

ZÁRÓJELENTÉS

a „Központi idegrendszeri kannabinoid receptorok farmakológiai és funkcionális feltérképezése”

című, 61758 számú OTKA pályázatról

Bevezetés

A kannabinoid receptorok mind a világon legelterjedtebben használt kábítószer, a marijuána és származékai, mind a fiziológiai idegi információfeldolgozásban fontos szerepet játszó endokannabinoid jelátviteli rendszer, mind pedig a nemrégiben a terápiába bevezetett, és nagy reményeket keltő, de központi idegrendszeri mellékhatások miatt visszavont antiobezitációs gyógyszerek (rimonabant, Acomplia) molekuláris támadáspontjaként az érdeklődés homlokterében állnak. S bár az elmúlt években igen nagy mennyiségű adat halmozódott fel a kannabinoidok központi idegrendszeri hatásával kapcsolatban, sejtszintű hatásmódjuk még mindig nem teljesen tisztázott, illetve a napvilágot látott eredmények további új megoldandó kérdéseket vetettek fel.

Célkitűzések

Eredeti munkatervünk kitűzött céljai a következők voltak:

- I. Klasszikus CB1 receptor mediált és feltételezett nem-CB1 receptor mediált preszinaptikus hatások összehasonlító analízise
- II. Új preszinaptikus kannabinoid hatások feltárása a központi idegrendszerben
- III. Abuzusdrogok neurokémiai interakciója az önjutalmazó rendszerben

Eredmények

I. Klasszikus CB1 receptor mediált és feltételezett nem-CB1 receptor mediált preszinaptikus hatások összehasonlító analízise

Az elmúlt évek vizsgálataiban számos olyan központi idegrendszeri kannabinoid hatást írtunk le (Kofalvi *et al.*, 2003; Kofalvi *et al.*, 2005) és mások is (pl. Di Marzo *et al.*, 2000; Hajos *et al.*, 2001; Haller *et al.*, 2002; Monory *et al.*, 2002; Pistis *et al.*, 2004), amely fennmarad CB1 receptor génkiütött egereken. A hatásokra magyarázatot adó harmadik kannabinoid receptort azonban továbbra sem sikerült a GPCR receptorok népes családján belül molekulárisan azonosítani. A kísérletsorozat fő célja az volt, hogy egy általunk neurokémiai (Katona *et al.*, 1999; Katona *et al.*, 2000) és mások által elektrofiziológiai (Hajos *et al.*, 2001) módszerekkel már korábban leírt, és egyértelműen CB1-receptor által közvetítettnek tekintett hatás, a hippokampális GABA felszabadulás gátlásának vonatkozásában a résztvevő receptort farmakológiai eszközökkel profilírozzuk, illetve összehasonlítsuk azt a CB1 receptor génkiütött egereken tapasztalható farmakológiai fenotípussal. A kísérletekben a [³H]GABA felszabadulást hippokampális szinaptoszómákból mértük radioizotópos módszerrel, K⁺ (25 mM) depolarizáció hatására CB1 +/+ és CB1 -/- egereken.

Először agonista koncentráció-hatás görbéket vettünk fel a CB1 +/+ egereken a következő ligandokkal: WIN55212-2, CP55940, HU210, 2-AG, Δ9THC. Valamennyi ligand koncentráció-függően gátolta a K⁺ depolarizáció által kiváltott [³H]GABA felszabadulást, és közöttük a következő agonista hatáserősségi és hatékonysági sorrend állapítottuk meg: CP55940>WIN55212-2>HU210>Δ9THC>2-AG, illetve Δ9THC=2-AG>WIN55212-2>CP55940>HU210. Figyelemreméltó, hogy az endokannabinoid 2-AG alacsony hatáserősséget mutatott, ami alátámasztja korábbi adatainkat (Katona *et al.*, 1999), mely szerint a hippokampusban, legalábbis konvencionális ingerlési paraméterek mellett, a

felszabaduló endokannabinoidok nem vesznek részt az ingerlés által kiváltott [³H]GABA felszabadulás modulációjában. Érdekes módon ugyanakkor, míg a többi kannabinoid ligand maximális gátló hatása az ingerlés által kiváltott [³H]GABA felszabadulás nem több, mint 50%-ra terjedt ki, a Δ9THC és a 2AG - igaz magasabb koncentrációban - de csaknem teljes gátlást okozott (1. ábra). Munkánk következő lépése a farmakológiai fenotípus leírása volt a CB1 -/- egértörzsön és annak összevetése az antagonisták jelenlétében tapasztalt hatásprofilal. Elméletileg, ha az agonisták hatását valóban a CB1 receptorok közvetítik, akkor kompetitív antagonista jelenlétében a koncentráció-hatás görbe jobbra tolódását kell tapasztalni, CB1-/- egéren viszont egyáltalán nem kellene agonista hatást kapni (mivel nem expresszálódik a receptor). A szintetikus ligandok közül a széleskörűen vizsgált WIN55212-t, illetve a Δ9THC -t és az endokannabinoid 2-AG-t választottuk ki a CB1-/- egereken történő további tesztelésre. Mindhárom ligand gátolta az elektromos ingerlés által kiváltott [³H]GABA felszabadulást CB1-/- egereken is, ez a hatás azonban – különösen a magasabb koncentrációkban (Δ9THC: 10 μM, 2-AG, 10 μM, WIN: 0.3-1 μM) szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a vad típusú állatokban kapott érték. Ez arra mutat, hogy bár a kannabinoidok GABA felszabadulásra gyakorolt hatásának egy részét valóban a CB1 receptorok közvetítik, a génkiütött egereken is hozzá tudnak kötődni valamilyen sejt felszíni fehérjéhez, amelyen keresztül gátolni tudják a GABA felszabadulását.

A továbbiakban a három kiválasztott ligand hatását megvizsgáltuk a szelektív CB1 receptor antagonista AM251 jelenlétében, vad típusú és génkiütött egereken. A vad típusú állatokban a WIN 55212-2 koncentráció-hatás görbéje AM251 jelenlétében jobbra tolódott és az csaknem teljes mértékben átfedett a CB1-/- egereken kapott koncentráció-hatás görbével. A CB1-/- egerekben ugyanakkor az AM251 nem tolta jobbra a WIN55212-2 koncentráció-hatás görbét, vagyis a WIN 55212-2 itt tapasztalt reziduális hatása független a CB1 receptoroktól (1. ábra).

A 2-AG esetében ugyancsak szignifikáns antagonizmust tapasztaltunk a vad típusú egerekben AM251 jelenlétében, és a koncentráció-hatás görbe itt is átfedett CB1-/- egereken kapott koncentráció-hatás görbével. Az AM251 azonban a CB1-/- egereken is jobbra tolta a 2AG koncentrációhatás görbét. A 2-AG esetében a CB1-/- egerekben fennmaradó válasz tehát „CB1-szerű”, amelynek magyarázata lehet egy, a CB1-/- egerekben a fejlődés során túlexpresszálódó, „tartalék” kannabinoid érzékeny receptor.

A THC esetében a vad típusú egerekben klasszikus görbe jobbra tolódás nem volt megfigyelhető, ugyanakkor a legmagasabb koncentrációjú THC hatását (10 μM) az AM251 kivédte. Az antagonizmus azonban, hasonlóan a 2-AG esetében tapasztaltakhoz, CB1 receptor génkiütött egereken is fennmaradt.

Adataink elsőként igazolják, hogy a kannabinoidok neurokémiai módszerrel kimutatott, GABA felszabadulásra gyakorolt hatását a hippocampusban valóban a CB1 receptorok közvetítik. Eredményeinknek emellett számos fontos olvasata van korábban leírt kannabinoid hatásokra vonatkozóan is. Mivel a farmakológiában abszolút szelektivitás nem létezik, az általános elterjedt szemlélet szerint egy receptor részvételére a perdöntő bizonyítékot nem valamely szelektív antagonista által történő gátlással, hanem a hatás génkiütött egérben történő kiesésének demonstrálásával lehet szerezni. Adataink azt mutatják, hogy ezekkel az eredményekkel is célszerű óvatossággal bánni: az alkalmazott ligand koncentrációtól függően a génkiütött egerekben is fennmaradhat az adott receptor mediált hatás, amennyiben a génkiütött egérben egy feldúsuló „tartalék” receptor átveszi a kieső receptor helyét.

Bár az eredeti munkatervnek még része volt glutamát felszabadulás vonatkozásában is elvégezni az összehasonlító farmakológiai analízist, a fenti eredmények már önmagukban is érdekesek arra, hogy publikáljuk őket. A munkából kézirat készült, melynek publikációja folyamatban van (Andó R, Bíró J and Sperlág B. Pharmacological analysis of inhibitory action of exo- and endocannabinoids in the mouse hippocampus Neuropharmacology submitted).

II. Új preszinaptikus kannabinoid hatások feltárása a központi idegrendszerben

a. A szerotonin felszabadulás kannabinerg modulációja a hippokampuszban (munkaterv IIa)

Míg a preszinaptikus kannabinerg szabályozást viszonylag jól ismerjük a glutamát, GABA acetilkolin és noradrenalin felszabadulás esetében, viszonylag keveset tudunk a szerotonin felszabadulást szabályozó kannabinoid receptorokról. A kannabinoidok és az endokannabinoid rendszer stimulációja közismerten pozitív hatást gyakorolnak a hangulatkedélyállapotra, és a közlemúltban terápiából visszavont CB1 receptor antagonistá rimonabant-t éppen depressziót és szuicid készletést fokozó hatása miatt kellett felfüggeszteni (Hill *et al.*, 2009). A kannabinoidoknak az affektív funkciókban fontos szerepet játszó szerotonerg transzmisszióra gyakorolt hatása ezért mindenképpen kiemelt figyelmet érdemel.

Elvégzett kísérlet sorozatunkban *in vitro* patkány és egér hippokampusz szeleteken a [³H]5-HT felszabadulás modulációjáért felelős kannabinoid receptorokat térképeztünk fel. A hippokampusz szeleteken a szerotonin felszabadulást [³H]5-HT előinkubációt követően, szuperfúziós rendszerben a szeleteken átáramló folyadék radioaktivitásának mérésével határoztuk meg nyugalomban, és elektromos ingerlés hatására. A szeletek radioaktivitás felvétele 103911 ± 10049 Bq/g, a nyugalmi [³H]5-HT felszabadulás 1.771 ± 0.088 % volt (n=4). Elektromos téringelés (25V, 2 Hz, 1 msec, 1 min) hatására reprodukálható növekedést mértünk a felszabaduló trícium mennyiségében, amely így a kontroll kísérletben 1.02±0.023 S2/S1 hányadost eredményezett. Amennyiben a kísérleteket a korábban már beállított protokoll szerint végeztük, a kannabinoid receptor agonista WIN55212-2 nem befolyásolta szignifikánsan a nyugalmi illetve elektromos ingerlés által kiváltott [³H]5-HT kiáramlást a szeletekből. Feltételezván, hogy a hippokampusz szeletek téringelése következtében kialakuló multiszinaptikus interakciók miatt nem észleljük a hatást, kísérleteinket megismételtük az excitátoros transzmisszió blokádja alatt is, vagyis az NMDA receptor antagonistá AP-5 (50 µM) és a nem-NMDA receptor blokkoló CNQX (10 µM) együttes jelenlétében. A WIN55212-2 ilyen körülmények között már szignifikáns, kb. 30%-os gátlást eredményezett az ingerlés által kiváltott [³H]5-HT felszabadulásban. Hasonló mértékű hatást tapasztaltunk a CNQX (10 µM) egyedüli jelenlétében, míg az AP-5 egyedüli jelenlétében nem manifesztálódott a hatás. Ezért a további kísérleteket 10 µM CNQX jelenlétében végeztük.

Megvizsgáltuk további kannabinoid agonisták hatását is: így a CP 55940 (1 µM) és a Δ9-THC (10 µM) a WIN55212-2-hez hasonló mértékű, szignifikáns gátló hatást fejtettek ki, a kis dózistartomány miatt azonban pontosabb dózis-hatás összefüggéseket nem tudtunk felvenni. A WIN55212-2 gátló hatását antagonizálta a szelektív CB1 receptor antagonistá SR141716A (1 µM), illetve az AM251 (1 µM). További kísérleteinkben vad típusú, illetve CB1 receptor génkiütött egerek hippokampuszában is megvizsgáltuk a [³H]5-HT felszabadulás kannabinerg modulációját: a WIN55212-2 a vad típusú egerek hippokampuszában szignifikánsan gátolta az ingerlés által kiváltott [³H]5-HT felszabadulást, amely kivédhető volt mind az SR141716A, mind pedig az AM251 alkalmazásával. A CB1 receptor génkiütött egerekben a WIN55212-2 hatása teljesen kiiktatódott. Mindezek alapján az elvégzett kísérletek eredményei egyértelműen a CB1 receptor részvételére utaltak a kannabinoidok szerotonin felszabadulást gátló hatásában.

Ugyanakkor azt is meg kellett állapítani, hogy a CB1 receptor reguláció hatása viszonylag szerény és az össz [³H]5-HT felszabadulásnak csak mintegy 30%-át érinti. Ennek magyarázataként azt feltételeztük, hogy a hippokampuszt beidegző szerotonerg afferenseknek csak az egyik szubpopulációja hordozza a receptort. E hipotézis igazolása céljából a szerotonerg neurotoxin paraklóramfetamint (PCA) használtuk fel, amely irodalmi adatok szerint a dorsal raphe-ből eredő szerotonerg innervációt csaknem szelektíven irtja ki (Haring *et al.*, 1992), míg a median raphe magvakból kiinduló rostokat érintetlenül hagyja. A kísérleti állatok PCA-val történő előkezelése kb. 30%-kal csökkentette le a hippokampusz szeletek [³H]5-HT felvételét és az ingerlés által kiváltott [³H]5-HT felszabadulás abszolút értékét, míg a nyugalmi trícium kiáramlást nem befolyásolta, mindez arra utalt, hogy a kezelés valóban

kiirtotta a szerotonerg rostok egy részét. A WIN55212-2 az áloperált állatokban szignifikánsan gátolta az ingerlés által kiváltott szerotonin felszabadulást, míg a PCA-val kezelt állatokban ez a hatás teljesen eltűnt. Ez az eredmény tehát úgy magyarázható, hogy a hippocampuszt beidegző szerotonerg neuronoknak valóban csak az egyik szubpopulációja hordozza a CB1 receptort és ez a szubpopuláció a *dorsal raphe* agymagból ered.

Összefoglalva tehát elsőként írtuk le és jellemeztük a kannabinoidok hatását a szerotonin felszabadulásra a hippocampuszban. A kannabinoidok gátló hatását a CB1-receptorok közvetítik, és az elsősorban a szerotonerg terminálisoknak a *dorsal raphe*-ből kiinduló szubpopulációjára terjed ki. Az eredményeket nemzetközi folyóiratban (Balázsa T, Biró J, Gullai N, Ledent C, Sperlágh B. (2008) *Neurochem Int.* 52(1-2):95-102.), valamint hazai és nemzetközi konferenciákon prezentáltuk.

b. A centrális IL-1 β produkció kannabinerg szabályozása

A kannabinoidok immunszuppresszív hatása a periférián jól ismert pl. (Roche *et al.*, 2006), kevésbé ismert azonban, hogy milyen módon vesznek részt az agyi immunválasz és ezen belül az agyi citokinválasz modulációjában. Kísérleteinkben feltártuk a CB1 kannabinoid receptorok szerepét a centrális IL-1 β produkció szabályozásában. A kísérletekben *in vivo* bakteriális endotoxin (LPS, 250 μ g/kg i.p.), illetve fiziológias sóoldat injekcióját követően a hippocampuszban ELISA technikával mértük az IL-1 β szintet. Az LPS, a várakozásnak megfelelően az IL-1 β produkció jelentős indukcióját idézte elő a hippocampuszban a kezelés után 6 h-val (2. ábra). Az AM251 (3 mg/kg i.p.) szignifikánsan csökkentette mind a bazális, mind az LPS indukált IL-1 β produkciót. A bazális IL-1 β produkció szignifikánsan alacsonyabb volt a CB1 $-/-$ egerek hippocampuszában, mint vad-típusú társaikban, az LPS által stimulált IL-1 β produkció ugyanakkor nem különbözött a CB1 $+/+$ és CB1 $-/-$ egerekben. Mivel a P2X7 receptor aktiváció az agyi mikroglia és asztrocita sejteken az endokannabinoid produkció egyik legerősebb aktivátora (Witting *et al.*, 2004), a P2X7 receptor génkiűtött egereken is megvizsgáltuk a CB1 receptor antagonistá hatását. A P2X7 receptor génkiűtött egerekben az AM251 bazális IL-1 β produkcióra gyakorolt hatása szignifikánsan mérséklődött. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy az endokannabinoidok elsősorban a bazális IL-1 β produkció szabályozásában játszanak szerepet, mégpedig stimuláló jelleggel. Eredményeink publikálása nemzetközi referált folyóiratban részben megtörtént (Csölle C, Sperlágh B (2010) *J Neuroimmunol.* 219(1-2):38-46.), részben folyamatban van (Csölle C, Sperlágh B, *Immunology Letters* submitted).

III. Abuzusdrogok neurokémiai interakciója az önjutalmazó rendszerben

a. A dopamin felszabadulás kannabinerg modulációja a nucleus accumbensben (munkaterv IIb)

Ugyancsak tisztázatlanok az önjutalmazási és megerősítési folyamatokban résztvevő kannabinerg mechanizmusok neurokémiai alapjai. Az ugyan jól ismert, hogy a kannabinoidok, hasonlóan a többi abuzusdroghoz, a *ventrális tegmentum*-ból a *nucleus accumbens*-be projiciáló dopaminerg neuronok végződéseiből dopamint szabadítanak fel és ezáltal önadagolást indukálnak (Chen *et al.*, 1990; Fattore *et al.*, 2001), a hatás pontos támadáspontja még vitatott. Amellett ugyanis, hogy a kannabinoidok a *ventrális tegmentum*-ban kisülésre készítetik e neuronokat, nem kizárt, hogy a *nucleus accumbens*-en belül is facilitálják a dopamin kiáramlást.

Kísérletsorozatunkat a punch technikával izolált patkány nucleus accumbensen végeztük. Alacsony frekvenciájú elektromos téringerlés jól reprodukálható választ okozott a [3 H]dopamin felszabadulásban (FRS2/FRS1= 0.86 \pm 0.03%, n=6). A kannabinoid agonista WIN55212-2 (100 nM-3 μ M), illetve CP55940 nem befolyásolta szignifikánsan az elektromos ingerlés által kiváltott [3 H]dopamin felszabadulást. Mivel felmerült annak a lehetősége, hogy esetlegesen a serkentő transzmisszió elfedő hatása miatt nem látjuk a

dopamin felszabadulás kannabinerg modulációját, megvizsgáltuk a WIN 552121-2 (100 nM-3 μ M) hatását az excitátoros transzmisszió blokádja esetében is. Az NMDA receptor antagonistá AP-5 (50 μ M) és a non-NMDA receptor antagonistá CNQX (10 μ M) együttes alkalmazása nem befolyásolta az ingerlés által kiváltott [3 H]dopamin felszabadulást. Ha a WIN552121-2 (3 μ M) hatását e kezelés jelenlétében vizsgáltuk, továbbra sem tapasztaltunk érdemleges változást a [3 H]dopamin kiáramlásban. Hasonló eredményeket értünk el, ha a preparátumokat nem elektromosan, hanem NMDA-val (1 μ M) stimuláltuk, Mg^{2+} mentes körülmények között, illetve amennyiben a D2 receptor autóinhibíciót a D2 receptor inverz agonista L741,626 (100 nM) alkalmazásával függesztettük fel.

Mivel a CB1 kannabinoid receptorok jelenléte a dopaminerg neuronok végződéseiben vitatott, feltételeztük, hogy a kannabinerg moduláció – ha létezik is, valószínűleg csak kis mértékű, és lehet, hogy a felszabaduló dopamin gyors visszavétele miatt nem tudjuk detektálni. Ezért, a következő kísérletekben a WIN552121-2 hatását a dopamin transzporter gátló GBR 12909 (100 nM) jelenlétében teszteltük. A GBR12909 önmagában koncentrációfüggően fokozta az elektromos ingerlés által kiváltott dopamin felszabadulást, igazolva, hogy az ingerlés során felszabaduló dopamin valóban gyorsan visszaveődik e mechanizmussal. A WIN55212-2 ilyen körülmények között fokozta a dopamin felszabadulást a *nucl. accumbens*-ből, vagyis a kannabinoidoknak a már eddig is jól ismert szisztémás effektusa mellett lokális dopamin ürítő hatása is van a reward rendszerben. A WIN55212-2 hatását gátolta a szelektív CB1 receptor antagonistá AM251, vagyis e hatást CB1 receptorok közvetítik. A WIN55212-2 hatása megszűnt a GABA_A receptor antagonistá bicuculline jelenlétében is, ezért mechanizmusa közvetett: a GABA felszabadulást a *nucleus accumbens*-ben – csakúgy, mint egyéb agyterületeken - CB1 receptorok gátló irányban regulálják, míg a GABA nem szinaptikus úton GABA_A receptoron keresztül gátolja a dopamin felszabadulást. A CB1 receptorok aktivációja tehát dizinhibíció révén képes serkenteni a dopamin felszabadulást a *nucl. accumbens*-ben. A CB1 receptor antagonistá AM251 ilyen körülmények között önmagában nem befolyásolta a dopamin felszabadulást, ami arra utal, hogy az endokannabinoidok moduláló hatása nem terjed ki a dopamin felszabadulásra. Hasonló eredményeket kaptunk a CB2 receptor antagonistá AM630, valamint az anandamid transzporter gátló VDM11 alkalmazásával is.

Összefoglalva, eredményeink elsőként igazolják, hogy a *nucleus accumbens* reward mechanizmusokban és drog addikcióban kiemelten fontos szerepet játszó dopaminerg végződéseiből a kannabinoidok nemcsak a dopaminerg neuronok ventralis tegmentumban lévő sejttestjeinek stimulálásával hanem a *nucleus accumbens*-ben belüli hatással, dizinhibíciós mechanizmussal is képesek dopamint felszabadítani. Eredményeinket referált folyóiratközleményben publikáltuk (Sperlágh B, Windisch K, Andó R.D., Vizi E.S. (2009) *Neurochem. Int.* 54:452-457).

b. A noradrenalin és acetilkolin felszabadulás kannabinerg modulációja a prefrontális kéregben

Kísérleteinkben a motiváció vezérelt magatartásban, többek között a drogaddikcióban is fontos agyterületen, a prefrontális kéregben térképeztük fel a kannabinoidok [3 H]noradrenalin ([3 H]NA) felszabadulásra gyakorolt hatását, a [3 H]acetilkolin ([3 H]ACh) felszabadulással történő összevetésben. Irodalmi adatok szerint a CB1 receptor aktiváció *in vivo* fokozza a noradrenalin felszabadulást ezen az agyterületen (Page *et al.*, 2008), *in vitro* azonban nem áll rendelkezésre adat. A jelen projektben elvégzett (Sperlágh *et al.*, 2009), valamint korábbi (Kofalvi *et al.*, 2005) munkáink alapján, ugyanakkor a monoamin transzmitterek felszabadulását a CB1 receptor elsősorban áttételes mechanizmussal szabályozza.

Amennyiben alacsony frekvenciájú téringerlést használtunk (2 Hz), a nyugalmi és elektromos ingerlés által kiváltott [3 H]NA felszabadulást nem befolyásolta a kannabinoid agonista WIN55212-2 a CB1 receptorra szelektív koncentrációtartományban (0.01-10 μ M). Jelentős gátló hatást tudtunk ugyanakkor detektálni magas frekvenciájú ingerlés esetén (10

Hz), abban az esetben, ha a noradrenalin felszabadulás α_2 -receptor mediált öngátlását a szelektív α_2 receptor antagonistá idazoxan alkalmazásával felfüggesztettük (3. ábra). Az elektromos ingerlés által kiváltott [3 H]NA felszabadulás nagymértékben fokozódott az idazoxan jelenlétében, és ezt csökkentette szignifikánsan a WIN55212-2. A kannabinoid agonista hatását gátolta a szelektív CB1 receptor antagonistá AM251, vagyis ezt a hatást is a CB1 kannabinoid receptorok közvetítik. A WIN55212-2 hatását ugyanakkor az ionotróp glutamát receptorok CNQX+ AP-5 általi blokádja is felfüggesztette. Ez arra mutat hogy a prefrontális kéreg szeletben a kiváltott noradrenalin felszabadulás egy részét a glutamát váltja ki ionotróp receptorok aktivációjával és ezt a részt modulálják a CB1 receptorok, vagy pedig a noradrenalin felszabadulás modulációja a glutamát felszabadulás modulációjának következménye, ez utóbbi már ismert az irodalomból (Hill *et al.*, 2009). Az AM 251-nek önmagában nem volt hatása a [3 H]NA felszabadulásra sem alacsony sem magas frekvenciájú ingerlés esetén, ami arra mutat, hogy az endokannabinoid nem vesznek részt a noradrenalin felszabadulás tónusos modulációjában annak ellenére hogy 10 Hz ingerlési frekvencia esetén magasabb endokannabinoid szinteket mértünk a perfúzáumban.

Az acetilkolin felszabadulás esetében a WIN55212-2 szerény mértékű, de koncentrációfüggő és szignifikáns gátló hatást gyakorolt 2 Hz ingerlési frekvencia esetén az elektromos ingerlés által kiváltott [3 H]ACh felszabadulásra, ami felfüggeszthető volt AM251 alkalmazásával. 10 Hz ingerlési frekvencia esetén ugyanakkor ugyanez a hatás csak tendenciaszerűen volt jelen, de nem volt szignifikáns. Az idazoxan nem befolyásolta [3 H]ACh felszabadulást egyik frekvencián sem, hasonlóan az AM251-hez, vagyis endokannabinoid moduláció ennek a transzmitternek az esetében sincs. A GABA_A receptor antagonistá bicuculline felfüggesztette a WIN gátló hatását a [3 H]ACh felszabadulásra, míg ionotróp glutamát receptor antagonisták (CNQX+AP-5) nem befolyásolták azt. A kannabinoidok acetilkolin felszabadulásra gyakorolt hatása tehát szintén feltehetően áttételes, és a GABA felszabadulás primer gátlásán majd ezt követő GABAerg dizinhibíción keresztül érvényesül.

Eredményeink publikálása folyamatban van (H. Richter, A. Palotás, M. Baranyi, C. Csölle, B. Sperlág, Frequency dependent modulation of noradrenaline and acetylcholine release by cannabinoids in the rat prefrontal cortex, British Journal of Pharmacology submitted).

c. A GPR3 receptor szerepe az emocionális válaszokban

Bár eredeti munkatervünkben nem szerepelt ez a kísérletsorozat, a Catherine Ledent laboratóriumával a CB1 receptor szignalizáció területén megalapozott együttműködésünk lehetőséget nyitott, hogy részt vegyünk ebben az érdekes, esetlegesen új terápiás lehetőségeket is felvető projektben. A GPR3, a kannabinoid receptorokhoz hasonlóan G proteinhez kapcsolt receptor, a számos orphan GPR receptor egyike. A GPR3 Gs proteinhez kapcsolt és aktivációja az adenil cikláz potens stimulációját és cAMP szint emelkedést idéz elő konstitutív módon, vagy esetleg egy még ismeretlen endogén ligand segítségével (Eggerickx *et al.*, 1995). A GPR3 széles körben expresszálódik az agyban, így többek között a limbikus rendszerben is, így a munka fő célja a receptor agyi funkciójának feltárása volt, elsősorban az emocionális válaszokban, a GPR3 receptor génkiütött egerek (GPR3 $-/-$) segítségével.

Kimutattuk, hogy GPR3 $-/-$ egerek agyában konzekvensen alacsonyabb cAMP szint mérhető a vad típusú állatokhoz képest, alátámasztva a receptor szerepét a bazális cAMP szint szabályozásában. Emellett a hippocampusban, frontális kéregben és a hipotalamuszban alacsonyabb noradrenalin, 5-HT és dopamin szintek voltak mérhetőek a génkiütött állatokban. A monoaminok közül az 5-HT szint csökkenése különösen nagy mértékű volt mindhárom agyterületen, és az 5-HT metabolitja, az 5-HIAA is csökkent ami arra utal, hogy ennek oka az 5-HT szintézis csökkenése, nem pedig a fokozott metabolizmus lehet. A neurokémiai változásokkal párhuzamosan a GPR3 $-/-$ egerek számos magatartás tesztben is eltérést mutattak. Egybevágóan a csökkent 5-HT szintekkel, a szorongást mérő megemelt kereszt-palló és open field tesztekben fokozott szorongást, a depresszív magatartást mérő forced swim és tail suspension tesztekben pedig nagyobb mértékű depresszív magatartást

tapasztaltunk, valamint a rezidens betolakodó tesztben agresszívebbek voltak a génkiütött egerek vad típusú társaiknál. Ugyanakkor a stressz hormonok bazális és stressz indukált emelkedésére nem gyakorolt hatást a génkiütés. A fenti eredmények alapján a GPR3 receptornak alapvető szerepe körvonalazódik az agyi cAMP szint regulációjában és ennek következményeként, vagy ettől függetlenül, az érzelmi, hangulati étellel kapcsolatos magatartásokkal. Eredményeink alapján felmerül a fenti receptoron ható ligandok alkalmazása szorongással járó betegségekben illetve depressziós kórképekben. Az eredményeket nemzetközi folyóiratban publikáltuk (Valverde, O., Célérier, E., Baranyi, M., Vanderhaeghen, P., Maldonado, R., Sperlách, B., Vassart, G., Ledent, C. (2009) GPR3 receptor, a novel actor in the emotional-like responses. Plos One 4:e4704.).

Végezetül röviden összefoglalnám a projekt személyi állományában bekövetkezett változásokat, illetve az eredeti munka- és költségtervtől történő eltérés indokait. A projektben megfogalmazott fő célokat, vagyis a kannabinoid receptor mediált preszinaptikus hatások összehasonlító farmakológiai analizisét, új preszinaptikus kannabinoid hatások leírását a központi idegrendszerben, valamint a abuzusdrogok neurokémiai interakcióinak feltárását az önjutalmazásért felelős agyterületen megvalósítottuk, a részletes munkatervhez képest azonban voltak kisebb eltérések. Ennek oka több, tölem független és általam nem befolyásolható tényező volt, amely a témában való előrehaladást hátráltatta (elsősorban az I. pont tekintetében), illetve eredeti terveink megváltoztatására kényszerített. Így a Δ^9 THC tesztelését csak késedelmesen tudtuk elkezdni, mivel a hatósági engedélyek több hónapos átfutása miatt eredeti terveinkhez képest több mint 1 év késéssel érkezett be a vegyület. A CB1/-/ egértörzs tenyésztése az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai részlegében a kértnél és elvárhatónál jóval lassabban haladt, így ezeken az állatokon is csak késve tudtuk elkezdni a vegyületek tesztelését.

Az eredeti munkatervben szereplő személyi állományhoz képest több változtatásra is rákényszerültünk a projekt előrehaladása során. Balázsa Tamás fiatal kutatói álláshelye lejárt, és szabad álláshelyünk nem volt, Papp Lillától pedig egészségügyi okok miatt kényszerültünk megválni. Míg Papp Lilla pótlása Csölle Cecilia PhD hallgató személyében viszonylag zökkenőmentes volt, a Balázsa Tamás helyére egy álláshely megürülésekor felvett Bíró Judit sajnos csak néhány hónapot töltött a munkacsoportban és mire betanítottuk a technikailag rendkívül igényes, szinaptoszomákon történő transzmitterfelszabadulás mérésre, egy gyógyszergyárhoz távozott. Az ő helyére Andó Rómeót vettük fel akit ismét be kellett tanítani. Ugyancsak gyógyszercéghez távozott Kiss János, munkacsoportja feloszlott, műszerei egy másik intézethez kerültek, így a tervezett mikrodialízis kísérletek elvégzéséről le kellett mondanunk. Az eredeti munkatervben szereplő, „A CB1 receptor szubcelluláris eloszlásának vizsgálata a hippocampusban” feladatpontot azért nem végeztük el, mert mire a projektre a jóváhagyást az OTKÁ-tól megkaptuk, ezt a vizsgálatot már leköszölték. A kieső kísérletorozatokat azonban új, lényegében véve a témába illeszkedő vizsgálatokkal, a kieső személyeket pedig a projekthez csatlakozó Windisch Katalin és Vizi E. Szilveszter, valamint Palotás Anna és Hardy Richter diákkörös hallgatók munkájával pótoltuk, így összességében a munkatervben vállalt feladatmennyiségnek megfelelő kutatási feladatot teljesítettünk.

A benyújtott költségtervtől annyiban tértünk el, hogy kevesebbet költöttünk beruházásra és külföldi utazásokra és többet készletbeszerzésre. Ennek indoka, hogy a farmakológiai kísérletek viszonylag magas anyag és fogyóeszköz igényét prioritásnak kellett tekinteni az öreg, de még működőképes műszerek cseréjéhez és a külföldi utazásokhoz képest. Fogyóeszközeink jelentős része külföldről származik, így az infláció és a forintgyengülés is hozzájárult a készletbeszerzési költségek emelkedéséhez.

Budapest, 2010.03.24.

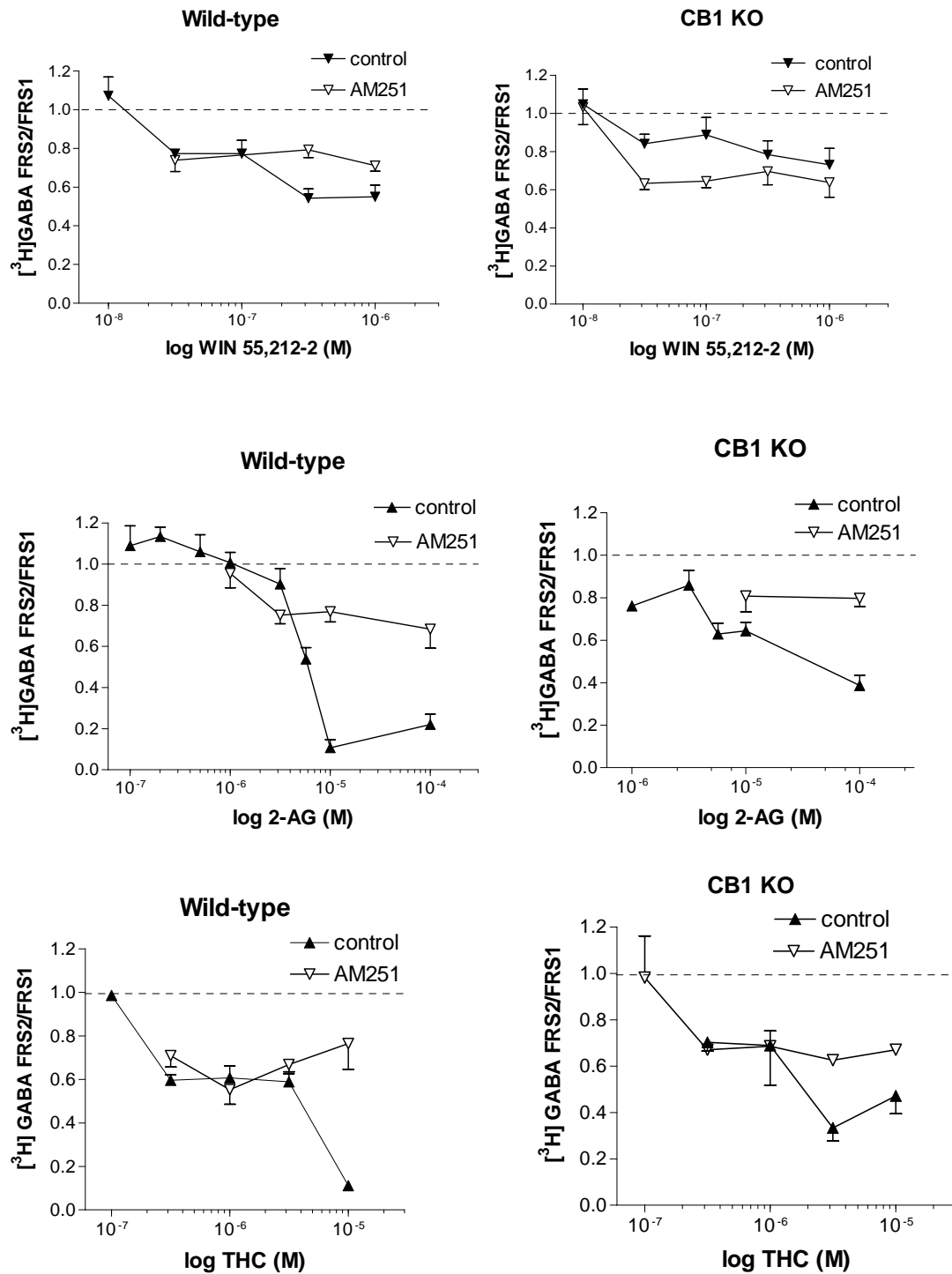
.....
Dr. Sperlách Beáta
témavezető

Irodalomjegyzék

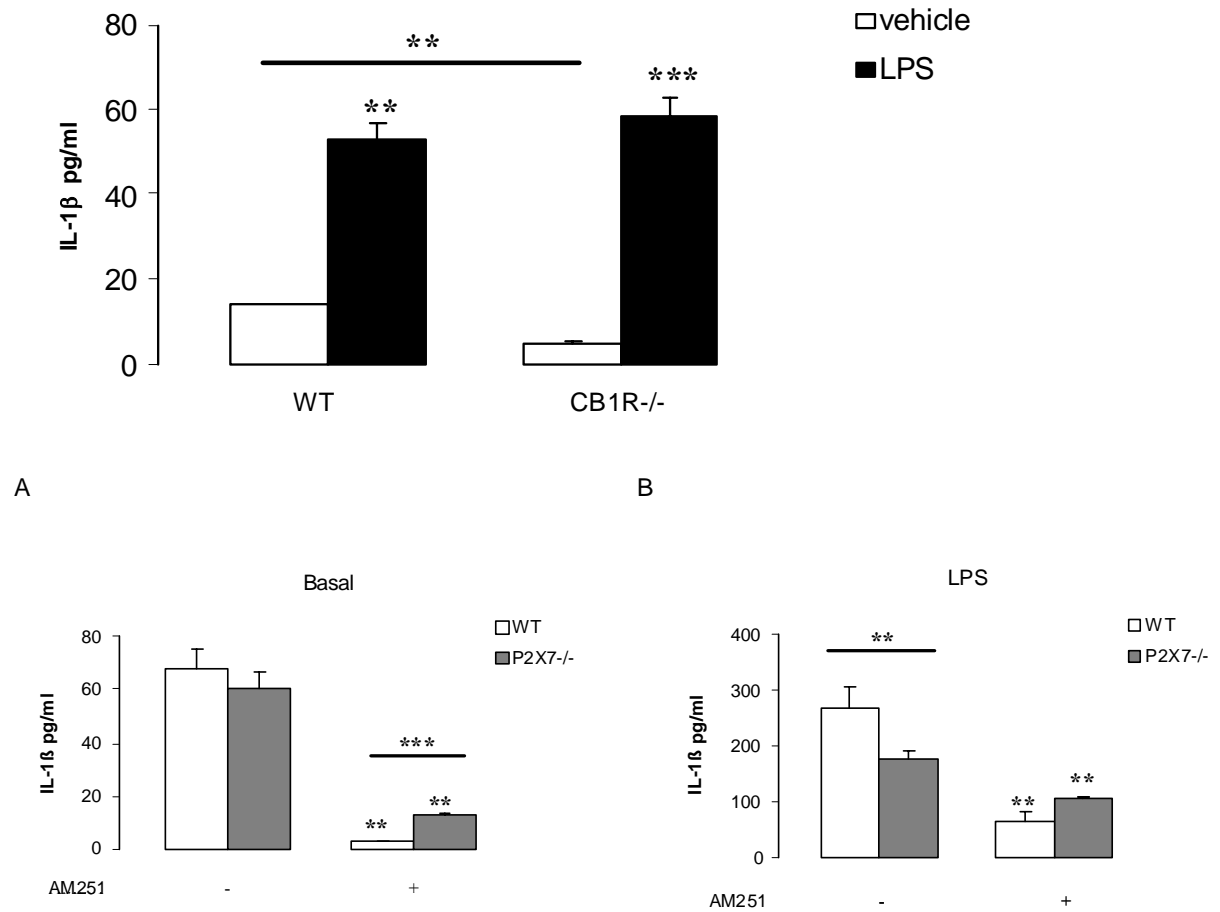
- Balazsa T, Biro J, Gullai N, Ledent C & Sperlagh B. (2008). CB1-cannabinoid receptors are involved in the modulation of non-synaptic [³H]serotonin release from the rat hippocampus. *Neurochem Int* **52**, 95-102.
- Chen JP, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J & Gardner EL. (1990). Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology (Berl)* **102**, 156-162.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A & Martin BR. (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* **75**, 2434-2444.
- Eggerickx D, Deneff JF, Labbe O, Hayashi Y, Refetoff S, Vassart G, Parmentier M & Libert F. (1995). Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *Biochem J* **309 (Pt 3)**, 837-843.
- Fattore L, Cossu G, Martellotta CM & Fratta W. (2001). Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **156**, 410-416.
- Hajos N, Ledent C & Freund TF. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* **106**, 1-4.
- 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. *Eur J Neurosci* **16**, 1395-1398.
- Haring JH, Meyerson L & Hoffman TL. (1992). Effects of para-chloroamphetamine upon the serotonergic innervation of the rat hippocampus. *Brain Res* **577**, 253-260.
- Hill MN, Hillard CJ, Bambico FR, Patel S, Gorzalka BB & Gobbi G. (2009). The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 484-493.
- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES & Freund TF. (2000). GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* **100**, 797-804.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kofalvi A, Vizi ES, Mackie K & Freund TF. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**, 4544-4558.
- Kofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA & Sperlagh B. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* **25**, 2874-2884.

- Kofalvi A, Vizi ES, Ledent C & Sperlagh B. (2003). Cannabinoids inhibit the release of [³H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *Eur J Neurosci* **18**, 1973-1978.
- Monory K, Tzavara ET, Lexime J, Ledent C, Parmentier M, Borsodi A & Hanoune J. (2002). Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 231-235.
- Page ME, Oropeza VC & Van Bockstaele EJ. (2008). Local administration of a cannabinoid agonist alters norepinephrine efflux in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* **431**, 1-5.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Gessa GL & Muntoni AL. (2004). Cannabinoids modulate neuronal firing in the rat basolateral amygdala: evidence for CB1- and non-CB1-mediated actions. *Neuropharmacology* **46**, 115-125.
- Roche M, Diamond M, Kelly JP & Finn DP. (2006). In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *J Neuroimmunol* **181**, 57-67.
- Sperlagh B, Windisch K, Ando RD & Sylvester Vizi E. (2009). Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neurochem Int* **54**, 452-457.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T & Stella N. (2004). P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3214-3219.

1. ábra. Exo és kannabinoidok hatása a [³H]GABA felszabadulásra egér hippocampális szinaptoszómákon.



2. ábra. A bazális és LPS által kiváltott IL-1 β produkció kannabinerg szabályozása a egér hippocampusban.



3. ábra. A [³H]NA felszabadulás frekvencia-függő kannabinerg modulációja petkány prefrontális kéregben.

