

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI ÉS SPORTBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

**Kolinerg és glutamáterg támadáspontú farmakológiai kezelések
kombinációjának vizsgálata neurokognitív zavarok különféle preklinikai
állatmodelljeiben**

HABILITÁCIÓS PÁLYÁZAT
Tézisek

**Dr. Bali Zsolt Kristóf
PhD**

PÉCS, 2025

1.	Bevezetés.....	60
1.1.	A neurokognitív zavarok és gyógyszeres kezelésük	60
1.2.	Kutatási előzmények.....	62
2.	Célkitűzések	63
3.	Módszerek	64
3.1.	Kísérleti állatok.....	64
3.2.	Magatartás-farmakológia	64
3.2.1.	Spontán alternációs teszt T-labirintusban	64
3.2.2.	Morris-féle víziútvesztő teszt.....	65
3.2.3.	Új tárgy felismerési teszt	65
3.2.4.	Betegségmodellek	66
3.2.5.	Farmakológia, kísérleti elrendezés és statisztikai elemzés	66
3.3.	In vivo elektrofiziológia	67
4.	Eredmények és interpretációjuk	68
4.1.	A memantine és a PHA-543613 erősítik egymás kognitív serkentő hatását a farmakológiai amnézia modellben	68
4.2.	A memantine-PHA-543613 kombinált kezelés hatékonyan javítja az idős patkányok memóriateljesítményét is	72
4.3.	A memantine és a PHA-543613 kombinációja enyhíti az ismételt enyhe traumás agysérülés következtében kialakult memóriazavart.....	73
4.4.	A memantine, az alfa7 nAChR aktiválók és ezek kombinációi befolyásolják a hippocampus neuronjainak érzékenységét ACh-ra és NMDA-ra.....	76
4.5.	Az alfa7 nAChR agonista részben hasonló hatást gyakorol a neuronok tüzelési aktivitására, mint az antagonistá	79
5.	Összefoglalás és következtetések	81
6.	Hivatkozások.....	83

1. Bevezetés

1.1. A neurokognitív zavarok és gyógyszeres kezelésük

A köznyelvben és a korábbi szakirodalomban demencia néven nevezett, különféle kognitív deficitekkel járó betegségeket a Mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyvének 5. kiadása a neurokognitív zavarok kategóriájába sorolja. Ebben a diagnosztikai kategóriában olyan szerzett pszichiátriai zavarokat gyűjtöttek össze, melyek elsődleges jellemzője, hogy a gondolkodással kapcsolatos képességeket érintik, és a kognitív deficitet neurális tényezők jól mérhető elváltozásai okozzák [1]. Az ún. major neurokognitív zavarok közé számos, etiológiailag változatos betegség tartozik, melyek közül a leggyakoribbak és legismertebbek az Alzheimer-kórhoz, cerebrovaszkuláris betegségekhez, Lewy-testes betegséghez, frontotemporális lobáris degenerációhoz illetve traumás agysérülésekhez kapcsolódó neurokognitív zavarok. Az Alzheimer-kór, a Lewy-testes betegség és a frontotemporális lobáris degeneráció primer neurodegeneratív betegségek, ahol az idegszövet kóros elváltozásai (pl. amiolid-plakkok, synuclein alkotta Lewy-testek, tau alkotta neurofibrilláris kötegek) valamint az agyállomány sorvadása, atrofíája kíséri a kognitív és viselkedési tünetek progresszióját. Bár a kognitív zavar mögött álló patológiát teljes bizonyossággal csak szövettani úton lehet megállapítani, a tünetek jellege, a betegség előrehaladása, a kezelések hatékonysága és egyes biomarkerek vagy képalkotó eljárások alapján valószínűsíthető lehet egyik vagy másik kórfolyamatot, illetve ezek kombinációját (pl. viszonylag gyakori az Alzheimer-kór és a Lewy-testes betegség együttes jelenléte). Mindezek a betegségek jelenleg nem gyógyíthatók és progressziójuk csak korlátozottan lassítható, ugyanakkor a tünetek enyhítésére léteznek törzskönyvezett gyógyszerek, melyek a kognitív serkentők közé tartoznak.

Az első, kimondottan Alzheimer-kórra törzskönyvezett gyógyszerek az acetilkolin-észteráz gátlók (AChEI) voltak: a tacrine, a donepezil, a rivastigmine és a galantamine. Az acetilkolin szintjét növelő gyógyszerek alkalmazása Alzheimer-kórban jelentős mértékben az ún. kolinerg hipotézisen alapult, ami a tünetek hátterében kiemelkedő szerepet tulajdonít a betegség korai fázisában megfigyelhető neuronális degenerációnak az acetilkolint termelő magokban, mint például a mediális szeptális magban [2–5]. Az AChEI vegyületek enyhe és közepes súlyos Alzheimer-kórban alkalmazhatók eredményesen.

Nem sokkal a galantamine törzskönyvezését követően, 2003-ban engedélyezte az USA gyógyszerügynöksége (Food and Drug Administration, FDA) a memantine-t, bár 1989 óta Németországban már alkalmazták demenciában [6]. A memantine-t már 1968-ban

kifejlesztették és szabadalmaztatták, de hatásmechanizmusa sokáig ismeretlen volt, és a mai napig kérdéseket vet fel. Miután felismerték kedvező idegrendszeri hatásait, kezdetben monoaminerg hatásokat tulajdonítottak neki. Később fedezték fel a memantine jelentős affinitását az NMDA-típusú glutamát-receptorhoz (NMDAR), és megalkották az azóta leginkább elfogadott hipotézist arra, hogyan fejt ki neuroprotektív és prokognitív hatást szemben más nem-kompetitív NMDAR antagonistákkal, melyek inkább károsan befolyásolják a memóriafolyamatokat [7]. A memantine különlegességét azzal magyarázzák, hogy feszültségfüggő módon, alacsony-közepes affinitással és gyors kötődési-leválási kinetikával kötődik az NMDAR-hoz. Mindezek következményeként elsősorban az ún. excitotoxicitásért felelős, extraszinaptikusan elhelyezkedő NMDAR-ok „patológiás” aktivációját blokkolja, miközben a normális szinaptikus glutamáterg neurotranszmissziót nem gátolja. Ezzel egyszerre védi a neuronokat a túlingerléstől (és ebből fakadó magas Ca^{2+} -szinttől) és az extraszinaptikus aktivációból fakadó „zaj” csökkentésével mintegy „kiemeli” a szinaptikus glutamáterg jelátvitelt [8,9]. Idővel azonban a memantine további célpontjait is azonosították, melyekhez az NMDAR-hoz hasonló nagyságrendű affinitással kötődik [10]: ilyenek egyes szerotonin- és dopamin-receptorok mellett különféle nikotinos acetilkolin-receptorok (nAChR), köztük az alfa7 altípus [11,12]. Jelenleg még nem kellően ismert ezeknek a további célpontoknak a memantine kognitív serkentő hatásaiban való szerepe, melyek közül az alfa7 nAChR-ra fordítottuk kutatásainknak fókuszát, tekintettel arra, hogy ezen receptor komolyan felmerült, mint lehetséges új farmakológiai célpont a neurokognitív zavarok kezelésében.

Régóta ismert, hogy az alfa-bungarotoxin nevű kígyóméreg-hatóanyag a nAChR-oknak csak egy alpopulációjához mutat affinitást [13,14]. Azonban csak a 80-as években sikerült a toxint kötő fehérje tisztítása és jellemzése [15,16], majd a 90-es évek közepére jutott el a szakterület arra a következtetésre, hogy az alfa-bungarotoxin szelektíven a homomer nAChR-okhoz kötődik. Bár több olyan nAChR található a szervezetben, mely azonos alfa-alegységekből tevődik össze, a további kutatások ezek közül a legjelentősebbnek az alfa7 nAChR-ot találták, melyet sikerült klónozni, és meghatározni a receptor génjét tartalmazó kromoszomális lókuszt [17–24]. Az 5 alfa7 alegység alkotta homomer nAChR-ról szóló ismereteink ezután rohamos gyarapodásnak indultak. Megállapították, hogy a receptor jelentős mennyiségben van jelen a kognitív működésekkel összefüggésbe hozott legfőbb agyi központokban, mint pl. a hippocampus-ban, a nucleus basalis Meynertiben, a neocortex számos részén, valamint a ventrális tegmentális areában [25–27]. Kimutatták az alfa7 nAChR-ok szerepét az ACh tanulással és memóriával összefüggésbe hozható hatásaiban, így például a neuronális

plaszticitásban [28–31]. Egyes genetikai vizsgálatok az alfa7 nAChR génjét hordozó lókuszt illetve a receptor csökkent expresszióját a frontális lebenyben összefüggésbe hozták a schizophrenia kialakulásának rizikójával [32–35], ugyanakkor egyes tanulmányok a különféle nAChR-ok megváltozott abundanciáját mutatták ki öregedés során, valamint Alzheimer-kórral illetve Lewy-tesztet betegséggel összefüggésben [36–40]. Fontos felfedezés volt, hogy az alfa7 nAChR-oknak immunmodulációs szerepük is van, így nem csak a neurodegenerációval, hanem a neuroinflammációval összefüggésben is vizsgálni kezdték a szerepét [41,42]. Mindezek a felfedezések felvetették az alfa7 nAChR mint gyógyszerfejlesztési célpont lehetőségét számos neuropszichiátriai indikációban. A 90-es évek végén és a 2000-es években számos alfa7 nAChR agonista és allosztérikus modulátor (PAM) vegyületet fejlesztettek ki, melyek többnyire jó hatékonysággal javították a kognitív teljesítményt a preklinikai állatkísérletekben [43]. Számos alfa7 nAChR ligand jutott el a gyógyszerfejlesztés klinikai fázisába schizophrenia illetve demencia indikációkban is, azonban ezek egyelőre nem jutottak el a törzskönyvezésig, miután a klinikai próbák különböző szakaszaiban elbuktak elégtelen hatásosság vagy különféle mellékhatások megjelenése miatt [44,45].

1.2. Kutatási előzmények

PhD doktori kutatásaim során a kolinerg-glutamáterg interakciók szerepét vizsgáltam a hippocampus elektrofiziológiai működésében és a kognitív teljesítményben, különös tekintettel az alfa7 nAChR-okra. Magatartás-farmakológiai kísérleteinkben kimutattuk, hogy egy alfa7 nAChR agonista (PHA-543613) prokognitív hatásossága függött attól, hogy milyen farmakológiai amnézia-modellt alkalmaztunk a kognitív deficit előidézéséhez. Míg a muszkarinos AChR antagonistá scopolamine által kiváltott tranziens amnézia-modellben látványos dóziszfüggő hatás szerint javította a PHA-543613 a patkányok térbeli munkamemóriáját, az NMDAR antagonistá MK-801 által kiváltott kognitív deficittel szemben nem volt ennyire egyértelmű az alfa7 nAChR agonista hatékonysága [46]. Elektrofiziológiai kísérleteinkben az acetilkolin és az NMDA neuronális tüzelési aktivitásra kifejtett lokális hatásai közötti interakciókat vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy az AChR-ok és az NMDAR-ok együttes kémiai stimulációja szuperadditív (szinergista) módon növeli a hippocampalis piramissejtek tüzelési aktivitását. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az ACh és az NMDA közötti kölcsönhatás elsősorban az alfa7 nAChR-ok működésétől függ, azt ugyanis az alfa7 nAChR antagonistá methyllycaconitine (MLA) képes volt felfüggeszteni, míg a scopolamine nem váltott ki blokkoló hatást a szinergista interakcióra [47]. Mindezek az eredmények hangsúlyozták, hogy a hippocampus-ban megfigyelhető kolinerg-glutamáterg interakció erősen

kötődik az alfa7 nAChR-ok funkciójához, ami azt is felvetette, hogy a két neurotranszmitter-rendszer együttes farmakológiai célzása eredményes stratégia lehet a kognitív serkentő kezelések hatásosságának növelésére.

2. Célkitűzések

A fent részletezett irodalmi ismeretek és saját korábbi kísérleteink alapján feltételeztük, hogy a kolinerg és a glutamáterg rendszer együttes célzásával jobb eredmények érhetők el a neurokognitív zavarok gyógyszeres kezelésében: nagyobb hatásosság érhető el, a mellékhatások kivédése érdekében csökkenthető egy-egy farmakon dózisa a hatékonyság fenntartása mellett, illetve akár további mechanizmusok is indukálhatóak, melyek a tüneti javulás mellett betegségmódosító hatásúak is lehetnek. Az önmagukban mutatott hatékonyságuk és a hatásmechanizmusban potenciálisan szerepet játszó farmakológiai összefüggések nyomán a memantine és a PHA-543613 kölcsönhatásainak vizsgálata mellett döntöttünk. Vizsgálatainkban az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:

- 1) Megfigyelhető-e farmakológiai interakció a memantine és az alfa7 nAChR agonista PHA-543613 között a kognitív teljesítményt vizsgáló viselkedési tesztekben? A farmakológiai interakciót először egy egyszerű modellben, scopolamine által kiváltott amnéziával szemben vizsgáltuk.
- 2) A megfigyelt interakció etiológiailag relevánsabb betegségmodellekben is jelentkezik-e? Ennek érdekében beállítottuk a neurokognitív zavarok ismételt enyhe traumás agysérülési (rmTBI) valamint öregedési modelljét.
- 3) Az egyes monokezelések milyen dózistartományban enyhítik hatékonyan a kognitív zavarokat, és melyek az ideális dóziskombinációk a különféle modellekben?
- 4) Hogyan befolyásolja a memantine és a PHA-543613 a hippocampalis piramissejtek elektromos működését a kognitív serkentő hatás szempontjából releváns dózisokban? A memantine és a PHA-543613 közötti interakciók hogyan jelennek meg a neuronok elektrofiziológiai funkciója szintjén?
- 5) A vizsgált farmakonok és a kombinált kezelések hogyan befolyásolják a kolinerg és a glutamáterg neurotranszmissziót? Milyen hatásmechanizmusra tudunk következtetni a befolyásolt elektrofiziológiai jelenségek alapján?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kutatásunkhoz felnőtt Lister hooded vagy Wistar törzsű patkányokat használtunk. Az állatokat kontrollált hőmérsékletű és páratartalmú állatházakban tartottuk: a magatartásteresztékben felhasználtakat a PTE Szentágothai Kutatóközpont állatházában, míg az elektrofiziológiai projektben alkalmazottakat a PTE TTK Neurobiológiai Tanszék állatházában helyeztük el. A magatartás-farmakológiai kísérletekben használt patkányokat napi szinten etettük kontrollált mennyiségű standard rágcsálótáppal annak érdekében, hogy a tesztekhez szükséges szintű motivációt fenntartsuk, és elkerüljük az obezitás kialakulását. Az elektrofiziológiai kísérletekben használt állatok ad libitum táplálásban részesültek. Ivóvízhez minden patkány korlátlanul hozzáférhetett. Kísérleteink során a vonatkozó állatvédelmi jogszabályok és irányelvek alapján jártunk el (40/2013 (II. 14.) Kormányrendelet, 2010/63/EU EU direktíva). Kísérleteink végzéséhez a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság valamint az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács javaslata alapján a Kormányhivatal által kiállított engedélyekkel rendelkezünk (BA02/2000–25/2015, BA02/2000-69/2017, BA02/2000-80/2017, BA02/2000-30/2021).

3.2. Magatartás-farmakológia

3.2.1. Spontán alternációs teszt T-labirintusban

A farmakológiai kezelések térbeli munkamemóriára kifejtett hatásait a T-labirintusban végzett spontán alternációs tesztben vizsgáltuk. A módszer részleteit vonatkozó közleményeink tartalmazzák [48]. Összefoglalva, a teszt alapja, hogy egészséges patkányok egy labirintus felfedezésekor ún. alternációs viselkedést mutatnak, vagyis két lehetséges célkar közül az egymás után következő próbákban mindig felváltva látogatják meg a bal illetve jobb oldali kart. Amennyiben rövid (pl. 10 s) késleltetést alkalmazunk az egyes választások között, akkor a megfelelő alternációs viselkedés feltétele, hogy a patkány térbeli munkamemóriája jól működjön. Egy-egy kísérleti ülés során egy patkány min. 9, max. 15 próbát teljesített max. 25 perc alatt. Az egymás utáni választásokból alternációs rátát számoltunk, ami az alternáló választások és az összes lehetséges alternáció hányadosát jelentette. Megfelelő térbeli munkamemória funkció esetén az alternációs ráta szignifikánsan magasabb, mint 50% (véletlen szint).

3.2.2. Morris-féle víziútvesztő teszt

A patkányok térbeli tanulási képességének és hosszútávú térbeli memóriájának tesztelésére a Morris-féle víziútvesztő (MWM) tesztet alkalmaztuk. A módszer részletes leírása megtalálható korábbi publikációnkban [49]. Röviden, a MWM tesztet egy 180 cm átmérőjű kádban végeztük, melyet kb. 50 cm magasságban feltöltöttünk vízzel, majd egy kör alakú platformot helyeztünk el a kád egyik kvadránsának közepén úgy, hogy pár cm-rel a víz felszíne alatt helyezkedjen el. A vizet tejporral és kék ételfestékkel átlátszatlaná tettük. A patkányok feladata az volt, hogy több napon át, naponta többször ismételt 2 perces úszások (tréning próbák) során megtanulják megtalálni az elrejtett platformot. A tréning 4 napon át tartott, és napi 4 próbából tevődött össze, az egyes próbák során a teljesítményt a menekülési idő ('escape latency', a kádba való behelyezéstől a platform megtalálásáig eltelt idő) illetve a platform megtalálásáig megtett út ('swimming path length') alapján állapítottuk meg. Az 5. napon a platformot eltávolítottuk a kádból, és egyetlen 2 perces próbában ('probe trial') azt mértük, hogy mennyi időt töltenek a patkányok a korábban a platformot tartalmazó térrészben ('time spent in the target quadrant').

3.2.3. Új tárgy felismerési teszt

Az új tárgy felismerési (NOR) teszt a patkányok középhosszú-távú deklaratív memóriájának tesztelésére szolgált. A módszer részletesen bemutatásra került korábbi publikációinkban [50,51]. A teszt alapja, hogy a patkányoknak természetes hajlamuk van az explorációra és az új ingerek preferálására az ismertekkel szemben. A tesztet egy szokásos méretű négyzet alapú arénában végeztük (ún. 'open field'), melyhez habituációs ülés(ek)ben előzetesen hozzászoktattuk az állatokat. A NOR teszt két próbából állt, az első próba során két ugyanolyan tárgyat helyeztünk be az arénába, és 3 percet adtunk a patkánynak a tárgyak felfedezésére. Az első próbát tetszőleges hosszúságú várakozási (retenciós) idő követte, ami jelen kísérleteinkben 3 óra vagy 24 óra volt. A második próbában a patkány az egyik, korábban megismert tárgy mellett egy teljesen új tárgyat is felfedezhetett. A kísérleti ülések során mértük, hogy melyik tárgyat mennyi ideig explorálta a patkány. Egészséges memóriaműködés esetén a patkányok szignifikánsan többet vizsgálják a 2. próbában az új tárgyat, mint a már ismertet. Ezenkívül az ismert és az új tárgy explorációjával eltöltött időkből diszkriminációs index számítható, amin különféle statisztikai próbák végezhetőek el.

3.2.4. Betegségmodellek

A farmakológiai kezelések kognitív teljesítményre való hatékonyságát a neurokognitív zavarok három különböző modelljében vizsgáltuk: farmakológiai modellben, természetes öregedési modellben és rmTBI modellben. A farmakológiai modellben a patkányokat akut szisztémás scopolamine kezelésnek vetettük alá a tesztek előtt 10-15 perccel. A scopolamine muszkarinos AChR antagonist, ami az állatokban tranziens amnéziát váltott ki a teszt idejére, így vizsgálhattuk a farmakonok (memantine, PHA-543613) képességét arra, hogy ezt az amnéziát felfüggeszse. A memantine és a PHA-543613 öregedéssel járó kognitív teljesítménycsökkenéssel szembeni hatásait nagyon idős, legalább 28 hónapos korú patkányokon teszteltük. A rmTBI modellt a PTE SzKK Neurotrauma Kutatócsoporttal kollaborációban hoztuk létre (részletes leírás: [50]). A patkányokat általános anesztézia alatt műtétnek vetettük alá, melynek során a fejbőr felnyitását követően a koponyán található két tájékozódási pont (bregma ill. lambda) közé egy fémkorongot ragasztottunk a csontra. Ezután a patkányt a Marmorou-féle súlyejtő apparátus plexi-csőve alá helyeztük, amiben egy 450g-os, huzalhoz rögzített bronzhenger lógott. A bronzhengert a koponyatrauma kívánt súlyosságának megfelelő magasságból (enyhe trauma esetén 15 cm) a patkány koponyájára rögzített fémkorongra ejtettük. A korongot ezután eltávolítottuk, a sebet zártuk, és a patkányokat ébredést követően visszavittük az állatházba. Azokban a kísérletekben, amikor rmTBI-t idéztünk elő, a fenti műtéti protokollt 5 egymást követő napon át naponta egyszer ismételtük.

3.2.5. Farmakológia, kísérleti elrendezés és statisztikai elemzés

A magatartástesztek előtt a patkányokat különböző szisztémás farmakológiai kezeléseknél vetettük alá. A scopolamine által kiváltott tranziens amnézia modell esetén a patkányoknak 10-15 perccel a teszt kezdése előtt 0,1 mg/ttkg (MWM) vagy 0,5 mg/ttkg (T-labirintus) scopolamine-t adtunk be intraperitoneálisan (i.p.). A memantine-t 0,001-1,0 mg/ttkg dózistartományban teszteltük, a beadása szubkután (s.c.) történt 40-45 perccel a magatartásteszt kezdete előtt. A PHA-543613 vizsgált dózistartománya 0,1-3,0 mg/ttkg között volt a különböző kísérletekben, beadása a memantine-hoz hasonlóan s.c. történt 40-45 perccel a tesztek előtt. Mindezeket a farmakonokat fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és 1 ml/ttkg-os volumenben adtuk be az állatoknak.

A farmakológiai kezeléseket a legtöbb esetben ismételt méréses ('within-subject') elrendezésben végeztük, az egyes kísérleti ülésekben a különböző kezeléseket randomizált, kiegyenlített latin-négyzet alapján osztottuk fel az egyes egyedek között. Tehát minden egyed

minden farmakológiai kezelésnek alá lett vetve, de az egyes kezelések sorrendje változó volt. Ezekben a kísérletekben a statisztikai elemzéshez ismételt méréses általános lineáris modellt (GLM) vagy lineáris kevert-hatás (mixed-effect) modellt alkalmaztunk. Kivételt képezett a MWM teszt, amiben a különböző kezeléseket más-más állatcsoportok kapták a teszt ismételhetetlensége miatt, így a statisztikai elemzést 'between-subject' faktorokat tartalmazó GLM-mel végeztük. Az öregedési modellben a fiatal és idős állatok teljesítményét valamint a TBI modellben a különféle műtéteken (álműtét, különböző súlyosságú és gyakoriságú traumák) átesett állatcsoportok teljesítményét független mintás t-teszttel ill. 'between-subject' GLM-mel hasonlítottuk össze. A statisztikai próbáknál szignifikánsnak ítéltük azokat a hatásokat illetve különbségeket, ahol $p < 0,05$ volt, míg marginálisan szignifikáns (tendenciaszerű) hatásnak/különbségnek ítéltük, ha $0,05 < p < 0,1$ volt.

3.3. In vivo elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai kísérleteinkben alkalmazott módszerek részletes leírását tartalmazzák a vonatkozó publikációink [52,53], alábbiakban ezek rövid összefoglalása olvasható.

Az in vivo elektrofiziológiai méréseket sztereotaxiás műtétek előzték meg. Ennek során az altatott (chloral hydrate) patkányok fejét sztereotaxiás keretben rögzítettük. A patkányok fején a bőrt felnyitottuk, a koponyafelszínt szabaddá tettük, majd a hippocampus vizsgálni kívánt területei felett a koponyába léket fűrtünk Paxinos és Watson atlaszának koordinátái segítségével [54]. A dura mater eltávolítása után többcsatornás mikroelektrodokat vezetünk be a hippocampus CA1 területének piramis sejtes rétegébe mikromanipulátorok segítségével. A mikroelektrodok központi szényszálán keresztül az agy lokális elektromos aktivitását vezettük el biológiai erősítőberendezések segítségével. Az elektrofiziológiai jelet megfelelő, az extracelluláris akciós potenciálra optimalizált szűrést követően digitalizáltuk, és PC-n regisztráltuk. A felvételeket offline analizáltuk megfelelő elektrofiziológiai szoftverekben, melyek segítségével tüzelési aktivitási hisztogramot nyertünk ki a hippocampalis piramis sejtek aktivitásáról, és megállapítottuk adott időablakokban a neuronok tüzelési frekvenciáját (Hz). Az elektrofiziológiai elvezetésekkel párhuzamosan meghatározott időközönként a neuronok közvetlen környezetébe különböző farmakonok nagyon kicsi mennyiségét injektáltuk mikroiontoforézis technikával a mikroelektrodok központi csatornáját körülvevő kapillárisokból (lokális beadás).

Két elektrofiziológiai projektünkben más-más lokális és/vagy szisztémás farmakológiai kezeléseket alkalmaztunk. Mindkét projektben közös volt, hogy a felvételek során 120 s-onként

5 s-ig tartó mikroiontoforetikus NMDA beadást alkalmaztunk, amivel a neuronok NMDA-ra való válaszait és azok változásait teszteltük. A memantine és alfa7 nAChR ligandok szisztémás hatását vizsgáló kísérleteink során továbbá kb. 10 percenként 60 s-ig lokálisan ACh-t injektáltunk, amivel a neuronok ACh-ra való válaszait és azok szisztémásan alkalmazott farmakonok hatására történő változásait vizsgáltuk. A szisztémás farmakológiai hatásokat vizsgáló kísérletek során memantine-t illetve alfa7 nAChR agonista PHA-543613-at vagy PAM CPDX-et (Richter Gedeon Nyrt. tesztvegyülete) adtunk be s.c. úton a patkányoknak, majd legalább 1 órán át követtük a neuronok elektrofiziológiai működését. A szisztémásan beadott farmakonok hatásának elemzésére lineáris kevert-hatás modelleket alkalmaztunk. Vizsgáltuk a farmakonok hatására a beadástól eltelt 60 perces időablakban bekövetkezett tüzelési frekvencia változást (a beadás előtti kontrollhoz képest), valamint az egyes farmakonok hatását összehasonlítottuk a releváns vehikulum (memantine és PHA-543613 esetén fizioológias sóoldat, CPDX esetén 5% Tween 80-at tartalmazó PBS) hatásaival.

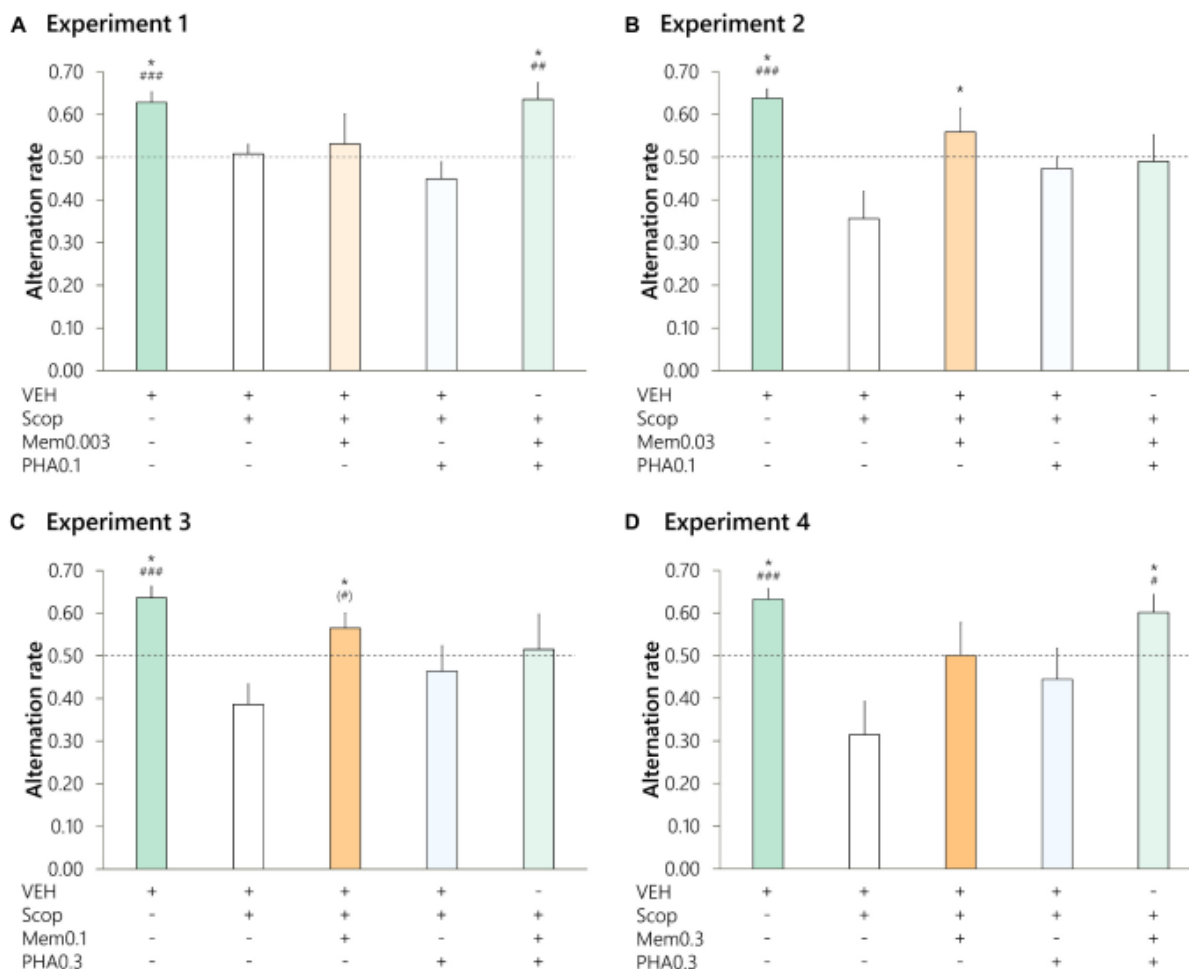
Az alfa7 nAChR ligandok lokális hatásait vizsgáló kísérletekben 10 percenként 60 s-ig iontoforetizáltuk az alfa7 nAChR agonista PHA-543613-at, az antagonistát MLA-t, vagy a PAM NS-1738 ill. PNU-120596-ot. Ezen beadások átfedtek egy-egy NMDA beadással, így a farmakonok NMDA válaszokra kifejtett interaktív hatásait is tudtuk vizsgálni. A farmakonok lokális hatásánál vizsgáltuk, hogy milyen irányban változtatják meg az elvezetett neuronok tüzelési aktivitását: tüzelési aktivitást növelő illetve csökkentő hatást állapítottunk meg, ha a neuron aktivitása $\pm 20\%$ -al változott a farmakon lokális alkalmazásának hatására. A tüzelési frekvenciát növelő illetve csökkentő hatások eloszlását adott kezeléson belül binomiális teszttel analizáltuk, hogy megállapítsuk, hogy adott farmakon szignifikánsan nagyobb gyakorisággal váltott-e ki tüzelési frekvenciát növelő vagy csökkentő hatást.

4. Eredmények és interpretációjuk

4.1. A memantine és a PHA-543613 erősítik egymás kognitív serkentő hatását a farmakológiai amnézia modellben

Kutatásaink során először egy farmakológiai tranzienst amnézia-modellben vizsgáltuk az alfa7 nAChR agonista PHA-543613 és a memantine kombinált alkalmazása során megfigyelhető hatásokat a kognitív teljesítményre. Ezekben a kutatásokban a T-labirintusban végzett spontán alternációs tesztet és a Morris-féle víziútvesztő (MWM) tesztet alkalmaztuk.

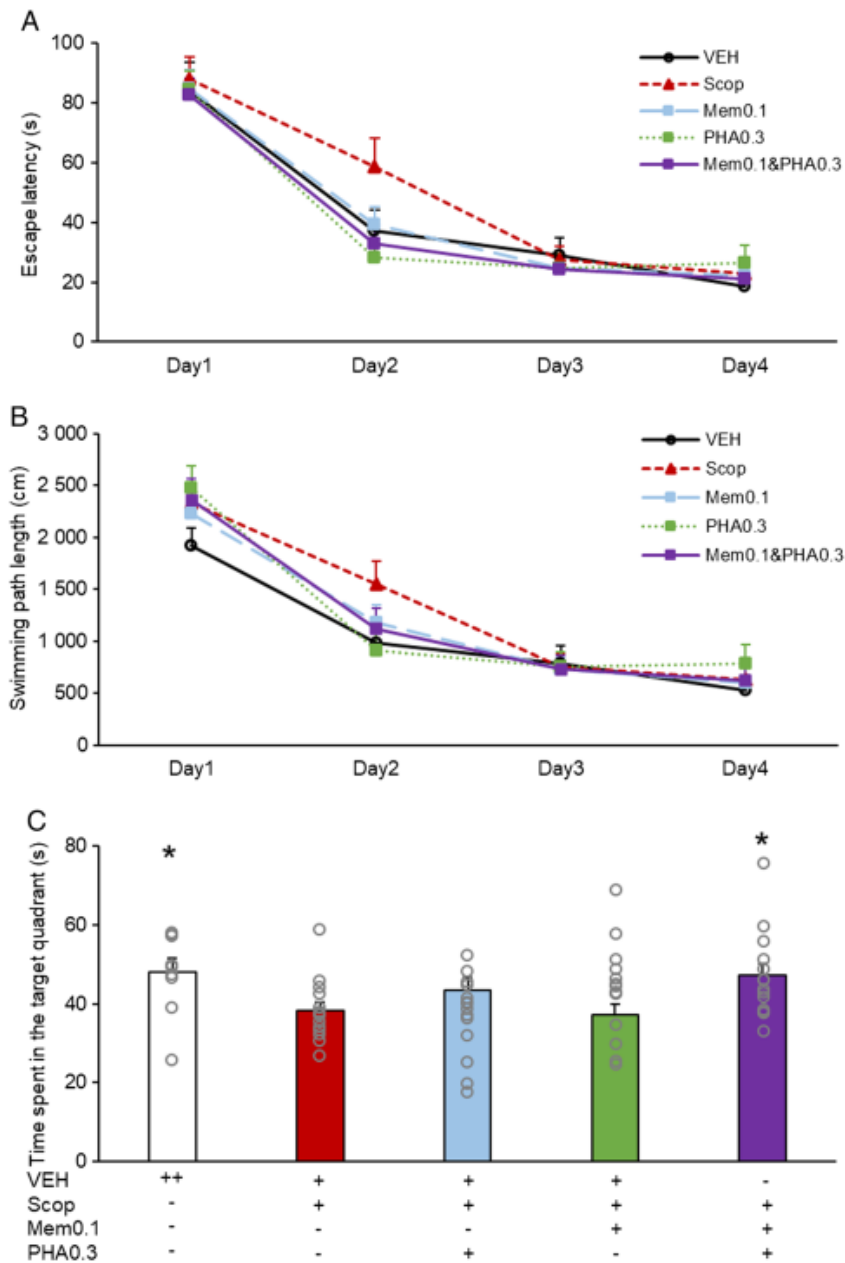
A T-labirintusban először kimutattuk, hogy a memantine már egészen alacsony, 0,1 mg/ttkg dózisban is javítja a patkányok térbeli munkamemóriáját a scopolamine-nal kiváltott amnéziával szemben. A továbbiakban a PHA-543613 és a memantine különböző dóziskombinációival kezeltük a patkányokat a spontán alternációs teszt előtt (*1. ábra*). A két vegyület hatásaiban kétféle kölcsönhatást figyeltünk meg. Ha a memantine dózisa monokezelés során is hatékonyan visszafordította a farmakológiailag kiváltott amnéziát (0,03 mg/ttkg, 0,1 mg/ttkg), akkor a hatékony dózis kombinált alkalmazása PHA-543613-mal nem javította, sőt, rontotta a memantine kognitív serkentő hatását. Ha azonban olyan memantine és PHA-543613 dózisokat kombináltunk egymással, melyek a monokezelések során nem voltak hatékonyak (0,003 mg/ttkg memantine + 0,1 mg/ttkg PHA-543613 ill. 0,3 mg/ttkg memantine + 0,3 mg/ttkg PHA-543613), akkor a kombinált kezelés javította az állatok térbeli munkamemóriáját. További analízisek során megállapítottuk, hogy a kombinált kezelések hatása nem múlja felül szignifikánsan a két monokezelés hatásának összegét, ami arra utal, hogy additív jellegű interakció áll fenn a két vegyület között. A spontán alternációs kísérletek eredményeit a *Frontiers in Pharmacology* (Frontiers) című folyóiratban publikáltuk [48].



1. ábra: Memantine és PHA-543613 különböző dózisainak hatásai scopolamine által kiváltott amnéziával szemben monoterápiák illetve kombinált kezelések során. A grafikonok alatti jelölések az adott kezelésben beadott farmakonokat és dózisokat mutatják. A memantine (s.c.) és a PHA-543613 (s.c.) alkalmazott dózisait adott kísérletben a rövidítésük (Mem, PHA) után következő szám mutatja mg/kg-ban. (A) Az első kísérletben (Experiment 1) a memantine szubeffektív dózisát kombináltuk a PHA-543613 szubeffektív dózisával (n=9 Long Evans patkány); (B,C) A második és harmadik kísérletben (Experiment 2, 3) a memantine effektív dózisait kombináltuk a PHA-543613 szubeffektív dózisaival (n=10 Long Evans ill. n=8 Wistar patkány); (D) A negyedik kísérletben (Experiment 4) a PHA-543613 szubeffektív dózisát kombináltuk egy olyan memantine dózissal, ami magasabb volt annak effektív dózisánál (n=8 Wistar patkány). Az oszlopok feletti csillagok az adott kezelés és a scopolamine önmagában történő alkalmazása közötti post hoc összehasonlítás szignifikancia szintjét jelölik: * $p < 0,05$. A kettőskeresztek az alternációs teljesítmény eltérését mutatják a véletlen szinttől (0,5, szaggatott vonal): (#) $p < 0,1$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. [48]

A spontán alternációs tesztben kimutatott farmakológiai interakciót igazoltuk a MWM tesztben is (2. ábra). A kísérlet első négy napja során a patkányokat a medencében elhelyezett rejtett platform külső jelzőingerek segítségével történő megtalálására tréningeztük. A tréning napokon a különböző kezeléseken átesett csoportok között nem találtunk különbséget. Az ötödik, ún. próba napon azt tapasztaltuk, hogy a csak scopolamine-nal kezelt patkányok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a platform keresésével a medence megfelelő kvadránsában, mint a kontroll (vehikulummal kezelt) csoport állatai, a scopolamine által kiváltott hosszútávú memória deficitet viszont a memantine-nal (0,1 mg/ttkg) és PHA-543613-

mal (0,3 mg/ttkg) végzett kombinált kezelés visszafordította. A farmakológiai modellben végzett MWM kísérleteket a *Psychopharmacology* (Springer) című folyóiratban publikáltuk [49].



2. ábra: A memantine és a PHA-543613 szubeffektív dózisainak ko-adminisztrációja által a térbeli tanulásra és a hosszútávú memória előhívására kifejtett hatások. A menekülési időt (escape latency, A) és az úszással megtett utat (swimming path length, B) a tréning napok (1-4. nap) folyamán összességében nem befolyásolták az alkalmazott kezelések. A próba napon (5. nap, C) a célkvadránsban töltött időre szignifikáns hatást mutattak a kezelések. Az adatokat átlag ± standard hiba formában mutatjuk. Az oszlopdiagramon a szürke korongok az egyedi adatpontokat jelölik. Csillagok jelölik adott kezelés szignifikáns eltérését a scopolamine önmagában történő alkalmazásához képest: * $p < 0,05$. [49]

4.2. A memantine-PHA-543613 kombinált kezelés hatékonyan javítja az idős patkányok memóriateljesítményét is

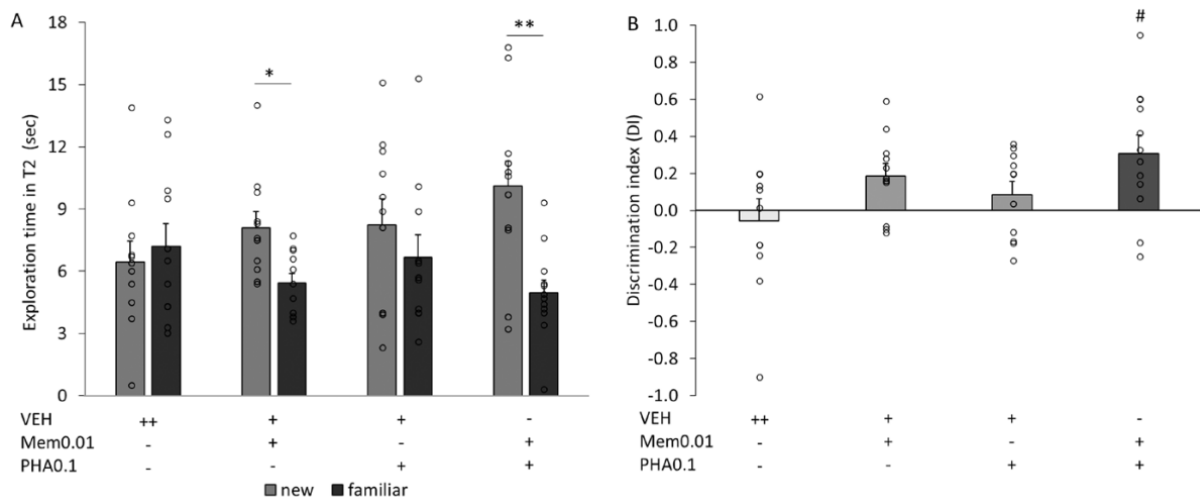
Etiológiai szempontból a neurokognitív zavarok egyik legrelevánsabb állatmodellje az idős patkány, amelyről korábbi közleményünkben is kimutattuk, hogy a természetes öregedés folyamán végbement idegrendszeri változások következtében alacsonyabb teljesítményt mutat kognitív tesztekben a fiatal egyedekhez képest [55]. A PHA-543613 és a memantine monokezelés hatásait és a kombinált terápia hatékonyságát ezért idős (>28 hónap) patkányokban is megvizsgáltuk az új tárgy felismerési (NOR) teszt segítségével. Kísérleteink igazolták, hogy az idősödéssel járó teljesítménycsökkenés a középhosszú-távú tárgyfelismerési memóriában is jelentkezik, ugyanis az idős állatok diszkriminációs indexe szignifikánsan alacsonyabb volt a fiatalokénál, egyúttal az idős állatok nem tudták megkülönböztetni a korábban látott tárgyat az új tárgytól. Az idős patkányokon végzett farmakológiai vizsgálatok mind a memantine, mind a PHA-543613 esetében kimutatták, hogy egyes dózisaik hatékonyan javítják a kognitív teljesítményt.

A memantine ugyan nem növelte jelentősen a diszkriminációs indexet, azonban 0,1 mg/ttkg és 1,0 mg/ttkg dózis beadása után az idős patkányok képesek voltak felismerni a korábban megismert tárgyat, és megkülönböztetni az új tárgytól. Ez az eredmény újfent alátámasztja azt a feltételezést, hogy a memantine-nak legalább két, egymástól elkülöníthető effektív dózistartomány van, melyek feltehetően más-más farmakológiai célponthoz való kötődéssel magyarázhatók.

A PHA-543613 0,3 mg/ttkg és 1,0 mg/ttkg dózisaik állították helyre a normális diszkriminációs viselkedést, melyek közül a kisebb dózis szignifikánsan növelte a diszkriminációs indexet is a vehikulumos kontroll kezeléshez képest. Ezen eredmény érdekessége, hogy a fiatal állatokban farmakológiai úton vagy ismételt enyhe traumás agysérülésekkel kiváltott memóriadeficitet más kísérleteinkben csak ezeknél magasabb PHA-543613 dózisosok voltak képesek visszafordítani. A különbség hátterében az alfa7 nAChR-ok megváltozott expresszióját feltételezhetjük az idős állatokban, amit alátámasztanak azon megfigyeléseink, miszerint a receptort kódoló gén mRNS expressziója magasabb az idős és kognitív zavart mutató állatokban, mint a fiatalokban.

A kombinált kezelések során (3. ábra) a memantine és a PHA-543613 szubeffektívnek bizonyult dózisaik alkalmaztuk (0,01 mg/ttkg memantine és 0,1 mg/ttkg PHA-543613). Meglepő módon a memantine 0,01 mg/ttkg dózisa önmagában alkalmazva is helyreállította a

diszkriminációs viselkedést, vagyis a kezelés után a patkányok többet exploráltak az új tárgyat, mint az ismertet. Ugyanakkor ez a kezelés még nem volt képes jelentősen növelni a diszkriminációs indexet. A PHA-543613 0,1 mg/ttkg-os dózisa a várakozásoknak megfelelően nem javította a diszkriminációs indexet, és nem állította helyre az idős patkányok diszkriminációs képességét az ismert és az új tárgy között. Ugyanakkor a memantine-nal és PHA-543613-mal végzett kombinált kezelés mindkét elemzés szempontjából hatékonyak bizonyult. A kombinált kezelést követően az idős patkányok jelentősen többet exploráltak az új tárgyat, mint az ismertet, és a diszkriminációs index szignifikánsan magasabb volt, mint az idős állatok vehikulumos kezelést követő alapvonalai teljesítménye. Az idős állatokkal végzett kutatásaink tehát megerősítették, hogy a memantine és az alfa7 nAChR agonista PHA-543613 között interakció figyelhető meg, és kölcsönösen képesek facilitálni egymás kognitív serkentő hatását idős állatokban is. Eredményeinket az *International Journal of Neuropsychopharmacology* (Oxford University Press) című folyóiratban publikáltuk [51].



3. ábra: A memantine és a PHA-543613 kombinációjával történt kezelések hatásai az idős patkányok NOR tesztben mutatott teljesítményére (n=12). (A) Azok az idős állatok, melyeket memantine-nal vagy annak PHA-543613-mal alkotott kombinációjával kezeltünk, több időt töltöttek az új mint az ismert tárgy explorációjával. (B) A memantine-PHA-543613 kombinációs kezelés szignifikánsan javította az idős patkányok diszkriminációs indexét. A csillagok az ismert és az új tárgy explorációjával eltöltött idők közötti szignifikáns különbségeket jelölik: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (párosított T-teszt). A kettőskereszt a vehikulumos kezeléstől való szignifikáns eltérést jelöli: # $p < 0,05$ (lineáris mixed-effect modell + post hoc LSD). [51]

4.3. A memantine és a PHA-543613 kombinációja enyhíti az ismételt enyhe traumás agysérülés következtében kialakult memóriazavart

Klinikai és epidemiológiai tapasztalatok valamint számos kutatás alapján az ismételt traumás agysérülések jelentősen növelik egyes neurodegeneratív betegségek, többek között az

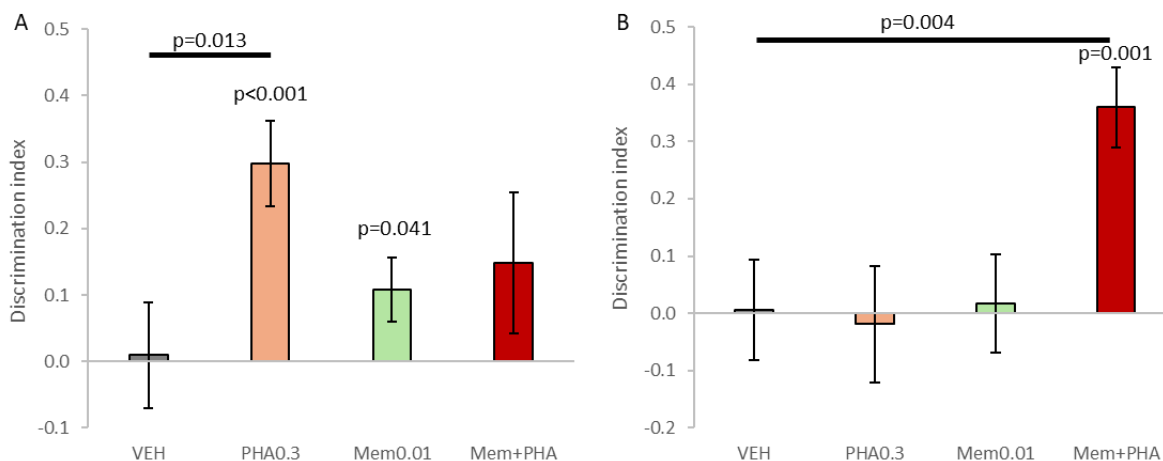
Alzheimer-kór kialakulásának kockázatát. A traumás agysérülések közül külön figyelmet érdemelnek az ún. ismételt enyhe traumás agysérülések (rmTBI), melyek többnyire nem igényelnek akut orvosi ellátást, kummulatív idegrendszeri hatásaik azonban hozzájárulhatnak neurodegeneratív folyamatokhoz. Tipikus előfordulása az rmTBI-eknek a gyakori ütközésekkel illetve fejet ért ütésekkel járó sportok (ökölvívás, futball, amerikai futball). Az rmTBI-ek preklinikai modellezése és vizsgálata ezért nagy jelentőséggel bír a prevenciós és terápiás módszerek kifejlesztésében. Kutatócsoportunkban először is beállítottunk, validáltunk és jellemeztünk egy rmTBI patkánymodellt, amelynek során a patkányok súlyejtéssel kiváltott enyhe mértékű koponyatraumát szenvedtek el altatás alatt. Kimutattuk, hogy a kísérleteinkben alkalmazott ütési intenzitás egyszeri trauma esetén nem okozott hosszútávú elváltozást a patkányok viselkedésében, azonban a traumát 5 egymást követő napon megismételve perzisztens kognitív zavart idézett elő a patkányokban. Érdekes módon ez a rmTBI által kiváltott kognitív deficit nem járt együtt a súlyos TBI-ek tipikus hisztológiai markereinek (pl. amiloid prekursor protein) megjelenésével illetve szérumból mérhető TBI-markerek szintjének tartós emelkedésével [50].

A fenti rmTBI modellben is teszteltük a memantine és a PHA-543613 és kombinációik hatékonyságát NOR teszt alkalmazásával. A trauma utáni 6-9. héten elvégzett tesztek során két különböző késleltetési időt is alkalmaztunk a NOR teszt első és második próbája között: 3 óra illetve 24 óra után vizsgáltuk a diszkriminációs képességet. Érdekes módon az rmTBI-en átesett patkányok jelentősebb memóriadeficitet mutattak a 3 órás késleltetéssel futtatott NOR tesztekben szemben a 24 órás késleltetéssel: az rmTBI-on átesett patkányok ugyan marginálisan szignifikánsan alacsonyabb diszkriminációs indexet mutattak mindkét típusú tesztben, mint az álműtött patkányok, azonban csak a 3 órás késleltetéssel végzett tesztekben nem voltak képesek felismerni a korábban explorált tárgyat, míg 24 órás késleltetést követően szignifikáns különbség volt az ismert és az új tárgy explorációjával eltöltött idők között. Feltételezhető, hogy a 24 órás retenció során alvási periódusok is előfordulnak, melyek során a memória konszolidáció megy át, ami elősegíti a második próbában a hatékonyabb felidézést.

A vizsgált farmakonok is eltérően hatottak a különböző retenció időt alkalmazó tesztekben. A 3 órás késleltetéssel végzett NOR tesztekben a memantine és a PHA-543613 egyértelműen visszafordította az rmTBI-on átesett patkányok diszkriminációs képességében bekövetkezett deficitet: a kontroll (vehikulum kezelés) helyzetben az rmTBI-on átesett patkányok diszkriminációs indexe nem tért el szignifikánsan 0-tól, míg 1,0 mg/ttk memantine és 3,0 mg/ttkg PHA-543613 alkalmazását követően a diszkriminációs index szignifikánsan magasabb

volt, mint a két tárgy azonos ideig történő explorációját jelentő 0 érték. Tehát az rmTBI által kiváltott deficitet mind a memantine, mind a PHA-543613 képes volt visszafordítani. Azonban a 24 órás retencióval végzett memantine-kísérletekben a kontroll helyzetben is megkülönböztették az rmTBI-on átesett patkányok az ismert és az új tárgyat, és teljesítményükben további szignifikáns javulást nem tudott a memantine előidézni, bár a patkányok az 1,0 mg/ttkg memantine kezelés után is jól teljesítettek. A 24 órás kísérlettel végzett NOR tesztben mind a vehikulumos kezelést, mind a PHA-543613 3,0 mg/ttkg-os dóziséval történő kezelést követően az rmTBI-on átesett patkányok diszkriminációs indexe marginálisan szignifikánsan volt magasabb a 0 értéknél, de a két kezelés után mért diszkriminációs indexek között nem volt szignifikáns különbség.

A kombinált kezelések vizsgálata során azonban mindkét retenció idő alkalmazásakor rossz diszkriminációs teljesítményt mutattak az rmTBI-on átesett patkányok farmakológiai kezelés hiányában (4. ábra). Meglepő módon a 3 órás retenciót követően ezúttal mind a PHA-543613 (0,3 mg/ttkg), mind a memantine (0,01 mg/ttkg) előzetesen szubeffektívnek gondolt dózisa javította a patkányok diszkriminációs képességét. Ugyanakkor a két farmakon effektív dózisaival történő kezelést követően a patkányok rosszul teljesítettek, diszkriminációs indexük nem múlta felül szignifikánsan sem a 0 értéket, sem a vehikulumos kezelés után mért értékeket. Ez a megfigyelés összhangban van a spontán alternációs tesztben farmakológiailag kiváltott amnézia-modellben kapott eredményeinkkel, miszerint a memantine és a PHA-543613 hatásai kiolthatják egymást, amennyiben az effektív dózisaikat kombináljuk. Ugyanakkor a 24 órás retencióval végzett NOR tesztben a fentivel megegyező dózissal végzett kombinált kezelés nagymértékben javította az rmTBI-on átesett patkányok diszkriminációs indexét, ami szignifikánsan magasabb volt mind a 0 értéknél, mind pedig a vehikulumos kontroll kezelése után mért diszkriminációs indexeknél. Összességében sikerült igazolni, hogy a memantine és a PHA-543613 kombinációja az rmTBI által kiváltott hosszútávú kognitív zavarokat is képes lehet visszafordítani, azonban az eredmények azt is aláhúzzák, hogy a hatékonyságot jelentősen befolyásolja az egyes dózisok megfelelő megválasztása. Az rmTBI modellel végzett kísérleteink jelenleg publikálási fázisban vannak.



4. ábra: A memantine és a PHA-543613 kombinációjának hatása az *rmTBI*-on átesett patkányok teljesítményére a NOR tesztben. (A) NOR teszt 3 órás retenciós idővel. (B) NOR teszt 24 órás retenciós idővel. Az oszlopok fölötti *p*-értékek a diszkriminációs index $DI=0$ -tól való szignifikáns eltérést jelölik (egymintás *T*-teszt). (publikáció előkészítés alatt)

4.4. A memantine, az alfa7 nAChR aktiválók és ezek kombinációi befolyásolják a hippocampus neuronjainak érzékenységét ACh-ra és NMDA-ra

Annak érdekében, hogy bepillantást nyerjünk a memantine és az alfa7 nAChR agonista PHA-543613 közötti viselkedési szinten tapasztalt interakció háttérébe, *in vivo* elektrofiziológiai kutatásokat is végeztünk, melyekben a hippocampus CA1 régió piramissejtjeinek tüzelési aktivitását vezettük el extracelluláris technikával. A neuronok spontán aktivitása mellett vizsgáltuk a lokálisan mikroiontoforetikus úton injektált ACh-ra illetve NMDA-ra adott elektrofiziológiai válaszokat is. A kb. 60 perces elvezetések során a memantine ill. a PHA-543613 különböző, szisztémásan beadott dózisainak hatásait vizsgáltuk, valamint egy kísérleti fázisú alfa7 nAChR PAM vegyületet is teszteltünk (CPDX, Richter Gedeon Nyrt.).

A memantine önmagában történő alkalmazása a neuronális aktivitás szintjén is alátámasztotta, hogy a vegyületnek több különböző hatékony dózistartománya lehet. A memantine ugyanis egy igen alacsony (0,01 mg/ttkg) és a legmagasabb (3,0 mg/ttkg) dózisban is növelte a piramissejtek spontán tüzelési aktivitását a beadástól eltelt idő függvényében. A 3,0 mg/ttkg-os memantine dózis ugyanakkor a neuronok NMDA-ra adott tüzelési válaszait erőteljesen gátolta, de ezt a jelenséget az alacsonyabb dózisok alkalmazásánál nem tapasztaltuk. Ez arra utal, hogy a memantine feltételezett NMDAR antagonistá hatása elsősorban magas dózisokban érvényesül, míg az ennél alacsonyabb, mégis prokognitív hatású dózisok esetén más hatásmechanizmus feltételezhető. Meglepő eredmény továbbá, hogy a memantine

alacsony, 0,1 mg/ttkg-os dózisa növelte a hippocampalis neuronok ACh-ra adott tüzelési válaszait, tehát feltételezhetően a memantine valamilyen úton keresztül képes lehet facilitálni a lokálisan felszabaduló ACh hatásait.

A PHA-543613 fordított U-alakú dózis-hatás görbéhez hasonlóan befolyásolta a hippocampalis piramissejtek spontán tüzelési aktivitását: legnagyobb mértékben a közepes, 1,0 mg/ttkg-os dózis növelte a beadástól eltelt idő függvényében a tüzelési frekvenciát, míg mind az alacsony (0,3 mg/ttkg), mind a magas (3,0 mg/ttkg) dózis kevésbé növelte a spontán aktivitást, ami nem tért el szignifikánsan a vehikulum beadásával kontroll helyzetben tapasztalt enyhe aktivitás-növekedéstől. A PHA-543613 egyik dózisa sem befolyásolta a neuronok NMDA-ra adott válaszait, ugyanakkor az ACh által kiváltott válaszokat jelentősen erősítette, a legnagyobb hatásosságot újfent az 1,0 mg/ttkg-os PHA-543613 dózis mutatta.

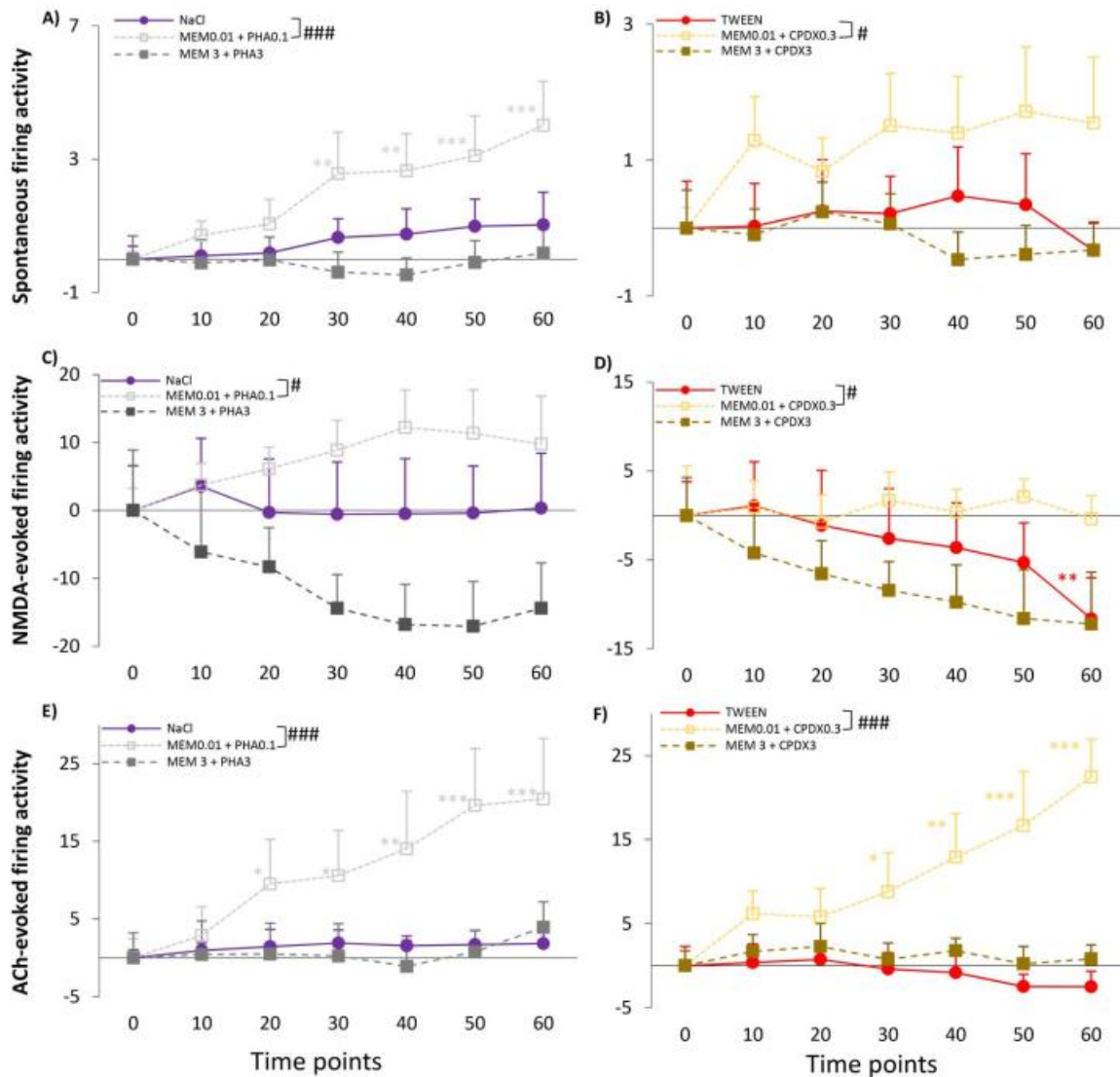
Az alfa7 nAChR PAM aktivitással rendelkező CPDX az agonistához hasonlóan szignifikánsan növelte a neuronok ACh-ra adott tüzelési válaszait, miközben a spontán aktivitást jelentősen nem befolyásolta. Ez megfelel az előzetes várakozásoknak, hiszen a PAM-ok önmagukban nem váltják ki a célreceptor aktivitását, hanem az ortosztérikus agonisták kötődését és funkcióját facilitálják. A CPDX ugyanakkor – a vehikulumos kontroll mérésekhez képest – növelte a neuronok NMDA-ra adott tüzelési válaszait, amiben szintén különbözik a hatása az agonista PHA-543613-tól.

Az elektrofiziológiai vizsgálatok során a memantine és az alfa7 nAChR ligandok alacsony, szubeffektív és magas dózisainak a kombinációit is teszteltük (5. ábra). A szubeffektív dózisokkal végzett kísérletek eredményei összhangban vannak a magatartásteresztékben funkcionális szinten tapasztalt farmakológiai interakcióval. A szubeffektív memantine (0,01 mg/ttkg) és PHA-543613 (0,1 mg/ttkg) dózisok kombinációja mind a spontán aktivitást, mind az NMDA illetve ACh által kiváltott tüzelési válaszokat növelte. Habár a spontán aktivitásra való hatás tekintetében sem a memantine, sem a PHA-543613 dózisa nem tekinthető teljesen hatástalannak önmagában, a két vegyület kombinációja láthatóan nagyobb mértékben emelte a spontán aktivitást, mint bármelyik vegyület önmagában. A memantine és a PHA-543613 alacsony dózisainak kombinációja ugyanakkor az ACh által kiváltott tüzelési válaszokat is rendkívüli mértékben felerősítette. Továbbá az alacsony dózisú kombináció a kontrollhoz képest szignifikánsan növelte a neuronok NMDA által kiváltott tüzelési válaszait, amit önmagában alkalmazva egyik vegyület sem növelt. Másrészt magas dózisban kombinálva a memantine-t és a PHA-543613-t sem a spontán aktivitásra, sem az ACh illetve NMDA által kiváltott tüzelési válaszokra nem tapasztaltunk jelentős hatást. Habár a magas dózisú

kombináció beadása után a neuronok NMDA-ra adott átlagos válaszaik csökkentek, ez a hatás nem volt statisztikailag szignifikáns. Mindebből arra következtethetünk, hogy a memantine és a PHA-543613 hatásai magas dózisok kombinálása esetén kioltják egymást.

Hasonló jelenségeket tapasztaltunk a memantine és az alfa7 nAChR PAM CPDX alkalmazásakor. Az alacsony dózisú kombinációban alkalmazva a memantine (0,01 mg/ttkg) és a CPDX (0,3 mg/ttkg) növelte a neuronok spontán aktivitását, bár ez a hatás nem volt annyira látványos, mint a memantine és a PHA-543613 kombinációja esetén. Az ACh által kiváltott tüzelési válaszokra azonban már sokkal nagyobb – a memantine és a PHA-543613 kombinációjával összemérhető mértékű – facilitáló hatással volt az alacsony dózisú memantine-CPDX kombinált kezelés. A memantine és a CPDX magas dózisú kombinációja (3,0 mg/ttkg mindkét vegyületből) azonban sem a spontán tüzelési aktivitásra, sem az ACh ill. NMDA által kiváltott tüzelési válaszokra nem volt hatással, ami azt mutatja, hogy a két farmakon hatásai kioltották egymást.

Az elektrofiziológiai kísérletek eredményeit az *ASN Neuro* (Taylor & Francis) című folyóiratban közzétettük [53].

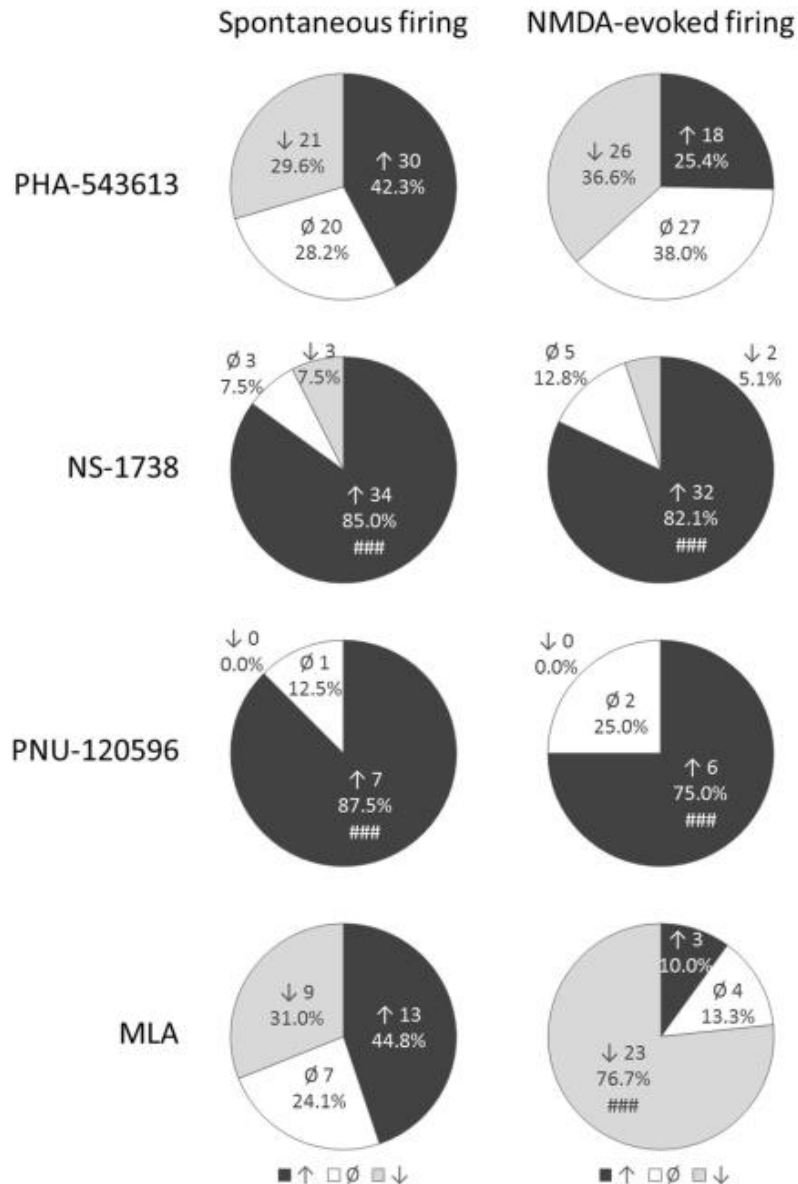


5. ábra: (A,B) A hippocampus CA1 piramiseltjeinek spontán tüzelési aktivitása a vehikulumok ill. különböző farmakonok kombinációinak beadása előtt (T0) és után (T10-T60): MEM0.01+PHA0.1; MEM3.0+PHA3.0; MEM0.01+CPDX0.3; MEM3.0+CPDX3.0. (C,D) A hippocampus CA1 piramiseltjek NMDA által kiváltott aktivitása a vehikulumok ill. különböző farmakonok kombinációinak beadása előtt (T0) és után (T10-T60). (E,F) A hippocampus CA1 piramiseltjek ACh által kiváltott aktivitása a vehikulumok ill. különböző farmakonok kombinációinak beadása előtt (T0) és után (T10-T60). A tüzelési aktivitást az aktuális tüzelési frekvenciának a beadás előtti átlagos tüzelési frekvenciához normalizált formájában tüntettük fel. A pontok és a hibásávok az átlagot illetve a standard hibát jelölik. A csillagok adott kezelési csoportban a T0 alapvonalis tüzelési aktivitástól szignifikánsan eltérő adatpontokat jelölik: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Holm-korrigált post hoc összehasonlítás). A kettős keresztek a különböző kezelések regressziós egyeneseinek meredeksége közötti különbségeket jelölik: # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$. [53]

4.5. Az alfa7 nAChR agonista részben hasonló hatást gyakorol a neuronok tüzelési aktivitására, mint az antagonistá

Elektrofiziológiai kutatásokban specifikusan vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a lokálisan a hippocampus piramiseltjeihez beadott alfa7 nAChR agonista, PAM és antagonistá a neuronok

spontán tüzelési aktivitását és NMDA-ra adott válaszait. Ehhez extracelluláris elvezetéseket végeztünk, miközben a vizsgált vegyületeket nagyon kis mennyiségben a sejtek közvetlen környezetébe injektáltuk mikroiontoforézis technikával. Annak ellenére, hogy egy nAChR agonistától a neuronális aktivitás serkentését várnánk el, meglepetten tapasztaltuk, hogy az esetek közel fele-fele arányában okozott a PHA-543613 lokális alkalmazása spontán tüzelési aktivitás csökkenést és növekedést (6. ábra). Továbbá a neuronok NMDA-ra adott válaszait is közel azonos arányban növelte illetve csökkentette. A PAM NS-1738 az agonistától eltérő hatásokat váltott ki: az esetek túlnyomó többségében jelentős növekedést indukált a spontán tüzelési aktivitásban és az NMDA-ra adott válaszokban is. Az antagonistá MLA viszont a PHA-543613-hoz nagyon hasonló arányban váltott ki spontán tüzelési aktivitás növekedést és csökkenést. Ugyanakkor az MLA az NMDA-ra adott válaszokat az esetek túlnyomó többségében jelentősen csökkentette. Az eredmények alapján az alfa7 nAChR-on keresztüli neurotranszmissziós és farmakológiai folyamatok lényegesen komplexebbek, mint egy egyszerű serkentés ill. gátlás jellegű mechanizmus. Az agonista PHA-543613 és a PAM NS-1738 hatásmechanizmusában lévő lényeges különbség magyarázhatja az eltérő neuronális válaszokat: a nAChR agonisták jellemzője, hogy kötődésükkor egy pillanatnyi aktiválás után a receptor deszenzitizációját váltják ki [56], ami a PAM vegyületek esetében nem jellemző. Másrészt az elektrofiziológiai megfigyelések aláhúzzák annak lehetőségét, hogy az alfa7 nAChR agonisták adott esetben összességében hasonló hatást válthatnak ki a neuronokon, mint az antagonistá. Ezen eredmények fényében nem zárhatjuk ki, hogy az alfa7 nAChR működésének gátlása (antagonizmuson vagy deszenzitizáción keresztül) előnyös a magatartási hatás szempontjából [12,57], és a memantine mint antagonistá prokognitív hatását a PHA-543613 mint deszenzitizáló ágens ilyen mechanizmusok útján fokozhatja [52].



6. ábra: Adott farmakon lokális alkalmazásának hatására tüzelési frekvencia növekedést, csökkenést vagy semleges választ mutató neuronok számának eloszlása. A kettőskereszt az ellentétes hatásnál szignifikánsan nagyobb gyakorisággal előforduló válaszokat jelöli: ### $p < 0,001$ (binomiális teszt).[52]

5. Összefoglalás és következtetések

Magatartás-farmakológiai kutatásaink a neurokognitív zavarok három különböző állatmodelljében igazolták az alfa7 nAChR agonista PHA-543613 és a memantine közötti farmakológiai interakciót. Mind a farmakológiailag kiváltott amnézia, mind az öregedésből illetve rmTBI-ekből fakadó kognitív deficit visszafordítására hatékonynak bizonyultak a PHA-543613 és a memantine alacsony (szubeffektív) dózisu kombinációi. A viselkedés szintjén jelentkező előnyös hatások háttérben álló mechanizmusokat in vivo elektrofiziológiai

módszerekkel is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a memantine és a PHA-543613 vagy a PAM CPDX alacsony dózisú kombinációi növelik a hippocampalis piramis sejtek spontán tüzelési aktivitását valamint ACh-ra illetve NMDA-ra adott tüzelési válaszainak intenzitását. Kísérleteinkben továbbá azt is kimutattuk, hogy a memantine-nak legalább két különböző hatékony dózistartománya van, melyek közül az alacsonyabb tartományban elsősorban a spontán tüzelésre és az ACh által kiváltott válaszokra hatott a memantine, míg a magasabb dózistartományban az NMDA által kiváltott válaszok gátlása volt megfigyelhető a spontán aktivitás fokozódása mellett.

Kutatásaink beleilleszkednek abba a nemzetközi trendbe, miszerint olyan komplex neurológiai-pszichiátriai betegségekre, mint amilyen az Alzheimer-kór és egyéb neurokognitív zavarok vagy a schizofrenia, a szelektív monoterápiák helyett kombinált vagy multi-target kezeléseket fejlesszenek. A neurokognitív zavarok kezelésére az FDA már korábban elfogadott egy donepezil és memantine megfelelő dóziskombinációját tartalmazó készítményt (Namzaric). Azonban az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) nem törzskönyvezte a gyógyszert arra hivatkozva, hogy nem támasztják alá tudományos eredmények a két vegyület kombinációjának a monoterápiákat felülmúló hatásosságát [58]. Klinikai próbák metaanalízise valóban azt mutatta, hogy a tisztán AChEI vegyületek és a memantine kombinálása csak korlátozottan javítja a hatásosságot a monoterápiákhoz képest [59]. Felmerült azonban, hogy jobb eredmények érhetők el, ha a memantine-t egy olyan AChEI-ral kombinálják, ami affinitást mutat az alfa7 nAChR allosztérikus kötőhelyéhez. Az alfa7 PAM aktivitással is rendelkező galantamine preklinikai kísérletekben szinergista prokognitív hatást mutatott a memantine-nal NOR tesztben [60]. A szinergizmussal kapcsolatban kimutatták annak alfa7 nAChR-aktíváló függését, ugyanis alfa7 antagonistákkal a kombinált kezelés prokognitív hatása felfüggeszthető volt. Kimutatták továbbá, hogy a galantamine mellett tisztán alfa7 nAChR PAM aktivitást mutató vegyületek (CCMI, PNU-120596) ko-adminisztrációja is növeli a memantine hatékonyságát. Kutatásaink alátámasztották a memantine prokognitív hatásait facilitáló alfa7 nAChR-függő jelenségeket, ugyanakkor kimutattuk azt is, hogy a farmakológiai interakció a receptoron ható direkt ortosztérikus agonista alkalmazása esetén is jelentkezik.

Eredményeink továbbá felhívják a figyelmet arra, hogy a memantine prokognitív hatásai legfeljebb részben tulajdoníthatók az NMDAR-okhoz való affinitásának és az ezeken a receptorokon kifejtett antagonizmusnak. A memantine az idegrendszeri receptorok széles köréhez mutat affinitást, és a kognitív teljesítmény javításában feltehetően jelentős szerepet játszanak más receptorokhoz, így az alfa7 nAChR-hoz való kötődése, akár már alacsonyabb

koncentrációban is [10]. Aracava és munkatársai (2005) már korábban kimutatták, hogy a memantine nagyobb affinitással kötődik az alfa7 nAChR-hoz, mint az NMDAR-hoz [11]. Elképzelhető, hogy ez az erős alfa7 nAChR affinitás áll a magatartás-kísérleteinkben tapasztalt alacsony dózisú memantine kezelések hatékonysága mögött. Ezt a feltevést megerősítették elektrofiziológiai méréseink is, melyek azt mutatták, hogy az ACh által kiváltott válaszokat már alacsony dózisban is facilitálta a memantine, míg az NMDA-ra adott válaszok gátlása csak igen magas dózisban következett be. Feltételezéseink szerint a memantine és az alfa7 nAChR ligandok közötti előnyös interakció egy kézenfekvő magyarázata az alfa7 nAChR-on, mint közös célponton kiváltott hatás. A továbbiakban még alaposabb magyarázatot igényel az a kérdés, hogy azonos receptoron ható agonista és antagonisták hogyan tudják egymás hatását facilitálni. Elektrofiziológiai kísérleteink erre egy lehetséges magyarázatként az agonisták deszenzitizáló hatását, és annak következtében kialakuló receptorális inaktivációt vetik fel [12,56,57,61], miután kimutattuk, hogy az agonista PHA-543613 és az antagonisták MLA kötődése végeredményben hasonló hatást válthat ki a neuronális tüzelési aktivitás (akciós potenciálok) szintjén hippocampalis piramisneuronokon [52]. Ezáltal kutatásaink az alfa7 nAChR-ok speciális működésével és – főként kognitív folyamatokban betöltött – szerepével kapcsolatban is értékes információkkal szolgálhatnak. A jelen dolgozatban összefoglalt eredmények ezáltal a neurokognitív zavarok kezelésére szolgáló gyógyszerjelölt vegyületek fejlesztését is elősegíthetik, különösen a kombinációs vagy multi-target kezelések területén.

6. Hivatkozások

1. Sachdev PS, Blacker D, Blazer DG, Ganguli M, Jeste D V., Paulsen JS, és mtsai. Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach. *Nat Rev Neurol.* 2014;10:634–642.
2. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 1982;217:408–414.
3. Pearson RC, Sofroniew M V, Cuello a C, Powell TP, Eckenstein F, Esiri MM, és mtsai. Persistence of cholinergic neurons in the basal nucleus in a brain with senile dementia of the Alzheimer's type demonstrated by immunohistochemical staining for choline acetyltransferase. *Brain Res.* 1983;289:375–379.
4. Henke H, Lang W. Cholinergic enzymes in neocortex, hippocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of alzheimer-type patients. *Brain Res.* 1983;267:281–291.
5. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 1981;10:122–126.
6. Alam S, Lingenfelter KS, Bender AM, Lindsley CW. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8:1823–1829.
7. Karimi Tari P, Parsons CG, Collingridge GL, Rammes G. Memantine: Updating a rare success story in pro-cognitive therapeutics. *Neuropharmacology.* 2024;244:109737.

8. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 1999;38:735–767.
9. Parsons CG, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*. 2007;53:699–723.
10. Rammes G, Danysz W, Parsons CG. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6:55–78.
11. Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX. Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:1195–1205.
12. Banerjee P, Samoriski G, Gupta S. Comments on „Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons”. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313:928–929; author reply 930-3.
13. Clarke PBS. The fall and rise of neuronal alpha-bungarotoxin binding proteins. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:407–413.
14. Changeux JP, Kasai M, Lee CY. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970;67:1241–1247.
15. Kemp G, Bentley L, McNamee MG, Morley BJ. Purification and characterization of the alpha-bungarotoxin binding protein from rat brain. *Brain Res*. 1985;347:274–283.
16. Conti-Tronconi BM, Dunn SMJ, Barnard EA, Dolly JO, Lai FA, Ray N, és mtsai. Brain and muscle nicotinic acetylcholine receptors are different but homologous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:5208–5212.
17. Alkondon M, Albuquerque EX. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265:1455–1473.
18. Schoepfer R, Conroy WG, Whiting P, Gore M, Lindstrom J. Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*. 1990;5:35–48.
19. Zoli M, Léna C, Picciotto MR, Changeux JP. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci*. 1998;18:4461–4472.
20. Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, és mtsai. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron*. 1990;5:847–856.
21. Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, és mtsai. Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*. 1998;52:173–185.
22. Chini B, Raimond E, Elgoyhen AB, Moralli D, Balzaretta M, Heinemann S. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunit gene (CHRNA7). *Genomics*. 1994;19:379–381.
23. Chen D, Patrick JW. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem*. 1997;272:24024–24029.
24. Orr-Urtreger A, Göldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, és mtsai. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci*. 1997;17:9165–9171.
25. Schilström B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 1998;85:1005–1009.
26. Breese CR, Adams C, Logel J, Drebing C, Rollins Y, Barnhart M, és mtsai. Comparison of the regional

- expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 mRNA and [125I]-alpha-bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J Comp Neurol.* 1997;387:385–398.
27. Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, Jakowec M, Lloyd GK, Langston JW. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 2000;425:58–69.
 28. Hunter BE, de Fiebre CM, Papke RL, Kem WR, Meyer EM. A novel nicotinic agonist facilitates induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1994;168:130–134.
 29. Broide RS, Leslie FM. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol.* 1999;20:1–16.
 30. Levin ED, Bettogowda C, Blosser J, Gordon J. AR-R17779, and alpha7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav Pharmacol.* 1999;10:675–680.
 31. Fujii S, Ji Z, Sumikawa K. Inactivation of alpha7 ACh receptors and activation of non-alpha7 ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Neurosci Lett.* 2000;286:134–138.
 32. Riley BP, Makoff A, Mogudi-Carter M, Jenkins T, Williamson R, Collier D, és mtsai. Haplotype transmission disequilibrium and evidence for linkage of the CHR7A7 gene region to schizophrenia in Southern African Bantu families. *Am J Med Genet.* 2000;96:196–201.
 33. Leonard S, Gault J, Moore T, Hopkins J, Robinson M, Olincy A, és mtsai. Further investigation of a chromosome 15 locus in schizophrenia: analysis of affected sibpairs from the NIMH Genetics Initiative. *Am J Med Genet.* 1998;81:308–312.
 34. Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Olincy A, Davis A, és mtsai. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:587–592.
 35. Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport.* 1999;10:1779–1782.
 36. Hellström-Lindahl E, Mousavi M, Zhang X, Ravid R, Nordberg A. Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;66:94–103.
 37. Utsugisawa K, Nagane Y, Tohgi H, Yoshimura M, Ohba H, Genda Y. Changes with aging and ischemia in nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha7 mRNA expression in postmortem human frontal cortex and putamen. *Neurosci Lett.* 1999;270:145–148.
 38. Rei RT, Sabbagh MN, Corey-Bloom J, Tiraboschi P, Thal LJ. Nicotinic receptor losses in dementia with Lewy bodies: comparisons with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000;21:741–746.
 39. Guan ZZ, Zhang X, Ravid R, Nordberg A. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2000;74:237–243.
 40. Ferrari R, Pedrazzi P, Algeri S, Agnati LF, Zoli M. Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain. *Neurobiol Aging.* 1999;20:37–46.
 41. Conejero-Goldberg C, Davies P, Ulloa L. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: a link between inflammation and neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:693–706.
 42. de Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol.* 2007;151:915–929.
 43. Wallace TL, Porter RHP. Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol.* 2011;82:891–903.
 44. Terry A V., Callahan PM. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets in schizophrenia: Update on animal and clinical studies and strategies for the future. *Neuropharmacology.* 2020;170:108053.
 45. Burns LH, Pei Z, Wang H-Y. Targeting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and their protein interactions in Alzheimer's disease drug development. *Drug Dev Res.* 2023;84:1085–1095.

46. Bali ZK, Inkeller J, Csurgyók R, Bruszt N, Horváth H, Hernádi I. Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav Brain Res.* 2015;278:404–410.
47. Bali ZK, Nagy LV, Hernádi I. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Play a Predominant Role in the Cholinergic Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Evoked Firing Responses of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:271.
48. Bali ZK, Bruszt N, Tadepalli SA, Csurgyók R, Nagy LV, Tompa M, és mtsai. Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. *Front Pharmacol.* 2019;10:73.
49. Bruszt N, Bali ZK, Tadepalli SA, Nagy LV, Hernádi I. Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer's disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task. *Psychopharmacology (Berl).* 2021;238:3273–3281.
50. Tadepalli SA, Bali ZK, Bruszt N, Nagy LV, Amrein K, Fazekas B, és mtsai. Long-term cognitive impairment without diffuse axonal injury following repetitive mild traumatic brain injury in rats. *Behav Brain Res.* 2020;378:112268.
51. Bruszt N, Bali ZK, Nagy LV, Bodó K, Engelmann P, Hernádi I. Synergistic effects of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 to improve memory of aged rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2025;28.
52. Bali ZK, Nagy LV, Budai D, Hernádi I. Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo. *Sci Rep.* 2019;9:9324.
53. Nagy LV, Bali ZK, Ledneczki I, Némethy Z, Lendvai B, Hernádi I. Cellular Mechanisms of Cognitive Enhancement: The In Vivo Modulation of the Firing Activity and the Responsiveness of Rat Hippocampal Neurons by Memantine and Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands. *ASN Neuro.* 2024;16:2371160.
54. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates.* 7th kiad. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2014.
55. Bali ZK, Nagy LV, Bruszt N, Bodó K, Engelmann P, Hernádi Z, és mtsai. Increased brain cytokine level associated impairment of vigilance and memory in aged rats can be alleviated by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment. *GeroScience.* 2024;46:645–664.
56. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 2005;28:371–378.
57. Buccafusco JJ, Beach JW, Terry A V. Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328:364–370.
58. Deardorff WJ, Grossberg GT. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3267–3279.
59. Tsoi KKF, Chan JYC, Leung NWY, Hirai HW, Wong SYS, Kwok TCY. Combination Therapy Showed Limited Superiority Over Monotherapy for Alzheimer Disease: A Meta-analysis of 14 Randomized Trials. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17:863.e1-8.
60. Nikiforuk A, Potasiewicz A, Kos T, Popik P. The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav Brain Res.* 2016;313:214–218.
61. van Goethem NP, Paes D, Puzzo D, Fedele E, Rebosio C, Gulisano W, és mtsai. Antagonizing $\alpha 7$ nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition. *Cell Signal.* 2019;62:109338.

A tudományos előadás alapjául szolgáló saját közlemények

N. Bruszt, **Z. K. Bali**, L. V. Nagy, K. Bodó, P. Engelmann, and I. Hernádi, “Synergistic effects of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 to improve memory of aged rats.” *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, vol. 28, no. 3, 2025. **IF(2023): 4.5 – SJR: D1**

L. V. Nagy, **Z. K. Bali**, I. Ledneczki, Z. Némethy, B. Lendvai, and I. Hernádi, “Cellular Mechanisms of Cognitive Enhancement: The In Vivo Modulation of the Firing Activity and the Responsiveness of Rat Hippocampal Neurons by Memantine and Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands,” *ASN Neuro*, vol. 16, no. 1, 2024. **IF(2023): 3.9 – SJR: Q1**

N. Bruszt, **Z. K. Bali**, S. A. Tadepalli, L. V. Nagy, and I. Hernádi, “Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer’s disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task” *Psychopharmacology*, vol. 238, no. 11, pp. 3273–3281, 2021. **IF: 4.415 – SJR: Q1**

S. A. Tadepalli, **Z. K. Bali**, N. Bruszt, L. V. Nagy, K. Amrein, B. Fazekas, A. Büki, E. Czeiter, and I. Hernádi, “Long-term cognitive impairment without diffuse axonal injury following repetitive mild traumatic brain injury in rats” *Behavioural Brain Research*, vol. 378, 2020. **IF: 3.332 – SJR: Q2**

Z. K. Bali, L. V. Nagy, D. Budai, and I. Hernádi, “Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019. **IF: 3.998 – SJR: D1**

Z. K. Bali, N. Bruszt, S. A. Tadepalli, R. Csurgyók, L. V. Nagy, M. Tompa, and I. Hernádi, “Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats” *Frontiers In Pharmacology*, vol. 10, 2019. **IF: 4.225 – SJR: Q1**