

# **A felnőttkori hippokampális neurogenesis vizsgálata krónikus stressz és perifériás gyulladás egérmodelljeiben**

**Doktori (PhD) értekezés**



**Rusznák Kitti**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője, Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Czéh Boldizsár

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs

2023

### 1. A felnőttkori hippocampális neurogenesis és vizsgálata

A központi idegrendszer fejlődése bonyolult, időben és térben pontosan szabályozott dinamikus folyamat, amely genetikai, környezeti, biokémiai és fizikai tényezők precízen összehangolt sorozatát foglalja magában a korai embrionális stádiumtól a születés utáni életig (Greig et al., 2013). Ugyanakkor az őssejtek egy kis csoportja az egész élet során fennmarad és plaszticitást biztosítanak az idegrendszer működéséhez, javításához és megváltoztatásához (Gage és Temple, 2013). Az embrionális és korai posztnatális idegi őssejtek (*neural stem cells*, NSC) neuronokat és gliasejteket generálnak majd a proliferatív és multipotens NSC-k átalakulnak teljesen differenciált neuronokká vagy gliasejteké. Emlős élőnyek agyában a neuronok a korai embrionális fejlődéstől a korai posztnatális stádiumig keletkeznek, és csak néhány neurogén zóna marad aktív felnőttkorban is (Urbán és Guillemot, 2014). A felnőtt agyban, bizonyos agyi struktúrákban az őssejtek egy igen kis száma fennmarad, és ezek hozzájárulnak bizonyos neuronok (és gliasejtek) folyamatos képződéséhez. Ezt a folyamatot nevezzük **felnőttkori neurogenesisnek**. Az neuronális őssejtek képezik az embrionális és a felnőttkori neurogenesis eredetét is (Engler et al., 2018), bár egyes elméletek szerint a felnőtt agyban már nem léteznek igazi őssejtek, csak neuronális progenitor sejtek. Az elmúlt 25 év egyik mérföldkönek számító eseménye az idegtudományi kutatásban a neuronális őssejtek kifejezés létrehozása volt, mint a neuronok és a glia egész életen át tartó forrása, és ez a koncepció szétzúzta azt a dogmát, miszerint az idegrendszernek nincs regeneratív ereje.

A felnőttkori neurogenesis az elmúlt évtizedek egyik legjobban kutatott idegtudományi területévé nőtte ki magát (Yun et al., 2016). Felnőttkori neurogenesis emberben feltételezhetően nagyon ritka jelenség és az öregedéssel fordított arányban áll, így az életkor előrehaladtával az új idegsejtek képződésének mértéke jelentősen lecsökken (Isaev et al., 2018). Progenitor sejtek osztódása majd differenciálódása során alakulnak ki az új neuronok melyek beépülnek a neuronhálózatba. Csupán 40-50%-uk tud integrálódni, a többi újszülött neuron elpusztul (Biebl et al., 2000). A felnőtt, érett agy hippocampusz gyurus dentatusában, valamint a laterális agykamrák subventrikuláris zónájában képződnek új idegsejtek. A subgranuláris zóna újszülött neuronjai a gyurus dentatus granuláris sejtrétegébe vándorolnak, míg a subventrikuláris zónából származó új neuronok a szaglógumó felé migrálnak. Az idegi őssejtek egyik csoportjából fejlődnek az új idegsejtek egy egyedülálló és specializált mikro környezetben, amely "neurogén niche" néven ismert (Bátiz et al., 2016).

## 2. Ízületi gyulladás és hatásai

Ízületi gyulladás (arthritis) az ízületek heveny (akut) vagy idült (krónikus) formában megnyilvánuló gyulladásos reakciója, amely az érintett ízület duzzanatával, bőrpirosodásával, melegségével, fájdalmával és funkciójának csökkenésével jár. Gyulladás esetén az ízületi tokot belülről határoló ízületi hártya gyulladása miatt az ízületi folyadék felszaporodik, ez okozza a duzzanatot, valamint a feszülés miatt érzünk fájdalmat. Krónikus állapotnál általában jelentős mozgáskorlátozottság, fájdalom, ízület merevség és deformitás léphet fel (Harth és Nielson, 2019, Tang, 2019).

A reumatoid arthritisz, a krónikus ízületi gyulladások egy tisztázatlan etiológiájú szisztémás krónikus gyulladásos betegsége, amely progresszív és destruktív poliarthritisben manifesztálódik és az egyik legnagyobb egészségügyi probléma világszerte a magas prevalencia és a nem túl hatékony terápiás lehetőségek miatt. Krónikus fájdalom és ízületi károsodás jellemzi, amely rendszerint a disztálisról a proximálisabb ízületek felé halad (Kourilovitch et al., 2013). A reumatoid arthritisz éves előfordulási gyakorisága körülbelül 40/100 000 fő világszerte, a nőket két-háromszor nagyobb arányban érinti, mint a férfiakat (Ospelt et al, 2017). Az ízületi gyulladásban szenvedő betegek számára a fájdalom a leggyakoribb panasz (Horváth et al., 2016). Ebből kifolyólag a gyulladásos ízületi rendellenességek súlyosan ronthatják az életminőséget. A korai szakasz az érintett ízületek körüli ödéma és érzékenység jellemzi, melyeket később akár progresszív, visszafordíthatatlan degeneráció és csontok átalakulása kísérhet (Botz et al., 2014).

A reumatoid arthritisz patogenezisét tekintve, mint sok más betegségnél is, úgy jelen esetben is a genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatása immunreakciók kaszkádját eredményezi. A betegségekre való fogékonyságot okozó genetikai tényezők közt a HLA fő hisztokompatibilitási komplex génjeit azonosították, emellett egyéb citokin-promoterek és T-sejt jelátviteli gének is részt vesznek a patogenezisben (Gregersen et al., 1987). A betegség leginkább a kéz és a láb ízületeit érinteti. Egészséges állapotban az egy-két sejtrétegből álló speciális kötőszövet a szinoviális membrán termeli az ízületi folyadékot, amely segíti az ízületek mozgását és csökkenti a porcfelületek súrlódását. Reumatoid arthritisz során ez a membrán megvastagodik, illetve a gyulladás hatására megjelennek a T- és B-sejtek, a fibroblasztok, a monociták, és makrofágok (Strand et al., 2007). Mivel az autoimmunitás fontos szerepet játszik a betegség patogenezisében, ezért az így termelődött antitestek aktiválják a komplement rendszert és a gyulladásos citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) termelődését is. Ezeknek a citokineknek köszönhetően felszaporodnak mátrix-metalloproteázok (MMP) melyek hatására kialakul a porckopás és a szabad csontfelszín, így a csont eróziója is elkezdődik (Dolati et al., 2016, Harre et al., 2012).

A komplett Freund adjuváns (complete Freund adjuvant, CFA) egy olyan antigéneket tartalmazó parafinolajos szuszpenzió, amely előtt *Mycobacterium tuberculosis*-t tartalmaz melyek vonzzák a makrofágokat és egyéb antitesteket az injekció helyére, így fokozva az immunválaszt. A CFA beadásával hosszan tartó nocicepció indukálható mely glia aktivizációval, gyulladáscsökkentő mediátorok és gyulladást elősegítő citokinek (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  és IL-6) termelődésével jár a perifériás szövetben, valamint termikus és mechanikus hiperalgéziát vált ki (Zucoloto et al., 2019). A CFA-val kiváltott ízületi gyulladás egy jól bevált gyulladással állatmodell, amelyet számos immunmoduláns és gyulladáscsökkentő gyógyszer tesztelésére használnak napjainkban. A szuszpenziót intraplantárisan és faroktőbe adva reumatoid artritiszhez hasonló gyulladással mechanizmusokkal destruktív monoarthritis indukálható egérben, ahol a gyulladási mechanizmusok akut és krónikus állapotban is vizsgálhatóak (Billiau al., 2001). Jelen kutatásunkban ezt az állatmodellt alkalmazzuk mert a perifériás gyulladás hatásait akartuk vizsgálni és többek között *in vivo* is bizonyítható a gyulladás megléte. Mindezen túl gyakori betegség, amely összefügghet a depresszióval is.

### 3. A *cannabis*, az endokannabinoid rendszer

A marihuána az egyik legszélesebb körben használt tiltott élvezeti szer és a Föld lakosságának körülbelül 2,5 %-a fogyasztja rendszeresen valamilyen formában (UNODC, 2017). A közelmúltban a *cannabis* használatot egyre több országban legalizálták gyógyászati és rekreációs célokra (Carliner et al., 2017; EMCDDA, 2017; Webster, 2018) ami megnövekedett fogyasztást eredményez, miközben az egészségre gyakorolt hosszútávú hatásai még nem teljesen ismertek (Volkow et al., 2014, 2016; Levine et al., 2017). Ezért is fontos megvizsgálni a marihuánafüst hosszantartó használatának következményeit. A kannabidiolt (CBD), amely a *Cannabis sativa* egyik fő alkotóeleme és az endokannabinoid rendszer résztvevője, egyre gyakrabban tekintik a szorongás kezelésének lehetséges terápiás megoldásának (Blessing et al., 2015; Lee et al., 2017; Patel et al., 2017) mivel több kutatás szerint a kannabinoid jelátvitel elősegítése megelőzheti a stressz által kiváltott viselkedési változásokat (Campos et al., 2013; Scarante et al., 2017; Fogaça et al., 2018). A marihuána szorongásoldó hatékonysága máig vitatott kérdés mivel több kutatási eredmény szerint a marihuána által kiváltott öt mellékhatás közül az egyik maga a szorongás (Turna et al., 2017). A *cannabis* használatból adódó kognitív funkciók javítása vagy éppen károsodások közötti összefüggések is szintén vitatott témakör a kutatók körében. Számos klinikai és preklinikai kutatás szerint szoros összefüggés lehet a marihuána expozíció és a csökkent kognitív képességek között (Broyd et al., 2016; Curran et al., 2016; Volkow et al., 2016). A marihuána használata nem csak a kognitív funkciókra lehet káros hatással, hanem kiválthatja az agy makrostrukturális elváltozásait is. Megváltoztathatja a szürkeállomány morfológiáját, a fehérállományi traktus integritását is. Továbbá olyan rendellenes agyi működéseket eredményezhet, mint a fokozott agyi aktiváció, vagy rendellenes

neurovaszkuláris működést indukálhat (Jacobus et al., 2012). Mindezekkel szemben egyes kutatások szerint a *cannabis* használat pozitívan hat különböző kognitív és végrehajtó funkciókra (Osborne et al., 2017; Gruber et al., 2018; Tervo-Clemmens et al., 2017). Továbbá, vita tárgyát képezik a rendszeres marihuánafüst belélegzésének légútra gyakorolt hatásai, valamint, hogy a tüdőrák kialakulására megnövekedett kockázati tényezőt jelentene (Gates et al., 2014; Martinasek et al., 2016; Chatkin et al., 2017; Stone et al., 2018). Ellentmondásos kutatási eredményeket olvashatunk a *cannabis* használat testsúlyra gyakorolt hatásairól is. Már ismert, hogy a marihuána fogyasztása serkenti az étvágyat és elősegíti a súlygyarapodást a humán immunhiányos vírussal (HIV) rendelkező-, vagy rákban szenvedő betegeknél. Ezzel szemben a népesség körében végzett kiterjedt epidemiológiai vizsgálatok eredményei pedig azt mutatják, hogy a marihuána fogyasztók általában alacsonyabb testtömeg-indexekkel rendelkeznek (Sansone, 2014).

Az endokannabinoid rendszer központi szerepet játszik az egészséges fejlődő idegrendszer kialakulásában, valamint felnőttkorban modulálja az idegrendszeri hálózatok aktivitását és működést. Az endokannabinoid rendszer endogén kannabinoidokból vagyis az endokannabinoidokból, kannabinoid receptorokból és az endokannabinoidokat szállító, szintetizáló és lebontó fehérjékből áll, és az endokannabinoid rendszer számos más jelátviteli útvonalat befolyásol (Lu és Mackie, 2020). A kannabinoidok közé tartoznak a *Cannabis sativa* növény aktív összetevői, az endokannabinoidok és a szintetikus kannabinoidok is. Az idegi kannabinoid rendszer receptor–ligandum és receptor–receptor kölcsönhatások összetett sorozatát alkotja, amelyek különféle jelátviteli utakat is magukba foglalnak, mint például a növekedési faktor receptor és a G-protein receptor jelátvitelt, amelyek a fiziológiai folyamatok széles skáláját szabályozzák, például a felnőttkori neurogenézist is. A kannabinoidok a G-fehérjéhez kapcsolt 1-es és 2-es típusú kannabinoid receptorok aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat (CB1, illetve CB2 típusú receptorok), amelyek a központi idegrendszerben lokalizálódnak asztrocitákon, mikrogliaikon és neuronokon is (Prenderville et al., 2015). A kannabinoid receptorok nagymértékben expresszálódnak a hippokampusban is. A kutatások eredményei szerint a különféle kannabinoid ligandumok szabályozzák a sejtgenézist és a neurogenézist is az emlős agyban (Campos et al., 2013).

#### **4. Stressz hatásai a központi idegrendszerre**

A mai rohanó világunkban már-már elfogadott, hogy mindennapi stressznek vagyunk kitéve. Szervezetünk stressznek éli meg a számunkra kellemetlen, fenyegető vagy veszélyes eseményeket legyen az akár külső tényező vagy a testünkben zajló folyamat (McEwen et al., 1998). A stressz hatására rövid távon mind a glükokortikoidok, mind a katekolaminok akut emelkedése segít a szervezet egészét felkészíteni a stresszhatás kivédésére, valamint elősegíti a

stresszes események emlékké alakítását ezáltal egy védelmi funkciót is ellátnak (McGaugh et al., 2000, Roozendaal et al., 2000). A hippocampusz részt vesz az epizodikus, deklaratív, kontextuális és térbeli tanulásban és memóriában, valamint szerepet játszik az autonóm és vegetatív funkciók, például az ACTH szekréció szabályozásában is (Eichenbaum et al., 1992, Sapolsky et al., 1992), ezért hosszútávon a stresszhormonok és különösen a glükokortikoidok hozzájárulnak a kognitív funkciók károsodásához és az agyi struktúrák, például a hippocampusz károsodásához is (McEwen et al., 1995, Sapolsky et al., 1992). Többek között a hippocampusz neuronjai is expresszálják a mellékvese szteroidok receptorait. Kétféle mellékvese hormon receptort különböztetünk meg: az I. típusút (mineralokortikoid) és a II. típusút (glükokortikoid), melyek megtalálhatóak a hippocampuszban is és ezek a receptorok a neuronok ingerlékenységére gyakorolt különféle hatásokat közvetítenek, neurokémia- és szerkezeti plaszticitás változásokat eredményeznek (DeKloet et al., 1998). A hormonok által közvetített hatások nem csak a génexpresszióra vannak hatással, hanem a piramissejtek dendritjeinek átrendeződésére is az Ammon-szarvban (Kerr et al., 1992, McEwen et al., 2000). Akut stressz esetén az agy próbál a változó körülményekhez alkalmazkodni. Krónikus stressz esetén a plaszticitás sérül és az agy kevésbé lesz képes adaptálódni. A hosszantartó stressz hatására a lokális neurotranszmitterek, valamint a szisztémás hormonok kölcsönhatásba lépve strukturális és funkcionális változásokat idéznek elő az agyban, amelyek magukban foglalják a hippocampusz neurogenesis gátlását is (McEwen et al., 2000). Stressznek kitett patkányoknál továbbá megfigyelhetők olyan morfológiai elváltozások is mint például a gyrus dentatus, CA1 és CA3 régiók neuronjainak dendritfa zsugorodása, dendritfán lévő tüskék számának csökkenése melyek hatására a szinapszisok száma is lecsökken, így az ingerültvezetési képesség már nem olyan hatékony, mint ép állapotban (Joëls et al., 2007). A hippocampusz felnőttkori neurogenesis a neuroplaszticitás egyedülálló formája és az elmúlt húsz évben jelentős figyelmet kapott. Ezek a felnőttkorban újonnan született neuronok alapvető szerepet játszanak a normál kognitív működésben és a tanulásban (Denny et al., 2014; Anacker és Hen, 2017). A stressz erőteljesen gátolja a prekursor sejtek proliferációját, és gátolja az újonnan keletkezett neuronok túlélését is (Gould et al., 1997; Czéh et al., 2001, 2002; Cameron és Schoenfeld, 2018) és ezekből a kutatási eredményekből azt feltételezhetjük, hogy a neurogenesis gátlása révén a stressz szerepet játszhat különféle pszichiátriai rendellenességek kialakulásában, mint például a depresszióban, a szorongásban vagy a skizofréniában (Santarelli et al., 2003; Snyder et al., 2011; Surget et al., 2011; Kim et al., 2012; Schoenfeld and Cameron, 2015).

## **2.) Célkitűzések**

### **1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre**

Kutatásunk legfőbb célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a periférián zajló gyulladás hogyan hat a központi idegrendszerre mivel erre irányuló kísérletes eredmények igen ellentmondásosak a szakirodalomban. Emellett célunk, hogy feltérképezzük, hogy az akut és krónikus ízületi gyulladásnak milyen hatásai vannak az egerek központi idegrendszerére és a felnőttkori neurogenesisre a hippocampusban.

Továbbá kutatásunk során szeretnénk bizonyítani azt a hipotézisünket, mely szerint a perifériás gyulladás hatására a periférián megjelent gyulladásos citokinek átjutnak a vér-agy gáton, vagy az agyban a gyulladásos citokinek expresszálódnak.

#### **Hipotézisek**

1. A periférián kialakult ízületi gyulladás negatívan hat a központi idegrendszerre, gátolja a neurogenesiset és ezzel párhuzamosan neuroinflammatorikus választ vált ki a hippocampusban.
2. A perifériás gyulladás hatására a központi idegrendszerben is fokozódni fog a citokinek mennyisége.

### **2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippocampális neurogenesisre**

A fiatal felnőtt társadalom azon része, akik rendszeresen marihuánát használnak, azok szerint a marihuána oldja a stresszt ezért kutatásunk legfőbb célkitűzése az volt, hogy életszerű körülményeket imitáljunk ezért tehát kísérleti egereket több héten keresztül naponta stresszeltünk és a stressz expozíció végén az állatok marihuánafüstöt inhaláltak. Azt vizsgáltuk, hogy milyen hatása van a krónikus stressz és/vagy krónikus marihuánafüst expozíciónak a felnőttkori neurogenesisre. Ezen felül vizsgáltuk még a marihuánafüst expozíció hatását az állatok életműködésére (súlygyarapodás) és egészségi állapotára (légzésfunkciós tesztek) valamint az állatok magatartására kifejtett hatást is, részben kognitív magatartási tesztekkel, részben az állatok szorongási szintjét mérő vizsgálatokkal.

#### **Hipotézisek**

1. A marihuánafüstnek stresszoldó hatása van.
2. A marihuánafüstöt inhalált egereknél károsodik a légzésfunkció.

3. A krónikus stressznek kitett állatok súlygyarapodása csökken, a marihuána expozíciónak kitett állatoknál a súlygyarapodás fokozódik a kontroll egerekhez képest.
4. A krónikus marihuánafüst expozíció serkenti a neurogenezist, a krónikus stressz pedig gátolja azt.
5. A marihuánafüst hatására változnak - sérülnek vagy javulnak - a kognitív funkciók.



## **2.) Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek**

### **1. Felhasznált Állatok**

#### **1.1. Arthritisz állatmodell során használt egerek**

A kutatás során 82 darab fiatal felnőtt (8-12 hetes) hím C57BL6/J törzsből származó laboratóriumi egeret (*Mus musculus*) használtunk fel. A kísérlet végzésére etikai engedéllyel rendelkeztek melynek engedélyszáma: BA02/2000-28/2020 volt.

A kísérleti állatokat akut (7 napig tartó) és krónikus (21 napig tartó) kezelésnek tettük ki őket, mindkét csoportnál voltak kontroll és CFA-val kezelt állatok tehát 4 különböző csoportra osztottuk a randomizálás szabályai szerint: **1.) akut kontroll csoport, 2.) akut CFA csoport, 3.) krónikus kontroll csoport, 4.) krónikus CFA csoport.**

#### **1.2. Krónikus stressz és marihuána expozíció során felhasznált egerek**

A kutatás során 36 darab felnőtt hím NMRI törzsből származó laboratóriumi egeret (*Mus musculus*) használtunk fel. A kísérlet végzésére állatetikai engedéllyel rendelkeztek melynek engedélyszáma: BA02/2000-35/2016 volt.

A kutatás során az egereket 4 különböző csoportra osztottuk a randomizálás szabályai szerint: **1.) kontroll csoport 2.) stressz csoport, 3.) cannabis csoport, 4.) stressz+cannabis csoport.**

### **2. Kísérleti modellek**

#### **2.1. Komplet Freund adjuváns (CFA)-indukált arthritisz modell**

CFA-modell elterjedt krónikus ízületi gyulladásos modell. A Komplet Freund adjuváns 1 mg/ml koncentrációban tartalmaz hővel előlt Mycobacterium tuberculosis-t egy paraffinolajos szuszpenzióban (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), amelyből egereknek 20µl mennyiséget a jobb hátsó talpába és faroktőbe subcutan injekcióval adva reumatoid arthritiszhez hasonló gyulladásos mechanizmusokkal destruktív monoarthritisz indukálható.

#### **2.2. Marihuánafüst expozíciós állatmodell**

A marihuána expozícióhoz, hogy életszerű helyzetet imitáljunk, egy teljes test marihuánafüst expozíciós modellt választottuk. Az expozíció hétköznaponként történt, napi 2x30 percig, 2 hónapon keresztül. Egy expozíció során egyszerre 2 szál, cigarettánkként 0,8 grammnyi marihuána égett el 10 perc alatt (2 másodperces pöfékelési időtartammal, 1/perc/cigaretta pöfékelési gyakorisággal), melynek füstjét 30 percen keresztül inhalálták be az állatok.

### **2.3. Kónikus stressz modell**

Az egereket naponta 6 órán keresztül immobilizáltuk reggel 8:00 és 14:00 óra között. Az immobilizációs stressz alatt az egerek élelem és víz nem állt a rendelkezésükre, nem tudtak mozogni és tisztálkodni. A kontroll egerek nem voltak kitéve semmilyen stressznek, kivéve a mindennapi kezelést.

## **3. In vivo mérések**

### **3.1. In Vivo technikák a perifériás gyulladás igazolására**

#### **3.1.1 Mechanikai hiperszenzitivitás mérés (DPA)**

A hátsó végtagon, a mechanikai túlérzékenységet dinamikus plantáris eszteziométerrel határoztuk meg (DPA, Ugo Basile Dynamic Plantar 37400, Comerio, Italy). A mechanonociceptív küszöbértékeket grammban (g) fejeztük ki.

#### **3.1.2. Elhárító reakció latenciaidejének mérése (Hot Plate)**

Az elhárító reakció latenciaidejét állandó (50°C) hőmérsékletű forró lappal (*hot plate*, IITC Life Science Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) határoztuk meg. Termonociceptív küszöbnek megfelelő időpontot leolvastuk a készülék kijelzőjéről.

#### **3.1.3. Lábtérfogat meghatározása**

A lábtérfogat mérését pletizmómméterrel végeztük (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Italy). Az állat hátsó lábát előre meghatározott jellegű egy ehhez a műszerhez tartozó folyadékkal teli hengerbe merítettük. A műszer érzékelte a folyadéktérfogatkiszorítást.

#### **3.1.4. Spontán súlyeloszlás meghatározása**

A hátsó lábakra való spontán nehézkes mértékét BioSeb tehetetlenség teszt (Vitrolles, Franciaország) segítségével állapítottuk meg.

#### **3.1.5. In vivo optikai képalkotás**

A neutrofil mieloperoxidáz (MPO) aktivitását biolumineszcens *in vivo* képalkotással vizsgáltuk (IVIS Lumina II, PerkinElmer, Waltham, USA). Luminolt (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinindion) valamint a makrofág NADPH oxidáz aktivitás kimutatására i.p. lucigenin (bis-N-metil-akridinium-nitrát) biolumineszcens kontrasztanyagot használunk. Az adatokat a Living Image® szoftver segítségével elemeztük (Perkin-Elmer, Waltham, USA) és a ROI-kból származó értékeket tüntetjük fel a grafikonokon.

### **3.2. Légzésfunkció vizsgálat**

A légzésfunkciós vizsgálatot teljes test pletizmográfia segítségével végeztük (PLY 3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, Egyesült Királyság) éber, spontán lélegző állatban, a két hónapos kezelés időtartama kezdetén intakt mérésenként, majd kísérlet alatt az első, valamint a második hónap végén. Minden mérést ön-kontrollos módon végeztünk el az összes állaton.

### **3.3. Magatartási vizsgálatok**

#### **3.3.1. Y-útvesztő teszt (Y-maze test)**

Az egereket magatartás vizsgálatoknak vetettük alá hétvégeként, mikor az állatokat nem érte akutan sem marihuána, sem stressz behatás. Az Y-útvesztő teszt az egerek rövid távú memóriájának felmérésére szolgál.

#### **3.3.2. Nyílt terep teszt (Open Field test, OF)**

A teszt az egerek szorongási szintjének vizsgálatára és lokomotoros aktivitás mérésére szolgál. A magatartás vizsgálatát új környezetben egy négyzet alapú dobozban végeztük.

#### **3.3.3. Új tárgy felismerési teszt (Novel Object Recognition Test, NOR)**

Az új tárgy-felismerési teszt, amely a kognitív funkciókat vizsgálja, különösen a felismerési memória értékelésére használják.

## **4. Post mortem szövettani módszerek**

### **4.1. Szövetek előkészítése immunhisztokémiai módszerekre**

Az állatok a perfundálás előtti 3. és 4. napon intraperitoneálisan BrdU injekciót kaptak (200mg/kg, ip). A BrdU egy timidin analóg vegyület, így beépül a DNS-be és az újonnan keletkező neuronok kimutathatóvá válnak. A leölés napján az egereket túllattuk ketamin-xylazin oldat intraperitoneális beadásával (0,1ml oldat / testtömeg gramm). Amikor az egerek nociceptív reflexei megszűntek megkezdtük a transzkardiális perfundációt.

### **4.2. BrdU immunhisztokémia**

Az immunhisztokémiai jelölés során Anti-BrdU antitestet (DAKO, Bu20a klón, katalógusszám: M074401) alkalmaztunk 1:5000-hez hígításban. Ez az immunhisztokémiai eljárást az avidin-biotin / diaminobenzidin vizualizációs módszerrel végeztük, így másodlagos antitestként biotinizált anti-egér IgG-t alkalmazunk.

### **4.3. Doublecortin immunhisztokémia**

Az immunhisztokémiai jelöléssel az éretlen neuronokat tesszük láthatóvá a gyrus dentatusban. Kecse anti-DCX antitestet alkalmaztunk 1:3000-hez hígításban. Ez az immunhisztokémiai eljárást az avidin-biotin / diaminobenzidin vizualizációs módszerrel végeztük, így másodlagos antitestként biotinizált anti-kecske IgG-t alkalmazunk.

### **4.4. Iba-1 immunhisztokémia**

Az Iba-1 immunhisztokémiai jelöléssel a mikrogliaikat tettük láthatóvá az agyszeleteken. A módszer megegyezik a fent említettekhez. A primer antitest poliklonális nyúl anti-Iba1 antitest volt. A másodlagos antitest anti-nyúl antitest volt.

### **4.5. CD68 immunhisztokémia**

A CD68 immunhisztokémiai jelöléssel az aktivált mikrogliaikat és makrofágokat tesszük láthatóvá a hippocampusban. A módszer lépései szinte megegyeznek az előzőekben leírtakkal, egyedüli különbség a felhasznált primer antitest volt. Az immunfestés során nyúl monoklonális anti-CD68 antitestet használtunk.

### **4.6. Az immunpozitivitás mértékének meghatározása**

Randomizálást és titkosítást követően a sejtszámlálást a NeuroLucida (7. verzió) rekonstrukciós rendszer (MicroBrightfield, Colchester, VT, USA) segítségével végeztük, amelyhez csatlakozott egy Nikon Eclipse fénymikroszkóp is, aminek a segítségével a sejteket 20-szoros nagyítás alatt vizsgáltuk. A sejtek mennyiségi meghatározásához módosított sztereológiai protokollt használtunk (Czéh et al., 2001).

## **5. Egyéb mérések**

### **5.1. Vérvizsgálat**

A leölés alkalmával szív punkcióval vért vettünk az állatokból és a csecsemőknél használatos 250µl-es K<sub>2</sub>EDTA csőben (Becton Dickinson, Magyarország) tároltuk. A vérelemzéseket egy automata kisállat hematológiai analizátorral (Sysmex XN-V) határoztuk meg. Az alábbi paramétereket mértük: Fehérvérsejt szám, vörösvérsejt szám, trombocita szám, hemoglobin koncentráció, neutrofil granulocita, bazofil granulocita, eozinofil granulocita, limfocita, valamint monocita szám és százalékos megoszlás.

### **5.2. A gyulladáshoz kapcsolódó citokinek koncentrációjának mérése**

A leölés alkalmával szövetmintákat gyűjtöttünk, hogy a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek koncentrációját megmérjük a boka-ízületben és a hippocampusban. Luminex multiplex immunoassay

vizsgálatot végzünk 8 jellegzetes gyulladássos citokin koncentrációjának meghatározására egy erre a kutatásra egyedileg tervezett Milliplex egér citokin / kemokin mágneses gyöngypanel segítségével. A vizsgált citokinek és kemokinek az alábbiak voltak: IL-1a, IL-4, IL-6, IL-10, KC, MIP-2, TNF-a, IL-16.

### **5.3. Vizelet marihuána tartalmának meghatározása**

A vizelet analitika a Pécsi Tudományegyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében történt. A delta-9-THC (tetrahydrocannabinol), cannabidol cannabinol, valamint 11-nor-9-carboxy-THC koncentrációt fluorimetriás polarizált immunvizsgálattal határoztuk meg.

### **5.4. Marihuánafüst összetevőinek meghatározása**

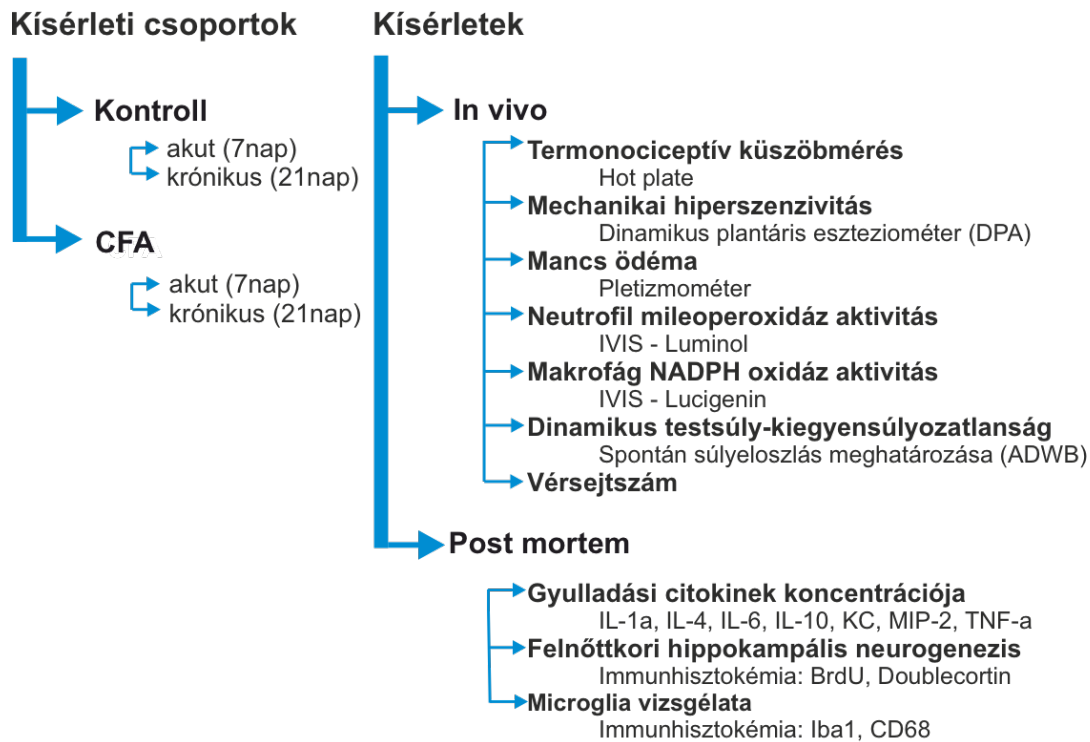
A nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) segítségével határoztuk meg a marihuána füst összetevőit.

## **6. Statisztikai elemzések**

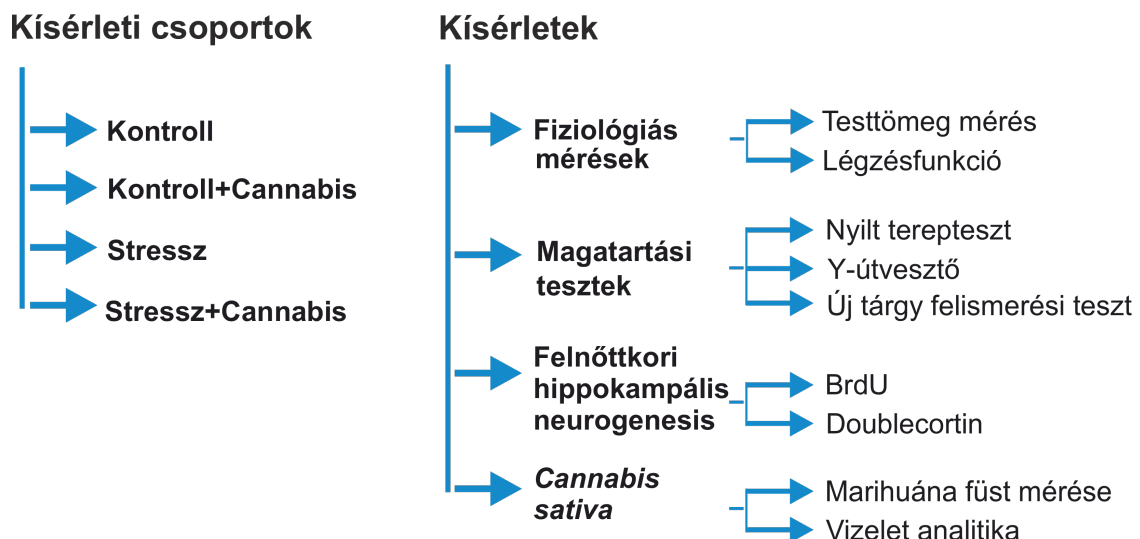
Az eredményeket átlag  $\pm$  SEM értékben fejeztük ki. Az adatok elemzését a GraphPad Prism 7-es verziójával végeztük. A viselkedési adatokat két-utas ismételt mérési pontokat tartalmazó varianciaanalízissel (ANOVA) vagy két-utas ANOVA-val (idő  $\times$  CFA-kezelés), majd Sidak többszörös összehasonlításával post hoc teszttel elemeztük. Az *in vivo* képző adatokat, a véresejtszámot, a citokinkoncentrációt és a sejtszámokat a hippocampus gyrus dentatusában két-utas ANOVA-val (idő  $\times$  CFA-kezelés) elemeztük, majd Tukey post hoc teszttel egészítettük ki. A testtömegre és a tüdőfunkciós tesztekre vonatkozó adatokat háromutas ANOVA-val (idő  $\times$  stressz  $\times$  *cannabis* kezelés) elemeztük, majd Tukey többszörös összehasonlításával végeztük a post hoc tesztek. A többi adatot két-utas ANOVA-val (stressz  $\times$  *cannabis* kezelés) és Tukey post hoc teszttel elemeztük. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értékre állítottuk be.

## 7. Kísérleti terv és időbeosztás

### 1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenézisre



### 2. A krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és hippocampusukban zajló felnőttkori neurogenézisre



### **3.) Eredmények**

#### **1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre**

##### **1.1. Magatartási és fájdalom tesztek**

CFA kezelés a hátsó mancsokban ödémát, termikus és mechanikai hiperalgéziát, valamint felborult súlyeloszlást idézett elő. A CFA-val injektált egerekben csökkent a mechanonociceptív küszöbérték akut és krónikus gyulladás állapotokban, amit a dinamikus plantáris eszteziométer mutatott ki. Az ízületi gyulladásban szenvedő egerek akut és krónikus gyulladás állapotokban fokozott termikus érzékenységet mutattak a meleg hőingerekre, melyet a forró lemez (*hot plate*) teszttel végeztünk. A CFA-val kezelt állatokban tartós gyulladásos ödéma alakult ki mind akut, mind krónikus állapotban. Az egerek testtömeg-eloszlása is megváltozott. Az állatok kevesebb súlyt helyeztek a gyulladt jobb oldali lábukra akut fázisban.

##### **1.2. *In vivo* képalkotás**

A CFA-kezelés helyi gyulladást váltott ki. A reaktív oxigéngyök termelésének gyulladással összefüggő növekedését biolumineszcens képalkotással mutattuk ki. Ezek az eredmények is megerősítik, hogy a CFA-val injektált egerek ízületi gyulladásban szenvedtek.

##### **1.3. Vérvkép elemzés**

A vérsejtek számában létrejövő változások a szisztémás gyulladás egyik jellemző tünete. Kísérletünkben a krónikus csoportban a vérlemezke szám csökkent a CFA-val kezelt állatokban az akut fázishoz képest. Megnövekedett neutrofil granulocita arány látható az CFA-val kezelt állatokban akut fázisban és megnövekedett monocita arányt láthatunk a CFA-val kezelt állatokban a krónikus fázisban. Az eozinofil és bazofil granulociták százalékos aránya szignifikánsan csökkent a CFA-val kezelt egerekben.

##### **1.4. Immunhisztokémiai eredmények**

###### **1.4.1. BrdU immunhisztokémia eredményei**

A sejtproliferációt anti-BrdU immunhisztokémiával vizsgáltuk. Az akut gyulladás nem befolyásolta a BrdU-jelölt sejtek számát, de a krónikus gyulladás szignifikánsan alacsonyabb számú újszülött sejtet eredményez.

#### **1.4.2. DCX immunhisztokémia eredményei**

Az éretlen neuronok számát anti-doublecortin-immunhisztokémiával vizsgáltuk. A krónikus ízületi gyulladás csökkentette a DCX+ sejtek számát a hippokampuszban a CFA-val kezelt állatoknál. A krónikus CFA csoport DCX+ sejtszámának ez a csökkenése a krónikus ízületi gyulladás gátló hatását mutatja a felnőttkori hippokampális neurogenesisre.

#### **1.4.3. Az Iba1 immunhisztokémia eredményei**

A hippokampális neurogenesis szabályozásának elsődleges befolyásoló tényezői a mikroglia lehetnek, ezért számszerűsítettük az Iba1+ mikroglia számot a gyrus dentatusban. Nem találtunk semmilyen kezeléssel eredő hatást az Iba1+ mikroglia sejtek számában. Tehát a következtetésünk alapján az ízületi gyulladás nem befolyásolta az Iba1-immunpozitív mikroglia számát a gyrus dentatusban. Az Iba1+ sejtek szemikvantitatív morfológiai vizsgálata alapján nem tapasztaltunk jelentős különbséget az aktivációjukban a vizsgált csoportok között.

#### **1.4.4. A CD68 immunhisztokémia eredményei**

A CD68 egy glikoprotein, amely főleg az endoszómális/lizoszómális kompartmentben található, és erősen expresszálódik a makrofágokban és más mononukleáris fagocitákban, ezért jellemzően citokémiai markerként használják a monociták/makrofágok megjelenítésére a gyulladt szövetekben. Az Iba1 adatokkal ellentétben szignifikánsan megnövekedett a CD68+ sejtek denzitása a gyrus dentatusban

### **1.5. A gyulladásos citokinek szintjei a hátsó mancsokban és a hippokampuszban**

A hátsó mancsokban a gyulladás által kiváltott teljes fehérjekoncentráció növekedését láthatjuk. A hátsó végtagokban az akut CFA-kezelés növelte a TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, KC és MIP-2 citokin koncentrációit, míg a krónikus fázisban a TNF- $\alpha$  és KC emelkedett. Egyes esetekben a mért citokinszintek vagy nem változtak a CFA-val kezelt hátsó végtagokban (IL-1 $\alpha$ , IL-10), vagy csökkentek (IL-1 $\alpha$ ). A hippokampuszban a citokin-szinteket nem változtatta meg a CFA-kezelés.

## **2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippokampális neurogenesisre**

### **2.1. A marihuánafüst és az egerek vizeletének elemzése**

A kutatásunk során meghatároztuk a marihuánafüst 9-THC-, CBD- és CBN-tartalmát HPLC készülék segítségével. Továbbá vizeletmintákat gyűjtöttünk a marihuánafüstöt inhalált



egerektől a 6. és 7. héten. A vizeletben a 9-THC, a 11-nor-9-karboxi-THC, a CBD és a CBN koncentrációját SFC/MS-MS módszerrel határoztuk meg. Az adatokat az 1. táblázat tartalmazza.

	delta-9-THC ng/ml	cannabidiol ng/ml	cannabinol ng/ml	11-nor-9-carboxy-THC ng/ml
Marihuánafüst (ng/ml)*	427000± 2000	35800± 1100	258000± 8000	-
Vizelet minta (ng/ml)	65,61 ± 22,77	2,44 ± 0,56	41,92 ± 17,62	1,81 ± 0,16
* A vegyületek mennyiségi adatai 1,6g elégetett marihuána füstjéből származnak. Az adatokat átlag ± SEM-ben adtuk meg.				

## 1. táblázat: A marihuánafüst és a vizelet minta kémiai analízise

### 2.2. Testtömeg változás a marihuána és stressz kezelés hatására

A stressz és a cannabis expozíció csökkentette az állatok testtömeg-gyarapodását. Az eredmények alapján a *cannabis* kezelés gátolja az állatok súlygyarapodást, illetve, a stressz által kiváltott testsúly gyarapodás gátlását a *cannabis* füst belégzése valamelyest enyhítette az állatoknál.

### 2.3. Légzésfunkció vizsgálat

A stressz károsította a tüdőfunkciókat és a tüdő normális fejlődését, viszont, a marihuánafüst nem befolyásolta a tüdőfunkciókat. A krónikus stressz negatívan hatott számos tüdőparaméter fejlődésére, például megváltoztatta a frekvenciát, az egy perc alatti légvételek számát, a belégzési csúcsáramlást, a kilégzési időt, a relaxációs időt és a légzési térfogatot is.

### 2.4. Magatartási tesztek

#### 2.4.1. Kognitív teszt – Y labirintus teszt / Új tárgy felismerési teszt

Eredményeink alapján sem a stressz, sem a marihuána expozíció nem befolyásolja az egerek kognitív funkcióit.

#### 2.4.2. Nyílt terep teszt

Ezzel a teszttel az állatok lokomotoros aktivitását és szorongás szintjét vizsgáljuk. Szorongással kapcsolatos spontán mozgásszervi aktivitást és önápolást vagyis a mosakodással töltött időt mértünk az állatoknál. A stresszes egerek kevesebb időt töltöttek a rendelkezésükre álló terület közepén. Azok az állatok melyek szoronganak inkább a sarokban töltik idejüket. Az állatok mozgássebességének mérésének eredményéből látható, hogy a stresszelt egerek csökkent

érdeklődést mutattak az új környezet iránt és lassabbak voltak. A marihuánafüstnek kitett állatok általában több időt töltöttek a terület közepén. Mind a stresszelt, mind a cannabis-szal kezelt egerek lényegesen több időt töltöttek a mosakodással.,. Ezenkívül a stresszel és/vagy cannabis kezelt egerek sokkal korábban kezdték meg az önápolást, mint a kontroll egerek.

## **2.5. Immunhisztokémiai eredmények**

### **2.5.1. BrdU-immunhisztokémia eredményei**

A sejtproliferációt a gyrus dentatusban a BrdU exogén proliferációs marker segítségével tettük láthatóvá. A sejtproliferációt gátlását statisztikai analízisekkel nem tudtuk kimutatni, de trend szinten látható, hogy a stressz, valamint a cannabis kezelés hatására csökkent a BrdU+ sejtek száma a gyrus dentatusban a kontroll csoporthoz képest.

### **2.5.2. DCX-immunhisztomémia eredményei**

A cannabis füst inhalálása hatással volt az éretlen idegsejtek számára, morfológiájára és migrációjára. A stressznek nem volt hatása, de a cannabis kezelés jelentősen csökkentette a DCX+ neuronok számát a gyrus dentatusban. Kóros megjelenésű DCX+ sejtek előfordulása szignifikánsan magasabb volt a cannabis-szal kezelt állatokban. A kontroll egerekben az éretlen neuronok többsége, (több mint 90%-a) a germinatív szubgranuláris zónában (sgz) található. A sejtek kis százaléka, (azaz <5%-a) vándorolt ki a szemcsesejtrétegbe (gcl) (29. ábra), emellett néhány sejtet a hilusban is találtuk. A kontroll állatok adataihoz képest a migrációs arányt jelentősen megváltoztatta a marihuána-expozíció. A cannabis hosszú távú expozíciója megváltoztatta a DCX+ neuronok morfológiáját. A cannabis-szal kezelt egerek gyrus dentatusában a DCX+ sejtek gyakran szokatlan, rendellenes megjelenést mutattak. Például a cannabis kezelés jelentősen megváltoztatta az idegsejtek dendritjeit és sok sejt elvesztette dendritfáját emellett bipoláris DCX+ neuronokat, vagy bazális dendritekkel rendelkező neuronokat figyeltünk meg.

## **4.) Eredményeink összefoglalása**

### **1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre**

A hipotézisünk szerint a perifériás ízületi gyulladás növeli a citokinek szintjét az ízületekben és a hippocampusban is, de az utóbbit a kutatási eredményeink alapján nem tudtuk megerősíteni. A gyulladt ízületekben megemelkedett az összfehérje koncentráció és hasonló tendenciát figyelhettünk meg a CFA-val kezelt állatok hippocampuszában is, különösen az akut fázisban. Mindezekből arra következtetünk, hogy a teljes fehérjekoncentráció növekedése a gyulladásos mediátorok fokozott termelésének köszönhető. Ezenfelül teljesült az a hipotézisünk is miszerint a perifériás gyulladás csökkenti a neurogenézist a gyrus dentatusban, valamint befolyásolta a CD68+ makrofágok/aktivált mikroglia denzitást is, valamint az adataink arra utalnak, hogy az akut perifériás gyulladás molekuláris és sejtes változások kaszkádját indítja el, ami végül a felnőttkori hippocampális neurogenesis csökkenéséhez vezet, ami csak a krónikus gyulladásos fázisban volt kimutatható.

### **2. A krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és hippocampuszukban zajló felnőttkori neurogenesisre**

Összefoglalva, az eredményeink alapján teljes mértékig egyik hipotézisünket sem tudtuk bizonyítani. A marihuánafüstnek nincs stresszoldó hatása a magatartási tesztek vizsgálata alapján, sőt, abnormális mosakodási magatartást figyeltünk meg ennél a csoportnál. Továbbá, füstöt inhalált egereknek nem károsodott a légzésfunkciója, viszont a stressznek kitett állatoknak igen, valószínűleg a csőben töltött idő alatt nem tudott a tüdejük a megszokott módon fejlődni. A várttal ellentétben, a kontroll egerekhez képest mindegyik csoport súlygyarapodása elmaradott volt. Mindezekon túl, nem tudtuk bizonyítani azt sem, hogy krónikus marihuánafüst expozíció serkentené a neurogenézist a hippocampusban, éppen ellenkezőleg, a marihuánafüst csökkentette a neurogenézist mint ahogy a stressz is. A marihuánafüst inhalálása megváltoztatta az idegsejtek dendritjeit és sok sejt elvesztette dendritfáját, számos idegsejt vándorolt szokatlan területekre. Mindezek hatással lehetnek a normális ingerületvezetési képességre, és kóros neurológiai kórképeket predesztinálhatnak.

## **5. Következtetések, kitekintés**

A felnőttkori hippokampális neurogenesis a kutatók körében egy intenzíven kutatott, ugyanakkor, a jelentősége szempontjából egy máig vitatott témakör. Fontos hangsúlyozni, hogy az irodalmi eredmények leginkább kísérleti állatokból (egerek és patkányok) származnak és jóval kevesebb bizonyíték származik főemlősökből, illetve humán mintákból. A két legfontosabb kérdés mindmáig tisztázásra vár: Vajon a kísérleti állatokban megfigyelt biológiai folyamatok, mennyire tükrözik az emberi agy működését? Vajon a felnőtt emberi hippokampuszban milyen mennyiségű új neuron képződik, és ezek pontosan milyen fiziológiai folyamatokban vesznek részt (Kempermann et al., 2018; Lucassen et al., 2020)?

A legfőbb probléma, hogy ezt a sejtszintű folyamatot leginkább csak post mortem szövettani módszerekkel lehet vizsgálni. Az irodalmi adatokból tudjuk, hogy a legtöbb eddig vizsgált állatfaj agyában, köztük több főemlős faj agyában is lejátszódik ez a folyamat (Augusto-Oliveira et al., 2019). Számos vizsgálat alátámasztja, hogy a felnőttkori hippokampális neurogenesis főemlősökben és rágcsálókban is hasonló módon zajlik, ugyanakkor jelentős különbségeket is kimutattak (Miller et al., 2013; Fasemore et al., 2018; Augusto-Oliveira et al., 2019). Az újonnan született sejtek érése lassabb a főemlősökben, mint a rágcsálókban, mivel a sejtek legnagyobb ingerlékenységével jellemezhető időszak jelentősen meghosszabbodhat a több évig vagy évtizedekig élő szervezetekben (Kohler et al., 2011; Yuan et al., 2014). A módszertani nehézségek ellenére bizonyított az is, hogy a felnőttkori hippokampális neurogenesis lejátszódik az emberi agyban is. 1998-ban publikálták az első kutatást arról, hogy előfordulhat-e emberben a felnőttkori neurogenesis. A szerzők kimutatták, hogy a BrdU beépült a felnőtt humán gyrus dentatus bizonyos sejtjeibe. Néhány hónappal a timidin analóg beadása után a BrdU+ sejtek kimutathatóak voltak több neuronális marker mellett, így demonstrálva a felnőttkorban született szemcsesejtek korlátozott populációjának jelenlétét embereknél (Eriksson et al., 1998). Egy 2013-ban publikált tanulmány pedig egy másik innovatív megközelítést alkalmazott az emberi agyban újonnan keletkezett sejtek kimutatására és számuk meghatározására. Ebben a kutatók radioaktív szénizotópok vizsgálatával megerősítették az újonnan képződött idegsejtek létezését a felnőtt emberi agyban (Spalding et al., 2013). Ez a két tanulmány kihasználta a nukleinsavak nagyobb posztmortem stabilitását a fehérjékhez képest, és megnyitotta az utat a terület jövőbeli fejlődése előtt. A következő években más csoportok, elsősorban az immunhisztokémia felhasználásán alapuló technikákkal hozzájárultak a felnőttkori hippokampális neurogenesis embereknél való előfordulását alátámasztó bizonyítékokhoz (Boldrini et al., 2009; Crews et al., 2010; Knoth et al., 2010; Ernst et al., 2014; Moreno-Jiménez et al., 2021). Történtek próbálkozások arra vonatkozóan is, hogy in vivo mágneses rezonancia képalkotó vizsgálatok segítségével jelenítsék meg ezt a speciális

sejtszintű folyamatot, de ezek a próbálkozások mindezekig nem hoztak átütő sikert (Ho et al., 2013).

Összefoglalásként, az itt bemutatott kutatások olyan mindennapi betegségeket és egészségügyi problémákat érintenek, amelyek gyakoriak. A Föld népességének körülbelül 2.5%-a fogyaszt marihuánát (UNODC, 2017), 0,5-1%-a szenved reumatoid artritiszben (Gibofsky et al., 2012) és a lakosság 40%-a volt stressz forrásnak kitéve és körülbelül 30%-a érzett fizikai fájdalmat vagy szomorúságot a felmérés előtti napokban (Gallup Global Emotions Report, 2022). Mindezek a tényezők negatívan hatnak a felnőttkori hippocampális neurogenesisre, melyek további egészségügyi problémák kialakulását vonhatja maga után. A neurogenesis hozzájárulhat a stresszkezeléshez és a stresszhormonok szabályozásához viszont a csökkent neurogenesis a stresszkezelés képességének csökkenéséhez és az érzelmi reaktivitás növekedéséhez vezethet. A hippocampusban bekövetkező új idegsejtek képződése kapcsolatba hozható a hangulati szabályozással is tehát a csökkent neurogenesis növelheti a depresszió, a szorongás és más hangulat zavarok kockázatát (Santarelli et al., 2003; Snyder et al., 2011; Surget et al., 2011; Kim et al., 2012; Schoenfeld and Cameron, 2015). A krónikus szisztémás gyulladás hozzájárulhat a mentális zavarok, depresszió és a neurodegeneráció kialakulásához vagy súlyosbodásához, valamint csökkentheti a neurogenesis mértékét is (Dantzer et al., 2008; Perry et al., 2010; Berk et al., 2013). A neurogenesis szerepet játszhat az agy regenerációs képességében, és hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségek kockázatának csökkentéséhez. A csökkent neurogenesis lassíthatja az agyi sérülések utáni gyógyulási folyamatokat, például a stroke vagy a koponyatrauma utáni rehabilitációt, valamint neurodegeneratív betegségek, például az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór kialakulásának kockázatát növelheti (Hanspal és Gillotin, 2022, Disouky és Lazarov, 2021, Marchetti et al., 2020, Tang et al., 2022).

Az endokannabinoid rendszer és az endokannabinoidok fontos szerepet játszanak az agy fejlődésében, szabályozzák a sejtproliferációt, migrációt, differenciálódást és túlélést (Harkany et al., 2007). A marihuána fogyasztás gátolhatja az új idegsejtek termelését és integrálását a hippocampusban (Rusznák et al., 2018). A hosszú távú marihuána fogyasztás érzékelhető tanulási nehézségeket és a memóriazavarok előfordulását okozhatja. Az agy plaszticitásának csökkenése és az új idegsejtek termelésének gátlása is negatív hatással lehet a tanulásra, memóriára és kognitív funkciókra (Denny et al., 2014; Anacker és Hen, 2017), tehát a csökkenő neurogenesis kognitív funkciók romlásához vezethet, mint például a tanulási képességek csökkenését okozhatja vagy memória problémákat, illetve a gondolkodási rugalmasság csökkenése is megfigyelhető (Gillotin et al., 2021).

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a felnőttkori hippocampális neurogenesis feltehetően fontos szerepet játszik az agy egészséges működésében és minden olyan hatás, mely megzavarja ezt a fiziológias folyamatot, különböző kórképek kialakulásához vezethet.

## Rövidítések jegyzéke

2-AG: 2-arachidonoil-glicerin	HIV: human immunodeficiency virus / humán immunhiányos vírus
5-HT: 5-hidroxi-triptamin / szerotonin	HLA: human leukocyte antigen / Humán leukocita antigén
ABC: avidin-biotin complex / avidin-biotin komplex	HPLC: high performance liquid chromatography / nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
ACTH: adrenocorticotropic hormone / adrenokortikotrop hormon	Iba1: ionized calcium-binding adapter molecule 1 / ionizált kalciumkötő adaptermolekula 1
AEA: anandamid / N-arachidonoil-etanolamin	IgG: immunglobulin G
AIDS: acquired immunodeficiency syndrome / szerzett immunhiányos szindróma	IL: interleukin
ANOVA: analysis of variance / varianciaanalízis	i.p.: intraperitoneális
BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin	i.pl.: intraplantáris
CaCl <sub>2</sub> : calcium chloride / kalcium-klorid	i.v.: intravénás
CA1: cornu ammonis 1 region of the hippocampal formation / cornu ammonis 1. számú régiója	K <sub>2</sub> EDTA: dikálium-etilén-diamin-tetraecetsav
CA3: cornu ammonis 3 region of the hippocampal formation / cornu ammonis 1. számú régiója	KC: keratinocita kemoattraktáns
CBC: cannabichromene / kannabikromén	LPS: lipopoliszacharid
CBD: cannabidiol / kannabidiol	LV: lateral ventricles / laterális agykamra
CBDV: cannabidivarin	MDMA: 3,4-metilén-dioxi-metamfetamin (vagy ecstasy)
CBG: cannabigerol	MIP-2: macrophage inflammatory protein-2 / makrofág gyulladásozó protein-2
CBN: cannabinol / kannabinol	MPO: mieloperoxidáz
CD68: cluster of differentiation 68 / differenciálási klaszter 68	MS: mass spectrometry / tömegspektrometria
CFA: complete Freund's adjuvant / komplett Freund-adjuváns	NADPH: kikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
DA: dopamin	NaOH: nátrium-hidroxid
DAB: 3,3'-diaminobenzidín	NGS: normal goat serum / normál kecske szérum
DCX: doublecortin	NCS: neural stem cells / neuronális őssejtek
DG: dentate gyrus / gyrus dentatus	OB: olfactory bulb / bulbus olfactorius
DNS: deoxyribonucleic acid / dezoxiribonukleinsav	OF: open field test / nyílt terep teszt
DPA: dynamic plantar aesthesiometer / dinamikus plantáris eszteziométer	PBS: phosphate buffered saline / foszfát puffer
DSS: dextran sulfate sodium / dextranszulfát-nátriumot	PFA: paraformaldehid
EDTA: ethylene-diamine tetra-acetic acid / etilén-diamin-tetraecetsav	PCNA: proliferating cell nuclear antigen / proliferáló sejtmag-antigén
FAAH: fatty acid amide hydrolase / zsírsavamid-hidroláz	s.c.: szubkután/subcutan
GABA: gamma-aminobutyric acid = gamma-amino-vajsav	S.E.M.: standard error of mean/átlag standard hibája
GCL: granular cell layer / granuláris sejtréteg / szemcsesejt réteg	SVZ: subventrikuláris zóna
GPR6: G protein-coupled receptor 6 / G-fehérjéhez kapcsolt 6-os receptor	THC: Δ9-tetrahidrokannabinol
	THCV: tetrahidrocannabivarin
	TNF-α: tumor nekrozis faktor alfa
	TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán
	TRP: tranziens receptorpotenciál

## **Publikációs jegyzék**

### **Az értekezés alapját képező eredeti közlemények**

**Kitti Rusznák**, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Chronic marijuana smoke exposure does not influence the impact of long-term stress on physiology, cognition, emotion and adult hippocampal neurogenesis.

*Frontiers in Pharmacology.*, 23 July 2018 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00786>

(Q1, IF: 3,8) Megosztott elsőszerző

**Rusznák Kitti**, Horváth Ádám István, Pohli-Tóth Kinga, Futácsi Anett, Kemény Ágnes, Kiss Gabriella, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Experimental Arthritis Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Cells* 2022, 11, 79., <https://doi.org/10.3390/cells11050791> (Q1, IF: 7,666)

**Az értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora: 11.466,**

**Független citációk száma összesen: 20**

### **További közlemények**

Czárán D, Sasvári P, Horváth ÁI, Ella K, Súly ÁR, Borbély É, **Rusznák K**, Czéh B, Mócsai A, Helyes Z, Csépanyi-Kömi R. Lacking ARHGAP25 mitigates the symptoms of autoantibody-induced arthritis in mice. *Frontiers in Immunology* 2023 May 10;14:1182278. doi: 10.3389/fimmu.2023.1182278. PMID: 37234175; PMCID: PMC10208528. (Q1, IF: 8,786)

### **Tudományos konferenciákon való részvételek, poszter prezentációk**

#### **Poszter prezentáció nemzetközi konferenciákon**

**Rusznák Kitti**, Horváth Ádám István, Pohli-Tóth Kinga, Futácsi Anett, Kemény Ágnes, Kiss Gabriella, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Experimental arthritis inhibits adult hippocampal neurogenesis in mice

FENS (Federation of Neuroscience Societies) Párizs, Franciaország, 2022. július 9-13

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Physiology, Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis. EBBS (European Brain and Behaviour Society) 2019, Prága, Csehország, 2019.09.21-24.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Physiology, Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis, IDK-Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország 2019. május 24-25.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

The effect of chronic stress and concomitant cannabis exposure on behaviour and adult hippocampal neurogenesis in mice , ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Workshop for Early Career Scientists in Europe, Nizza, Franciaország, 2019, március 7 – 10.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

The Effect of Chronic Stress and Concomitant Cannabis Exposure on Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice, FENS (Federation of Neuroscience Societies) Regional Meeting, Pécs, Magyarország 2017 szeptember 20-23.

### **Poszter prezentáció magyar konferenciákon**

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

The effects of long-term cannabis smoke exposure in mice, Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése Pécs, 2018. augusztus 30 – szeptember 1.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

A stressz és marihuána füst hatása kísérleti állatokban,





## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Czéh Boldizsárnak, a mesterszakos szakdolgozatom megkezdése óta nyújtott támogatásáért, oktatómunkájáért, kutatói példamutatásáért, tanácsaiért, segítségéért, továbbá nyitott és közvetlen magatartásáért, akihez mindig bizalommal fordulhattam bármilyen kérdés esetén és mindig támogatott a kutatóvá válás útján.

Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának a közös kollaborálásaink során nyújtott segítségét, ötleteit és lelkesedését. Elhivatottsága és közvetlensége követendő példát jelent számomra a jövőben.

Mérhetetlenül hálás vagyok Furácsi Anett és Vudi-Garai Krisztina, a Szentágotthai János Kutatóközpont Neurobiológiai kutatócsoport munkatársainak, akikre akár hétvégén is számíthattam és szövettani feldolgozásokban segítettek a kutatómunkámat. Köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz, és külön köszönettel tartozom Dr. Csekő Katának és Dr. Horváth Ádám Istvánnak, akiktől nagyon sokat tanulhattam, valamint mindig nyitottak, kedvesek és türelmesek voltak, valamint köszönöm a kutatásainkban együttműködő munkatársaknak: Bóna Ágnesnek, Mayer Mátyásnak, Kozma Zsoltnak, Kemény Ágnesnek, és Kiss Gabriellának is hálás vagyok a segítségükért.

Ezenfelül köszönöm a Laboratórium Medicina Intézet, valamint Prof. Dr. Miseta Attila támogatását.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm a szüleimnek és családomnak, barátaimnak a fáradhatatlan támogatásukat, türelmüket, segítségüket, és hogy mindig mellettem álltak az álmaim megvalósításában.

A kutatásokat a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA\_NAP\_13-2014-0019 és 20017-1.2.1-NKP -2017-00002), a GINOP-2.3.2-15-2016-00048 “Stay Alive” program valamint az EFOP-3.6.2-16-2017-00008 „A neuroinflammáció vizsgálat a neurodegeneratív folyama-tokban: a molekulától a betegágyig” című projektje és a EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, „Átfogó fejlesztés a Intelligens szakosodási stratégiák megvalósítása a Pécsi Tudományegyetemen” és a TKP2021-EGA-16 projekt a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásával valósult meg. Mindezekon túl a kutatói útjaimat az ERASMUS+ és az NTP-NFTÖ támogatta.