bár az expresszió mértéke fajokként eltérő mintázatokat mutathat. CB₁R perifériásan a májban, vesében, illetve a mellékvesekéregben található. A CB₂R döntően a periférián, az immunrendszer sejtjein expresszálódik. A rendszert egyre inkább feltérképezve fedezték fel, hogy léteznek ezeken a receptorokon keresztül ható endogén, lipidtermészetű ligandok, melyek farmakológiai tulajdonságaikban hasonlítanak a korábban megismert fitokannabinoidokra. Ma két endokannabinoidot (eCB) tartunk meghatározónak a rendszer működésében, az arachidonoil-etanolamidot, más néven anandamidot (AEA) (Devane és mtsai., 1992) és a 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG) (Mechoulam és mtsai., 1995). Az AEA és a Δ⁹-THC megközelítőleg azonos affinitással kötődik a CB₁R-hez, míg a 2-AG ettől némileg elmarad (Lutz, 2002; összefoglaló: Pertwee és Ross, 2002). Ugyanakkor az AEA a CB₁R-nek csak parciális agonistája (Mackie és mtsai., 1993), míg a 2-AG mindkét ismert CBR-en teljes agonistaként hat és jóval nagyobb mennyiségben is van jelen a központi idegrendszerben (Stella és mtsai., 1997; Sugiura és mtsai. 1999). Az AEA egyébként parciális agonistája továbbá a CB₂R és az 1-es típusú vanilloid receptornak (TRPV₁), illetve ismerjük ezektől a receptoroktól független hatásait is (Wenger és mtsai., 2003). Ezen felül további, eddig még nem ismert, kannabinoid érzékeny receptorok hatásait láthattuk glutamáterg szinapszisok (Kőfalvi és mtsai., 2005), illetve a szorongás szabályozásban (Haller és mtsai., 2002) is.

Az endokannabinoidok alapvető funkciója a központi idegrendszeri glutamáterg, GABAerg, szerotoninerger és dopaminerg szinaptikus aktivitás szabályozása. Ez egy retrográd jelátviteli mechanizmuson keresztül valósul meg, vagyis neurotranszmisszió hatására a posztzinaptikus sejtől felszabaduló kannabinoid a preszinaptikus idegsejt irányába vándorol, és ott fejti ki moduláló hatásait (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001). Az endokannabinoid szintézis ún. *on-demand* (szükség szerinti) módon történik, vagyis a kannabinoidok nem tárolódnak szinaptikus vezikulákban, mint más idegrendszeri jelátvivő molekulák, képződésük és ürülésük közvetlenül a posztzinaptikus idegsejt depolarizációjának hatására beáramló Ca²⁺-hoz kötött. A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ hatására aktiválódó kalcium-dependens transzasiláz egy membránlipid arachidonsavát helyezi át a szintén membránalkotó foszfatidil-etanolaminra, ezzel N-arachidonoilfoszfát-etanolamint

(NArPE), az AEA prekursorát létrehozva. Az AEA-t végül a foszfolipáz D hasítja le a NArPE-ről. Ezen felül léteznek további alternatív szintézisutak is, melyek különböző fejlődési vagy metabolikus állapotokban dominálhatnak (Di Marzo és Petrosino, 2007). A 2-AG szintézise szintén Ca^{2+} -beáramláshoz kötött folyamat, ahol a fent említett foszfolipáz enzim foszfatidil-inozitról állítja elő a 1,2-diacilglicerolt (DAG), ami egy diacil-glicerol-lipáz enzim katalizálta reakcióban alakul 2-AG-vá (Di Marzo és Petrosino, 2007). A 2 fő endokannabinoid szintézise, nem kizárólagosan neurotranszmitter mediált folyamat, egyes cAMP serkentő ágensek az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növelésével szintén kiválthatják kialakulásukat, például glükokortikoid mediált eCB szintézis során (Di Marzo és mtsai., 1998; Di és mtsai., 2003; 2005; Malcher-Lopes és mtsai., 2006). A szintézis után a kannabinoidok kijutnak a szinaptikus résbe, majd a preszinaptikus idegsejt felületén közvetlenül ioncsatornákhöz kötődve, vagy CBR-ek G-protein rendszerén át fejtik ki hatásukat (Di Marzo és Petrosino, 2007). Közvetlen módon N, illetve P/Q Ca^{2+} csatornákat képesek blokkolni, ezzel meggátolva a sejtbe való további Ca^{2+} beáramlást és a neuron tüzelését (Twitchell és mtsai., 1997; Kreitzer és Regehr, 2001). G-protein rendszeren keresztül az N típusú Ca^{2+} csatornákat gátolják (Lenz és mtsai., 1998), illetve befelé egyenirányú K^{+} csatornákat nyitnak meg (Guo, 2004), így csökkentve az idegsejt excitatórikus aktivitását. A ligandok intracellulárisan enzimatis úton bomlanak le. Az AEA-ot a zsírsav-amid hidroláz (FAAH) enzim arachidonsavvá és etanol-aminná, míg a 2-AG-t a monoacilglicerollipáz (MAGL) arachidonsavvá és glicerinné bontja (Dinh és mtsai., 2002; Freund és mtsai., 2003; Di Marzo és Petrosino, 2007). Ezen metabolikus folyamatok befolyásolása egy jelenleg is alkalmazott módszer a rendszer tanulmányozására.

Az endokannabinoid jelátvitel magatartási és élettani hatásainak vizsgálata a rendszer manipulálásán keresztül lehetséges. A jelátvitelt genetikai és farmakológiai módszerekkel egyaránt blokkolhatjuk, illetve serkenthetjük. Gyakran alkalmazott negatív, genetikai manipulációs módszer a génkiütés, amivel valamely CBR-t nélkülöző állatok (CBR *knock out*, KO) előállításra nyílik lehetőség. Az állatok vizsgálatával indirekt módon következtetünk a receptor szerepére, illetve az egyes kannabinoid hatások háttérmechanizmusára. A módszer hátránya lehet, hogy felléphet génkompenzáció, vagyis a kiütött gén által kódolt fehérjék bizonyos funkcióit átvehetik más

génproduktumok, illetve mivel az állat egész élete során nélkülözi az adott receptort, egyes neurotranszmissziós folyamatok átstrukturálódhatnak, ezzel torzítva az eredményeket. A rendszer negatív irányú, farmakológiai manipulációját elérhetjük CB₁R antagonisták és inverz agonisták alkalmazásával. Ilyenek pl. az AM251, az AM281, az SR141716 (rimonabant), vagy a csendes antagonista O2050. A jelátvitel serkentésére alkalmas farmakológiai módszer CBR agonisták alkalmazása, mint pl. a WIN55,212-2, a CP55940, vagy a HU210. A receptor agonisták és antagonisták hátránya, hogy az endokannabinoid rendszert globálisan aktiválva számos nonspecifikus hatást fejthetnek ki. A jelenleg alkalmazható feltételezhetően legspecifikusabb farmakológiai módszer a kannabinoid metabolizmus gátlása, ami az adott endokannabinoidot bontó enzim blokkolását jelenti, miáltal az adott endokannabinoid feldúsul, annak jelátvitele fokozódik. A módszer legnagyobb előnye a nagymértékű szelektivitás, ugyanis a jelátvitel csak ott és csak akkor erősödik föl, ahol és amikor azaz adott körülmények között lezajlik. Az AEA-t gátló FAAH enzim blokkolására széles körben alkalmazott vegyület az URB597 (Kathuria és mtsai., 2003), amely élettani és magatartási hatásairól nagy mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. A 2-AG-t bontó MAGL gátlásának hatásai korántsem mondhatóak ennyire feltérképezettnek, mivel erre csak az utóbbi időben előállított JZL184 (Long és mtsai., 2009) nevű vegyület ad lehetőséget.

2.3 A kannabinoidok és az agresszió

Régóta ismert, hogy a marihuána és más kannabisz-származékok befolyásolják a kognitív és emocionális magatartást, amely hatások háttérmechanizmusairól az utóbbi évtizedekben egyre többet tudtunk meg (Moreira és Lutz, 2008; Moreira és Wotjak, 2010; Zanettini, 2011). A eCB rendszer működésének feltárása az állandóan fejlődő manipulációs technikákkal és a viselkedés vizsgálatának érzékenyebb megközelítéseivel az eCB jelátvitel terápiás relevanciájára terelte a figyelmet (Bambico és mtsai., 2009). Bár a kannabinoidok agresszív magatartásra gyakorolt hatásait az elsők között kezdték tanulmányozni, szabályozó szerepük részletei ebben az aspektusban ezidáig tisztázatlanok, a vizsgálati eredmények gyakran ellentmondásosak (Mechoulam, 2002).

Hal, rágcsáló, majom és humán vizsgálatokban fitokannabinoidokat alkalmazva egyaránt megfigyelhetőek voltak proagresszív (Carlini és mtsai., 1972; 1977a; 1977b;

Sethi és mtsai., 1986; Cherek és mtsai., 1993), neutrális (Cutler és Mackintosh, 1975; 1984a) és antiagresszív (Miczek és Barry, 1974; Miczek, 1978) hatások. Carlini és munkatársai Δ^9 -THC, valamint kannabisz kivonat agresszióra gyakorolt hatásait különböző környezeti paraméterek és fiziológiai állapotok mentén vizsgálták patkány modellekben. A krónikus kezelés éheztetéssel (1972), tartós hűtéssel, morfin elvonással (1977a), illetve a REM fázistól való megvonással (1977b) együtt alkalmazva növelte az agressziót, míg a stresszorok hiányában nem befolyásolta azt. Érdekes felvetés, hogy az éheztetett állatok esetében a megfigyelt agresszió másodlagosan is kialakulhatott, pl. a kannabisz ismert étváagnövelő hatására nézve (Di Marzo és mtsai., 2001; Mechoulam, 2002). Ezzel konzisztensen több csoport számolt be kannabisz-indukált agressziófokozó hatásokról elektromos lábsokknak kitett rágcsálóknál (Carder és Olson 1972; Sethi és mtsai., 1986). Carder és Olson (1972) megfigyelte, hogy míg a csoportosan tartott állatok esetében az akut kezelés csak szedatív hatással bírt, a kannabisz krónikus alkalmazása az egérölő (muricid) magatartás felerősödését és az alomtársak megtámadását váltotta ki az egyedekből. Ezzel szemben szociálisan izolált állatokból az egyszeri akut kezelés is a sokk forrásának támadását és muricid magatartást eredményezett. Előbbi magatartás teljesen eltűnt, utóbbi felére csökkent az izoláció megszüntetése után. Látható tehát, hogy a kannabisz döntően valamely környezeti, vagy szociális stressz mellett váltotta ki és/vagy erősítette fel az agresszív magatartást. Bár a krónikus kezelések sok esetben hasonló irányban befolyásolták a viselkedést, a kannabisz proagresszív hatásai nem általánosan elfogadottak. Az agresszivitást tekintve neutrális hatásokról számoltak be Cutler és Mackintosh (1975; 1984), hím-hím és hím-nőstény párok magatartását vizsgálva. Ezen felül a korai irodalom elemzése, valamint kiegészítő kísérletek elvégzése után Miczek arra a következtetésre jutott, hogy nincs egyértelmű pozitív összefüggés a Sprague-Dawley patkányok krónikus Δ^9 -THC kezelése és intraspecifikus agressziója között (Miczek és Barry, 1974). Ezzel együtt megerősítette, hogy a krónikus kezelés hatására muricid magatartást mutattak, korábban nem egérölő egyedek is (Miczek és Barry, 1974). Később egerekkel, patkányokkal és mókusmajmokkal végzett kísérletekben a Δ^9 -THC egyes, más magatartást nem befolyásoló dózisait agresszió csökkentő hatásúnak írták le, erős kontrasztban a korábban megfigyelttel (Miczek, 1978). A kannabinoid jelátvitel aktiválása a szintetikus CB₁R agonistával, az arachidonoil-2-klóretilamiddal szintén agressziócsökkentő hatást mutatott patkányokban

(Rodriguez-Arias és mtsai., 2013). Az AEA vizsgálata során bifázikus, dóziszfüggő hatásokat figyeltek meg egerekben, ahol az alacsony dózis agresszióserkentő volt, míg a nagyobb dózisok nem befolyásolták a szociális magatartást (Sulcova, 1998).

A CB₁ receptor aktivitásának az AM251 antagonistával történő gátlása nem fejtett ki önálló hatást az agresszióra, azonban krónikus alkalmazása csökkentette a társaiktól izoláltan nevelt patkányok megnövekedett agresszív magatartását (Zamberletti és mtsai., 2012).

Az eCB jelátvitel genetikai úton való gátlásának hatásai erősen függtek a kísérleti kontextustól. CB₁R KO rágsálók saját ketrecükben megnövekedett territoriális agressziót mutattak (Haller és mtsai., 2004; Rodriguez-Arias és mtsai., 2013), míg idegen környezetben az agresszív és szociális magatartás is csökkent (Haller és mtsai., 2004). Kutatócsoportunk egy korábbi munkája alapján a magyarázat, hogy a kannabinoid jelátvitel az eltérő kontextusban eltérő mértékben aktiválódó stressz-tengellyel erős interakcióban fejt ki egyes magatartási hatásait (Aliczki és mtsai., 2013). Utóbbi mellett szól, hogy a CB₁R KO egerek vérplazmájában szignifikánsan nagyobb volt a stresszhelyzetben szintetizálódó adrenokortikotróp hormon (ACTH) koncentrációja vad típusú társaikéhoz képest (Haller és mtsai., 2004).

Az irodalomban fellelhető ellentmondások hátterében valószínűleg többek között az alkalmazott manipulációk gyenge neurokémiai és anatómiai specificitása áll. A szervezetbe jutatott növényi-, szintetikus- és endokannabinoidok direkt módon, globálisan aktiválják az endokannabinoid rendszert, így mind a periférián, mind a központi idegrendszerben, eltérő funkciókért felelős területek és receptorok szimultán működését figyelhetjük csak meg. Továbbá az endokannabinoidok szerepe mind a nem-szociális, mind a szociális kihívásokra adott válaszok szabályozásában erősen függ a környezeti kontextustól és az annak befolyása alatt álló stresszreaktivitástól (Hao és mtsai., 2000; Haller és mtsai., 2004; 2009; Aliczki és mtsai., 2012; 2013). A korábbi ellentmondások magyarázhatóvá válhatnak, egy az eddigieknél specifikusabb, indirekt farmakológiai manipuláció alkalmazásával, valamint a hatások környezettel való interakcióinak feltérképezésével. Az endokannabinoid metabolizmust gátolva a szervezetben éppen lejátszódó endokannabinoid akciókat specifikusan erősíthetjük fel.

Az utóbbi években ezzel a módszerrel számos, főleg az AEA-hoz köthető endokannabinoid mediált magatartási hatást jellemeztek sikerrel (összefoglaló: Zanettini, 2011). Ezzel ellentétben a MAGL enzim gátlásával specifikusan felerősített 2-AG jelátvitel vizsgálatára csak az utóbbi időben született megoldás (Long és mtsai., 2009), így annak magatartási hatásai kevésbé feltérképezettek (Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Sciolino és mtsai., 2011; Aliczki és mtsai., 2012; 2013), agresszióra gyakorolt hatásairól eddig nincs adat.

3. Célkitűzések

Célunk az endokannabinoid, azon belül a 2-AG jelátvitel agressziószabályzásban betöltött szerepének vizsgálata. Kérdésünk, hogy hogyan befolyásolja a JZL184 indukálta megemelkedett 2-AG jelátvitel CD1 egerek agresszív magatartását és stresszreaktivitását a rezidens-betolakodó tesztben. Mivel az endokannabinoid rendszer korábban megfigyelt magatartási hatásai a kísérleti kontextustól erősen függték (Aliczki et al., 2012; Sciolino és mtsai., 2011), külön kísérletben vizsgáltuk mind a rezidens, mind a betolakodó állatokat. Továbbá, mivel kutatócsoportunkban korábban leírtuk, hogy a megemelkedett 2-AG jelátvitel befolyásolja a stresszreaktivitást és azon keresztül a magatartást (Aliczki és mtsai., 2013), a kortikoszteron szintézist gátló metiraponnal kombinált kezeléseket alkalmazva kívántuk az ilyen irányú interakciókat feltérképezni. Ezen felül CB₁R antagonistá AM251-el kombinált kezeléseket alkalmaztunk a megfigyelt hatások receptorfüggésének felderítésére.

4. Anyag és módszer

4.1 Kísérleti alanyok

A kísérleti alanyok 2 hónapos, hím CD1 egerek voltak (Charles Riverlaboratories, Budapest, Magyarország). Minden alany teszt- és drog-naív állat volt, kísérletnek egyszeri alkalommal tettük ki őket. Az egerek a szociális tartáskor kialakuló hierarchia kiküszöbölése miatt egyénileg voltak tartva, 15x45x20 cm-es átlátszó falú dobozokban. A kísérleti szobában a hőmérséklet egységesen $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on, a páratartalom $60\pm 10\%$ -on volt tartva. A fény-sötét ciklus 12:12 órás volt, a lámpák 07:00-kor kapcsolódtak fel. Víz és rágcsáló-pellet *ad libitum* elérhető volt. A magatartási teszteket a nap világos periódusának első felében végeztük. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC) és a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Tanácsának jóváhagyásával zajlottak le.

4.2 Drogok és dózisok

A kísérleteknél alkalmazott MAGL gátló JZL184-et (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) és a CB_1R antagonistát AM251-et (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 1,5 % dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó 0,4%-os metilcellulóz oldatban (MC) oldottuk föl úgy, hogy a dózisok az előbbi anyag esetében 0 (vivőanyag), 8, illetve 16 mg/kg-nak, utóbbinál 0 (vivőanyag), illetve 0.5 mg/kg-nak adódjanak. Az AM251 alkalmazott dózisát előzetes kísérleteink alapján választottuk aszerint, hogy az önállóan ne befolyásolja az agresszív magatartást. Az állatok 10 ml/kg folyadékot kaptak intraperitoneális (i.p.) injekciók formájában. A kortikoszteron szintézis gátló metirapont 5% Tween80-at tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Itt az alkalmazott dózis 0 (vivőanyag) és 30 mg/kg, a beadott térfogat 5 ml/kg volt, a kombinált kezelések során adott folyadékmennyiség minimalizálásának érdekében. A metirapon alkalmazott dózisa előzetes kísérleteink során megbízhatóan és szignifikánsan csökkentette a kortikoszteron koncentrációt, ugyanakkor nem befolyásolja a lokomotoros aktivitást. Az állatok a kombinált kezeléseket két egymást azonnal követő i.p. injekció formájában kapták.

4.3 Magatartásvizsgálat és elemzés

Munkánk során az agresszív viselkedést a rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk. A teszt során a megfigyelt állatot fajtársával való közvetlen találkozás formájában állítjuk szociális kihívás elé. Tradicionálisan a kihívást saját ketrecében átélő, jellemzően a fajtársánál nagyobb méretű, territoriális magatartású rezidens egyed a megfigyelési objektum. Ennek oka, hogy normális körülmények között ez az egyed nagyobb valószínűséggel kezdeményez összecsapást, hiszen a harc felvállalásából adódó potenciális költségei természetéből fakadóan kisebbek, míg a harc elutasításából adódó potenciális költségei (például: territóriumvesztés) nagyobbak a betolakodó állaténál. A fentiekből látszik, hogy a rezidens és a betolakodó státusz eltérő szociális kontextusnak minősül, így ezt kihasználva a kezelés magatartási hatásait külön kísérletekben, ezen eltérő körülmények között elemezhetjük.

A kísérletek a világos periódus korai szakaszában, egy csendes, elkülönített, kizárólag erre a célra használt állattartó szobában zajlottak. A kísérleti platform az egerek tartására alkalmazott 15x45x20 cm-es átlátszó falú doboz volt. A teszt során a saját ketrecében lévő rezidens állathoz egy nála kisebb termetű betolakodó egyedet teszünk 10 percre. A viselkedést kamerával rögzítettük, majd vakon elemeztük a H77 nevű eseményrekorder szoftverrel (Haller József, Budapest). Megfigyelt változóink a bevitt és az elszenvedett harapások száma, illetve egymást kizáró támadó, védekező és egyéb viselkedések időtartamai voltak. Támadó magatartásnak tekintettük az agresszív kurkászást (az állat ellenfelét mellső lábaival lenyomja, közben szaggatott, gyors mozdulatokkal annak szőrében turkál, harapdál), a birkózást (birkózásszerű mozdulatok, amit gyakran harapások kísérnek) és a farokrázást (az állat szemben áll ellenfelével, közben a farkát rázza). Védekező magatartások a védekező felágaskodás (az állat hátsó két lábára áll, miközben mellső lábaival ellenfelét próbálja magától eltartani), az elkerülés (az állat kitér a hozzá közeledő elől) és a menekülés (az állat menekül az őt üldöző ellenfél elől). Egyébnek tekintettünk minden, a fenti kategóriákba nem sorolható eseményt (exploráció, pihenés, táplálkozás, stb.).

4.4 Hormonmérés

A vérplazma kortikoszteronszintjének méréséhez a dekapitációval nyert vért 12 µl etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük, majd jégágyon tároltuk a centrifugálásig. A centrifugálást 4 °C-on végeztük, ezután a plazmát leszívtuk, majd a mintákat a hormonmérésig –20 °C-on tároltuk. A plazma kortikoszteron szint mérése radioimmuno-vizsgálat (RIA) módszerrel történt. Minden mintát kétszer és egy kísérlet alatt ugyan abban az assay-ben mérték meg. A méréseket megelőzően a kortikoszteroid-kötő-fehérjét (CBG) alacsony pH-n eliminálták. Jelölőanyagként ¹²⁵I-jelölt kortikoszteron-karboximetiloxim-tirozin-metil észter származékot használtak.

4.5 Kísérleti elrendezés

Az 1. kísérlet célja a JZL184-kezeléssel fokozott 2-AG jelátvitel territoriális agresszióra és stresszreaktivitásra gyakorolt hatásainak feltárása volt. Az alanyok 0 (vivőanyag), 8, illetve 16 mg/kg JZL184 kezelést kaptak, véletlenszerű sorrendben, i.p. injekciók formájában, majd a kezelés után 40 perccel a rezidens-betolakodó tesznek vetették alá őket, ami 10 percen át tartott. A teszt után az alanyokat dekapitáltuk vérvétel céljából. A csoportok beosztását, azok mintaelemszámait és a kapott kezeléseket az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: csoportok és kezelések az 1.kísérletben

Kísérlet	Kezelt állat szociális státusza	Csoport	Előkezelési idő	Kezelés
1.	rezidens	Kontroll (n=10)	40 perc	i.p. vivőanyag
		JZL184 ₈ (n=10)	40 perc	i.p. 8mg/kg JZL184
		JZL184 ₁₆ (n=10)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184

n: csoportelemszám

A 2. kísérletben a hatások szociális kontextustól való függését vizsgálva a betolakodó állatokat kezeltük és vizsgáltuk, az 1. kísérletnél leírtak szerint. Azokat a párokat, ahol a rezidens semmilyen agresszív magatartást nem mutatott a vizsgálatból kizártuk. A csoportok beosztását, azok mintaelemszámait, a vizsgálatba ténylegesen bevont állatok számát és a kapott kezeléseket a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: csoportok és kezelések az 2. kísérletben

Kísérlet	Kezelt állat szociális státusza	Csoport	Előkezelési idő	Kezelés
2.	betolakodó	Kontroll ($n=10$, $n_v=7$)	40 perc	i.p. vivőanyag
		JZL184₈ ($n=9$, $n_v=5$)	40 perc	i.p. 8mg/kg JZL184
		JZL184₁₆ ($n=9$, $n_v=4$)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184

n : csoportelemszám, n_v : vizsgálatba ténylegesen bevont egyedek száma

A 3. kísérlet célja a megfigyelt magatartásra és stresszreaktivitásra gyakorolt hatások potenciális összefüggéseinek feltárása volt. Ennek érdekében a magatartásra és stressz-indukált kortikoszteron szintre legnagyobb hatást gyakorló 16 mg/kg dózisú JZL184 kezelést, a kortikoszteron szintézist gátló metirapon kezelésekkel kombináltuk, majd az állatokat így vetettük alá a rezidens-betolakodó tesztnek, betolakodó státuszban. A betolakodó állatok vizsgálatának oka, hogy az első két kísérletben csak a betolakodók stressz-indukált kortikoszteron szintjét befolyásolta szignifikánsan a kezelés. Azokat a párokat, ahol a rezidens semmilyen agresszív magatartást nem mutatott, a vizsgálatból kizártuk. A kísérlet időbeosztása és a vérvétel az 1. kísérlet protokollja szerint történt. A csoportok beosztását, azok mintaelemszámait, a vizsgálatba ténylegesen bevont állatok számát és a kapott kezeléseket a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat: csoportok és kezelések a 3. kísérletben

Kísérlet	Kezelt állat szociális státusza	Csoport	Előkezelési idő	JZL184 kezelés	Metirapon (Met) kezelés
3.	betolakodó	Kontroll ($n=10$, $n_v=7$)	40 perc	i.p. JZL184 vivőanyag	i.p. Metvivőanyag
		JZL184₁₆ ($n=10$, $n_v=6$)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184	i.p. Met vivőanyag
		Met ($n=10$, $n_v=6$)	40 perc	i.p. JZL184 vivőanyag	i.p. 30mg/kgMet
		JZL184₁₆*Met ($n=10$, $n_v=6$)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184	i.p. 30mg/kgMet

n : csoportelemszám, n_v : vizsgálatba ténylegesen bevont egyedek száma

A 4. kísérlet célja a megfigyelt magatartási hatások CB₁R-függésének feltárása volt. Ennek érdekében a magatartásra legnagyobb hatást gyakorló 16 mg/kg dózisú JZL184 kezeléseket, szelektív CB₁R antagonistá, AM251 kezelésekkel kombináltuk, majd az állatokat így vetettük alá a rezidens-betolakodó tesztnek, rezidens státuszban. A kísérlet időbeosztása és a vérvétel az 1. kísérlet protokollja szerint történt. A csoportok beosztását, azok mintaelemszámait és a kapott kezeléseket a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat: csoportok és kezelések a 4. kísérletben

Kísérlet	Kezelt állat szociális státusza	Csoport	Előkezelési idő	JZL184 kezelés	AM251 kezelés
4.	rezidens	Kontroll (n=9)	40 perc	i.p. vivőanyag	i.p. vivőanyag
		JZL184 ₁₆ (n=9)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184	i.p. vivőanyag
		AM251 (n=10)	40 perc	i.p. vivőanyag	i.p. 0.5mg/kg AM251
		JZL184 ₁₆ *AM251 (n=10)	40 perc	i.p. 16mg/kg JZL184	i.p. 0.5mg/kg AM251

n: csoportelemszám

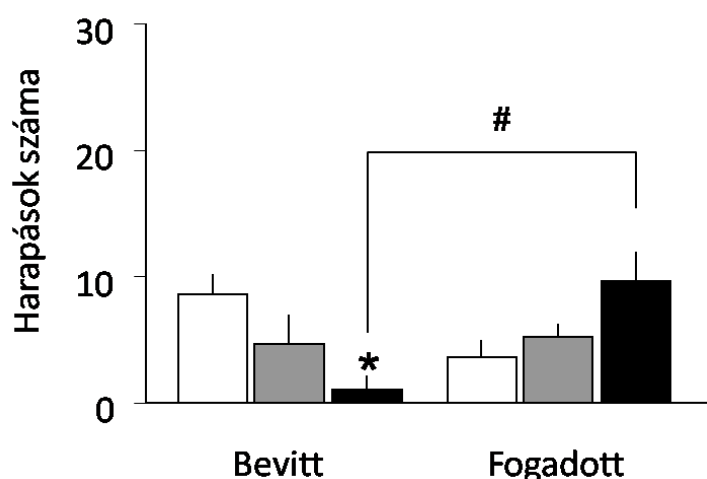
4.6 Statisztikai analízis

Az 1. és 2. kísérletben az egyes dózisok hatását a magatartásra és kortikoszteronszintre egytényezős varianciaelemzéssel (ANOVA) vizsgáltuk. A 3. és 4. kísérletben alkalmazott kombinált kezelések hatásait kéttényezős ANOVA-val vizsgáltuk, ahol a két tényező a két kezelés volt. Az ANOVA alkalmazhatósági feltételeit a Levene-próbával ellenőriztük. Egyes esetekben a feltételek teljesüléséhez az adatokat négyzetgyök transzformáltuk. A csoportok páronkénti összehasonlítását Duncan post-hoc teszttel végeztük. A kezelések hatását a harapó egyedek számára Khi-négyzet próbával vizsgáltuk. Egy hatást $p < 0.05$ érték mellett tekintettünk szignifikánsnak. A statisztikai analízist a STATISTICA 10. szoftverrel végeztük.

5. Eredmények

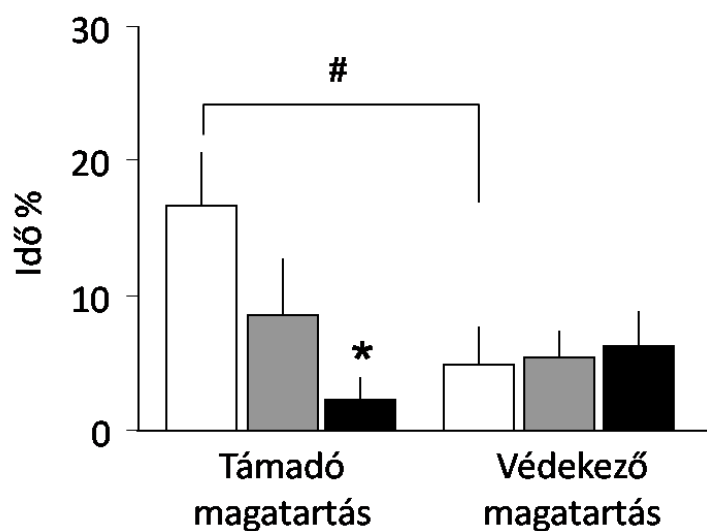
Az 1. kísérletben a JZL184 által fokozott 2-AG jelátvitel szociális és agresszív magatartásra, valamint kortikoszteron szintre gyakorolt hatásait vizsgáltuk a rezidens állatokban. A kezelés legnagyobb dózisa szignifikánsan csökkentette a bevitt harapások számát, ezzel együtt az elszenvedett harapások számát marginálisan megnövelte (*bevitt harapások*: $F(2,27) = 4.61$; $p = 0.01$; *elszenvedett harapások*: $F(2,27) = 3.23$; $p = 0.06$), valamint a csoporton belül az állatok szignifikánsan több harapást szenvedtek el, mint amennyit kiviteleztek ($F_{\text{interakció}}(2,27) = 3.41$, $p = 0.047$) (1. ábra). Ugyanebben a csoportban a támadó magatartások időtartama szignifikánsan csökkent, míg a védekező magatartások időtartamában nem mértünk szignifikáns eltérést a kontrolltól (*támadó magatartások*: $F(2,27) = 4.33$; $p = 0.02$; *védekező magatartások*: $F(2,27) = 0.06$; $p = 0.94$). Ugyanakkor látható, hogy a kontroll csoporton belül az állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek védekezéssel, míg a kezelt csoportokban ez a különbség eltűnt (2. ábra). A kezelés nem befolyásolta a szociális stressz-indukált kortikoszteron szintet szignifikánsan ($F(2,27) = 2.93$; $p = 0.07$) (3. ábra).

□ 0 mg/kg JZL184 ■ 8 mg/kg JZL184 ■ 16 mg/kg JZL184

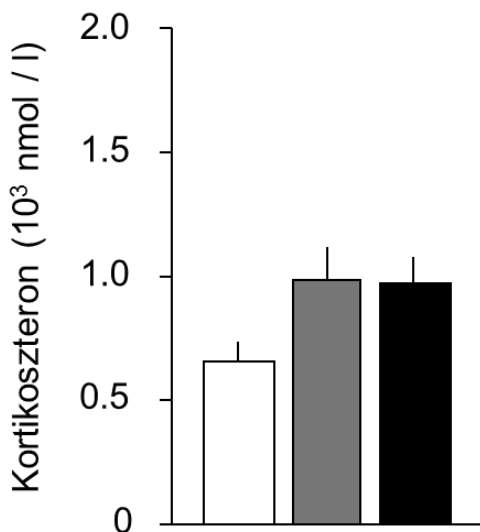


1. ábra: A JZL184 kezelés hatása a bevitt és fogadott harapások számára rezidens állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól. #: szignifikáns eltérés azonos csoporton belül a két magatartási változó között

0 mg/kg JZL184
 8 mg/kg JZL184
 16 mg/kg JZL184



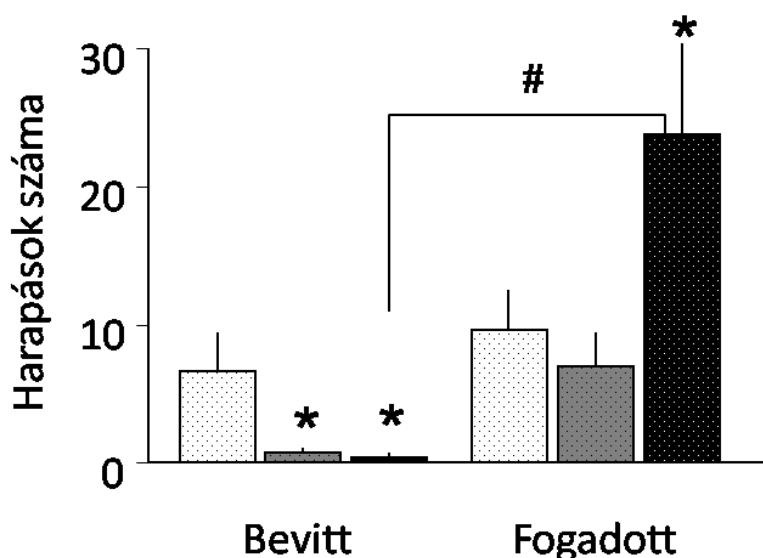
2. ábra: A JZL184 kezelés hatása a támadó és védekező magatartások időtartamaira a rezidens állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól. #: szignifikáns eltérés azonos csoporton belül a két magatartási változó között



3. ábra: A JZL184 kezelés hatása a stressz-indukált kortikoszteron szintre a rezidens állatok esetében.

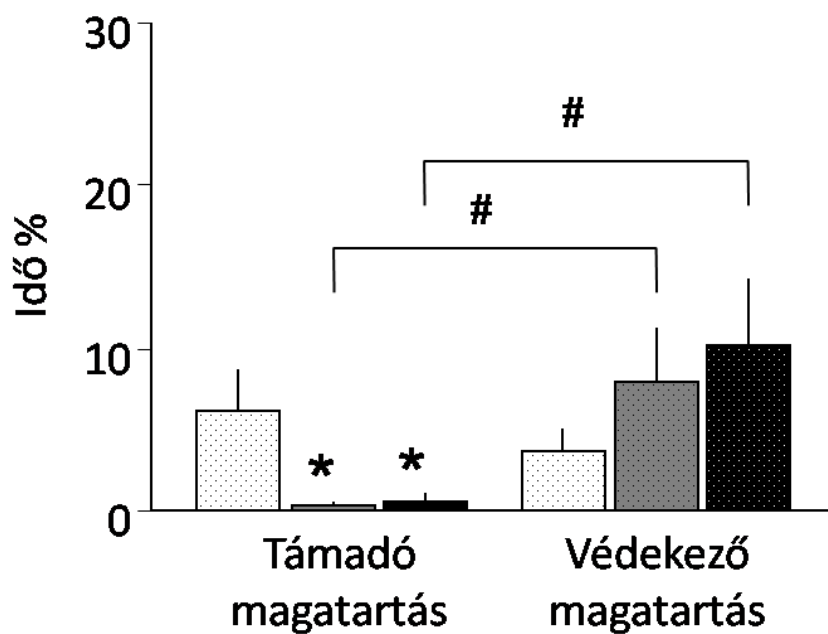
A 2. kísérletben az 1. kísérlethez hasonlóan a JZL184 magatartási és élettani hatásait vizsgáltuk, azonban ebben az esetben a megfigyelési objektumok a betolakodó állatok voltak. A kezelés minden dózisa drasztikusan csökkentette a bevitt harapások számát, míg a legnagyobb dózis az elszenvedett harapások számát megnövelte (*bevitt harapások*: $F(2,15) = 4.02$; $p = 0.03$; *elszenvedett harapások*: $F(2,15) = 5.58$; $p = 0.02$), illetve a rezidens állatokhoz hasonlóan a csoporton belül itt is jóval több harapást szenvedtek el az alanyok, mint amennyit kiviteleztek (4. ábra). A JZL184 dózistól függetlenül csökkentette a támadó magatartások idejét, míg a védekező magatartásokat nem befolyásolta szignifikánsan (*támadó magatartás*: $F(2,15) = 4.82$; $p = 0.02$; *védekező magatartás*: $F(2,15) = 2.64$; $p = 0.1$), valamint a kezelési csoportokon belül megnövelte a védekezéssel töltött időt a támadó magatartással töltött időhöz képest (5. ábra). A JZL184 legnagyobb dózisa ebben az esetben szignifikánsan növelte a szociális stressz indukált kortikoszteron szintet ($F(2,15) = 4.48$; $p = 0.03$) (6. ábra).

0 mg/kg JZL184
 8 mg/kg JZL184
 16 mg/kg JZL184

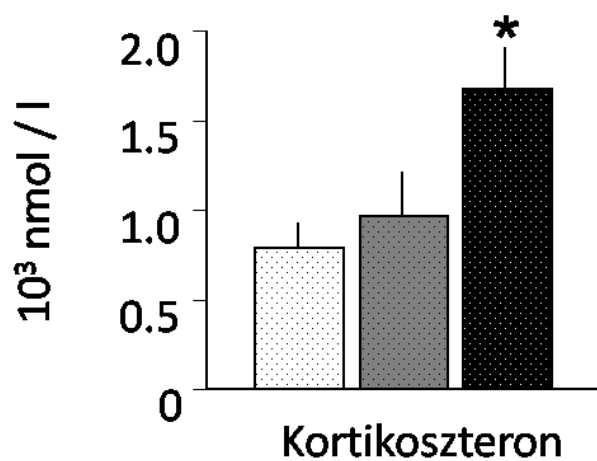


4. ábra: a JZL184 kezelés hatása a bevitt és fogadott harapások számára a betolakodó állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól. #: szignifikáns eltérés azonos csoporton belül a két magatartási változó között

0 mg/kg JZL184
 8 mg/kg JZL184
 16 mg/kg JZL184

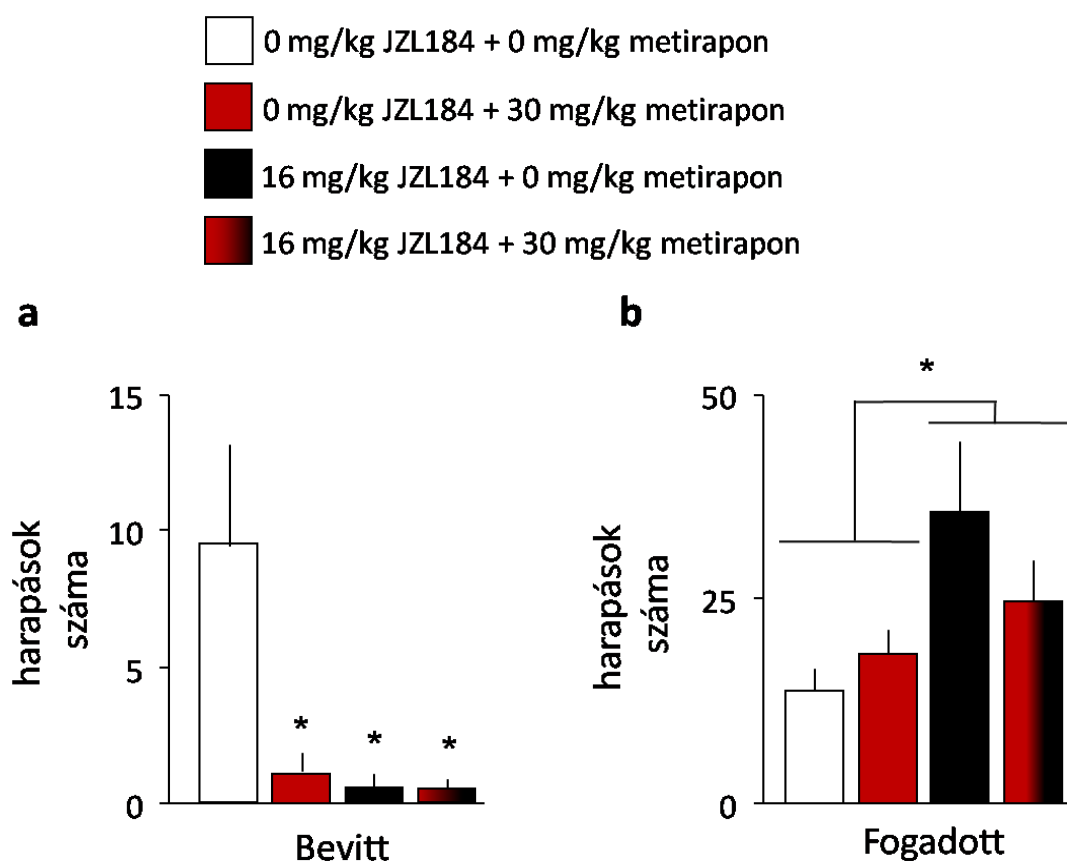


5. ábra: a JZL184 kezelés hatása a támadó és védekező magatartások időtartamaira a betolakodó állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól. #: szignifikáns eltérés azonos csoporton belül a két magatartási változó között

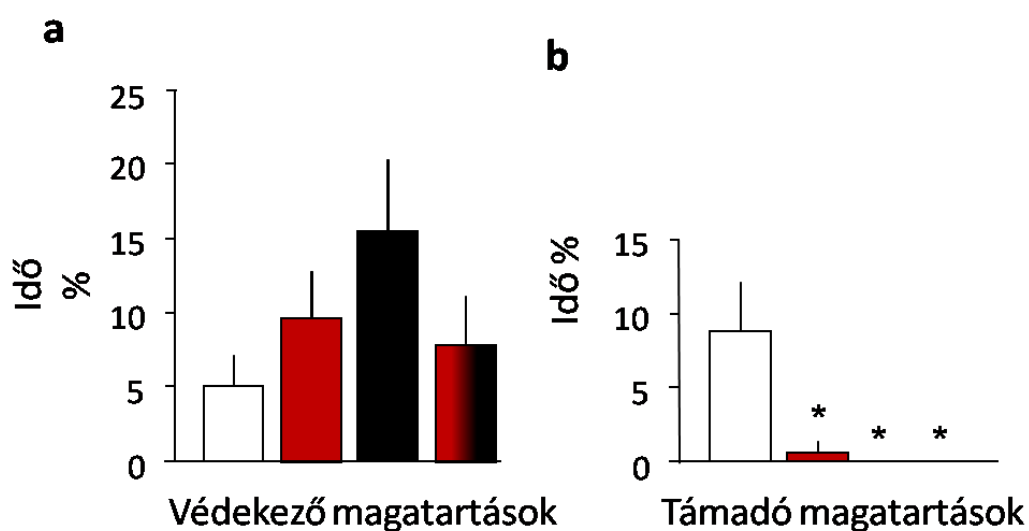


6. ábra: A JZL184 kezelés hatása a stressz-indukált kortikoszteron szintre a betolakodó állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól

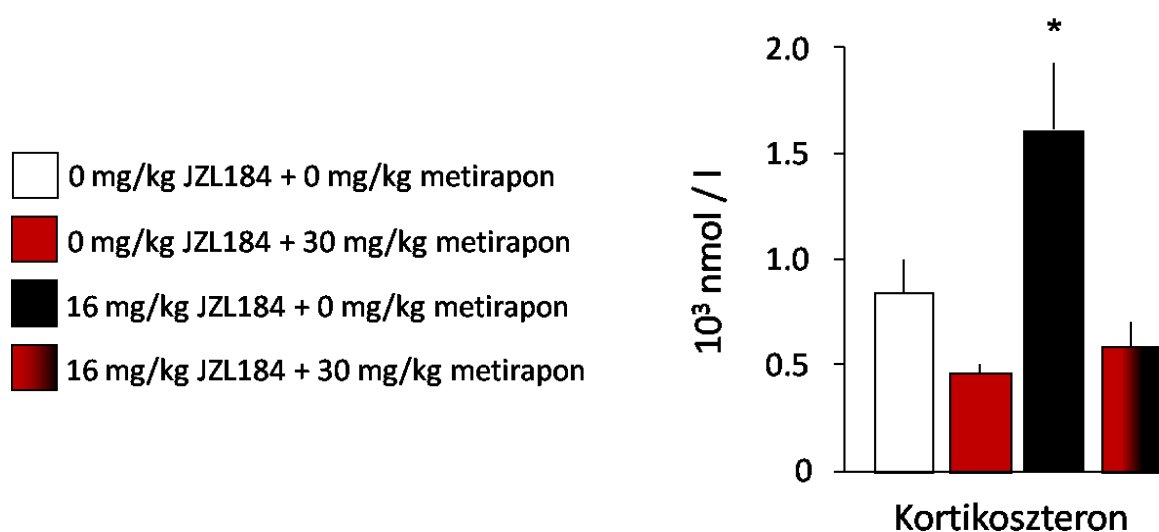
A 3. kísérletben a JZL184 magatartásra és stresszreaktivitásra gyakorolt hatásainak összefüggését vizsgáltuk oly módon, hogy az eddigi kezeléseket a kortikoszteron szintézisét gátló metirapon kezeléssel kombináltuk. A metirapon és a JZL184 kezelések egyenként önállóan, valamint kombinált formában is szignifikánsan csökkentette a bevitt harapások számát (*bevitt harapások*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,25) = 6.36$; $p = 0.02$; $F_{\text{metirapon-kezelés}}(1,25) = 4.86$; $p = 0.04$; $F_{\text{JZL184-kezelés*metirapon-kezelés}}(1,25) = 4.86$; $p = 0.04$) (7a. ábra). Az elszenvedett harapások számát a JZL184 kezelés szignifikánsan megnövelte (*elszenvedett harapások*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,25) = 8.52$; $p < 0.01$), míg a metiraponos kezelések nem voltak rá hatással (*elszenvedett harapások*: $F_{\text{metirapon-kezelés}}(1,25) = 0.43$; $p = 0.51$; $F_{\text{JZL184-kezelés*metirapon-kezelés}}(1,25) = 2.47$; $p = 0.13$) (7b. ábra). A támadó magatartásformák időtartamát mindhárom kezelés szignifikánsan csökkentette (*támadó magatartás*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,25) = 7.41$; $p < 0.01$; $F_{\text{metirapon-kezelés}}(1,25) = 5.56$; $p = 0.03$; $F_{\text{JZL184-kezelés*metirapon-kezelés}}(1,25) = 5.47$; $p = 0.03$) (8a. ábra), míg a védekező magatartások időtartamára egyik sem volt szignifikáns hatással (*védekező magatartás*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,25) = 1.59$; $p = 0.22$; $F_{\text{metirapon-kezelés}}(1,25) = 0.18$; $p = 0.67$; $F_{\text{JZL184-kezelés*metirapon-kezelés}}(1,25) = 3.17$; $p = 0.09$) (8b. ábra). A JZL184 kezelés hatására megnövekedett stressz-indukált kortikoszteron szintet a metirapon szignifikánsan csökkentette ($F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,25) = 6.26$; $p = 0.02$; $F_{\text{metirapon-kezelés}}(1,25) = 27.5$; $p < 0.01$) (9. ábra).



7a. és 7b. ábrák: a JZL184 és a metirapon kezelések hatása a bevitt (a) és a fogadott (b) harapások számára a betolakodó állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól; * vonalon: szignifikáns különbség a JZL184 vivőanyagával kezelt csoportoktól

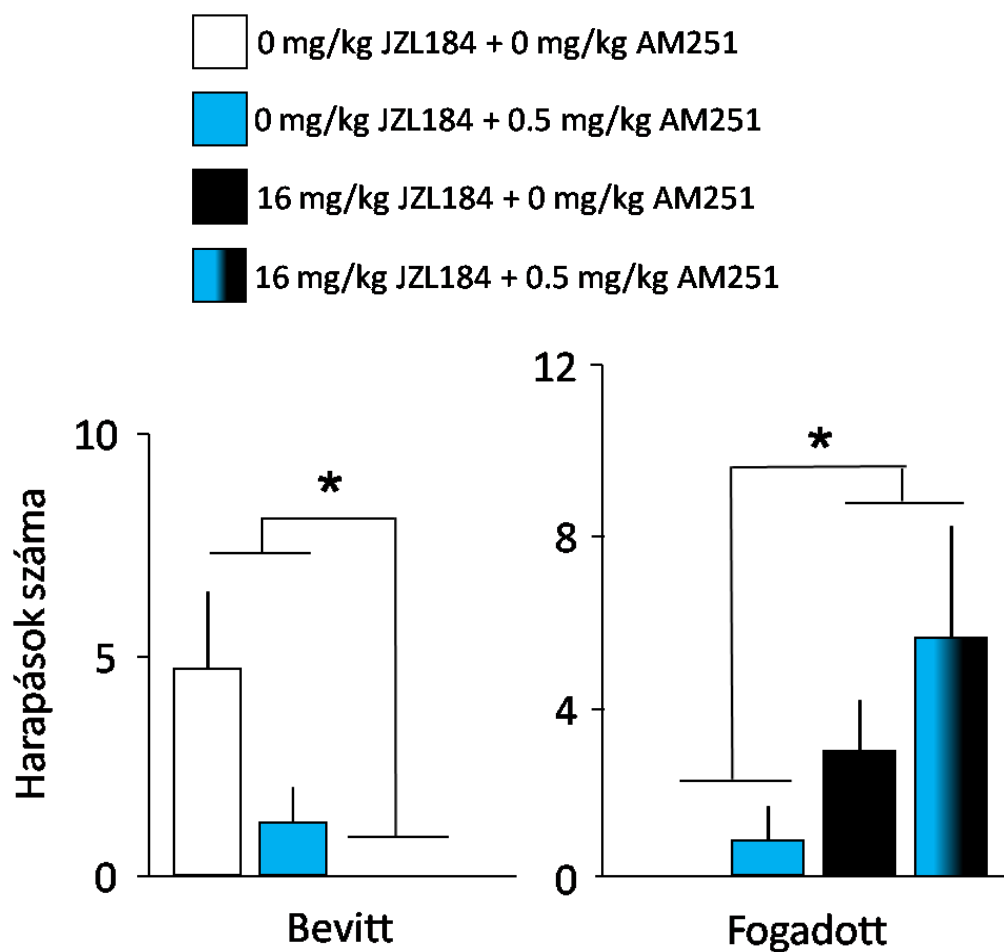


8a. és 8b. ábrák: a JZL184 és a metirapon kezelések hatása a támadó (a) és a védekező (b) magatartások időtartamára betolakodó állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól

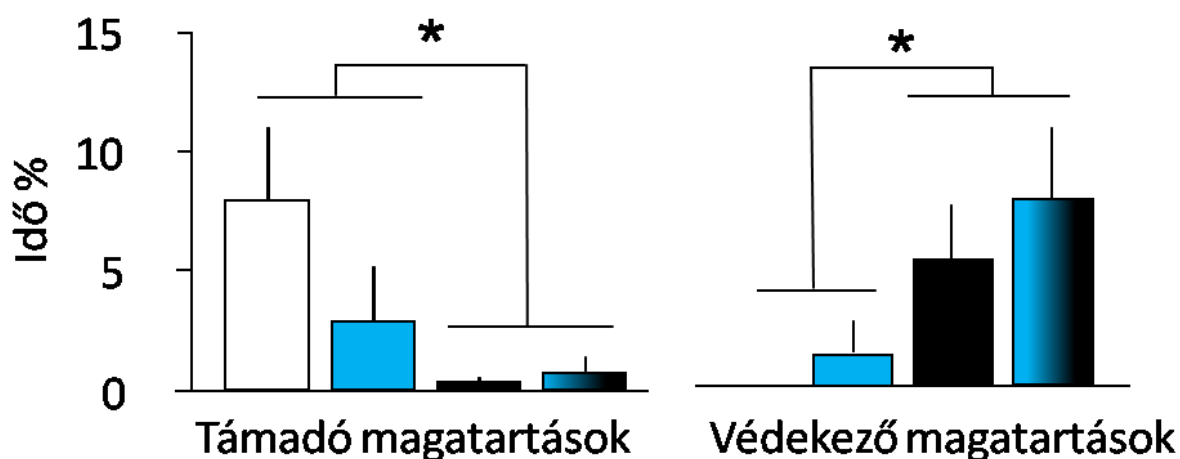


9. ábra: a JZL184 és a metirapon kezelések hatása stressz-indukált kortikoszteron szintre betolakodó állatok esetében.
*: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól

A 4. kísérletben a JZL184 magatartási hatásainak CB₁R-től való függését vizsgáltuk, a CB₁R-en keresztül történő jelátvitel AM251-indukált blokkolásával. A JZL184 kezelés szignifikánsan csökkentette a bevitt és növelte az elszenvedett harapások számát (*bevitt harapások*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,34) = 11.62$; $p < 0.01$; *elszenvedett harapások*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,34) = 10$; $p < 0.01$), míg az AM251 egyiket sem befolyásolta szignifikánsan (*bevitt harapások*: $F_{\text{AM251-kezelés}}(1,34) = 3.2$; $p = 0.08$; $F_{\text{JZL184-kezelés} \times \text{AM251-kezelés}}(1,35) = 3.2$; $p = 0.08$; *elszenvedett harapások*: $F_{\text{AM251-kezelés}}(1,34) = 0.81$; $p = 0.37$; $F_{\text{JZL184-kezelés} \times \text{AM251-kezelés}}(1,34) = 0.04$; $p = 0.84$) (10. ábra). A JZL184 csökkentette a támadó és megnövelte a védekező magatartások arányát a kontrollokéhoz képest (*támadó magatartás*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,34) = 5.71$; $p = 0.02$; *védekező magatartás*: $F_{\text{JZL184-kezelés}}(1,34) = 10.87$; $p < 0.02$), míg az AM251 sem önállóan, sem kombinált kezelés formájában nem befolyásolta szignifikánsan (*támadó magatartás*: $F_{\text{AM251-kezelés}}(1,34) = 1.72$; $p = 0.2$; $F_{\text{JZL184-kezelés} \times \text{AM251-kezelés}}(1,34) = 2.67$; $p = 0.11$; *védekező magatartás*: $F_{\text{AM251-kezelés}}(1,34) = 0.89$; $p = 0.35$; $F_{\text{JZL184-kezelés} \times \text{AM251-kezelés}}(1,30) = 0.04$; $p = 0.85$) (11. ábra).



10. ábra: a JZL184 és azAM251 kezelések hatása a bevitt és a fogadott harapások számára a rezidens állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól; * vonalon: szignifikáns különbség a JZL184 vivőanyagával kezelt csoportoktól



11 ábra: a JZL184 és az AM251 kezelések hatása a támadó és a védekező magatartások időtartamára a rezidens állatok esetében. *: szignifikáns különbség a vivőanyagkezelt csoporttól; * vonalon: szignifikáns különbség a JZL184 vivőanyagával kezelt csoportoktól

6. Megvitatás

A JZL184-indukált fokozott 2-AG jelátvitel szociális kontextusban erősen csökkentette az agresszív magatartást mind a rezidensek, mind a betolakodók esetében, emellett a kezelt állatok komolyabb vereségeket szenvedtek a konfliktusok során. Az agressziócsökkentő hatások függetlenek voltak a CB₁R aktivitástól, illetve a megemelkedett stressz-indukált kortikoszteron szinttől.

A megfigyelt antiagresszív hatások konzisztensek több korábbi vizsgálati eredménnyel, ahol kannabinoid agonisták ezzel megegyező irányban, de jóval kisebb mértékben befolyásolták az agressziót (Miczek és Barry, 1974; Miczek, 1978; Rodriguez-Arias és mtsai., 2013). A mérsékeltebb hatásokat és más, az irodalomban fellelhető ellentmondásokat a CB₁R agonisták gyenge neurokémiai és anatómiai specificitásával magyarázhatjuk. Direkt aktiváció során eltérő funkciókért felelős CB₁R-ek szimultán lépnek működésbe, ezzel nem csak az agresszió szabályozásában fontos területeket befolyásolva. Érdekes fejlemény, hogy vizsgálatunkban a 2-AG egyes agresszív magatartásra gyakorolt hatásai feltehetőleg CB₁R független módon mentek végbe. Bár az endokannabinoid rendszer agressziószabályozásban betöltött szerepének még sok részlete tisztázatlan, eredményeink a 2-AG erős, CB₁R független, negatív moduláló hatására mutatnak rá. Fontos adalék az agresszió csökkenéshez, hogy a kezelés hatására drasztikusan megnőtt az elszenvedett harapások száma, ami további erre hajlamosító magatartási és/vagy élettani hatásokat feltételez. Annak feltárása, hogy független, vagy a csökkent agresszív magatartásra másodlagos jelenségről van-e szó további vizsgálatokat igényel.

A JZL184 agressziócsökkentő hatásai mind a rezidenseknél, mind a betolakodónál megnyilvánultak, így a hatásokra feltehetőleg a kísérleti kontextus kisebb befolyással bírt, mint a globális kannabinoid manipulációk esetében (összefoglaló: Mechoulam 2002; Haller és mtsai., 2004). Bár a hatások iránya nem függött a körülményektől, mértéke a betolakodók esetén enyhén nagyobb volt, és kiterjedt egyéb magatartásokra is, úgy mint az elszenvedett harapások száma, így itt is tetten érhető a kísérleti kontextus bizonyos szintű hatása. Szintén a kísérleti kontextus befolyására utal a támadó és védekező magatartások arányában, illetve a stresszreaktivitásban való eltérés a két státusz között. A

rezidens állatok esetében a kontroll csoporton belül az alanyok kevesebbet védekeztek, mint támadtak, míg a JZL184-el kezelt csoportoknál ez a különbség nem volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a betolakodó állatok esetén a kontroll csoporton belül nem volt ezen magatartások előfordulásában jelentékeny különbség, azonban a kezelt csoporton belül az állatok inkább védekeztek, mint támadtak. A védekező magatartások felerősödése a betolakodók esetében magyarázható lehet megnőtt stressz-indukálta kortikoszteron válasszal. Továbbá érdekes megfigyelés, hogy korábban a JZL184 nem-szociális stressz hatására gyenge és a kísérleti kontextustól nagyban függő magatartási hatásokat okozott, mely erős kontrasztban áll az agresszióval kapcsolatos jelen hatásokkal kapcsolatban leírtakkal (Sciolino és mtsai., 2011; Busquets-Garcia és mtsai., 2011; Aliczki és mtsai., 2012; 2013). Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a 2-AG jelátvitelnek a szociális magatartás befolyásában specifikus és domináns szerepe lehet.

Meglepő módon a megnövelt 2-AG jelátvitel felerősítette a szociális stressz által kiváltott kortikoszteronválaszt a betolakodók esetében. Korábbi vizsgálatainkban a JZL184 nem-szociális kontextusban kizárólag a bazális stresszreaktivitást befolyásolta, a stressz-indukáltat érintetlenül hagyva (Aliczki és mtsai., 2013). Ez arra enged következtetni, hogy a 2-AG eltérő módon befolyásolja a szociális és nem-szociális kihívásokra adott stresszválaszt. Ugyanakkor valószínűtlen, hogy a szociális kihívás hatására megnövekedett stresszválasz kapcsolatban lenne a megfigyelt antiagresszív hatásokkal, ugyanis a kortikoszteron koncentráció akut megemelkedése sokkal inkább serkenti, mint gátolja az agresszív magatartást (Mikics és mtsai., 2004). A két jelenség függetlenségét támogatja továbbá, hogy a kortikoszteron szintézis gátlása nem befolyásolta a fokozott 2-AG jelátvitel antiagresszív hatásait. Ennek ellenére lehetséges, hogy a felerősödött stressz-válasz kapcsolatban van a betolakodók esetében megnőtt védekező magatartásokkal.

Összefoglalva, a 2-AG az agresszív magatartás erős negatív modulátorának bizonyult, illetve befolyásolta az elszenvedett vereség mértékét. Bár vizsgálataink során kimutattuk, hogy agresszióra gyakorolt hatásai a stresszreaktivitástól és a CB₁R-től függetlenül mentek végbe, a pontos mechanizmus még tisztázásra vár. Mivel a 2-AG nem-szociális és szociális kontextusban eltérő módon befolyásolta a stressz-reaktivitást,

valamint utóbbiban erősebb magatartási hatásokat fejtett ki, feltételezhetjük, hogy szerepe a szociális kihívásokra adott válaszok szabályozásában markáns szerepet tölt be.

7. Összefoglalás

Korábbi eredmények szerint az endokannabinoid jelátvitel részt vesz a szociális viselkedés, elsősorban az agresszió szabályozásában, azonban a szabályozószerep részletei ezidáig tisztázatlanok maradtak. Ennek oka feltételezhetően a kérdéskör tisztázására alkalmazott farmakológiai manipulációk számos nem-specifikus hatása, mely nem teszi lehetővé a hatásmechanizmusok pontos feltárását.

Munkánk során egy az eddigiéknél specifikusabb megközelítést alkalmazva manipuláltuk az endokannabinoid jelátvitelt. A JZL184 ágenssel blokkoltuk hím CD1 egerekben a monoacilglicerollipázt, a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) endokannabinoid bontóenzimét, ezzel feldúsítva a 2-AG-t, serkentve annak jelátvitelét, majd vizsgáltuk ennek agresszióra gyakorolt hatásait a rezidens-betolakodó tesztben. Mivel korábbi tanulmányokban a kezelés magatartási hatásai erősen függtek a kísérleti kontextustól, azt mind rezidens, mind betolakodó állatokon megvizsgáltuk. Továbbá vizsgáltuk a kezelés stressz reaktivitásra gyakorolt hatásait a kortikoszteronszint mérésével, és ezen hatások összefüggéseit a potenciális magatartási változásokkal, valamint a hatások potenciális függését az 1-es típusú kannabinoid receptortól (CB1), ugyanis a fokozott 2-AG jelátvitel eddigi ismereteink szerint ezen a receptoron keresztül alakítja ki magatartási és élettani hatásait.

A JZL184 kezelés a kísérleti kontextustól függetlenül, rezidens és betolakodó állatokban is drasztikusan csökkentette az agresszivitást, valamint utóbbiak esetében fokozta a stressz-reaktivitást. A megfigyelt agresszió-csökkentő hatások függetlenek voltak az endokrin változásoktól és a CB1 receptor aktivitástól.

Összefoglalva, a 2-AG az agresszív magatartás erős negatív modulátorának bizonyult. Mivel az itt megfigyelt hatásokat a kísérleti kontextus kevésbé befolyásolta, szemben a korábban leírt nem-szociális viselkedésre gyakorolt hatásokkal feltételezhetően a 2-AG a szociális viselkedés szabályozásában erőteljes, specifikus szerepet tölt be. Továbbá tisztáztuk, hogy a hatások direkt módon, a stressz-választól függetlenül, egy feltételezhetően eddig ismeretlen, CB1 receptor aktivitástól független mechanizmuson keresztül valósulnak meg.

8. Summary

Previous studies showed that endocannabinoid signaling plays a role in the regulation of social behavior, predominantly aggression, although the details of this role are still to be clarified. Current pharmacological manipulations employed to study this issue result in a number of non-specific effects which possibly prevents the detailed description of the background mechanisms.

In the present study, we employ a more specific approach to manipulate endocannabinoid signaling. Using the agent JZL184, we blocked monoacylglycerol lipase in male CD1 mice, the degrading enzyme of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which resulted in elevated levels and therefore enhanced signaling of 2-AG. We studied the effects of the above treatment on aggression in the resident-intruder paradigm. As previous studies showed that behavioral effects of enhanced 2-AG signaling depended on the experimental context, both residents and intruders were studied. Furthermore, measuring corticosterone levels we studied treatment effects on stress-reactivity and simultaneously enhancing 2-AG signaling and blocking corticosterone synthesis we assessed correlations between such effects and effects on behavior. We also investigated whether the effects depended on cannabinoid receptor type-1 (CB1) activity, as behavioral and physiological effects of 2-AG are reported to be mediated *via* this receptor.

JZL184 dramatically decreased the level of aggressiveness in a context independent manner both in resident and intruder animals. Furthermore it increased stress-reactivity in the case of the latter. Antiaggressive effects were independent of endocrine effects and CB1 activity, respectively.

Taken together, 2-AG was proven to be a strong negative modulator of aggressive behavior. As the environmental context slightly affected the effects on behavior in contrast to the effects observed on non-social behavior, one may suggest that its impact on social behavior is more specific and robust. Furthermore we report that the behavioral effects occur independently of effects on stress-reactivity, *via* a yet unidentified CB1 receptor-independent mechanism.

9. Hivatkozások

- Aliczki, M., Balogh, Z., Tulogdi, A., Haller, J., 2012. „The Temporal Dynamics of the Effects of Monoacylglycerol Lipase Blockade on Locomotion, Anxiety, and Body Temperature”: *Behavioural Pharmacology* 23 (4): 348–57.
- Aliczki, M., Zelena D., Mikics E., Varga ZK., Pinter O., Venczkone Bakos N., Varga J., Haller J., 2013. „Monoacylglycerol Lipase Inhibition-Induced Changes in Plasma Corticosterone Levels, Anxiety and Locomotor Activity in Male CD1 Mice”. *Hormones and Behavior* 63 (5): 752–58.
- Bambico, FR., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Gobbi, G. 2009. „Endocannabinoids in the Treatment of Mood Disorders: Evidence from Animal Models”. *Current Pharmaceutical Design* 15 (14): 1623–46.
- Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Pastor, A., de la Torre, R., Maldonado, R., Ozaita, A. 2011. „Differential Role of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Memory and Anxiety-like Responses”. *Biological Psychiatry* 70 (5): 479–86.
- Carder, B., Olson, J. 1972. „Marihuana and Shock Induced Aggression in Rats”. *Physiology & Behavior* 8 (4): 599–602.
- Carlini, EA. 1977. „Further Studies of the Aggressive Behavior Induced by delta9-Tetrahydrocannabinol in REM Sleep-Deprived Rats”. *Psychopharmacology* 53 (2): 135–45.
- Carlini, EA., Hamaoui, A., März, RM. 1972. „Factors Influencing the Aggressiveness Elicited by Marihuana in Food-Deprived Rats”. *British Journal of Pharmacology* 44 (4): 794–804.
- Carlini, EA., Lindsey, CJ., Tufik S.. 1977., „Cannabis, Catecholamines, Rapid Eye Movement Sleep and Aggressive Behaviour”. *British Journal of Pharmacology* 61 (3): 371–79.
- Cherek, DR., Roache, JD., Egli, M., Davis, C., Spiga, R., Cowan, K., 1993. „Acute Effects of Marijuana Smoking on Aggressive, Escape and Point-Maintained Responding of Male Drug Users”. *Psychopharmacology* 111 (2): 163–68.
- Cutler, MG., Mackintosh, JH., 1975. „Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on Social Behaviour in the Laboratory Mouse and Rat”. *Psychopharmacologia* 44 (3): 287–89.
- Cutler, MG., Mackintosh, JH., 1984a. „Cannabis and Delta-9-Tetrahydrocannabinol. Effects on Elements of Social Behaviour in Mice”. *Neuropharmacology* 23 (9): 1091–97.
- Devane, WA., Dysarz, FA. 1988. „Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.” *Molecular Pharmacology* 34 (5): 605–13.

- Devane, WA., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, RG., Stevenson, LA., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. 1992. „Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor”. *Science* 258 (5090): 1946–49.
- Di Marzo, V., Petrosino, S. 2007. „Endocannabinoids and the Regulation of Their Levels in Health and Disease”. *Current Opinion in Lipidology* 18 (2): 129–40.
- Di Marzo, V., Melck D., Bisogno T., De Petrocellis, L. 1998. „Endocannabinoids: Endogenous Cannabinoid Receptor Ligands with Neuromodulatory Action”. *Trends in Neurosciences* 21 (12): 521–28.
- Di Marzo, V. 2001. „Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake”. *Nature*, sz. 410 (április): 822–25.
- Dinh, TP., Carpenter D., Leslie FM., Freund TF., Katona, I., Sensi SL., Kathuria, S., Piomelli, D. 2002. „Brain Monoglyceride Lipase Participating in Endocannabinoid Inactivation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10819–24.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, KC., Tasker, JG. 2003. „Nongenomic Glucocorticoid Inhibition via Endocannabinoid Release in the Hypothalamus: A Fast Feedback Mechanism”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (12): 4850–57.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, VL., Bazan, NG., Tasker, JG. 2005. „Rapid Glucocorticoid-Mediated Endocannabinoid Release and Opposing Regulation of Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Inputs to Hypothalamic Magnocellular Neurons”. *Endocrinology* 146 (10): 4292–4301.
- Fine, J., Perry G., Mark J. Rosenfeld. 2013. „The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain”. *Rambam Maimonides Medical Journal* 4 (4).
- Freund, TF., Katona I., Piomelli, D. 2003. „Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling”. *Physiological Reviews* 83 (3): 1017–66.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R.. 1964. „Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish”. *Journal of the American Chemical Society* 86 (8): 1646–47.
- Gérard, C. M., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M. 1991. „Molecular Cloning of a Human Cannabinoid Receptor Which Is Also Expressed in Testis”. *The Biochemical Journal* 279 (Pt 1) (október): 129–34.
- Guo, J. 2004. „Endocannabinoids Modulate N-Type Calcium Channels and G-Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels via CB1 Cannabinoid Receptors Heterologously Expressed in Mammalian Neurons”. *Molecular Pharmacology* 65 (3): 665–74.

- Haller, J., Bakos N., Szirmay M., Ledent C., Freund TF. 2002. „The Effects of Genetic and Pharmacological Blockade of the CB1 Cannabinoid Receptor on Anxiety”. *European Journal of Neuroscience* 16 (7): 1395–98.
- Haller, J., Barna I., Barsvari B., Gyimesi Pelczér K., Yasar S., Panlilio LV., Goldberg S. 2009. „Interactions between Environmental Aversiveness and the Anxiolytic Effects of Enhanced Cannabinoid Signaling by FAAH Inhibition in Rats”. *Psychopharmacology* 204 (4): 607–16.
- Haller, J., Varga B., Ledent C., Barna I., Freund TF. 2004. „Context-Dependent Effects of CB1 Cannabinoid Gene Disruption on Anxiety-like and Social Behaviour in Mice”. *The European Journal of Neuroscience* 19 (7): 1906–12.
- Hao, S., Avraham Y., Mechoulam R., Berry EM. 2000. „Low Dose Anandamide Affects Food Intake, Cognitive Function, Neurotransmitter and Corticosterone Levels in Diet-Restricted Mice”. *European Journal of Pharmacology* 392 (3): 147–56.
- Herkenham, M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. „Cannabinoid receptor localization in brain”. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(5):1932-6.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M. 2003. „Modulation of Anxiety through Blockade of Anandamide Hydrolysis”. *Nature Medicine* 9 (1): 76–81.
- Kreitzer, AC., Regehr WG. 2001. „Cerebellar Depolarization-Induced Suppression of Inhibition Is Mediated by Endogenous Cannabinoids”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (20): RC174.
- Lenz, RA., Wagner JJ., Alger, BE. 1998. „N- and L-Type Calcium Channel Involvement in Depolarization-Induced Suppression of Inhibition in Rat Hippocampal CA1 Cells”. *The Journal of Physiology* 512 (1): 61–73.
- Long, JZ, Weiwei Li, Booker, L., Burston, JJ., Kinsey, SG., Schlosburg, JE, Pavón FJ. 2009. „Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects”. *Nature chemical biology* 5 (1): 37–44.
- Lutz, B. 2002. „Molecular Biology of Cannabinoid Receptors”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66 (2-3): 123–42.
- Mackie, K. 2005. „Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System”. *Handbook of Experimental Pharmacology*, sz. 168: 299–325.
- Mackie, K., Devane WA., Hille, B. 1993. „Anandamide, an Endogenous Cannabinoid, Inhibits Calcium Currents as a Partial Agonist in N18 Neuroblastoma Cells”. *Molecular Pharmacology* 44 (3): 498–503.

- Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli S., Weng, FJ., Stuart, CT., Bazan, NG., Tasker, JG. 2006. „Opposing Crosstalk between Leptin and Glucocorticoids Rapidly Modulates Synaptic Excitation via Endocannabinoid Release”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (24): 6643–50.
- Matsuda, LA., Stephen, J. Lolait, Michael, J. Brownstein, Alice, C. Young, T., Bonner, I. 1990. „Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA”. *Nature* 346 (6284): 561–64.
- Mechoulam, R. 2002. „Discovery of Endocannabinoids and Some Random Thoughts on Their Possible Roles in Neuroprotection and Aggression”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66 (2-3): 93–99.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski NE., Schatz AR., Gopher A., Almog S., Martin BR., Compton DR. 1995. „Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors”. *Biochemical Pharmacology* 50 (1): 83–90.
- Miczek, KA. 1978. „delta9-Tetrahydrocannabinol: Antiaggressive Effects in Mice, Rats, and Squirrel Monkeys”. *Science (New York, N.Y.)* 199 (4336): 1459–61.
- Miczek, KA., Barry, H. 1974. „Delta9-Tetrahydrocannabinol and Aggressive Behavior in Rats”. *Behavioral Biology* 11 (2): 261–67.
- Mikics, E., Kruk, MR., Haller, J. 2004. „Genomic and Non-Genomic Effects of Glucocorticoids on Aggressive Behavior in Male Rats”. *Psychoneuroendocrinology* 29 (5): 618–35.
- Moreira, FA., Beat, L. 2008. „The Endocannabinoid System: Emotion, Learning and Addiction”. *Addiction Biology* 13 (2): 196–212.
- Moreira, FA., Wotjak, CT. 2010. „Cannabinoids and Anxiety”. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 2: 429–50.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M. 2001. „Endogenous Cannabinoids Mediate Retrograde Signals from Depolarized Postsynaptic Neurons to Presynaptic Terminals”. *Neuron* 29 (3): 729–38.
- Pertwee, R.G., Ross RA. 2002. „Cannabinoid Receptors and Their Ligands”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66 (2-3): 101–21.
- Rodriguez-Arias, M., Navarrete, F., Daza-Losada, M., Navarro, D., Aguilar, MA., Berbel, P., Miñarro, J., Manzanares, J. 2013. „CB1 Cannabinoid Receptor-Mediated Aggressive Behavior”. *Neuropharmacology* 75 (december): 172–80.
- Sciolino, NR., Zhou, W., Hohmann, AG. 2011. „Enhancement of Endocannabinoid Signaling with JZL184, an Inhibitor of the 2-Arachidonoylglycerol Hydrolyzing Enzyme

- Monoacylglycerol Lipase, Produces Anxiolytic Effects under Conditions of High Environmental Aversiveness in Rats". *Pharmacological Research* 64 (3): 226–34.
- Sethi, BB., Trivedi, JK., Kumar, P., Gulati, A., Agarwal, AK., Sethi, N. 1986. „Antianxiety Effect of Cannabis: Involvement of Central Benzodiazepine Receptors". *Biological Psychiatry* 21 (1): 3–10.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D. 1997. „A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation". *Nature* 388 (6644): 773–78.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H. 1999. „Evidence That the Cannabinoid CB1 Receptor Is a 2-Arachidonoylglycerol Receptor. Structure-Activity Relationship of 2-Arachidonoylglycerol, Ether-Linked Analogues, and Related Compounds". *The Journal of Biological Chemistry* 274 (5): 2794–2801.
- Sulcova, E. 1998. „Biphasic Effects of Anandamide". *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59 (2): 347–52.
- Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K. 1997. „Cannabinoids Inhibit N- and P/Q-Type Calcium Channels in Cultured Rat Hippocampal Neurons". *Journal of Neurophysiology* 78 (1): 43–50.
- Wenger, T., Ledent, C., Tramu, G. 2003. „The Endogenous Cannabinoid, Anandamide, Activates the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in CB1 Cannabinoid Receptor Knockout Mice". *Neuroendocrinology* 78 (6): 294–300.
- Wilson, RI., Nicoll, RA. 2001. „Endogenous Cannabinoids Mediate Retrograde Signalling at Hippocampal Synapses". *Nature* 410 (6828): 588–92.
- Zamberletti, E., Viganò, D., Guidali, C., Rubino, T., Parolaro, D. 2012. „Long-Lasting Recovery of Psychotic-like Symptoms in Isolation-Reared Rats after Chronic but Not Acute Treatment with the Cannabinoid Antagonist AM251". *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 15 (02): 267–80.
- Zanettini, C. 2011. „Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior". *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a rengeteg segítséget Aliczki Manónak, aki nélkül a dolgozat nem születhetett volna meg. Számtalan dolgot tanulhattam tőle és idejét nem kímélve mindig lehetett rá számítani.

Nagyon köszönöm Haller Józsefnek mindig releváns szakmai tanácsait és azt, hogy munkámat a Magatartásneurobiológiai osztályon végezhetem. Mentorálása hatalmas és nélkülözhetetlen segítség számomra.

Köszönöm továbbá az MTA KOKI további munkatársainak, hogy megteremtnek minden lehetőséget az eredményes és hatékony munkához.

11. Egyéni hozzáadott munka

A kutatás során részt vettem minden kísérletben és előkísérletben, illetve azok megtervezésében és előkészítésében. Konkrét feladataim az előkészítés fázisban a kísérleti protokoll megírása, a kísérleti szoba berendezése (állatok megfelelő pozícióba rendezése), az állatok lemérése a megfelelő kezeléshez, illetve a vegyületek beoldása voltak. Az előkísérletek és kísérletek során feladataim közé tartozott az állatok kezelése, a viselkedéssztek kivitelezése és felvétele, a termináció, a vérvétel, valamint a plazma leválasztása. Ezen felül egyes kísérletek alkalmával részt vállaltam a magatartás kielemezésében és az eredmények kiértékelésében is.