

# Az endokannabinoid jelátvitel szerepe a környezeti kihívásokra és traumára adott válaszreakciók szabályozásában

Doktori értekezés

**Balogh Zoltán**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Aliczki Manó, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Haller József, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Tímár Júlia, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Varga Balázs, Ph.D., kutató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zachar Gergely, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Tarnawa István, Ph.D., kutató

Budapest  
2018

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
<b>I. Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
I.1. Az endokannabinoid rendszer .....	9
I.1.1. Az endokannabinoidok felfedezése.....	9
I.1.2. Az endokannabinoid rendszer elemei a központi idegrendszerben .....	11
I.1.2.1. Az endokannabinoid receptorok.....	11
I.1.2.2. Az endogén CB <sub>1</sub> R ligandok: az anandamid és a 2-arachidonoil-glicerin .....	13
I.1.2.2.1. Az anandamid szintézise és lebontása.....	14
I.1.2.2.2. A 2-AG szintézise és lebontása.....	16
I.1.3. A CB <sub>1</sub> R, a FAAH és a MAGL anatómia lokalizációja az agyban.....	18
I.1.4. A CB <sub>1</sub> R-hoz kötött szinaptikus jelátvitel .....	22
I.2. Farmakológiai manipulációk típusai az endokannabinoid jelátvitel funkcióinak felderítésére .....	24
I.2.1. CB <sub>1</sub> R specifikus manipulációk .....	25
I.2.2. Endokannabinoid metabolizmuson keresztüli és ligand specifikus manipulációk .....	26
I.3. Az emóciók és a hozzájuk kötődő magatartási válaszok endokannabinoidok általi szabályozása .....	28
I.3.1. Endokannabinoid jelátvitel a szorongás-szerű magatartás szabályozásában ..	28
I.3.2. Endokannabinoid jelátvitel a megküzdési stratégiák szabályozásában.....	30
I.3.3. Endokannabinoid jelátvitel a félelmi válasz szabályozásában.....	32
<b>II. Célkitűzések .....</b>	<b>37</b>
<b>III. Módszerek.....</b>	<b>39</b>
III.1. Kísérleti alanyok.....	39
III.2. Farmakonok, dózisok és agyterület specifikus kezelések .....	39
III.3. Magatartástesztek és elemzésük .....	40
III.3.1. Hátrafordítás teszt CD1 egereken.....	41
III.3.2. Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető CD1 egereken.....	41
III.3.3. Rezidens-betolakodó teszt CD1 egereken .....	42
III.3.4. Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető Wistar patkányokon ...	42
III.3.5. Forró lap teszt Wistar patkányokon.....	43
III.4. Vérvétel és kortikoszteron szint mérés .....	44
III.5. Kanül implantáció agyterület specifikus beadáshoz.....	44

III.6. Perfúzió és a kanül lokalizációjának ellenőrzése .....	45
III.7. Kísérleti elrendezések.....	45
III.7.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken.....	45
III.7.1.1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a hátrafordítás tesztben CD1 egerek megküzdési stratégiáira .....	45
III.7.1.2. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a kondicionált félelem tesztben CD1 egerek akut és hosszú távon fennmaradó félelmi válaszára.....	46
III.7.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken .....	47
III.7.2.1. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek territoriális agressziójára és a stressztengely aktivitására .....	47
III.7.2.2. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	47
III.7.2.3. A MAGL enzim és a kortikoszteron szintézis egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	47
III.7.2.4. A MAGL enzim működésének és a CB <sub>1</sub> R egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	48
III.7.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon .....	48
III.7.3.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon .....	48
III.7.3.2. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben Wistar patkányokon.....	50
III.7.3.3. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a prelimbikus kéregben az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon.....	50
III.7.3.4. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a ventrális hippokampuszban az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon .....	51
III.7.3.5. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a bazolaterális amigdálában	

az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon.....	52
III.7.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon .....	53
III.7.4.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása traumatikus emlék kioltódására a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon .....	53
III.8. Statisztikai analízis .....	54
<b>IV. Eredmények.....</b>	<b>57</b>
IV.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken.....	57
IV.1.1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a hátrafordítás tesztben CD1 egerek megküzdési stratégiáira .....	57
IV.1.2. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a kondicionált félelem tesztben CD1 egerek akut és hosszú távon fennmaradó félelmi válaszára .....	58
IV.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken .....	60
IV.2.1. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek territoriális agressziójára és a stressztengely aktivitására .....	60
IV.2.2. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	61
IV.2.3. A MAGL enzim és a kortikoszteroid szintézis egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	62
IV.2.4. A MAGL enzim működésének és a CB <sub>1</sub> R egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására .....	63
IV.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon .....	66
IV.3.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon .....	66
IV.3.2. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben Wistar patkányokon .....	67
IV.3.3. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a prelimbikus kéregben az akut	

félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon.....	68
IV.3.4. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a ventrális hippocampusban az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon.....	69
IV.3.5. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a bazolaterális amigdalában az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon.....	70
IV.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon .....	72
IV.4.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása traumatikus emlék kioltódására a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon .....	72
<b>V. Megbeszélés .....</b>	<b>74</b>
V.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken.....	74
V.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken .....	75
V.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon .....	78
V.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon .....	81
<b>VI. Következtetések .....</b>	<b>83</b>
<b>VII. Összefoglalás .....</b>	<b>84</b>
<b>VIII. Summary .....</b>	<b>85</b>
<b>IX. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>86</b>
<b>X. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>127</b>
<b>XI. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>128</b>

## Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonoil-glicerin
2-AG-3P	2-arachidonoil-glicerin-3-foszfát
ABDH4	$\alpha/\beta$ -hidroláz 4
ABHD6	$\alpha/\beta$ -hidroláz 6
ABHD12	$\alpha/\beta$ -hidroláz 12
AC	adenilát-cikláz
ACC	anterior cinguláris kéreg
ACEA	arachidonil-2-kloroetilamid
ACPA	arachidonil-ciklopropilamid
AEA	N-arachidonoil-etanolamin, anandamid
Akt	RAC-alfa szerin/treonin-protein kináz
ANOVA	varianciaanalízis ( <i>analysis of variance</i> )
BLA	bazolaterális amigdala
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CaN	kalcineurin
CB <sub>1</sub> R	egyes típusú kannabinoid receptor
CB <sub>2</sub> R	kettes típusú kannabinoid receptor
CCK	kolecisztokinin
CCP	N-ciklohexán-karbonil-pentadecilamin
CeA	centrális amigdala
COX-2	ciklooxigenáz-2
Cyt P450	citokróm P450
dACC	dorzális anterior cinguláris kéreg
DAG	diacil-glicerol
DAGL- $\alpha$	diacil-glicerol lipáz- $\alpha$
dHC	dorzális hippocampusz
DSE	depolarizáció indukálta serkentés csökkenés ( <i>depolarization-induced suppression of excitation</i> )
DSI	depolarizáció indukálta gátlás csökkenés ( <i>depolarisation-induced suppression of inhibition</i> )

eCB	endokannabinoid
ECL	extracelluláris hurok
EETs-EA	epoxi-eikozatrién-etanolamid
FAAH	zsírsav-amid-hidroláz
GABA	gamma-amino-vajsav
GDE1	glicero-foszfodiészter foszfodiészteráz 1
Glu	glutamát
GPR 18	G-fehérje kapcsolt receptor 18
GPR 55	G-fehérje kapcsolt receptor 55
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
HAEA	hidroxi-N-arachidonoil-etanolamin, hidroxi-anandamid
HETE-G	hidroxi-eikozatetraénsav-glicerinészter, hidroxi-arachidonsav-glicerinészter
I mGluR	egyres csoportba tartozó metabotróp glutamát receptor
ICL	intracelluláris hurok
IL	infralimbikus kéreg
iNAT	Ca <sup>2+</sup> független N-acil transzferáz
i.p.	intraperitoneális
IP <sub>3</sub>	inozitol-1,4,5-trifoszfát
Lizo-PI	lizo-foszfamidil-inozitol
lizo-PLD	lizo-foszfolipáz-D
LOX	lipoxigenáz
LTD	hosszútávú szinaptikus depresszió ( <i>long term depression</i> )
MAFP	metil-arachidonil-fluor-foszfónát
MAGL	monoacil-glicerol-lipáz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
mGlu5	5-ös típusú metabotróp glutamátreceptor
mPFC	mediális prefrontális kéreg
NAAA	N-acil-etanolaminsav-amidáz
NAE	N-acil-etanolamin
NAEp	N-acil-etanolamin plazmalogén
NAPE	N-acil-foszfamidil-etanolamin
NAPE-PLD	NAPE specifikus foszfolipáz-D

NArPE	N-arachidonoil-fosztatidil-etanolamin
NAT	N-acil-transzferáz
N-term	N-terminális
PG-G	prostaglandin-glicerinészter
PI4K	foszfamidil-inozitol-4-kináz
PIP <sub>2</sub>	fosztatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PKA	protein kináz-A
PLA <sub>1</sub>	foszfolipáz-A1
PLA <sub>2</sub>	foszfolipáz-A2
PLC	foszfolipáz-C
PLC-β	foszfolipáz-C enzim β izoforma
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PrL	prelimbikus kéreg
PTPN22	nem receptoriális protein tirozin foszfatáz 22
Ref.	referencia, hivatkozás az irodalomjegyzékre
sPLA <sub>2</sub>	szekretált foszfolipáz-A2
TRPV1	transiens receptor potenciál vanilloid-1 ioncsatorna
VGCC	feszültségfüggő Ca <sup>2+</sup> csatorna ( <i>voltage gated calcium channel</i> )
vHC	ventrális hippokampusz
vmPFC	ventromediális prefrontális kéreg
Δ <sup>1</sup> -THC	(-)-transz-Δ <sup>1</sup> -tetrahydrokannabinol
Δ <sup>9</sup> -THC	(-)-transz-Δ <sup>9</sup> -tetrahydrokannabinol



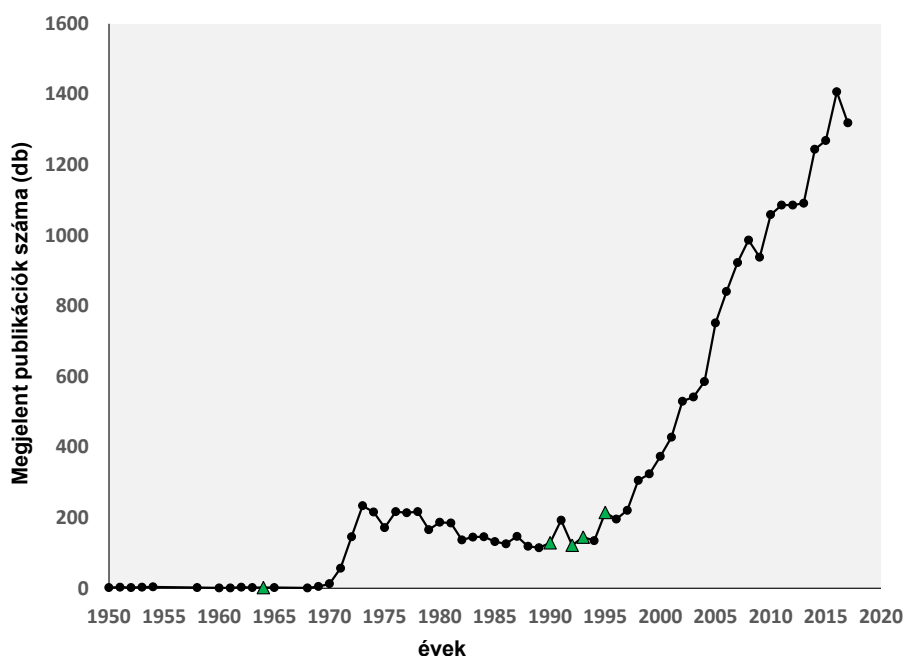
# I. Bevezetés

## I.1. Az endokannabinoid rendszer

### I.1.1. Az endokannabinoidok felfedezése

A XX. század második felében folytatott és az új évezredben zajló, az exogén és az endogén kannabinoidok által kiváltott élettani hatásokat vizsgáló kutatások történetileg egy 54 évvel ezelőtt publikált közleményre vezethetők vissza. 1964-ben Yehiel Gaoni és Raphael Mechoulam kromatográfiás eljárással izolálták és mágneses magrezonancia spektroszkópiával feltárták a hasis fő pszichoaktív komponensének, a (-)-transz- $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinolnak ( $\Delta^9$ -THC) a kémiai szerkezetét, melyet ekkor még  $\Delta^1$ -3,4-transz-tetrahidrokannabinol néven jegyezték (1). Három évvel később publikálták a molekula szintézisének módszerét és abszolút konfigurációját (2, 3). 2005-ig közel 70, a kannabisz növény (*Cannabis sativa*, L.) által szintetizált fitokannabinoidot azonosítottak (4). A  $\Delta^9$ -THC kémiai szerkezetének meghatározása előtt már megindult a kannabisz biológiai hatásainak tudományos vizsgálata, azonban a Gaoni és Mechoulam munkája új lendületet adott e kutatásoknak (1. ábra) (5, 6). A kezdeti időszakban állatmodelleken végzett vizsgálatok eredményei szerint az alkalmazott dózis és a vizsgált faj függvényében  $\Delta^9$ -THC hatására szimptomák széles spektruma jelentkezett, úgymint motoros zavarok, eufórikus és diszfórikus állapot, szedáció, hipotermia, csökkent memória (7-13). Azonban az első bizonyítékot, hogy valóban a  $\Delta^9$ -THC felelős humán alanyok esetén is a hasis által kiváltott pszichotrop és egyéb élettani hatásokért Harris Isbell szolgáltatta 1967-ben (14). A hatásmechanizmus ekkor azonban még ismeretlen volt. Az első hipotézisek szerint a  $\Delta^9$ -THC lipofil természete miatt a sejtmembránnal léphet interakcióba befolyásolva a membrán fluiditását és szerkezetét, ezáltal kiváltva élettani hatását (15, 16). A kezdő lépést a valós hatásmechanizmus felderítése felé Allyn Howlett laboratóriumában tették meg, ahol elsőként ismerték fel, hogy a  $\Delta^9$ -THC gátolja a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) akkumulációját  $G_i$  altípusú G-fehérje kapcsolt receptoron keresztül (17-19) és emellett specifikus kötőhellyel is rendelkezik patkány agyszövetben (20). Ekkorra vált kijelenthetővé, hogy legalább egyféle kannabinoid receptornak jelen kell lennie a központi idegrendszerben. A receptor szerkezetének leírása, klónozása humán és patkány mintákból röviddel ezt követően megtörtént, mely

az egyes típusú kannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R) elnevezést kapta (21-23). Egy évvel később, 1991-ben autoradiográfiai módszerrel sikerült a receptor jelenlétét láthatóvá tenni patkány központi idegrendszerben, mely jelentős denzitást mutatott, így makroszkóposan is jól megfigyelhető volt (24). Ezt követően Sean Munro cambridge-i laboratóriumában felfedezték egy további kannabinoid receptor jelenlétét (kettes típusú kannabinoid receptor, CB<sub>2</sub>R) makrofágokon a lép marginális zónájában és ekkorra már bizonyossá vált, hogy mindkét receptor a 7 transzmembrán doménnel rendelkező G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartozik (25). A kannabinoid receptorok felfedezését követően a kutatások fókuszpontja a lehetséges endogén receptor agonisták keresése felé fordult. Valószínűtlennek tűnt ugyanis, hogy a felfedezett receptorok biológiai funkciót kizárólag az exogén kannabinoidokkal szemben mutatnak. Az első bizonyítékok, ilyen az emlős szervezet által szintetizált endogén kannabinoidok, vagyis az endokannabinoidok létezésére a Mechoulam vezette laboratórium szolgáltatta: a sertés agyszövetből izolált N-arachidonoil-etanolamin, az első ismert endokannabinoid, a CB<sub>1</sub>R parciális agonistája, az anandamid (AEA) nevet kapta (26). Röviddel ezt követően, 1995-ben két egymástól független laboratórium leírt egy teljes CB<sub>1</sub>R agonista endokannabinoidot, a 2-arachidonoil-glicerint (2-AG) (27, 28).



1. **Ábra** Az 1950 és 2017 között megjelent kannabinoid témájú közlemények száma. Zöld háromszög szimbólummal jelölve a kannabinoid kutatás „mérőöldkövei”: 1964 – a  $\Delta^9$ -THC kémiai szerkezetének leírása; 1990 – a CB<sub>1</sub>R klónozása; 1992 – az AEA felfedezése; 1993 – a CB<sub>2</sub>R kimutatása a lépben; 1995 – a 2-AG felfedezése. Felhasznált adatbázis: MEDLINE (PubMed), keresési tárgy szó (Medical Subject Headings, MeSH): cannabinoids, keresés ideje: 2018.április 12.

E röviden összefoglalt három évtizedes kutatómunka képezi a kiindulópontját a ma is zajló endokannabinoid kutatásoknak és a lipid természetű neurotranszmitterek vizsgálatainak. Az említett kutatások eredményei mára megkérdőjelezhetetlenül hozzájárultak az idegi működés szabályozásában fundamentális szerepet betöltő endokannabinoid rendszer megismeréséhez, valamint a retrográd szinaptikus neurotranszmisszió alapuló szabályozási lehetőségének feltérképezéséhez.

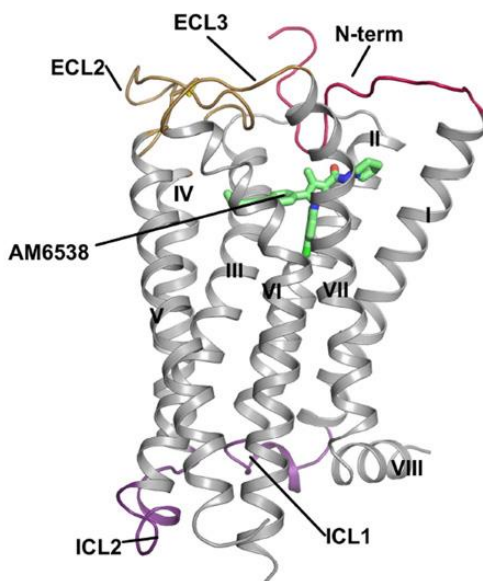
### I.1.2. Az endokannabinoid rendszer elemei a központi idegrendszerben

A központi idegrendszerben az endokannabinoid rendszert mai felfogásunk szerint az endokannabinoid receptorok (CB<sub>1</sub>R, CB<sub>2</sub>R) és az ezeken biológiai hatást kifejtő endogén ligandok alkotják, kiegészülve az endokannabinoidok szintéziséhez és degradációjához szükséges enzimgarnitúrával (29).

#### I.1.2.1. Az endokannabinoid receptorok

A CB<sub>1</sub>R a 7  $\alpha$ -helikális transzmembrán doménnel rendelkező G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) szupercsaládjába, azon belül a rodopszin-szerű receptorok osztályába tartozik (2. ábra). A központi idegrendszerben nagy mennyiségben, szinte valamennyi agyterületen (ld. részletesen az I.1.3-as fejezetben) megtalálható GPCR, jelenleg két splice variánsa ismert (30, 31). A receptort 472 aminosav építi fel, 116 aminosavból álló N-terminálisa extracellulárisan lokalizálódik, melynek alapvető szerepe van a receptor biogenezisében, valamint a sejtmembránba való rögzülésében (32). A CB<sub>1</sub>R-t kódoló CNR1 gén evolúciósan konzervált, gerinces és egyes gerinctelen fajokban is megtalálható (33-35). A vándorpatkány (*Rattus norvegicus*) és a házi egér (*Mus musculus*) CB<sub>1</sub>R-t kódoló génjének terméke 97-97%-os aminosav szekvencia homológiát mutat a humán CB<sub>1</sub>R gén termékével, de mindkét rágcsáló faj esetén a receptor teljes aminosav száma 473 (33, 36). A kannabinoid receptorok evolúciós eredetüket tekintve feltételezhetően az újszájúak (deuterostomata) kládjában jelentek meg elsőként, ugyanis ortológ kódoló szekvenciáik még nincsenek jelen az összájúak (protostomata) közé tartozó ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), ill. a fonálféreg *Caenorhabditis elegans* genomjában (34), azonban már megtalálhatóak a *Ciona intestinalis* újszájú, gerinchúros aszcídia fajban (37). A CB<sub>1</sub>R képes homodimerek kialakítására és heterodimereket képezni D2 dopamin

receptorokkal, opioid receptorral, azonban e receptor komplexek funkciói részleteiben nem ismertek (38, 39).



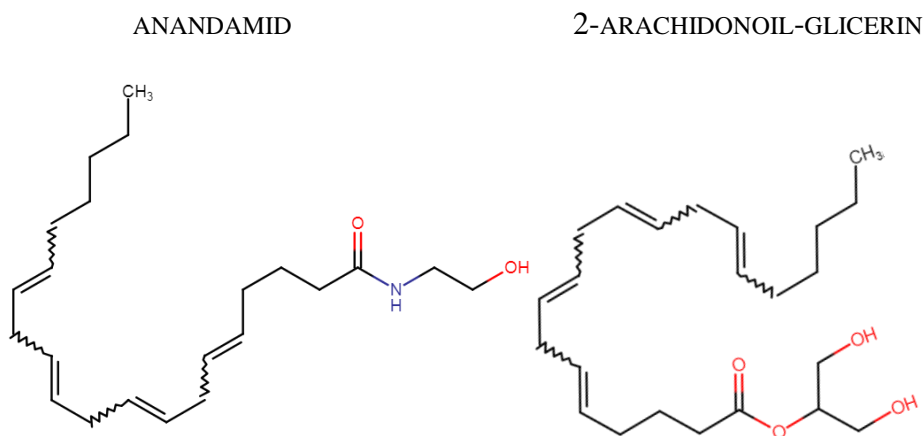
2. **Ábra** A humán CB<sub>1</sub>R szerkezete komplexben az antagonistá AM6538-cal a receptor kötőhelyén. A receptor 7  $\alpha$ -helikális transzmembrán doménjét (I-VII) 3-3 extracelluláris (ECL) és intracelluláris (ICL) hurok köt össze, a receptort emellett egy további amfipatikus hélix alkotja (VIII). ECL2/3: extracelluláris hurok 2 és 3; ICL1/2: intracelluláris hurok 1 és 2; N-term: N-terminális; római számok:  $\alpha$ -hélix domének. Az ábrázolás módja miatt az ICL3 és az ECL1 nincsen jelölve. Forrás: Tian Hua és munkatársai. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB 1. Cell, 2016, 167.3: 750-762.

A CB<sub>2</sub>R szintén a 7  $\alpha$ -helikális transzmembrán doménnel rendelkező GPCR-ek szupercsaládjába tartozik, a CNR2 gén kódolja, 360 aminosavból épül fel és 68%-os aminosav szekvencia homológiát mutat a CB<sub>1</sub>R transzmembrán doménjeihez viszonyítva, ill. 44 %-os homológiát a teljes CB<sub>1</sub>R aminosav szekvenciára vonatkoztatva (25, 40). A CB<sub>2</sub>R nagy számban expresszálódik az immunrendszer sejtjein, mint pl. B- és T-limfocitákon, NK-sejteken, makrofágokon, illetve monocitákon (40, 41). A központi idegrendszeren kívül megtalálható számos sejt típuson, úgymint az erek simaizom sejtjein, májban a Kuppfer-sejteken, az enterális idegeken, csontszövetben oszteoklaszokon és a bőrszövetben is (42). A receptor expressziója a központi idegrendszerben hosszú időn át kérdéses volt, elsőként jelenlétét az idegszövetre specifikus makrofágokon, a mikroglia sejtjein sikerült igazolni (43). A megfelelő antitest hiányában az immunhisztokémiai eljárások megbízhatósága a receptor neuronális jelenlétét illetően évekig bizonytalan maradt (44). Jelenlegi ismereteink szerint ugyan a CB<sub>1</sub>R-nál jóval kisebb mennyiségben, de jelen van a CB<sub>2</sub>R neuronokon a ventrális

tegmentális area-ban, az agytörzsben, a hippokampuszban, a kéregben, a striátumban és az amigdalában (45). A szakirodalom a CB<sub>2</sub>R-t alapvetően az immunrendszer receptoraként tartja számon, és noha mára jelenléte a központi idegrendszerben biztosnak tekinthető, jelen disszertáció nem részletezi tovább neuronális funkcióit, mert az ehhez szükséges szakirodalmi konszenzus egyelőre hiányzik, e terület ma is intenzív kutatás alatt áll. Ezzel szemben a CB<sub>1</sub>R szerepe az idegi folyamatokban behatóan ismert és a disszertáció szempontjából a CB<sub>1</sub>R magatartás neurobiológiai szerepe tekinthető relevánsnak.

#### I.1.2.2. Az endogén CB<sub>1</sub>R ligandok: az anandamid és a 2-arachidonoil-glicerin

Az AEA és a 2-AG egyaránt lipid természetű, arachidonsav tartalmú molekulák, előbbi az N-acil-etanolaminok, utóbbi a monoacil-glicerinek csoportjába tartozik (3. ábra). Az AEA a CB<sub>1</sub>R parciális agonistája, mennyisége a központi idegrendszerben nagyságrendileg ezredrésze a teljes CB<sub>1</sub>R agonista 2-AG-nak (46). Mindkét endokannabinoid szintézisének kezdőpontját a sejtmembránban található glicerofosfolipidek adják, de szintetikus útjuk és a szintézisbe bevont enzimek eltérőek. A szintézis helye, vagyis a sejtmembrán közvetlen környezete azért nagy jelentőségű mert az endokannabinoidok ún. „*on demand*” módon, vagyis szükség szerint, akkor és ott jönnek létre mikor a posztszinaptikus idegsejt a szintézist inicializáló elektromos és kémiai szignálokat a szinapszisban megkapja (47). Az endokannabinoid kutatásokban az „*on demand*” szintézis egyfajta dogmává vált azonban a legújabb eredmények szerint az anandamid képes lipidcseppeknek (*adiposome*, más néven *lipid droplet*) nevezett intracelluláris kompartmentekben akkumulálódni ill. specifikus AEA kötő fehérjék közreműködésével a sejten belül szállítódni (48-50). Feltételezik továbbá, hogy a 2-AG szintézise sem kizárólag „*on demand*” történhet, ugyanis a szintézishez szükséges diacil-glicerol-lipáz- $\alpha$  (DAGL- $\alpha$ ) enzim intracelluláris lokalizációja heterogén (51-53).

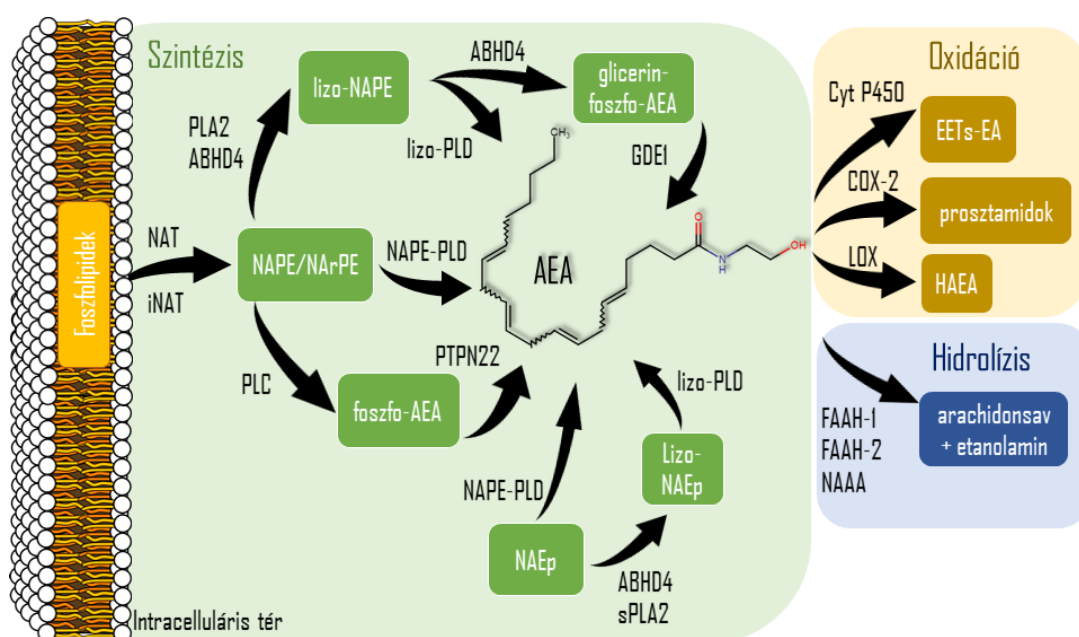


3. **Ábra** Az anandamid (balra) és a 2-arachidonoil-glicerin (jobbra) 2D-s szerkezeti rajza.  
 Forrás: <http://www.guidetopharmacology.org>

#### I.1.2.2.1. Az anandamid szintézise és lebontása

Az anandamid szintézise több közös lépést mutat más, szintén az N-acil-etanolaminok (NAE) családjába tartozó molekulákkal pl. a palmitoil-etanolamid és az oleoil-etanolamid bioszintetikus útjával. Utóbbiak azonban nem fejtenek ki az endokannabinoidokra jellemző élettani hatást. A NAE-k szintézisének módját Schmid és munkatársai írták le, mely két fő enzimátikus lépéséből áll (4. ábra) (54). Első lépésben a foszfatidil-etanolamin N-acilációja történik az N-acil transzferáz (NAT) enzim által, létrehozva N-acil-foszfatidil-etanolamint (NAPE) termékként. Második lépésben NAPE-t hidrolizálja az erre a molekulára specifikus foszfolipáz-D (NAPE-PLD), mely NAE-t ad termékként (55). Di Marzo bizonyította, hogy az anandamid szintézise is ezen az útvonalon halad, prekursor molekulaként az N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin (NArPE) került meghatározásra (56). NArPE a sejtmembránban lokalizálódó arachidonsav tartalmú foszfolipidekből jön létre, mely folyamatot a membránhoz kötött,  $\text{Ca}^{2+}$  szignál függő NAT enzim katalizál (57). A NAPE szintézis emellett megvalósulhat egy másik,  $\text{Ca}^{2+}$  független módon aktiválódó NAT enzim révén (57, 58). A legjobban ismert és legfontosabbnak tartott NAPE-PLD enzimátikus út mellett további négy, NAPE-PLD független módja ismert az AEA szintézisének: 1.) NAPE-ből kiindulva ABDH4 enzim által termelt gliceril-foszfó-AEA-ból a GDE1 foszfodiészteráz aktivitásával AEA keletkezik (59); 2.) NArPE foszfolipáz-C függő módon foszfó-AEA-

dá alakul, melyet a PTPN22 tirozin foszfatáz enzim AEA-dá hidrolizál (60); 3.) PLA2 enzimaktivitása által lizo-NAPE jön létre NArPE-ből, melyet lizo-foszfolipáz-D (lizo-PLD) AEA-dá hidrolizál (61); 4.) keletkezhet anandamid NAPE-PLD függő és független módon is N-acil-etanolamin plazmalogénből (NAEp) (62). Az ismert szintetikus utak egy része *in vitro* került megfigyelésre, azonban NAPE-PLD és GDE1 génkiűtött egerekben a két enzim hiánya nem eredményez teljes AEA hiányt, tehát feltételezhetően működnek az *in vivo* egyelőre nem bizonyított szintetikus útvonalak is (59).



**4. Ábra** Az anandamid szintézisének (zöld háttéren) és lebontásának (sárga és kék háttéren) ismert útvonalai. AEA: anandamid; NAT/iNAT:  $\text{Ca}^{2+}$  függő/független N-acil transzferáz; NAPE: N-acil-fosztafidil-etanolamin; NArPE: N-arachidonoil-fosztafidil-etanolamin; NAPE-PLD: NAPE specifikus foszfolipáz-D; PLC: foszfolipáz-C; PTPN22: nem receptoriális protein tirozin foszfatáz 22; PLA2: foszfolipáz-A2; ABHD4:  $\alpha/\beta$ -hidroláz 4; lizo-PLD: lizo-foszfolipáz-D; GDE1: glicero-foszfodiészter foszfodiészteráz 1; NAEp: N-acil-etanolamin plazmalogén; sPLA2: szekretált foszfolipáz-A2; Cyt P450: citokróm P450; COX-2: ciklooxygenáz-2; LOX: lipooxygenáz; EETs-EA: epoxi-eikozatrién-etanolamid; HAEA: hidroxi-anandamid; FAAH-1/-2: zsírsav-amid-hidroláz 1/2; NAAA: NAE-sav-amidáz.

Az AEA lebontása történhet hidrolízissel arachidonsavra és etanolaminra ill. oxidációval különféle termékekre (4. ábra). A hidrolízisért a központi idegrendszerben a zsírsav-amid-hidroláz (*fatty acid amid hydrolase*, FAAH) enzim egyes izoformája felel

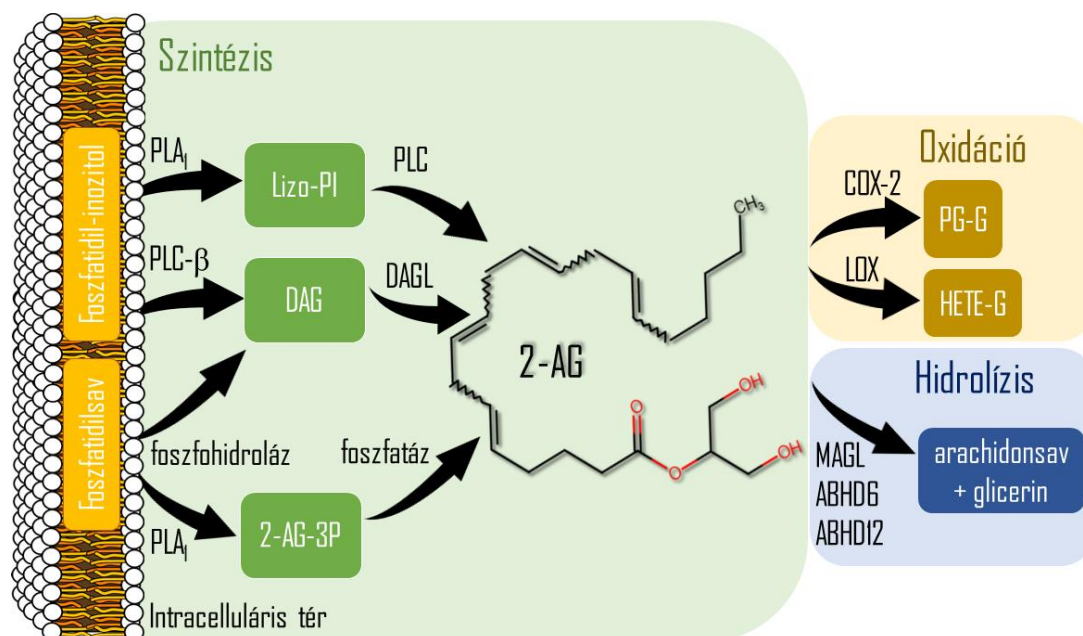
(FAAH-1), míg a kettes izoforma (FAAH-2) számottevő mennyiségben a periférián van jelen, de rágcsáló fajokban utóbbi nem expresszálódik (63-66). Ehhez hasonlóan a NAE-sav-amidáz (NAAA) enzim szintén hidrolizálja az AEA-t, de a tüdőben, lépben, pajzsmirigyben expresszálódik (67). Lipooxigenázok (LOX), a ciklooxygenáz-2 (COX-2) valamint a citokróm P<sub>450</sub> szupercsalád egyes tagjai (pl.: CYP3A4, CYP4F2) képesek különböző biológiailag aktív molekulákká oxidálni AEA-t (68, 69). Az AEA kétféle lebontási útvonala között visszacsatolási mechanizmus működik: a lipooxigenázok által AEA-ból létrehozott különféle hidroxianandamid (HAEA) molekulák a FAAH kompetitív inhibitorai, ill. egyik típusuk a 15-HAEA a NAPE-PLD aktivátora (70). Farmakológiai megközelítésből az AEA szintézisének gátlása a párhuzamosan működő szintetikus utak miatt nehezen megoldható. Ezzel szemben a fokozott AEA tónus kialakítása a FAAH enzim gátlásán keresztül hatékonyan megvalósítható (71).

#### I.1.2.2.2. A 2-AG szintézise és lebontása

A 2-AG képződés legjobban ismert és elsődlegesnek tekintett bioszintetikus útja elválaszthatatlan a posztszinaptikus idegsejt depolarizációjától. Posztszinaptikusan a periszinaptikus gyűrűben elhelyezkedő G<sub>q/11</sub> jelátviteli utat inicializáló metabotróp glutamát receptorok (pl. mGlu5) aktiválódásának hatására azok  $\alpha$  alegysége működésbe hozza a foszfolipáz-C enzim  $\beta$  izoformáját (PLC- $\beta$ ), mely az arachidonsav tartalmú foszfatidil-inozitol molekulákat (elsősorban a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>)) inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP<sub>3</sub>) és diacil-glicerollá (DAG) hidrolizálja (5. ábra) (57, 72-74). A 2-AG szintézisét DAG-ból a diacil-glicerol lipáz (DAGL) enzim végzi, mely szintén jelen van a posztszinaptikus denzitásban (75). E makromolekuláris komplex létrehozásához a posztszinaptikus struktúrfehérje, a Homer<sub>2b</sub> elengedhetetlenül szükséges (76). A PLC- $\beta$  izoformái közül a hippokampális idegsejtekben PLC- $\beta$ 1, a kisagy Purkinje sejtjeiben PLC- $\beta$ 2 van jelen (77, 78). Emellett DAG képződhet foszfatidilsavból foszfohidroláz enzimaktivitás eredményeként (79). DAGL-nek szintén két izoformája ismert, melyek térben szegregáltan helyezkednek el: a DAGL- $\alpha$  legnagyobb mennyiségben a plazmamembránhoz kötött, míg a DAGL- $\beta$  intacelluláris membránok mentén van jelen (75, 80). A két izoforma közül a retrográd jelátvitelért felelős 2-AG-t a DAGL- $\alpha$  szolgáltatja, melyet nem csak térbeli elhelyezkedése igazol, de DAGL- $\alpha$  KO egerek 2-AG termelésének 80 %-kal való visszaesése is (81). 2-AG létrejöhet DAG-tól független módon, mely esetben foszfatidil-inozitolból foszfolipáz-A1 (PLA<sub>1</sub>) lizo-



foszfatidil-inozitolt (Lizo-PI) képez. Utóbbiból a PLC 2-AG-t ad termékül (82). Egy további szintetikus utat Nakane és munkatársai írtak le, mely esteben 2-arachidonoil-glicerin-3-foszfátból (2-AG-3P) foszfatáz enzimaktivitással jön létre 2-AG (83).



**5. Ábra** A 2-AG szintézisének (zöld háttéren) és lebontásának (sárga és kék háttéren) ismert útvonalai. PLA<sub>1</sub>: foszfolipáz-A1; Lizo-PI: lizo-foszfatidil-inozitol; PLC: foszfolipáz-C; PLC-β: foszfolipáz-C β izoforma; DAG: diacil-glicerol; DAGL: diacil-glicerol-lipáz; 2-AG-3P: 2-arachidonoil-glicerin-3-foszfát; COX-2: ciklooxygenáz-2; PG-G: prosztaglandin-glicerinészter; LOX: lipooxygenáz; HETE-G: hidroxi-eikozatetraénsav-glicerinészter (másnéven: hidroxi-arachidonsav-glicerinészter); MAGL: monoacil-glicerol-lipáz; ABHD6/12: α/β-hidroláz 6/12.

A 2-AG lebontása az AEA-hoz hasonlóan történhet hidrolízissel és oxidációval (5. ábra). A központi idegrendszerben a 2-AG arachidonsavra és glicerinre történő bontását hidrolízissel elsődlegesen a monoacil-glicerol-lipáz (MAGL) enzim végzi (84). Az MAGL a 2-AG mintegy 85%-ának lebontásáért felelős, míg a fennmaradó mennyiség MAGL független hidrolízisét az ABHD12 (α/β-hidroláz 12; ~9%), ABHD6 (α/β-hidroláz 6; ~4%) és FAAH (~2%) enzimek végzik (85). A FAAH enzim 2-AG lebontásban betöltött csekély szerepét támasztja alá, hogy FAAH KO egerek 2-AG szintje változatlan marad a központi idegrendszerben (86). A 2-AG oxidatív lebontását LOX és COX-2 enzimek végzik (87, 88). A COX-2 által a 2-AG-ból létrehozott prosztaglandin glicerinészter a 2-AG-val ellentétes hatást kifejtve fokozza hosszútávú szinaptikus potenciációt (89). A 2-AG szintézise gátolható tetrahidrolipsztatinnal, míg lebontásának gátlása leghatékonyabban a MAGL enzim inhibíciójával valósítható meg (90, 91).

### I.1.3. A CB<sub>1</sub>R, a FAAH és a MAGL anatómia lokalizációja az agyban

A CB<sub>1</sub>R a központi idegrendszerben nagy denzitásban expresszáldó fehérje ezért a könnyebb áttekinthetőség érdekében táblázatos formában foglalom össze az eltérő felbontóképességű deskriptív neuroanatómiai módszerekkel (autoradiográfia, *in situ* hibridizáció, antitest alapú immunhisztokémiai jelölések) feltérképezett CB<sub>1</sub>R-t expresszáldó agyterületeket és sejttípusokat, melyek esetén nem kizárólag Herkenham autoradiográfiai munkája áll rendelkezésünkre (24). Emellett, ahol a megfelelő irodalmi adat rendelkezésre állt feltüntettem az anandamid és a 2-AG lebontásáért felelős két legfontosabb enzim, a FAAH és MAGL anatómiai lokalizációját is (1. táblázat).

Az 1. táblázatban felsoroltakból látható, hogy kivétel nélkül, az agy mindegyik fejlődéstani egységéből létrejött régiójában található CB<sub>1</sub>R. Sejttípusokat tekintve előfordul principális neuronokon és GABAerg interneuron típusokon is, de a kéregben kizárólag CCK-pozitív, míg a bazális ganglionokban parvalbumin pozitív interneuronokon van jelen. A principális sejtek ugyan gyengébb intenzitású expressziót mutatnak, de számuk a központi idegrendszerben egy nagyságrenddel nagyobb az interneuronokénál. A szinaptikus transzmisszióban funkcionálisan aktív CB<sub>1</sub>R szubcellulárisan az axonterminálisok plazmamembránjában preszinaptikusan helyezkedik el (75, 124). Az anandamid hidrolízisét végző FAAH posztszinaptikusan lokalizálódik, míg a 2-AG hidrolízisért felelős enzimek közül a MAGL preszinaptikusan, az ABHD6 posztszinaptikusan, míg az ABDH12 mikroglían mutat expressziót (64-66, 133).

**1. Táblázat** A CB<sub>1</sub> receptor, a FAAH és a MAGL enzimek lokalizációja a központi idegrendszerben. Az eCB rendszer funkcionális egységet alkot, így a CB<sub>1</sub>R jelenléte feltételezi az eCB bontó enzimek expresszióját is, noha utóbbiak nem minden itt felsorolt agyterületen kerültek meghatározásra.

CB <sub>1</sub> R			FAAH és MAGL		
Régió		Al régió és/vagy sejt típus	Ref.	Al régió és/vagy sejt típus	Ref.
<b>Myelencephalon</b>	<b>Nyúltvelő</b>	area postrema, vagus dorzális motoros magjai, nucleus tractus solitarius (subnucleus gelatinosus és medialis), dorzális cochleáris mag	(92-95)	FAAH és MAGL: nuclei vestibulares, nuclei olivares inferiores	(96)
<b>Metencephalon</b>	<b>Kisagy</b>	kisagy kéreg stratum moleculare, stratum granulosum, parallel rostok (granula sejtek axonjai), kosársejtek, kúszórostok	(97-101)	FAAH: Purkinje sejtek, szemcsesejtek, kisagyi magok MAGL: stratum moleculare-ban végződő axon terminálisokban, parallel és kúszó rostok terminálisai	(65, 102-106)
<b>Mesencephalon</b>	<b>Substantia nigra</b>	pars reticulata, de vitatott, valószínűleg az ide érkező közepesen tüskés neuronok axonterminálisai adják a jelölődést	(99, 105, 107-109)	FAAH: mérsékelt jelölődés	(106)
	<b>Ventrális tegmentális area</b>	preszinaptikusan GABAerg és glutamaterg axonterminálisokon	(110)		
	<b>Periakveduktális szürkeállomány</b>	elsősorban a dorzális régióban	(100, 111)		
	<b>Formatio reticularis</b>		(101)		
	<b>Raphe magok</b>		(101, 111, 112)	FAAH: median és dorzalis raphe magok	(105)

1. Táblázat második része A CB<sub>1</sub> receptor, a FAAH és a MAGL enzimek lokalizációja a központi idegrendszerben.

CB <sub>1</sub> R			FAAH és MAGL		
Régió		Al régió és/vagy sejt típus	Ref.	Al régió és/vagy sejt típus	Ref.
Diencephalon	Hipotalamusz	n. arcuatus, n. paraventricularis, n. ventromedialis, n. dorsomedialis, eminencia mediana extrenális zónája, laterális hipotalamikus area	(113, 114)		
	Talamusz	nucleus habenularis lateralis, anterior dorzális talamikus mag, retikuláris mag	(100, 109, 114)	FAAH: számos (~13) talamikus magban MAGL: nuclei anteriores thalami	(84, 99, 105, 106)
Telencephalon	Dorzális striátum	nucleus caudatus, putamen, globus pallidus, közepesen tüskés neuronok, parvalbumin pozitív interneuronok, serkentő kortikostriatális afferensek,	(99, 100, 115-118)	FAAH: oligodendrociták	(105)
	Ventrális striátum	nucleus accumbens, közepesen tüskés neuronok, parvalbumin pozitív interneuronok	(117, 119)	MAGL: n. accumbens	(84)
	Mediális striátum	bazális és mediális szeptum, nucleus of the diagonal band, ventrális pallidum, substantia innominata, szeptohippokampális kolinerg sejtek	(109, 114, 115, 120, 121)	FAAH: bazális előagy kolinerg sejtjei, laterális szeptum, triangular septal nucleus	(105, 120)

**1. Táblázat harmadik része** A CB<sub>1</sub> receptor, a FAAH és a MAGL enzimek lokalizációja a központi idegrendszerben.

CB <sub>1</sub> R			FAAH és MAGL		
Régió	Al régió és/vagy sejt típus	Ref.	Al régió és/vagy sejt típus	Ref.	
Telencephalon	<b>Amigdala</b>	CCK-pozitív GABA-erg interneuronok, glutamaterg principális neuronok, CB <sub>1</sub> R expresszió mindegyik magban, de eltérő mennyiségben	(114, 122-124)	FAAH: laterális, bazolaterális, bazomediális magok MAGL: preszinaptikusan CCK-pozitív GABA-erg interneuronokban a bazolaterális magban	(105, 106, 123)
	<b>Hippokampális formáció</b>	CCK-pozitív kosársejtek és Schaffer kollaterális asszociált interneuronok a hippocampusz piramis sejtjeinek rétegében és a molekuláris rétegben, ill. a gyrus dentatusban a granula sejtek rétegének alapjánál, piramissejtek a CA1 és CA3 rétegekben, gyrus dentatus mohasejtjei	(47, 75, 99, 114, 125-129)	FAAH: piramissejtek szómája és proximális dendritjei, gyrus dentatus granula sejtjei (utóbbi csak egérben) MAGL: granula sejtek és piramissejtek axonterminálisai a CA3 régióban	(65, 84, 104-106)

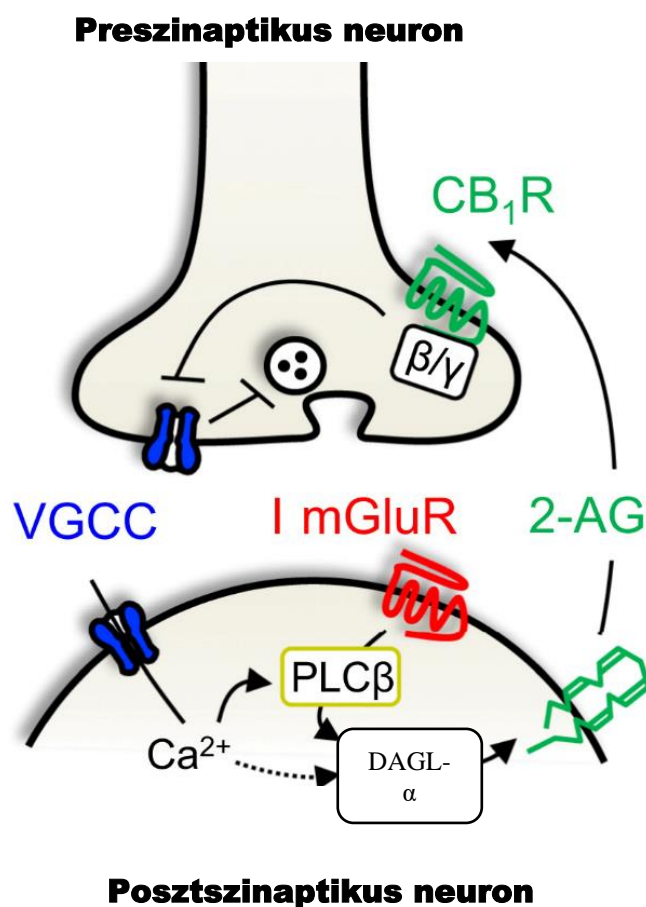
**1. Táblázat negyedik része** A CB<sub>1</sub> receptor, a FAAH és a MAGL enzimek lokalizációja a központi idegrendszerben.

CB <sub>1</sub> R			FAAH és MAGL		
Régió	Al régió és/vagy sejttípus	Ref.	Al régió és/vagy sejttípus	Ref.	
Telencephalon	<b>Agykéreg</b>	neocortex egész területén, de kiemelten: cinguláris kéreg, homlokleány, szomatoszenzoros kéreg, motoros kéreg, CCK-pozitív kosársejtek, a glutamaterg piramis sejtek ~49 százaléka	(99-101, 109, 114, 115, 130-132)	FAAH: neocortex 1-es rétegének kivételével minden rétegben, legtöbb az 5. rétegben; piramis sejtek MAGL: neocortex 4, 5, 6-os rétegeiben	(84, 105, 106)
	<b>Bulbus olfactorius, olfaktoros magok</b>	bulbus olfactorius: granula sejtek rétege, plexiform réteg; nucleus olfactorius anterior	(99, 100)	FAAH: bulbus olfactorius, olfacotorius, sejtek, piriform kéreg	(105, 106)

#### I.1.4. A CB<sub>1</sub>R-hoz kötött szinaptikus jelátvitel

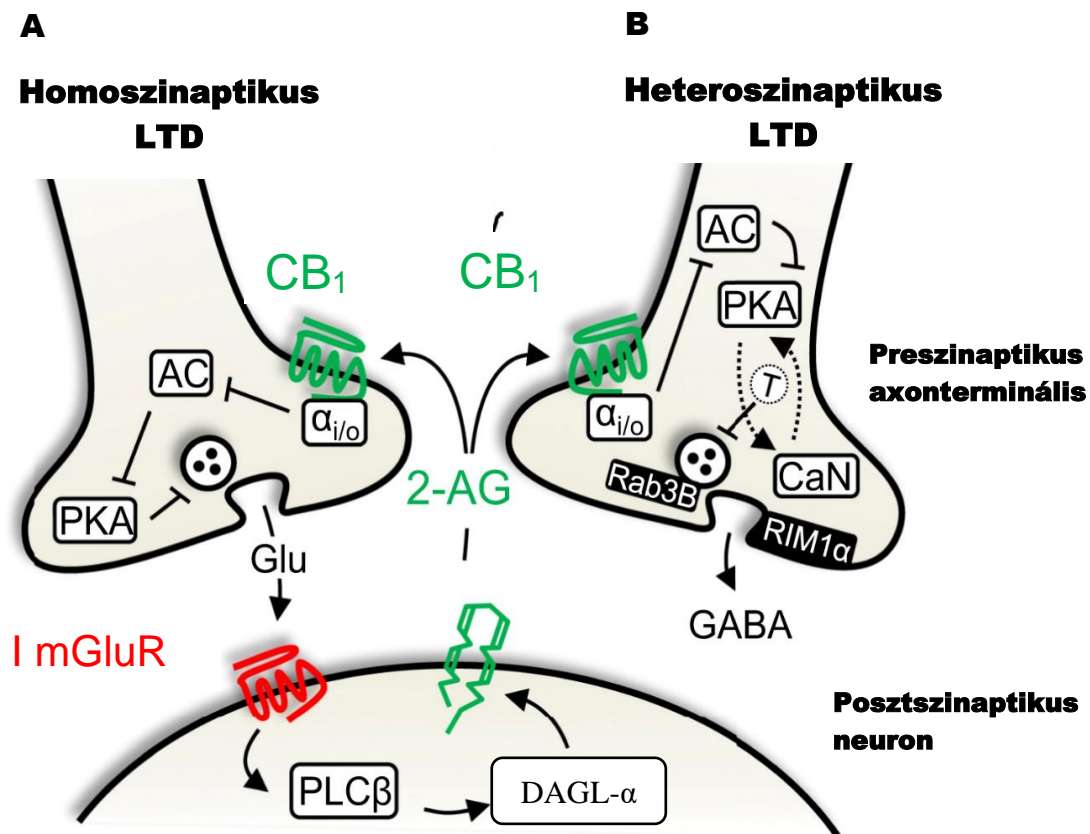
A G<sub>i/o</sub> GPCR-ek családjába tartozó CB<sub>1</sub>R aktivációjának hatására az adenilát-cikláz (AC) működése gátlás alá kerül, így csökken a cAMP termelődése (13, 134). A csökkent cAMP mennyiség következtében a cAMP-függő protein kináz-A (PKA) működése mérséklődik. Ennek következtében K<sup>+</sup> csatornák defoszforilálódnak (aktiválódnak) és az axonterminális hiperpolarizálódnak, mely membránpotenciál változás meggátolja a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulást (135, 136). Egyes esetekben a receptor aktiváció azonban a cAMP szintjének emelkedésével járhat, melynek oka lehet eltérő AC izoformák vagy D2 dopamin receptor jelenléte (137, 138). Kannabinoid receptor aktiváció hatására összességében preszinaptikusan 1.) záródnak az N-, R- és P/Q-típusú feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup> csatornák (139, 140); 2.) a fent ismertetett módon nyílnak a GPCR kapcsolt befelé egyenirányító K<sup>+</sup> csatornák (141); 3.) aktiválódik a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) (142); illetve 4.) a PI4K/Akt jelátviteli út (143). A receptor deszenzitizációja β-arresztinhez kötötten zajlik (144).

Az endokannabinoidok ún. retrográd jelátvitelt valósítanak meg, mely értelmében a posztszinaptikusan felszabaduló endokannabinoidok a preszinaptikus membránban elhelyezkedő CB<sub>1</sub>R-on fejtik ki biológiai hatásukat megindítva a bemutatott szignalizációs utakat. A neuronok közötti kommunikáció e formáját akkor ismerték fel, mikor a posztszinaptikus idegsejten kiváltott depolarizáció csökkentette a preszinaptikusan felszabaduló neurotranszmitter mennyiségét (145, 146). A jelenség gátló (*depolarisation-induced suppression of inhibition*, DSI) és serkentő (*depolarization-induced suppression of excitation*, DSE) szinapszisokban is megfigyelhető volt és az endokannabinoidok szerepét e folyamatban sikerült bizonyítani (98, 147, 148). E retrográd modulátoros hatás révén a neuronok képesek a saját bemeneteiket szabályozni, csökkenteni a szinaptikus részbe kerülő GABA és glutamát mennyiségét. Az eCB jelátvitel jelentőségét tovább növelték azok a bizonyítékok, mely szerint ezen endokannabinoid alapú szignalizációnak alapvető szerepe van rövid- és hosszútávú, valamint a tüzelés időzítésétől függő szinaptikus depresszió kiváltásában, ezáltal a szinaptikus plaszticitás szabályozásában hetero – és homoszinaptikusan egyaránt (6. és 7. Ábra) (149-151).



#### 6. Ábra Endokannabinoid által mediált rövid távú szinaptikus depresszió

Posztszinaptikus membrán depolarizáció, feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup> csatornán (VGCC) át Ca<sup>2+</sup> beáramlás történik. A megemelkedett Ca<sup>2+</sup> szint hatására megindul a 2-AG szintézis diacil-glicerol-lipáz alfa (DAGL- $\alpha$ ) enzim által. 2-AG szintézist kiválthat továbbá I. csoportba tartozó metabotróp glutamát receptor (I mGluR) aktiváció is, foszfolipáz-C béta (PLC- $\beta$ ) enzim közreműködésével. A felszabaduló 2-AG a preszinaptikusan elhelyezkedő CB<sub>1</sub>R-on fejt ki hatását, mely G-fehérje mediált módon gátolja a VGCC nyitást, ezáltal Ca<sup>2+</sup> hiányában a neurotranszmitter tartalmú vezikula ürülése nem megy végbe. (Az ábra eredetije: Pablo E. Castillo és munkatársai., Neuron. 2012 Oct 4; 76(1): 70–81.)



### 7. Ábra Endokannabinoid által mediált hosszú távú szinaptikus depresszió

(A) Preszínaptikus depolarizáció hatására glutamát (Glu) ürül a szinaptikus részbe, mely posztszínaptikusán I. csoportba tartozó metabotrop glutamát receptoron (I mGluR) hatva 2-AG szintézist eredményez foszfolipáz-C béta (PLC-β) és diacil-glicerol-lipáz alfa (DAGL-α) enzimaktivitáson keresztül. 2-AG a homoszinaptikus glutamaterg terminálison hatva G-fehérje kapcsolt módon gátolja az adenilát-cikláz (AC) működését, ezáltal a protein-kináz A (PKA) aktivitása gátlódik és glutamát (Glu) neurotranszmitter felszabadulás csökken. (B) Preszínaptikus CB<sub>1</sub>R aktiváció gátolja az adenilát-cikláz (AC) működését, ezáltal a protein-kináz A (PKA) aktivitása gátlódik. Ezzel egyidőben a Ca<sup>2+</sup> szenzitív foszfatáz kalcineurin (CaN) aktiválódik és egy ezidáig nem meghatározott célmolekula (T) aktiválódásával gátlás alá kerül a gamma-amino-vajsav (GABA) neurotranszmitter felszabadulás. A folyamatban Rab3B és RIM1α, a preszínaptikus aktívzóna fehérjéi is részt vesznek. (Az ábra eredetije: Pablo E. Castillo és munkatársai., Neuron. 2012 Oct 4; 76(1): 70–81.)

## I.2. Farmakológiai manipulációk típusai az endokannabinoid jelátvitel funkcióinak felderítésére

A CB<sub>1</sub>R és endogén ligandjainak bizonyított jelenléte a központi idegrendszerben váltották ki az igényt a megfelelő farmakológiai ágensek létrehozására annak érdekében, hogy az endokannabinoid rendszer élettani szerepe részleteiben felderíthetővé váljon. Farmakológiai megközelítésből az endokannabinoid jelátvitel befolyásolása két fő módon történhet: a kannabinoid receptor aktivációjának szabályozása (pl.: receptor agonista, antagonistá, allostérikus modulátor) vagy az endogén ligandok metabolizmusának (szintézis, degradáció, transzport) manipulálása révén. E két típusba



sorolható farmakológiai manipulációk eltérő hatást fejtenek ki, ezáltal eltérő funkciók felderítésére alkalmasak. A receptor aktiválódásának kiváltásával vagy gátlásával megismerhetők a CB<sub>1</sub>R-ra jellemző specifikus hatások. Ezzel szemben az endokannabinoidok metabolizmusának manipulálásával, pl. az AEA, a 2-AG lebontásának gátlásával vagy az AEA visszavétel gátlásával az endokannabinoidokra jellemző, nem feltétlenül CB<sub>1</sub>R-on megvalósuló ligand specifikus hatások deríthetők fel. A két megközelítési mód legfontosabb képviselői az alábbiak:

### I.2.1. CB<sub>1</sub>R specifikus manipulációk

A nem szelektív, eltérő típusú kannabinoid receptorokon is biológiai hatást kifejtő molekulákat a klasszikus kannabinoidok, nem klasszikus kannabinoidok, aminoalkil-indolok és eikozanoidok csoportjaiba soroljuk (13). Klasszikus kannabinoidoknak nevezzük a *Cannabis sativa*-ból izolált növényi eredetű ill. az analóg molekulaszervezetű szintetikus előállított dibenzo-pirán tartalmú vegyületeket (13). Ide soroljuk a  $\Delta^9$ -THC-t és a HU-210-et.  $\Delta^9$ -THC a CB<sub>1</sub>R-nak és CB<sub>2</sub>R-nak egyaránt parciális agonistája, de előbbihez nagyobb affinitással köt (152). A HU-210 CB<sub>1</sub>R és CB<sub>2</sub>R teljes agonistája, a  $\Delta^9$ -THC-nál potensebb hatást vált ki (153). Nem klasszikus kannabinoidoknak nevezzük  $\Delta^9$ -THC jellemzően pirán gyűrű nélküli biciklikus analógjait (13). A legszélesebb körben használt nem klasszikus kannabinoid a CB<sub>1</sub>R és CB<sub>2</sub>R teljes agonista CP 55,940 (153). A tríciummal jelölt CP55940-nel sikerült elsőként bizonyítani a kannabinoid receptor jelenlétét a patkány idegrendszerben (20). Az aminoalkil-indolok csoportjába tartozik a teljes CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> receptor agonista WIN55212-2, mely a HU-210-től és CP 55,940-től eltérő módon kötődik CB<sub>1</sub>R-hoz (154). Az eikozanoidok közé soroljuk az endokannabinoidokat, mint az AEA, a 2-AG, noladinéter, virodhamin és az N-arachidonoil-dopamin (155). Az AEA a kannabinoid receptorok mellett agonistája a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 ioncsatorna (TRPV1), GPR55, GPR18 (G-fehérje kapcsolt receptor 55 és 18) receptoroknak, valamint a 2-AG agonistaként még a GPR55 receptoron fejt ki hatást (156-158).

Az egyes kannabinoid receptor típusok specifikus élettani funkcióinak megismeréséhez elengedhetetlenül szükséges volt receptor szelektív ligandok szintetizálása. Ezzel a céllal olyan szelektív CB<sub>1</sub>R agonistákat hoztak létre, mint az AEA

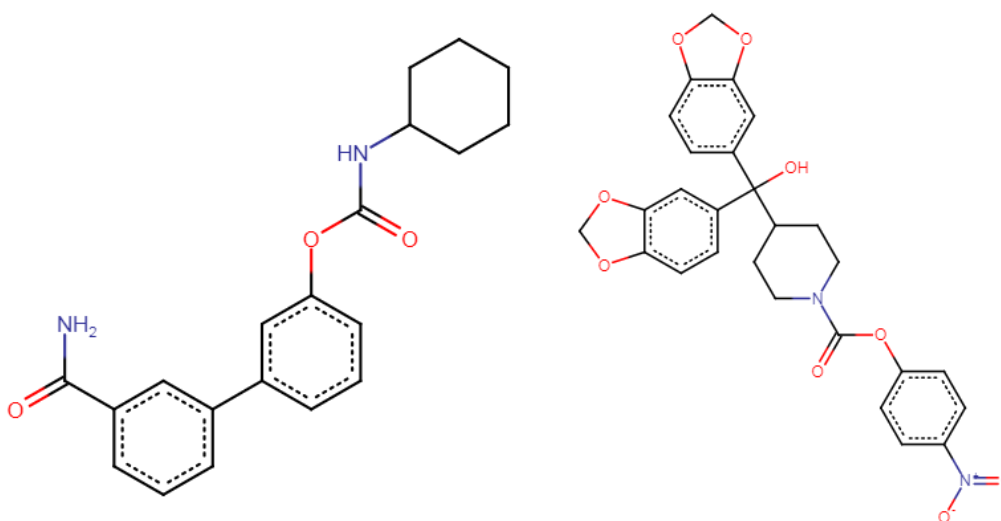
analóg arachidonil-2-kloroetilamid (ACEA) és a arachidonil-ciklopropilamid (ACPA) (159). A legismertebb, rendkívül potens CB<sub>1</sub>R antagonistát a rimonabantot (SR141716A) 1994-ben szintetizálták (160). Emellett CB<sub>1</sub>R inverz agonista rimonabant analógokat hoztak létre, mint az AM251, AM-281, MK-0364 (161-163). Neutrális antagonistákat fejlesztettek, melyek gátolják az agonisták receptorba történő bekötődését, de nem befolyásolják a receptor spontán aktivitását. Ilyenek molekulák például az O-2554, O-2050, LH-21, AM4113 és a NESS0327 (164-168). Más megközelítést alkalmaznak az allosztérikus modulátorok, mint amilyen az Org 29647, Org 27759 és PSNCBAM-1 (169, 170). E molekulák a primer (ortoszterikus) kötőhelytől eltérően, az allosztérikus kötőhelyen kötődnek CB<sub>1</sub>R-hoz és a receptor konformációjának megváltozását váltják ki.

### I.2.2. Endokannabinoid metabolizmuson keresztüli és ligand specifikus manipulációk

A ligand specifikus endokannabinoid manipulációk egyik módja az AEA citoplazmába történő transzportjának gátlása. Magát a transzport folyamatot az teszi szükségessé, hogy az endokannabinoidok inaktivációja hidrolízissel és oxidációval intracellulárisan történik (171, 172). Az első AEA felvételt gátló molekula, az acetaminofen (paracetamol) aktív metabolitja az AM404-volt, mely nem fejt ki közvetlen hatást kannabinoid receptorokra (172, 173). Később azonban kiderült, hogy az AM404 a FAAH szubsztrátja is, mely az AEA lebontásáért felelős enzim, így kompetícióba kerülve az AEA-val csökkenti annak hidrolízisét, emellett TRPV1 receptor agonistaként is hat (174, 175). AEA felvétel gátlók továbbá az UCM-707, VDM11, OMDM-2, AM1172, azonban specifikusságuk az AM404-hez hasonlóan nem teljeskörű, eltérő intenzitással, de gátolják FAAH enzim működését (175-177).

A biológiailag aktív AEA mennyisége növelhető a lebontásáért felelős FAAH enzim gátlása révén. Az első FAAH gátlók fejlesztése a '90-es évek elején kezdődtek meg, azonban e molekulák FAAH-specifitása nem volt kielégítő, mert a MAGL enzim működését is csökkentették. Ebbe a csoportba tartozik a proteáz inhibitor fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), a metil-arachidonil-fluor-foszfónát (MAFP), az AM347 (178-180). Az első potens és szeletív FAAH gátlószer az OL-92 és PL-135 voltak, melyek kompetitív FAAH inhibitorok és *in vivo* analgetikus hatást fejtenek ki (181, 182). A FAAH gátlószer közül a legszélesebb körben ismert és használt szer az URB597 vagy

másnéven KDS-4103 (8. ábra). Az URB597 karbamiláció révén irreverzibilisen gátolja FAAH enzim működését nanomólos koncentráció mellett és nem szorít le ligandokat CB<sub>1</sub>R-ről, továbbá *in vivo* nem vált ki sem katalepsiát, sem hipotermiát (71, 183-187). Potens FAAH-szelektív gátlószer még emellett a PF750, JNJ40355003 és a PF-04457845 (188-190). Az AEA lebontásának gátlása történhet a NAAA enzim inhibícióján keresztül CCP-vel (N-ciklohexán-karbonil-pentadecilamin), azonban ennek elsősorban a perifériás szövetekben van jelentősége (67). Az AEA mellett legjobban ismert másik eCB, a 2-AG szintje is növelhető a lebontásáért elsődlegesen felelős enzim, a MAGL működésének gátlásával. Az első MAGL gátlószer a nem specifikus szerin-hidroláz inhibitor MAFP, PMSF voltak (191). A MAGL aktivitást gátolja továbbá az RCH-80267 és tetrahidrolipsztatin is, azonban DAGL enzimen kifejtett hatásuk miatt nem tekinthetők specifikusnak (90). Az első specifikus MAGL gátló molekula a URB602 volt, azonban mára szelektivitása megkérdőjeleződött (192, 193). Jelenleg az elfogadott MAGL szelektív inhibitorok a JZL184, JJKK 048 és a KML29 (8. ábra) (91, 194).



**8. Ábra** A URB597 (bal) és a JZL184 (jobb) 2D-s szerkezeti képe. Forrás: <http://www.guidetopharmacology.org>

A lehetséges farmakológiai beavatkozások egy további módja az eCB-ok keletkezésének gátlása, azonban az eCB-ok nem egy kizárólagos biokémiai úton szintetizálódnak, így e megközelítési mód nem garantál teljes eCB hiányt. Feltehetően ezen okokból kifolyólag igen kevés eszköz áll rendelkezésünkre: az AEA szintézise gátolható az egyben AEA visszavételt is gátló VDM-11-gyel NAPE-PLD inhibíció

keresztül, míg a 2-AG szintéziséért felelős DAGL enzim működése gátolható tetrahidrolipsztatinnal és O-3841-gyel (90, 195).

### I.3. Az emóciók és a hozzájuk kötődő magatartási válaszok endokannabinoidok általi szabályozása

A CB<sub>1</sub>R jelentős expressziót mutat olyan kortikális és szubkortikális agyterületeken egyaránt (Izd. 1. táblázat), melyek az emóciók felismeréséért, az emocionális válaszok, az emocionális magatartás kialakításáért felelősek. A legfontosabb ilyen agyterületek a prefrontális kéreg ventromediális, ventrolaterális és orbitofrontális része, az anterior cinguláris kéreg, az amigdala, a hippokampusz, az anterior talamikus mag, a hipotalamusz és a periakveduktális szürkeállomány (196-198). A jelentős emocionális komponenssel bíró mentális zavarokban ezen agyterületek malfunkciója figyelhető meg (199-202). Ebből kifolyólag, az endokannabinoid rendszer jelenléte a mentális zavarokkal összefüggésbe hozott agyterületeken már egy évtizeddel ezelőtt felvetette lehetőségként az endokannabinoid jelátvitel manipulálását, mint potenciális terápiás megközelítést e zavarok kezelésére, elsődlegesen a szorongásos zavarokkal és depresszióval kapcsolatban (203, 204). A fent felsorolt, az emocionális magatartást szabályozó agyterületekkel evolúciósan homológ régiók azonosíthatók a rágcsálók központi idegrendszerében (205), ezért a lehetséges transzlációs értéket szem előtt tartva a legtöbb információt a kannabinoid rendszer manipulációjának hatásairól az emocionális válaszokra a rágcsálókön végzett kísérletek szolgáltatják kiterjedten vizsgálva a szorongás-szerű magatartást, a megküzdési stratégiát és a félelmi memóriát.

#### I.3.1. Endokannabinoid jelátvitel a szorongás-szerű magatartás szabályozásában

A szorongás-szerű magatartást vizsgáló kísérletek eredményei szerint a CB<sub>1</sub>R gén deléciója szorongó fenotípus megjelenését eredményezi (206-213). Érdekes módon a CB<sub>1</sub>R-hoz kötött szignalizáció hiányának e szorongás-szerű magatartást fokozó (anxiogénikus) hatás bizonyos esetekben a kísérleti körülmények averzivitásától (pl. fényerősség) függően jelentkezett (213, 214). A CB<sub>1</sub>R antagonistá rimonabant alkalmazása, hasonlóan a CB<sub>1</sub>R gén deléciójához, jellemzően anxiogénikus hatást váltott ki (213, 215-221). Azonban a rimonabant meglepő módon, alacsonyabb dózisban történt

alkalmazását követően a szorongás-szerű magatartást csökkentette, anxiolitikus hatásúnak mutatkozott (222-225). A hatások sokféleségét tovább árnyalja, hogy ezen bifázikus jelleg bizonyos esetekben nem jelentkezett és a rimonabant nem fejtett ki semmilyen irányú hatást a szorongás-szerű magatartásra (226-228). A szakirodalomban olvasható ellentmondásokkal kapcsolatban felmerült, hogy a CB<sub>1</sub>R antagonizmus által kifejtett magatartási hatás nem kizárólag az alkalmazott dózistól, de a kísérleti körülményektől is függhet. Ezt a lehetséges magyarázatot támasztják alá egyéb CB<sub>1</sub>R antagonistákkal végzett vizsgálatok, melyek közel azonos dózisban, de a kísérleti körülményektől függően anxiogénikus ill. anxiolitikus hatást is ki tudtak fejteni (208, 211, 229-232). Az eCB manipulációk dózis és kísérleti kontextus függő hatásait a szorongás-szerű magatartás szabályozásában a CB<sub>1</sub>R agonistákkal (pl.:  $\Delta^9$ -THC, AEA, WIN55,212-2, HU-210, CP 55,940, AM 411) végzett vizsgálatok is alátámasztják. E kezelések alacsony dózis mellett anxiolitikus (208, 220, 229, 233-245), míg magas dózis esetén anxiogénikus hatást fejtettek ki (215, 225, 237, 238, 241, 246-256). Az AEA lebontásáért felelős FAAH enzim génjének deléciója vagy működésének gátlása csökkentette a szorongás-szerű magatartást, mely esetben a jelátvitelt csak ott és akkor fokozza a kezelés az agyban, ahol az éppen zajlik és nem általánosan aktivál vagy gátol minden elérhető CB<sub>1</sub>R-t a receptor agonisták és antagonisták hatásmechanizmusával ellentétben (186, 187, 220, 244, 247, 255, 257-262). Azonos farmakológiai megközelítéssel, a MAGL enzim gátlása révén fokozott 2-AG jelátvitel az AEA-hoz hasonlóan anxiolitikus hatást fejtett ki (259, 263-265). Azonban az enzimgátlás által fokozott eCB jelátvitel esetén e magatartási hatások a CB<sub>1</sub>R agonistákhoz és antagonistákhoz hasonlóan egyes esetekben a kísérleti körülményektől, elsősorban azok averzivitásától függően jelentkeztek (264, 266-269). A szorongás-szerű magatartás CB<sub>1</sub>R és eCB-ok általi szabályozásával foglalkozó szakirodalomban tehát számos ellentmondásos eredmény található, melyek értelmezését a felhasznált dózisos különbözősége, az eltérő kísérleti körülmények (pl. a tesztkörnyezet averzivitása) és a vizsgált fajok mellett tovább nehezíti, hogy az emocionális, pl. a szorongás-szerű magatartást is szabályozó, de eltérő funkcióval bíró agyterületeken a CB<sub>1</sub>R GABAerg és glutamaterg szinapszisokban egyaránt jelen van (114, 214, 233, 266, 270-272). Általánosságban azonban kijelenthető, hogy viselkedés farmakológiai tesztekben averzív körülmények között az eCB jelátvitel anxiolitikus hatású. A fent bemutatott, a

kannabinoid rendszer szerepét vizsgáló kutatásokban felmerült ellentmondások vezettek el arra a hipotézisre, hogy az endokannabinoid rendszer nem specifikus magatartásformák megjelenéséért felelős, sokkal inkább kontextus függő módon a környezeti ingerek interpretációját befolyásolja, valamint a külvilágból érkező kihívásokra adott magatartási válaszok jellegét modulálja (214, 273, 274). E felvetésre a megküzdési stratégiák endokannabinoidok általi szabályozottságát vizsgáló kísérletek szolgálnak bizonyítékokkal.

### I.3.2. Endokannabinoid jelátvitel a megküzdési stratégiák szabályozásában

A környezeti kihívásokra adott magatartási válaszok összességét a kihívásokkal szemben mutatott megküzdési stratégiaként értelmezhetjük, mely stratégia két jól karakterizálható, egyedre specifikusan jellemző és időben állandó típusba sorolható (275, 276). Az ún. proaktív (más néven aktív) stratégiát mutató egyedek magatartása rutin által vezérelt és probléma orientált. A magatartási válasz ebben az esetben autonóm, kevésbé flexibilis. A reaktív (más néven passzív) megküzdési stratégiára jellemző, hogy döntően a környezet stimulusaira adott válaszok vezérlik, az egyed inaktivitást, csökkent elkerülő magatartást mutat. E kétféle megküzdési stratégia esetén az eltérő magatartási válaszok mellett eltérő élettani jelek is felismerhetőek. A proaktív stratégiát mutató egyedek hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyének (stressz-tengely) stressz által kiváltott aktivitása alacsony, fokozott szimpatikus túlsúlyt mutatnak és magas nyugalmi tesztoszteron szintet. Ezzel szemben a reaktív megküzdési stratégiát gyakorló egyedek stressz-tengelyének reaktivitása magas, paraszimpatikus túlsúly jellemző és nyugalmi tesztoszteron szintjük alacsony. E stratégiák humán megfelelőit „A” (proaktív) és „C” (reaktív) típusú stratégiáknak nevezzük, mely stratégiáknak az életminőséget befolyásoló szerepük van, ezáltal a proaktív megküzdési stratégia propagálása terápiás potenciált hordoz magában (277-280).

A kannabinoid rendszer szabályozó szerepét a megküzdési stratégia kialakításában bizonyítja, hogy a CB<sub>1</sub>R gén deléciója averzív környezetben a reaktív megküzdési stratégia felé tolja el az egerek magatartását (214). Eltérő típusú, de szintén megküzdési stratégiát vizsgáló tesztben, szociális kihívás esetén a CB<sub>1</sub>R inverz agonista kezelés szintén reaktív megküzdési stratégia felé tolta el az egyedek magatartását (211). A

kondicionált félelem tesztben, mely során az egyed egy feltételes inger pl.: környezetet vagy hangot, asszociál a félelmi választ kiváltó elektromos sokkal (feltétlen inger), a kialakuló magatartási válasz jellege egyaránt értelmezhető megküzdési stratégiaként. Ebben az esetben reaktív stratégiának tekintjük a dermedt viselkedést, míg a menekülési kísérleteket, fokozódó lokomóciót proaktív stratégiának (281, 282). A CB<sub>1</sub>R génkiütött egyedek fokozott dermedt viselkedést mutatnak a kondicionált félelem tesztben a kondicionálás során használt hang lejátszása során, tehát reaktív megküzdési stratégiát mutatnak (283). Szintén reaktív stratégia jelentkezik, ha a CB<sub>1</sub>R specifikusan a kortikális glutamaterg sejtekről hiányzik, míg proaktív stratégia mutatkozik meg ha a deléció az előagyi GABAerg sejteket érinti (283). A megküzdési stratégiát a  $\Delta^9$ -THC félelmi kondicionálásban dózis függő módon befolyásolja: alacsony dózisban proaktív, míg magas dózisban a reaktív megküzdési stratégia felé tolta el az állatok magatartását (283). A FAAH gátlószer URB597 alkalmazása averzív körülmények között az egyedek magatartási válaszát a proaktív stratégia felé tolja el, melyben fontos szerepe van a prefrontális kéreg ventromediális régiójában zajló anandamid jelátvitelnek (266, 267, 274, 284). A környezet averzivitásától függő, proaktív stratégiát kiváltó hatás a MAGL gátló JZL184-gyel is kiváltható volt (269).

A kétféle megküzdési stratégia a felsorolt magatartási és élettani jellegek mellett az agresszív magatartást tekintve is elkülöníthető egymástól: a proaktív stratégiát mutató egyedek fokozott territoriális agressziót mutatnak, míg a reaktív stratégiát alkalmazókra mérsékelt agresszivitás jellemző (275, 285). A proaktív stratégiát gyakorló egyedek fontos jellemzője fokozott agresszív magatartásukkal összefüggésben a megemelkedett striatális dopamin szint, csökkent szerotonin neurotranszmisszió ill. a magas szomatodendritikus 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor expresszió (276).

A kannabinoid rendszer szerepének vizsgálata az agresszió szabályozásában már a CB<sub>1</sub>R azonosítása előtt megkezdődött. Miczek és munkatársai a  $\Delta^9$ -THC fajtársak közötti agressziót csökkentő hatásáról számoltak be (286). E hatást  $\Delta^1$ -THC is képes volt kifejteni (287). Azonban a kannabinoid rendszer egyes elemeinek szerepéről az agresszió szabályozásában a mai napig keveset tudunk. CB<sub>1</sub>R génkiütött egerek fokozott offenzív agressziót mutatnak, azonban CB<sub>1</sub>R agonista ACEA kezelés hatására az agresszió

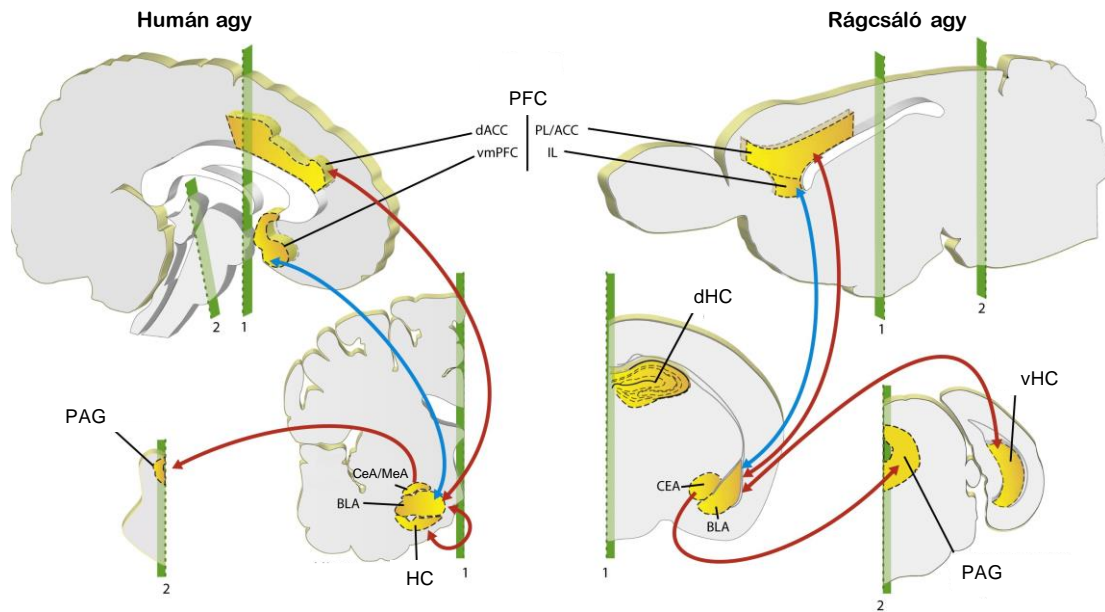
csökken (288). A FAAH enzim aktivitása ugyan befolyásolja a szociális magatartást, de agresszióra gyakorolt hatása nem ismert (218, 289-291). A 2-AG agresszió csökkentő szerepéről elsőként kutatócsoportunk számolt be, mely e disszertáció témája is (292). Ezen eredmények a későbbiekben részletesen kifejtésre kerülnek. A 2-AG agressziót csökkentő hatását emellett egy, a közelmúltban megjelent tanulmány is alátámasztja (293).

Jelen fejezetben bemutatott eredményeknek köszönhetően egyre inkább elfogadottabbá vált a tudományos közösségben azt a nézet, mely szerint az endokannabinoid jelátvitel valóban nem specifikus magatartásformák megjelenéséért felelős, sokkal inkább kontextus-függő módon a környezeti ingerek interpretációját befolyásolja. A külvilágból érkező kihívások azonban sokfélék lehetnek, továbbá az egyes endokannabinoidok specifikus hatásokat is kifejthetnek. Ezért tartottuk indokoltnak és szükségesnek megvizsgálni az anandamid jelátvitel szerepét egy korábban még az endokannabinoid jelátvitellel összefüggésben nem tanulmányozott, megküzdési stratégiát vizsgáló tesztben és a félelmi válasz szabályozásában, valamint a 2-AG szerepét az agresszív interakció szabályozásában.

### I.3.3. Endokannabinoid jelátvitel a félelmi válasz szabályozásában

Az endokannabinoid rendszer elemei jelentős expressziót mutatnak (I. táblázat) a félelmi válaszokat, félelmi memóriát szabályozó, az emlősök között jelentős evolúciós homológiát mutató agyterületeken, mint az amigdala, a hippocampus, a prefrontális kéreg, a periakveduktális szürkeállomány (9. ábra) (205). Humán vizsgálatokból ismert, hogy a rendkívül intenzív érzelmi trauma átélését követően egyes esetekben kialakuló poszttraumatikus stressz szindrómában az endokannabinoid rendszer elemeinek mennyiségi változása figyelhető meg: megváltozik a vérben keringő endokannabinoidok szintje és a CB<sub>1</sub>R expresszió a központi idegrendszerben, azonban a változás irányában a tanulmányok között eltérések mutatkoznak (294-297). A fent említett agyterületeken működő endokannabinoid rendszer jelenléte és elemeinek mennyiségi változása érzelmi trauma hatására feltételezik az endokannabinoid rendszer lehetséges funkcionális relevanciáját a félelmi válaszok szabályozásában.





**9. Ábra** A félelmi válasz akvizíciójában ill. expressziójában (összeköttetések vörös nyíllal) és a félelmi válasz gátlásában (összeköttetések kék nyíllal) részt vevő evolúciósan homológ régiók humán és rágcsáló agyban. Rövidítések: PFC – prefrontális kéreg; HC – hippokampusz; dHC – dorzális hippokampusz; vHC – ventrális hippokampusz; PAG - periakveduktális szürkeállomány; dACC – dorzális anterior cinguláris kéreg; vmPFC – ventromediális prefrontális kéreg; PL – prelimbikus kéreg; ACC – anterior cinguláris kéreg; IL – infralimbikus kéreg; BLA – bazolaterális amigdala; CeA/CEA – amigdala centrális magja; MeA – amigdala mediális magja. Ábra forrása: Dejean, Cyril és munkatársai. "Neuronal circuits for fear expression and recovery: recent advances and potential therapeutic strategies." *Biological Psychiatry* 78.5 (2015): 298-306.

A félelmi válaszok szabályozásának háttérében álló idegrendszeri folyamatok megismerésének egyik eszköze a kondicionált félelem paradigma használata, mely segítségével a traumatikus életesemény átélését követően kialakuló mentális zavar, a poszttraumatikus stressz szindróma rágcsálókban modellezhető (298). E paradigmában az egyed egy feltételes ingert pl. kontextust (környezetet) vagy hangot asszociál a félelmi választ kiváltó, a traumatikus életeseményt jelentő elektromos sokkal (feltétlen inger). Az asszociatív tanulás eredményeként a félelem-specifikus magatartási válasz (dermedés, *freezing*) kiváltásához elegendő az egyed a traumára emlékeztető környezetbe visszahelyezni vagy eltérő környezetben a kondicionálás folyamán használt hangot lejátszani. Az asszociatív tanulási folyamat során memórianyom, ún. engram alakul ki, mely létrejöttének első lépése a memórianyom kódolódása, azaz akvizíciója. Ezt az engram konszolidációja (memória rögzülése), majd a memória felidézése esetén annak rekonszolidációja vagy kioltódása (extinkciója) követik (299-301). Az említett paradigmában a félelmi válasz kioltódása abban az esetben figyelhető meg, ha az állatot

több alkalommal ismételtlen visszahelyezzük a kondicionálásra használt környezetébe és/vagy lejátsszuk a kondicionáláskor használt hangot, de az állat ezzel egy időben már nem szenved el az elektromos sokkot. Ekkor, szintén asszociatív tanulási folyamatok révén az egyed felismeri, hogy az adott környezet vagy hang nem averzív többé. A megfelelő időben alkalmazott farmakológiai beavatkozás megválasztásával specifikusan befolyásolható és tanulmányozható az akvizíció, a konszolidáció, a rekonszolidáció, ill. az extinkció (302).

A kondicionált félelemi válasz akvizíciója során, a kondicionált stimulusra vonatkozó szenzoros információ kortikális feldolgozását követően, a mediális prefrontális kéreg (mPFC) prelimbikus (PrL) régiójából serkentő beidegzést kap az amigdala bazolaterális magja (BLA), mely a centrális amigdalába (CeA) projiciál (303). A kondicionált félelemi választ innen, a centrális amigdalából az agytörzsbe vetítő idegsejtek aktivációja váltja ki (304). A kondicionált félelem konszolidációja során a kondicionált stimulus a BLA fokozott aktivációját váltja ki, amely a félelemi válasz kialakításáért felelős neuronális hálózat ismételt aktivációjához, ezáltal a félelemi válasz megjelenéséhez (expressziójához) vezet (305). A kondicionált félelem kioltódása a mediális prefrontális kéreg infralimbikus régiójának (IL) aktivitásához kötött folyamat, mely serkentő bemenetet ad a BLA-ba. Az IL által beidegzett, a BLA-ban lokalizálódó sejtek gátolják a CeA-ból kilépő, félelemi választ kiváltó idegsejtek aktivitását (303). Az amigdalának tehát szerepe van a félelemi válasz kialakításában és annak kioltódásában is, melyet a mPFC két eltérő régiójából érkező szignálok szabályoznak. E folyamatot az amigdala mikrohálózatainak plasztikussága teszi lehetővé (306, 307). A kondicionáláshoz kötött kontextus eltárolása az IL, PrL kérgi területekkel és az amigdala bazolaterális magjával reciprok összeköttetésben álló ventrális hippokampuszhoz (vHC) kötött folyamat (308). A vHC a komplex összeköttetési révén egyaránt részt vesz a kondicionált félelem akvizíciójában, expressziójában és kioltódásában is (308-312).

A kondicionált félelemi válasznak az endokannabinoid rendszer valamely elemén keresztüli manipulációjára többféle megközelítésből is találunk adatokat az irodalomban. A CB<sub>1</sub>R szisztémás aktivációja ill. gátlása receptor agonistákkal, ill. antagonistákkal megmutatta, hogy a CB<sub>1</sub>R aktivációhoz kötött jelátvitel a kondicionált félelemi válasz

kioltódását elősegíti (313-320). Azonban az ehhez hasonló, szisztémás kezeléseken alapuló vizsgálatok a CB<sub>1</sub>R-hoz kötött jelátvitel szerepét a félelmi válasz akvizíciójában és expressziójában nem tudták egyértelműen meghatározni (313, 317, 320-329). A felmerült ellentmondásokat az endokannabinoid jelátvitel szerepét illetően a kondicionált félelmi válaszokra az anatómiai specificitással végzett farmakológiai kezelések részben tisztázták. Ezen vizsgálatok alapján tudjuk, hogy egyes agyterületek, mint a prefrontális kéreg, a hippocampusz dorzális és ventrális részei, valamint az amigdala magjai más-más módon szólnak bele a kondicionált félelmi válasz szabályozásába: az endokannabinoid jelátvitel 1.) a BLA-ban fokozza a félelmi válasz akvizícióját (325, 330); 2.) az IL-ben, dHC-ban és a dorzolaterális periakveduktális szürkeállományban csökkenti a félelmi válasz expresszióját (327, 331-333); ill. 3.) a dHC-ban fokozza a félelmi válasz kioltódását (334). Fenti kutatások minden esetben a CB<sub>1</sub>R aktivációjához vagy gátlásához kötötten vizsgálták az endokannabinoid jelátvitel szerepét a félelmi válasz szabályozásában, azonban a kis számban ismert endokannabinoid specifikus vizsgálatok arra utalnak, hogy a 2-AG és az AEA eltérő módon szabályozzák a félelmi válaszokat. A szisztémásan és lokálisan az IL-ben fokozott AEA jelátvitel csökkentette a kondicionált félelmi válasz expresszióját, ezzel szemben a szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel a félelmi válasz expresszióját fokozta (332, 335). A szisztémásan vagy a dHC-ban fokozott AEA jelátvitel gyorsította a félelmi válasz kioltódását, míg a fokozott 2-AG jelátvitel szisztémásan és lokálisan a BLA-ban gátolta a kioltódást (319, 334, 336).

Tehát a kondicionált félelmi válasz akvizícióját, expresszióját és kioltódását a központi idegrendszer több, egymástól eltérő funkciójú egysége szabályozza. E neuronális hálózatban az egyes agyterületeken a félelmi válasza az endokannabinoid jelátvitel eltérő és ligand specifikus hatásokat fejt ki. Az AEA-hoz és a 2-AG-hez köthető specifikus hatásokról a félelmi válasz expressziójában és kioltódásában rendelkezünk információval azonban a félelmi válasz akvizíciójában betöltött szerepük vizsgálataink elvégzésének időpontjáig ismeretlenek voltak. Továbbá az endokannabinoidok hatásukat feltételezhetően egymással interakcióban fejtik ki. Ezen interakcióra mutattak bizonyítékot Lee és munkatársai. Eredményeik szerint egér hippocampusz CA1 régiójának piramisneuronjai a periszomatikusan és dendritikusan lokalizálódó GABAerg szinapszisokban az AEA jelátvitel képes a tonikus 2-AG felszabadulást gátolni TRPV1

receptor aktivációja révén (337). Azonban a magatartás szintjén a lehetséges interakciót az AEA és 2-AG jelátvitel között a félelmi memória akvizíciójában mi vizsgáltuk meg elsőként.

Az emóciók és a hozzájuk kötődő magatartási válaszok endokannabinoidok általi szabályozásáról összegzésként elmondható, hogy az endokannabinoid rendszer elemei jelen vannak az emocionális magatartás szabályozásáért felelős agyterületeken és az emocionális válaszok kialakításában betöltött szerepük kulcsfontosságú, de egyben sokrétű is. A sokrétűség forrása a CB<sub>1</sub>R jelentős denzitású expressziója számos agyterületen és egyidejű jelenléte serkentő és gátló szinapszisokban egyaránt, melyek az emocionális magatartás szabályozásában eltérő funkcióval és eltérő mértékben vesznek részt. Általánosságban kijelenthető, hogy viselkedés farmakológiai tesztekben averzív körülmények között az CB<sub>1</sub>R aktivációja anxiolitikus hatású, de az irodalomban több egymásnak ellentmondó eredmény található. Ezen ellentmondások feloldására szolgálnak azon megfigyelések, melyek szerint az endokannabinoid jelátvitel nem egy specifikus magatartás kiváltásáért vagy gátlásáért felelős, sokkal inkább a környezeti kihívásokra adott magatartási válasz jellegét modulálja (274, 338). Tehát kontextus függő módon a környezeti ingerek interpretációját befolyásolja, így potenciálisan szerepe van egyebek mellett a megküzdési stratégia, az agresszív interakció és a félelmi tanulás szabályozásában egyaránt. Jelen ismeretnek döntő többsége a CB<sub>1</sub>R-hoz kötött jelátvitelnek a receptor agonisták ill. antagonisták által kiváltott magatartási hatásaira terjednek ki, míg a két endokannabinoid, az AEA és a 2-AG specifikus szerepéről, lehetséges interakciójáról csekély ismeretekkel rendelkezünk. Munkánk során ezért az AEA-ra és 2-AG-re specifikus magatartási hatásokat, lehetséges interakciókat kívántuk felderíteni, vizsgálva a megküzdési stratégiát, a territoriális agressziót és az akut és hosszú távon fennmaradó félelmi választ.

## II. Célkitűzések

Munkánk során az endokannabinoidok lebontásáért felelős két fő enzim, a FAAH és a MAGL farmakológiai gátlásával kívántuk felderíteni az AEA-ra és 2-AG-re specifikus magatartási hatásokat, lehetséges interakcióikat. Doktori munkám során vizsgálatainkkal az alábbi kérdéseket kívántuk céltottan megválaszolni:

1. **A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken**
  - 1.1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel módosítja-e a megküzdési stratégiát a hátrafordítás tesztben?
  - 1.2. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel befolyásolja-e az akut vagy a hosszú távon fennmaradó kondicionált félelmi választ?
2. **A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken**
  - 2.1. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel befolyásolja-e a territoriális agressziót, valamint a stressztengely aktiválódását agresszív konfliktus során?
  - 2.2. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel befolyásolja-e a fajtárs territóriumára betolakodó egyed agresszióját és a stressztengely aktiválódását agresszív konfliktus során?
  - 2.3. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitelnek az agresszióra gyakorolt hatása a fajtárs territóriumára betolakodó egyedekben a kortikoszteron szint emelkedésével összefüggésben alakult ki?
  - 2.4. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitelnek az agresszióra gyakorolt hatása a rezidens egyedekben az egyes típusú kannabinoid receptor aktiválódásával összefüggésben valósul meg?
3. **A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon**

- 3.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
  - 3.2. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk kivált-e analgézikus hatást?
  - 3.3. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a prelimbikus kéregben befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
  - 3.4. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a ventrális hippocampusban befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
  - 3.5. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk lokálisan a bazolaterális amigdalában befolyásolja-e az akut félelmi választ és a traumatikus emlék akvizícióját?
- 4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon**
- 4.1. A FAAH és a MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk befolyásolja-e a traumatikus emlék kioltódását?

### III. Módszerek

#### III.1. Kísérleti alanyok

Kísérleti alanyainak 2-3 hónapos, 30-35 g tömegű hím CD1 egerek (Charles River Laboratories, Magyarország) valamint 3 hónapos, átlagosan 250 g tömegű hím Wistar patkányok (Toxi-Coop Zrt., Magyarország) voltak. Az állatok számára táplálék és víz *ad libitum* elérhető volt a tartás teljes ideje alatt. A hőmérséklet  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , a relatív páratartalom  $60 \pm 10\%$  volt az állattartó és kísérleti szobákban egyaránt. Kísérleti alanyainkat egymástól izoláltan egyesével, különálló ketrecekben, 12:12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, a lámpák reggel 7:00-kor kapcsolódtak fel. Az egerek esetében az izolált tartás szükségességét a territorialitás kialakítása indokolja valamint az, hogy e faj szoliter életmódot folytat (339-341) és csoportos tartás esetén erős szociális hierarchiát alakítanak ki, mely dominanciaviszony potenciálisan befolyásolhatja a magatartásvizsgálatok eredményeit (341, 342). Patkányok esetén az izolált tartás megakadályozta, hogy a kísérlet előtti kezelés stressznek tegye ki a dobozban a többi még tesztelésre váró állatot továbbá, hogy a szociális interakciók ne befolyásolják a kísérlet alatt mutatott magatartási választ. Emellett a patkányok koponyájába beültetett vezető kanül sérülésmentes fennmaradását és a műtéti seb gyógyulását is az izolált tartás biztosította. Az egereket ezért legalább 2 héttel, a patkányokat egy héttel az első kísérletet megelőzően izoláltuk, így akklimatizálódhattak az állattartási körülményekhez. Minden kísérletünkhöz teszt- és drognívó egyedeket használtunk fel, egy egyedre kizárólag egyetlen kísérletben alkalmaztunk. A kísérleteket az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC), a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával, az állatkísérletekre vonatkozó engedélyek birtokában végeztünk el.

#### III.2. Farmakonok, dózisok és agyterület specifikus kezelések

A MAGL inhibitor JZL184 (egérkísérletek: Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, illetve patkánykísérletek Tocris Biosciences, Bristol, UK), a CB<sub>1</sub>R antagonistá AM251 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) és a FAAH inhibitor URB597 (egérkísérletek: Sigma, Budapest, Magyarország, illetve patkánykísérletek: Tocris Biosciences, Bristol, UK) 1,5 % dimetil-szulfoxid (DMSO) és 0,4 % metil-cellulóz

tartalmú fiziológias sóoldatban került feloldásra. Amennyiben kísérleti alanyaink egerek voltak, az URB597-et 0 (vivőanyag), 0,3 mg/kg, a JZL184-et 0 (vivőanyag), 8 és 16 mg/kg, az AM251-et 0 (vivőanyag), 0,5 és 1 mg/kg dózisokban, 10 ml/kg térfogatban intraperitoneálisan (i.p.) adtuk be 40 perccel a kísérletet megelőzően. Szintén egér kísérletekben a kortikoszteron szintézis gátló metirapont (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 5 % Tween 80-at tartalmazó fiziológias sóoldatban oldottuk fel majd i.p. adtuk be 0 ill. 30 mg/kg dózisban, 5 ml/kg térfogatban 40 perccel a kísérletet megelőzően. Patkányok esetében az URB597-et 0,3 mg/kg, a JZL184-et 16 mg/kg dózisban, 1 ml/kg térfogatban i.p. adtuk be 40 perccel a kísérletet megelőzően szisztémás kezeléseket esetén. Lokális, agyterület specifikus adagolás során a 1,5 % DMSO tartalmú fiziológias sóoldatban feloldott URB597-et 1 ng/0,5 µl, és a JZL184-et pedig 1 µg/0,5 µl koncentrációban, 0,5 µl térfogatban, 30 perccel a kísérletet megelőzően Hamilton mikrofecskendővel bilaterálisan juttattuk a célterületre. A Hamilton mikrofecskendőt egy beadó kanülben végződő polietilén csőhöz csatlakoztattuk, melyet a vezető kanülbe helyeztünk, majd a farmakológiai ágenseket 20 másodperc alatt egyenletes sebességgel injektálva juttattuk a célterületekre. A visszaáramlás elkerülése és a diffúzió maximalizálása érdekében a beadó kanült további 100 másodpercig a vezető kanülben fixen tartottuk. Egerek és patkányok felhasználása esetén is, amennyiben több farmakológiai ágenssel kezeltük az egyedeket a kezeléseket külön fecskendővel, ill. beadó kanüllel, gyors egymásutánban adtuk be. Minden esetben a JZL184, URB597, metirapon és AM251 kezeléseket dózisaik korábbi tanulmányokra alapulva kerültek kiválasztásra (186, 187, 233, 264, 268, 269, 274, 343-346).

### III.3. Magatartástesztek és elemzésük

Minden magatartás tesztet a 12:12 órás fény-sötét ciklus világos periódusának első 4 órájában végeztük, az állattartó helyiségtől elkülönített szobában, 400 lux megvilágítás mellett. A tesztek során videokamerával rögzítettük az állatok magatartását, majd a videofelvételeket a H77 eseményrögzítő szoftverrel (Haller József, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest) manuálisan, illetve az EthoVision XT 10.1.856 (Noldus, Wageningen, Hollandia) viselkedéskövető szoftver segítségével automatizáltan elemeztük. Manuális elemzés esetében a viselkedés analízisét minden



mintán egyazon személy végezte. A kiértékelést végző személy nem ismerte az állatok kísérleti csoportok szerinti beosztását.

### III.3.1. Hátrafordítás teszt CD1 egereken

A hátrafordítás teszt az aktív és passzív megküzdési stratégiák vizsgálatára alkalmas módszer rágcsálóknál (347, 348). Egyedi szinten a kétféle megküzdési stratégia közül az egyik válik dominánssá és az időben állandó marad, a kevert fenotípus általánosan nem jellemző (285, 347-349). A teszt folyamán az alanyokat kézzel a hátukra fordítottuk és egy percig ebben a pozícióban fixen tartottuk. A teszt során az állatok magatartását videófelvételen rögzítettük, majd a H77 eseményrögzítő szoftverrel elemeztük. Elemzésünk során négy fő magatartási formát különítettük el: inaktív megadás (az állat csak légzőmozgásokat, kismértékű fejmozgást mutat), menekülési kísérlet (a test és a végtagok erőteljes mozgása, egyértelmű szabadulási kísérlet), a test megcsavarása, valamint harapások a kísérletet végző személy kezére. Utóbbi két magatartásforma rendkívül röviden, és ritkán jelentkezett vizsgálatunkban (a test megcsavarásának időtartama kevesebb mint 1 s, harapások száma 1-2), az állatok a teszt során döntően passzív megadást tanúsítottak vagy menekülési kísérleteket hajtottak végre. E két paraméter lényegében kiegészítette egymást a teszt teljes idejét tekintve, ezért a megküzdési stratégiát ezzel a két magatartási formával jellemeztük. A menekülési kísérleteket tekintettük az aktív, míg az inaktív megadást a passzív megküzdési stratégia megjelenésének.

### III.3.2. Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető CD1 egereken

Félelmi kondicionálás során az egereket egy plexiüveg ketrecbe (30 X 30 X 30 cm) helyeztük, majd a ketrec acélrácsos padlóján keresztül 5 perc alatt 10 alkalommal 100 V feszültségű 3 mA áramerősségű, 1 másodperc időtartamú (0,01 s hosszú sokk, 0,02 s szünetekkel) elektromos sokk-sorozatokat kaptak 30 másodperces időközönként. Két egyed között a ketrecet etanollal tisztítottuk meg. A kontextuális emlékeztető folyamán az egyedek a félelmi kondicionálásra használt ketrecbe kerültek vissza a sokkot követően 14 nappal, egy alkalommal további 5 percre. Az állatok magatartását a ketrec fölött 1,5 m magasságban elhelyezett videokamerával rögzítettük. Virtuálisan felosztottuk a ketrec alját képező rácsot 10 négyzetcentiméteres területekre, számoltuk a mind a négy

végtaggal történő vonalátlépéseket, így mérve a lokomóciót a H77 szoftver segítségével. A sokk által kiváltott mozgást és a sokkok közötti lokomóciót külön értékeltük. Továbbá mértük a rács irányába történő explorációs magatartást és a dermedt viselkedéssel (teljes immobilitás, a légzőmozgást nem számítva) töltött időt. A dermedt viselkedés a rágszálókra jellemző félelem specifikus magatartási válasz, mely a passzív megküzdési stratégiára jellemző. A dermedt viselkedéssel töltött idő mennyisége jelzi a félelmi válasz intenzitását.

### III.3.3. Rezidens-betolakodó teszt CD1 egereken

Az egereket a kísérletet megelőzően izoláltan tartottuk annak érdekében, hogy territorialitásuk kialakuljon, majd a rezidens betolakodó tesztben egy kisebb méretű ún. betolakodó egyedeket helyeztünk 10 percre a rezidens egyed saját ketrecébe a territoriális agresszió vizsgálatának céljából. Az egyedek magatartását videokamerával rögzítettük és manuálisan megszámoltuk a rezidens és a betolakodó egyed által adott és kapott harapások számát, továbbá a H77 programmal megmértük az alábbi magatartásformákkal töltött idő mértékét: agresszív kurkászás (ellenfél lenyomva tartása, miközben az állat áll vagy menekülni próbál, egyidejűleg az ellenfél bőrének és a bundájának rágszálásával), farokrázás (farok gyors rázása az ellenféllel szembe fordulva), birkózás (birkózó mozdulatok gyakran harapással kísérve), védekező hátrálás (az ellenfél távoltartása a mellső végtagokkal, a hátsó végtagokra ágaskodva), elkerülés (kitérés a közeledő ellenfél elől), menekülés (elfut a közeledő ellenfél elől). Támadó magatartási formaként összegeztük az agresszív kurkászást, a farokrázást és birkózást, míg védekező magatartásként összegeztük a védekező hátrálást, az elkerülést és a menekülést.

### III.3.4. Félelmi kondicionálás és kontextuális emlékeztető Wistar patkányokon

A teszt során a patkányokat egy plexiüveg ketrecbe helyeztük (40 X 40 X 40 cm), majd 3 perc habituációt követően a ketrec acélrácsos padlóján keresztül 3 alkalommal 2,4 mA áramerősségű, 2 másodperc hosszúságú elektromos sokk-sorozatot kaptak (0.01 s hosszú sokk, 0.02 s szünetekkel) 30 másodperces időközönként. Az utolsó elektromos sokkot követően az állatok további 60 másodpercig az apparátusban maradtak, majd visszakerültek saját ketrecükbe. A lokomotoros aktivitás meghatározásához a videofelvételek elemzése során egy 2 X 4-es rácsvonalat vetítettünk a sokkolásra használt

ketrec padlójára, és a kondicionálás első 3 percében (az első sokkot megelőzően) a H77 szoftver segítségével összegeztük a vonalátlépések számát. A sokkolás során mutatott dermedt viselkedéssel töltött időt az akut félelmi válasz vizsgálatához az első sokktól kezdődően a kondicionálás végéig a H77 szoftver segítségével mértük. A kontextuális emlékeztetők során az elektromos sokk napját követően, egy héten át naponta 5 perc időtartamra visszahelyeztük az egyedeket a sokkolásra használt apparátusba. Valamint 28 nappal az elektromos sokk után ismét visszahelyeztük az állatokat a kondicionáló ketrecre. A mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyvének (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) kritériumrendszere alapján amennyiben 1 hónappal egy traumatikus életesemény átélését követően a trauma emlékei akaratlanul visszatérnek már a trauma hosszú távú hatásairól beszélhetünk és (további tünetek egyidejű jelenléte esetén) a poszttraumatikus stressz szindróma diagnosztizálható (350). A 28 nappal későbbi visszahelyezés a sokk környezetébe ráébredés esetén lehetővé teszi a hosszútávú hatások vizsgálatát. Tekintetbe véve a patkányok gyorsabb anyagcseréjét és rövidebb élettartamát a traumát követő 4. héten fennálló félelmi válasz a humán diagnosztikai kritériumnál hosszabb időszakra feleltethető meg. A traumát közvetlenül követő 7 kontextuális emlékeztető alatt a kondicionált félelmi válasz expresszióját és kioldódását, a 28. napi emlékeztető során a félelmi válasz spontán visszatérését vizsgáltuk. A mért változó ekkor is a félelem specifikus dermedt viselkedéssel töltött idő volt, melyet az EthoVision XT szoftver aktivitásvizsgáló funkciójával állapítottunk meg.

### III.3.5. Forró lap teszt Wistar patkányokon

A kezelések esetleges fájdalomküszöbre gyakorolt hatását a forró lap teszt (*hot plate test*) alkalmazásával vizsgáltuk. Az állatokat az IITC Hot Plate Analgesia Meter apparátus (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) 30 °C hőmérsékletű acél lapjára helyeztük, majd egy plexiüveg burával letakartuk, ahol 3 percig szokhattak hozzá a tesztkörnyezethez. Az acél lap a hőszoktatást követően egyenletesen, 6 °C/perc sebességgel melegedett fel 55 °C maximális hőmérsékletig. A kísérletet végző személy mindvégig felügyelte a tesztet és amint az állat bármely végtagját megnyalta vagy a legenyhébb fájdalomra utaló magatartást (bármely végtag hirtelen felemelése, szőrzet felborzolása) mutatta az apparátus hevítése azonnal befejeződött, és az aktuális hőmérséklet, mint a fájdalomküszöb indikátora feljegyzésre került.

### III.4. Vérvétel és kortikoszteron szint mérés

A kortikoszteron hormon szintjének mennyisége a törzsvérből került meghatározásra. A vért etilén-diamin-tetraecetsav tartalmú csövekbe fogtuk fel közvetlenül a rezidens-betolakodó tesztet követően. A mintavétel után a vérvételi csöveket jégen tároltuk majd 4 °C-on lecentrifugáltuk és a plazmát a későbbi elemzés céljából -20 °C-on fagyasztva tároltuk. A kortikoszteron szintet 10 µl plazmából határoztuk meg radioimmunoesszé módszerrel. Méréseink során nyúlban a kortikoszteron-3-karboximetiloxim-bovin szérum albumin ellen termeltetett specifikus ellenanyagot alkalmaztuk. Nyomjelzőként (tracer) a  $I^{125}$ -jelölt karboximetiloxim-tirozin-metil észtert használtuk. A plazma transzkortin reaktivitását alacsony pH alkalmazásával küszöböltük ki. A kortikoszteron mérés szenzitivitása 1 pmol, a mérésen belüli és mérések közötti varianciakoefficiens rendre 10% és 25% volt. Egy adott kísérlet minden mintáját mindig ugyanabban az radioimmunoesszében mértük meg.

### III.5. Kanül implantáció agyterület specifikus beadáshoz

Ketamin-xylazin-pipolfen anesztéziát követően (50–10–5 mg/kg; i.p.) a patkányok fejét sztereotaxiás keretben fixáltuk (David Kopf Instruments), majd két rozsdamentes acél vezető kanült (21G átmérő) bilaterálisan implantáltuk a célzott agyterületek, a vHC (antero-posterior: -5,8 mm; medio-lateralis:  $\pm 5$  mm; dorso-ventralis: -7,1 mm), a PrL (antero-posterior: 2,4 mm; medio-lateralis:  $\pm 1$  mm; dorso-ventralis: -3,5 mm), illetve a BLA (antero-posterior: -3 mm; medio-lateralis:  $\pm 5,2$  mm; dorso-ventralis: -7 mm) fölé. A bregmától számított koordinátákat Paxinos és Watson patkány agyatlaszát felhasználva választottuk meg (351). A kanült mikrocsavarok és fogászati cement segítségével rögzítettük a koponyafelszínhez. Műtét után az állatok visszakerültek ketrecükbe, majd 0,5 ml i.p. fiziológiás sóoldat, illetve 1 mg/kg Gentamicine (1 ml/kg térfogatban) kezelésben részesültek, hogy elkerüljük a posztoperatív kiszáradást és fertőzéseket. A műtétet követő 3 napban, naponta egyszer, ismételten minden állat 1 mg/kg Gentamicine-t kapott (1 ml/kg térfogatban). A műtét után legalább 7 nap telt el az első kísérleti napig, hogy biztosítsuk az állatok posztoperatív felépülését.

### III.6. Perfúzió és a kanül lokalizációjának ellenőrzése

A magatartásteszteket követően az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk a felszálló aortán keresztül 100 ml 0,1 M foszfátpufferelt fiziológiás sóoldattal, majd 200 ml 4%-os paraformaldehid oldattal. Az agyat kiemeltük a koponyából majd a továbbiakban 3 órán át fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldatban és ezt követően 4 °C-on két éjszakára 20%-os cukros, nátrium-azidos foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatba helyeztük. Az agyakat fagyasztást követően szánkamikrotóm segítségével 30 µm vastag szeletekre metsztük és 4 °C-on tároltuk. A metszeteket tárgylemezre húztuk fel, majd fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk a kanülok hegyének anatómiai koordinátáit. Azokat az állatokat, melyek esetén a két kanül közül bármelyik pozíciója nem a célterület felett helyezkedett el kizártuk a további vizsgálatokból.

### III.7. Kísérleti elrendezések

III.7.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken

III.7.1.1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a hátrafordítás tesztben CD1 egerek megküzdési stratégiáira

Az *1. kísérletben* vizsgáltuk a szisztémás FAAH gátlás hatását a megküzdési stratégiára. Az állatokat 3 alkalommal vetettük alá a hátrafordítás tesztnek egy hetes időközönbséggel a tesztnapok között. A vivőanyag (fiziológiás sóoldat) kezelést az 1-3 tesztnapok során a teszt előtt 40 perccel i.p. adtuk be, ill. az egerek fele a 3. tesztnapon szintén 40 perccel a tesztet megelőzően i.p. URB597 kezelést kapott 0,3 mg/kg dózisban (N=40). A 3 tesztnap közül az elsőt a kísérleti procedúrához való hozzászoktatásnak tekintettük, ezért az URB597 kezelés lehetséges hatását a 2. és a 3 tesztnapon mutatott magatartás összevetésével vizsgáltuk. A második tesztnapot követően az állatok magatartását kielemeztük és a megküzdési stratégiát jól jellemző két paraméter (menekülési kísérlet és inaktív megadás) alapján három kategóriába soroltuk az egyedeket. Vizsgálatunkban azon egyedeket soroltuk a 'passzív' kategóriába, amelyek menekülési kísérlet/inaktív megadás aránya 1,5 alatti volt. A 1,5 és 3 közötti arányszámot produkáló egyedeket kevert megküzdési stratégiát mutató állatoknak tekintettük. A 3

feletti arányt mutató állatokat az aktív megküzdési stratégiával rendelkező csoportként definiáltuk. A 2. tesztnapot követő elemzésre és kategorizálásra azért volt szükség, hogy a 3. tesztnapon az URB597-tel és vivőanyaggal kezelt kísérleti csoportokban ugyanolyan arányban legyenek jelen a passzív, kevert és az aktív megküzdési stratégiát mutató egyedek.

III.7.1.2. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a kondicionált félelem tesztben CD1 egerek akut és hosszú távon fennmaradó félelmi válaszára

A 2. kísérletben a kondicionált félelem tesztben tanulmányoztuk a FAAH enzim gátlásának hatását az akut és hosszútávú félelmi válasza CD1 egereken. A tesztet megelőzően 40 perccel 0,3 mg/kg URB597-tel vagy vivőanyaggal kezeltük az egereket majd behelyeztük az egyedeket a sokkolásra használt apparátusba 5 percre. Az azonos hosszúságú kontextuális emlékeztetőre 14 nappal a sokkolást követően került sor, de ekkor sem elektromos sokkot, sem farmakológiai kezelést nem kaptak az egerek. A csoportonkénti elemszám 7 volt.

A tesztet megelőzően egy héttel elektroencefalográfiás (EEG) és elektromiográfiás (EMG) mérőelektrodák kerültek beültetésre az egerekbe azzal a céllal, hogy a sokk, ill. a kezelés által kiváltott alvási mintázat-változásokat rögzíteni lehessen. Fronto-parietális elektroencefalogram rögzítéséhez epidurálisan a homlok (1,5 mm-re laterálisan és 1 mm-re anterior a bregmától) és a falcsoni lebeny (1,5 mm-re laterálisan és 1 mm-re anterior a lambdától) fölé, a bal agyféltekére rozsdamentes acél csavar elektróda került beültetésre. A referencia elektróda (föld) a kisagy fölé került elhelyezésre. Az EMG jelek rögzítéséhez a nyak izomzatából történt az elvezetés rozsdamentes acél vezeték segítségével. A kondicionált félelem tesztben az állatok a műtétet követően 1 héttel vettek részt, de a kondicionálás és a kontextuális emlékeztető során sem EEG, sem EMG jel elvezetés nem történt. Az állatok szabadon mozogtak, nem voltak összekapcsolva mérőműszerekkel. Jelen disszertáció nem tárgyalja az EEG mérések eredményeit, mert azok nem a doktorjelölt saját eredményei. Az érdeklődő olvasó számára ezen eredmények megtalálhatóak az alábbi publikációban: Haller, J., Aliczki, M., Pelczer, K. G., Spitzer, K., Balogh, Z., & Kantor, S. (2014). Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor

URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology*, 231(3), 593-601.

III.7.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken

III.7.2.1. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek territoriális agressziójára és a stressztengely aktivitására

A *3. kísérletben* a rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk a MAGL enzim szisztémás gátlásának hatását a rezidens állatok agressziójára és szociális stressz indukálta kortikoszteron szint változásra. A rezidens egereket kezeltük 0 (vivőanyag), 8 vagy 16 mg/kg JZL184-gyel. 40 perccel a kezelést követően a rezidens állat saját ketrecébe egy nem kezelt, kisebb, hím fajtársat helyeztünk 10 perc időtartamra. A tesztet követően közvetlenül a rezidens állatokat dekapitáltuk és a törzsvért begyűjtöttük a későbbi kortikoszteron szint mérés céljából. Az elemszám kezelési csoportonként 10 volt.

III.7.2.2. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

A *4. kísérletben* a rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk a MAGL enzim szisztémás gátlásának hatását a betolakodó állatok agressziójára és szociális stressz indukálta kortikoszteron szint változásra. A kísérleti elrendezés mindenben megegyezett a *3. kísérletben* leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a betolakodó egyedek részesültek JZL184 kezelésben, míg a rezidens állatok nem. Az elemszám a vivőanyag kezelt csoport esetében 10 volt, ill. 9-9 a 8 mg/kg és 16 mg/kg JZL184-gyel kezelt csoportok esetén.

III.7.2.3. A MAGL enzim és a kortikoszteron szintézis egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

Az *5. kísérletben* a rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk a MAGL enzim működésének és a kortikoszteron szintézis szisztémás gátlásának hatását a betolakodó állatok agressziójára. A kísérleti elrendezés mindenben megegyezett a *3. kísérletben*

leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a betolakodó egyedek részesültek 0 (vivőanyag), 16 mg/kg JZL184 és/vagy 0 (vivőanyag), 30 mg/kg metirapon kezelésben, míg a rezidens állatok nem. A csoportonkénti elemszám 10 volt.

III.7.2.4. A MAGL enzim működésének és a CB<sub>1</sub>R egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

Az 6. kísérletben a rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk a MAGL enzim és a CB<sub>1</sub>R egyidejű szisztémás gátlásának hatását a rezidens állatok agressziójára és szociális stressz indukálta kortikoszteron szint változásra. A kísérleti elrendezés mindenben megegyezett a 3. kísérletben leírtakkal, azzal az eltéréssel, hogy a rezidens állatok esetén alkalmazott dózisosok 0 (vivőanyag), 16 mg/kg JZL184 és 0 (vivőanyag), 0,5 (6b. kísérlet) és 1 mg/kg (6a. kísérlet) AM251 voltak. A csoportonkénti elemszám 9-10 volt.

III.7.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon

III.7.3.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

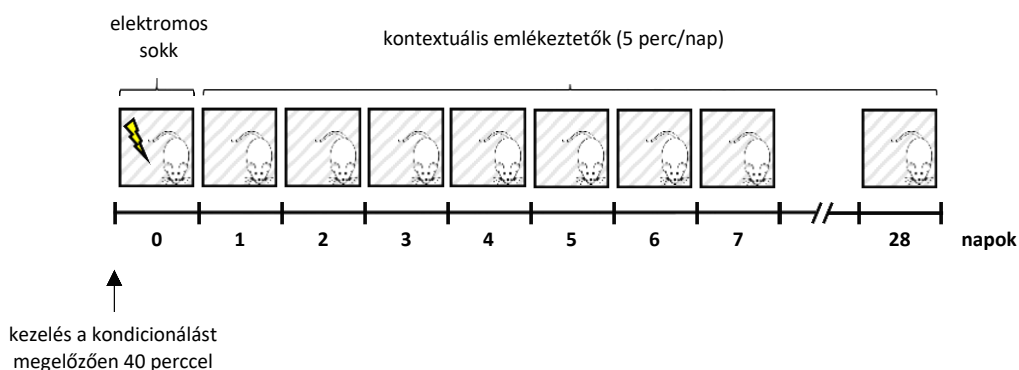
A 7. kísérletben szisztémásan gátoltuk a FAAH és az MAGL enzimek működését és vizsgáltuk az enzimgátlás hatását az akut félelmi válaszokra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben és a kondicionálást követő kontextuális emlékeztetőkből. A kísérleti csoportokat, a kezelés módját, idejét, típusát és az elemszámokat az 2. táblázat foglalja össze.



2. Táblázat A 7. kísérlet csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusa

Kísérleti csoport	Elemzés	Elektromos sokk	Kezelés		
			Ideje	Módja	Típusa
Nem sokkolt kontroll	9	Nem			Vivőanyag
Sokkolt kontroll	10		A kondicionálást megelőzően 40 perccel	i.p.	Vivőanyag
URB597	9				URB597 (0,3 mg/kg)
JZL184	9	Igen			JZL184 (16 mg/kg)
URB597+JZL184	11				URB597 (0,3 mg/kg) + JZL184 (16 mg/kg)

Kísérleti alanyainkat a csoportbeosztásnak megfelelően vivőanyaggal, URB597-tel és/vagy JZL184-gyel kezeltük a kondicionálást megelőzően 40 perccel. A nem sokkolt kontroll egyedek nem kaptak elektromos sokkot, de a többi kezelési csoport állataihoz hasonlóan 5 perc időtartamra behelyeztük őket a tesztapparátusba. A kondicionálást követő hét napban minden egyed naponta egy alkalommal és 28 nappal később, még további egy alkalommal visszahelyeztünk a kondicionálásra használt apparátusba szintén 5 percre, de ekkor sem elektromos sokkot, sem farmakológiai kezelést nem kaptak (10. ábra).



10. Ábra A 7. kísérletben alkalmazott kísérleti elrendezés

III.7.3.2. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben Wistar patkányokon

A 8. kísérletben vizsgáltuk a szisztémás FAAH és MAGL gátlás esetleges fájdalomcsillapító hatását a forró lap tesztben (3. táblázat). A fájdalomküszöb alapértékének megállapításához az állatokat vivőanyaggal kezeltük és 40 perccel később elvégeztük a forró lap tesztet. Ezt követően 24 órával megismételtük a tesztet ugyanazokon az egyedeken, de itt az alanyaink 40 perccel korábban JZL184 és/vagy URB597 kezelésben részesültek.

**3. Táblázat** A 8. kísérlet csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusai

Kísérleti csoport		Kezelés			
Név	Elemsszám	Ideje	Módja	Típusa	
				1. Fájdalomküszöb bazális értékének meghatározása	2. FAAH és MAGL gátlás
URB597	8				URB597 (0,3 mg/kg)
JZL184	8	A tesztet megelőzően 40 perccel	i.p.	Vivőanyag	JZL184 (16 mg/kg)
URB597+JZL184	6				URB597 (0,3 mg/kg) + JZL184 (16 mg/kg)

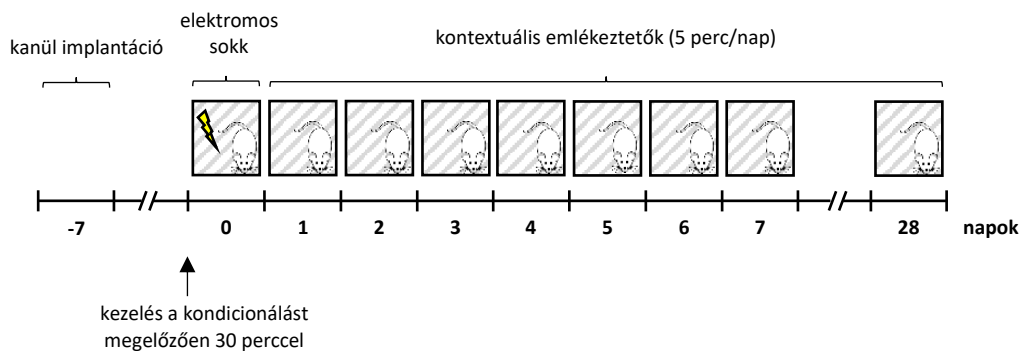
III.7.3.3. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a prelimbikus kéregben az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 9. kísérletben lokálisan, bilaterálisan a prelimbikus kéregben gátoltuk a FAAH és az MAGL enzimek működését és vizsgáltuk az enzimgátlás hatását az akut félelmi válaszokra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben és a kondicionálást követő kontextuális emlékeztetőkben. A kísérleti csoportokat, a kezelés módját, idejét, típusát és az elemszámokat a 4. táblázat foglalja össze.

4. Táblázat A 9. kísérlet csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusai

Kísérleti csoport		Elektromos sokk	Ideje	Kezelés	
Név	Elemszám			Módja	Típusa
Nem sokkolt kontroll	6	Nem			Vivóanyag
Sokkolt kontroll	6		A		Vivóanyag
URB597	5	Igen	kondicionálást megelőzően 30 perccel	Lokálisan a prelimbikus kéregben	URB597 (1 ng/0,5 µl)
JZL184	7				JZL184 (1 µg/0,5 µl)
URB597+JZL184	7				URB597 (1 ng/0,5 µl) + JZL184 (1 µg/0,5 µl)

Kísérleti elrendezés a 7. kísérletnél bemutatottal azonos volt, azzal az eltéréssel, hogy a kezelést 30 perccel a kondicionálást megelőzően és lokálisan, bilaterálisan, a prelimbikus kéregbe juttattuk be. A lokális beadáshoz szükséges vezető kanült a kezelést megelőzően 7 nappal ültettük be (11. ábra).



11. Ábra A 9., 10. és 11. kísérletekben használt kísérleti elrendezés

III.7.3.4. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a ventrális hippocampusban az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 10. kísérletben lokálisan, a ventrális hippocampusban bilaterálisan gátoltuk a FAAH és az MAGL enzimek működését és vizsgáltuk az enzimgátlás hatását az akut félelmi válaszokra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben

és a kondicionálást követő kontextuális emlékeztetőkben. A kísérleti csoportokat, a kezelés módját, idejét, típusát és az elemszámokat az 5. táblázat foglalja össze. Kísérleti elrendezés a 9. kísérletnél ismertetettel megegyező volt, azzal az eltéréssel, hogy a kezelést lokálisan, bilaterálisan a ventrális hippokampuszba juttattuk be. A lokális beadáshoz szükséges vezető kanült a kezelést megelőzően 7 nappal ültettük be (11. ábra).

5. Táblázat A 10. kísérlet kezelési csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusai

Kísérleti csoport		Elektromos sokk	Ideje	Kezelés	
Név	Elemszám			Módja	Típusa
Nem sokkolt kontroll	4	Nem			Vivóanyag
Sokkolt kontroll	7				Vivóanyag
URB597	4		A kondicionálást megelőzően 30 perccel	Lokálisan a ventrális hippokampuszban	URB597 (1 ng/0,5 µl)
JZL184	6	Igen			JZL184 (1 µg/0,5 µl)
URB597+JZL184	5				URB597 (1 ng/0,5 µl) + JZL184 (1 µg/0,5 µl)

III.7.3.5. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a bazolaterális amigdalában az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 11. kísérletben lokálisan, a bazolaterális amigdalában bilaterálisan gátoltuk a FAAH és az MAGL enzimek működését és vizsgáltuk az enzimgátlás hatását az akut félelmi válaszokra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben és a kondicionálást követő kontextuális emlékeztetőkben. A kísérleti csoportokat, a kezelés módját, idejét, típusát és az elemszámokat a 6. táblázat foglalja össze. Kísérleti elrendezés a 9. kísérletnél ismertetettel megegyező volt, azzal az eltéréssel, hogy a kezelést lokálisan, bilaterálisan a bazolaterális amigdalába juttattuk be. A lokális beadáshoz szükséges vezető kanült a kezelést megelőzően 7 nappal ültettük be (11. ábra).

6. Táblázat A 11. kísérlet csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusai

Kísérleti csoport		Elektromos sokk	Ideje	Kezelés	
Név	Elemszám			Módja	Típusa
Nem sokkolt kontroll	5	Nem			Vivőanyag
Sokkolt kontroll	5				Vivőanyag
URB597	4	Igen	A kondicionálást megelőzően 30 perccel	Lokálisan a bazolaterális amigdalában	URB597 (1 ng/0,5 µl)
JZL184	6				JZL184 (1 µg/0,5 µl)
URB597+JZL184	5				URB597 (1 ng/0,5 µl) + JZL184 (1 µg/0,5 µl)

III.7.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jeltávitel hatása a traumatikus emléki kioltódására patkányokon

III.7.4.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása traumatikus emléki kioltódására a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 12. kísérletben szisztémásan gátoltuk a FAAH és az MAGL enzimek működését és vizsgáltuk az enzimgátlás hatását a traumatikus emlékek kioltódására a kondicionált félelem tesztet követő kontextuális emlékeztetőkben. Kísérleti elrendezésünk megegyezett a 7. kísérletnél bemutatottal, azzal az eltéréssel, hogy a kezelést kísérleti alanyaink a kondicionálást követő napon, az első kontextuális emlékeztetőt megelőzően 40 perccel kapták. A kísérleti csoportokat, a kezelés módját, idejét, típusát és az elemszámokat a 7. táblázat foglalja össze.

7. Táblázat A 12. kísérlet kezelési csoportjai, elemszámok, a kezelés ideje, módja és típusai

Kísérleti csoport		Elemszám	Elektromos sokk	Ideje	Módja	Kezelés Típusa
Név						
Nem sokkolt kontroll	9	Nem				Vivóanyag
Sokkolt kontroll	10			Az első kontextuális emlékeztetőt megelőzően 40 perccel	i.p.	Vivóanyag
URB597	9	Igen				URB597 (0,3 mg/kg)
JZL184	10					JZL184 (16 mg/kg)
URB597+JZL184	9					URB597 (0,3 mg/kg) + JZL184 (16 mg/kg)

### III.8. Statisztikai analízis

Az adatokat minden esetben átlag  $\pm$  standard hibaként ábrázoltuk.

Az 1. kísérletben (hátrafordítás teszt) a 2. és 3. tesztenapon mutatott magatartások közötti korreláció kiszámításához lineáris regressziót alkalmaztunk (magyarázó változó: magatartás a 2. tesztenapon; függő változó: magatartás a 3. tesztenapon). A magatartási adatokat ismételt mérésees varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk (1. faktor: kezelés; 2. faktor: megküzdési stratégia; 3. ismételt mérésees faktor: tesztenap). Ha a 3 faktor közötti interakció szignifikáns volt egy külön faktoriális ANOVA-t futtattunk le a kezelési csoportokra (1. faktor: megküzdési stratégia; 2. faktor: tesztenap).

A 2. kísérletben a félelmi kondicionálás és a kontextuális emlékeztető alatt mutatott magatartási változókat ismételt mérésees ANOVA-val értékeltük (1. faktor: kezelés; 2. ismételt mérésees faktor: idő). Szignifikáns kezelési hatás esetén a csoportok páros összehasonlítására *post-hoc* a Fisher-féle LSD (legkisebb szignifikáns eltérés, *least significant difference*) tesztet alkalmaztuk. Többszörös összehasonlítások esetén a p-értékeken Bonferroni-Holm korrekciót végtünk.

A 3., 4., 5. és 6. kísérlet adatainak kiértékelésekor egyutas, faktoriális, illetve ismételt mérésees ANOVA-t alkalmaztunk. Az ANOVA kritériumainak teljesülését Levenne-teszttel ellenőriztük, szükség esetén, a kritériumok teljesülésének érdekében az

adatokat négyzetgyök-transzformáltuk. Ha a varianciaelemzés szignifikáns hatást mutatott ki a csoportok *post-hoc* páronkénti összehasonlításához Duncan-tesztet alkalmaztuk. A 3. kísérletben két ismételt méréses ANOVA-t végeztünk. Az első varianciaelemzésben a harapások számát vizsgáltuk, a rezidens állatoknak adott JZL184 dózis (1. faktor: 0, 8, 16 mg/kg) és a harapások irányultságának függvényében (2. ismételt méréses faktor: adott harapások az elszenvedett harapásokkal szemben). A második ANOVA-ban a regisztrált magatartási válasz jellegét vizsgáltuk, a rezidens egyednek adott JZL184 dózis (1. faktor: kezelés) és a magatartás természetének (2. ismételt méréses faktor: offenzív magatartás a defenzívvel szemben) függvényében. A 4. kísérletben a 3. kísérlet kiértékelésére használt statisztikai módszert alkalmaztuk, de ebben az esetben a kezelést a betolakodó egyedek kapták.

Az 5. kísérletben az adatok értékelésére ismételt méréses ANOVA-t végeztünk a harapások számának és a magatartás természetének (offenzív, defenzív) kiértékelésére (1. faktor: JZL184 kezelés; 2. faktor: metirapon kezelés; 3. ismételt méréses faktor: magatartás típusa). Az 6. kísérletben az adatok értékelésére ismételt méréses ANOVA-t végeztünk a harapások számának és a magatartás természetének (offenzív, defenzív) kiértékelésére (1. faktor: JZL184 kezelés; 2. faktor: AM251 kezelés; 3. ismételt méréses faktor: magatartás típusa). A 3., 4., 5. és 6. kísérletben a kortikoszteron szint változásokat egyutas ANOVA-val értékeltük (1. faktor: kezelési csoport).

A 7. kísérletben a vonalátlépések számát a kondicionálás első 3 percében egyfaktoros varianciaanalízissel értékeltük (1. faktor: kezelési csoport). A dermedt viselkedéssel töltött idő mennyiségét a kondicionálás alatt, ill. a kontextuális emlékeztetők során ismételt méréses ANOVA-val értékeltük (ismételt méréses faktor: napok; 2. faktor: kezelési csoport) a 7., 9-12. kísérletekben. A 8. kísérletben a kezeléseknél a fájdalomküszöbre gyakorolt hatását szintén ismételt méréses ANOVA-val értékeltük (1. faktor: kezelési csoport; 2. ismételt méréses faktor: napok). Az ANOVA kritériumainak teljesülését Levenne-teszttel ellenőriztük, szükség esetén, a kritériumok teljesülésének érdekében az adatokat négyzetgyök-transzformáltuk. Ha a varianciaelemzés szignifikáns hatást mutatott ki a csoportok páronkénti

összehasonlításához a post-hoc Duncan-tesztet alkalmaztuk. Többszörös összehasonlítások esetén Bonferoni-Holm korrekciót végtünk.

Minden elvégzett statisztikai számítás esetén a változók közöttük fennálló korrelációkat, eloszlásuk közötti különbségeket, ill. a kezelések hatását és a csoportok közötti különbségeket kizárólag abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték 0,05-nél kisebb volt. A végrehajtott statisztikai vizsgálatokat a Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végtük.

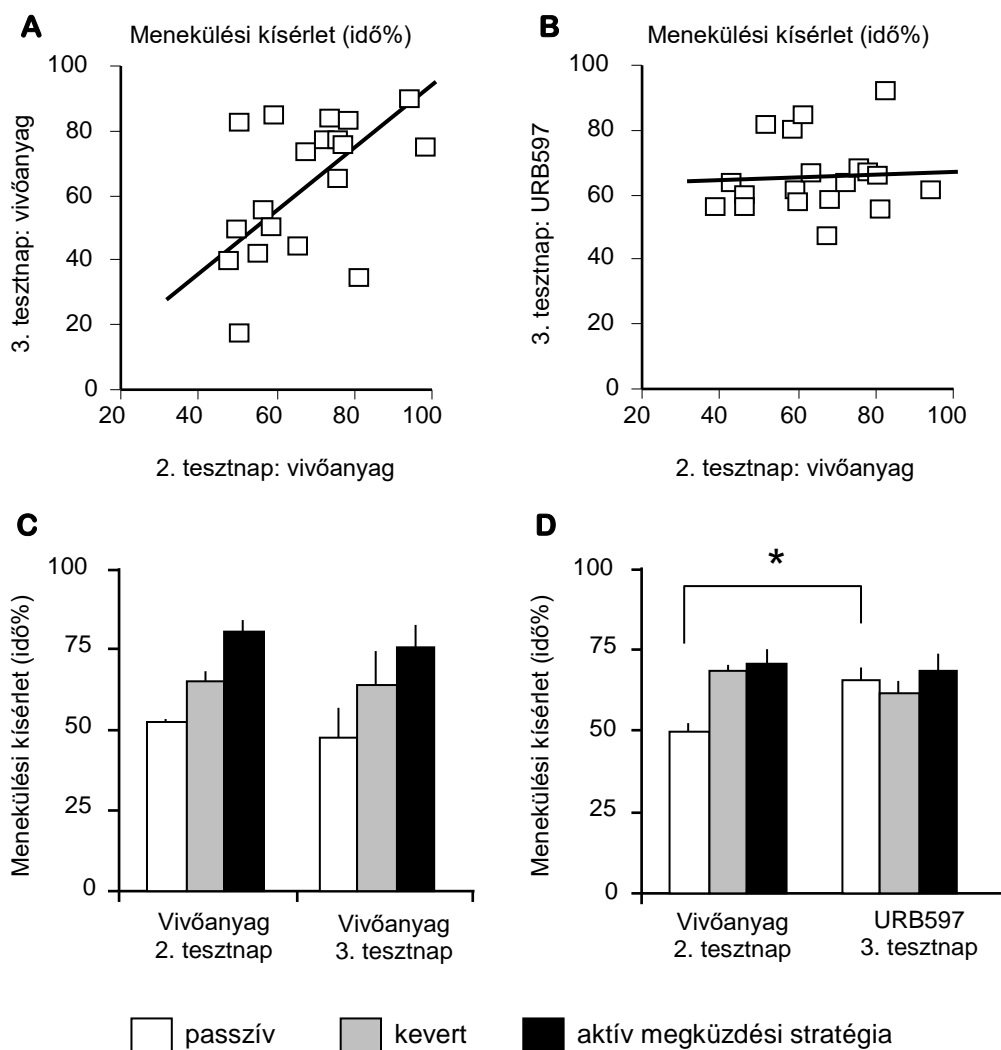


## IV. Eredmények

### IV.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken

#### IV.1.1. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a hátrafordítás tesztben CD1 egerek megküzdési stratégiáira

Az 1. kísérletben a vivőanyag kezelt egyedek menekülési kísérlettel töltött ideje a 2. és 3. teszt napok között statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott ( $R=0,479$ ;  $p=0,03$ ) (12A. ábra), míg a 3. teszt napon a tesztet megelőzően történt URB597 kezelés esetén e korreláció nem jelentkezett ( $R=0,128$ ;  $p=0,59$ ) (12B. ábra). Általánosságban az URB597 kezelés nem fejtett ki hatást a menekülési kísérletekkel töltött időre. Ezt követően az egyedeket megküzdési stratégiáik szerint csoportosítottuk (lisd.: Kísérleti elrendezések, III.7.1. rész), mely elemzésünk szerint az egyedek 39,5 %-a passzív, 34,2 %-a aktív, míg 26,3 %-a kevert megküzdési stratégiát mutatott. Mivel a kezelés (1. faktor), a megküzdési stratégia (2. faktor) és a teszt nap (ismételt méréses faktor) között szignifikáns interakció állt fenn (Wilk's lambda=0,174;  $F_{\text{interakció}}(4, 66)=22,97$ ;  $p<0,0001$ ), lehetőségünk volt további elemzésben a kezelési csoportokon belüli magatartási változást vizsgálni. A 2. és 3. teszt napon a vivőanyaggal kezelt egyedek magatartását a megküzdési stratégia határozta meg ( $F_{\text{megküzdési stratégia}}(2, 32)=9,41$ ,  $p=0,0006$ ;  $F_{\text{teszt nap}}(1, 32)=0,75$ ,  $p=0,39$ ;  $F_{\text{interakció}}(2, 32)=0,66$ ,  $p=0,52$ ). Mindhárom megküzdési stratégiát mutató vivőanyag kezelt csoport esetén a 2. és 3. teszt napot összevetve a menekülési kísérletekkel töltött idő nem különbözött szignifikánsan ( $p>0,5$ ) (12C. ábra). Ezzel szemben a 3. teszt napon URB597 kezelt egyedek magatartására a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ( $F_{\text{megküzdési stratégia}*\text{teszt nap}}(2, 32)=8,63$ ,  $p=0,001$ ) (12D. ábra). A 2. teszt napon passzív stratégiát mutató egyedek esetén, a 3. teszt napon URB597 kezelést követően az aktív megküzdési stratégia dominált ( $p=0,02$ ). A megküzdési stratégiát befolyásoló URB597 hatás a 2. teszt napon a kevert és az aktív megküzdési stratégiát mutató egyedek esetén nem jelentkezett. Az URB597 kezelés hatására azon egyedek, amelyekre a passzív megküzdési stratégia volt jellemző, aktív megküzdési stratégiát mutattak (12D. ábra).

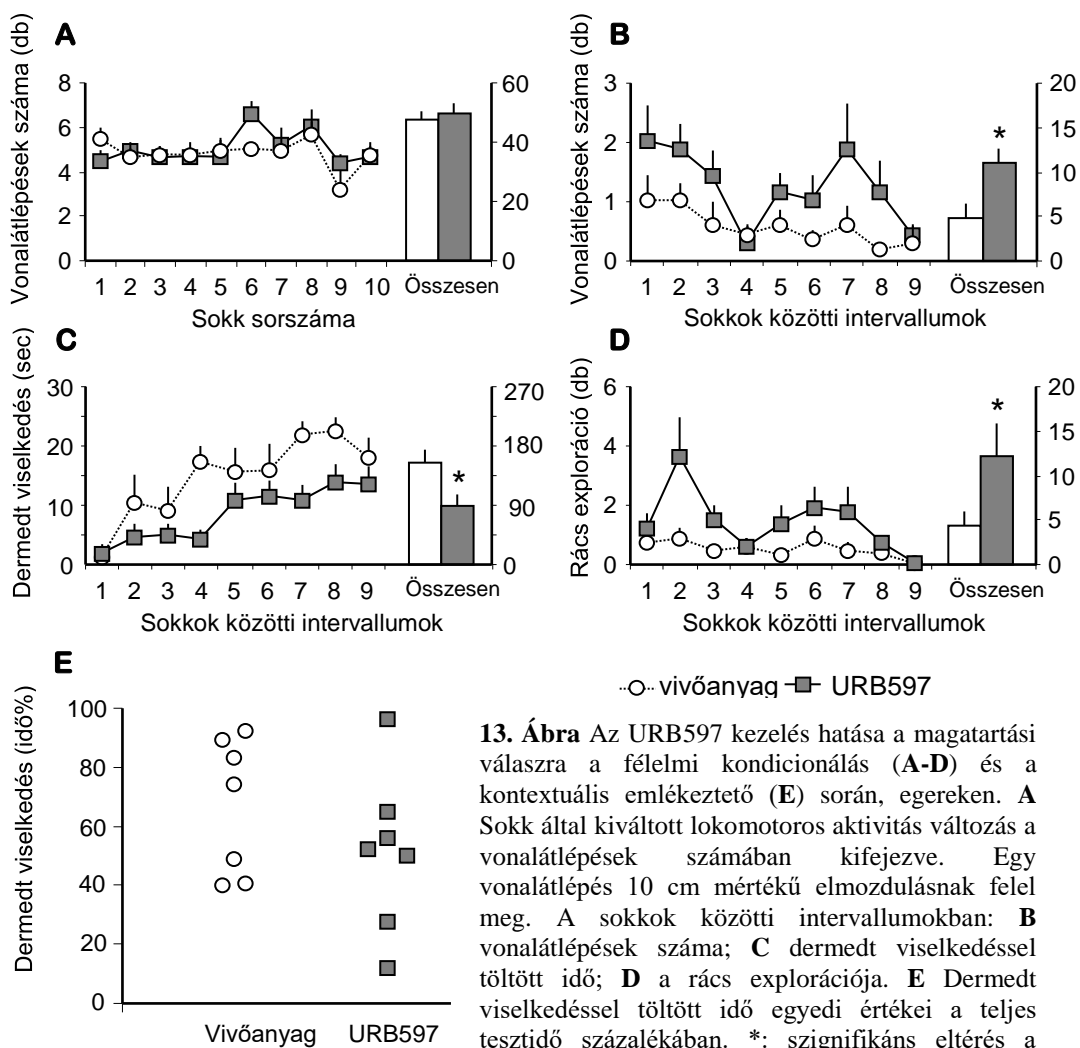


**12. Ábra** A FAAH enzim szisztémás gátlásának hatása a megküzdési stratégiára a hátrafordítás tesztben egereken. **A** Korreláció a 2. és 3. teszt napon vivőanyag kezelést követően mutatott menekülési kísérletekkel töltött idő között. **B** Korreláció a 2. teszt napon vivőanyag, a 3. teszt napon URB597 kezelést követő menekülési kísérletekkel töltött idő között. **C** Menekülési kísérletekkel töltött idő az eltérő megküzdési stratégiákat mutató csoportok között a 2. és 3. teszt napon vivőanyagkezelés esetén. **D** Menekülési kísérletekkel töltött idő az eltérő megküzdési stratégiákat mutató csoportok között a 2. teszt napon vivőanyag, ill. a 3. teszt napon URB597 kezelést követően. \*: szignifikáns különbség a 2. és a 3. teszt nap között ( $p < 0,05$ ).

#### IV.1.2. A FAAH enzim szisztémás gátlásával fokozott anandamid jelátvitel hatása a kondicionált félelem tesztben CD1 egerek akut és hosszú távon fennmaradó félelmi válaszára

A 2. kísérletben a félelmi kondicionálást megelőzően adott URB597 kezelés a kondicionálás alatt nem volt hatással az elektromos sokk által kiváltott lokomotoros

aktivitásra ( $F_{\text{kezelés}}(1, 12)=0,15; p<0,2$ ) (13A. ábra). Ezzel szemben az elektromos sokkok közötti 30 másodperces intervallumokban az URB597 kezelt egyedek lokomotoros aktivitása szignifikáns mértékben növekedett ( $F_{\text{kezelés}}(1, 12)=7,07; p<0,03$ ), továbbá a félelemspecifikus, dermedt viselkedéssel töltött idő szignifikánsan alacsonyabb volt ( $F_{\text{kezelés}}(1,12)=5,32; p<0,05$ ) (13B-C. ábra). A kondicionálásra használt ketrec alját képező fémrácsot az URB597 kezelt egyedek szignifikánsabban többet explorálták ( $F_{\text{kezelés}}(1, 12)=4,77; p<0,05$ ) (13D. ábra). A kondicionálást követően 14 nappal a kontextuális emlékeztető folyamán mindkét kezelési csoportba tartozó egyedek dermedt viselkedést mutattak. Az URB597 kezelt csoport a dermedt viselkedéssel töltött időt tekintve csupán marginálisan különbözött a vivőanyag kezelt csoporttól ( $F_{\text{kezelés}}(1, 12)=3,37; 0,1>p>0,05$ ) (13E. ábra). Tehát a 2. kísérletben az URB597 kezelés hatására a félelmi válasz csökkent mértékben jelentkezett a félelmi kondicionálás során, míg a félelmi válasz hosszú távú fennmaradását az egyszeri kezelés nem befolyásolta.

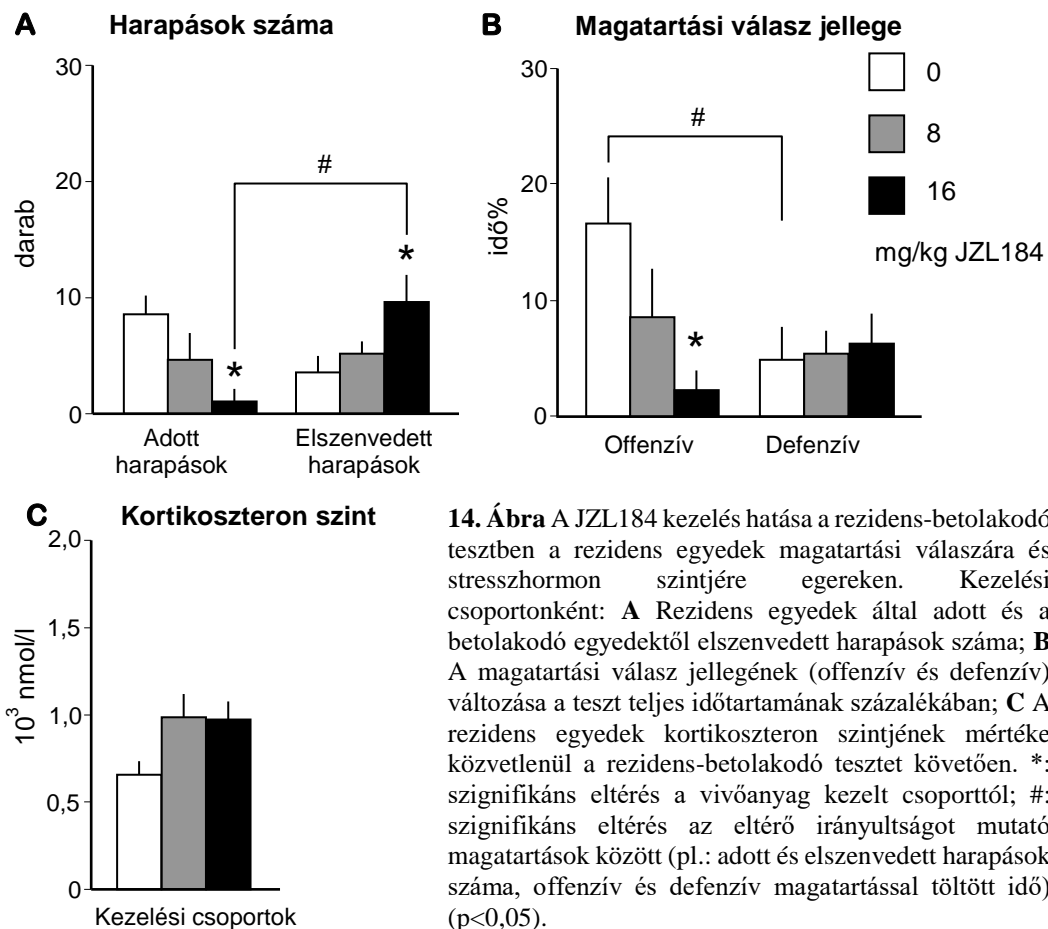


**13. Ábra** Az URB597 kezelés hatása a magatartási válaszra a félelmi kondicionálás (A-D) és a kontextuális emlékeztető (E) során, egereken. A Sokk által kiváltott lokomotoros aktivitás változása a vonalatlépések számában kifejezve. Egy vonalatlépés 10 cm mértékű elmozdulásnak felel meg. A sokkok közötti intervallumokban: B vonalatlépések száma; C dermedt viselkedéssel töltött idő; D a rács explorációja. E Dermedt viselkedéssel töltött idő egyedi értékei a teljes tesztidő százalékában. \*: szignifikáns eltérés a vivőanyag kezelt csoporttól ( $p<0,05$ ).

## IV.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válasza agresszív interakcióban egereken

### IV.2.1. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek territoriális agressziójára és a stressztengely aktivitására

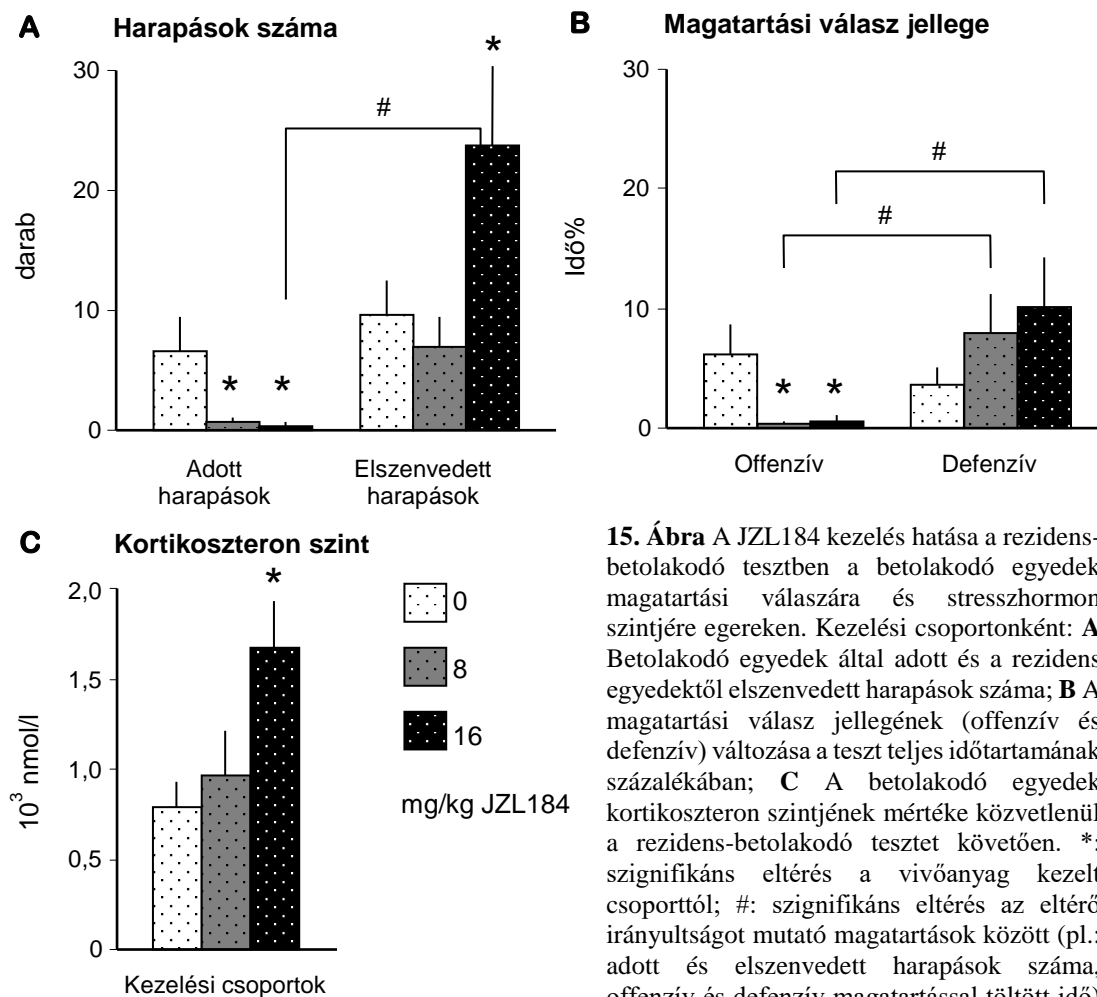
A 3. kísérletben a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens egerek JZL184 kezelése szignifikáns hatást fejtett ki a kezelt egyedek harapásszámára ( $F_{\text{kezelés*harapás irányultsága}}(2, 27)=5,94; p=0,007$ ) (14A. ábra). A JZL184 kezelés 16 mg/kg dózisban szignifikánsan csökkentette a betolakodó egyedek célzó harapások számát, míg az elszennvedett harapások száma megnőtt. A rezidens egyedek által mutatott magatartási válasz jellege is megváltozott a JZL184 kezelés hatására ( $F_{\text{kezelés*magatartás természete}}(2, 27)=3,41; p=0,047$ ) (14B. ábra). Az offenzív magatartással töltött idő szignifikánsan csökkent 16 mg/kg dózisú JZL184 kezelés hatására, azonban a defenzív magatartásra a kezelésnek nem volt hatása. A vivőanyag kezelt kontroll egyedek szignifikánsan több időt töltöttek offenzív, mint defenzív magatartással. Ezen időtartambéli eltérés az offenzív és defenzív magatartás között a JZL184 kezelés hatására megszűnt. A JZL184 kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a kortikoszteron szint mértékére ( $F_{\text{kezelés}}(2,27)=2,93; p>0,07$ ) (14C. ábra).



IV.2.2. A MAGL enzim szisztémás gátlása által fokozott 2-AG jelátvitel hatása a rezidens-betolakodó testben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

A 4. kísérletben a JZL184-gyel kezelt betolakodó egyedek harapásszámára a rezidens-betolakodó testben a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ( $F_{\text{kezelés} \times \text{harapás}} \text{ irányultsága}(2,25)=4,29$ ;  $p=0,025$ ) (15A. ábra). Továbbá a JZL184 kezelés a betolakodó egyedek magatartási válaszána jellegét is szignifikánsan befolyásolta ( $F_{\text{kezelés} \times \text{magatartás}} \text{ természet}(2,27)=3,41$ ;  $p=0,047$ ) (15B. ábra). A JZL184-kezelt betolakodó egyedek szignifikánsan több harapást szenvedtek el és defenzív magatartással töltött idő is szignifikánsan megnőtt esetükben. A betolakodó egerek kortikoszteron szintje JZL184 kezelés hatására szignifikánsan megnőtt az agresszív konfliktus során a vivőanyagkezelt csoporthoz hasonlítva ( $F_{\text{kezelés}}(2, 24)=4,51$ ;  $p=0,02$ ) (15C. ábra), mely hatás a rezidens

egyedek esetén nem jelentkezett (lsd. 3. kísérlet). A kezelés hatására a betolakodó egyedek magatartása egyértelműen defenzív irányba tolódott.



**15. Ábra** A JZL184 kezelés hatása a rezidens-betolakodó testben a betolakodó egyedek magatartási válaszára és stresszhormon szintjére egereken. Kezelési csoportonként: **A** Betolakodó egyedek által adott és a rezidens egyedektől elszenvedett harapások száma; **B** A magatartási válasz jellegének (offenzív és defenzív) változása a teszt teljes időtartamának százalékában; **C** A betolakodó egyedek kortikoszteron szintjének mértéke közvetlenül a rezidens-betolakodó tesztet követően. \*: szignifikáns eltérés a vivőanyag kezelt csoporttól; #: szignifikáns eltérés az eltérő irányultságot mutató magatartások között (pl.: adott és elszenvedett harapások száma, offenzív és defenzív magatartással töltött idő) ( $p < 0,05$ ).

IV.2.3. A MAGL enzim és a kortikoszteron szintézis egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó testben a fajtárs territóriumára betolakodó CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

Az 5. kísérletben a 30 mg/kg dózisban alkalmazott metirapon kezelés önmagában és 16 mg/kg dózisban adott JZL184 kezeléssel együttesen egyaránt szignifikánsan csökkentette a vérplazma kortikoszteron szintjét a vivőanyag kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva (adatok és statisztika a 8. táblázatban). A metirapon, a JZL184 kezelés és kombinációjuk egyaránt szignifikánsan csökkentették az adott harapások számát és e kezelési csoportokban nőtt az elszenvedett harapások száma. Továbbá mindhárom kezelési

csoportban szignifikánsan csökkent az offenzív magatartással töltött idő mennyisége. Érdekes módon a defenzivitást a metirapon és a JZL184 kezelés önmagában fokozta, e hatás azonban a kombinált kezelés esetén nem jelentkezett.

**8. Táblázat** A metirapon és a JZL184 kezelés hatása a fajtárs territóriumára betolakodó egyedek magatartási válaszára a rezidens-betolakodó tesztben egereken. Varianciaanalízis: 1. faktor: JZL184 kezelés; 2. faktor: metirapon kezelés; 3. ismételt méréses faktor: magatartás típusa. \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól (vivőanyag + vivőanyag kezelt csoport); #: szignifikáns eltérés az adott és az elszenvedett harapások száma, ill. az offenzív és defenzív magatartással töltött idő között ( $p < 0,05$ ).

Kezelés		Harapások (db)		Magatartási válasz jellege (idő%)		Kortikoszteron szint (nmol/l)
1.	2.	Adott	Elszenvedett	Offenzív	Defenzív	
Vivőanyag	Vivőanyag	6,60±2,91	9,70±2,77	6,11±2,65	3,54±1,55	783,9±144,5
Vivőanyag	Metirapon 30 mg/kg	1,10*±0,62	18,30#±2,95	0,66*±0,66	9,60#±3,00	438,0*±32,5
JZL184 16 mg/kg	Vivőanyag	0,33*±0,33	23,78#±8,18	0,52*±0,50	10,20#±4,04	1670,5*±258,3
JZL184 16 mg/kg	Metirapon 30 mg/kg	0,30*±0,21	14,90#±4,97	0,00*±0,00	4,71±2,21	446,2*±33,9
F <sub>interakció</sub> (1,35)		5,09		6,41		10,07
p		0,03		0,015		0,003

IV.2.4. A MAGL enzim működésének és a CB<sub>1</sub>R egyidejű szisztémás gátlásának hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens CD1 egerek agressziójára és stressztengely aktivitására

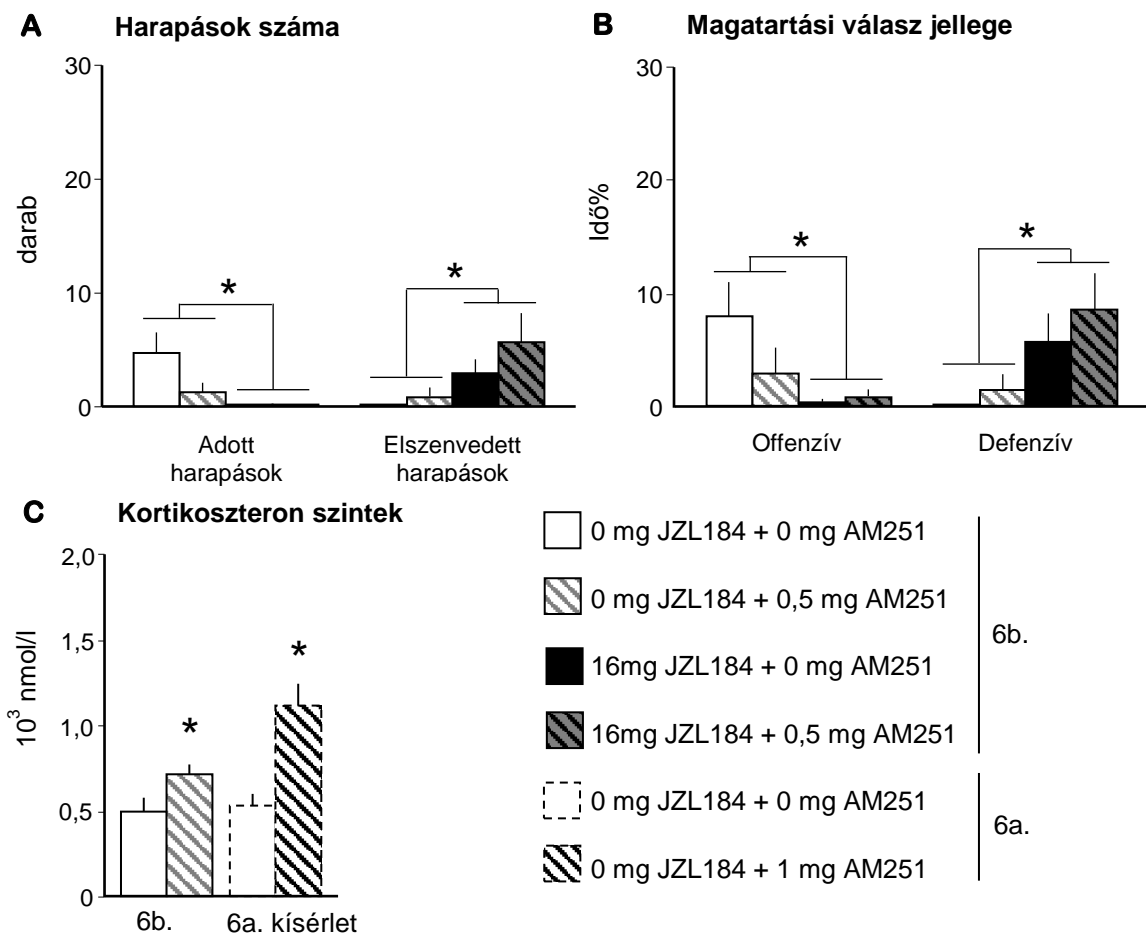
Az 6a. kísérletben a CB<sub>1</sub>R antagonistá AM251 1mg/kg dózisban a rezidens egyedek agresszív magatartását önmagában szignifikánsan befolyásolta: csökkentette a harapások számát és az offenzív magatartással töltött időt. Ezen agresszió csökkentő hatás JZL184 önálló ill. AM251-gyel együtt történő beadásakor is jelentkezett (adatok és statisztika a 9. táblázatban).

**9. Táblázat** A JZL184 és az AM251 (1 mg/kg) kezelés hatása a rezidensek magatartási válaszára a rezidens-betolakodó tesztben egereken. Varianciaanalízis: 1. faktor: JZL184 kezelés; 2. faktor: AM251 kezelés; 3. ismételt mérés faktor: magatartás típusa. \*: szignifikáns eltérés a kontrolltól (vivőanyag + vivőanyag kezelt csoport); #: szignifikáns eltérés az adott és az elszenvedett harapások száma, ill. az offenzív és defenzív magatartással töltött idő között ( $p < 0,05$ ).

Kezelés		Harapások (db)		Magatartási válasz jellege (idő%)	
1.	2.	Adott	Elszenvedett	Offenzív	Defenzív
Vivőanyag	Vivőanyag	6,75 ±1,71	0,62 <sup>#</sup> ±0,49	13,62 ±3,63	0,1 <sup>#</sup> ±0,1
Vivőanyag	AM251 1 mg/kg	1,00* ±0,60	2,44 ±1,65	4,61* ±2,05	0,98 ±1,30
JZL184 16 mg/kg	Vivőanyag	0,75* ±0,49	0,0 ±0,00	1,31* ±0,75	0,03 ±0,03
JZL184 16 mg/kg	AM251 1 mg/kg	1,00* ±0,78	0,00 ±0,00	2,37* ±1,64	0,01 ±0,01
F <sub>interakció</sub> (1, 33)		7,79		5,92	
p		0,009		0,02	

Az 6b. kísérletben az AM251 0,5 mg/kg dózisban sem önmagában (harapások száma:  $F_{AM251}(1, 34)=0,1$ ;  $p > 0,9$ ); magatartási válasz jellege:  $F_{AM251}(1, 34)$ ;  $p > 0,9$ ) sem más faktorokkal interakcióban (harapások száma:  $F_{AM251*JZL184}(1,34)=1,95$ ;  $p=0,17$ ; magatartási válasz jellege:  $F_{AM251*JZL184}(1,34)=1,35$ ;  $p > 0,25$ ; harapások irányultsága:  $F_{AM251*JZL184*harapás\ irányultsága}(1,34)=0,26$ ;  $p=0,61$ ; magatartási válasz típusa:  $F_{AM251*JZL184*magatartási\ válasz\ jellege}(1,34)=0,51$ ;  $p > 0,47$ ) nem befolyásolta az egyedek magatartását (16. ábra). Azonban szignifikáns interakció figyelhető meg a JZL184 kezelés és a harapások irányultsága ( $F_{JZL184*harapás\ irányultsága}(1,34)=14,32$ ;  $p=0,005$ ) valamint a magatartási válasz jellege között ( $F_{JZL184*magatartási\ természet}(1,34)=15,35$ ;  $p > 0,0004$ ) (16A. és 16B. ábra). A post-hoc analízisek szerint a JZL184 kezelés hatására a rezidens egyedek által adott harapások száma és az offenzív magatartással töltött idő szignifikánsan csökkent, míg az elszenvedett harapások száma és a defenzív magatartással töltött idő mennyisége nőtt. Az 6a. és 6b. kísérletekben a 0,5 mg/kg ( $F_{AM251}(1, 34)=4,57$ ;  $p < 0,04$ ) ill. 1 mg/kg AM251 kezelés ( $F_{AM251}(1, 30)=11,10$ ;  $p < 0,003$ ) egyaránt szignifikánsan megemelte a kortikoszteron szintet (16C. ábra).



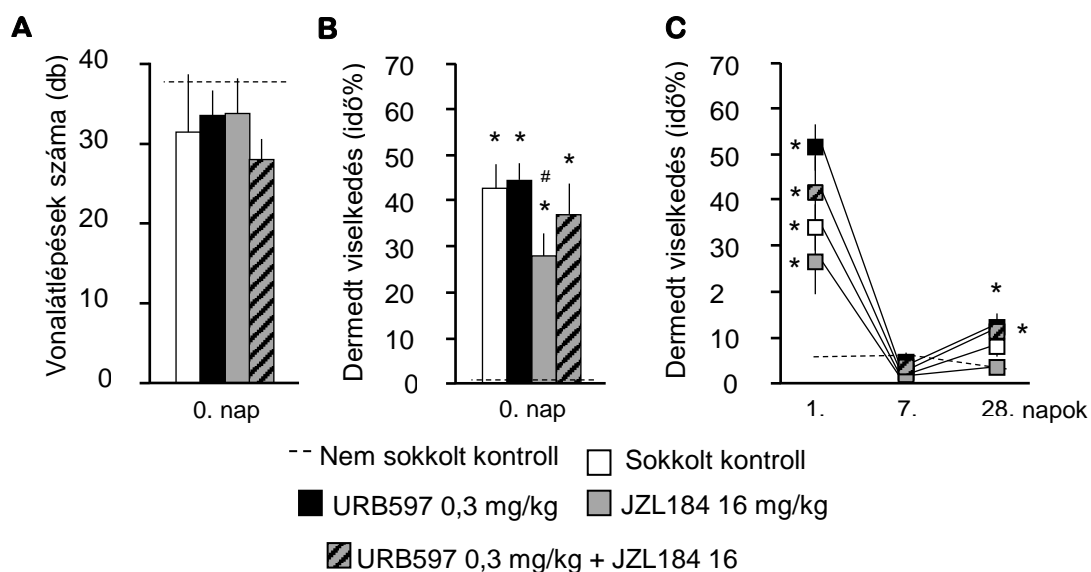


**16. Ábra** A JZL184 (16 mg/kg) és az AM251 (0,5 és 1 mg/kg) kezelés önálló és együttes hatása a rezidens-betolakodó tesztben a rezidens egyedek magatartási válaszára és stresszhormon szintjére egereken. Kezelési csoportonként: **A** Rezidens egyedek által adott és a betolakodó egyedektől elszenvedett harapások száma; **B** A magatartási válasz jellegének (offenzív és defenzív) változása a teszt teljes időtartamának százalékában; **C** A rezidens egyedek kortikoszteron szintjének mértéke közvetlenül a rezidens-betolakodó tesztet követően az 6a. és 6b. kísérletekben. \*: szignifikáns eltérés a vivőanyag kezelt kontrolltól ( $p < 0,05$ ).

### IV.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon

#### IV.3.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

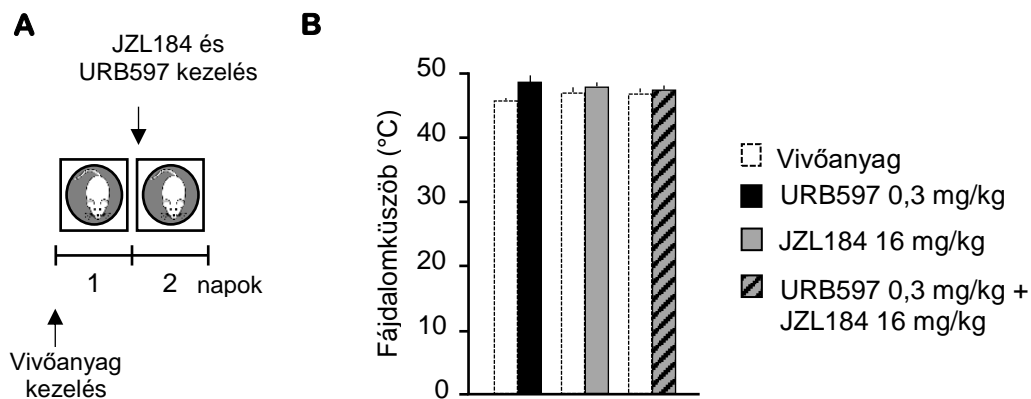
A 7. kísérletben a szisztémásan, a kondicionálást megelőzően adott FAAH gátló URB597 és az MAGL gátló JZL184 a teszt első 3 percében, az első sokkot megelőző habituációs időszakban, nem volt hatással a vonaltalépések számára ( $F(4,43)=1,82$ ;  $p=0,14$ ), tehát nem befolyásolta az állatok lokomotoros aktivitását (17A. ábra). A dermedt viselkedéssel töltött idő mennyiségére mind a kondicionálás, mind a kontextuális emlékeztetők során a kezelés szignifikáns hatást fejtett ki ( $F_{\text{kezelés}}(4, 38)=10,55$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{napok}}(8, 302)=64,7178$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{kezelési csoport*napok}}(32, 304)=6,91$ ;  $p<0,01$ ). A nem sokkolt kontrollokhoz viszonyítva minden kísérleti csoport szignifikánsan több időt töltött dermedt viselkedéssel a kondicionálás során, azonban a JZL184 kezelt csoport szignifikánsan csökkent akut félelmi választ mutatott a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva (17B. ábra). A JZL184 e hatása az egyidejűleg adott URB597 kezelés mellett nem jött létre. A dermedt viselkedéssel töltött idő az első kontextuális emlékeztető során minden kísérleti csoportban szignifikánsan magasabb volt a nem sokkolt kontrollokhoz viszonyítva, mely esetben egyik farmakológiai kezelés nem fejtett ki szignifikáns hatást (17C. ábra). A 7. kontextuális emlékeztetőre minden kezelési csoport dermedt viselkedéssel töltött ideje a nem sokkolt kontroll egyedek által mutatott szintre tért vissza. A kondicionálást követő 28. napon történt kontextuális emlékeztető során az URB597 és az URB597+JZL184 kezelt csoport a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan több időt töltött dermedt viselkedéssel. E hatás azonban nem jelentkezett a sokkolt kontroll egyedekkel összehasonlításban (17C. ábra).



**17. Ábra** A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlásának hatása az akut félelmi válasza és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben. **A** Vonallátlépések száma a kondicionálás napján a habituációs időszakban; **B** Dermedt viselkedéssel töltött idő a kondicionálás során; **C** Dermedt viselkedéssel töltött idő az 1., a 7. és a 28. napi kontextuális emlékeztetők során. \*: szignifikáns eltérés a nem sokkolt kontrolltól; #: szignifikáns eltérés a sokkolt kontrolltól ( $p < 0,05$ )

#### IV.3.2. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása a fájdalomküszöbre a forró lap tesztben Wistar patkányokon

A 8. kísérletben a fájdalomküszöb a 2. kísérleti napra kis mértékben nőtt az 1. naphoz képest ( $F_{\text{napok}}(1, 19) = 8,38$ ;  $p < 0,01$ ), de a farmakológiai kezelések nem fejtettek ki szignifikáns hatást a fájdalomküszöbre ( $F_{\text{kezelési csoport}}(2, 19) = 0,08$ ;  $p = 0,92$ ;  $F_{\text{kezelési csoport} * \text{napok}}(2, 19) = 2,1$ ;  $p = 0,15$ ), nem bírtak fájdalomcsillapító hatással (18. ábra).



**18. Ábra** A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlásának hatása a fájdalomküszöbre a forró lap testben. **A** Kísérleti elrendezés; **B** fájdalomküszöb a forró lap testben vivőanyag, URB597 és JZL184 kezelések esetén.

IV.3.3. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a prelimbikus kéregben az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem testben Wistar patkányokon

A 9. kísérletben lokálisan, bilaterálisan, a kondicionálást megelőzően a PrL-be beadott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időt a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikánsan befolyásolta ( $F_{\text{kezelés}}(4, 26)=6,44$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{napok}}(8, 208)=46,29$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{kezelési csoport*napok}}(32, 208)=5,72$ ;  $p<0,01$ ). A kondicionálás alatt a sokk hatására minden kezelési csoport dermedt viselkedéssel töltött ideje szignifikánsan magasabb volt a nem sokkolt kontroll csoporttal összehasonlítva (19B. ábra). A kezelések nem fejtettek ki hatást a kondicionálás során a dermedt magatartásra. Az első kontextuális emlékeztető folyamán a nem sokkolt kontrollhoz viszonyítva minden kezelési csoport szignifikánsan több időt töltött dermedt viselkedéssel, de a farmakológiai kezelés ebben az esetben sem volt hatással a félelem specifikus magatartási válaszra (19C. ábra). A 7. kontextuális emlékeztető során az URB597 kezelésen átesett csoport a nem sokkolt és a sokkolt kontroll csoportokhoz viszonyítva egyaránt több időt töltött dermedt viselkedéssel, a JZL184 önmagában adagolva ilyen hatást nem mutatott, míg szimultán kezelés esetén eltörölte az URB597 hatását (19C. ábra). A dermedt viselkedéssel töltött idő szignifikánsan magasabb maradt a 28. napi kontextuális emlékeztető során is az URB597-kezelt csoportban a nem sokkolt és sokkolt kontroll csoportokhoz viszonyítva. Szignifikáns hatás más kezelési csoportokban

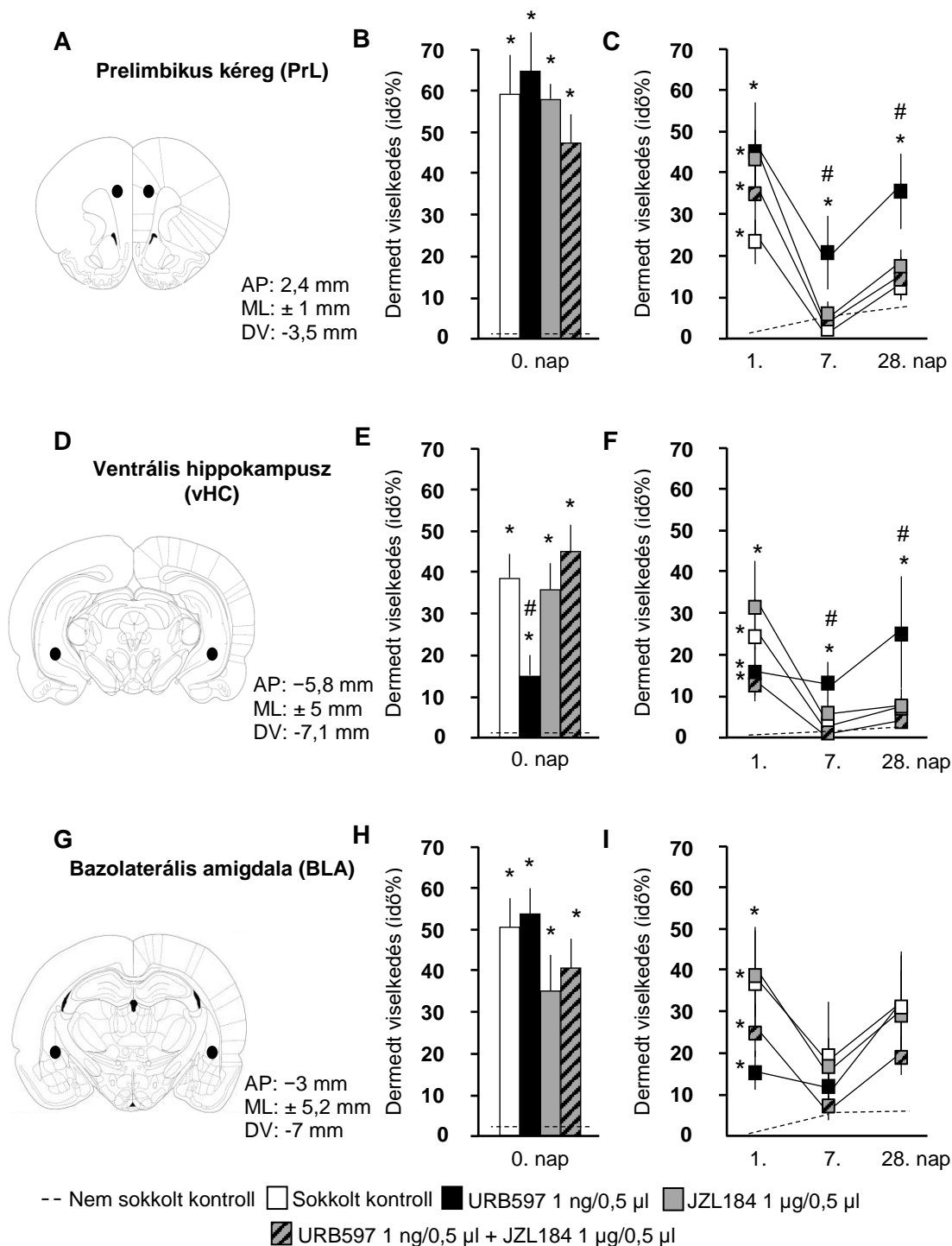
nem jelentkezett a 28. napon, de érdekes módon a URB597 hatása a JZL184-gyel történő egyidejű kezelés esetén ekkor sem jelentkezett. (19C. ábra).

IV.3.4. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a ventrális hippokampuszban az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 10. kísérletben lokálisan, bilaterálisan, a kondicionálást megelőzően a vHC-ba adott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időre a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikáns hatást fejtett ki ( $F_{\text{kezelés}}(4, 20)=5,33$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{napok}}(8, 160)=14,34$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{kezelési csoport*napok}}(32, 160)=4,34$ ;  $p<0,01$ ). A kondicionálás során minden kezelési csoportban szignifikánsan megnőtt a dermedt viselkedéssel töltött idő a nem sokkolt kontrollokhoz viszonyítva. Azonban az URB597 kezelés hatására az akut félelmi válasz a sokkolt kontrollal összevetve szignifikánsan csökkent (19E. ábra). Az URB597 ilyen jellegű hatását kombinált kezelés esetén a JZL184 eltörölte, mely önmagában nem gyakorolt hatást a dermedt viselkedésre a kondicionálás során. Az első kontextuális emlékeztető során minden kezelési csoport szignifikánsan több időt töltött dermedt viselkedéssel, mint a nem sokkolt kontroll csoport, de a farmakológiai kezelések egyike sem mutatott hatást a félelmi válaszra ebben az időpontban (19F. ábra). A 7. kontextuális emlékeztető folyamán az URB597-tel kezelt csoport kivételével egyik kezelési csoport sem mutatott szignifikáns különbséget a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva. Az URB597 kezeléssel átesett csoport a nem sokkolt kontroll csoport mellett, a sokkolt kontroll csoporttól is szignifikánsan különbözött. Érdekes módon, kombinált kezelés esetén a JZL184 meggátolta az URB597 ezirányú hatását (19F. ábra). A dermedt viselkedéssel töltött idő az URB597-kezelt csoportban 28 nappal a kondicionálást követően is fokozottan jelentkezett, ezen állatok szignifikánsan több ideig mutattak félelmi választ, mint a nem sokkolt és a sokkolt kontroll egyedek (19F. ábra). A kondicionálást megelőzően adott URB597 hatását a szimultán adott JZL184 ebben az esetben is elmosta.

IV.3.5. A FAAH és MAGL enzimek gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása lokálisan a bazolaterális amigdalában az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 11. kísérletben lokálisan, bilaterálisan, a kondicionálást megelőzően a BLA-ba adott JZL184 és URB597 kezelés a dermedt viselkedéssel töltött időre a kondicionálás és a kontextuális emlékeztetők során szignifikáns hatást fejtett ki ( $F_{\text{kezelés}}(4, 22)=6,23$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{napok}}(8, 176)=9,95$ ;  $p<0,01$ ;  $F_{\text{kezelési csoport}*\text{napok}}(32, 176)=1,73$ ;  $p=0,01$ ). A post-hoc összehasonlítások szerint a kondicionálás és az első kontextuális emlékeztető során minden kezelési csoport szignifikánsan többet töltött dermedt viselkedéssel a teszt folyamán, mint a nem sokkolt kontroll csoport (19H. ábra). Az elektromos sokkot követő 7. és a 28. napokon történt kontextuális emlékeztető során már egyetlen csoport sem különbözött szignifikánsan a nem sokkolt kontroll csoporttól (19I. ábra). A farmakológiai kezeléseknek sem kondicionálás, sem a kontextuális emlékeztetők folyamán nem volt szignifikáns hatása a félelmi válaszra a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva (19I. ábra).



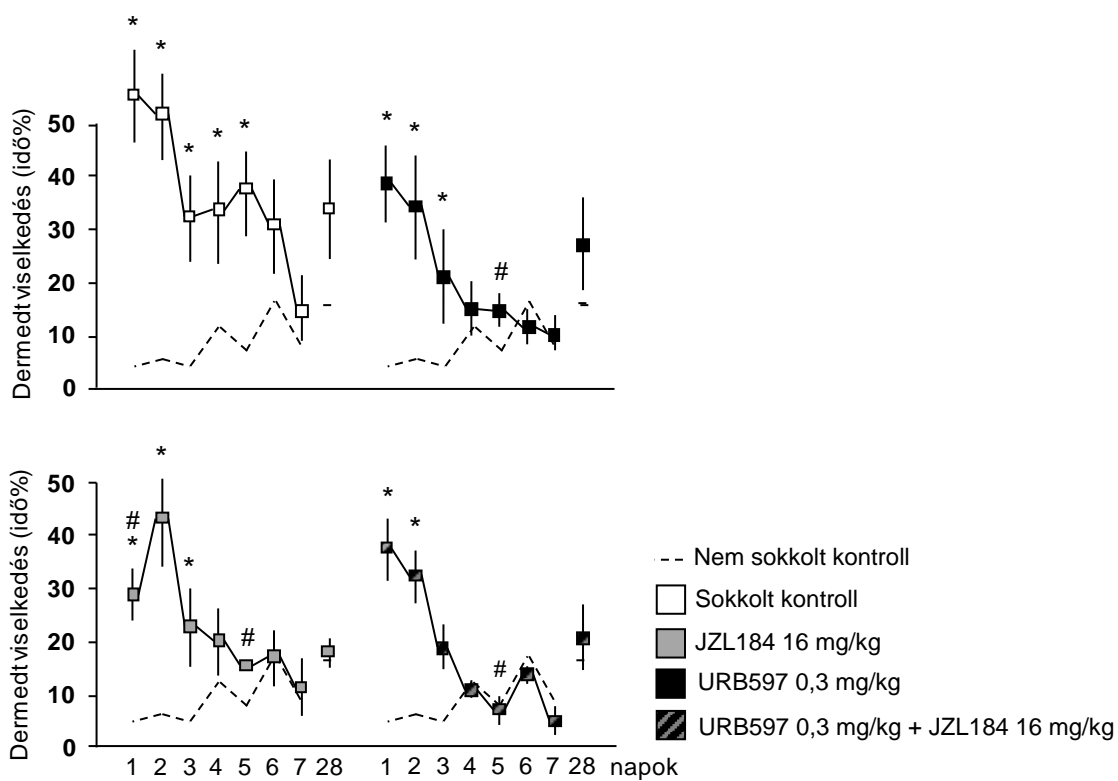
**19. Ábra** A FAAH és MAGL enzimek lokális gátlásának hatása a prelimbikus kéregben, a ventrális hippokampuszban és a bazolaterális amigdalában az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára a kondicionált félelem tesztben. Agyterületenként: **A, D, G** Lokális beadások referencia koordinátái: AP, antero-posterior a bregmától; ML, medio-laterálisan a szagittális koponyavarrattól; DV, dorzo-ventrálisan a koponyacsont felszínétől; **B, E, H** Dermten viselkedéssel töltött idő a kondicionálás során; **C, F, I** Dermten viselkedéssel töltött idő a kontextuális emlékeztetők 1., 7. és 28. napján. \*: szignifikáns különbség a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva; #: szignifikáns különbség a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon

IV.4.1. A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlása által kiváltott fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása traumatikus emlék kioltódására a kondicionált félelem tesztben Wistar patkányokon

A 12. kísérletben szisztémásan, az első kontextuális emlékeztetőt megelőzően adott JZL184 és URB597 kezelés szignifikáns hatással volt a kontextuális emlékeztetők során mutatott dermedt viselkedésre ( $F_{\text{kezelés}}(4, 42)=7,57; p<0,01; F_{\text{napok}}(8, 336)=23,35; p<0,01; F_{\text{kezelés*napok}}(32, 336)=4,94; p<0,01$ ). A félelmi kondicionálás minden kezelési csoportban szignifikánsan megnövelte a dermedt viselkedéssel töltött időt az első kontextuális emlékeztető napján a nem sokkolt kontrollhoz viszonyítva. Továbbá e teszt nap folyamán a JZL184-gyel kezelt csoport szignifikánsan kevesebb félelmi választ mutatott a sokkolt csoporttal összehasonlítva (20. ábra). A sokkolt kontrolltól való szignifikáns eltérés nem jelentkezett sem az URB597 kezelés hatására, sem a kombinált kezelés esetén. Tehát az URB597 kezelés meggátolta a JZL184 kezelés félelmi választ csökkentő hatását az első kontextuális emlékeztető során. A sokkolt kontroll csoport dermedt viselkedéssel töltött ideje a 6. kontextuális emlékeztető napján már nem különbözött szignifikánsan a nem sokkolt kontroll csoporttól. A JZL184 és az URB597 kezelt csoportok esetén a szignifikáns különbség a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva már a 4., kombinált kezelés esetén a 3. kontextuális emlékeztető során megszűnt. Tehát mindhárom kezelési csoport esetén a traumatikus emlék kioltódása gyorsabban végbement. Hét és 28 nappal a kondicionálást követően egyik kezelési csoport sem mutatott szignifikáns különbséget a félelmi válasz tekintetében sem a nem sokkolt, sem a sokkolt kontroll csoportokkal összehasonlításban (20. ábra).





**20. Ábra** A FAAH és MAGL enzimek szisztémás gátlásának hatása traumatikus memória kioltódására a kondicionált félelem tesztben \*: szignifikáns különbség a nem sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva; #: szignifikáns különbség a sokkolt kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ).

## V. Megbeszélés

### V.1. A szisztémásan fokozott anandamid jelátvitel hatása a megküzdési stratégiára és a félelmi válaszra egereken

Munkánk első szakaszában egereken tanulmányoztuk a hátrafordítás tesztben az URB597 által fokozott AEA jelátvitel szerepét a megküzdési stratégiák szabályozásában. Az első és a második teszt napok között, egyedi szinten a megküzdési stratégiák konzisztensen jelentek meg, melyet a vivőanyag kezelés nem befolyásolt és az irodalomban is bemutatott bimodális eloszlást mutattak (275, 285). A 2. teszt napon passzív megküzdési stratégiát mutató egyedek a 3. teszt napon az URB597 kezelés által kiváltott fokozott AEA jelátvitel hatására aktív megküzdési stratégiát mutattak, míg a kezelés a kevert, illetve aktív megküzdési stratégiát mutató egyedek magatartását nem befolyásolta. Egy averzívabb környezeti kihívás, az elektromos sokk esetében az URB597 kezelés a sokkok közti intervallumokban csökkentette a rágcsálókra specifikus félelmi választ, a dermedt viselkedéssel töltött idő hosszát, illetve fokozta a rács explorációjával töltött időt, mely hatás az akut félelmi válasz csökkenésének és az aktív megküzdési stratégia megjelenésének tekinthető. A kondicionálást 14 nappal követő kontextuális emlékeztető során a félelmi választ a kezelés nem befolyásolta.

Eredményeink alapján mindkét teszt esetén a fokozott AEA jelátvitel az aktív (proaktív) megküzdési stratégia megjelenését eredményezte: növelte a menekülési kísérletekkel töltött időt a hátrafordítás tesztben, illetve csökkentette a dermedt viselkedéssel töltött időt az elektromos sokkok közötti időintervallumokban a félelmi kondicionálás során. A hátrafordítás tesztben e hatás kizárólag a korábban passzív (reaktív) stratégiát gyakorló egyedek esetén jelentkezett. Ezzel szemben a kondicionálás során mutatott akut félelmi válasz minden URB597 kezeléssel átesett egyed esetén általánosan csökkent. E jelenségért a két teszt eltérő intenzitású averzivitása lehet felelős: míg a hátrafordítás teszt 1 perc időtartamú és nem jár fájdalommal (az alanyokat fixen tartjuk, de fájdalmat nem okozunk), addig a félelmi kondicionálás ötször ilyen hosszú és a 3 mA áramerősségű sokk fájdalmat okoz. Hasonló, a környezet averzivitásától függő endokannabinoid jelátvitelhez kötött hatásra az irodalomban több példát is találunk (266,

267). Eredményeink, melyek szerint a fokozott AEA jelátvitel az aktív megküzdési stratégia felé tolja el az egyedek magatartását, egybevágnak csoportunk korábbi, saját eredményeivel, valamint más csoportok által publikált megfigyelésekkel (267, 274, 284, 291, 352). Vizsgálatunk nem terjedt ki arra, hogy a fokozott AEA jelátvitel hatására kialakuló proaktív megküzdési stratégia, mely receptor(ok) szignalizációjához kötött jön létre, azonban csoportunk egy korábbi vizsgálatában a URB597 megküzdési stratégiára gyakorolt hatása CB<sub>1</sub>R antagonistával gátolható volt (274). Ezért a vizsgálatunkban mért hatások nagy valószínűséggel elsődlegesen a CB<sub>1</sub>R-on keresztül valósultak meg. Ugyanakkor szükséges megemlíteni, hogy az AEA a CB<sub>1</sub>R mellett a CB<sub>2</sub>R, TRPV1, GPR55, GPR18 receptoroknak egyaránt agonistája, ezért a jövőbeni vizsgálatokat ezt szem előtt tartva szükséges megtervezni (153, 156-158). Vizsgálataink ebben az esetben nem terjedtek ki az AEA hatásának anatómiai lokalizálására, azonban irodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a vmPFC-ben, a CeA-ban ill a BLA-ban zajló AEA jelátvitelnek lehet elsődleges szerepe a proaktív megküzdési stratégia kialakításában (283, 284, 353-355).

Eredményeink megerősítik, hogy az endokannabinoid jelátvitel nem egy specifikus magatartás megjelenéséért felel, sokkal inkább a környezetből érkező ingerekre adott válaszok jellegét befolyásolja: averzív környezeti kondíciók esetén az AEA jelátvitel az aktív (proaktív) megküzdési stratégia kiváltásáért felelős, de a stratégiának minden egyedre kiterjedő, általános megváltozása az averzív környezeti inger intenzitásától is függ.

## V.2. A szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatása a magatartási válaszra agresszív interakcióban egereken

A territoriális agressziót vizsgáló rezidens-betolakodó tesztben a JZL184 kezelés által fokozott 2-AG jelátvitel mind a rezidens, mind a betolakodó egyedek esetén drasztikusan csökkentette az agresszív magatartást. A JZL184 kezelt csoport által adott harapások száma és az offenzív magatartással töltött ideje, a tesztben betöltött szerepétől (rezidens vagy betolakodó) függetlenül csökkent, míg az elszenvedett harapások száma nőtt. A fokozott 2-AG jelátvitel a rezidens egyedek defenzív magatartással töltött idejére nem volt hatással, de a betolakodó egyedek esetén a defenzivitás fokozódott. A rezidens

egyedek kortikoszteron szintje a kezelés hatására nem növekedett, míg a betolakodó egyedek stressztengely aktivitása szignifikánsan fokozódott. A metirapon, a JZL184 kezelés és ezek kombinációja a betolakodó egyedekben egyaránt csökkentették az adott harapások számát és az offenzív magatartással töltött időt. Továbbá a defenzivitást a metirapon és a JZL184 kezelés önmagában fokozta, de a kombinált kezelés esetén e hatás nem jelentkezett. A CB<sub>1</sub>R antagonistá AM251 önmagában kizárólag 1 mg/kg dózisban váltott ki agresszió csökkentő hatást a rezidens alanyokban, míg a JZL184 önállóan, ill. mindkét dózisban alkalmazott AM251 mellett egyaránt csökkentette a rezidensek agresszióját. A CB<sub>1</sub>R antagonistá kezelés mindkét alkalmazott dózisban a kortikoszteron szint emelkedését váltotta ki. Eredményeink alapján a JZL184 kezelés hatására fokozódott 2-AG jelátvitel feltehetőleg nem CB<sub>1</sub>R-on keresztül fejt ki agresszió csökkentő hatását.

Az irodalomban rendelkezésünkre álló csekély információ alapján a  $\Delta^9$ - és  $\Delta^1$ -THC egyaránt csökkenti az agressziót, míg a CB<sub>1</sub>R gén kiütése fokozott offenzív agressziót eredményez (286-288). Eredményeink szerint az endokannabinoid rendszer aktiválódását követő csökkent agresszivitás kialakításáért a két eCB közül a 2-AG felelős, melyet megerősítenek az AEA szerepét a szociális magatartás szabályozásában igazoló, de az agresszió szabályozásában cáfoló közlemények (218, 289, 290). A fokozott 2-AG jelátvitel magatartási hatásai irodalmi adatok és laboratóriumunk saját eredményi alapján kontextus függő módon jelentkeztek nem szociális tesztekben (263, 268, 269). A rezidens-betolakodó teszt a territóriumukat védő rezidensek ill. a betolakodó egyedek perspektívájából nézve eltérő kontextust jelent. Ezért kiemelten fontos, hogy a rezidens-betolakodó tesztben a JZL184 kezelés, mind a rezidensek, mint a betolakodók agresszióját csökkentette. Egy, a közelmúltban megjelent közlemény szintén a fokozott 2-AG jelátvitel agressziót csökkentő hatását támasztja alá (293): az MJN110-zel kiváltott MAGL enzim gátlás hatására a szociális interakció tesztben, az anyától való elválasztást követően szociálisan izoláltan tartott egyedek fokozott agressziója a szociálisan tartott egyedek szintjére csökkent.

Csoportunk korábbi eredményei alapján a JZL184 kezelés hatására fokozódik a kortikoszteron szekréció, mely önmagában is képes befolyásolni az agresszív magatartást

(268, 356). Kísérletünkben a JZL184 kezelés kizárólag a betolakodó egyedek esetén eredményezett megemelkedett kortikoszteron szintet. A betolakodó egyedek által adott és elszüvedett harapások száma és offenzív magatartással töltött ideje JZL184 és kortikoszteron szintézis gátló metirapon kezelést követően, ill. a kettő kombinált adása esetén is szignifikánsan csökkent. Érdekes módon a defenzivitásra a kombinált kezelésnek nem volt hatása, de önállóan a JZL184 és a metirapon a defenzív magatartással töltött idő mennyiségét fokozta. Fentiekből következően minden kísérleti csoport esetén a JZL184 kezelés hatására megváltozott harapásszám és csökkent offenzív magatartás a kortikoszteron szint változástól függetlenül jöhetett létre. Egyrészt e változások iránya a rezidens és betolakodó egyedek esetén azonos irányúak voltak, míg a kortikoszteron szint csak a betolakodó egyedekben emelkedett meg. Másrészt a kombinált JZL184 és metirapon kezelés egyaránt ebbe az irányba tolta el a betolakodók magatartását a harapásszámok és az offenzivitás tekintetében. Ezzel szemben a betolakodó egyedek defenzív magatartással töltött ideje legalábbis részben a megemelkedett kortikoszteron szint eredményeként jöhetett létre. Ezt alátámasztja, hogy a rezidens egyedek defenzív magatartással töltött idejére a JZL184 kezelés nem volt hatással és a kortikoszteron szint sem emelkedett e kezelési csoportban, továbbá a betolakodó egyedek defenzív magatartással töltött idejére a kombinált JZL184 és metirapon kezelés nem volt hatása, de a két kezelési típus *per se* fokozta a defenzivitást. A JZL184 és a metirapon kezelések háttérében álló molekuláris interakciók, melyek magyarázatul szolgálhatnának e jelenségre jelenleg nem ismertek.

A JZL184 kezelés hatására fokozódott 2-AG jelátvitel feltehetőleg nem CB<sub>1</sub>R-on keresztül fejt ki agressziót csökkentő hatását a rezidens egyedekben. E feltételezést alátámasztja, hogy a kisebb dózisban alkalmazott CB<sub>1</sub>R antagonistá AM251 *per se* nem befolyásolta az agressziót, sem a JZL184 agresszió csökkentő hatását, de a kortikoszteron szintet megemelte, tehát biológiai hatást ekkora dózis alkalmazása is képes volt kiváltani. Ugyanakkor a nagyobb dózisban alkalmazott AM251 önállóan agresszió csökkentő hatást váltott ki, azonban e hatás egyidejű AM251 és JZL184 kezelés esetén is létrejött. A JZL184 által kiváltott fokozott 2-AG jelátvitelnek az agresszív interakciót befolyásoló hatása tehát nem CB<sub>1</sub>R-hoz kötött valósul meg. A 2-AG biológiai hatást a CB<sub>2</sub>R, TRPV1 és GPR55 receptorokon egyaránt képes kifejteni (27, 156, 357), ezért a pontos,

az agresszív magatartás csökkentéséért felelős mechanizmus feltérképezése érdekében a vizsgálatokat e receptorokra is ki kell terjeszteni a jövőben. Fontos továbbá megemlíteni, hogy az AM251 kezelés a központi idegrendszerben az összes elérhető CB<sub>1</sub>R-on kifejti antagonistá hatását, míg a JZL184 kezelés hatására csak ott és akkor fokozódik a 2-AG jelátvitel mikor az a megfelelő biológiai szignálok hatására szintetizálásra kerül. Ezen farmakológiai kezelések jellege miatt, a CB<sub>1</sub>R szerepe nem zárható ki teljes mértékben a 2-AG által kiváltott agresszió csökkentő hatást illetően.

Jelen eredményeink pontosabb képet festenek az eCB rendszer territoriális agresszió szabályozásában betöltött szerepéről, melyek szerint a két eCB közül a 2-AG jelátvitel fokozásával robusztus agressziócsökkentő hatás váltható ki az agresszív interakcióban részt vevő mindkét fél esetén a rezidens-betolakodó tesztben. A fokozott 2-AG jelátvitel a rezidens és betolakodó egyedekben egyaránt csökkenti az offenzivitást, azonban a betolakodó egyedek defenzivitásának növekedése részben a megemelkedett kortikoszteron szint következtében jöhet létre. Az agressziót csökkentő 2-AG hatás azonban feltehetőleg nem a CB<sub>1</sub>R-hoz kötött szignalizáció révén jön létre.

### V.3. A szisztémásan és lokálisan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel, ill. interakciójuk hatása az akut félelmi válaszra és a traumatikus emlék akvizíciójára patkányokon

A kondicionálást megelőzően szisztémásan adott JZL184 által fokozott 2-AG jelátvitel a félelmi kondicionálás során csökkentette az akut félelmi választ, mely hatás az egyidejűleg URB597-tel fokozott AEA jelátvitel mellett nem jelentkezett. Az agyterület specifikus kezeléseket esetén az akut félelmi választ a vHC-ban az URB597 által fokozott AEA jelátvitel csökkentette, mely hatás az egyidejű JZL184 kezelés által fokozott 2-AG jelátvitel mellett nem jött létre. Az akut félelmi válaszra a PrL-ben és a BLA-ban egyik kezelésnek sem volt hatása. A traumatikus memória akvizícióját befolyásoló kezeléseket hosszú távú hatásaira a kontextuális emlékeztetők során mutatott félelmi válasz alapján következtettünk. Tehát ez esetben a fokozott dermedt viselkedéssel töltött idő a félelmi válasz robusztusabb akvizícióját jelzi. A kondicionálást megelőző szisztémás kezelést követően az első kontextuális emlékeztető során egyik kezelési típus sem befolyásolta a félelmi választ. Továbbá egyetlen kezelési típus hosszú távú hatásai

sem jelentkeztek 7 nappal a kondicionálást követően, de fokozott félelmi válasz jött létre 28 nappal később az URB597, illetve a kombinált URB597 és JZL184 kezelt csoportok esetén. Az agyterület specifikus kezeléseknél a traumatikus emlék akvizícióját a PrL-ben és a vHC-ban az URB597 kezelés fokozta. E hatás egy nappal a kondicionálást követően nem volt detektálható, de 7 és 28 nappal a kondicionálást követően a félelmi válasz továbbra is fennmaradt, míg a többi elektromos sokkon átesett kezelési csoportban kioltódott. E két agyterületen az URB597 által fokozott AEA jelátvitel hosszú távú hatását a szimultán, JZL184 kezelés révén fokozott, 2-AG jelátvitel eltörölte. A BLA-ba adott kezeléseknél nem fejtettek ki hatást a traumatikus memória akvizíciójára. A szisztémás kezeléseknél egyik sem fejtett ki motoros vagy fájdalomcsillapító hatást.

A disszertációban korábban bemutatott eredmények alapján a szisztémás URB597 kezelés által fokozott AEA jelátvitel csökkenti a CD1 egerek akut félelmi válaszát (ld.: Eredmények IV.1.2. rész) a félelmi kondicionálás során (358). Ilyen, akut félelmi választ csökkentő hatás patkányok és eltérő kondicionálási protokoll felhasználása esetén a szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel hatására, míg lokálisan a vHC-ban a fokozott AEA jelátvitel hatására jött létre. Érdekes módon a szisztémásan, a kondicionálást megelőzően fokozott 2-AG jelátvitelnek nem volt hosszú távú hatása a félelmi válasz fennmaradására, míg a vHC-ban megmutatkozó akut félelmi válasz csökkenés ellenére a fokozott anandamid jelátvitel hatására a traumatikus memória robusztusan és hosszú távon fennmaradt. Továbbá mindkét esetben a két endokannabinoid jelátvitelének együttes fokozása kioltotta az akut félelmi válaszra gyakorolt 2-AG ill. anandamid hatást. Eredményeink elsőként mutatják be a szisztémásan fokozott 2-AG és a lokálisan a vHC-ban fokozott anandamid jelátvitel ilyen jellegű specifikus hatásait az akut félelmi válaszra. Az irodalomban e jelenséget vizsgáló közlemények jelenleg nem találhatók ezért az idegrendszeri folyamatok feltárása további kísérletek elvégzését teszi szükségessé.

Az AEA kísérletünkben bemutatott akvizíció fokozó hatása összhangban van az irodalmi adatokkal. E hatás URB597 kezelés ill. FAAH génkiütött egyedek esetén is detektálható volt averzív körülmények között a Barnes-labirintus valamint a passzív elkerülés tesztben (359, 360). Az irodalomban ismert memória konszolidációt fokozó, a

prefrontális kéreghez és hippokampuszhoz kötött AEA jelátvitelnek eredményeink szerint az akvizícióban is szerepe van, ill. a szubrégiók közül a PrL és a vHC érintettek (361). A fokozott 2-AG jelátvitel irodalmi adatok szerint nincs hatással az akvizícióra, de fokozza a kondicionált félelem expresszióját és csökkenti a félelmi válasz kioltódását (335, 336). Esetünkben a memória akvizíciójára a fokozott 2-AG jelátvitel önmagában nem volt hatással sem a PrL-ben, sem a vHC-ban, azonban a 2-AG a fokozott AEA jelátvitel hatását eltörölte. A BLA-ban az akvizícióra nem volt hatással egyik kezelési típus sem, azonban irodalmi adatok szerint az AEA jelátvitelnek ezen agyterületen szerepe van az averzív memória kialakításában (361). Az egyes eCB-k szerepét lokálisan a BLA-ban a traumatikus memória akvizíciójában feltételezhetően azért nem sikerült tisztáznunk, mert a BLA-ban egyaránt lokalizálódnak specifikusan a félelmi válasz expressziójáért és gátlásáért felelős idegsejtek (362-365). Az általunk alkalmazott farmakológiai kezelés eltérő funkciójú neuron-populációkat egyaránt elérhetett. Az eCB jelátvitel manipulációjával kapcsolatban ilyen jellegű ellentmondás nem példa nélküli az irodalomban: lokálisan a BLA-ba jutató kezelések a szorongás-szerű magatartás vizsgálatában anxiogénikus és anxiolitikus hatásokat egyaránt kiváltottak (346, 366, 367).

Munkánk során nem vizsgáltuk, hogy a fokozott AEA és 2-AG jelátvitel, ill. interakcióik pontosan, mely receptor(ok)on keresztül érvényesülnek. Jelen ismereteink szerint, ahogy az a diszkusszióban korábban említésre került az AEA és a 2-AG biológiai hatását CB<sub>1</sub>R mellett CB<sub>2</sub>R, TRPV1, GPR55, GPR18 receptorokon is képes kiváltani. Lee és munkatársainak munkája alapján ismerjük, hogy az endokannabinoid és endovanilloid jelátvitel egér hippokampusz CA1 régiójának piramissejtjein a periszomatikus és dendritikus lokalizálódó GABAerg szinapszisokban egymással interakcióban zajlik. Megfigyeléseik szerint a tonikus 2-AG jelátvitel hatékonyságát a preszinaptikus MAGL aktivitás mellett a poszt-szinaptikus TRPV1 receptor és FAAH enzim aktivitása is szabályozza: az AEA jelátvitel a TRPV1 receptor aktivációja révén képes a tonikus 2-AG felszabadulást gátolni (337). CB<sub>1</sub>R pozitív periszomatikus interneuronok a hippokampusz mellett megtalálhatóak a PFC-ben és az amigdalában is (368, 369), ezért az AEA és 2-AG közötti interakciók vizsgálatát a jövőben érdemes a TRPV1 receptor bevonásával végezni. A felsorolt receptorok között kandidáns lehet még a CB<sub>2</sub>R, mely expresszálódik a hippokampuszban és részt vesz a félelmi memória



szabályozásában (370-374). Az endokannabinoidok interakciójának megértését tovább nehezíti, hogy a CB<sub>1</sub>R megtalálható glutamaterg és GABAerg szinapszisokban egyaránt, mely sejtspecifikus manipulációk eltérő magatartási választ eredményeznek (241, 335).

Összességében eredményeink szerint az akut félelmi választ a szisztémásan fokozott 2-AG és a vHC-ban zajló fokozott AEA jelátvitel csökkentette, azonban a szisztémásan, a PrL-ben és vHC-ban fokozott AEA jelátvitel hatására a félelmi válasz még 28 nappal a kondicionálást követően is fennmaradt, tehát fokozta a traumatikus emlék akvizícióját. Vizsgálataink egyik legjelentősebb eredménye, hogy a magatartás szintjén tudtuk detektálni a két eCB közötti interakciót: a kondicionálást megelőzően fokozott AEA jelátvitel hatását összesen 3 vizsgált időpontban törölte el az egyidejűleg fokozott 2-AG jelátvitel: 1.) lokálisan a vHC-ban a kondicionálás során, 2.) a PrL-ben és a 3.) vHC-ban 7 és 28 nappal a kondicionálást követően. Emellett szisztémásan szintén eltörölte a fokozott AEA jelátvitel a 2-AG akut félelmi választ csökkentő hatását. Tudomásunk szerint a két eCB interakcióját a magatartás szintjén más kutatócsoport nem írta még le.

#### V.4. A szisztémásan fokozott anandamid és 2-AG jelátvitel hatása a traumatikus emlék kioltódására patkányokon

Az első kontextuális emlékeztetőt megelőzően szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel az első kontextuális emlékeztető során csökkentette a félelmi választ, mely hatás kialakulását a szimultán fokozott AEA jelátvitel meggátolta. A JZL184, URB597 és a kombinációban adott kezelés esetén a traumatikus emlék kioltódása gyorsabban végbement, mint a sokkolt kontroll csoport esetén. Hét és 28 nappal a kondicionálást követően egyik kezelési csoport sem mutatott szignifikáns különbséget a félelmi válasz tekintetében sem a nem sokkolt, sem a sokkolt kontroll csoportokkal összehasonlításban.

Kísérletünkben a JZL184 kezelés hatására az első kontextuális emlékeztetőben csökkent félelmi válasz ellentmondásban van irodalmi adatokkal, melyek szerint a JZL184 kezelés szisztémásan és lokálisan a BLA-ba adva is fokozza a félelmi válasz expresszióját (335, 336). Irodalmi adatok alapján a kísérletünkben jelentkező JZL184 kezelés hatását a fokozott AEA jelátviteltől várnánk, ugyanis a félelmi válasz

expresszióját az első kontextuális emlékeztető folyamán egyaránt csökkentette a vmPFC-be és a dHC-ba beadott AEA, ill. a szisztémásan beadott URB597 (332, 334, 335). E hatás az általunk végzett kísérletben szisztémás URB597 kezelés esetén nem jelentkezett. Kísérletünkben az első kontextuális emlékeztető során a szimultán fokozott AEA jelátvitel a 2-AG félelmi választ csökkentő hatását eltörölte. A félelmi memória akvizícióját vizsgáló kísérleteinkben ilyen jellegű interakció a szisztémás kezelést követő akut félelmi válaszban jelentkezett (Isd.: Eredmények IV.3.1.). A fokozott AEA és 2-AG jelátvitelnek a traumatikus emlék kioltódását fokozó hatása részben egybevág az irodalmi adatokkal: a szisztémásan vagy a dHC-ban fokozott AEA jelátvitel gyorsította a félelmi válasz kioltódását, míg a fokozott 2-AG jelátvitel szisztémásan és lokálisan a BLA-ban gátolta a kioltódást (319, 334, 336). Érdekes módon a kombinált kezelés esetén a két endokannabinoid szinergisztikusan, egymás hatását erősítve gyorsabb extinkciót eredményezett. Tehát a két endokannabinoid közötti interakció a magatartás szintjén nem kizárólag a másik hatásának gátlása révén jelentkezhet, mint ahogy azt a félelmi memória akvizícióját vizsgáló kísérleteinkben láttuk.

## VI. Következtetések

Doktori munkám során az endokannabinoidok lebontásáért felelős két fő enzim, a FAAH és a MAGL farmakológiai gátlásával kívántam felderíteni az AEA-ra és 2-AG-re specifikus magatartási hatásokat, lehetséges interakcióikat. A disszertációban bemutatott eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A fokozott AEA jelátvitel a proaktív megküzdési stratégia megjelenését propagálja, mely a környezetből érkező averzív ingerek intenzitásától függő módon jelentkezik.
2. A fokozott 2-AG jelátvitel felelős specifikusan a territoriális agressziót csökkentő endokannabinoid hatásokért. Azonban a 2-AG agresszió csökkentő hatása nem a CB<sub>1</sub>R-hoz kötött szignalizáció révén jön létre és a fokozott defenzivitást részben a megemelkedett kortikoszteron szint eredményezi a betolakodó egerekben.
3. Az akut félelmi válasz és félelmi memória kialakításában a fokozott AEA és 2-AG jelátvitel eltérő szerepet tölt be és egymással interakcióban fejtik ki élettani hatásukat.
  - 3.1. Az akut félelmi válasz csökkenéséért szisztémásan specifikusan a 2-AG, míg a vHC-ban az AEA jelátvitel a felelős.
  - 3.2. Az akut félelmi válaszra kifejtett szisztémás 2-AG hatást az AEA, míg a lokális AEA hatást a vHC-ban a 2-AG képes eltörölni.
  - 3.3. A fokozott AEA jelátvitel a PrL-ben és a vHC-ban elősegíti a robusztus, hosszan fennmaradó félelmi memória létrejöttét.
  - 3.4. Az AEA jelátvitel hatását a traumatikus memória hosszútávú fennmaradására a PrL-ben és a vHC-ban a 2-AG képes eltörölni, azonban önmagában e jelenségekre a két agyterületen nem fejt ki hatást.
4. A traumatikus emlék kioltódását a 2-AG, az AEA és a két endokannabinoid együttesen is fokozza. A félelmi válasz expresszióját az első kontextuális emlékeztető során a 2-AG jelátvitel csökkenti, mely hatást az AEA képes megszüntetni.

## VII. Összefoglalás

Az endokannabinoid (eCB) rendszer elemei – a kannabinoid receptorok, a két eCB, az anandamid (AEA) és a 2-archidonoil-glicerin (2-AG) – jelentős mennyiségben vannak jelen az emocionális magatartás szabályozásáért felelős agyterületeken. Jelen ismereteink szerint az eCB jelátvitel a környezeti ingerekre adott magatartási válasz jellegét modulálja és nem egy specifikus magatartási válasz kiváltásáért vagy gátlásáért felel. Doktori munkám célja az AEA és a 2-AG specifikus szerepének, lehetséges interakciójának vizsgálata volt eltérő környezeti kihívásokat reprezentáló tesztekben, vizsgálva a megküzdési stratégiát, az agresszív interakciót, valamint a traumatikus memória akvizícióját és kioltódását. Vizsgálatainkban az eCB AEA és 2-AG jelátvitelét fokoztuk a lebontásukért specifikusan felelős enzimek, a zsírsav-amid-hidroláz és a monoacil-glicerol-lipáz gátlása révén. A fokozott AEA jelátvitel hatására CD1 egerek proaktív megküzdési stratégiát mutattak a hátrafordítás és kondicionált félelem tesztekben. Míg a hátrafordítás tesztben a korábban reaktív megküzdési stratégiát mutató egerek stratégiáját módosította proaktívrá a kezelés, addig a félelmi kondicionálás során a proaktív stratégia általános megjelenése volt megfigyelhető. A territoriális agressziót CD1 egereken vizsgáló rezidens-betolakodó tesztben a fokozott 2-AG jelátvitel a rezidensek és a betolakodók agresszióját egyaránt robusztusan csökkentette. Wistar patkányokon a kondicionált félelem tesztben az akut félelmi választ a szisztémásan fokozott 2-AG jelátvitel és a lokálisan a ventrális hippocampusban (vHC) fokozott AEA jelátvitel csökkentette. Az akut félelmi választ csökkentő hatása ellenére az AEA jelátvitel fokozása lokálisan a vHC-ban és a prelimbikus kéregben is permanens félelmi emléknym kialakulását eredményezte. A 2-AG-nek önmagában e jelenségekre nem volt hatása, de az AEA által kiváltott hatásokat képes volt eltörölni. A traumatikus emlék kioltódását a 2-AG, az AEA és a két endokannabinoid együttesen is fokozza. Összefoglalva, sikerült bebizonyítanunk, hogy a két eCB specifikusan, bizonyos esetekben egymással interakcióban befolyásolja az eltérő környezeti kihívásokat modellező tesztekben megjelenő magatartásformákat. Az AEA a proaktív megküzdési stratégia kialakításában, míg a 2-AG az agresszió csökkentésében játszik szerepet, továbbá az akut félelmi választ, a hosszú távon fennmaradó félelmi memória létrejöttét és kioltódását e két eCB együttesen szabályozza.

## VIII. Summary

Components of the endocannabinoid (eCB) system – the cannabinoid receptors, the two eCBs, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) – are present in significant amounts in brain areas responsible for the regulation of emotional behavior. According to our knowledge, eCB signaling modifies the nature of the behavioral response to environmental stimuli and is not responsible for the induction or inhibition of a specific behavioral response. The aim of my doctoral thesis was to investigate the specific role and possible interaction of AEA and 2-AG in different environmental challenges, studying coping strategies, aggressive interaction, and acquisition and extinction of traumatic memory. In our studies, the signaling of eCB AEA and 2-AG was enhanced by the inhibition of specific enzymes responsible for their degradation: fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase, respectively. As a result of enhanced AEA signaling, CD1 mice showed a proactive coping strategy in the back test and conditioned fear test. Mice that showed previously reactive coping strategy after the treatment behaved proactively in the back test, but during fear conditioning the proactive strategy was observed comprehensively. In the resident-intruder test of territorial aggression enhanced 2-AG signaling drastically reduced the aggression of resident and intruder CD1 mice. In Wistar rats the acute fear response in the conditioned fear test was reduced by systemically enhanced 2-AG signaling and by locally enhanced AEA signaling in the ventral hippocampus (vHC). Despite the effect of reduced acute fear response, enhanced AEA signaling locally in vHC and in the prelimbic cortex resulted the formation of permanent fear memory. 2-AG alone had no effect on these phenomena but was able to abolish the effects induced by AEA. Extinction of traumatic memory is enhanced by 2-AG, AEA and the two eCBs together. In summary, we provided evidence that the two eCBs have a specific, in some cases interacting role in the modulation of behavioral responses given to tests modeling different environmental challenges. AEA is involved in the formation of a proactive coping strategy, while 2-AG plays a role in reducing aggression and the two eCB jointly regulate the acute fear response, the development and extinction of long-term fear memory.

## IX. Irodalomjegyzék

1. Gaoni, Y., Mechoulam, R., (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, 86: 1646-1647.
2. Mechoulam, R., Gaoni, Y., (1967). The absolute configuration of  $\delta^1$ -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron letters*, 8: 1109-1111.
3. Mechoulam, R., Braun, P., Gaoni, Y., (1967). Stereospecific synthesis of (-)-.DELTA.1- and (-)-.DELTA.1(6)-tetrahydrocannabinols. *Journal of the American Chemical Society*, 89: 4552-4554.
4. Elsohly, M.A., Slade, D., (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*, 78: 539-548.
5. Haagen-Smit, A.J., Wawra, C.Z., Koepfli, J.B., Alles, G.A., Feigen, G.A., Prater, A.N., (1940). A Physiologically Active Principle from Cannabis Sativa (Marihuana). *Science*, 91: 602-603.
6. Loewe, S., (1946). Studies on the pharmacology and acute toxicity of compounds with marihuana activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 88: 154-161.
7. Grunfeld, Y., Edery, H., (1969). Psychopharmacological activity of the active constituents of hashish and some related cannabinoids. *Psychopharmacologia*, 14: 200-210.
8. Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., Grunfeld, Y., (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*, 169: 611-612.
9. Ferraro, D.P., Grilly, D.M., Lynch, W.C., (1971). Effects of marihuana extract on the operant behavior of chimpanzees. *Psychopharmacologia*, 22: 333-351.
10. Frankenheim, J.M., McMillan, D.E., Harris, L.S., (1971). Effects of l-delta9- and l-delta8-trans-tetrahydrocannabinol and cannabinol on schedule-controlled behavior of pigeons and rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 178: 241-252.
11. Pertwee, R.G., (1972). The ring test: a quantitative method for assessing the 'cataleptic' effect of cannabis in mice. *Br J Pharmacol*, 46: 753-763.

12. Paton, W.D., Pertwee, R.G. (1973). The pharmacology of cannabis in animals. In *Marijuana: Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects*. (Academic Press).
13. Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54: 161-202.
14. Isbell, H., Gorodetzsky, C.W., Jasinski, D., Claussen, U., von Spulak, F., Korte, F., (1967). Effects of (–)delta-9-trans-tetrahydrocannabinol in man. *Psychopharmacologia*, 11: 184-188.
15. Lawrence, D., Gill, E., (1975). The effects of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Molecular pharmacology*, 11: 595-602.
16. Hillard, C., Harris, R., Bloom, A., (1985). Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232: 579-588.
17. Howlett, A.C., Qualy, J.M., Khachatrian, L.L., (1986). Involvement of  $G_i$  in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, 29: 307-313.
18. Howlett, A.C., Fleming, R.M., (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 26: 532-538.
19. Howlett, A.C., (1984). Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci*, 35: 1803-1810.
20. Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34: 605-613.
21. Gerard, C., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., (1990). Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, 18: 7142.
22. Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.

23. Gerard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 279 ( Pt 1): 129-134.
24. Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11: 563-583.
25. Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.
26. Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., 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: 1946-1949.
27. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., et al., (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
28. Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.
29. Di Marzo, V., Piscitelli, F., (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12: 692-698.
30. Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Shire, D., Bouaboula, M., Oustric, D., Barth, F., Casellas, P., Ferrara, P., Le Fur, G., (1996). Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 871-878.
31. Ryberg, E., Vu, H.K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjogren, S., Greasley, P.J., (2005). Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett*, 579: 259-264.
32. Andersson, H., D'Antona, A.M., Kendall, D.A., Von Heijne, G., Chin, C.N., (2003). Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol Pharmacol*, 64: 570-577.



33. McPartland, J.M., Glass, M., (2003). Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates. *Gene*, 312: 297-303.
34. Elphick, M.R., Egertova, M., (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356: 381-408.
35. Murphy, W.J., Eizirik, E., Johnson, W.E., Zhang, Y.P., Ryder, O.A., O'Brien, S.J., (2001). Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*, 409: 614-618.
36. Chakrabarti, A., Onaivi, E.S., Chaudhuri, G., (1995). Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq*, 5: 385-388.
37. Elphick, M.R., Satou, Y., Satoh, N., (2003). The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Gene*, 302: 95-101.
38. Mackie, K., (2005). Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci*, 77: 1667-1673.
39. Wager-Miller, J., Westenbroek, R., Mackie, K., (2002). Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*, 121: 83-89.
40. Cabral, G.A., Griffin-Thomas, L., (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*, 11: e3.
41. Malfitano, A.M., Basu, S., Maresz, K., Bifulco, M., Dittel, B.N., (2014). What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Semin Immunol*, 26: 369-379.
42. Maccarrone, M., Bab, I., Biro, T., Cabral, G.A., Dey, S.K., Di Marzo, V., Konje, J.C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K.A., Zimmer, A., (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*, 36: 277-296.
43. Maresz, K., Carrier, E.J., Ponomarev, E.D., Hillard, C.J., Dittel, B.N., (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry*, 95: 437-445.

44. Baek, J.-H., Darlington, C.L., Smith, P.F., Ashton, J.C., (2013). Antibody testing for brain immunohistochemistry: brain immunolabeling for the cannabinoid CB2 receptor. *Journal of neuroscience methods*, 216: 87-95.
45. Chen, D.J., Gao, M., Gao, F.F., Su, Q.X., Wu, J., (2017). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin*, 38: 312-316.
46. Buczynski, M.W., Parsons, L.H., (2010). Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. *Br J Pharmacol*, 160: 423-442.
47. Lutz, B., (2004). On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol*, 68: 1691-1698.
48. Maccarrone, M., Dainese, E., Oddi, S., (2010). Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci*, 35: 601-608.
49. Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., Bandiera, T., Reggiani, A., Mor, M., Cavalli, A., Piomelli, D., (2011). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*, 15: 64-69.
50. Oddi, S., Fezza, F., Pasquariello, N., De Simone, C., Rapino, C., Dainese, E., Finazzi-Agro, A., Maccarrone, M., (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci*, 65: 840-850.
51. Zhou, Y., Howell, F.V., Glebov, O.O., Albrecht, D., Williams, G., Doherty, P., (2016). Regulated endosomal trafficking of Diacylglycerol lipase alpha (DAGLalpha) generates distinct cellular pools; implications for endocannabinoid signaling. *Mol Cell Neurosci*, 76: 76-86.
52. Zhang, L., Wang, M., Bisogno, T., Di Marzo, V., Alger, B.E., (2011). Endocannabinoids generated by Ca<sup>2+</sup> or by metabotropic glutamate receptors appear to arise from different pools of diacylglycerol lipase. *PLoS One*, 6: e16305.
53. Min, R., Di Marzo, V., Mansvelder, H.D., (2010). DAG lipase involvement in depolarization-induced suppression of inhibition: does endocannabinoid biosynthesis always meet the demand? *Neuroscientist*, 16: 608-613.

54. Schmid, P., Reddy, P., Natarajan, V., Schmid, H., (1983). Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 9302-9306.
55. Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N., (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 5298-5305.
56. Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.
57. Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J*, 280: 1874-1894.
58. Jin, X.-H., Uyama, T., Wang, J., Okamoto, Y., Tonai, T., Ueda, N., (2009). cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca<sup>2+</sup>-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791: 32-38.
59. Simon, G.M., Cravatt, B.F., (2010). Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst*, 6: 1411-1418.
60. Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.-Y., (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 13345-13350.
61. Sun, Y.X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., Ueda, N., (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*, 380: 749-756.
62. Tsuboi, K., Okamoto, Y., Ikematsu, N., Inoue, M., Shimizu, Y., Uyama, T., Wang, J., Deutsch, D.G., Burns, M.P., Ulloa, N.M., (2011). Enzymatic formation of N-acylethanolamines from N-acylethanolamine plasmalogen through N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and-

- independent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811: 565-577.
63. Wei, B.Q., Mikkelsen, T.S., McKinney, M.K., Lander, E.S., Cravatt, B.F., (2006). A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 36569-36578.
  64. Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H., (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 9371-9376.
  65. Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boscia, F., Freund, T.F., (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20: 441-458.
  66. McKinney, M.K., Cravatt, B.F., (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.*, 74: 411-432.
  67. Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., (2010). N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res*, 49: 299-315.
  68. Snider, N.T., Walker, V.J., Hollenberg, P.F., (2010). Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome P450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications. *Pharmacol Rev*, 62: 136-154.
  69. Rouzer, C.A., Marnett, L.J., (2011). Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev*, 111: 5899-5921.
  70. Amadio, D., Fezza, F., Catanzaro, G., Incani, O., van Zadelhoff, G., Agrò, A.F., Maccarrone, M., (2010). Methylation and acetylation of 15-hydroxyanandamide modulate its interaction with the endocannabinoid system. *Biochimie*, 92: 378-387.
  71. Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., (2005). Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on

- anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther*, 313: 352-358.
72. Jung, K.M., Mangieri, R., Stapleton, C., Kim, J., Fegley, D., Wallace, M., Mackie, K., Piomelli, D., (2005). Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, 68: 1196-1202.
73. Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D., (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388: 773-778.
74. Katona, I., Freund, T.F., (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 35: 529-558.
75. Katona, I., Urban, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.M., Piomelli, D., Mackie, K., Freund, T.F., (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26: 5628-5637.
76. Won, Y.J., Puhl, H.L., 3rd, Ikeda, S.R., (2009). Molecular reconstruction of mGluR5a-mediated endocannabinoid signaling cascade in single rat sympathetic neurons. *J Neurosci*, 29: 13603-13612.
77. Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H.S., Kano, M., (2005). Phospholipase C $\beta$  serves as a coincidence detector through its Ca $^{2+}$  dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron*, 45: 257-268.
78. Maejima, T., Oka, S., Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T., Kano, M., (2005). Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca $^{2+}$ -assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C $\beta$ 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*, 25: 6826-6835.
79. Carrier, E.J., Kearns, C.S., Barkmeier, A.J., Breese, N.M., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, S.L., Campbell, W.B., Hillard, C.J., (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB $_2$  receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 65: 999-1007.

80. Jung, K.M., Astarita, G., Thongkham, D., Piomelli, D., (2011). Diacylglycerol lipase- $\alpha$  and - $\beta$  control neurite outgrowth in neuro-2a cells through distinct molecular mechanisms. *Mol Pharmacol*, 80: 60-67.
81. Gao, Y., Vasilyev, D.V., Goncalves, M.B., Howell, F.V., Hobbs, C., Reisenberg, M., Shen, R., Zhang, M.Y., Strassle, B.W., Lu, P., Mark, L., Piesla, M.J., Deng, K., Kouranova, E.V., Ring, R.H., Whiteside, G.T., Bates, B., Walsh, F.S., Williams, G., Pangalos, M.N., Samad, T.A., Doherty, P., (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30: 2017-2024.
82. Tsutsumi, T., Kobayashi, T., Ueda, H., Yamauchi, E., Watanabe, S., Okuyama, H., (1994). Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes. *Neurochem Res*, 19: 399-406.
83. Nakane, S., Oka, S., Arai, S., Waku, K., Ishima, Y., Tokumura, A., Sugiura, T., (2002). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Arch Biochem Biophys*, 402: 51-58.
84. Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10819-10824.
85. Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F., (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14: 1347-1356.
86. Ahn, K., Johnson, D.S., Mileni, M., Beidler, D., Long, J.Z., McKinney, M.K., Weerapana, E., Sadagopan, N., Liimatta, M., Smith, S.E., Lazerwith, S., Stiff, C., Kamtekar, S., Bhattacharya, K., Zhang, Y., Swaney, S., Van Becelaere, K., Stevens, R.C., Cravatt, B.F., (2009). Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chem Biol*, 16: 411-420.
87. Kozak, K.R., Marnett, L.J., (2002). Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66: 211-220.

88. Kozak, K.R., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J., (2000). Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275: 33744-33749.
89. Yang, H., Zhang, J., Andreasson, K., Chen, C., (2008). COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*, 37: 682-695.
90. Bisogno, T., Cascio, M.G., Saha, B., Mahadevan, A., Urbani, P., Minassi, A., Appendino, G., Saturnino, C., Martin, B., Razdan, R., (2006). Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761: 205-212.
91. Chang, J.W., Niphakis, M.J., Lum, K.M., Coggnetta, A.B., 3rd, Wang, C., Matthews, M.L., Niessen, S., Buczynski, M.W., Parsons, L.H., Cravatt, B.F., (2012). Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates. *Chem Biol*, 19: 579-588.
92. Storr, M.A., Sharkey, K.A., (2007). The endocannabinoid system and gut-brain signalling. *Curr Opin Pharmacol*, 7: 575-582.
93. Van Sickle, M.D., Oland, L.D., Mackie, K., Davison, J.S., Sharkey, K.A., (2003). Delta9-tetrahydrocannabinol selectively acts on CB1 receptors in specific regions of dorsal vagal complex to inhibit emesis in ferrets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285: G566-576.
94. Van Sickle, M.D., Oland, L.D., Ho, W., Hillard, C.J., Mackie, K., Davison, J.S., Sharkey, K.A., (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology*, 121: 767-774.
95. Zhao, Y., Rubio, M.E., Tzounopoulos, T., (2009). Distinct functional and anatomical architecture of the endocannabinoid system in the auditory brainstem. *J Neurophysiol*, 101: 2434-2446.
96. Suarez, J., Bermudez-Silva, F.J., Mackie, K., Ledent, C., Zimmer, A., Cravatt, B.F., de Fonseca, F.R., (2008). Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*, 509: 400-421.

97. Diana, M.A., Levenes, C., Mackie, K., Marty, A., (2002). Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci*, 22: 200-208.
98. Kreitzer, A.C., Regehr, W.G., (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29: 717-727.
99. Egertova, M., Elphick, M.R., (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol*, 422: 159-171.
100. Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83: 393-411.
101. Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L., (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77: 299-318.
102. Zhong, P., Pan, B., Gao, X.P., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., Liu, Q.S., (2011). Genetic deletion of monoacylglycerol lipase alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic depression in the cerebellum. *J Physiol*, 589: 4847-4855.
103. Tanimura, A., Uchigashima, M., Yamazaki, M., Uesaka, N., Mikuni, T., Abe, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Kano, M., (2012). Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12195-12200.
104. Egertova, M., Giang, D.K., Cravatt, B.F., Elphick, M.R., (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265: 2081-2085.
105. Egertova, M., Cravatt, B., Elphick, M., (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119: 481-496.
106. Tsou, K., Nogueron, M.I., Muthian, S., Sanudo-Pena, M.C., Hillard, C.J., Deutsch, D.G., Walker, J.M., (1998). Fatty acid amide hydrolase is located



- preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett*, 254: 137-140.
107. Sanudo-Pena, M.C., Tsou, K., Walker, J.M., (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci*, 65: 703-713.
  108. Moldrich, G., Wenger, T., (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21: 1735-1742.
  109. Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J., (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48: 655-668.
  110. Matyas, F., Urban, G.M., Watanabe, M., Mackie, K., Zimmer, A., Freund, T.F., Katona, I., (2008). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, 54: 95-107.
  111. Azad, S.C., Marsicano, G., Eberlein, I., Putzke, J., Zieglgänsberger, W., Spanagel, R., Lutz, B., (2001). Differential role of the nitric oxide pathway on  $\Delta^9$ -THC-induced central nervous system effects in the mouse. *European Journal of Neuroscience*, 13: 561-568.
  112. Haring, M., Marsicano, G., Lutz, B., Monory, K., (2007). Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience*, 146: 1212-1219.
  113. Wittmann, G., Deli, L., Kallo, I., Hrabovszky, E., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., (2007). Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, 503: 270-279.
  114. Marsicano, G., Lutz, B., (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 11: 4213-4225.
  115. Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J., (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, 327: 535-550.
  116. Julian, M.D., Martin, A.B., Cuellar, B., Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M., Moratalla, R., Garcia-Segura, L.M., (2003). Neuroanatomical relationship

- between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, 119: 309-318.
117. Uchigashima, M., Narushima, M., Fukaya, M., Katona, I., Kano, M., Watanabe, M., (2007). Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27: 3663-3676.
  118. Gerdeman, G., Lovinger, D.M., (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, 85: 468-471.
  119. Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., Manzoni, O.J., (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21: 109-116.
  120. Harkany, T., Hartig, W., Berghuis, P., Dobszay, M.B., Zilberter, Y., Edwards, R.H., Mackie, K., Ernfors, P., (2003). Complementary distribution of type 1 cannabinoid receptors and vesicular glutamate transporter 3 in basal forebrain suggests input-specific retrograde signalling by cholinergic neurons. *Eur J Neurosci*, 18: 1979-1992.
  121. Nyiri, G., Szabadits, E., Cserep, C., Mackie, K., Shigemoto, R., Freund, T.F., (2005). GABAB and CB1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. *Eur J Neurosci*, 21: 3034-3042.
  122. Ramikie, T.S., Nyilas, R., Bluett, R.J., Gamble-George, J.C., Hartley, N.D., Mackie, K., Watanabe, M., Katona, I., Patel, S., (2014). Multiple mechanistically distinct modes of endocannabinoid mobilization at central amygdala glutamatergic synapses. *Neuron*, 81: 1111-1125.
  123. Yoshida, T., Uchigashima, M., Yamasaki, M., Katona, I., Yamazaki, M., Sakimura, K., Kano, M., Yoshioka, M., Watanabe, M., (2011). Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 3059-3064.
  124. Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T.F., (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*, 21: 9506-9518.

125. Tsou, K., Mackie, K., Sanudo-Pena, M.C., Walker, J.M., (1999). Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93: 969-975.
126. Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., Freund, T.F., (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 19: 4544-4558.
127. Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutierrez, S.O., van der Stelt, M., Lopez-Rodriguez, M.L., Casanova, E., Schutz, G., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., Lutz, B., (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302: 84-88.
128. Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., Kano, M., (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, 26: 2991-3001.
129. Monory, K., Massa, F., Egertova, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., Long, J., Rubenstein, J.L., Goebbels, S., Nave, K.A., Doring, M., Klugmann, M., Wolfel, B., Dodt, H.U., Zieglgansberger, W., Wotjak, C.T., Mackie, K., Elphick, M.R., Marsicano, G., Lutz, B., (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51: 455-466.
130. Eggan, S.M., Lewis, D.A., (2006). Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: a regional and laminar analysis. *Cerebral cortex*, 17: 175-191.
131. Bodor, Á.L., Katona, I., Nyíri, G., Mackie, K., Ledent, C., Hájos, N., Freund, T.F., (2005). Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *Journal of Neuroscience*, 25: 6845-6856.
132. Hill, E.L., Gallopin, T., Férézou, I., Cauli, B., Rossier, J., Schweitzer, P., Lambollez, B., (2007). Functional CB1 receptors are broadly expressed in

- neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *Journal of neurophysiology*, 97: 2580-2589.
133. Savinainen, J.R., Saario, S.M., Laitinen, J.T., (2012). The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)*, 204: 267-276.
  134. Childers, S.R., Sexton, T., Roy, M.B., (1994). Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochemical pharmacology*, 47: 711-715.
  135. Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Mu, J., Whyte, A., Childers, S., (1995). Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther*, 273: 734-743.
  136. Childers, S.R., Deadwyler, S.A., (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 52: 819-827.
  137. Rhee, M.H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Vogel, Z., (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, 71: 1525-1534.
  138. Jarrahan, A., Watts, V.J., Barker, E.L., (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 308: 880-886.
  139. Brown, S.P., Safo, P.K., Regehr, W.G., (2004). Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci*, 24: 5623-5631.
  140. Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K., (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 78: 43-50.
  141. Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R., (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15: 6552-6561.
  142. Turu, G., Hunyady, L., (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*, 44: 75-85.

143. Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Heenan, L., Moore, J.D., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., (2005). Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci*, 28: 189-194.
144. Nogueras-Ortiz, C., Yudowski, G.A., (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Mol Pharmacol*, 90: 620-626.
145. Pitler, T.A., Alger, B.E., (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 12: 4122-4132.
146. Vincent, P., Marty, A., (1993). Neighboring cerebellar Purkinje cells communicate via retrograde inhibition of common presynaptic interneurons. *Neuron*, 11: 885-893.
147. Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M., (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29: 729-738.
148. Wilson, R.I., Nicoll, R.A., (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410: 588-592.
149. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., Watanabe, M., (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews*, 89: 309-380.
150. Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E., Hashimotodani, Y., (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76: 70-81.
151. Ohno-Shosaku, T., Kano, M., (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology*, 29: 1-8.
152. Bayewitch, M., Rhee, M.-H., Avidor-Reiss, T., Breuer, A., Mechoulam, R., Vogel, Z., (1996). (-)-Tetrahydrocannabinol Antagonizes the Peripheral Cannabinoid Receptor-mediated Inhibition of Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 9902-9905.
153. Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48: 443-450.

154. Song, Z.-H., Bonner, T.I., (1996). A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Molecular pharmacology*, 49: 891-896.
155. Piomelli, D., (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4: 873-884.
156. Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152: 1092-1101.
157. Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., Davis, J.B., (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*, 129: 227-230.
158. McHugh, D., Page, J., Dunn, E., Bradshaw, H.B., (2012). Delta(9) - Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol*, 165: 2414-2424.
159. Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., DiCamelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G., Campbell, W.B., (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289: 1427-1433.
160. Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS letters*, 350: 240-244.
161. Muccioli, G.G., (2007). Blocking the cannabinoid receptors: drug candidates and therapeutic promises. *Chemistry & biodiversity*, 4: 1805-1827.
162. Pertwee, R.G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. In *Cannabinoids*. (Springer), pp. 1-51.
163. Fong, T.M., Guan, X.-M., Marsh, D.J., Shen, C.-P., Stribling, D.S., Rosko, K.M., Lao, J., Yu, H., Feng, Y., Xiao, J.C., (2007). Antiobesity efficacy of a novel cannabinoid-1 receptor inverse agonist, N-[(1S, 2S)-3-(4-chlorophenyl)-2-(3-

- cyanophenyl)-1-methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl) pyridin-2-yl]oxy] propanamide (MK-0364), in rodents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321: 1013-1022.
164. Thomas, A., Ross, R.A., Saha, B., Mahadevan, A., Razdan, R.K., Pertwee, R.G., (2004). 6"-Azidohept-2"-yne-cannabidiol: a potential neutral, competitive cannabinoid CB1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 487: 213-221.
  165. Gardner, A., Mallet, P.E., (2006). Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor 'silent antagonist'. *Eur J Pharmacol*, 530: 103-106.
  166. Pavon, F.J., Bilbao, A., Hernandez-Folgado, L., Cippitelli, A., Jagerovic, N., Abellan, G., Rodriguez-Franco, M.A., Serrano, A., Macias, M., Gomez, R., Navarro, M., Goya, P., Rodriguez de Fonseca, F., (2006). Antiobesity effects of the novel in vivo neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole--LH 21. *Neuropharmacology*, 51: 358-366.
  167. Sink, K.S., McLaughlin, P.J., Wood, J.A., Brown, C., Fan, P., Vemuri, V.K., Peng, Y., Olszewska, T., Thakur, G.A., Makriyannis, A., Parker, L.A., Salamone, J.D., (2008). The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology*, 33: 946-955.
  168. Ruiu, S., Pinna, G.A., Marchese, G., Mussinu, J.M., Saba, P., Tambaro, S., Casti, P., Vargiu, R., Pani, L., (2003). Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 306: 363-370.
  169. Price, M.R., Baillie, G.L., Thomas, A., Stevenson, L.A., Easson, M., Goodwin, R., McLean, A., McIntosh, L., Goodwin, G., Walker, G., Westwood, P., Marrs, J., Thomson, F., Cowley, P., Christopoulos, A., Pertwee, R.G., Ross, R.A., (2005). Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol*, 68: 1484-1495.
  170. Horswill, J.G., Bali, U., Shaaban, S., Keily, J.F., Jeevaratnam, P., Babbs, A.J., Reynet, C., Wong Kai In, P., (2007). PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist

- at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br J Pharmacol*, 152: 805-814.
171. Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Gasperi, V., Maccarrone, M., (2006). New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6: 257-268.
  172. Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S., Makriyannis, A., Piomelli, D., (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277: 1094-1097.
  173. Hogestatt, E.D., Jonsson, B.A., Ermund, A., Andersson, D.A., Bjork, H., Alexander, J.P., Cravatt, B.F., Basbaum, A.I., Zygmunt, P.M., (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*, 280: 31405-31412.
  174. Zygmunt, P.M., Chuang, H.-h., Movahed, P., Julius, D., Högestätt, E.D., (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *European journal of pharmacology*, 396: 39-42.
  175. Lambert, D.M., Fowler, C.J., (2005). The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *Journal of medicinal chemistry*, 48: 5059-5087.
  176. Ortar, G., Ligresti, A., De Petrocellis, L., Morera, E., Di Marzo, V., (2003). Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochemical pharmacology*, 65: 1473-1481.
  177. Hillard, C.J., Shi, L., Tuniki, V.R., Falck, J.R., Campbell, W.B., (2007). Studies of anandamide accumulation inhibitors in cerebellar granule neurons: comparison to inhibition of fatty acid amide hydrolase. *Journal of Molecular Neuroscience*, 33: 18-24.
  178. Deutsch, D., Lin, S., Hill, W., Morse, K., Salehani, D., Arreaza, G., Omeir, R., Makriyannis, A., (1997). Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 231: 217-221.
  179. De Petrocellis, L., Melck, D., Ueda, N., Maurelli, S., Kurahashi, Y., Yamamoto, S., Marino, G., Di Marzo, V., (1997). Novel inhibitors of brain, neuronal, and



- basophilic anandamide amidohydrolase. *Biochemical and biophysical research communications*, 231: 82-88.
180. Deutsch, D.G., Chin, S.A., (1993). Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical pharmacology*, 46: 791-796.
181. Lichtman, A.H., Leung, D., Shelton, C.C., Saghatelian, A., Hardouin, C., Boger, D.L., Cravatt, B.F., (2004). Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311: 441-448.
182. Boger, D.L., Miyauchi, H., Du, W., Hardouin, C., Fecik, R.A., Cheng, H., Hwang, I., Hedrick, M.P., Leung, D., Acevedo, O., (2005). Discovery of a potent, selective, and efficacious class of reversible  $\alpha$ -ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. *Journal of medicinal chemistry*, 48: 1849-1856.
183. Clapper, J.R., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., (2006). The fatty-acid amide hydrolase inhibitor URB597 does not affect triacylglycerol hydrolysis in rat tissues. *Pharmacological research*, 54: 341-344.
184. Alexander, J.P., Cravatt, B.F., (2005). Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes. *Chemistry & biology*, 12: 1179-1187.
185. Mor, M., Rivara, S., Lodola, A., Plazzi, P.V., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Piersanti, G., Kathuria, S., Piomelli, D., (2004). Cyclohexylcarbamic acid 3'-or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure- activity relationships, and molecular modeling studies. *Journal of medicinal chemistry*, 47: 4998-5008.
186. Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D., (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9: 76-81.

187. Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., Putman, D., (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev*, 12: 21-38.
188. Ahn, K., Johnson, D.S., Fitzgerald, L.R., Liimatta, M., Arendse, A., Stevenson, T., Lund, E.T., Nugent, R.A., Nomanbhoy, T.K., Alexander, J.P., Cravatt, B.F., (2007). Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry*, 46: 13019-13030.
189. Keith, J.M., Apodaca, R., Tichenor, M., Xiao, W., Jones, W., Pierce, J., Seierstad, M., Palmer, J., Webb, M., Karbarz, M., Scott, B., Wilson, S., Luo, L., Wennerholm, M., Chang, L., Brown, S., Rizzolio, M., Rynberg, R., Chaplan, S., Breitenbucher, J.G., (2012). Aryl Piperazinyl Ureas as Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) in Rat, Dog, and Primate. *ACS Med Chem Lett*, 3: 823-827.
190. Johnson, D.S., Stiff, C., Lazerwith, S.E., Kesten, S.R., Fay, L.K., Morris, M., Beidler, D., Liimatta, M.B., Smith, S.E., Dudley, D.T., Sadagopan, N., Bhattachar, S.N., Kesten, S.J., Nomanbhoy, T.K., Cravatt, B.F., Ahn, K., (2011). Discovery of PF-04457845: A Highly Potent, Orally Bioavailable, and Selective Urea FAAH Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, 2: 91-96.
191. Saario, S.M., Laitinen, J.T., (2007). Monoglyceride Lipase as an Enzyme Hydrolyzing 2-Arachidonoylglycerol. *Chemistry & biodiversity*, 4: 1903-1913.
192. Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435: 1108.
193. Vandevoorde, S., Jonsson, K.O., Labar, G., Persson, E., Lambert, D., Fowler, C.J., (2007). Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *British journal of pharmacology*, 150: 186-191.
194. Aaltonen, N., Savinainen, J.R., Ribas, C.R., Ronkko, J., Kuusisto, A., Korhonen, J., Navia-Paldanius, D., Hayrinen, J., Takabe, P., Kasnanen, H., Pantsar, T., Laitinen, T., Lehtonen, M., Pasonen-Seppanen, S., Poso, A., Nevalainen, T., Laitinen, J.T., (2013). Piperazine and piperidine triazole ureas as ultrapotent and highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase. *Chem Biol*, 20: 379-390.

195. Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.-J., (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163: 463-468.
196. LeDoux, J., (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, 23: 727-738.
197. Rolls, E.T., (2015). Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. *Cortex*, 62: 119-157.
198. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. *Principles of neural science*, Volume 4. McGraw-hill New York, 2000.
199. Shin, L.M., Rauch, S.L., Pitman, R.K., (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci*, 1071: 67-79.
200. Park, A.T., Leonard, J.A., Saxler, P., Cyr, A.B., Gabrieli, J.D.E., Mackey, A.P., (2018). Amygdala-medial prefrontal connectivity relates to stress and mental health in early childhood. *Soc Cogn Affect Neurosci*.
201. Arnsten, A.F., (2009). Ameliorating prefrontal cortical dysfunction in mental illness: inhibition of phosphatidylinositol-protein kinase C signaling. *Psychopharmacology (Berl)*, 202: 445-455.
202. Kohen, R., Dobra, A., Tracy, J.H., Haugen, E., (2014). Transcriptome profiling of human hippocampus dentate gyrus granule cells in mental illness. *Transl Psychiatry*, 4: e366.
203. Hill, M.N., Hillard, C.J., Bambico, F.R., Patel, S., Gorzalka, B.B., Gobbi, G., (2009). The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends in pharmacological sciences*, 30: 484-493.
204. Valverde, O., (2005). Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour. *Current pharmaceutical design*, 11: 3421-3429.
205. Dejean, C., Courtin, J., Rozeske, R.R., Bonnet, M.C., Dousset, V., Michelet, T., Herry, C., (2015). Neuronal circuits for fear expression and recovery: recent advances and potential therapeutic strategies. *Biological psychiatry*, 78: 298-306.
206. Derks, N.M., Pinter, O., Zuure, W., Ledent, C., Watanabe, M., Molnar, C.S., Wei, Y., Roubos, E.W., Wu, S., Hrabovszky, E., Zelena, D., Koziacz, T., (2012).

- Cannabinoid modulation of midbrain urocortin 1 neurones during acute and chronic stress. *J Neuroendocrinol*, 24: 1447-1461.
207. Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., Freund, T.F., (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*, 16: 1395-1398.
  208. Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Freund, T.F., (2004). CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol*, 15: 299-304.
  209. Hill, M.N., Hillard, C.J., McEwen, B.S., (2011). Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex*, 21: 2056-2064.
  210. Jacob, W., Yassouridis, A., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Wotjak, C.T., (2009). Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav*, 8: 685-698.
  211. Litvin, Y., Phan, A., Hill, M.N., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., (2013). CB1 receptor signaling regulates social anxiety and memory. *Genes Brain Behav*, 12: 479-489.
  212. Uriguen, L., Perez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T., Manzanares, J., (2004). Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology*, 46: 966-973.
  213. Dubreucq, S., Matias, I., Cardinal, P., Haring, M., Lutz, B., Marsicano, G., Chaouloff, F., (2012). Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. *Neuropsychopharmacology*, 37: 1885-1900.
  214. Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Barna, I., Freund, T.F., (2004). Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci*, 19: 1906-1912.
  215. Arevalo, C., de Miguel, R., Hernandez-Tristan, R., (2001). Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav*, 70: 123-131.
  216. Blasio, A., Iemolo, A., Sabino, V., Petrosino, S., Steardo, L., Rice, K.C., Orlando, P., Iannotti, F.A., Di Marzo, V., Zorrilla, E.P., Cottone, P., (2013). Rimonabant

- precipitates anxiety in rats withdrawn from palatable food: role of the central amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 38: 2498-2507.
217. Huang, P., Liu-Chen, L.Y., Kirby, L.G., (2010). Anxiety-like effects of SR141716-precipitated delta9-tetrahydrocannabinol withdrawal in mice in the elevated plus-maze. *Neurosci Lett*, 475: 165-168.
  218. Moise, A.M., Eisenstein, S.A., Astarita, G., Piomelli, D., Hohmann, A.G., (2008). An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behavior in male Syrian hamsters. *Psychopharmacology (Berl)*, 200: 333-346.
  219. Navarro, M., Hernandez, E., Munoz, R.M., del Arco, I., Villanua, M.A., Carrera, M.R., Rodriguez de Fonseca, F., (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*, 8: 491-496.
  220. Patel, S., Hillard, C.J., (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 318: 304-311.
  221. O'Brien, L.D., Wills, K.L., Segsworth, B., Dashney, B., Rock, E.M., Limebeer, C.L., Parker, L.A., (2013). Effect of chronic exposure to rimonabant and phytocannabinoids on anxiety-like behavior and saccharin palatability. *Pharmacol Biochem Behav*, 103: 597-602.
  222. Griebel, G., Stemmelin, J., Scatton, B., (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry*, 57: 261-267.
  223. Rodgers, R.J., Haller, J., Halasz, J., Mikics, E., (2003). 'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci*, 17: 1279-1286.
  224. Rubio, M., Fernandez-Ruiz, J., de Miguel, R., Maestro, B., Michael Walker, J., Ramos, J.A., (2008). CB1 receptor blockade reduces the anxiogenic-like response and ameliorates the neurochemical imbalances associated with alcohol withdrawal in rats. *Neuropharmacology*, 54: 976-988.
  225. Akinshola, B.E., Chakrabarti, A., Onaivi, E.S., (1999). In-vitro and in-vivo action of cannabinoids. *Neurochem Res*, 24: 1233-1240.

226. Assareh, N., ElBatsh, M.M., Marsden, C.A., Kendall, D.A., (2012). The effects of chronic administration of tranylcypromine and rimonabant on behaviour and protein expression in brain regions of the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 100: 506-512.
227. Lopez-Moreno, J.A., Gonzalez-Cuevas, G., Navarro, M., (2007). The CB1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant chronically prevents the nicotine-induced relapse to alcohol. *Neurobiol Dis*, 25: 274-283.
228. Degroot, A., Nomikos, G.G., (2004). Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test. *Eur J Neurosci*, 20: 1059-1064.
229. Cagni, P., Barros, M., (2013). Cannabinoid type 1 receptor ligands WIN 55,212-2 and AM 251 alter anxiety-like behaviors of marmoset monkeys in an open-field test. *Behav Brain Res*, 240: 91-94.
230. Rodgers, R.J., Evans, P.M., Murphy, A., (2005). Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol*, 16: 405-413.
231. Sink, K.S., Segovia, K.N., Sink, J., Randall, P.A., Collins, L.E., Correa, M., Markus, E.J., Vemuri, V.K., Makriyannis, A., Salamone, J.D., (2010). Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142. *Eur Neuropsychopharmacol*, 20: 112-122.
232. Dono, L.M., Currie, P.J., (2012). The cannabinoid receptor CB(1) inverse agonist AM251 potentiates the anxiogenic activity of urocortin I in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, 62: 192-199.
233. Haller, J., Matyas, F., Soproni, K., Varga, B., Barsy, B., Nemeth, B., Mikics, E., Freund, T.F., Hajos, N., (2007). Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci*, 25: 2445-2456.
234. Berrendero, F., Maldonado, R., (2002). Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)*, 163: 111-117.

235. Braida, D., Limonta, V., Malabarba, L., Zani, A., Sala, M., (2007). 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in the anxiolytic effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol*, 555: 156-163.
236. Fokos, S., Panagis, G., (2010). Effects of delta9-tetrahydrocannabinol on reward and anxiety in rats exposed to chronic unpredictable stress. *J Psychopharmacol*, 24: 767-777.
237. Hill, M.N., Gorzalka, B.B., (2004). Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol*, 499: 291-295.
238. Marco, E.M., Perez-Alvarez, L., Borcel, E., Rubio, M., Guaza, C., Ambrosio, E., File, S.E., Viveros, M.P., (2004). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol*, 15: 21-27.
239. Naderi, N., Haghparast, A., Saber-Tehrani, A., Rezaii, N., Alizadeh, A.M., Khani, A., Motamedi, F., (2008). Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 89: 64-75.
240. Panlilio, L.V., Solinas, M., Matthews, S.A., Goldberg, S.R., (2007). Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology*, 32: 646-657.
241. Rey, A.A., Purrio, M., Viveros, M.P., Lutz, B., (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB<sub>1</sub> and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology*, 37: 2624-2634.
242. Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Palermo-Neto, J., (2009). Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests. *Braz J Med Biol Res*, 42: 556-560.
243. Rubino, T., Sala, M., Vigano, D., Braida, D., Castiglioni, C., Limonta, V., Guidali, C., Realini, N., Parolaro, D., (2007). Cellular mechanisms underlying the

- anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology*, 32: 2036-2045.
244. Scherma, M., Medalie, J., Fratta, W., Vadivel, S.K., Makriyannis, A., Piomelli, D., Mikics, E., Haller, J., Yasar, S., Tanda, G., Goldberg, S.R., (2008). The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology*, 54: 129-140.
  245. Umathe, S.N., Manna, S.S., Utturwar, K.S., Jain, N.S., (2009). Endocannabinoids mediate anxiolytic-like effect of acetaminophen via CB1 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33: 1191-1199.
  246. Arnold, J.C., Dielenberg, R.A., McGregor, I.S., (2010). Cannabinoids increase conditioned ultrasonic vocalisations and cat odour avoidance in rats: strain differences in drug-induced anxiety. *Life Sci*, 87: 572-578.
  247. Bambico, F.R., Cassano, T., Dominguez-Lopez, S., Katz, N., Walker, C.D., Piomelli, D., Gobbi, G., (2010). Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 35: 2083-2100.
  248. Bambico, F.R., Nguyen, N.T., Katz, N., Gobbi, G., (2010). Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol Dis*, 37: 641-655.
  249. Giuliani, D., Ferrari, F., Ottani, A., (2000). The Cannabinoid Agonist Hu 210 Modifies Rat Behavioural Responses to Novelty and Stress. *Pharmacol Res*, 41: 45-51.
  250. Harte-Hargrove, L.C., Dow-Edwards, D.L., (2012). Withdrawal from THC during adolescence: sex differences in locomotor activity and anxiety. *Behav Brain Res*, 231: 48-59.
  251. Hill, M.N., Gorzalka, B.B., (2006). Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 31: 526-536.
  252. Marin, S., Marco, E., Biscaia, M., Fernandez, B., Rubio, M., Guaza, C., Schmidhammer, H., Viveros, M.P., (2003). Involvement of the kappa-opioid



- receptor in the anxiogenic-like effect of CP 55,940 in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 74: 649-656.
253. McLaughlin, P.J., Lu, D., Winston, K.M., Thakur, G., Swezey, L.A., Makriyannis, A., Salamone, J.D., (2005). Behavioral effects of the novel cannabinoid full agonist AM 411. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 78-88.
254. Onaivi, E.S., Green, M.R., Martin, B.R., (1990). Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 253: 1002-1009.
255. Rutkowska, M., Jamontt, J., Gliniak, H., (2006). Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacol Rep*, 58: 200-206.
256. Schramm-Sapyta, N.L., Cha, Y.M., Chaudhry, S., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., Kuhn, C.M., (2007). Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 191: 867-877.
257. Gobira, P.H., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., (2013). Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 110: 33-39.
258. Hill, M.N., Kumar, S.A., Filipinski, S.B., Iverson, M., Stuhr, K.L., Keith, J.M., Cravatt, B.F., Hillard, C.J., Chattarji, S., McEwen, B.S., (2013). Disruption of fatty acid amide hydrolase activity prevents the effects of chronic stress on anxiety and amygdalar microstructure. *Mol Psychiatry*, 18: 1125-1135.
259. Kinsey, S.G., O'Neal, S.T., Long, J.Z., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav*, 98: 21-27.
260. Moreira, F.A., Kaiser, N., Monory, K., Lutz, B., (2008). Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology*, 54: 141-150.
261. Rossi, S., De Chiara, V., Musella, A., Sacchetti, L., Cantarella, C., Castelli, M., Cavasinni, F., Motta, C., Studer, V., Bernardi, G., Cravatt, B.F., Maccarrone, M., Usiello, A., Centonze, D., (2010). Preservation of striatal cannabinoid CB1

- receptor function correlates with the antianxiety effects of fatty acid amide hydrolase inhibition. *Mol Pharmacol*, 78: 260-268.
262. Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Vigano, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., Parolaro, D., (2008). Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 18: 1292-1301.
263. 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. *Biol Psychiatry*, 70: 479-486.
264. 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. *Behav Pharmacol*, 23: 348-357.
265. Almeida-Santos, A.F., Gobira, P.H., Rosa, L.C., Guimaraes, F.S., Moreira, F.A., Aguiar, D.C., (2013). Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. *Behav Brain Res*, 252: 10-17.
266. Haller, J., Barna, I., Barsvari, B., Gyimesi Pelczer, K., Yasar, S., Panlilio, L.V., Goldberg, S., (2009). Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 204: 607-616.
267. Naidu, P.S., Varvel, S.A., Ahn, K., Cravatt, B.F., Martin, B.R., Lichtman, A.H., (2007). Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)*, 192: 61-70.
268. Aliczki, M., Zelena, D., Mikics, E., Varga, Z.K., Pinter, O., Bakos, N.V., Varga, J., Haller, J., (2013). Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. *Horm Behav*, 63: 752-758.
269. Sciolino, N.R., Zhou, W., Hohmann, A.G., (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. *Pharmacol Res*, 64: 226-234.
270. Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G.M., Drago, F., Di Marzo, V., (2009). Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*, 34: 593-606.
271. Steiner, M.A., Marsicano, G., Wotjak, C.T., Lutz, B., (2008). Conditional cannabinoid receptor type 1 mutants reveal neuron subpopulation-specific effects on behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, 33: 1165-1170.
272. Tambaro, S., Bortolato, M., (2012). Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 7: 25-40.
273. Zanettini, C., Panlilio, L.V., Alicki, M., Goldberg, S.R., Haller, J., Yasar, S., (2011). Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci*, 5: 57.
274. Haller, J., Goldberg, S.R., Pelczer, K.G., Aliczki, M., Panlilio, L.V., (2013). The effects of anandamide signaling enhanced by the FAAH inhibitor URB597 on coping styles in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 230: 353-362.
275. Koolhaas, J., Korte, S., De Boer, S., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., De Jong, I., Ruis, M., Blokhuis, H., (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23: 925-935.
276. de Boer, S.F., Buwalda, B., Koolhaas, J.M., (2017). Untangling the neurobiology of coping styles in rodents: towards neural mechanisms underlying individual differences in disease susceptibility. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 74: 401-422.
277. Temoshok, L.R., (2000). Complex coping patterns and their role in adaptation and neuroimmunomodulation: Theory, methodology, and research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917: 446-455.

278. Westerhuis, W., Zijlmans, M., Fischer, K., Van Andel, J., Leijten, F.S., (2011). Coping style and quality of life in patients with epilepsy: a cross-sectional study. *Journal of neurology*, 258: 37-43.
279. Pucheu, S., Consoli, S.M., D'Auzac, C., Français, P., Issad, B., (2004). Do health causal attributions and coping strategies act as moderators of quality of life in peritoneal dialysis patients? *Journal of psychosomatic Research*, 56: 317-322.
280. Cooke, M., Peters, E., Fannon, D., Anilkumar, A.P., Aasen, I., Kuipers, E., Kumari, V., (2007). Insight, distress and coping styles in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 94: 12-22.
281. De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol*, 463: 145-161.
282. Cain, C.K., LeDoux, J.E., (2007). Escape from fear: a detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 33: 451-463.
283. Metna-Laurent, M., Soria-Gómez, E., Verrier, D., Conforzi, M., Jégo, P., Lafenêtre, P., Marsicano, G., (2012). Bimodal control of fear-coping strategies by CB1 cannabinoid receptors. *Journal of Neuroscience*, 32: 7109-7118.
284. McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Bambico, F.R., Stuhr, K.L., Gobbi, G., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., (2012). Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *European Neuropsychopharmacology*, 22: 664-671.
285. Koolhaas, J.M., De Boer, S.F., Buwalda, B., Van Reenen, K., (2007). Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain, behavior and evolution*, 70: 218-226.
286. Miczek, K.A., (1978). delta9-tetrahydrocannabinol: antiaggressive effects in mice, rats, and squirrel monkeys. *Science*, 199: 1459-1461.
287. Van Ree, J.M., Niesink, R.J., Nir, I., (1984).  $\Delta$  1-tetrahydrocannabinol but not cannabidiol reduces contact and aggressive behavior of rats tested in dyadic encounters. *Psychopharmacology*, 84: 561-565.
288. Rodriguez-Arias, M., Navarrete, F., Daza-Losada, M., Navarro, D., Aguilar, M.A., Berbel, P., Miñarro, J., Manzanares, J., (2013). CB1 cannabinoid receptor-mediated aggressive behavior. *Neuropharmacology*, 75: 172-180.

289. Cassano, T., Gaetani, S., Macheda, T., Laconca, L., Romano, A., Morgese, M.G., Cimmino, C.S., Chiarotti, F., Bambico, F.R., Gobbi, G., (2011). Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase-deficient mice. *Psychopharmacology*, 214: 465-476.
290. Manduca, A., Servadio, M., Campolongo, P., Palmery, M., Trabace, L., Vanderschuren, L.J., Cuomo, V., Trezza, V., (2014). Strain-and context-dependent effects of the anandamide hydrolysis inhibitor URB597 on social behavior in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 24: 1337-1348.
291. Marco, E.M., Rapino, C., Caprioli, A., Borsini, F., Maccarrone, M., Laviola, G., (2011). Social encounter with a novel partner in adolescent rats: activation of the central endocannabinoid system. *Behavioural brain research*, 220: 140-145.
292. Aliczki, M., Varga, Z.K., Balogh, Z., Haller, J., (2015). Involvement of 2-arachidonoylglycerol signaling in social challenge responding of male CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 232: 2157-2167.
293. Fontenot, J., Loetz, E., Ishiki, M., Bland, S.T., (2017). Monoacylglycerol lipase inhibition alters social behavior in male and female rats after post-weaning social isolation. *Behavioural brain research*.
294. Hauer, D., Schelling, G., Gola, H., Campolongo, P., Morath, J., Roozendaal, B., Hamuni, G., Karabatsiakis, A., Atsak, P., Vogeser, M., (2013). Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *Plos one*, 8: e62741.
295. Hill, M.N., Bierer, L.M., Makotkine, I., Golier, J.A., Galea, S., McEwen, B.S., Hillard, C.J., Yehuda, R., (2013). Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with post-traumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks. *Psychoneuroendocrinology*, 38: 2952-2961.
296. Neumeister, A., Normandin, M.D., Pietrzak, R.H., Piomelli, D., Zheng, M.-Q., Gujarrro-Anton, A., Potenza, M.N., Bailey, C.R., Lin, S., Najafzadeh, S., (2013). Elevated brain cannabinoid CB 1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Molecular psychiatry*, 18: 1034.
297. Pietrzak, R.H., Huang, Y., Corsi-Travali, S., Zheng, M.-Q., Lin, S.-f., Henry, S., Potenza, M.N., Piomelli, D., Carson, R.E., Neumeister, A., (2014). Cannabinoid

- type 1 receptor availability in the amygdala mediates threat processing in trauma survivors. *Neuropsychopharmacology*, 39: 2519.
298. Aliczki, M., Haller, J. (2015). Electric shock as model of post-traumatic stress disorder in rodents. In *Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorder*. (Springer), pp. 1-16.
  299. Josselyn, S.A., Kohler, S., Frankland, P.W., (2015). Finding the engram. *Nat Rev Neurosci*, 16: 521-534.
  300. Furini, C., Myskiw, J., Izquierdo, I., (2014). The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev*, 47: 670-683.
  301. Schiller, D., Levy, I., Niv, Y., LeDoux, J.E., Phelps, E.A., (2008). From fear to safety and back: reversal of fear in the human brain. *J Neurosci*, 28: 11517-11525.
  302. Abel, T., Lattal, K.M., (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 11: 180-187.
  303. Lee, S., Kim, S.-J., Kwon, O.-B., Lee, J.H., Kim, J.-H., (2013). Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Frontiers in neural circuits*, 7: 129.
  304. Amano, T., Unal, C.T., Paré, D., (2010). Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nature neuroscience*, 13: 489.
  305. LeDoux, J.E., (2014). Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 2871-2878.
  306. Sangha, S., (2015). Plasticity of fear and safety neurons of the amygdala in response to fear extinction. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9: 354.
  307. Pape, H.C., Pare, D., (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev*, 90: 419-463.
  308. Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., Quirk, G.J., (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 36: 529.
  309. Huff, M.L., Emmons, E.B., Narayanan, N.S., LaLumiere, R.T., (2016). Basolateral amygdala projections to ventral hippocampus modulate the

- consolidation of footshock, but not contextual, learning in rats. *Learning & memory*, 23: 51-60.
310. Sotres-Bayon, F., Sierra-Mercado, D., Pardilla-Delgado, E., Quirk, G.J., (2012). Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron*, 76: 804-812.
  311. Thierry, A.M., Gioanni, Y., Dégénétais, E., Glowinski, J., (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, 10: 411-419.
  312. Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., Ylinen, A., (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat: a review. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 911: 369-391.
  313. Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418: 530.
  314. Kamprath, K., Marsicano, G., Tang, J., Monory, K., Bisogno, T., Di Marzo, V., Lutz, B., Wotjak, C.T., (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *Journal of Neuroscience*, 26: 6677-6686.
  315. Pamplona, F.A., Takahashi, R.N., (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience letters*, 397: 88-92.
  316. Bitencourt, R.M., Pamplona, F.A., Takahashi, R.N., (2008). Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology*, 18: 849-859.
  317. Reich, C.G., Mohammadi, M.H., Alger, B.E., (2008). Endocannabinoid modulation of fear responses: learning and state-dependent performance effects. *Journal of Psychopharmacology*, 22: 769-777.
  318. Chhatwal, J.P., Gutman, A.R., Maguschak, K.A., Bowser, M.E., Yang, Y., Davis, M., Ressler, K.J., (2009). Functional interactions between endocannabinoid and

- CCK neurotransmitter systems may be critical for extinction learning. *Neuropsychopharmacology*, 34: 509.
319. Laricchiuta, D., Centonze, D., Petrosini, L., (2013). Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. *Behavioural brain research*, 256: 101-107.
320. Draycott, B., Loureiro, M., Ahmad, T., Tan, H., Zunder, J., Laviolette, S.R., (2014). Cannabinoid transmission in the prefrontal cortex bi-phasicly controls emotional memory formation via functional interactions with the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 34: 13096-13109.
321. Arenos, J.D., Musty, R.E., Bucci, D.J., (2006). Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *European journal of pharmacology*, 539: 177-183.
322. Mikics, E., Dombi, T., Barsvari, B., Varga, B., Ledent, C., Freund, T.F., Haller, J., (2006). The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behavioural pharmacology*, 17: 223-230.
323. Pamplona, F.A., Prediger, R.D., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 188: 641-649.
324. Kamprath, K., Plendl, W., Marsicano, G., Deussing, J., Wurst, W., Lutz, B., Wotjak, C., (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes, Brain and Behavior*, 8: 203-211.
325. Tan, H., Lauzon, N.M., Bishop, S.F., Bechar, M.A., Laviolette, S.R., (2009). Integrated cannabinoid CB1 receptor transmission within the amygdala–prefrontal cortical pathway modulates neuronal plasticity and emotional memory encoding. *Cerebral cortex*, 20: 1486-1496.
326. Sink, K., Segovia, K., Collins, L., Markus, E., Vemuri, V., Makriyannis, A., Salamone, J., (2010). The CB1 inverse agonist AM251, but not the CB1 antagonist AM4113, enhances retention of contextual fear conditioning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95: 479-484.



327. Segev, A., Akirav, I., (2011). Differential effects of cannabinoid receptor agonist on social discrimination and contextual fear in amygdala and hippocampus. *Learning & Memory*, 18: 254-259.
328. Jacob, W., Marsch, R., Marsicano, G., Lutz, B., Wotjak, C.T., (2012). Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of learning and memory*, 98: 47-55.
329. Höfelmann, D., Di Benedetto, B., Azad, S., Micale, V., Wotjak, C., Rammes, G., (2013). Lack of interaction of endocannabinoids and 5-HT3 neurotransmission in associative fear circuits of the amygdala: Evidence from electrophysiological and behavioural experiments. *brain research*, 1527: 47-56.
330. Tan, H., Lauzon, N.M., Bishop, S.F., Chi, N., Bechar, M., Laviolette, S.R., (2011). Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formation via functional inputs to the prelimbic cortex. *Journal of Neuroscience*, 31: 5300-5312.
331. Lin, Q.-S., Yang, Q., Liu, D.-D., Sun, Z., Dang, H., Liang, J., Wang, Y.-X., Chen, J., Li, S.-T., (2011). Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain research bulletin*, 86: 139-145.
332. Lisboa, S.F., Reis, D.G., da Silva, A.L., Corrêa, F.M., Guimaraes, F.S., Resstel, L.B., (2010). Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13: 1163-1173.
333. Uliana, D., Hott, S., Lisboa, S., Resstel, L., (2016). Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. *Neuropharmacology*, 103: 257-269.
334. de Oliveira Alvares, L., Genro, B.P., Diehl, F., Molina, V., Quilfeldt, J., (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, 154: 1648-1655.
335. Llorente-Berzal, A., Terzian, A.L.B., di Marzo, V., Micale, V., Viveros, M.P., Wotjak, C.T., (2015). 2-AG promotes the expression of conditioned fear via

- cannabinoid receptor type 1 on GABAergic neurons. *Psychopharmacology*, 232: 2811-2825.
336. Hartley, N., Gunduz-Cinar, O., Halladay, L., Bukalo, O., Holmes, A., Patel, S., (2017). 2-arachidonoylglycerol signaling impairs short-term fear extinction. *Translational psychiatry*, 6: e749.
  337. Lee, S.-H., Ledri, M., Tóth, B., Marchionni, I., Henstridge, C.M., Dudok, B., Kenesei, K., Barna, L., Szabó, S.I., Renkecz, T., (2015). Multiple forms of endocannabinoid and endovanilloid signaling regulate the tonic control of GABA release. *Journal of Neuroscience*, 35: 10039-10057.
  338. Aliczki, M., Haller, J. (2015). Interactions Between Cannabinoid Signaling and Anxiety: A Comparative Analysis of Intervention Tools and Behavioral Effects. In *Cannabinoid Modulation of Emotion, Memory, and Motivation*, P Campolongo, L Fattore, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 73-96.
  339. Arndt, S.S., Laarakker, M.C., van Lith, H.A., van der Staay, F.J., Gieling, E., Salomons, A.R., van't Klooster, J., Ohl, F., (2009). Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav*, 97: 385-393.
  340. Benton, D., Brain, P.F., (1981). Behavioral and adrenocortical reactivity in female mice following individual or group housing. *Dev Psychobiol*, 14: 101-107.
  341. Capanna, E., Corti, M., Mainardi, D., Parmigiani, S., Brain, P.F., (1984). Karyotype and intermale aggression in wild house mice: ecology and speciation. *Behav Genet*, 14: 195-208.
  342. Poshivalov, V.P., (1980). The integrity of the social hierarchy in mice following administration of psychotropic drugs. *Br J Pharmacol*, 70: 367-373.
  343. Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavon, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., Lichtman, A.H., Cravatt, B.F., (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*, 5: 37-44.
  344. Stern, C.A., Gazarini, L., Takahashi, R.N., Guimaraes, F.S., Bertoglio, L.J., (2012). On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37: 2132-2142.
  345. Morena, M., De Castro, V., Gray, J.M., Palmery, M., Trezza, V., Roozendaal, B., Hill, M.N., Campolongo, P., (2015). Training-Associated Emotional Arousal

- Shapes Endocannabinoid Modulation of Spatial Memory Retrieval in Rats. *J Neurosci*, 35: 13962-13974.
346. Morena, M., Leidl, K.D., Vecchiarelli, H.A., Gray, J.M., Campolongo, P., Hill, M.N., (2016). Emotional arousal state influences the ability of amygdalar endocannabinoid signaling to modulate anxiety. *Neuropharmacology*, 111: 59-69.
347. Lambert, K.G., Tu, K., Everette, A., Love, G., McNamara, I., Bardi, M., Kinsley, C.H., (2006). Explorations of coping strategies, learned persistence, and resilience in Long-Evans rats: innate versus acquired characteristics. *Ann N Y Acad Sci*, 1094: 319-324.
348. Hawley, D.F., Bardi, M., Everette, A.M., Higgins, T.J., Tu, K.M., Kinsley, C.H., Lambert, K.G., (2010). Neurobiological constituents of active, passive, and variable coping strategies in rats: integration of regional brain neuropeptide Y levels and cardiovascular responses. *Stress*, 13: 172-183.
349. Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 925-935.
350. Association, A.P. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition Edition*. American Psychiatric Publishing, Arlington, VA, 2013: 271-280.
351. Paxinos, G., Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition*. Academic Press, Spiral Bound, 1998., New York.
352. Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., Parolaro, D., (2011). Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology*, 60: 235-243.
353. McLaughlin, R., Hill, M., Dang, S., Wainwright, S., Galea, L., Hillard, C., Gorzalka, B., (2013). Upregulation of CB1 receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. *Behavioural brain research*, 237: 333-337.
354. Aliczki, M., Barna, I., Till, I., Baranyi, M., Sperlagh, B., Goldberg, S.R., Haller, J., (2016). The effects anandamide signaling in the prelimbic cortex and

- basolateral amygdala on coping with environmental stimuli in rats. *Psychopharmacology*, 233: 1889-1899.
355. Bedse, G., Romano, A., Tempesta, B., Lavecchia, M.A., Pace, L., Bellomo, A., Duranti, A., Micioni Di Bonaventura, M.V., Cifani, C., Cassano, T., (2015). Inhibition of anandamide hydrolysis enhances noradrenergic and GABAergic transmission in the prefrontal cortex and basolateral amygdala of rats subjected to acute swim stress. *Journal of neuroscience research*, 93: 777-787.
  356. Mikics, É., Kruk, M.R., Haller, J., (2004). Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 29: 618-635.
  357. Zygmunt, P.M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D.A., Simonsen, C., Jönsson, B.A., Blomgren, A., Birnir, B., Bevan, S., Eschalier, A., (2013). Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*, 8: e81618.
  358. Haller, J., Aliczki, M., Pelczer, K.G., Spitzer, K., Balogh, Z., Kantor, S., (2014). Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 593-601.
  359. Mazzola, C., Medalie, J., Scherma, M., Panlilio, L.V., Solinas, M., Tanda, G., Drago, F., Cadet, J.L., Goldberg, S.R., Yasar, S., (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR- $\alpha$  nuclear receptors. *Learning & memory*, 16: 332-337.
  360. Wise, L.E., Harloe, J.P., Lichtman, A.H., (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) knockout mice exhibit enhanced acquisition of an aversive, but not of an appetitive, Barnes maze task. *Neurobiology of learning and memory*, 92: 597-601.
  361. Morena, M., Roozendaal, B., Trezza, V., Ratano, P., Peloso, A., Hauer, D., Atsak, P., Trabace, L., Cuomo, V., McGaugh, J.L., (2014). Endogenous cannabinoid release within prefrontal-limbic pathways affects memory consolidation of emotional training. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 18333-18338.
  362. Jasnow, A.M., Ehrlich, D.E., Choi, D.C., Dabrowska, J., Bowers, M.E., McCullough, K.M., Rainnie, D.G., Ressler, K.J., (2013). Thy1-expressing

- neurons in the basolateral amygdala may mediate fear inhibition. *Journal of Neuroscience*, 33: 10396-10404.
363. Beyeler, A., Namburi, P., Glober, G.F., Simonnet, C., Calhoun, G.G., Conyers, G.F., Luck, R., Wildes, C.P., Tye, K.M., (2016). Divergent Routing of Positive and Negative Information from the Amygdala during Memory Retrieval. *Neuron*, 90: 348-361.
364. Namburi, P., Al-Hasani, R., Calhoun, G.G., Bruchas, M.R., Tye, K.M., (2016). Architectural Representation of Valence in the Limbic System. *Neuropsychopharmacology*, 41: 1697-1715.
365. Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoun, G.G., Halbert, S.A., Wichmann, R., Holden, S.S., Mertens, K.L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A.C., Wickersham, I.R., Gray, J.M., Tye, K.M., (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520: 675-678.
366. Di, S., Itoga, C.A., Fisher, M.O., Solomonow, J., Roltsch, E.A., Gilpin, N.W., Tasker, J.G., (2016). Acute stress suppresses synaptic inhibition and increases anxiety via endocannabinoid release in the basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*, 36: 8461-8470.
367. Munguba, H., Cabral, A., Leão, A., Barbosa, F., Izídio, G., Ribeiro, A., Silva, R., (2011). Pre-training anandamide infusion within the basolateral amygdala impairs plus-maze discriminative avoidance task in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 95: 527-533.
368. Whissell, P.D., Cajanding, J.D., Fogel, N., Kim, J.C., (2015). Comparative density of CCK-and PV-GABA cells within the cortex and hippocampus. *Frontiers in neuroanatomy*, 9: 124.
369. Barsy, B., Szabó, G.G., Andrási, T., Vikór, A., Hájos, N., (2017). Different output properties of perisomatic region-targeting interneurons in the basal amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 45: 548-558.
370. Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R., (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research*, 1071: 10-23.

371. Li, Y., Kim, J., (2016). CB2 cannabinoid receptor knockout in mice impairs contextual long-term memory and enhances spatial working memory. *Neural plasticity*, 2016.
372. Onaivi, E.S., Ishiguro, H., GONG, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074: 514-536.
373. Stern, C.A., da Silva, T.R., Raymundi, A.M., de Souza, C.P., Hiroaki-Sato, V.A., Kato, L., Guimaraes, F.S., Andreatini, R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J., (2017). Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. *Neuropharmacology*, 125: 220-230.
374. Ratano, P., Petrella, C., Forti, F., Passeri, P.P., Morena, M., Palmery, M., Trezza, V., Severini, C., Campolongo, P., (2018). Pharmacological inhibition of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis enhances memory consolidation in rats through CB2 receptor activation and mTOR signaling modulation. *Neuropharmacology*, 138: 210-218.

## X. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Balogh, Z., Szente, L., Biro, L., Varga, Z.K., Haller, J., Aliczki, M., (2019). Endocannabinoid interactions in the regulation of acquisition of contextual conditioned fear. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 90: 84-91. **IF: 4,185**
2. Aliczki, M., Varga, Z.K., Balogh, Z., Haller, J., (2015). Involvement of 2-arachidonoylglycerol signaling in social challenge responding of male CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 232: 2157-2167. **IF: 3,540**
3. Haller, J., Aliczki, M., Pelczar, K.G., Spitzer, K., Balogh, Z., Kantor, S., (2014). Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 593-601. **IF: 3,875**

Egyéb közlemények:

1. Aliczki, M., Fodor, A., Balogh, Z., Haller, J., Zelena, D., (2014). The effects of lactation on impulsive behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Horm Behav*, 66: 545-551. **IF: 4,632**
2. Fodor, A., Barsvari, B., Aliczki, M., Balogh, Z., Zelena, D., Goldberg, S.R., Haller, J., (2014). The effects of vasopressin deficiency on aggression and impulsiveness in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 47: 141-150. **IF: 4,944**
3. 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. *Behav Pharmacol*, 23: 348-357. **IF: 2,301**

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Aliczki Manónak, aki már kilenc éve töretlenül támogatja és segíti szakmai fejlődésemet. Az ő iránymutatása nélkül nem sajátíthattam volna el a tudományos munka alapvetéseit és különösen hálás vagyok azért, hogy minden esetben, bármilyen kérdéssel, bizalommal fordulhattam hozzá az évek folyamán. Mentorom volt a szó legnemesebb értelmében, segítsége nélkül nem tarthatnék ott, ahol most.

Hálás vagyok témavezetőmnek Dr. Haller Józsefnek, hogy a kutatócsoportjában zajló munkába már másodéves egyetemi hallgatóként becsatlakozhattam.

Szeretném megköszönni és nagyon hálás vagyok Dr. Mikics Évának, hogy megadta a lehetőséget és biztosította az időt disszertációm elkészítéséhez kutatócsoportjában.

A disszertációban bemutatott eredményeket nem érhattük volna el Biró László, Sente László és Varga Zoltán hallgatótársaim és barátaim közreműködése nélkül, akik egyedi meglátásaikkal és áldozatos munkájukkal nagyban hozzájárultak az elért eredményekhez.

Szeretném továbbá megköszönni az MTA-KOKI Magatartásélettan és Stressz, valamint Transzlációs Magatartás Idegtudomány kutatócsoportjaiban dolgozó minden munkatársamnak, hogy olyan légkör jöhetett létre, melyben élmény volt dolgozni és közösen új felfedezéseket tenni, legyenek azok bármilyen aprók vagy nagyok.

Nagyon hálás vagyok és köszönettel tartozom családomnak, akik minden támogatást megadtak annak érdekében, hogy azzal foglalkozhassak, amit szeretek. Különösen hálás vagyok feleségemnek, Annának, hogy biztatásával a holtponatokon átsegített és mindvégig mellettem állt.