

Glutamáterg vegyületek hatása a tovaterjedő depolarizációra, és felismerési memóriában az emléknym kialakulására: gyógyszerfejlesztési szempontok

Doktori (PhD) értekezés

Idegtudomány és humánbiológia c. doktori program

Programvezető: Prof. Dr. Détári László

Írta:

Kertész Szabolcs

állatorvos

Témavezető:

Dr. habil. Lévay György

az orvostudomány kandidátusa

Készült:

EGIS Gyógyszergyár Nyrt.

2009

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A glutamáterg ingerület-átvivő rendszer	3
2.1.1. NMDA receptorok	3
2.1.2. AMPA receptorok	5
2.1.3. Kainát receptorok	6
2.1.4. Metabotróp glutamát receptorok	7
2.1.5. Aminosav transzporterek	8
2.2. A glutamáterg rendszer és a kognitív funkciók kapcsolata	10
2.3. Neuropszichiátriai kórképek és a glutamáterg rendszer	14
2.3.1. Szkizofrénia	14
2.3.2. Depresszió (hangulatzavarok)	16
2.3.3. Alzheimer demencia	17
2.4. A glutamát neurotranszmisszióra ható vegyületek – kognitív terápiás lehetőségek	18
2.4.1. AMPA receptor pozitív modulátorok	18
2.4.2. Glicin transzporter-1 (GlyT1) gátló vegyületek	20
2.4.3. Memantin: egy "jó" NMDA receptor antagonistá	21
2.5. A glutamáterg ligandok kísérletes gyógyszerhatástani vizsgálata	22
2.5.1. Tovaterjedő depolarizáció és a glutamáterg rendszer	22
2.5.2. Tárgyfelismerés: vizuális felismerési memória	25
3. CÉLKITŰZÉSEK	27
4. MÓDSZEREK	28
4.1. Tovaterjedő depolarizáció mérése csirke retinán	28
4.2. Tárgyfelismerési teszt patkányon	32
4.3. Felhasznált anyagok.	34

5. EREDMÉNYEK	36
5.1. <i>In vitro</i> vizsgálatok	36
5.1.1. AMPA/kainát receptor modulátorok hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumon	36
5.1.1.1. AMPA receptor agonistáknak és antagonistáknak az SD latenciájára kifejtett hatása	36
5.1.1.2. AMPA/kainát receptor pozitív modulátorok hatása az SD-re	37
5.1.1.3. AMPA receptor pozitív modulátorok hatása	39
5.1.1.4. AMPA receptor pozitív és negatív modulátorok kölcsönhatása csirke retina SD teszten	41
5.1.1.5. AMPA receptor pozitív modulátorok kölcsönhatása SD-ben	43
5.1.2. Glicin transzporter gátló vegyületek hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumon	47
5.1.3. A deramciklán (EGIS-3886) hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumon	49
5.2. <i>In vivo</i> vizsgálatok	52
5.2.1. AMPA/kainát és NMDA receptor modulátorok memóriajavító hatásának vizsgálata tárgyfelismerés teszten patkányban	52
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	60
6.1. A csirke retinán kiváltott tovaterjedő depolarizáció és a glutamáterg ligandok szerepe	60
6.1.1. AMPA/kainát receptorok	60
6.1.2. Glicin visszavétel gátlók hatása az SD-re	64
6.1.3. A deramciklán hatása az NMDA-val kiváltott SD-re	67
6.2. A különböző glutamáterg vegyületek hatása tárgyfelismerésre	68
7. ÖSSZEFOGLALÁS	73
8. IRODALOMJEGYZÉK	75
9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	93
RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS	95
SUMMARY	96
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97

1. BEVEZETÉS

A pszichiátriai, neurológiai elváltozások kialakulását gyakran kíséri, illetve megelőzi a kognitív funkciók romlása. A depresszió, a szorongásos megbetegedések, a szkizofrénia az európai, észak-amerikai társadalmakban magas prevalenciával jelentkező, sok esetben élethosszig tartó betegségek. Ezeknek a kórképeknek a gyógyítása során a lelki-érzelmi életet esetenként súlyosan érintő hatások kezelésén kívül a gondolkodásban, tanulásban, memóriában bekövetkező romlás megállítása, esetleges megfordítása is terápiás cél (lehet). Traumás események (stroke), illetve epilepszia, okozhatják a kognitív funkciók gyors, illetve fokozatos romlását. A megnövekedett átlagos élettartammal pedig megnövekszik olyan, az idegrendszer elfajulásával járó betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntigton-kór, prion-betegségek, stb.) előfordulási aránya, amelyekben a kognitív működés is súlyosan károsodik. Mindezekből következik, hogy a kognitív folyamatok gyógyászati célzatú befolyásolásának igénye, és az ezirányú gyógyszerkutatói tevékenység jelentős mértékű.

A megfelelő kognitív működés fenntartásában számos ingerület-átvivő anyag szerepe és azok kölcsönhatása ismert (glutamát, acetilkolin, GABA, szerotonin, dopamin), ezért az elváltozások gyógyszeres kezelésének számos neurotranszmitter rendszer lehet a terápiás célterülete. A felsoroltak közül az EGIS Gyógyszergyárban elsősorban a glutamáterg vegyületek kutatásában és fejlesztésében vettem részt.

A glutamát (glutaminsav) az idegrendszer legjelentősebb, serkentő neurotranszmittere, amely számos, fent említett tünetegyüttesben központi szerepet játszik. A különböző glutaminsav receptor – és receptor alegység – specifikus ligandok, agonisták, kompetitív és nem-kompetitív antagonisták, negatív és pozitív allosterikus modulátorok, transzporter gátló vegyületek felfedezésével lehetővé vált a glutamáterg rendszer specifikus vizsgálata. Gyógyszerfejlesztési szempontból pedig kezdettől nagy várakozás kísérte a glutaminsav receptor ligandok fejlesztését, és a – többek között a leromlott kognitív funkciók javításának reményét hordozó – kísérletes és klinikai gyógyszerhatástani vizsgálatokat.

Az EGIS Gyógyszergyárban folytatott, glutamáterg vegyületekkel kapcsolatos originális gyógyszerkutatói munkában a fejlesztésbe került molekuláktól alapvetően két területen vártuk a kognitív működés – kísérletes szempontból a tanulási teszteken mért teljesítmény – növekedését: a pozitív allosterikus AMPA receptor modulátorok,

valamint a glicin transzporter gátló molekulák esetében. Ezen kívül felmerült az EGIS originális vegyületének, a deramcikliánnak már korábban közölt NMDA receptor antagonistá tulajdonsága kapcsán, hogy esetlegesen a memantinhoz hasonlóan prokognitív tulajdonsággal bír.

A gyógyszerfejlesztés során indokoltta vált egy egyszerű, mégis elegendően informatív, nagy áteresztő-képességű *in vitro* módszer beállítása, amellyel a vizsgálandó vegyületeket első körben szűrni lehetett. Mindehhez megfelelőnek tűnt a csirke retinán mért tovaterjedő depolarizáció (spreading depression, SD), amely AMPA receptor antagonisták gyógyszerfejlesztési célzatú tesztelésében régóta alkalmazott módszer.

A vegyületek kognitív hatásának *in vivo* vizsgálatára a tárgyfelismerés tesztet választottuk, amely pozitív és negatív megerősítéstől mentesen, az állatok spontán, környezetet felfedező (exploratív) tevékenységét használja ki, ezáltal a humán demencia folyamatát jobban modellezi.

A doktori értekezésben tárgyalt kísérleteket az EGIS Gyógyszergyárban végeztem.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A glutamáterg ingerület-átvivő rendszer

Az L-glutaminsav (glutamát) a központi idegrendszer legfontosabb, serkentő ingerület-átvivő anyaga. Az idegsejtek mintegy 60%-ában, szinte az összes thalamokortikális, kortiko-kortikális és motoros neuronban a glutaminsav az elsődleges neurotranszmitter (*Nieuwenhuys, 1994*). Idegrendszeri serkentő hatását először az 1950-es években írták le emlős agykéregben (*Hayashi, 1954*) és a gerincvelőben (*Curtis és Watkins, 1960*). Az azonban, hogy a glutamát az elsődleges, serkentő ingerület-átvivő anyag a gerincesek idegrendszerében, csak a 70-es évek végére vált nyilvánvalóvá. Erre az időre datálódik, hogy gerincvelői neuronokon végzett vizsgálatokban, specifikus agonisták alkalmazása alapján háromféle glutamát receptor meglétét feltételezték: N-metil-D-aszparaginsav (NMDA), 2-karboxi-3-karboximetil-4-izopropenil-pirrolidin (kainát) és α -amino-3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidin-2-propánsav (kviszkalát) receptorok (*Davies és Watkins, 1981*). A kviszkalátnál jóval szelektívebb α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) felfedezése, és glutamáterg agonista hatásának leírása (*Höslí és mtsai, 1983*) vezetett oda, hogy ma az ioncsatorna-kapcsolt (ionotróp) glutamát receptor családot NMDA, AMPA és kainát receptorokra osztjuk. Később kimutatták, hogy a glutaminsav G-fehérjéhez kötött receptorokhoz is kapcsolódik, ezek alkotják a metabotróp glutamáterg receptorok csoportját (*Sugiyama és mtsai, 1989*).

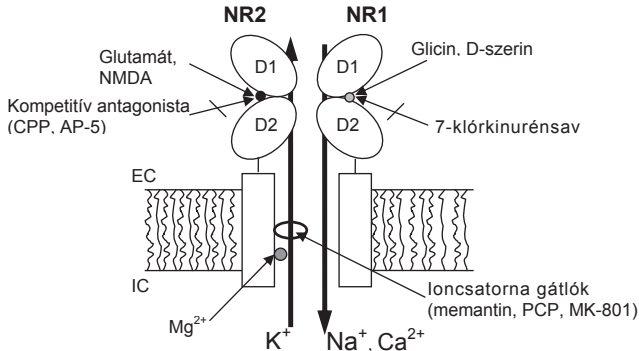
2.1.1. NMDA receptorok

A 90-es évek első felében végzett molekuláris biológiai vizsgálatok során írták le az ionotróp glutamáterg receptorok szerkezetét (*Hollmann és Heinemann, 1994*). A natív ionotróp glutaminsav receptorok általában négy, esetenként öt alegységből felépülő, többféle alegységből összeálló (heterotetramer vagy heteropentamer) szerkezetet vehetnek föl (*Kew és Kemp, 2005*). Az alegységek 3 transzmembrán (m1, m3, m4) doménből, és egy intracellulárisan visszahajló hurokból (m2) épülnek fel. Ez utóbbinak van szerepe az ioncsatorna kialakításában. Az egyes alegységeken belül az m1 transzmembrán doménhez kapcsolódó (D1), valamint az m3 és m4 domének közötti extracelluláris (D2) szakaszokon található régiók (S1 és S2) képezik az agonista kötőhelyet (*Dingledine és mtsai., 1999, Sun és mtsai, 2002*) (1. ábra).

Az NMDA receptorokat jelenlegi ismereteink szerint 7 alegység alkothatja: NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B. A működőképes NMDA receptorok általában négy vagy öt alegységből épülnek fel, és heteropentamerek: rendszerint két NR1, és egy vagy több NR2 alegység szükséges a felépítésükhöz. Kationcsatornaként funkcionálnak, a transzmembrán domének által alkotott pórus Ca^{2+} és Na^{+} -ionokra permeábilis. Az NR2 alegységekhez kötődik a glutaminsav, az NR1 és NR3 alegységhez pedig (glicin_B kötőhely) az NMDA receptoron koagonista tulajdonsággal rendelkező glicin kapcsolódik (Anson és mtsai., 1998). A glicin önmagában nem aktiválja a receptort, de a glutamát jelenlétében befolyásolja az ioncsatorna nyitási-zárási kinetikáját. Béka (*Xenopus laevis*) petesejtben mesterségesen kifejezett NR1/NR3 összetételű NMDA receptorok aktiválásához nem volt szükség glutaminsavra, a glicin önmagában elegendő volt a kationáram indukálásához (Chatterton és mtsai., 2002), de NR3 alegységet expresszáló idegsejtekben még nem figyeltek meg serkentő glicin receptorokat. Az előagyi területeken leginkább az NR2A és NR2B alegységek fejeződnek ki, NR2C alegység nagyrészt a kisagyi szemcsesejtekben található. Az NR2D és NR3 alegységek elsősorban a korai fejlődés során mutathatók ki az agyban, NR3B alegység jelenlétét pedig az agytörzsi és gerincvelői mozgató idegsejtekben mutatták ki (Nishi és mtsai., 2001).

Az NMDA receptor működése egyedi a ligand-kötött ioncsatornák között; tulajdonképpen a Hebb-féle szinapszis működéséhez hasonló. Az ionáteresztő pórus nyitásához egyrészt szükséges az agonisták (L-glutaminsav és L-glicin vagy D-szerin) egyidejű jelenléte. Ugyanakkor a posztzinaptikus membránnak is depolarizált állapotban kell lennie ahhoz, hogy a nyugalmi állapotban az ioncsatorna belsejéhez kötődő, élettani csatorna blokkoló, a Mg^{2+} leválásával az ioncsatorna megnyíljen. Az NMDA receptorokon átfolyó kationáram a serkentő posztzinaptikus potenciál (EPSP) későbbi, lassabb szakaszáért felelős. A receptor Ca^{2+} -áteresztő-képességének különös szerepe van az idegrendszer fejlődésében, valamint a neurotoxicitás folyamatában is. Az NMDA receptorok működése meghatározó a szinaptikus plaszticitás alapját képező tartós potenciózás (long term potentiation: LTP) kialakulásában, míg az AMPA receptorok az LTP fennmaradásáért felelősek. E folyamatokban betöltött szerepüket részletesebben taglalom a 2.2 fejezetben.

1. ábra Az NMDA receptor sematikus felépítése és kötőhelyei

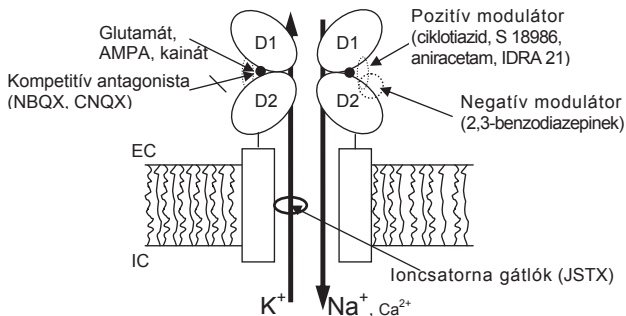


2.1.2. AMPA receptorok

Az AMPA receptorokat négyféle alegység képezheti (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4). Az így felépülő ioncsatorna Na^+ , ill. Ca^{2+} átteresztő-képességgel rendelkezik. A GluR2 alegység meglete kritikus a Ca^{2+} átteresztő-képesség szempontjából: a GluR2-t tartalmazó AMPA-receptorok nem Ca^{2+} -permeábilisak. Az m3 és m4 domének közötti hurkon található egy filogenetikailag konzervatív régió, melyet kétféle génszakasz kódolhat. A végleges aminosav szekvenciát a transzkripciót megelőzően az mRNS érésekor az ún. alternatív összevágás (splicing) határozza meg. Így a természetben ugyanazon fehérjeszakasz minden AMPA alegység esetén két formában (flip és flop) fejeződik ki (*Sommer et al. 1990*). A két változat eltér a receptor deszzenzitizáció mértékében, vagyis abban, hogy az agonistának a receptorhoz való kötődése ellenére milyen gyorsan és milyen mértékben csökken az ionáteresztő-képesség. Ezen kívül más affinitást mutatnak a két variáns iránt az AMPA receptor allosztérikus modulátorai – azok a vegyületek, amelyek az extracelluláris doméneken az agonista kötőhelyétől különböző területhez kapcsolódva befolyásolják az ioncsatorna kinetikáját (**2. ábra**) (bővebben lásd a **6.1.1.** fejezeten). A GluR2 és GluR4 alegységek esetében további, intracelluláris splice variánsok léteznek, amelyeknek feltehetően a sejten belüli fehérjék közötti kapcsolatok kialakításában játszanak szerepet (*Dingledine és mtsai., 1999*). Jóllehet az AMPA receptorok a glutamát iránt alacsonyabb affinitást mutatnak, mint az NMDA

receptorok, azonban gyorsabb kinetikájúak, és az EPSP kezdeti, gyors komponenséért felelősek. Speciális tulajdonságuk az agonista hatására történő gyors aktiválódás (ioncsatorna nyitás), az agonista leválására gyors deaktiválódás (ioncsatorna záródás) és a gyors deszenzitizálódás: az agonista jelenlétében 1-2 ms alatt lecsökken az ionáteresztő-képességük, vagyis az ioncsatorna részlegesen zárul (Clements és mtsai., 1996). E tulajdonságaik alkalmassá teszik az AMPA receptorokat a gyors idegi impulzusok közvetítésére.

2. ábra Az AMPA receptor sematikus felépítése és kötőhelyei



2.1.3. Kainát receptorok

A kainát receptorokat ötféle alegység alkothatja (GluR5, GluR6, GluR7, KA-1, KA-2). A natív receptorok mind hetero-, mind homotetramer formában előfordulnak. A GluR5-7 alegységek képezhetnek működő homomer receptorokat, de ezekhez az alegységekhez a kainát alacsonyabb affinitással kötődik. A KA-1 és KA-2 alegységek nem képeznek funkcionális homomer ioncsatornát, ellenben a kainátot nagy affinitással kötik (Hollmann és Heinemann, 1994). A kainsav az AMPA receptorokhoz kötődve nem deszenzitizálódó áramot indukál, azaz kainsav jelenlétében az AMPA receptor ioncsatornája nyitott állapotban marad. Ezzel szemben a kainát receptorokon a kainsav gyors, néhány ms alatt bekövetkező deszenzitizációt okoz. A szelektív, 2,3 benzodiazepin típusú AMPA receptor antagonisták felfedezése (Rogawski, 1993; Tarnawa és mtsai., 1989; Tarnawa és Vizi, 1998; Zorumski, 1993) hozott igazi áttörést a kainát receptorok élettani működésének vizsgálatában. Ezek a

vegyületek lehetővé tették az AMPA áramok szelektív gátlása révén a kainát áramok mérését (*Paternain és mtsai., 1995, Lerma és mtsai, 2001*). A szelektív, kainát receptoron pozitív allosztérikus modulátor hatású concanavalin A, amely csökkenti a kainsav hatására kialakuló gyors deszenzitizációt (*Partin és mtsai, 1993*), szintén széles körben használt vegyületté vált a kainát receptorok vizsgálatában. A kainát receptorok mindenütt előfordulnak a központi idegrendszerben, de az egyes alegységek megjelenése a különböző régiókban nagy eltérést mutat, és azonos területen is eltérő lehet a különböző sejtípusokon. A GluR5 előfordulása jellemző a halántéklebenyben, és az amygdalában GluR5 agonista vegyülettel epileptikus aktivitás váltható ki (*Rogawski és mtsai, 2003*). Számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálat megerősíti a kainát receptor feltételezett szerepét a status epilepticus kialakulásában (*Lerma és mtsai, 2001*). A hippocampusban a GluR5 alegység nagy mennyiségben fejeződik ki az interneuronokon, míg a GluR6 alegység inkább a CA3 régió fősejtjein mutatható ki. A tanulás és memória bizonyos szakaszaiban megfigyelhető, hippocampális γ -oszilláció szabályozásában eltérő módon vesz részt a GluR5 és GluR6 alegység: a GluR5 alegység hiánya növelte, míg a GluR6 hiánya gátolta a kainát által kiváltott epileptikus tüzelési mintázatot (*Fisahn, 2005*).

2.1.4. Metabotróp glutamát receptorok

A G-proteinnel kapcsolt metabotróp receptoroknak ezidáig 8 csoportja lett azonosítva (mGluR1-8), amelyek az aminosav szekvenciában kimutatható hasonlóság és a farmakológiai tulajdonságok alapján három főbb csoportra oszthatók. Az I. csoport (mGluR1 és mGluR5) a G_q/G_{11} fehérjéhez kapcsolódva foszfolipáz-C enzim aktiválásával növeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, a II. (mGluR2, mGluR3) és III. (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) csoport a G_i/G_o fehérjéhez való kötődésen keresztül az adenilát-cikláz gátlásával csökkenti a ciklikus-AMP szintet. A II. és III. család tagjai farmakológiájukban különböznek egymástól (*Schoepp és Conn, 1993*). Az mGluR6 alegység a retina bipoláris sejtjein található (*Nakajima és mtsai., 1993*), a többi alegység mind idegsejteken, mind gliasejteken kimutatható. Az idegsejteken lévő I. mGluR család leginkább poszt-szinaptikusan, a szomatodendritikus területeken, míg a II. és III. család főleg preszinaptikusan, az axonon és axonterminálison helyezkedik el (*Kew és Kemp, 2005*). A metabotróp glutamát receptorok közvetlenül befolyásolhatják a szinaptikus transzmissziót a

lassú, serkentő posztzinaptikus potenciál kiváltásával, élettani hatásuk azonban inkább – mind a pre-, mind a posztzinaptikus oldalon – az idegsejtek ingerelhetőségének szabályozásán keresztül jelentkeznek. Az mGluR család tagjai kulcsfontosságúak a glutamát okozta neurotoxicitásban és a szinaptikus plaszticitás fenntartásában (*Pin és Duvoisin, 1995*). Az I. csoportba tartozó preszinaptikus receptorok aktivációja serkenti (*Schwartz és Alford, 2000*), a II. és III. csoportba tartozóké csökkenti (*Allen és mtsai., 1999*) a Ca^{2+} és glutamát felszabadulást, ezáltal eltérően hatnak az NMDA receptorok működésére és az LTP kialakulására (*Grassi és mtsai., 2002*). A metabotróp glutamáterg receptoroknak az NMDA receptor modulációjának és a szinaptikus ingerület-ávitelnek a kapcsolatában játszott szerepe jelenleg is kutatások tárgyát képezi (*pl. Neyman és Manahan-Vaughan, 2008*, lásd **2.2.** fejezet).

2.1.5. Aminosav transzporterek

Glutaminsav transzporterek

Az emlős idegrendszerből öt glutaminsav transzportert klónoztak a plazmamembránból (EAAT1-5). Az EAAT1 és EAAT2 fordul elő a legnagyobb mennyiségben, a glutaminsav újrafelvételt legnagyobb mértékben ezek végzik, szinte kizárólag az asztroglia-sejtekben található. Az EAAT1 a kisagyban, míg az EAAT2 elsősorban az előagy területén fordul elő. Az EAAT3 idegsejtekben mutatható ki, az EAAT4 szintén (ez utóbbi a kisgyi Purkinje-sejtekben). Az EAAT5 pedig a retinában, a Müller gliasejtekbe történő glutaminsav visszavételért felelős. A transzporterek Na^+/K^+ -függő elektrogén ionpumpák. Az EAAT2(GLT-1) esetében kimutatták, hogy egy glutamát anion szállításával egyidejűleg 3 Na^+ és 1 H^+ lép be a sejtbe, míg az ellenkező irányban egy K^+ kilépése történik meg (*Levy és mtsai, 1998*). A szinaptikus vezikulák membránjában háromféle transzportert írtak le (VGLUT1-3), amelyek működése a H^+ -gradienstől függ (*Shigeri és mtsai, 2004*). A plazmamembránban található transzporterek nem szelektívek a glutaminsavra, D- és L- aszpartátot is szállítanak, míg a vezikuláris transzporterek csak L-glutaminsavat vesznek fel. A vezikuláris transzporterek feladata a glutamát gyors kiürítésének biztosítása, ezzel szemben a plazmamembrán transzporterek a glutamát a szinaptikus részből történő gyors eltávolításában működnek közre, a gyors és hatékony újrafelvétel révén megakadályozva, hogy a glutaminsav excitotoxikus hatást fejtsen ki (*Beart és*

O'Shea, 2007). Különbőség van azonban a gliasejten található és az idegsejten lévő glutaminsav transzporterek funkciója között. Amíg a gliális transzporterek fő feladata a glutaminsav visszavétele, bizonyos szinapszisokban, különösen a kisagyban, ahol sok extraszinaptikus glutamát receptor helyezkedik el, addig a neuronális transzportereknek az ingerület-áttevődés szabályozásában is szerepe van. Ezekben a szinapszisokban kimutatták, hogy az EAAT4 működése a kisgyi Purkinje sejteken limitálja a metabotróp glutamát receptorokon keresztül jelátvitelt (*Wadiche és Jahr, 2005*) és a kisgyi neuronális transzporterek gátlása facilitálja az mGluR receptorok által szabályozott LTD-t (*Brasnjo és Otis, 2001*).

Glicin transzporterek

A glicin transzportereknek (GlyT) két formája ismeretes, a GlyT1 és GlyT2, amelyek Na^+/Cl^- -függő hordozó molekulák. A GlyT2 a gátló glicinerg szinapszisokban a preszinaptikus idegvégződésen található, és elsődleges funkciója a glicin felvétele a preszinaptikus idegvégződésbe, ezáltal a szinaptikus vezikulák feltöltésének elősegítése. A GlyT1 pedig a glutamáterg serkentő szinapszisokban mutatható ki preszinaptikusan, ill. mind a gátló, mind a serkentő szinapszistokat környező gliasejteken (*Cubelos és mtsai., 2005*). Fő feladata a glicin eltávolítása a szinaptikus részből, ezáltal a glicin mennyiségének szabályozása, hogy az a posztzinaptikus NMDA receptorokon a telítés szintje alatt maradjon (*Eulenburg és mtsai., 2005*). A GlyT2 esetében egy glicin szállításával egyidejűleg 3 Na^+/Cl^- kotranszportja történik, míg a GlyT1 2 Na^+/Cl^- szállítását végzi a glicinnel együtt (*Roux és Supplisson, 2000*). Ezzel van összefüggésben, hogy a GlyT2 egy irányba, az axonterminálisba szállít glicint, ezzel szemben a GlyT1-en keresztüli glicinszállítás kétirányú lehet a membránpotenciáltól, az iongrádientstől és a szubsztrát-koncentrációtól függően (*Supplisson és Roux, 2002*). Normál esetben a GlyT1 a glicint eltávolítja a szinapszistól a gliasejtekbe. Szállíthat azonban az ellenkező irányba is, ilyenkor a glicin felszabadul a gliasejtekből, és megemelkedik a szintje a szinapszisban. A GlyT1-nek eddig hat izoformáját (GlyT1a-f) azonosították, ezek mind a gliasejtek, mind a neuronok membránjában kimutathatók (*Yang és Svensson, 2008*). Több állatfajban kimutatták a GlyT1 jelenlétét a retinában is (*Pow és Hendrickson, 1999*). A GlyT1 gátló vegyületek serkentik az NMDA receptorhoz kapcsolható szinaptikus plaszticitást (lásd **2.4.2.** fejezet). Szelektíven az agykérgi és hippocampális

idegsejtekben GlyT1 hiányos (knockout) egerekből származó agyselejteken mért serkentő posztszinaptikus áram (EPSC) NMDA komponense megnövekedett, és az egerek különböző tanulási modellekben a vad típushoz képest jobban teljesítettek (Yee és mtsai., 2006).

2.2. A glutamáterg rendszer és a kognitív funkciók kapcsolata

A külvilággal való kapcsolatot, a környezeti ingerekre adott megfelelő, adaptív válaszokat az emlékezet és a kognitív mechanizmusok alapvetően határozzák meg. Az új ismeretek megszerzését, a tanulást követően a tapasztalatok, információk előhívása, az emlékezés a lejátszódó folyamatok időbelisége szerint két részre osztható: a rövid távú vagy munkamemória az új információk gyűjtésében játszik szerepet, a begyűjtött információ rögzüléséért pedig, rendszerezés és kódolás után a hosszú távú memória a felelős. A hosszú távú memória részét képezi az – állatokban nagyobb jelentőséggel bíró – procedurális vagy implicit (tanult mozgásokhoz, magatartáshoz, tevékenységhez kötődő), valamint a deklaratív vagy explicit (adatok, tények, szituációk, események tárolását és felidézését végző) memória. Bár a magasabb kognitív funkciók nehezen mérhetőek állatkísérletekben, az összetett folyamatok – kísérletes körülmények között, állatokban is jól modellezhető – elemi tanulási folyamatokon alapulnak, amelyek lehetnek nem társításon alapuló (habituáció, szenitizáció) és társításon alapuló (asszociatív). Az asszociatív tanulás klasszikus modellje a pavlovi kondicionálás: feltételes inger (hang, fény) + feltétlen inger (jutalom, büntetés) → feltételes reflex. Az operáns kondicionálás során a feltételes ingert az állat által végrehajtott, tanult cselekvéssor jelenti.

A tanulás és memória különféle formáiban különböző agyterületek érintettek. A munkamemória – az a képesség, hogy bizonyos információkat rövid időn belül „online” feldolgozva azonnali döntések születhessenek – elsősorban a prefrontális kéreg és a hippokampusz feladata (Goldman-Rakic, 1987). A hippokampusz a térbeli és időbeli memória kialakulásában is központi szerepet játszik.

Az információ-feldolgozás alapját a különböző agyterületeken hasonló sejt- és molekuláris szintű folyamatok adják. A leginkább tanulmányozott jelenség a hippokampális serkentő szinaptikus plaszticitás, amelynek kialakulásában az NMDA receptorok játszik a fő szerepet (Davis és mtsai., 1992; Huerta és mtsai., 2000; McHugh és mtsai., 1996; Morris és mtsai., 1986; Nakazawa és mtsai., 2002; Tang és

mtsi., 1999; *Tsien és mtsai.*, 1996) A Hebb-féle – a szinaptikus kapcsolat erősödéséhez a pre- és posztszinaptikus sejt egyidejű aktivitását feltételező – modell (1949) sejt szintű alapjai feltehetően a szinaptikus áttevődés hatékonyságának hosszútávú potenciózása (long term potentiation: LTP) (*Bliss és Collingridge*, 1993) és hosszútávú csökkenése (long term depression, LTD) (*Ito*, 1986) jelenségében kereshetők. Az LTP jelenségét először a hippokampuszban írták le (*Bliss és Lomo*, 1973), de később bebizonyosodott, hogy nem csak a hippokampuszra jellemző. A memória és tanulás bizonyos formái, valamint a Hebb-féle (NMDA receptor függő) LTP között ez utóbbinak két jellemzője, az *asszociativitás* (a szinapszisban részt vevő mindkét idegsejt együttes és egyidejű aktivitása) és az *input specifikusság* (az idegsejtnak nem az összes szinapszisa, csak az aktivált szinapszis(ok) működése változik) alapján lehet analógiát felállítani. Korán felismerték a glutamáterg rendszer szerepét a szinaptikus plaszticitásban, és a részletes vizsgálat feltárta a glutaminsav receptor típusok eltérő szerepét az LTP és LTD kialakulásában. Hippokampusz szeletben az NMDA antagonistája AP-5 (2-amino-5-foszfovaleriánsav) gátolta az LTP kialakulását (*Collingridge és mtsai.*, 1983). Kisagyi Purkinje sejtekben az LTD indukálható az AMPA (kvizskalát) receptorokon keresztül (*Kano és Kato*, 1987), az entorhinális kéregben *in vitro* kiváltott LTD pedig gátolható NMDA antagonistával (*Kourrich és Chapman*, 2003). A kainát receptorok is közreműködnek a hippokampális LTP (*Contractor és mtsai.*, 2001), illetve LTD (*Park és mtsai.*, 2006) kialakulásában és fennmaradásában. Metabotróp glutamáterg ligandokkal alegységfüggően befolyásolható a hippokampális LTP és LTD. Nagy frekvenciájú ingerléssel kiváltott LTP, illetve alacsony frekvenciájú ingerléssel kiváltott LTD kialakulását és fennmaradását gátolták az ingerlés előtt adagolt mGluR1 és mGluR5 specifikus antagonisták. Ingerlést követően adva azonban csak az mGluR5 antagonistája csökkentette az LTP ill. LTD késői fázisát (*Neyman és Manahan-Vaughan*, 2008).

Morris és munkatársai (1986) írták le először, hogy NMDA antagonistája (AP-5), az LTP-t gátló dózistartományban, agykamrába adagolva rontotta patkányok térbeli memóriáját vízi útvesztőben. A hippokampális NMDA receptorok gátlása rontotta a környezeti tényezők (kontextus) és a félelmi reakció közti asszociáció kialakulását is (*Young*, 1994). AMPA receptor pozitív allosterikus modulátor hatású vegyülettel pedig javítani lehetett patkányok térbeli memóriáját vízi útvesztőben és nyolckarú labirintus teszten (*Staubli és mtsai.*, 1994). Később az is nyilvánvalóvá vált, hogy a

glutaminsav receptorok működése más agyterületeken és más memória-folyamatokban is elengedhetetlen (*Robbins és Murphy, 2006*).

Miután a glutamát szerepe a memória-folyamatokban egyértelműen igazolódott, felmerült a kérdés, hogy milyen szerepet játszanak az egyes receptortípusok a tanulás egymást követő fázisaiban: az emléknym bevésésében, megerősítésében (konszolidációjában) és előhívásában. Ennek vizsgálatára alkalmas egy egyszeri tanulási paradigma, ahol a tanulási kísérletet bizonyos idő eltelté után a megtanult emlék visszahívásának mértékét tesztelő kísérlet követi. A vizsgálati anyag beadása történhet 1. a tanulási szakasz (bevésés) előtt; 2. rövidebb-hosszabb idővel a tanulási teszt után (megerősítés alatt); 3. az emlékezés mértékét vizsgáló kísérlet (előhívás) előtt. A különböző tanulási elrendezéseken alapuló legtöbb vizsgálat egységes abban a tekintetben, hogy mind az NMDA, mind az AMPA receptornak kiemelt szerepe van a bevésés szakaszában. A megerősítést és előhívást illetően azonban ellentmondóak az eredmények. A kompetitív NMDA receptor antagonistá AP-5 hippokampális infúziója patkányban rontotta a térbeli memória bevésését és konszolidációját, de az előhívásra nem volt hatással (*Bast és mtsai., 2005*). Egy újabban megjelent közleményben a nem kompetitív antagonistá ketamin a bevésés, illetve az előhívás előtt adagolva rontotta a patkányok teljesítményét nyolckarú labirintusban, ellenben a megerősítés alatt nem volt negatív hatással a tanulásra (*Chrobak és mtsai., 2008*). AMPA receptor szelektív antagonistá infúziója a dorzális hippokampuszba ugyanakkor a térbeli memória kialakulását mindhárom fázisban csökkentette (*Riedel és mtsai., 1999*). Az AMPA és NMDA receptorok ugyanilyen módon vesznek részt egyéb – hippokampusztól függő és független – tanulási formákban. Egy társítási tanulási vizsgálat során az NMDA receptor gátlása a hippokampuszban az íz-hely asszociáció bevésését gátolta, de előhívását nem, az AMPA receptor blokkolása viszont mindkét szakaszban rontotta a tanulást (*Day és mtsai., 2003*).

Számos kísérletes és klinikai vizsgálatban, irtásos, ill. agyi aktivitást mérő kísérletekben a 80-as évek elején már igazolták, hogy a vizuális tárgyfelismerés, amely kifejezetten romlik Alzheimer betegségben, valamint szkizofrén betegekben is jellemző a megváltozása, elsősorban a ventromediális temporális lebeny egy specifikus területe, a perirhinális kéreg működéséhez kötődik. (*Buckley és Gaffan, 1998; Macko és mtsai., 1982; Meunier és mtsai., 1993; Srebro, 1985*). Az utóbbi években több közlemény jelent meg, amely glutamáterg ligandok hatását tárgyalja a

felismerési memória kialakulásának különböző szakaszaiban. Patkányokon végzett tárgyfelismerés tesztben azt találták, hogy a perirhinális kéregbe infundált AP-5 gátolta a már korábban látott tárgy felismerését, ha a bevésés előtt, vagy a konszolidáció alatt (közvetlenül a bevésési teszt után) történt az adagolás. Az előbbi esetben azonban az AP-5 infúziója csak a hosszú távú (180 perc retenció után mért) memória kialakulását akadályozta meg, a rövid távúra (5 perc retenció) nem volt hatással. A CNQX ugyanilyen körülmények között gátolta a tárgyfelismerést mind a bevésés előtt, mind a konszolidáció alatt, mind az emléknym előhívása előtt adagolva. A bevésés előtti CNQX infúzió a rövid- és hosszútávú memória kialakulását egyaránt megakadályozta (*Winters és Bussey, 2005*). Az NMDA és AMPA receptorok fontosságát a bevésés folyamatában több más tanulmány is alátámasztja, azonban a konszolidációban és előhívásban betöltött szerepüket illetően nem egységes a szakirodalom (bővebben lásd **6.2.** fejezet)

Fontos felismerés volt a tanulási folyamatok élettani hátterének felderítésében az a tény, hogy a feltételes inger – feltétlen inger kondicionálás során kialakuló asszociáció kioltása (extinkciója) nem egyszerű felejtési folyamat, hanem aktív tanulást feltételez, amelyben a glutamáterg rendszer is részt vesz. (*Bouton, 2001*). NMDA receptor antagonisták lassítják a kondicionált félelmi válasz kioltását (*Falls, 1992*), az NMDA glicin kötőhelyen agonista hatású D-cikloszerin szisztémás vagy az amygdalába történő adagolása viszont serkentette a félelem extinkcióját félelem indukálta megrezzenés tesztben (*Walker, 2002*). A humán szorongásos kórképekben (pánikbetegség, poszttraumás stresszbetegség), amelyekben egy averzív ingerrel társult túlzott félelmi válasz, kóros szorongás áll fenn, ígéretes terápiás lehetőséget kínál a kóros asszociáció kioltásának serkentése a glutamáterg neurotranszmissziót serkentő szerekkel. Kísérletes eredmények vannak arra vonatkozólag, hogy egy tanult félelmi válasz kioltásának elősegítése D-cikloszerinnel nemcsak az adott feltételes válaszra, hanem egy második ingerre vonatkozólag is lecsökkentette a kioltás idejét, tehát az NMDA receptor működés serkentése nemcsak specifikusan, hanem általában fokozta a félelmi válasz kioltását (*Ledgerwood, 2005*).

2.3. Neuropszichiátriai kórképek és a glutamáterg rendszer

A kognitív működés zavara sokféle kóroki tényezőre vezethető vissza. Az ún. disszociatív zavarok esetében a memória hiányosan működik, de nincs nyilvánvaló fizikai oka a rendellenességnek. Gyakori azonban a súlyos pszichés trauma az ilyen esetek hátterében. Az organikus eredetű emlékezetzavarok esetében szervi, szöveti elváltozások mutathatók ki. A demenciákban rendszerint az élettani működés fokozatos (térbeli és időbeli) romlásával találkozunk. Mind a memória, mind a kognitív készségek jelentősen romlanak. A funkciók (absztrakt gondolkodás, ítélőképesség, nyelvkészség) közül egy vagy több súlyosan károsodik, megváltozik a beteg személyisége; viselkedése és érzelmi élete is.

A glutamáterg rendszer működésének megváltozása, lévén a legfontosabb serkentő ingerület-átviteli rendszer a központi idegrendszerben, számos tünetegyüttesben szerepelhet kóroki tényezőként. A glutamát receptorok – ill. ezen receptorokkal rendelkező idegsejtek – számában, felépítésében, szerkezetében bekövetkezett változások gyakran járnak a kognitív funkciók kisebb-nagyobb fokú megváltozásával. A továbbiakban néhány betegségekre szeretnék kitérni, amelyekben a kognitív működés zavarával, mint jelentős kóroki és/vagy tüneti tényezővel szembesül a beteg és környezete, és amelyek terápiája nem teljes értékű a kognitív funkciók javítása nélkül, ill. egyes esetekben a fő szempont a kognitív működés helyreállítása, de legalább a romlás folyamatának lassítása.

2.3.1. Szkizofrénia

A szkizofrénia (pszichózis) az átlagnépesség kb. 1 %-át érintő betegség, amelynek jellemzője a személyiség alapvető zavara, a gondolkodás jellegzetes torzulása, bizarr téveszmék sora, percepció zavar, és a realitással való kapcsolat romlása. A szkizofrén tünetegyüttesben a pszichés működés számos területen érintett, alapjában véve azonban megkülönböztethetünk pozitív (hallucinációk, téveszeszmék, valóság-érzékelés megváltozása, gondolatok elidegenedése és befolyásoltság érzése), negatív (érzelmi elsivárosodás, mimika elszegényedése, anergia, apátia, anhedonia, szociális és szexuális aktivitás csökkenése), és kognitív tüneteket. Ez utóbbiak jelentősége egyre inkább előtérbe kerül, mert általában – a negatív tünetekkel együtt – megelőzik a pszichotikus tünetek megjelenését, az idő

előrehaladtával viszonylag állandóak, a pszichózis elmúlta után is fennmaradnak, a klasszikus antipszichotikus kezelés pedig csekély mértékben befolyásolja a kognitív tüneteket (*Young és mtsai, 2009*). Idézett szerzők elsősorban kísérletes gyógyszerhatástani szempontból tárgyalják az Egyesült Államokból 2004-ben indult MATRICS (Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia) kezdeményezést (*Marder és mtsai., 2004*). A MATRICS céljai között szerepel többek között, hogy a skizofrénia hatatos gyógykezelése érdekében a kognitív funkciók javítását, mint terápiás célt, összehangoltabban és célzottabban lehessen vizsgálni a klinikai és kísérletes gyógyszerhatástani vizsgálatokban. Ennek érdekében a szkizofréniára jellemző kognitív elváltozásokat 7 csoportba osztották: információ-feldolgozás sebessége; figyelem/éberség; verbális és nemverbális munkamemória; verbális tanulás; vizuális tanulás; problémamegoldás; érzelmi intelligencia/szociális kogníció. A MATRICS magyarországi kipróbálásával kapcsolatos tapasztalatokról, a tesztrendszer klinikai diagnosztikai vonatkozásairól, hazai körülmények között való alkalmazhatóságáról két évvel ezelőtt jelent meg ismertető (*Komlósi és mtsai, 2007*).

A betegség patomechanizmusában több neurotranszmitter rendszer érintett, elsődlegesen a dopaminerg rendszer, de egyre több bizonyíték szól a szkizofrénia glutamáterg eredete mellett is. A dopaminerg hipotézist támogatja, hogy a klinikumban elérhető hatékony antipszichotikumok mindegyike, az 1951-ben felfedezett klórpromazintól kezdve kisebb-nagyobb mértékben kötődik a dopaminerg D₂ receptorhoz. Ezek a vegyületek azonban nem vagy alig hatnak a betegség negatív és kognitív tüneteire (*Reynolds, 2004*). A glutamáterg rendszer alulműködése, mint kóros tényező abból a megfigyelésből táplálkozik, hogy NMDA antagonistá hatású vegyületek – disszociatív anesztetikumok (fenciklidin (*Allen és Young, 1978*), dizocilpin (*Löscher és mtsai, 1991*), ketamin (*Newcomer, 1999*)) – emberben szkizofrénia-szerű tüneteket idéznek elő. Egészséges és pszichotikus önkéntesek részvételével folytatott vizsgálatokban a ketamin mindkét csoportban egyaránt, és közel azonos mértékben rontotta a kognitív funkciókat (*Lahti, 2001*).

2.3.2. Depresszió (hangulatzavarok)

A betegség alapvetően két formában jelentkezhet: beszélhetünk mániás és depresszív tünetegyüttesről. A depressziós epizódban a levertség, az érdeklődés és az örömrre való képesség megszűnése, csökkent aktivitás, az önbizalom és önértékelés csökkenése, a kognitív funkciók zavara, és vegetatív tünetek (alvászavar, étvágyzavar, szexuális diszfunkció) a jellemző tünetek. A mániás szakaszban fokozott aktivitás és ingerlékenység, felgyorsult, de felületes gondolkodás, a valóságtól elrugaszkodott elképzelések jelennek meg, valamint fokozott vegetatív aktivitást mutat a beteg (*Szádóczy, 2003*). Egy közelmúltban megjelent tanulmány eredményei azt mutatják, hogy a DSM-IV feltételrendszere szerinti összes depresszív kórképben a prevalencia aktuális aránya Magyarországon 18.5%. Ezen belül a major depressziós epizód 7.3%-kal szerepel, ez hasonló a Nyugat-Európában és az Egyesült Államokban mért adatokhoz (*Torzsa és mtsai, 2008*). A magas prevalencia a depresszió esetében gyakori és súlyos szövődeményekkel, komorbiditással (szorongás, alkohol és drog abúzus), fokozott szomatikus morbiditással és mortalitással jár, és a kognitív funkciók zavara is különböző agyterületeket érint (*Sárosi és mtsai, 2008*). Leírták többek között a vizuális-térbeli memória romlását, a figyelem, a koncentráció és a végrehajtó funkciók csökkenését, a kognitív rugalmasság megváltozását, alacsonyabb pszichomotoros aktivitást (*Sárosi és mtsai, 2008*). A tünetegyüttes kialakulásában kulcsszerepet tulajdonítanak a monoaminerg rendszer alulműködésének. A jelenleg használatos, újabb generációs antidepresszánsok is elsődlegesen a szerotonin és/vagy a noradrenalin, ill. a dopamin szinaptikus visszavételének gátlása révén fejtik ki terápiás hatásukat. Ezek a vegyületek azonban számos területen, például a kognitív funkciók javítása terén, nem, vagy nem eléggé hatékonyak (*Schechter és mtsai, 2005*). A más hatásmechanizmusú antidepresszáns vegyületekkel kapcsolatos gyógyszerkutatás egyik lehetséges iránya a glutamáterg rendszerre ható vegyületek fejlesztése. Régóta ismert, hogy NMDA gátló vegyületek kísérletes körülmények között antidepresszáns hatást mutatnak (*Papp és Moryl, 1994; Trullas és Skolnick, 1990*). Az Alzheimer betegség terápiájában használatos memantint egy 2006-ban végzett klinikai vizsgálatban önmagában hatástalannak találták major depresszióban (*Zarate és mtsai., 2006*), de kísérletes kényszerbetegség állatmodellben az antidepresszáns fluoxetin hatását erősítette (*Wald és mtsai.,*

2009). Az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületek kísérletes körülmények között tapasztalt antidepresszáns hatásáról röviden a **2.4.1.** fejezetben lesz szó.

2.3.3. Alzheimer demencia

A nyugati társadalmakban az idősödő korosztályban a leggyakoribb neurodegeneratív kórkép az Alzheimer betegség. A klinikailag diagnosztizált demencia hátterében az esetek 2/3-ában az Alzheimer kór áll. Az előfordulási arány 65 év felett 5 évente megduplázódik, ez 90 éves korra 25%-os prevalenciát jelent (*Hebert és mtsai., 2003*). Egy tavalyi, Egyesült Államokbeli beszámoló szerint 2050-re csak az USA-ban a betegek száma elérheti a 13 milliót (*Alzheimer's Association, 2008*). A betegség a kognitív funkciók fokozatos romlásával jár, amelyet kezdeti szakaszában nehéz elkülöníteni a normális, korral járó memóriaromlástól vagy az enyhe kognitív károsodástól (mild cognitive impairment – MCI), amely egyébként gyakran megelőzi az Alzheimer demencia kialakulását. A kórképre jellemző az extracellulárisan található amyloid plakkok jelenléte a központi idegrendszerben, de a sejten belüli neurofibrilláris kötegek jelenléte és mennyisége szorosabb korrelációt mutat a kognitív funkciók romlásával (*Nelson és mtsai., 2009*). A klinikai diagnózistól a halálig tartó időszak átlagosan 8 év (*Williams és mtsai., 2006*). A szövettani elváltozás és a kognitív működés csökkenése azonban hamarabb jelentkezik, és egyes becslések szerint a klinikailag diagnosztizált betegek számának mintegy négyszerese azoké, akik Alzheimer betegségre jellemző patológiás elváltozásokat mutatnak (*Nelson és mtsai., 2009*). A súlyos kognitív funkció romlás a neokortexben kialakuló degeneratív folyamathoz köthető, a betegség kezdeti szakaszában azonban elsősorban a hippokampusz és az entorhinális kéreg (deklaratív memória) érintett (*Braak és Braak, 1991; Mitchell és mtsai., 2002*). A kognitív romlás hátterében elsősorban a felszálló retikuláris aktiváló rendszer kolinerger idegsejtjeinek pusztulása áll, amelynek okai között az – oxidatív stressz, ionháztartás egyensúlyzavara, növekedési faktorok hiánya, A β aggregátumok képződése, mitokondriális diszfunkció, stb. miatti – apoptotikus sejtpusztulás áll az első helyen (*Mattson és Magnus, 2006*). Az apoptózisban, az idegsejtnyúlványok degeneratív elváltozásában kulcsszerepet játszanak a mikroglia-sejtek, amelyek aktivációja az NMDA receptorokon keresztül történik, és az aktiváció NMDA antagonistá MK-801-gyel in vitro körülmények között gátolható (*Takeuchi és mtsai., 2005*). Az NMDA

receptor aktivitás-függő gátlása ezen felül a szinaptikus jelátvitel hatásfokának növelését is eredményezheti, amely alapvető fontosságú a memantin terápiás hatékonyságában (*Rammes és mtsai., 2008*) lásd még **2.4.3.** fejezet.

2.4. A glutamát neurotranszmisszióra ható vegyületek – kognitív terápiás lehetőségek

Az utóbbi években számos olyan vegyületet szintetizáltak, amelyek a különféle glutamát receptorokon, receptor alegységeken specifikus vagy kevésbé szelektív agonista, antagonistá, negatív vagy pozitív allostérikus modulátor tulajdonsággal bírnak (*Kew és Kemp, 2005*). A molekulák részletes áttekintése meghaladja értekezésem kereteit, ezért ebben a fejezetben néhány olyan vegyületet, illetve vegyületcsaládot szeretnék megemlíteni, amelyek bizonyos kísérletes és esetlegesen klinikai körülmények között a kognitív funkciók javulását eredményezték.

Ahogy specifikus NMDA és AMPA receptor antagonistákkal gátlható volt a memórianyom kialakulása kísérletes körülmények között, a glutaminsav transzmisszió serkentése NMDA és AMPA receptor agonistákkal fokozta a tanulási teljesítményt. A direkt agonista hatás azonban csak kísérletes körülmények között alkalmazható a komoly mellékhatások (epileptikus aktivitás, neurotoxicitás) veszélye miatt, ezért a kutatás inkább más alternatívák felé fordult: az NMDA receptor esetében a glicin kötőhely agonisták, illetve a glicin transzportot gátló vegyületek, az AMPA receptorok esetében pedig a pozitív allostérikus modulátor hatású anyagok szintézisét és kísérletes, majd klinikai kipróbálását kísérte nagy várakozás.

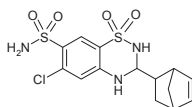
2.4.1. AMPA receptor pozitív modulátorok

A nootrop szerként alkalmazott aniracetámról 1990-ben mutatták ki (*Ito és mtsai.*), hogy az AMPA receptor működésének potenciózálásán keresztül fejti ki hatását. Ezt követően számos új, AMPA receptor pozitív modulátor vegyület született, amelyek fejlesztése többek között prokognitív irányban is történt. A jelenleg ismert, vér-agy gáton is átjutó vegyületek a pirrolidon (piracetam, aniracetam, pramiracetam, oxiracetam), piperidin (CX Ampakin vegyületek), tiazid (S18986, IDRA 21, PEPA), és biarilpropilszulfonamid (néhány Eli Lilly vegyület) származékok csoportjába tartoznak (*O'Neill és Dix, 2007*). Az *in vitro* vizsgálatokban a fiziológiás szinaptikus választ és a szinaptikus plaszticitást fokozó vegyületek közül több hatott

kísérletes tanulási és memóriamodellekben (Black, 2005; Lebrun és mtsai., 2000; O'Neill és Dix, 2007; Porrino és mtsai., 2005; Staubli és mtsai., 1994; Thompson és mtsai., 1995). Ezt követően hamarosan megjelentek a pozitív humán vizsgálati eredményekről szóló beszámolók. Az első vegyület az Ampakin CX516 volt 1997-ben, amelyről leírták, hogy idősebb, 65 év feletti csoporton vizsgálva sekentette az emléknym előhívását (Lynch és mtsai., 1997).

3. ábra AMPA pozitív modulátor vegyületek

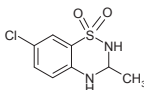
Benzotiazidok



Ciklotiazid

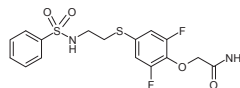


S18986



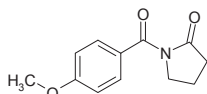
IDRA 21

Tiazid származékok

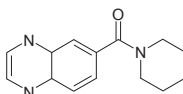


PEPA

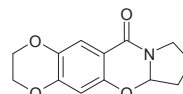
Pirrolidon és piperidin származékok



Aniracetam

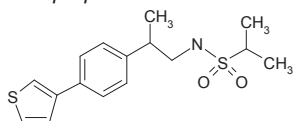


CX516

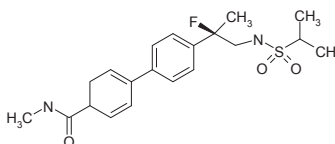


CX614

Bianilpropilszulfonamidok



LY392098



LY503430

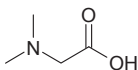
Az elmúlt években klinikai fázisig, kognitív funkciót javító terápiás irányban a CX516, az Org 24448, az S18986, és a LY451395 jutott (Black, 2005). Az ígéretes állatkísérletes eredmények ellenére a klinikai vizsgálatok során a kognitív funkciók javításában egyelőre mérsékelt sikert hozott az AMPA receptor modulátorok alkalmazása, de több molekula van preklinikai szakaszban fejlesztés alatt. Demenciában a memóriaromlásra elvileg jótékony hatású lehet az AMPA receptor működésének serkentése, de a potenciális neurotoxicitás miatt kérdéses az AMPA pozitív modulátorok hosszútávú alkalmazásának hatékonysága. Kísérletes

szkizofrénia, ill. depresszió modellekben azonban beszámoltak pozitív eredményekről (összefoglalók a témában: *Arai és Kessler, 2007; Black, 2005; O'Neill és Dix, 2007*). A várt antidepresszáns hatás elsősorban az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) szintjének növelésén keresztül jelentkezik. Ampakin molekulák (CX546, CX614) esetében azt is megfigyelték, hogy *in vitro* folyamatos adagolás helyett 24 órás periodikus adagolással kivédhető volt az AMPA receptor down-reguláció miatt fellépő Ampakin inszenzitívitás (*Lauterborn és mtsai., 2003*).

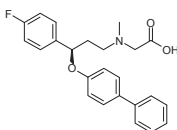
2.4.2. Glicin transzporter-1 (GlyT1) gátló vegyületek

Az NMDA receptor direkt aktivációjának klinikai alkalmazása a görcskeltő és neurotoxikus hatás veszélye miatt nehézségekbe ütközik. A receptor allosztérikus serkentése, elsősorban a glicin koagonista tulajdonságának kihasználásán keresztül, már sokkal ígéretesebbnek tűnik. Ez megvalósítható a glicin_B kötőhely agonistáinak (glicin, D-szerin, D-cikloszerin) adagolásán kívül a glicin transzport gátlásával is. Már régóta ismert, hogy a glicin transzporter működése csökkenti (*Supplisson és Bergman, 1997*), a transzport gátlása fokozza (*Bergeron és mtsai., 1998*) az NMDA receptoron átfolyó ionáramot. A GlyT1 gátlása serkenti a hippocampális LTP NMDA komponensét (*Martina és mtsai., 2004*).

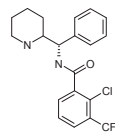
4. ábra Glicin transzporter-1 gátló molekulák



Sarkozin



NFPS



SSR504734

A szarkozin alapú, nem kompetitív GlyT1 gátló NFPS és Org 24461 hatásosnak mutatkoztak állatkísérletes szkizofrénia és tanulási modellekben (*Hársing és mtsai., 2003, 2006; Manahan-Vaughan és mtsai., 2008*). A nem szarkozin alapú, kompetitív GlyT1 antagonistá SSR504734 antipszichotikus aktivitást mutatott patkányon végzett szkizofrénia modellekben (*Black és mtsai., 2009*). Antipszichotikus irányban klinikai

vizsgálatra eddig csak a szarkozin esetében került sor. A vegyület risperidon terápia kiegészítéseként növelte a kezelés hatékonyságát a risperidon + placebóval, ill. a risperidon + D-szerinrel kezelt csoporthoz viszonyítva (*Lane és mtsai., 2005*). Egy újabb vizsgálatban a szarkozin önmagában történt adagolása nem okozott szignifikáns javulást akut szkizofrén betegeknél (*Lane és mtsai., 2008*).

2.4.3. Memantin: egy „jó” NMDA receptor antagonist

A memantin 2002 óta elfogadott szer Európában, 2003-tól az USA-ban közepesen súlyos, ill. súlyos Alzheimer betegség terápiájában. Magyarországon Ebixa (Lundbeck) néven van forgalomban. A demencia kezelésében ezidáig az egyetlen olyan szer, amelynek klinikai hatékonysága elsősorban az NMDA receptor közepesen erős, gyors kinetikájú, erősen feszültségfüggő, unkompetitív gátlásához (*Chen és Lipton, 1997, Rammes és mtsai., 2008*) köthető. Még nem tisztázott, hogy a hasonló NMDA ioncsatorna blokkolókhöz (fenciklidin, MK-801, ketamin) viszonyított eltérések pontosan hogyan játszanak szerepet a memantin előnyös terápiás tulajdonságaiban. A legtöbb *in vitro* és *in vivo* vizsgálat azonban arra utal, hogy a memantin kinetikai tulajdonságai alapján „kedvező jel-zaj viszonyt” biztosít az NMDA receptor közvetítette szinaptikus ingerület-áttevődésben. A lassú kinetika és a memantinénál gyengébb feszültségfüggés a receptorgátlásban (pl. az MK-801 esetében) nemcsak a kóros, hanem az élettani működés gátlását is okozza. A Mg^{2+} -nak, mint csatornablokkolóknak a gátló hatása erősen feszültségfüggő, így nem befolyásolja az élettani és a kóros aktivációt sem. Ezzel szemben a memantin kevésbé feszültségérzékeny, ezért nem akadályozza az élettani, de meggátolja a kóros NMDA receptor aktivációt. Ennek tulajdonítható a memantin neuroprotektív hatása különféle, *in vitro* és *in vivo*, akut és krónikus neurotoxicitási modelleken. Ugyanakkor a vegyület a legtöbb tanulási tesztben nem gátolja a normál memória-folyamatokat, de csökkenti a farmakológiai vagy más úton előidézett memóriakárosodást (újabb összefoglalók a témában: *Parsons és mtsai., 2007, Rammes és mtsai., 2008*). A memantinak a felismerési memóriával kapcsolatos hatásairól részletesebben a **6.2.** fejezetben lesz szó.

Megjegyzendő, hogy bizonyított preklinikai hatékonysága ellenére a memantin terápiás felhasználásának előnyös voltát illetően nem egyértelműek az adatok. Az ezidáig folytatott klinikai vizsgálatok a kognitív, ill. általános funkciók javulása,

pontosabban a funkcióromlás ütemének csökkenése tekintetében a placebohoz viszonyítva csak csekély mértékű pozitív hatást mutattak ki a memantin esetében. (Marum, 2009).

2.5. A glutamáterg ligandok kísérletes gyógyszerhatástani vizsgálata

2.5.1. Tovaterjedő depolarizáció és a glutamáterg rendszer

A tovaterjedő depolarizáció (spreading depression – SD) jelenségének első leírása történelmi távlatokba nyúlik vissza: 1944-ben Leão altatott nyúlón, epilepszia kísérletes kiváltásakor nem várt jelenséget figyelt meg. Az agykéreg elektródával történő, tetanizáló ingerlése során nem a görcsaktivitásra jellemző kisülési mintázat jelent meg, hanem éppen ellenkezőleg, az aktivitás időleges megszűnése, az elektrokortikogram hullámok 'kisimulása' volt megfigyelhető. Ez a folyamat az ingerlés helyétől kiindulva lassan – néhány mm/perc sebességgel – végigterjedt a vizsgált agykérgi területen (Leão, 1944). A folyamatra jellemző, hogy 1. néhány perc után helyreáll az idegi aktivitás; 2. nemcsak elektromos, hanem mechanikai és kémiai ingerekre is kialakul az SD; 3. SD alatt egyéb (szenzoros vagy direkt kortikális) ingerek nem váltanak ki akciós potenciált az adott kérgi területen 4. lassú, 1-2 perc alatt lezajló, 7-15 mV nagyságú negatív potenciálváltozás kíséri, amely átfordul egy kisebb amplitúdójú, 3-5 perces pozitív irányú változásba, így az eredeti állapot helyreállításáig 4-7 perc telik el.

A kérgi aktivitás reverzibilis megszűnésének jelensége – az eredeti elnevezéssel "spreading depression of activity in the cerebral cortex" – azóta számos vizsgálat tárgyát képezte, de még ma sem tisztázott minden részlet vele kapcsolatban. Mára bebizonyosodott, hogy nemcsak kóros feltételek mellett, hanem fiziológiás környezetben, megfelelő oxigén- és tápanyag ellátottság esetén is kiváltható, és később a központi idegrendszer számos területén kimutatták. Az agykéregnek különböző mértékben szinte minden része, és bizonyos körülmények között a gerincvelői szürkeállomány is fogékony az SD kialakulására (Streit és mtsai., 1995, Somjen, 2001). Bár az SD-nek nem tulajdonítanak szerepet a kognitív funkció közvetlen változásában, az epilepsziával és migrénnel való kapcsolatára vonatkozóan számos utalás lelhető fel (lásd pl. Rogawski 2008-as összefoglaló közleményét).

A tovaterjedő depolarizációra jellemző, hogy az extra- és intracelluláris tér közötti erőteljes ionáramlás kíséretében nagyszámú idegsejt gyors és csaknem teljes depolarizációja történik, „minden vagy semmi” elv alapján zajlik le, reverzibilis, és hullámként terjed a szürkeállományban. Az SD során a K^+ koncentrációjának markáns növekedése jelentkezik az extracelluláris térben. Ezzel egyidejűleg a Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- ionok extracelluláris koncentrációja meredeken csökken. A Na^+ és a K^+ ellentétes irányú mozgása azonban nem 1:1 arányú, mert az extracelluláris $[Na^+]$ -csökkenés jóval nagyobb mértékű, mint a $[K^+]$ -növekedés (Müller és Somjen, 2000). Az anionok közül a Cl^- -nak legalább egy része a Na^+ -mal együtt jut be az idegsejtbe, míg az ellenkező irányba is áramlanak anionok, többek között glutamát is felszabadul. Az extracelluláris glutamát koncentráció emelkedése azonban részben a gliasejtekből származó glutamátnek köszönhető. A nagymértékű ionáramlást az idegsejt majdnem teljes depolarizációja kíséri, de jelentős K^+ gradiens mérhető az idegsejt és az extracelluláris tér között SD folyamán (Müller és Somjen, 2000).

A lassú negatív potenciálváltozást egy belső optikai jel megjelenése is kíséri, amely optikai rögzítő eljárásokkal jól láthatóvá tehető. Míg a potenciál mérés csak diszkrét pontokban lehetséges, az optikai jel követése az SD alatt lehetővé teszi a depolarizációs hullám valós idejű, kétdimenziós követését. Kialakulása megfigyelhető hippokampusz szeleten (Snow és mtsai., 1983), kortikális szeleten (Világi és mtsai., 2001) és retinán egyaránt (Dahlem és Müller, 2000; Peixoto és mtsai., 2001; Wiedemann és mtsai., 1996). A fénytörés változása az ion- és vízmozgással, és az ezzel együtt járó sejt- és sejtorganelum térfogat változásával hozható kapcsolatba. A sejtterfogat növekedésével a fénytörés csökken, míg a mitokondriumok és más sejtalkotók duzzadása a fénytörés növekedéséhez vezet (do Carmo és Martins-Ferreira, 1984). Bár bizonyos feltételek mellett az optikai jel és az elektromos potenciál változása egymástól függetlenül, ill. a másik hiányában is megfigyelhető, a két paraméter között szoros összefüggés van. Az optikai jel megjelenése egybeesik a kezdeti negatív potenciálváltozás maximumával (Peixoto és mtsai., 2001).

Leão beszámolója után 14 évvel jelent meg az első közlemény, amely béka retinában *in vitro* kiváltott SD-ről számol be (Gouras, 1958). Ezt követően számos fajból származó retinában sikerült kiváltani SD-t (Martins-Ferreira és de Oliveira Castro, 1966; Martins-Ferreira és mtsai., 2000). A madarak retinájának előnye, hogy az üvegtest könnyen eltávolítható, ezért az ideghártya könnyebben szabaddá tehető, valamint nincsenek benne erek, így a vaszkuláris folyamatok befolyásoló hatása nem

jelentkezik a vizsgálatok során. Az *in vitro* retina preparátumon kiváltható SD sok tekintetben hasonlít a kortikális SD-re: a terjedés sebessége, a mérhető negatív potenciálváltozás nagysága és időbeli lefutása, a szöveti elektromos ellenállás növekedésének időtartama, stb. mind összevethető a két kísérleti rendszerben (Martins-Ferreira, 1966, 2000). A retina preparátumnak kísérletes szempontból kedvező tulajdonsága, hogy rajta az SD során megjelenő belső optikai szignál akár szabad szemmel követhető, ezáltal az SD folyamata közvetlenül megfigyelhető.

Az SD-kialakulásában szerepet játszó kémiai ágensek közül kiemelendő a K^+ és a $-$ hatását elsősorban az ionotróp receptorokon keresztül kifejtő – glutamát, tekintettel arra, hogy ezek élettanilag jelen vannak az élő szervezetben, és mind a depolarizáció kialakulásában, mind a terjedésben kulcsszerepet játszanak. Jelenleg vita tárgyát képezi, hogy a glutamát vagy a K^+ -koncentráció változásának tulajdonítható-e az elsődleges szerep az SD folyamatában. A glutamát szerepe a tovaterjedő depolarizáció kialakulásában és terjedésében már az 1950-es évek végén felmerült (Harrevel, 1959). A különböző, specifikus glutamát receptor antagonisták és agonisták felfedezésével kezdődhetett meg a glutamát SD-ben játszott szerepének pontosabb feltérképezése, a glutamát és a K^+ kapcsolatának vizsgálata. Az SD terjedésében a magas extracelluláris K^+ -koncentrációnak lehet elsődleges szerepe. K^+ -mal kiváltható kortikális SD, amelynek terjedése során a mért negatív potenciálváltozás amplitúdója növekedett az extracelluláris K^+ koncentrációjának növelésével. Glutamát hozzáadása, és/vagy a glutamát transzport gátlása azonban nem facilitálta a folyamatot (Obrenovitch, 1995). Ugyanakkor SD előidézhető glutamát receptor agonistákkal mind az agykéregben (Marranes, 1988), mind a retinában (Sheardown, 1993), és kialakulása gátolható specifikus glutamát antagonistákkal. A glutamát receptorok közül az NMDA receptorok központi szerepét a 80-as években sikerült igazolni kortikális SD-ben *in vivo* (Gorelova és mtsai., 1987; Marranes és mtsai., 1988), és kisagyi preparátumban *in vitro* (Lauritzen és mtsai., 1988). Csirke retinán *in vitro* végzett kísérletekben is kimutatták, hogy AMPA/kainát receptor ligandokkal is befolyásolható az SD, a serkentés közvetve, a felszabaduló glutamát az NMDA receptorokat izgató hatásán keresztül jön létre (Sheardown, 1993).

2.5.2. Tárgyfelismerés: vizuális felismerési memória

A memóriára gyakorolt hatás vizsgálata a gyógyszerfejlesztés folyamatában egyaránt fontos lehet a nemkívánatos mellékhatásként jelentkező memóriazavar (pl. anxiolitikum kezelés során), ill. terápiás célként a várható tanulás- és memóriajavító potenciál kimutatására. Szkizofrén betegekben ismeretes a vizuális memória és tanulás romlása (*Young és mtsai, 2009*). Alzheimer betegségben szintén bizonyított a vizuális memória funkció csökkenése (*Viggiano és mtsai., 2008*). Ezért a gyógyszerhatástani vizsgálatok során – a fent említett kórképek gyógyszeres kezelését megcélozva mindenképpen – fontos, de legalább is érdekes lehet, hogy egy adott vegyület hogyan befolyásolja a vizuális memória működését. A vizuális memória térbeli és nem térbeli elemekre bontható. Állatkísérletes modellekben mindkét funkció vizsgálható. A térbeli tájékozódás mérésére alkalmasak a különféle útvesztők (nyolckarú labirintus, Y-útvesztő, T-labirintus, Morris-féle vízi labirintus, stb.) A nem térbeli, felismerési memória mérésére mind patkányon, mind egéren széles körben alkalmazzák a tárgyfelismerési tesztet, amelyet patkányon először *Ennaceur és Delacour (1988)* írt le. A módszer spontán felfedezési magatartáson alapszik, egyes szerzők így is hivatkoznak rá (*Young és mtsai, 2009*). Ezáltal a mérésből kizárhatjuk a büntetés és jutalmazás általi kondicionálás esetleges befolyásoló hatását, így például a humán demencia folyamatát is jobban modellezheti. A gyógyszerfejlesztés szempontjából előnyös az is, hogy az állatoknak nem kell valamilyen szabályrendszert előzetesen megtanulniuk, tehát a teszt gyorsan kivitelezhető. A módszer alapja, hogy az állat először két tárggyal találkozik a kísérleti terepen (dobozban), majd rövidebb-hosszabb retenciós időt követően ugyanabban a dobozban az egyik, már ismert tárgy helyett egy új tárgy van a dobozba helyezve. Ha az állat emlékszik a már ismert tárgyra, akkor azzal kevesebb ideig foglalkozik (szaglássza), mint az újjal. Az eljárás egyéb tényezők (térbeli, időrendbeli eltérések felismerése) mérésére is alkalmas (*Dere és mtsai., 2007*), de legáltalánosabban a fenti elrendezés használatos. Ebben az esetben is kétféle megközelítésben vizsgálható a tanulási funkció, attól függően, hogy a kontroll állatok tanulási képességéhez viszonyított romlást, ill. javulást szeretnénk kimutatni. Amennyiben rövid retenciós időt (a tanulási és emlékezési fázis közt eltelt idő) alkalmazunk (általában egereknél <2, patkányoknál <4 óra (*Young és mtsai., 2009*), a kontroll állatok csoportja jól emlékszik az ismert tárgyra. Ez esetben a

tesztvegyülettel történt kezelés esetleges memóriarontó jellegét – mint nem kívánatos mellékhatást – lehet kimutatni. Rövid retenciós idő esetén mérhető a tesztanyag memóriajavító – pontosabban memóriaromlást csökkentő vagy visszafordító – potenciálja is. Ennek kimutatásához azonban memóriarontó hatású előkezelésre (leggyakrabban NMDA antagonistá, pl. MK-801, vagy kolinerg antagonistá, szkopolamin alkalmazására) van szükség. Ha a retenciós időt megnöveljük 24-48 órára, akkor a kontroll csoport nem emlékszik a tárgyra, amellyel korábban már találkozott. Így a tesztvegyület esetleges memóriajavító, tanulást serkentő hatása mutatható ki (*Ennaceur és Dealcour, 1988*).

A tárgyfelismerés teszt kiválóan alkalmas arra, hogy vizsgáljuk egy anyag hatását specifikusan az emlényom kialakulásának különböző szakaszaiban (*Winters és Bussey, 2005; Winters és mtsai., 2008*; részletesebben lásd **2.2.** és **6.2.** fejezet).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A glutamáterg rendszer működését befolyásoló, fent említett vegyületsaládok terápiás alkalmazása a neuropszichiátriai kórképek kezelésében részben bizonyított, részben nagy várakozással kísért. Mind az AMPA receptor pozitív modulátorok, mind a glicin transzporter gátló vegyületek, mind az enyhe NMDA antagonistá memantin, kísérletes és részben klinikai vizsgálatokban is a kognitív, tanulási és memória funkciókra kedvezően hatnak. Jelenleg is vannak klinikai fejlesztés alatt álló molekulák, a gyógyszergyári fejlesztés pedig a hatékonyabb és jobb mellékhatásprofilal rendelkező vegyületek irányában jelenleg is folyik.

Ezért célul tűztük ki, hogy

1. olyan *in vitro* módszert dolgozunk ki és állítunk be, amelynek segítségével nagy számban, rövid idő alatt, és a kisebb áteresztő-képességű teszteken (patch-clamp mérés, hippocampusz szelet) kapott eredményekkel összevethető módon végezhetünk hatásmechanizmus vizsgálatot gyógyszergyári fejlesztés alatt álló AMPA receptor pozitív és negatív modulátorok biológiai hatékonyságának meghatározásához. Erre a célra a csirke retinán ionotróp glutamát receptor agonistákkal kiváltott tovaferjedő depolarizáció (spreading depression – SD) megfelelő választásnak tűnt.
2. megvizsgáljuk az AMPA és kainát receptor pozitív allosztérikus modulátor ligandok szerepét és kölcsönhatását AMPA-val, ill. kainsavval kiváltott SD potenciózásában csirke retinán.
3. megvizsgáljuk a csirke retinán kiváltott SD teszt alkalmazhatóságát az NMDA receptor működésének fokozását előidéző (glicin transzport gátló) vegyületek hatékonyságának kvantitatív meghatározásában.
4. a deramciklán NMDA receptor gátló tulajdonságára vonatkozóan kompetitív és nem kompetitív NMDA receptor antagonistá vegyülettel összehasonlító vizsgálatot végzünk csirke retinán kiváltott SD teszten
5. Egy egyszerű, gyors, rágcsálókön végezhető *in vivo* tanulási modellt, a tárgyfelismerés tesztet beállítva összehasonlítjuk a fejlesztés alatt álló különböző glutamáterg vegyületek tanulásra és emlékezésre kifejtett hatását.

4. MÓDSZEREK

4.1. Tovaterjedő depolarizáció mérése csirke retinán

Az irodalmi áttekintésben (2.5.1. fejezet) már említettem, hogy az ionotróp glutamáterg receptorok (NMDA, AMPA/kainát) kiemelt szerepet játszanak a tovaterjedő depolarizáció (spreading depression: SD) folyamatában. A retina jól alkalmazható az SD jelenségének vizsgálatára. Egyrészt azért, mert az SD-t kísérő fénytörési változások szabad szemmel is megfigyelhetőek. Másrészt azért, mert a folyamat megfelelő körülmények között az izolált szövetben néhány órán keresztül reprodukálható. Fontos megemlíteni, hogy az SD az izolált retinában az agonista anyagra és annak koncentrációjára jellemző latencia után jelentkezik. A latenciát, ill. a depolarizációs hullám lefutását különböző gátló és serkentő anyagok befolyásolják.

A retina preparálását Sheardown (1993) módszere alapján végeztük. A vizsgálatokban 4-7 napos csirkéket (Shaver Redbrow, Labnyúl Kft., Gödöllő) használtunk fel. Éteres altatásban végzett dekapitálás után emeltük ki a kísérleti állatok szemét az alábbiakban ismertetett módon. A szemhéjat csipesszel megfogtuk és levágtuk. Ollóval a szegolyó körüli kötőhártyát és izmokat átvágtuk, majd csipesszel a látóidegnél fogva a szegolyót kiemeltük a szemüregből. A szegolyóról letisztítottuk a kötőhártya és izom maradványokat, majd borotvapengével az egyenlítői síkban elmetszettük a szemet. Az üvegtest kiemelése után a retina hátsó részét is tartalmazó „szemserleggel” végeztük a továbbiakban a kísérleteket. A szemserlegeket egyenként tápoldatba helyeztük, és végig szobahőmérsékleten (23-24 °C) tartottuk a vizsgálatok során. A tápoldat összetétele a következő volt: NaCl (100 mM), KCl (3 mM), NaHCO₃ (30 mM), MgSO₄ (1 mM), CaCl₂ (1 mM), NaH₂PO₄ (1 mM), glükóz (10 mM), pH 7.4. A tápoldatot karbogén gázzal (95% O₂, 5% CO₂) buborékolattuk a megfelelő oxigenáltság és pH biztosítása céljából.

AMPA antagonistá ill. negatív modulátor vegyületek vizsgálata

A retinákat 60 perc inkubációt követően stimuláló oldatba (5 µM (S)-AMPA-t tartalmazó tápoldat) helyeztük, és mértük az opalizáció kezdetéig eltelt időt (latencia). Az alkalmazott S-AMPA koncentráció mellett a kontroll latencia érték 10-15 mp közé esik. Harminc perc kimosás után a retinapreparátumokat olyan

tápotdatba helyeztük, amely az antagonista, ill. negatív modulátor vegyületet a vizsgálandó koncentrációban tartalmazta. Húsz perc elteltével a retinák olyan stimuláló oldatba kerültek, amely a gátló vegyületet is tartalmazta a vizsgálandó koncentrációban, és mértük a latenciát (a latencia megnövekedését). Végül 60 perc kimosási idő után stimuláló oldatban ismét mértük a latenciát az anyag kimoshatóságát vizsgálandó. Hatvan perc pihentetési idő után a retinán újabb mérési ciklust lehetett elvégezni, így egy szemem legalább két mérést lehetett kivitelezni. A tesztanyagok vizsgálatához a vegyületeket először tömény DMSO-ban oldottuk, majd ebből a törzsoldatból mértünk a kívánt koncentrációban a tápotdatba úgy, hogy a DMSO végkoncentrációja általában 0.1% volt, de a rosszabb oldhatóságú vegyületek esetében sem haladta meg a 0.3%-ot. Ez a mennyiség önmagában nem befolyásolta az SD lefutását.

A vizsgált vegyületre jellemző gátló hatás kvantitatív meghatározása a következőképpen történt. *Sheardown (1993)* meghatározása szerint a kontroll oldatban mért latenciától való 30 másodperces vagy ennél nagyobb eltérést már 100 százalékos gátlásnak tekintettünk. Ebből kiindulva a százalékos gátlást a következő képlet alapján számoltuk ki:

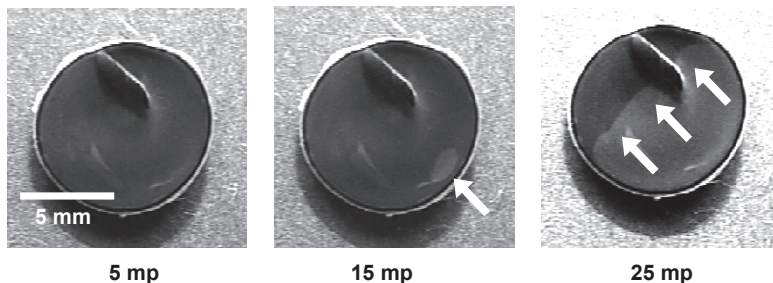
$$\% \text{-os gátlás} = 100x [\text{vizsgált anyaggal mért latencia (mp)} - \text{kontroll latencia (mp)}] / 30$$

Az egyes anyagokhoz és koncentrációkhoz tartozó átlagokat legalább 2 eltérő napon végzett kísérletek adataiból számoltuk. Négy-öt koncentrációhoz tartozó %-os gátlási értékből a koncentráció-hatás összefüggés meghatározására szigmoid görbe illesztés mellett (GraphPad Prism 3.02) kiszámoltuk az 50%-os gátlást előidéző koncentrációt (IC_{50} értéket).

P	K	A	M	K	A	M	K
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
0	60	90	110	170	200	220	280perc

P: preparálás vége; K: kontroll mérés; A: anyagadás; M: anyaghatás mérése

5. ábra A tovaterjedő depolarizáció (SD) kialakulása és terjedése retinában



Az SD-t 5 μM S-AMPA-val váltottuk ki. A nyilak az SD megjelenésének helyét ill. terjedését jelzik. A latenciát a képeken bemutatott folyamat esetében 14-15 mp-nek mértük.

Pozitív modulátor vegyületek vizsgálata

Az alkalmazott kísérleti eljárás nagyban megegyezik az előbbi pontban ismertetettel, ezért itt csak az eltéréseket vázolom fel. A retinákat 90 perc inkubációt követően helyeztük stimuláló oldatba, amely 2 μM (RS)-AMPA-t tartalmazott, és így mértük a latenciát.

P	K	A	M	K	A	M	K
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
0	90	120	140	200	230	250	310perc

P: preparálás vége; K: kontroll mérés; A: anyagadás; M: anyaghatás mérése

A tesztben használt (RS)-AMPA koncentráció mellett a kontroll latencia érték 40-70 másodperc közé esett. A vizsgált vegyület egy koncentrációjával legalább 4-5 mérést végeztünk. Az SD potenciózás kvantitatív meghatározásához a százalékos serkentést az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\% \text{-os potenciózás} = 100 \times \frac{[\text{kontroll latencia} - \text{vizsgált anyaggal mért latencia (mp)}]}{\text{kontroll latencia}}$$

A pozitív modulátorok esetében a latencia változását (csökkenését) tehát nem egy elméleti 100%-os értékhez, hanem a kontroll latenciához viszonyítva adtuk meg. Száz százalékos hatásnak ebben az esetben elméletileg a 0 mp-es latencia felelne

meg. Amennyiben a vegyület koncentráció-függő módon csökkentette a kontroll latencia értéket, négy-öt koncentrációhoz tartozó %-os potencírozási értékből szigmoid görbe illesztés mellett (GraphPad Prism 3.02) kiszámoltuk az 50%-os potencírozást kiváltó koncentrációt (EC_{50} értéket).

Ciklotiazid és concanavalin A vizsgálata kainsavval kiváltott SD-ben

Az AMPA receptor pozitív modulátor ciklotiazid és a kainát receptor pozitív modulátor concanavalin A vizsgálatakor a mérések egy részében 5 μ M kainsavval váltottuk ki az SD-t. Ez esetben a latencia a 2 μ M RS-AMPA-val kiváltott SD esetében tapasztalt 1 perc körüli érték volt.

NMDA receptor, ill. glicin transzporter gátló vegyületek vizsgálata

Bizonyos vizsgálatokban a SD-t NMDA-val váltottuk ki. A $MgSO_4$ 1 mM koncentrációja mellett 100 μ M NMDA alkalmazásakor mértünk az 5 μ M S-AMPA-val kiváltott SD esetében tapasztalt 10-15 mp latenciát, 35 μ M NMDA alkalmazásakor pedig a 2 μ M RS-AMPA-val kiváltott SD esetében tapasztalt 1 perc körüli latenciát.

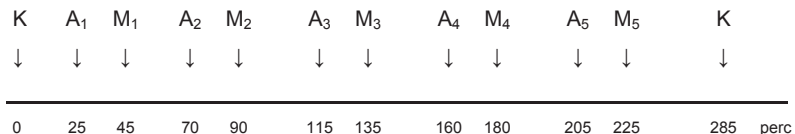
Glicin transzporter gátló vegyületek vizsgálatánál indirekt hatást mértünk. A 100 μ M NMDA-val kiváltott SD-t 5 μ M 7-klórkinurénsavval gátoltuk (kb. 1 perc latencia: 100% gátlás), majd a 7-klórkinurénsavval kiváltott gátlás gátlását mértük a glicin transzporter gátló anyag jelenlétében:

P	K	kin	A	M	K	kin	A	M	K
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
0	60	90	100	120	180	210	220	240	280 perc

P: preparálás vége; K: kontroll mérés; kin: kinurénsav; A: anyagadás; M: anyaghatás mérése

Az EGIS-3886 (deramciclán), memantin, MK-801 és CPP SD-gátló hatása időbeli változásának vizsgálatakor az alkalmazott NMDA koncentrációja 50 μ M volt csökkentett, 0,33 mM $MgSO_4$ koncentráció mellett. Ezekben a kísérletekben egyfajta „kumulatív” jellegű koncentráció-hatás összefüggést is vizsgáltunk, amelynek során az AMPA receptor antagonisták tesztelésénél leírt kísérleti protokolltól annyiban térünk el, hogy a szokásos *kontroll mérés – anyagadás – anyaghatás mérése –*

kimosódás utáni második kontroll mérés (K – A – M – K, magyarázatot lásd az alábbi diagramnál) – sorrend helyett a két kontroll mérés között 45 perces időközönként 5-ször mértünk anyaghatást. A 45 perces időközöket 25 perc kimosódást követő 20 perces, NMDA-antagonista liganddal történt inkubáció adta ki:



K: kontroll mérés; A: anyagadás; M: anyaghatás mérése

4.2. Tárgyfelismerési teszt patkányon

A tárgyfelismerés (object recognition - OR) a deklaratív (explicit) tanulási és memória-folyamatok vizsgálatára alkalmazható teszt. A gyakorlatban az állatok (esetünkben patkányok) a kísérleti porondon (dobozban) a terep bejárása során a dobozba helyezett tárgyakkal találkoznak. Első alkalommal a tárgy(ak) ismeretlen(ek) az állat számára, ezért az(oka)t szaglássza, ismerkedik vele. Bizonyos retenciós időt követően egy újbóli találkozás során a szaglászással töltött időt mérve megállapítható, hogy az állat mennyire emlékszik a korábban már felfedezett tárgyra.

A vizsgálatokat Ennaceur & Delacour (1988) módszere alapján végeztük. A tesztekben az EGIS-ben tenyésztett, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatok a kísérlet kezdete előtt 1 hétig a teszt helyszínéül szolgáló állatszobában voltak elhelyezve, dobozonként négy állat. Tápot és ivóvizet *ad libitum* fogyasztottak. Ez alatt az egy hét alatt az állatokat rendszeresen szoktattuk a tesztet végző kísérleti személyhez. A kísérlet első napjára az állatok testtömege 230-280 grammot ért el. A vizsgálatok során az állatokat egyesével egy 50 cm széles, 70 cm hosszú és 40 cm magas, fenyőforgács alommal bélelt, fekete plexidobozba helyeztük. A kísérletet megelőző napon a patkányok két és fél percg ismerkedtek a dobozzal. 24 órával később, a kísérlet első napján a dobozba két egyforma tárgy került: két darab, rozsdamentes acélból készült négyzet alapú hasáb (5x5x14 cm), fekvő helyzetben, vagy két, egyenlőszárú háromszög alapú hasáb (8,5x5x14 cm), nagyobbik lapjára állítva, azaz mindkét tárgy az 5x14 cm méretű lapján állt. A tárgy- ill. helypreferencia

elkerülése végett csoportonként egyszer az egyik, máskor a másik tárgy volt az új, illetve egyszer az egyik, máskor a másik oldalra került az új tárgy.

A vizsgálandó anyaggal az első napon történt *per os* kezelést követően 60 perccel az állatokat egyesével a dobozba helyeztük, és videókamerán keresztül figyeltük az állatok viselkedését, hogy a vizsgáló személye ne zavarja az állatokat a teszt során. Stopperrel mértük a tárgyak vizsgálatával (szaglászásával) eltöltött időt (explorációt). Ha a két tárgy explorációja együttesen elérte a 20 másodpercet – ez rendszerint 3-4 perc, dobozban töltött időt jelentett -, az állatokat kivettük a kísérleti dobozból. Újabb 24 óra múlva, a kísérlet második napján, az egyik, már ismert tárgyat kicseréltük a dobozban, és újra elvégeztük az exploráció mérését. Az 1. napi protokollhoz képest az volt a különbség, hogy ez esetben a dobozban töltött összes idő volt minden állatnál egyforma (4 perc), és azt mértük, hogy az állat ezalatt mennyi időt tölt az ismert, illetve az új tárgy explorációjával (**6. ábra**).

6. ábra Kísérleti elrendezés a teszt 2. napján



Az S18986, aniracetam és a deramciklán hatását az 1. napon, közvetlenül a dobozból való kivétel után, valamint a 2. napon, a dobozba helyezés előtt történt kezeléssel is megvizsgáltuk.

Az új (new, N) és a már ismert (familiar, F) tárggyal való ismerkedéssel eltöltött idő (tN, tF) különbségének és összegének hányadosa $(tN-tF)/(tN+tF)$ a

diszkriminációs index, amely elméletileg 0 és 1 közötti értéket vehet fel. Ennaceur & Delacour (1988) mérései alapján 24 óra retenciót követően a kontroll csoportban az állatok nem emlékeznek az előző napon már vizsgált, ismert tárgyra - vagyis a diszkriminációs index 0-hoz közelít. Ha azonban a 1. napon, a kísérlet előtt adott anyag memóriajavító hatású, akkor az állatok jobban emlékeznek a már ismert tárgyra. Ez esetben a diszkriminációs index megnövekszik, jelezve az új, ismeretlen tárgy vizsgálatával eltöltött idő viszonylagos növekedését. A statisztikai analízis Statsoft Statistica 7.1 programmal történt, az egyes csoportokhoz tartozó értékek közötti szignifikáns eltérést ismétléses variancia analízist követő Scheffé teszttel határoztuk meg.

4.3. Felhasznált anyagok

Az S- és RS-AMPA-t (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav), kainsavat (2-karboxi-3-karboximetil-4-izopropenil-pirrolidin), NMDA-t (N-metil-D-aszparaginsav), ciklotiazidot (3-biciklo[2.2.1]hept-5-én-2-il-6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-szulfonamid 1,1-dioxid), IDRA 21-et (7-klór-3-metil-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin S,S-dioxid), 1-BCP-t (1-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-piperidin), CPP-t ((+/-)-3-(2-karboxipiperazin-4-il)propil-1-foszfonsav) és a memantint (1-amino-3,5-dimetiladamantán) a Tocris cégtől (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) vásároltuk.

A cancanavalin-A, a szarkozin (N-metilglicin) és az MK-801 ((+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo-[a, σ]ciklo-heptén-5,10-imin-maleát) a Sigma-tól (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) származik.

A deramciklánt [(1R,2S,4R)-(-)-2-fenil-2-(2'-dimetilamino-etoxi)-1,7,7-trimetil-biciklo[2.2.1]heptán], , aniracetámot (1-(4-methoxibenzoil)-2-pirrolidinon), NFPS-t, (N[3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)-propil]szarkozin), Org 24461-et (R,S-(+/-)-N-metil-N-[(4-trifluorometil)fenoxi]-3-fenil-propilglicin), EGIS-A-at, EGIS-B-t az EGIS-ben (EGIS Gyógyszergyár Nyrt., Budapest) szintetizálták.

Az S18986-ot [(S)-2,3-dihidro-[3,4]ciklopentano-1,2,4-benzotiadiazin-1,1-dioxid] a Servier gyár (Institute de Recherches Internationales Servier, Neully sur Seine, France) bocsátotta rendelkezésünkre. A kísérletek egy részében az EGIS

vegyészei által szintetizált S18986-ot használtunk. Minden egyéb, a kísérletekhez felhasznált vegyületet a Sigma cégtől szereztünk be.

Az RS-AMPA, S-AMPA és kainsav desztillált vízben lett feloldva. A concanavalin-A oldásához Ringer oldatot használtunk. A többi vegyület oldása az *in vitro* kísérletekben DMSO-ban történt, majd az így készült törzsoldatot a tápoldatban hígítottuk a kívánt koncentráció eléréséhez. A DMSO végkoncentrációja a tápoldatban nem haladta meg a 0.3 %-ot.

A tárgyfelismerés teszt során a vizsgált anyagok adagolása 0.4%-os metilcellulózban (MC) készült szuszpenzió formájában történt. Az állatokat *per os* kezeltük. A vegyületek hatását elsődlegesen tanulás előtti adagolás után teszteltük, vagyis 60 perccel a tanulási szakasz (1. nap) előtt mindegyik vizsgált vegyülettel történt kezelés. Az S18986, aniracetam és deramciklán esetében sor került közvetlenül a tanulás utáni, ill. 60 perccel az előhívási (2. napi) szakasz előtti anyagadásra is.

5. EREDMÉNYEK

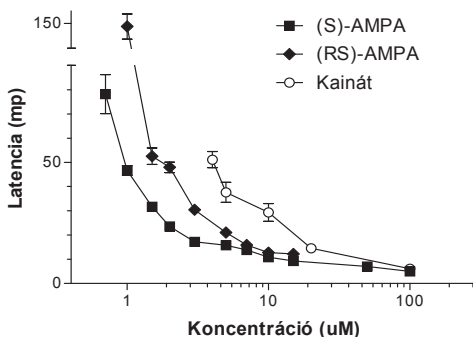
5.1. *In vitro* vizsgálatok

5.1.1. AMPA/kainát receptor modulátorok hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumban

5.1.1.1. AMPA receptor agonistáknak és antagonistáknak az SD latenciájára kifejtett hatása

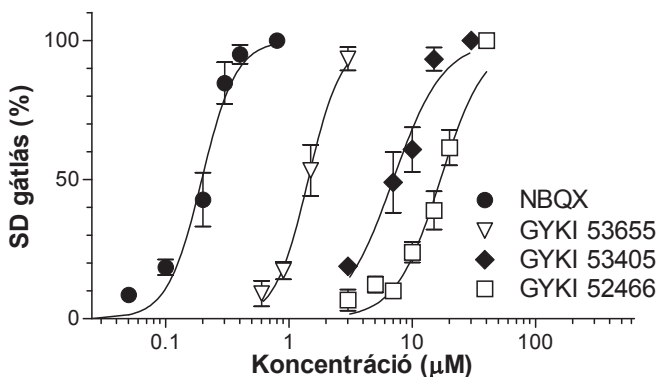
Az AMPA receptor allosztérikus modulátorainak SD-t befolyásoló hatását exogén AMPA agonista jelenlétében vizsgáltuk. Ehhez az adott agonista [(S)-AMPA, (RS)-AMPA, kainát] olyan koncentrációját kellett kiválasztanunk, amellyel megbízhatóan és megismételhetően ki tudtuk váltani az SD-t. Ezért az említett AMPA receptor agonista vegyületek különböző koncentrációjával idéztünk elő SD-t, és mértük az SD kialakulásához szükséges időt. Az agonisták koncentrációjának növelésével az SD gyorsabban alakult ki, a latencia koncentráció-függően csökkent. Azonos koncentrációban (1 és 10 μM közötti tartományban) az AMPA aktív enantiomerje (S-AMPA) hatékonyabb, mint a racemát (RS-AMPA), a kainát pedig az (RS)-AMPA-nál gyengébb az SD indukálásában. Az elérhető legrövidebb latencia kb. 5 másodperc volt, ezt az értéket mértük mindegyik agonista 100 μM koncentrációja esetében (7. ábra).

7. ábra AMPA receptor agonisták hatása az SD latenciájára izolált csirke retinán



Az eredmények alapján a továbbiakban az AMPA receptor antagonistista hatás vizsgálatához az SD-t 5 μM (S)-AMPA-val váltottuk ki. Így a 10-15 másodperces kontroll értékhez képest a 30 mp-es növekedés - azaz a 100%-nak tekintett gátlás - elérése esetén sem lépte túl a mérés az 1 percet. Kísérleteinkben a kompetitív antagonistista hidroxalindion származék NBQX, és a 2,3-benzodiazepin struktúrákörbe tartozó, nem-kompetitív antagonistista GYKI-52466, GYKI-53405 és GYKI-53655 hatását vizsgáltuk. Mind a kompetitív antagonistista, mind a nem kompetitív antagonisták koncentráció-függően gátolták az SD-t. Legerősebben az NBQX (IC_{50} érték: $0.20 \pm 0.01 \mu\text{M}$), a 2,3-benzodiazepin származékok pedig csökkenő erősség szerint a GYKI 53655 ($1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$), GYKI 53405 ($7.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$), GYKI 52466 ($16.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$) (8. ábra). A gátlás reverzibilis volt, az 1 órás kimosási periódus után a latencia a kontroll érték szintjére állt vissza.

8. ábra AMPA receptor antagonisták hatása az SD latenciájára izolált csirke retinán



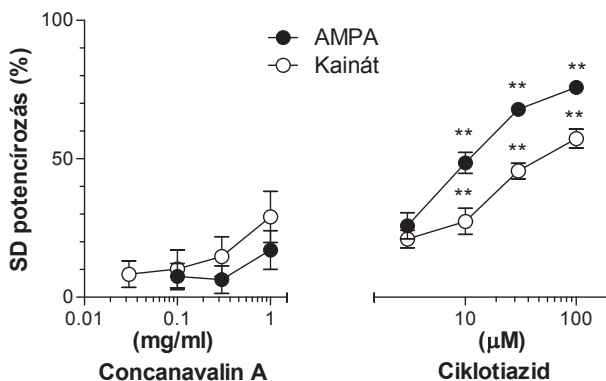
5.1.1.2. AMPA/kainát receptor pozitív modulátorok hatása az SD-re

Az alkalmazott agonista koncentrációk csökkentésével az egyes retinánkon mért latenciák közötti szórás növekedett, végül az SD egyáltalán nem is alakult ki. Az AMPA receptor pozitív modulátorok vizsgálatához az (RS)-AMPA 2 μM -os koncentrációját választottuk. Ez esetben az 1 perc körüli kontroll latencia érték elég nagyban bizonyult ahhoz, hogy a pozitív modulátor hatás mennyiségi

meghatározásához koncentráció-függő csökkenést lehessen mérni, és a kontroll értékek szórása is elfogadható mértékű volt. Egyes kísérletekben a pozitív modulátor hatás vizsgálatához az SD-t 5 μM kaináttal váltottuk ki, amely a (RS)-AMPA 2 μM -os koncentrációjához hasonlóan 1 perc körüli latencia értéket eredményezett (7. ábra).

Annak vizsgálatához, hogy az AMPA és kainát receptorok külön-külön milyen mértékben vesznek részt az SD kialakulásában és lefolyásában, specifikus AMPA ill. kainát ligandok jelenlétében váltottuk ki az SD-t. Az AMPA receptor pozitív modulátor ciklotiazid, és a kainát receptor deszenzitizációját gátló lektin, a concanavalin A hatását néztük 2 μM (RS)-AMPA-val, ill. 5 μM kaináttal kiváltott SD-ben. Eredményeink azt mutatják, hogy a concanavalin A az alkalmazott legnagyobb koncentrációban (1 mg/ml) sem befolyásolta szignifikánsan sem az AMPA-val, sem a kaináttal kiváltott SD-t. A ciklotiazid esetében azonban a potenciózás markánsan koncentráció-függő volt mind az AMPA-val, mind a kaináttal kiváltott SD esetében. Az AMPA hatását a ciklotiazid ugyanabban a koncentrációban nagyobb mértékben növelte, mint a kainátét (EC_{50} : 9.0 (5.9-13.8) μM AMPA, és 21.7 (15.5-30.2) μM kainát jelenlétében) (9. ábra).

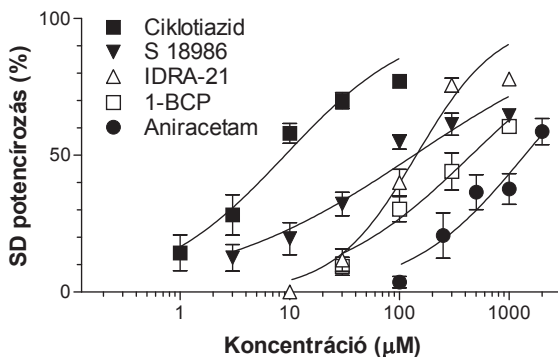
9. ábra Concanavalin A és ciklotiazid hatása AMPA-val és kaináttal kiváltott SD-re izolált csirke retinán



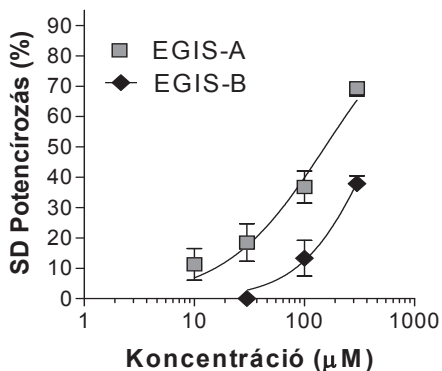
5.1.1.3. AMPA receptor pozitív modulátorok hatása

Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy az AMPA receptor és az általa közvetített sejtválasz a kainát receptorral szemben sokkal nagyobb szerepet játszik az SD folyamatában a retinában. Ezért a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a ciklotiazid mellett egyéb AMPA receptor pozitív modulátorok: a ciklotiaziddal szerkezetileg rokon IDRA 21, és a benzotiadiazin származék S18986, a benzoil-piperidin származék aniracetam és 1-BCP hogyan viselkednek AMPA-val kiváltott SD-ben. Az 1 perc körüli kontroll latencia érték az összes vegyület esetében koncentráció-függő csökkenést mutatott (**10. ábra**). Az EGIS-ben szintetizált két tiadiazin származék, az EGIS-A és EGIS-B jelű vegyület szintén koncentráció-függő módon csökkentette az SD latenciát (**11. ábra**).

10. ábra AMPA receptor pozitív modulátorok hatása AMPA-val kiváltott SD-re izolált csirke retinán



11. ábra Az AMPA receptor pozitív modulátor EGIS-A és EGIS-B hatása AMPA-val kiváltott SD-re izolált csirke retinán



A koncentráció-hatás görbéből minden vegyület esetében meghatároztuk az 50%-os latencia csökkenéshez tartozó koncentrációt (EC_{50} értéket): aniracetam: 1383 (1137-1684) μM ; ciklotiazid: 9.0 (7.6-10.7) μM ; IDRA 21: 142 (121-168) μM ; 1-BCP: 450 (364-556) μM ; S18986: 135 (104-176) μM . Az EGIS-A jelű vegyület esetében számított EC_{50} érték: 154 (130-183) μM . A számított EC_{50} értékek alapján az AMPA pozitív modulátor hatáserősségre vonatkozóan a következő sorrendet lehetett felállítani: ciklotiazid > S18986 \geq IDRA 21 = EGIS-A > 1-BCP > aniracetam. Az EGIS-B valamivel gyengébben hatott, 300 μM koncentrációban nem okozott 50%-os potenciózást. A retinán kapott adatok jól korreláltak az EGIS-ben patkány hippocampus szeleten mért, populáció spike amplitúdó potenciózására (Kapus Gábor mérései), valamint kisagy Purkinje sejtben, patch clamp technikával kapott, AMPA áram növelésére (Végh Miklós mérései) vonatkozó eredményekkel (1. táblázat).

1. Táblázat AMPA receptor pozitív modulator vegyületek potenciózó hatása különböző preparátumokon

Vegyület	<i>Patch clamp</i>	<i>Retina SD</i>	<i>Hippokampusz PS ampl. potenciózás</i>
	I_{2x} (μM)	EC_{50} (μM)	
Ciklotiazid	8	9	
IDRA 21	120	142	100 μM /6%
S18986	20	135	100 μM /40%
Aniracetam	-	1383	1000 μM /45%
1-BCP	-	450	
EGIS A	100 μM /140%	154	100 μM /21%
EGIS B	300 μM /140%	~430*	

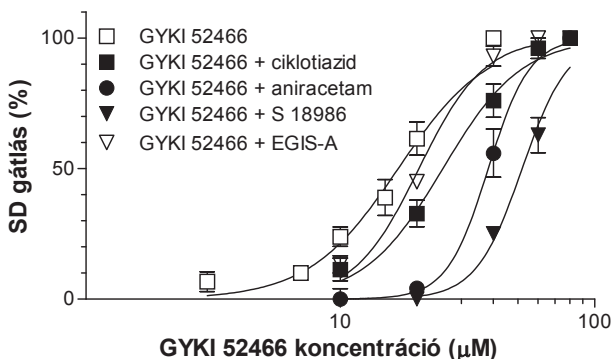
Patch clamp: patkány kisagyi Purkinje sejten patch clamp technikával mért AMPA áram; I_{2x} : Az AMPA áram kétszeresére növeléséhez szükséges vegyület-koncentráció; PS ampl.: patkány hippocampusz szeleten mért populáció spike amplitúdója

5.1.1.4. AMPA receptor negatív és pozitív modulatorok kölcsönhatása csirke retina SD teszten

Vizsgáltuk, hogy a GYKI 52466 jelű vegyületnek a csirke retina SD-ben mért koncentráció-függő AMPA-antagonista hatása (**8. ábra**) hogyan változik különböző AMPA receptor pozitív modulatorok jelenlétében (**12. ábra**). A ciklotiazidot, aniracetamot és S18986-ot olyan koncentrációban alkalmaztuk, amelyek külön-külön azonos mértékben, 50-60%-ban csökkentették a kontroll latenciát. Az önmagukban egyforma nagyságú potenciózó hatást kifejtő AMPA pozitív modulatorok a GYKI 52466 antagonistá hatását különböző mértékben befolyásolták. Az RG (relatív gátlás) rövidítéssel azt az arányszámot jelöltük a táblázatban, amely kifejezi, hogy az egyes pozitív modulator vegyületek jelenlétében hányszorosára nőtt a GYKI 52466-nak az SD gátlásra vonatkozó IC_{50} értéke (**2. táblázat**). A GYKI 52466 koncentráció-hatás görbéjét legnagyobb mértékben a 100 μM S18986, kevésbé a 2000 μM

aniracetam, és legkevésbé a 10 μM ciklotiazid tolta jobbra. Az EGIS-A jelű vegyület esetében az alkalmazott 100 μM koncentráció önmagában alacsonyabb potenciózást eredményezett, mint a többi vizsgált vegyület, és a GYKI 52466 koncentráció-hatás görbéjében is csekély mértékű változást okozott (2. táblázat).

12. ábra A GYKI 52466 és különböző AMPA receptor pozitív modulátorok hatása AMPA-val kiváltott SD-ben csirke retinán



2. táblázat A GYKI 52466 AMPA antagonistá hatásának változása AMPA receptor pozitív modulátorok jelenlétében

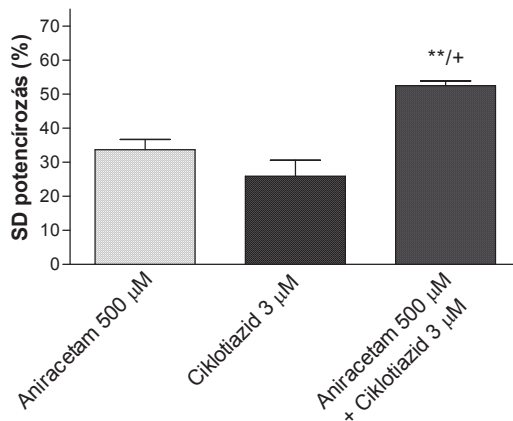
Kezelés	Koncentráció (μM)	Potenciózás (%)	GYKI 52466 IC_{50} (μM)	RG* ($\text{IC}_{50}/\text{IC}_{50}$ kontroll)
Kontroll	-	-	16.6 ± 0.7	1
Ciklotiazid	10	58.0 ± 3.6	25.3 ± 1.3	1.52
Aniracetam	2000	58.7 ± 4.8	38.2 ± 0.5	2.30
S18986	100	54.8 ± 2.6	51.9 ± 2.5	3.12
EGIS-A	100	36.8 ± 5.3	20.4 ± 3.4	1.22

RG (relatív gátlás): az az arányszám, amely kifejezi, hogy az egyes pozitív modulátor vegyületek jelenlétében hány-szorosára nőtt a GYKI 52466-nak az SD gátlásra vonatkozó IC_{50} értéke

5.1.1.5. AMPA receptor pozitív modulátorok kölcsönhatása SD-ben

A következő kísérletben arra kerestük a választ, hogy a pozitív modulátorok GYKI 52466 AMPA antagonizmusát eltérő mértékben befolyásoló hatásának lehet-e az az oka, hogy a különböző pozitív modulátor vegyületek az AMPA receptorhoz különböző kötőhelyen kapcsolódnak. Ehhez a ciklotiazid, az aniracetam és az S18986 egymással való kölcsönhatását páronként vizsgáltuk. Az additív hatás mérhetőségéhez az egyes vegyületeket olyan koncentrációban alkalmaztuk, amelyek önmagukban kb. 25-40% közötti potenciózást eredményeztek (**13., 14., 15. ábra**). Az aniracetam (500 μM) és ciklotiazid (3 μM) együttes adagolása a két vegyület hatásának összeadódását okozta (**13. ábra, 3. táblázat**). A benzotiazin származék S18986-at két koncentrációban (10 és 30 μM) adagoltuk, egyszer 3 μM ciklotiaziddal, másszor pedig 500 μM aniracetammal együtt. Az aniracetammal történt együttes adagolás során nem tapasztaltuk az SD potenciózó hatás növekedését (**14. ábra, 4. táblázat**). A ciklotiazidnak azonban az S18986 mindkét koncentrációjával történő együtt adagolása a külön-külön mért potenciózó hatások összeadódását idézte elő (**15. ábra, 5. táblázat**).

13. ábra Ciklotiazid és aniracetam kölcsönhatása AMPA-val kiváltott SD-ben csirke retinán

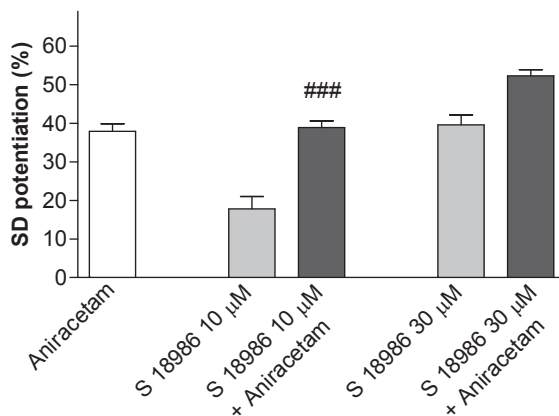


3. táblázat Aniracetam és ciklotiazid kölcsönhatása csirke retina SD-ben

Kezelés	Koncentráció (μ M)	SD latencia (másodperc)		Csökkenés (% [†])	N
		kontrol	kezelt		
Ciklotiazid	3	57.7 \pm 1.4	44.0 \pm 2.9	23.7 \pm 4.6	10
Aniracetam	500	54.8 \pm 1.4	37.6 \pm 1.2	30.9 \pm 2.8	11
Ciklotiazid+Aniracetam	3+500	58.8 \pm 0.8	29.0 \pm 0.7	50.6 \pm 1.1 ^{**/+}	11

[†] Az egyes retinákon mért százalékos csökkenések átlaga \pm szórás; ** p<0.01 különbség a ciklotiazidhoz viszonyítva; + p<0.05 különbség az aniracetamhoz viszonyítva

14. ábra S18986 és aniracetam kölcsönhatása AMPA-val kiváltott SD-ben csirke retinán

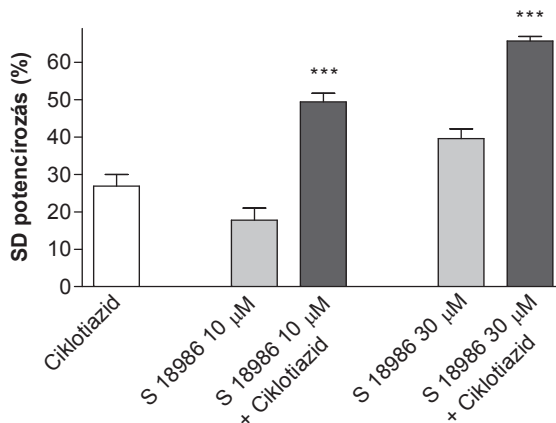


4. táblázat S18986 és aniracetam kölcsönhatása csirke retina SD-ben

Kezelés	Koncentráció (µM)	SD latencia (másodperc)		Csökkenés (%†)	N
		kontroll	kezelt		
Kontroll	-	59.3±3.0	58.1±2.6	0.4±4.3	24
Aniracetam	500	57.8±2.7	35.4±1.0	37.9±2.0	13
S18986	10	55.3±1.9	45.2±1.8	17.8±3.2	13
Aniracetam + S18986	500 + 10	51.6±1.5	31.3±0.9	38.9±1.7	20
S18986	30	56.6±2.0	33.7±0.8	39.6±2.6	12
Aniracetam + S18986	500 + 30	52.5±2.1	24.8±0.8	52.3±1.6	14

† Az egyes retinákon mért százalékos csökkenések átlaga ± szórás

15. ábra S18986 és ciklotiazid kölcsönhatása AMPA-val kiváltott SD-ben csirke retinán



5. táblázat S18986 és ciklotiazid kölcsönhatása csirke retina SD-ben

Kezelés	Koncentráció (µM)	SD latencia (másodperc)		Csökkenés (% [†])	N
		kontroll	kezelt		
Kontroll	-	59.3±3.0	58.1±2.6	0.4±4.3	24
Ciklotiazid	3	58.1±1.8	42.2±1.9	26.9±3.1	15
S18986	10	55.3±1.9	45.2±1.8	17.8±3.2	13
Ciklotiazid + S18986	3 + 10	53.2±2.6	26.3±0.8	49.4±2.3***	15
S18986	30	56.6±2.0	33.7±0.8	39.6±2.6	12
Ciklotiazid + S18986	3 + 30	57.4±1.7	19.6±0.6	65.7±1.2***	20

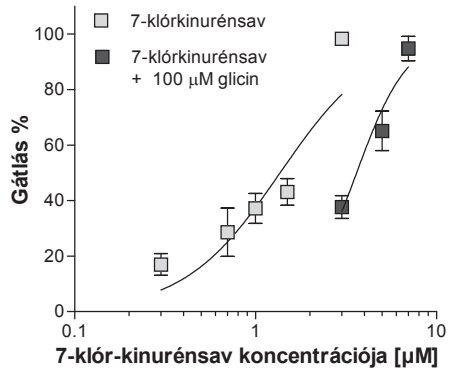
[†] Az egyes retinákon mért százalékos csökkenések átlaga ± szórás; ***: p<0.001 különbség mind a ciklotiazid, mind a megfelelő koncentrációjú S18986 potenciózó hatásához viszonyítva

5.1.2. Glicin transzporter gátló vegyületek hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumban

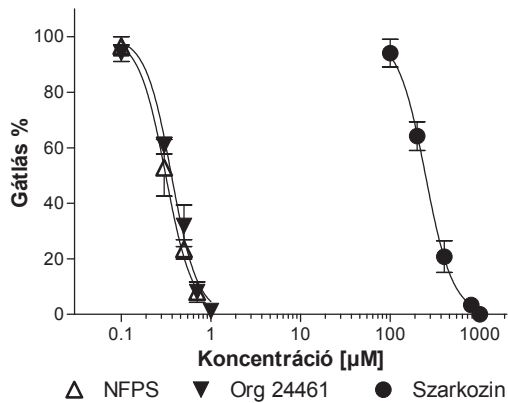
A vizsgálatokban azt vártuk, hogy az AMPA pozitív modulátor vegyületekhez hasonlóan a glicin transzporter gátló molekulák is serkentik az SD kialakulását, tehát csökkentik a latenciát. A glicin visszavétel hatékonyságának mennyiségi meghatározásához ezért az AMPA receptor pozitív modulátorok vizsgálatánál jól használható 1 perc körüli latencia értéket próbáltuk elérni NMDA alkalmazásával. Ha a kísérletekben 35 μM NMDA-t alkalmaztunk, az SD 40-60 mp latencia után alakult ki. Glicin transzporter gátló NFPS (10 μM), Org 24461 (30 μM), ill. glicin (100 μM) hozzáadása 40-60%-ban csökkentette az NMDA-val kiváltott SD latenciáját: 10 μM NFPS $60.3 \pm 4.1\%$ -os, 30 μM Org 24461 $56.0 \pm 3.3\%$ -os, 100 μM glicin $44.2 \pm 7.6\%$ -os csökkenést idézett elő ($n=4-5$). A glicin transzporter gátló vegyületek hatása azonban az alkalmazott magas koncentrációk esetében nem vagy nehezen kimoshatónak bizonyult.

Ezt a nehezen kimosható serkentést a glicin transzport gátlásának indirekt mérésével tudtuk kiküszöbölni. Ha 100 μM NMDA volt az SD kiváltó ágens, 10-15 mp latencia értéket mértünk. Az NMDA receptor glicin kötőhelyen kompetitív antagonistá 7-klór-kinurénsav 3 μM koncentrációjának hozzáadásával 100%-os (>30 mp) gátlást értünk el a 100 μM NMDA alkalmazása mellett. Glicin jelenlétében (koncentráció: 100 μM) a 3 μM 7-klór-kinurénsav 100%-os gátló hatása kb. 40%-os mértékűre csökkent (**16. ábra**). Ebben a kísérleti elrendezésben az NFPS és az Org 24461 azonban már kevesebb, mint 1 μM koncentrációban, koncentráció-függő módon mérsékeltek a 7-klór-kinurénsav SD gátló hatását. A glicin transzporter gátló szarkozin hatása a 100-1000 μM -os tartományban jelentkezett (**17. ábra**).

16. ábra 7-klór-kinurénsav hatása 100 μM NMDA-val csirke retinában kiváltott SD-re 100 μM glicin jelenlétében, ill. hiányában



17. ábra NFPS, Org 24461 és szarkozin hatása a 3 μM 7-klór-kinurénsav gátló hatására 100 μM NMDA-val kiváltott SD-re



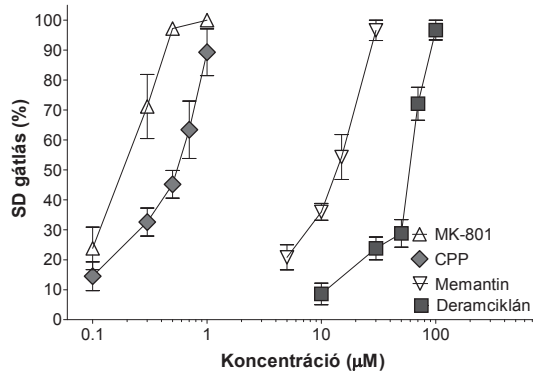
5.1.3. A deramciklán (EGIS-3886) hatása a tovaterjedő depolarizációra izolált csirke retina preparátumban

Vizsgáltuk a deramciklának az NMDA-val kiváltott SD-re gyakorolt hatását. 100 μM NMDA alkalmazása esetén, a Ringer oldat 1 mM-os MgSO_4 koncentrációja mellett az SD 15-20 mp latencia után alakult ki. Ez esetben a deramciklán 10-30-50-70-100 μM -ban adagolva kismértékben (10-20%), és nem koncentráció-függő módon gátolta az SD-t. Ha az NMDA koncentrációját változatlanul hagytuk, míg a MgSO_4 koncentrációját 0.33 mM-ra csökkentettük, a kontroll latencia a felére (8-10 mp) csökkent, és a deramciklánál a 10-100 μM koncentráció tartományban SD-gátló hatást nem tudtunk kimutatni (Feltehetően az ismételt adagolások és SD mérések hiánya miatt).

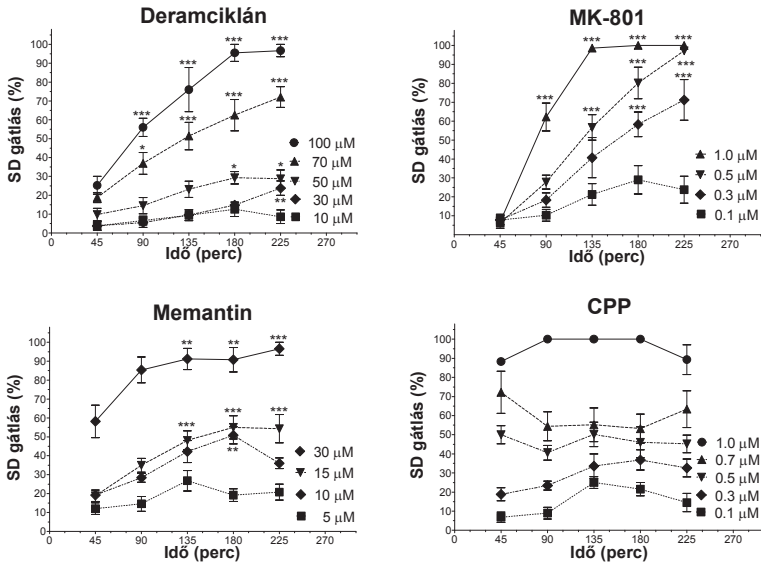
Amennyiben az NMDA koncentrációját csökkentettük 50 μM -ra 0.33 mM MgSO_4 koncentráció mellett, az SD 15-20 mp latencia után alakult ki. Ezen kísérleti feltételek mellett vetettük össze a deramciklán SD gátló hatását ismert kompetitív (CPP) és nem-kompetitív (MK-801, memantin) NMDA receptor gátló vegyületekével.

A deramciklán koncentráció-függő módon gátolta az NMDA-val kiváltott SD-t 10-100 μM tartományban. Az első mérés során (45 percnél) azonban még nem mértünk szignifikáns különbséget a vegyület különböző koncentrációi által okozott SD-gátlás mértékében (**19. ábra**). Az egyes koncentráció-értékekhez tartozó százalékos gátlás mértéke a kísérlet során – az ismételt adagolásokat követő mérésekkor – növekedett. Hasonló koncentráció- és működésfüggő gátlást mutatott a memantin és az MK-801. A CPP esetében is koncentráció-függő gátlást tapasztaltunk, de az egyes koncentráció-értékekhez tartozó gátlás mértéke nem változott az ismételt adagolások során. A deramciklán, memantin és MK-801 esetében tehát a koncentráció-hatás görbe balra tolódott, míg a CPP esetében nem észleltünk hasonló változást. A vegyületek koncentráció-függő SD gátló hatását szemlélteti az **18. ábra**, ahogyan a kísérlet során az 5. anyagadás utáni mérés mutatta. A **19. ábrán** látható, hogyan alakult az egyes vegyületek esetében az adott koncentrációkban mért SD gátló hatás. A számított IC_{50} értékeket a **6. táblázat** tartalmazza.

18. ábra A deramciklán, memantin, MK-801 és CPP csirke retinán mért SD gátló hatása a kísérlet 225. percében (5. anyagadást követő mérés)



19. ábra A deramciklán, memantin, MK-801 és CPP csirke retinán mért SD gátló hatásának alakulása ismételt anyagadások során



6. táblázat Az NMDA antagonistá vegyületek SD gátló hatására vonatkozó koncentráció-hatás görbék (IC₅₀ értékek) változása az ismételt adagolások során

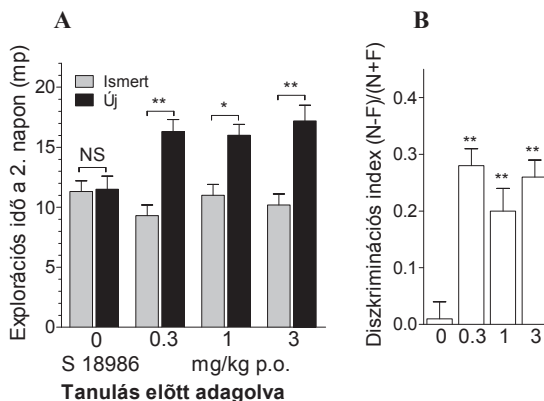
Vegyület	IC ₅₀ értékek (µM)					N
	1x45 perc	2x45 perc	3x45 perc	4x45 perc	5x45 perc	
Deramciclán	197.7±47.7	89.4±4.7	69.6±3.9	60.4±2.6	56.2±2.5	5-8
Memantin	27.1±2.7	17.2±1.7	12.6±1.2	11.3±0.9	12.7±1.0	5-8
MK-801	-	0.79±0.08	0.35±0.05	0.20±0.03	0.18±0.02	5-6
CPP	0.50±0.03	0.55±0.03	0.44±0.06	0.45±0.06	0.48±0.04	4-5

5.2. *In vivo* vizsgálatok

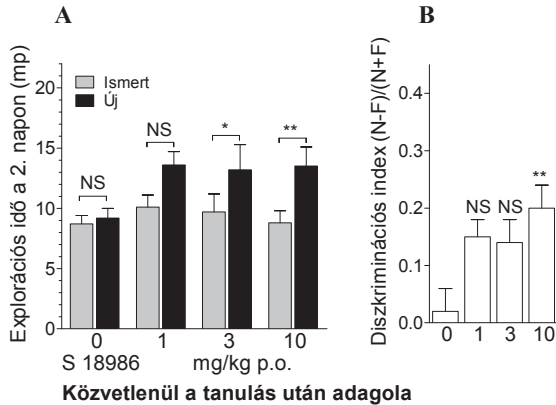
5.2.1. AMPA és NMDA receptor modulátorok memóriajavító hatásának vizsgálata tárgyfelismerés teszten patkányban

Az AMPA receptor pozitív modulátor S18986 a bevésés (tanulási szakasz) előtt adva 0.3 - 3 mg/kg dózistartományban hatékonyan bizonyult a tárgyfelismerés teszten (**20. ábra**). A vegyület közvetlenül a tanulási szakasz után (**21. ábra**), valamint a retenció előtt adva (**22. ábra**) csak 3 mg/kg (és magasabb) dózisban javította a tárgyfelismerési teljesítményt.

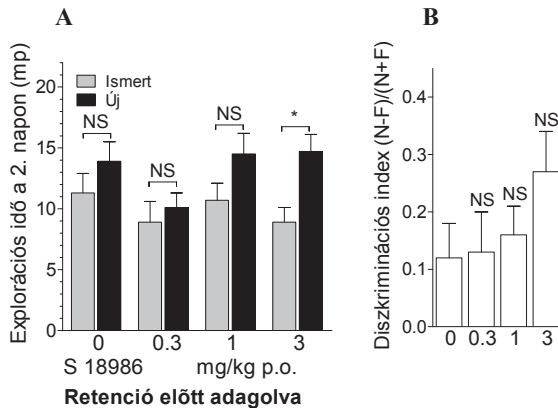
20. ábra Az S 18986 hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt



21. ábra Az S 18986 hatása OR teszten: anyagadás a tanulást követően



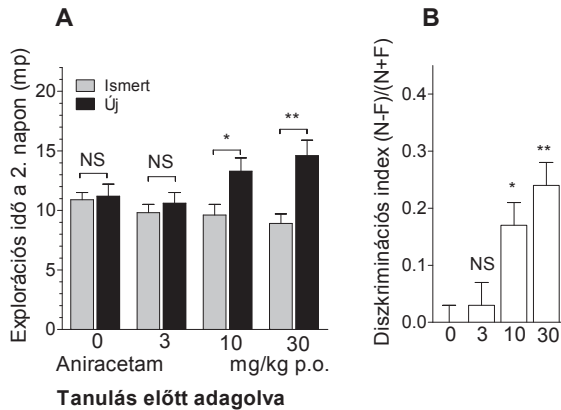
22. ábra Az S 18986 hatása OR teszten: anyagadás a memória előhívási szakasz előtt



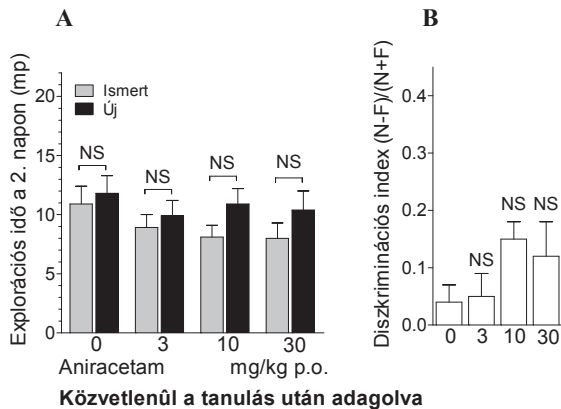
Az AMPA receptor pozitív modulátor aniracetam akvizíció előtt adva az alkalmazott két magasabb dózisban (10 és 30 mg/kg, p.o.) szignifikáns hatást ért el (23. ábra). Akvizíció után adva viszont nem mértünk szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoportok között (24. ábra). Retenció előtt adva a legnagyobb, 30

mg/kg-os dózisban szignifikáns különbséget mértünk az új és ismert tárgy vizsgálatával eltöltött időben, de a diszkriminációs index (DI) nem különbözött a kontroll értékétől (25. ábra).

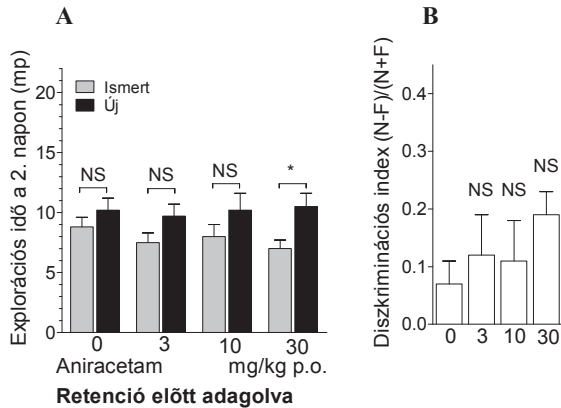
23. ábra Az aniracetam hatása OR teszten: anyagadás a tanulási szakasz előtt



24. ábra Az aniracetam hatása OR teszten: anyagadás a tanulási szakaszt követően

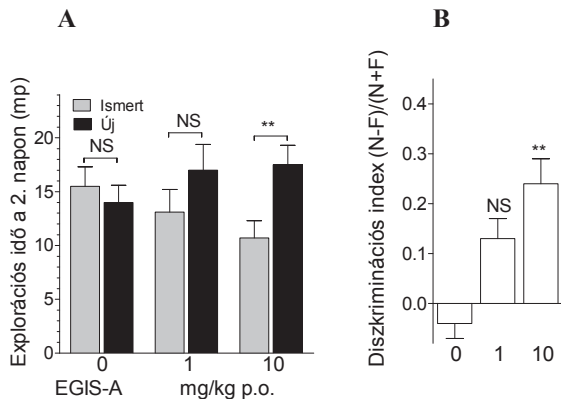


25. ábra Az aniracetam hatása OR teszten: anyagadás a memória előhívási szakasz előtt

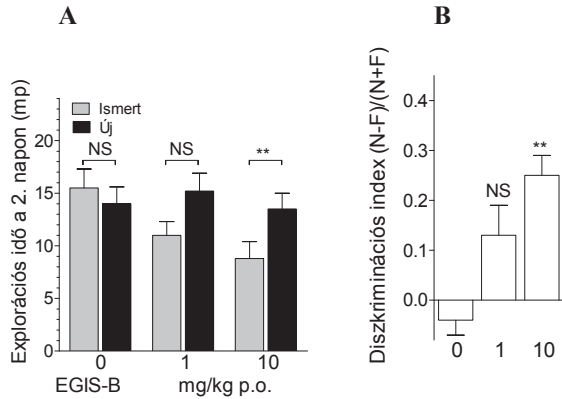


Az EGIS Gyógyszergyárban szintetizált AMPA receptor allosztérikus modulátor vegyületek, az EGIS-A és EGIS-B az alkalmazott magasabb dózisban (10 mg/kg) javították a kezelt állatok tárgyfelismerését a kontroll csoporthoz viszonyítva (26., 27. ábra).

26. ábra Az EGIS-A hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt

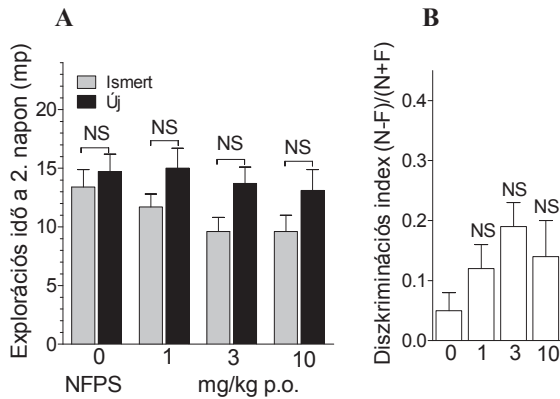


27. ábra Az EGIS-B hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt

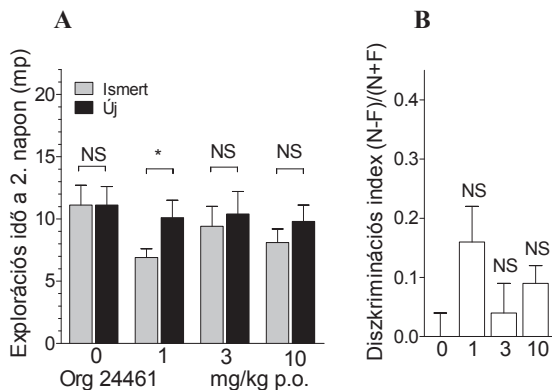


A glicin transzporter 1 gátló vegyületek, az NFPS és az Org 24461 a vizsgált dózisokban nem javították a tanulási teljesítményt a tárgyfelismerési teszten (28., 29. ábra).

28. ábra Az NFPS hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt

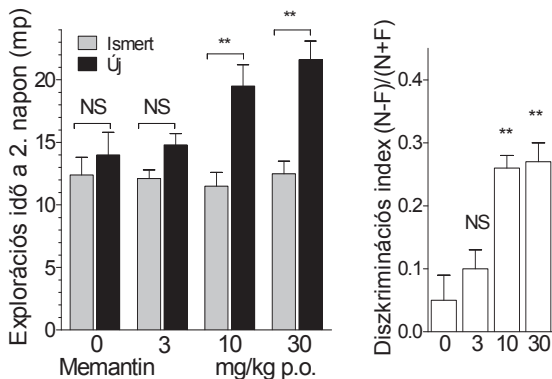


29. ábra Az Org 24461 hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt

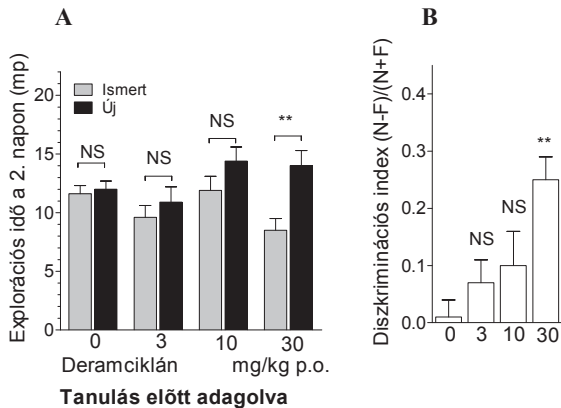


Az NMDA receptor blokkoló memantin a tanulási szakasz előtt adagolva a két magasabb dózisban (10 és 30 mg/kg, p.o.) növelte az új tárgy vizsgálatával eltöltött időt a kontroll csoporthoz képest (30. ábra). A deramciklán esetében mindhárom adagolási időpontnál (tanulási szakasz előtt, után, illetve az előhívási szakasz előtt) az alkalmazott legnagyobb dózisban (30 mg/kg, p.o.) a vegyület hatékonyan javította a tárgyfelismerést a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyítva (31., 32., 33. ábra).

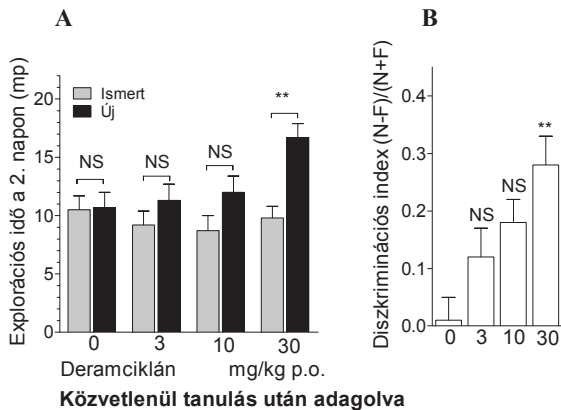
30. ábra A memantin hatása OR teszten: anyagadás a tanulás előtt



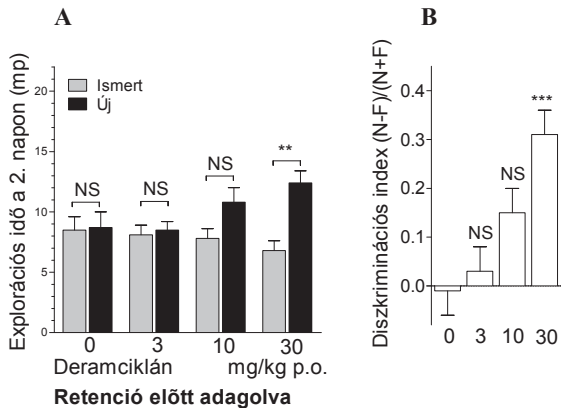
31. ábra A deramciclán hatása OR teszten: anyagadás a tanulási szakasz előtt



32. ábra A deramciclán hatása OR teszten: anyagadás a tanulási szakaszt követően



33. ábra A deramciklán hatása OR teszten: anyagadás a memória előhívási szakasz előtt



6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A csirke retinán kiváltott tovaterjedő depolarizáció és a glutamáterg ligandok szerepe

6.1.1. AMPA/kainát receptor ligandok

Az ionotróp glutamát receptorok közül az NMDA receptoroknak a tovaterjedő depolarizáció (SD) folyamatában játszott központi szerepe régóta ismeretes (*Sheardown, 1993*), és a nem specifikus AMPA/kainát receptor agonista ligandoknak az SD-t befolyásoló hatását is leírták mind az agykéregben (*Lauritzen és mtsai., 1988*), mind a retinában (*Martins-Ferreira és mtsai., 1993; Sheardown, 1993*). Amíg az agykéregben kísérletes körülmények között, mechanikai ingerléssel (*Nellgård és Wieloch, 1992*), ill. magas extracelluláris K^+ -koncentrációval (*Wu és Fujikawa, 2002*) kiváltott SD kialakulásában és terjedésében nem egyértelműen bizonyított az AMPA antagonisták SD gátló hatása, addig a retinában az AMPA receptor fontos szerepét az SD kialakulásában jól alátámasztják a szelektív ligandokkal végzett vizsgálatok. A retinában az ionotróp glutamáterg receptor altípusok mindegyike előfordul (*Cristovao és mtsai., 2002a, 2002b*). Az SD előidézhető az ionotróp glutamát receptor altípusok agonistáival, és gátolható az antagonistákkal. A retinán kiváltott SD az AMPA receptor antagonisták vizsgálatára régóta használatos, egyszerűen kivitelezhető, jó áteresztő-képességű, az EGIS-ben is beállított módszer (*Kapus és mtsai., 2004.; Gigler és mtsai., 2007; Szénási és mtsai., 2008.*), amely a gyógyszerfejlesztés folyamatában első szűrőként jól alkalmazható (*Tarnawa és Vízi, 1998; Ábrahám és mtsai., 2000*).

A gyógyszerfejlesztés egyik célja a receptorszelektív ligandok előállítására. Az EGIS-ben folyó, AMPA receptorra ható vegyületek kutatásának egyik fontos része volt a szelektivitás bizonyítása, ill. annak vizsgálatára a megfelelő élettani teszt kifejlesztése. Az SD modell beállításánál még nem rendelkezünk irodalmi adatokkal arra vonatkozólag, hogy egyrészt az AMPA és kainát receptorok külön-külön milyen mértékben vesznek részt az SD kialakulásában, másrészt ezzel összefüggésben az AMPA/kainát receptorok pozitív modulátorai hogyan befolyásolják az SD folyamatát. Ennek vizsgálatához specifikus AMPA ill. kainát receptor ligandok jelenlétében váltottuk ki az SD-t. Előzetes méréseinkben sem az AMPA receptor pozitív modulátor ciklotiazid, amely az AMPA receptor deszenzitizációját gátolja, sem a kainát receptor deszenzitizációját gátló concanavalin A (*Partin és mtsai., 1993*) önmagában nem

idézett elő SD-t a retinában. Várakozásainknak megfelelően a ciklotiazid és a concanavalin A potenciózta a kaináttal, illetve AMPA-val kiváltott SD-t, annak kialakulását eltérő módon befolyásolva (**9. ábra**). Míg a concanavalin A kismértékű, nem szignifikáns potenciózó hatást mutatott, addig az AMPA receptor pozitív modulátor ciklotiazid markánsan és koncentráció-függő módon potenciózta az AMPA-nak, és csak kisebb mértékben a kainátnak az SD-re kifejtett hatását (*Kertész és mtsai., 2004*). Ez utóbbi, kismértékű hatás hátterében az állhat, hogy a kainát nemcsak a kainát receptorokon, hanem az AMPA receptorokon is agonistaként működik. Az AMPA receptorokon az AMPA deszenzitizáló, míg a kainsav nem deszenzitizáló áramot indukál (*Paternain és mtsai., 1996*). A ciklotiazid szelektíven az AMPA receptorokhoz kötődve (*Partin és mtsai., 1993*) a kainát által kiváltott AMPA áramot potenciózza. Eredményeink szerint a kainát receptor csak csekély mértékben vehet részt az SD kialakulásában.

A retinában a csapok és a fény kikapcsolására aktiválódó (OFF) bipolaris sejtek közötti glutamáterg ingerület-átvitelben szerepet játszó kainát receptorok jelenlétét írták le (*DeVries és Schwartz, 1999*). Más sejtípusokon (amakrin sejt, horizontális sejt, ganglion sejt) azonban azt találták, hogy a kainát receptor nem vagy alig játszik szerepet a fény kiváltotta ingerület továbbításában (*Cohen, 2000; Ghosh és mtsai., 2001; Huang és mtsai., 2004; Jacoby és Wu, 2001; Lukasiewicz és mtsai., 1997; Veruki és mtsai., 2003; Yang és mtsai., 1998*). Kísérleteink tehát azt igazolták, hogy hasonlóan a fényinger továbbításában közreműködő glutamáterg folyamatokhoz, az SD-ben is nagyobb szerepet játszhatnak az AMPA receptorok, mint a kainát receptorok.

További vizsgálatainkban ezért megmértük, hogy az AMPA receptor különböző szerkezetű pozitív modulátorai hogyan befolyásolják az SD kialakulását önmagukban adva, valamint egy negatív modulátor, ill. egy másik pozitív modulátor jelenlétében. A ciklotiazidhoz hasonlóan a többi, kísérleteinkben vizsgált AMPA receptor pozitív modulátor vegyület is – S18986, aniracetam, IDRA 21, 1-BCP, EGIS-A, EGIS-B –, eltérő hatékonysággal, de koncentráció-függő módon potenciózta az AMPA-val kiváltott SD-t (**11. ábra**), míg AMPA nélkül adva önmagában nem indította el a retinában a depolarizációs hullámot, amely allosztérikus serkentésre utal. A hatásereőség mennyiségi meghatározásához az SD következtében fellépő fénytörési változás (belső optikai jel) megjelenésének latenciájában bekövetkezett csökkenés mértékét számoltuk ki. Amint a bevezetőben már említettem, a belső optikai jel

megjelenése jól korrelál az ion- és membránpotenciál változásokkal különféle preparátumokban (*Dahlem és Müller, 2000; Peixoto és mtsai., 2001; Snow és mtsai., 1983; Világi és mtsai., 2001; Wiedemann és mtsai., 1996*). Az egyes pozitív modulátorok hatékonyságát befolyásolhatja a retina szövetében való eltérő diffúziójuk és eloszlásuk, valamint a különböző pozitív modulátoroknak az AMPA receptor egyes alegységei, és azok flip és flop variánsai iránti eltérő affinitása (*Partin és mtsai., 1996*). Mindezen befolyásoló tényezők ellenére is az AMPA receptor pozitív modulátorokkal kapott SD potenciózási adataink (**10. ábra**) jól korreláltak az ettől eltérő preparátumokon nyert, AMPA áram potenciózásra vonatkozó irodalmi adatokkal (*Arai és Lynch, 1998; Bertolino és mtsai., 1993; Johansen és mtsai., 1995; Kapus és mtsai., 2000; Lockhart és mtsai., 2000; Partin és mtsai., 1996; Yamada és Turetsky, 1996*), valamint az EGIS-ben patkány hippocampusz szeleten (Kapus Gábor mérései), és patkány kisagy Purkinje sejten patch clamp technikával (Végh Miklós mérései) nyert eredményekkel (**1. táblázat**).

A negatív modulátorokkal való kölcsönhatások vizsgálata során a pozitív modulátor ciklotiazid, aniracetám és S18986, közel azonos nagyságú (50-60%) potenciózást előidéző koncentrációban adva párhuzamosan, de eltérő mértékben tolta jobbra a negatív allosztérikus modulátor GYKI 52466 koncentráció-hatás görbéjét (**12. ábra**). Hasonló, bár kisebb mértékű eltolást eredményezett az EGIS-A jelű vegyület is. A párhuzamos eltolás kompetitív kölcsönhatásra utal, de ennek ellentmond az a tény, hogy a GYKI 52466 gátló hatása más-más mértékben csökkent a különböző pozitív modulátorok hatására. Több közlemény utal arra, hogy a pozitív és negatív allosztérikus modulátorok eltérő kötőhelyhez kapcsolódnak az AMPA receptoron (*Johansen és mtsai., 1995; Kessler és mtsai., 1996; Partin és Mayer, 1996; Yamada és Turetsky, 1996*). Más vizsgálatok arra világitanak rá, hogy a pozitív és negatív modulátorok receptorhoz kapcsolódásában feltehetően közös kötőhely(ek) is részt vehetnek (*Kapus és mtsai., 2000, Zorumski és mtsai., 1993*). Ami a pozitív modulátor vegyületeket illeti, újabb adatok arra utalnak, hogy a deaktiváció és deszenzitizáció gátlása akár eltérő szerkezetű vegyületeknél is azonos kötőhelyhez kapcsolható (*Jin és mtsai., 2005; Leever és mtsai., 2003*).

Eredményeink nem erősítik meg az AMPA receptoron a pozitív modulátor vegyületek egyetlen, közös kötőhelyének létezését (GYKI 52466 hatásának eltérő mértékű modulálása), de nem is zárják ki annak lehetőségét (GYKI 52466 gátlási görbe hasonló, párhuzamos eltolása mind a négy vizsgált pozitív modulátor

esetében). A látszólagos ellentmondás feloldásához segítséget ad egy idén közzétett tanulmány (Ptak és mtsai., 2009). A szerzők különböző tiazid származékoknak az AMPA receptor S1S2 dimerjéhez való kapcsolódását vizsgálták. Azt állapították meg, hogy a ligandkötőhelyet elméletben 5 részterületre bontva a vizsgált molekulák a kötőhelyen belül eltérő affinitással kapcsolódtak az 5 részterülethez. Saját vizsgálataink összhangban vannak Ptak és mtsai eredményeivel. A GYKI 52466 SD gátló hatásának eltérő mértékű befolyásolását magyarázhatja az AMPA receptoron a pozitív modulátor kötőhely 5 részterülete iránti eltérő affinitásból eredő eltérő aktivitás.

Egy olyan összetett rendszerben, mint a retina, az egyes modulátorok hatását erősen befolyásolhatja a különböző AMPA receptor alegységekhez való affinitásbeli eltérés, illetve a flip/flop variáns iránti preferencia is. A pozitív modulátorok közötti kölcsönhatásnak az SD kialakulásában játszott szerepét vizsgálva úgy tűnik, a funkcionális különbségek erősebben befolyásolják a vegyületek hatását, mint a vegyületek szerkezeti különbségei, legalább is az általunk vizsgált esetekben. A ciklotiazid és aniracetam SD potenciózó hatása összeadódott (**13. ábra**). A ciklotiazid és aniracetam eltérő kémiai szerkezetű vegyületek, de hatásuk is lényegesen eltér a deszenzitizáció/deaktiváció gátlásában, flip/flop preferenciában (Partin és mtsai., 1996). A szerkezeti rokonság ellenére hasonló addíciót tapasztaltunk az SD potenciózásban a ciklotiazid és S18986 esetében is (**15. ábra**). A várakozással szemben a más struktúrákörbe tartozó aniracetam és az S18986 együttes adagolása nem eredményezte az SD potenciózó hatás összeadódását (**14. ábra**). A szerkezeti hasonlóság ellenére meglévő funkcionális különbségeket leírták az aniracetamhoz közeli szerkezetű Ampakin vegyületek esetében is. A vegyületcsalád nem egységes hatású az AMPA áramok kinetikája megváltoztatásának, illetve az AMPA receptor zárt – nyitott – deszenzitizált – deaktivált állapotai közötti átmenet befolyásolásának tekintetében (Arai és Lynch, 1998; Arai és mtsai., 2000; Arai és mtsai., 2002). A ciklotiaziddal, IDRA 21-gyel és S 18986-tal rokon 1,2,4-benzotiadiazinok között pedig mind negatív, mind pozitív AMPA modulátor vegyületek is megtalálhatók (Braghioli és mtsai., 2002). Egyéb közleményekben is fellelhetők a különféle pozitív modulátor vegyületek feltételezett más-más kötőhelyére vonatkozó utalások (Desai, és mtsai., 1995; Kapus és mtsai., 2000; Partin és mtsai., 1996; Pittaluga és mtsai., 1999). Újabb vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy különböző szerkezetű pozitív modulátorok eltérő

hatásmechanizmusában és hatáserősségében nem feltétlenül eltérő kötőhely játszik szerepet, inkább a molekulaszervezetből adódóan pl. az elsődleges és másodlagos kötések kialakulásában kimutatható különbségek (*Jin és mtsai., 2005; Leever és mtsai., 2003; Ptak és mtsai., 2009; Sun és mtsai., 2002*). A ciklotiazid esetében igazolták, hogy az S1 és S2 transzmembrán domének között mely aminosavakhoz kötődve akadályozza meg a deszenzitizált állapot kialakulását (*Sun és mtsai., 2002*). A ciklotiazid receptor deszenzitizációt gátló, és a CX546 jelű Ampakin vegyület deaktivációt gátló hatása egyaránt megszűnt a GluR1 (S493T) és GluR2 (S497T) alegység extacelluláris doménjein előidézett ugyanazon szerin/treonin pontmutációkkal (*Leever és mtsai., 2003*). A szerkezetiileg különböző, és egészen eltérő hatáserősségű, deaktivációt gátló aniracetam és CX614 a két domén (S1 és S2) által képezett dimer ugyanazon helyére köt, egy közös kötőhelyre, és a kölcsönhatásban inkább apoláris kölcsönhatások játszó a főszerepet. Ezzel szemben a ciklotiazid ugyanezen a területen két kötőhelyhez is kapcsolódik, és hidrogénhidakon keresztül is jobban kötődik a receptormolekulához (*Jin és mtsai., 2005*). A benzotiazid szerkezetű molekulák S1S2 doménhoz kapcsolódásában kimutatható eltérések (*Ptak és mtsai., 2009*) tovább árnyalják a képet. Mindezek felül az aniracetamnak inkább a flop, míg a ciklotiazidnak a flip variáns iránt nagyobb az affinitása (*Partin és mtsai., 1996*). A retinában, ahol a flip és flop variánsok együtt megtalálhatók (*Harada és mtsai., 1998*), ez elegendő lehet a két vegyület SD potenciózó hatásának összeadódásához. Az S18986 jelű vegyület flip/flop preferenciájára vonatkozólag nem találtunk irodalmi adatot, de a flop variáns iránti nagyobb affinitás feltételezhető az eredményeink alapján.

6.1.2. Glicin visszavétel gátlók hatása az SD-re

A vizsgálatok során a glicin transzporter-1 gátló nem kompetitív antagonistá NFPS és Org 24461, valamint a kompetitív gátló szarkozin hatását mértük meg NMDA-val kiváltott SD teszten retinában. Az AMPA pozitív modulátorok SD potenciózó hatásának ismeretében kézenfekvő volt, hogy az NMDA receptor működésének serkentése szintén elősegíti az SD kialakulását a retinában. NMDA receptor agonisták, kompetitív és nem kompetitív antagonisták hatását régebben leírták (*Lauritzen és mtsai., 1988; Marranes és mtsai., 1988; Sheardown, 1993*). A glicin, illetve az NMDA receptor glicin kötőhelyéhez kapcsolódó ligandok SD

befolyásoló hatása is már régóta ismert. A glicin kötőhelyen parciális agonista HA-966 jelű vegyület SD gátló hatását a glicin visszafordította csirke retinában (*Drejer és mtsai., 1989*). Glicin_B kötőhely antagonistával gátolható az SD (*Obrenovitch és Zilkha, 1996*), ugyanakkor a striátumba adagolva a glicin magas koncentrációban sem fokozta az NMDA depolarizáló hatását (*Obrenovitch és mtsai., 1997*). Nem találtunk azonban adatot azzal kapcsolatban, hogy a glicin szintjének közvetlenül a szinapszisban történő emelkedése potenciózza-e az NMDA-nak az SD-re gyakorolt hatását.

Kísérleteinkben abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a glicin gliasejtbe történő felvételének gátlása révén megnövekszik a szinaptikus résben az NMDA receptor koagonista glicin koncentrációja, ez pedig az NMDA-val kiváltott SD potenciózását eredményezi. Az általunk vizsgált gliális glicin transzporter (Glyt1) gátló tulajdonsággal bíró vegyületek (NFPS, Org24461) mind közvetlen, mind közvetett úton – a glicin kötőhely kompetitív antagonistá 7-klór-kinurénsav hatásának felfüggesztése révén – az NMDA-val kiváltott SD potenciózását okozták. A közvetlen serkentés ugyanolyan mértékének eléréséhez a glicin transzporter gátló vegyületeket mintegy két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban kellett alkalmazni, mint a 7-klór-kinurénsav gátló hatásának felfüggesztéséhez – kb. 50%-os serkentéshez 10-30 μM a 0,1-1 μM tartománnyal szemben. A glicin 100 μM -os koncentrációban azonban mindkét kísérleti elrendezésben hasonló mértékű (40-50% körüli) potenciózást váltott ki. Ennek magyarázata az lehet, hogy a kísérleti rendszerhez adagolt, exogén glicinnek a szinaptikus részbe jutása (diffúziója) hasonló kinetikával történik a közvetlen serkentés és a kompetitív gátlás során. Ezzel szemben a glicin transzporter gátló vegyületek helyben, a szinaptikus résben növelik meg a glicin koncentrációját, és ez már csekély mértékű újrafelvétel gátlás révén is jóval hatékonyabban emeli az aminosav mennyiségét a szinapszisban ahhoz, hogy a glicin a kompetitív antagonistá hatását felfüggeszthesse. A glicin koncentrációja a szinapszisban nyugalmi állapotban 100-200 nM-os tartományban van, ez az érték ingerlés hatására millimoláris szintre emelkedhet. A glicin affinitása az NMDA receptorhoz az NR2 alegységtől függően 0.1-3 μM (*Danysz és Parsons, 1998*). A GlyT1 normál működés esetén az extracelluláris glicin szintjét a glicin_B kötőhely telítési értéke alatt tartja (*Supplisson és Bergman, 1997*). A GlyT1 folyamatos működése szükséges ahhoz, hogy a néhány μM -os extracelluláris koncentráció

mellett a szinaptikus részben a glicin mennyisége 0,1 –0,2 μM körül legyen. A GlyT1 gátlása tehát az NMDA receptor telítődését okozza. Eredményeinkből az is következtethető, hogy hasonlóan más agyi preparátumokhoz (*Yang és Svensson, 2008*), a GlyT1 működése esetén a retinában sem teltett a glicin_B kötőhely.

Hársing és mtsai. (2003) közlése alapján hippokampális szinaptoszóma preparátumban a glicin felvétel gátlásra vonatkoztatott IC_{50} érték az NFPS esetében 0.022 μM , az Org 24461 jelű vegyületnél 2.5 μM . Más beszámolók az NFPS glicin felvétel gátló IC_{50} értékét 0.017-0.22 μM közé teszik (*Yang és Svensson, 2008*), így önmagában az NFPS esetében is a glicin transzport gátlás vonatkozásában egy nagyságrendbeli eltérés mérhető, a különböző preparátumok és az eltérő kísérleti körülmények függvényében. Érdekes, hogy míg Hársing és mtsai. (2003) ugyanazon kísérleti rendszerben az NFPS és az Org 24461 között 100-szoros hatékonyságbeli eltérést mutattak ki, addig a retinában a 7-klór kinurénsav okozta SD gátlás felfüggesztése mind az NFPS, mind az Org 24461 esetében a 0.1-1 μM tartományba esett. Az SD-re gyakorolt hatás vizsgálata során azonban nem közvetlen glicin visszavétel gátlást mértünk, hanem azt, hogy a transzport blokkolása miatt megnövekedett mennyiségű glicin a 7-klór kinurénsav hatásának felfüggesztésén keresztül hogyan facilitálja az NMDA által kiváltott SD kialakulását. Az általunk választott 7-klór kinurénsav koncentráció (3 μM) elegendően magas volt ahhoz, hogy 100%-os SD gátlást okozzon (**16. ábra**), de elegendően alacsony, hogy ezt a gátlást a glicin koncentráció kismértékű növekedése (a glicin visszavétel enyhe gátlása esetén) is kompetitív módon könnyen felfüggeszthesse. A meredek koncentráció-hatás görbe is arra utal, hogy a glicin transzport gátlásával az SD potenciózó hatás nem egyenesen arányosan növekszik.

Az eltérő hatásmechanizmusú glicin transzporter gátló hatással (*Hársing és mtsai. 2003*), és a glicin kötőhelyen koagonista tulajdonsággal rendelkező (*Zhang et al., 2009*) szarkozin esetében az SD potenciózás a 100-1000 μM közötti koncentráció-tartományban jelentkezett.

Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk beállított rendszer mindenképpen alkalmas a glicin visszavétel gátlására vonatkozó hatékonyság kvalitatív kimutatására, és vegyületek tesztelésére. Az SD potenciózás hatékonyságával kapcsolatos mennyiségi adatokból azonban csak óvatosan vonhatók le következtetések a glicin transzporter gátló hatékonyságra vonatkozólag.

6.1.3. A deramciklán hatása az NMDA-val kiváltott SD-re

Kísérleteinkben a deramciklán, a memantin, az MK-801 és a CPP hatását hasonlítottuk össze csirke retinán NMDA-val kiváltott SD teszten. A deramciklán NMDA receptor antagonistá hatásáról Kovács és mtsai. (2000) közöltek először adatot. A szerzők feltételezése szerint a deramciklán az MK-801-hez hasonlóan gátolja az NMDA receptort patkány agykéreg homogenizátumban. Saját vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a csirke retinán NMDA-val kiváltott SD alkalmas-e az aktivitásfüggő gátlás, ill. a csapdázás jelenségének mérésére, és az antagonisták NMDA receptor gátló hatása közti különbség kimutatására. Negatív kontrollként a kompetitív antagonistá CPP-t alkalmaztuk, amellyel kapcsolatban nem ismeretes az aktivitásfüggő gátlás. Kísérleteinkben csökkentett Mg^{2+} -koncentráció (0.33 mM) mellett mind a négy vizsgált vegyület koncentráció-függő módon gátolta az SD-t. Az MK-801 esetében az első mérés (első SD kiváltás) esetben még a legmagasabb vizsgált koncentrációban sem mértünk számottevő gátlást. Az ismételt SD kiváltások során a deramciklán és a két ismert csatornablokkoló vegyület esetében egyaránt a koncentráció-hatás görbe jobbra tolódását, vagyis működésfüggő gátlásra utaló változást figyeltünk meg (Kertész és mtsai., 2005; Kertész és mtsai., közlésre elküldve).

Az MK-801 a nyitott csatornába bekötődő nem kompetitív NMDA receptor antagonistá vegyület (Huettnér és Bean, 1988). Hasonló tulajdonságokkal rendelkezik a memantin is (Chen és mtsai., 1992), amelynek az MK-801-gyel szemben ismert a terápiás hatékonysága kognitív funkciók leromlásával járó kórképekben (lásd 2.4.3. és 6.2. fejezet). Az NMDA receptor ioncsatornájába kötődő vegyületekkel kapcsolatban ismeretes a használat- vagy aktivitásfüggő ('use-dependent') gátlás, amely azt jelenti, hogy minél magasabb az agonista koncentrációja, vagyis minél többet van aktivált (nyitott) állapotban az ioncsatorna, annál jobban gátol az antagonistá (Huettnér és Bean, 1988). Az aktivitásfüggő gátló vegyületek esetében megfigyelt jelenség a csapdázás (trapping), amelynek során az antagonistá vegyület az agonista távollétében bezáruló ioncsatornába kötve marad. Az MK-801 esetében leírták, hogy hippokampális és kérgi idegsejtenyészetben végzett patch clamp mérésben 0.3 μM MK-801 10 perc előinkubációt követően nem okozott számottevő csökkenést az NMDA-áramban. Ezzel szemben sorozatos NMDA impulzusok hatására kialakult az MK-801 gátló hatása, amely még 20 perc

kimosás után sem csökkent számottevően (*Halliwel és mtsai., 1989*). A memantin esetében is ismert az aktivitásfüggő gátló hatás az NMDA receptoron. Az MK-801-re az jellemző, hogy szinte az összes gátló ioncsatornában bent marad (*Huettner és Bean, 1988*), míg a memantinál az adagolás időtartamától is függő részleges csapdázást (partial trapping) írtak le (*Blanpied és mtsai., 1997; Mealing és mtsai., 1999*). Kísérleteink alapján feltételezhető, hogy a deramciklánra is jellemző a csapdázás, tehát a deramciklán valószínűleg az ioncsatorna belsejébe köt az MK-801-hez és a memantinhoz hasonlóan. Egyben igazoltuk, hogy az NMDA-val kiváltott SD alkalmas a csapdázás jelenségének vizsgálatára, valamint ilyen tulajdonsággal bíró NMDA antagonistáknak vegyületek tesztelésére

6.2. A különböző glutamáterg vegyületek hatása a tárgyfelismerésre

Kísérleteink során az ionotróp glutamáterg rendszer működését befolyásoló anyagok, nevezetesen AMPA receptor pozitív modulátorok, glicin transzporter-1 gátló vegyületek, és a gyenge-közepes NMDA receptor antagonistáknak memantin, valamint az NMDA antagonistáknak tulajdonsággal rendelkező deramciklán prokognitív hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. Az AMPA receptor pozitív modulátorok, valamint a deramciklán esetében megvizsgáltuk, hogy a vegyületek az alkalmazott tesztkben hogyan befolyásolják az emlékezet kialakulásának szakaszait: az emléknem bevését, megszilárdulását és felidézését.

Az AMPA receptor modulátor S18986 és az aniracetam előkezeléssel (bevésés előtt adagolva) javította a tárgyfelismerést a kontroll állatokhoz képest (**20., 23. ábra**). Az aniracetam hatékony volt 10 és 30 mg/kg p.o. dózisban, az S 18986 esetében mindhárom vizsgált dózist (0.3-1-3 mg/kg, p.o.) prokognitív hatásának találtuk. Hasonlóan hatékonyak bizonyultak az EGIS saját fejlesztésű vegyületei is a vizsgált magasabb dózisban (10 mg/kg, p.o.) (**26., 27. ábra**). Lebrun és mtsai (2000) közleményében az S18986 hatása a bevésés előtti kezelés során már 0,3 mg/kg p.o. dózisban jelentkezett, az aniracetamot intraperitoneális kezelés után 10-100 mg/kg-ban találták hatékonyak. A saját vizsgálatainkban nyert adatok megerősítik a szakirodalomban közölt eredményeket, amennyiben az S 18986 és aniracetam hatékonyak mutatkoztak a memórianyom bevését megelőző kezelés során.

A bevésés utáni, és az előhívás előtti adagolást illetően az eredmények más képet mutatnak. Ha az ismert és új tárgy vizsgálatával eltöltött időket nézzük, az aniracetam esetében nem jelentkezett hatás a 30 mg/kg-os dózisban sem. Az S18986-ot pedig az előkezelés során mérthez képest (0.3 mg/kg) csak egy nagyságrenddel magasabb dózisban (3 mg/kg) találtuk hatékonynak (**21., 22. ábra**). Az egyes dózisosokhoz tartozó diszkriminációs indexeknek (DI) a kontroll csoporttal való összevetése során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Winters és Bussey (2005) tárgyfelismerés teszten nyert eredmények alapján leírták, hogy az AMPA receptorok szerepet játszanak az emléknem bevésésében, megszilárdulásában és előhívásában is. Azt is megfigyelték, hogy ha nem közvetlenül a bevésési szakasz után, hanem 40 perccel később történt az AMPA receptor antagonistá vegyület infúziója, akkor az semmilyen hatással nem volt az állatok teljesítményére. Tehát a konszolidáció folyamatában ez alatt a 40 perc alatt szükséges a perirhinális kéregben az ionotróp glutamát receptorok megfelelő működése. Winters és Bussey fenti kísérletében az anyagok infúziója közvetlenül a perirhinális kéregbe történt. Saját vizsgálatainkban viszont *per os* kezelést alkalmaztunk. Az S18986 1 mg/kg dózisa a plazmában 8 perccel, a hippocampusban és az agykéregben 30 perccel az orális adagolás után éri el a maximális koncentrációt (*Bourasset és mtsai., 2005*). Az aniracetam orális adagolást követően 20-30 perccel éri el a maximális plazma-koncentrációt (*Ogiso és mtsai., 1998*), de az agyi koncentráció alacsony a képződő, feltehetően hatékonyabb metabolitokhoz képest (*Ogiso és mtsai., 2000*). Az S 18986, ill. az aniracetam felszívódását figyelembe véve ez magyarázhatja, hogy a bevésés utáni adagolást követő prokognitív hatás miért nem jelentkezett alacsonyabb dózisban. Feltehető, hogy az adagolást követő 40 percen belül csak magasabb dózis esetén alakul ki a hatékony agyi koncentráció.

Az előhívást megelőző adagolás alacsonyabb hatékonyságát másban kell keresnünk. Saját kísérleteink és a szakirodalomban leírtak közötti lényeges különbség, hogy a legtöbb vizsgálat, mint a fent említett is (*Winters és Bussey, 2005*), glutamát receptor antagonisták alkalmazásával vizsgálja a memória kialakulásának fázisait. Az S 18986-tal végzett vizsgálaton kívül (*Lebrun és mtsai., 2000*) nem találtam információt arra vonatkozólag, hogy AMPA receptor pozitív modulátor anyagok hogyan befolyásolják a felismerési memória kialakulásának különböző fázisait normál, farmakológiailag vagy egyéb módon nem butított állatokban. Passzív elkerülési paradigmát és hosszú, 26 napos retenciót alkalmazva

Quillfeldt és mtsai. (1994) kísérletében az entorhinális kéregbe adagolt CNQX memóriarontó hatását kivédte az AMPA, de AMPA adagolása önmagában nem javította a memória előhívási teljesítményt. A patkányok már néhány órás retenciót követően is véletlenszerű teljesítményt nyújtanak tárgyfelismerés teszten (*Young és mtsai., 2008*). Saját kísérleti körülményeink között – a 24 órás retención felül feltehetően a vizsgálandó tárgyak közötti csekély különbségnek köszönhetően is (lásd **4.2.** fejezet) – a kontroll csoport szinte teljesen egyforma ideig explorálta az ismert és az új tárgyat, és a számolt DI értékek a 0-hoz közelítenek. Bár nagyon spekulatív a feltételezés, de elképzelhető, hogy ilyen esetben a bevésés előtti adagolás elegendően potenciózza a normális emléknym kialakulást ahhoz, hogy 24 óra múlva az állatok emlékezzenek a korábban látott tárgyra. Amikor a vegyület adagolására a retenció előtt kerül sor, akkor az előzőleg megfelelően ki nem alakult bevésés miatt az előhívás serkentése csak nagyobb dózisban, és/vagy kisebb javulást okoz a tárgyfelismerési teljesítményben. Továbbá, tapasztalataink szerint az alacsony DI értéket produkáló kontroll csoport mellett egy hatékony vegyülettel történő kezelés is csak alacsony, 0.2-0.3 közötti DI értéket eredményez (amely általában már statisztikai szignifikanciát eredményez, éppen az alacsony kontroll érték miatt). Az S18986 esetében a retenciót megelőző adagolás során a kontroll csoportban a szokásosnál valamivel magasabb értéket (0.12) kaptunk. Ezért, bár a 3 mg/kg dózissal kezelt csoportban szignifikánsan különbözött az ismert és az új tárgy vizsgálatával eltöltött idő, a kontroll csoporthoz viszonyítva a DI nem bizonyult szignifikánsnak (**22. ábra**).

Az előbbi feltételezéssel némileg ellentmondásban állónak tűnnek a deramciclánnal kapott eredmények, mert az S 18986-hoz és aniracetamhoz hasonló felszívódási adatok mellett (*Magyar és mtsai., 1998*) a deramciclán 30 mg/kg dózisban hatékonyan bizonyult bevésés után és előhívás előtt adagolva is (részletesen lásd alább). A deramciclán prokognitív hatásában azonban eredményeink szerint feltehetően a mérsékelt NMDA receptor gátló aktivitás játszik szerepet, nem pedig az AMPA receptor potenciózás.

A glicin transzporter-1 gátló NFPS és Org 24461 nem befolyásolta a tárgyfelismerést patkányban, bár az NFPS esetében, ha nem mértünk is szignifikáns eltérést, de mindhárom kezelt csoport esetében valamivel nagyobb az új tárgy vizsgálatával eltöltött idő a kontroll csoporthoz viszonyítva (**28., 29. ábra**). Az Org 24461 esetében a legalacsonyabb kezelt dózissal az explorációs időkben

kismértékű, de szignifikáns különbséget számoltunk, a DI azonban nem különbözött a kontroll csoport értékéhez képest. Egy nemrég közölt vizsgálatban az NFPS hatékonyan visszafordította az MK-801 okozta teljesítményromlást tárgyfelismerés tesztben (*Karasawa és mtsai., 2008*). Egy új, reverzibilis és kompetitív glicin transzporter gátló vegyület, az SSR504734 javította a munkamemóriát fiziológiás feltételek mellett egerekben (*Singer és mtsai., 2009*). Nem ismert azonban, hogy az NFPS vagy egyéb, irreverzibilis glicin transzporter gátló anyagok hogyan befolyásolják a farmakológiai vagy más beavatkozásokkal nem lerontott, élettani tanulási és/vagy felejtési folyamatokat felismerési memóriában. Előfordulhat, hogy saját kísérleti körülményeink között az NFPS magasabb dózisban prokognitív hatásúnak bizonyul, de a várható súlyos mellékhatások miatt (*Hársing és mtsai., 2006*) nem adagoltuk a vegyületet 10 mg/kg-nál nagyobb dózisban.

A gyenge-közepes NMDA antagonistá memantin a két nagyobb koncentrációban (10 és 30 mg/kg, p.o.) javította a patkányok tárgyfelismerését (**30. ábra**). Azonos dózistartományban vizsgálva a deramciklán hasonlóan viselkedett, de csak az alkalmazott legnagyobb dózisban (30 mg/kg, p.o.) mértünk statisztikailag kimutatható javulást a kísérleti állatok teljesítményében (**31. ábra**). Ebben a dózisban a deramciklán a bevésés után, ill. az előhívás előtt adagolva is fokozta a tárgyfelismerést a kontroll csoporthoz képest. NMDA antagonistá vegyületekkel végzett számos vizsgálat igazolta az NMDA receptorok szerepét a felismerési memória folyamatában a bevésés és a konsolidáció szakaszában (*de Lima és mtsai., 2005; Pitsikas és mtsai., 2008; Puma és mtsai., 1998; Puma és Bizot, 1998; Sargolini és mtsai., 2003; Winters és Bussey, 2005*). Kevés tanulmány tárgyalja azonban az NMDA receptorok közreműködését specifikusan az előhívási szakaszban, és az eredmények nem egyértelműek. A közölt adatok összehasonlítása nehéz az eltérő kísérleti elrendezés, adagolás módja, helye, a más-más előkezelési idő, és a vizsgált állatfajok közti különbségek miatt. A kompetitív antagonistá AP-5 infúziója a perirhinális kéregbe retenció előtt nem befolyásolta az emléknym előhívását patkányban (*Winters és Bussey, 2005*). Ezzel ellentétben MK-801 szisztémás, intraperitoneális injekciója egerekben megnövelte az új tárgy explorációjával eltöltött időt (*Nilsson és mtsai., 2007*). Az AP-5 dózistól függő ellentétes hatását mutatták ki patkányban. Az AP-5 intraseptális infúziója nagyobb dózisban (8 nM) a tárgyfelismerés romlását eredményezte (*Puma és mtsai., 1998*)

míg alacsonyabb dózisban (2nM) javulást mértek, függtlenül attól, hogy bevésés előtt, után vagy az előhívást megelőzően történt az infúzió (*Puma és Bizot, 1998*).

A memantin prokognitív hatására vonatkozó adatok sem egyértelműek, ha csupán a tárgyfelismerést tekintjük. Kimutatták, hogy a memantin visszafordítja az oxidatív stressz okozta és a korral járó memóriaromlást patkányban (*Pietá Dias és mtsai., 2007*), ugyanakkor nem befolyásolta a memória kialakulását különféle tanulási tesztekben, beleértve a felismerési memóriát (*Réus és mtsai., 2008*). Pitsikas és Sakellaridis (*2007*) azonban úgy találták, hogy intraperitoneális adagolást követően a memantin javította a kezelt állatok teljesítményét a kontroll csoporthoz képest. Ezzel az eredménnyel egyezők saját adataink is, amelyek azt mutatják, hogy a memantin *per os* kezelést követően is előnyösen hat a normál, élettani memória-folyamatokra tárgyfelismerés teszten. Hasonlóképpen hatékony vegyületnek találtuk a deramciclánt is. A deramciclánra vonatkozó vizsgálatainkról közleményben számoltunk be (*Kertész és mtsai., közlésre elküldve*)

A központi idegrendszer folyamatait a glutamáterg rendszer működésén keresztül befolyásoló ligandok hatását, ezen belül is a tanulás és emlékezés változását számtalan tanulmány tárgyalja. A glutaminsavnak és exogén, funkcionális analogonjainak a térbeli és nem térbeli, procedurális és deklaratív folyamatokban, spontán, ill. tanulóssal, kondicionálással kapcsolatos emlékezésben betöltött szerepe ma is intenzív kutatási terület. Saját vizsgálataim eredményeinek tárgyalásán keresztül – egyszerűen terjedelmi okokból is – ennek a hatalmas területnek csupán egy aprócska részletét járhattam be. Annyi azonban a tárgyfelismerés teszten nyert eredményekből is kitűnik, hogy az általunk vizsgált, glutamáterg hatással rendelkező vegyületcsoportok lényegesen különböznek a memóriára kifejtett hatásukban. A glicin transzporter gátló anyagoknál, amelyek közvetve serkentik az NMDA receptor működését, nem tapasztaltunk javulást az állatok emlékezetében. Az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületek elsősorban a memórianyom bevésését segítették elő, kevésbé hatottak a további szakaszokban. Az NMDA receptor gátlása általában a tanulás romlásával jár. Az enyhe-közepes receptor affinitással és specifikus kinetikájú NMDA gátló tulajdonsággal rendelkező memantin, valamint az EGIS Gyógyszergyár által fejlesztett deramciclán azonban javulást idéztek elő a kísérleti állatok memóriájában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ionotróp glutamáterg rendszer működésére ható vegyületek vizsgálatára az EGIS Gyógyszergyárban beállítottuk a tovaterjedő depolarizáció (SD) csirke retinán kiváltott *in vitro* modelljét. Specifikus AMPA (ciklotiazid) és kainát (concanavalin A) receptor ligandok alkalmazásával kimutattuk, hogy az AMPA-val kiváltott SD kialakulásában elsősorban az AMPA receptor játsza az elsődleges szerepet, a kainát receptor csak kismértékben járul hozzá a folyamathoz. Az irodalomban elsőként írtuk le az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületeknek az SD-re gyakorolt hatását (*Kertész és mtsai., 2004*). A pozitív modulátor vegyületeknek egymással, illetve a receptort negatívan moduláló GYKI 52466-tal való interakcióját vizsgálva az alábbi megfigyeléseket tehetjük: 1, A pozitív modulátor vegyületek azon koncentrációban, amelyben kb. 50 %-os mértékben potenciózták az AMPA-val kiváltott SD-t, a GYKI 52466 koncentráció-hatás görbáját kompetitív jelleggel, de eltérő mértékben tölték jobbra; 2, A pozitív modulátorok egymással való kölcsönhatásának jellegét – addíció, ill. annak hiánya – elsődlegesen nem a vegyületek szerkezeti rokonsága határozta meg.

Eredményeink (*Kertész és mtsai., 2004*) összhangban vannak a szakirodalomban közölt adatokkal, amennyiben közvetve arra utalnak, hogy:

1) a pozitív és negatív modulátor vegyületek AMPA receptorhoz kapcsolódásában legalább részben ugyanazon kötőhelyek játszanak szerepet, amelyeken a pozitív és negatív modulátorok kompetitív módon befolyásolják egymás kötődését;

2) a pozitív modulátorok kötődésében pedig önmagában a szoros szerkezeti rokonság nem jelent azonos kötőhelyet, esetükben több allosztérikus helyet feltételezhetünk.

Az EGIS Gyógyszergyárban új szerkezetű AMPA receptor pozitív és negatív modulátor vegyületek kifejlesztésében vettünk részt.

Igazoltuk, hogy a csirke retinán mért SD alkalmas az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) gátló anyagok kvalitatív, szemikvantitatív vizsgálatára; az ilyen típusú anyagok gyógyszerfejlesztési célzatú szűrővizsgálatára.

Csirke retina preparátumon összevetettük a deramciklán (EGIS-3886) NMDA receptor gátló hatását az ioncsatorna gátló MK-801 és memantin, valamint a kompetitív antagonistá CPP hatásával. Kimutattuk, hogy a deramciklán, a csatornagátló vegyületekhez hasonlóan, aktivitásfüggő módon gátolja az NMDA receptor működését, míg a CPP esetében az SD gátló hatás jellege eltért a deramciklán, a memantin és az MK-801 hatásának jellegétől.

Patkány tárgyfelismerés teszten *in vivo* végzett vizsgálatokban a szakirodalomban leirtakkal megegyezően azt találtuk, hogy az AMPA receptor működését serkentő, pozitív modulátor vegyületek memória fokozó hatásúak. Az aniracetam és a ciklotiazid esetében kimutattuk, hogy a memórianyom kialakulásának különböző fázisait különböző mértékben befolyásolják a vegyületek: a leghatékonyabban a bevézés szakaszát, kisebb mértékben a konszolidáció és az előhívás folyamatát potenciózzák.

Kísérleti körülményeink között az NMDA receptor működésére pozitívan ható, GlyT1 gátló vegyületek nem bizonyultak memória-serkentőnek..

A szakirodalomban elsőként közöltünk adatot arról, hogy a deramciklán javítja a patkányok memóriáját tárgyfelismerés teszten (*Kertész és mtsai., közlésre elküldve*). Azt találtuk, hogy a deramciklán az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületektől eltérően egyformán hatott a memórianyom bevézésére, konszolidációjára és előhívására. A tárgyfelismerés teszten nyert adataink alapján azt a feltételezést tettük, hogy a deramciklán prokognitív hatásában – a memantinhoz hasonlóan – feltehetően szerepet játszanak a vegyület NMDA receptor gátló tulajdonságának jellegzetességei.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Allen, J.W.; Ivanova, S.A.; Fan, L.; Espey, M.G.; Basile, A.S.; Faden, A.I. (1999) Group II metabotropic glutamate receptor activation attenuates traumatic neuronal injury and improves neurological recovery after traumatic brain injury. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **290**: 112-120.

Allen, R.M.; Young, S.J. (1978) Phencyclidine-induced psychosis. *American Journal of Psychiatry* **135**:1081-1084.

Alzheimer's Association (2008) 2008 Alzheimer's Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* **4**:110-133.

Anson, L.C.; Chen, P.E.; Wyllie, D.A.; Colquhoun, D.; Schoepfer, R. (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience* **18**:581-589.

Arai, A.C.; Kessler, M.; Rogers, G.; Lynch, G. (2000) Effects of the potent ampakine CX614 on hippocampal and recombinant AMPA receptors: interactions with cyclothiazide and GYKI 52466. *Molecular Pharmacology* **58**:802-813.

Arai AC, Kessler M. (2007) Pharmacology of ampakine modulators: from AMPA receptors to synapses and behavior. *Current Drug Targets* **8**:583-602.

Arai, A.; Lynch, G. (1998) The waveform of synaptic transmission at hippocampal synapses is not determined by AMPA receptor desensitisation. *Brain Research* **799**:230-234.

Arai, A.; Xia, Y.F.; Kessler, M.; Phillips, D.; Chamberlin, R.; Granger, R.; Lynch, G. (2002) Effects of 5'-alkyl-benzothiadiazides on (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor biophysics and synaptic responses. *Molecular Pharmacology* **62**:566-577.

Ábrahám, G.; Sólyom, S.; Csuzdi, E.; Berzsenyi, P.; Ling, I.; Tarnawa, I.; Hámori, T.; Pallagi, I.; Horváth, K.; Andrási, F.; Kapus, G.; Hársing Jr., L.G.; Király, I.; Patthy, M.; and Horváth, G. (2000) New non-competitive AMPA antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8**:2127-2143.

Bast, T.; da Silva, B.M.; Morris, R.G.M. (2005) Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *The Journal of Neuroscience* **25**:5845–5856.

Beart, P.M.; O'Shea, R.D. (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British Journal of Pharmacology* **150**:5-17.

Bergeron, R.; Meyer, T.M.; Coyle, J.T.; Greene, R.W. (1998) Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:15730-15734.

Bertolino, M.; Baraldi, M.; Parenti, C.; Braghiroli, D.; DiBella, M.; Vicini, S. Costa, E. (1993) Modulation of AMPA/kainate receptors by analogues of diazoxide and cyclothiazide in thin slices of rat hippocampus. *Receptors and Channels* **1**:267-278.

Black, M.D. (2005) Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data. *Psychopharmacology* **179**:154-163.

- Black, M.D.; Vasty, G.B.; Arad, M.; Barak, S.; De Levie, A.; Boulay, D.; Pichat, P.; Griebel, G.; Weiner, I. (2009) Procognitive and antipsychotic efficacy of glycine transport 1 inhibitors (GlyT1) in acute and neurodevelopmental models of schizophrenia: latent inhibition studies in the rat. *Psychopharmacology* **202**:385-396.
- Blanpied, T.A.; Boeckman, F.A.; Aizenman, E.; Johnson, J.W. (1997) Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of Neurophysiology* **77**:309-323.
- Bliss T.V.P.; Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* **232**:331-356.
- Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-39.
- Bouton, M.E.; Mineka, S.; Barlow, D.H. (2001) A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychological Review* **108**:4-32.
- Bourasset, F.; Bernard, K.; Muñoz, C.; Genissel, P.; Scherrmann, J.M. (2005) Neuropharmacokinetics of a new α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) modulator, S18986 [(S)-2,3-dihydro-[3,4]cyclopentano-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide], in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:1137-1143.
- Braak, H.; Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* **82**:239-259.
- Braghiroli, D.; Puia, G.; Cannazza, G.; Tait, A.; Parenti, C.; Losi, G.; Baraldi, M. (2002) Synthesis of 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives as potential allosteric modulators of AMPA/kainate receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**:2355-2357.
- Brasnjo, G.; Otis, T.S. (2001) Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. *Neuron* **31**: 607-616.
- Buckley, M.J.; Gaffan, D. (1998) Perirhinal cortex ablation impairs visual object identification. *The Journal of Neuroscience* **18**:2268-2275.
- Chatterton, J.E.; Awobuluyi, M.; Premkumar, L.S.; Takahashi, H.; Talantova, M.; Shin, Y.; Cui, J.; Tu, S.; Sevarino, K.A.; Nakanishi, N.; Tong, G.; Lipton, S.A.; Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**:793-798.
- Chen, H.S.V.; Pellegrini, J.W.; Aggarwal, S.K.; Lei, S.Z.; Warach, S.; Jensen, F.E.; Lipton, S.A. (1992) Open-channel block of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* **12**:4427-4436.
- Chen, H.S.V.; Lipton, S.A. (1997) Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *The Journal of Physiology* **499**:27-46.

- Chrobak, J.J.; Hinman, J.R.; Sabolek, H.R. (2008) Revealing past memories: proactive interference and ketamine-induced memory deficits. *The Journal of Neuroscience* **28**:4512-4520.
- Clements, J.D. (1996). Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends in Neurosciences* **19**, 163-171.
- Cohen, E.D. (2000) Light-evoked excitatory synaptic currents of X-type retinal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology* **83**:3217-3229.
- Collingridge, G.C.; Kehl, S.J.; McLennan, H. (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* **334**:33-46.
- Contractor, A.; Swanson, G.; Heinemann, S.F. (2001) Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **29**:209-216.
- Cristovao, A.J.; Oliveira C.R.; Carvalho, C.M. (2002a) Expression of AMPA/kainate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *International Journal of Developmental Neuroscience* **20**:1-9.
- Cristovao, A.J.; Oliveira C.R.; Carvalho, C.M. (2002b) Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Molecular Brain Research* **99**:125-133.
- Cubelos, B.; Gimenez, C.; Zafra, F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral Cortex* **15**:448-459.
- Curtis, D.R.; Watkins, J.C. (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *Journal of Neurochemistry* **6**:117-141.
- Davies, J.; Watkins, J.C. (1981) Differentiation of kainate and quisqualate receptors in the cat spinal cord by selective antagonism with gamma-D(and L)-glutamylglycine. *Brain Research* **206**:172-177.
- Davis, S.; Butcher, S.P.; Morris, R.G.M. (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP-5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *The Journal of Neuroscience* **12**:21-34.
- Dahlem, M.A. Müller, S.C. (2000) Image processing techniques applied to excitation waves in the chicken retina. *Methods* **21**:317-323.
- Danysz, W.; Parsons, C.G. (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacological Reviews* **50**:597-664.
- Day, M.; Langston, R.; Morris, R.G.M. (2003) Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* **424**:205-209.
- de Lima, M.N.M.; Laranja, D.C.; Bromberg, E.; Roesler, R.; Schröder, N. (2005) Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research* **156**:139-143.

- Dere, E.; Huston, J.P.; De Souza Silva, M.A. (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **31**:673-704.
- Desai, M.A.; Valli, M.J.; Monn, J.A.; Schoepp, D.D. (1995) 1-β-BCP, a memory-enhancing agent, selectively potentiates AMPA-induced [³H]norepinephrine release in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* **34**:141-147.
- DeVries, S.H.; Schwartz, E.A. (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and 'Off' bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* **397**:157-160.
- Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* **51**:7-61.
- do Carmo, R.J.; Martins-Ferreira, H. (1984) Spreading depression of Leão probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **56**:401-421.
- Drejer, J.; Sheardown, M.; Nielsen, E.O.; Honoré, T. (1989) Glycine reverses the effect of HA-966 on NMDA responses in cultured rat cortical neurons and in chick retina. *Neuroscience Letters* **98**:333-338.
- Ennaceur, A.; Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I.: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* **31**:47-59.
- Eulenburg, V.; Wencke, A.; Betz, H.; Gomeza, J. (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in Biochemical Sciences* **30**:325-333.
- Falls, W.A.; Miserendino, M.J.; Davis, M. (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *The Journal of Neuroscience* **12**:854-863.
- Fisahn, A. (2005) Kainate receptors and rhythmic activity in neuronal networks: hippocampal gamma oscillations as a tool. *The Journal of Physiology* **562**:65-72.
- Ghosh, K.K.; Haverkamp, S. Wässle, H. (2001) Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina, *The Journal of Neuroscience* **21**:8636-8647.
- Gigler, G.; Móricz, K.; Ágoston, M.; Simó, A.; Albert, M.; Benedek, A.; Kapus, G.; Kertész, S.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Markó, B.; Szabó, G.; Matucz, E.; Gacsályi, I.; Lévy, G.; Hársing Jr, L.G.; Szénási, G. (2007) Neuroprotective and anticonvulsant effects of EGIS-8332, a non-competitive AMPA receptor antagonist, in a range of animal models. *British Journal of Pharmacology* **152**:151-160.
- Goldman-Rakic, P.S. (1987) Circuitry of primate prefrontal cortex and regulation of behavior by representational memory. In: *Handbook of Physiology Vol 5(1)*. Ed. Plum, F. American Physiological Society, Bethesda, MD; pp. 373-417.
- Gorelova, N.A.; Koroleva, V.I.; Amemori, T.; Pavlik, V.; Bures, J. (1987) Ketamine blockade of cortical spreading depression of rats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* **66**:440-447.
- Gouras, P. (1958) Spreading depression of activity in amphibian retina. *American Journal of Physiology* **195**:28-32.

- Grassi, S.; Frondaroli, A.; Pettorossi, V.E. (2002) Different metabotropic glutamate receptors play opposite roles in synaptic plasticity of the rat medial vestibular nuclei. *The Journal of Physiology* **543**:795-806.
- Halliwel, R.F.; Peters, J.A.; Lambert, J.J. (1989) The mechanism of action and pharmacological specificity of the anticonvulsant NMDA antagonist MK-801: a voltage clamp study on neuronal cells in culture. *British Journal of Pharmacology* **96**: 480-494.
- Harada, T.; Harada, C.; Sekiguchi, M.; Wada, K. (1998) Light-induced retinal degeneration suppresses developmental progression of flip-to-flop alternative splicing in GluR1. *The Journal of Neuroscience* **18**:3336–3343.
- Hársing, L.G., Jr.; Gacsályi, I.; Szabó, G.; Schmidt, É.; Sziray, N.; Sebban, C.; Tesolin-Decros, B.; Mátyus, P. Egyed., A.; Spedding, M.; Lévy, G. (2003) The glycine transporter-1 inhibitors NFPS and Org 24461: a pharmacological study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **74**:811-825.
- Hársing, L.G., Jr.; Jurányi, Z.; Gacsályi, I.; Tapolcsányi, P.; Czompa, A.; Mátyus, P. (2006) Glycine transporter Type-1 and its inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* **13**:1017-1044.
- Hayashi, T. (1954) Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal of Medicine* **3**:183-192.
- Hebb, D.O. (1949) *The Organization of Behaviour*. Wiley, New York.
- Hebert, L.E.; Scherr, P.A.; Bienas, J.L. Bennett, D.A.; Evans, D.A. (2003) Alzheimer disease in the US population: Prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology* **60**:1119-1122.
- Hollmann, M.; Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Reviews in Neuroscience* **17**:31-108.
- Hösli L, Hösli E, Lehmann R, Eng P. Effects of the glutamate analogue AMPA and its interaction with antagonists on cultured rat spinal and brain stem neurones. *Neuroscience Letters* **36**:59-62.
- Huang, H.; Luo, D.G.; Shen, Y.; Zhang, A.J.; Yang R.; Yang, X.L. (2004) AMPA receptor is involved in transmission of cone signal to On bipolar cells in carp retina, *Brain Research* **1002**:86-93.
- Huerta, P.T.; Sun, L.D.; Wildon, M.A.; Tonegawa, S. (2000) Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* **24**:473–480.
- Huettnner, J.E.; Bean, B.P. (1988) Block of *N*-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:1307-1311.
- Ito, M. (1986) Long-term depression as a memory process in the cerebellum. *Neuroscience Research* **3**:531-539.
- Ito, I.; Tanabe, S.; Kohda, A.; Sugiyama, H. (1990) Allosteric potentiation of quisqualate receptors by a nootropic drug aniracetam. *The Journal of Physiology* **424**:533-543.
- Jacoby, R.A. Wu, S.M. (2001) AMPA-preferring receptors mediate excitatory non-NMDA responses of primate retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience* **18**:703-710.

Jin, R.; Clark, S.; Weeks, A.M.; Dudman, J.T.; Gouaux, E.; Partin, K.M. (2005) Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors. *The Journal of Neuroscience* **25**:9027-9036.

Johansen, T.H.; Chaudhary, A.; Verdoorn, T.A. (1995) Interactions among GYKI-52466, cyclothiazide and aniracetam at recombinant AMPA and kainate receptors. *Molecular Pharmacology* **48**:946-955.

Kano, M.; Kato, M. (1987) Quisqualate receptors are specifically involved in cerebellar synaptic plasticity. *Nature* **325**:276-279.

Kapus, G.; Bódi, I.; Pataki, Á.; Gueritaud, J.P.; Székely, J.I.; Tarnawa, I. (2000) Differential modulation of the GYKI 53784-induced inhibition of AMPA currents by various AMPA-positive modulators in cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Pharmacology* **397**:43-47.

Kapus, G.; Kertész, S.; Gigler, G.; Simó, A.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Hársing Jr, L.G.; Szabó, G.; Lévy, G. (2004) Comparison of the AMPA antagonist action of new 2,3 benzodiazepines *in vitro* and their neuroprotective effects *in vivo*. *Pharmaceutical Research* **21**:317-323.

Kertész, S.; Kapus, G.; Lévy, G. (2004) Interactions of allosteric modulators of AMPA/kainate receptors on spreading depression in the chicken retina. *Brain Research* **1025**:123-129.

Kertész, S.; Végh, M.; Kapus, G.; Kovács, G.; Lévy, G. (2005) Deramciclone (EGIS-3886) negatively modulates N-methyl-D-aspartate receptor function *in vitro*. *European Neuropsychopharmacology* **15**:S636.

Kertész, S.; Kapus, G.; Gacsályi, I.; Lévy, G. Deramciclone improves object recognition in rats: potential role of NMDA receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; Közlésre benyújtva

Karasawa, J.; Hashimoto, K.; Chaki, S. (2008) D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. *Behavioural Brain Research* **186**:78-83.

Kessler, M.; Arai, A.; Quan, A.; Lynch, G. (1996) Effect of cyclothiazide on binding properties of AMPA-type glutamate receptors: lack of competition between cyclothiazide and GYKI 52466. *Molecular Pharmacology* **49**:123-131.

Kew, J.N.C.; Kemp, J.A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **179**:4-29.

Komlósi S., Czobor P., Bitter I. (2007) A szkizofréniában tapasztalható neuropszichológiai deficit mérése: A MATRICS neuropszichológiai tesztsomag ismertetése. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* **IX**:143-150.

Kovács, I.; Szárics, E.; Skuban, N.; Kardos, J. (2000) Deramciclone inhibits N-methyl-D-aspartate receptor function. *Brain Research Bulletin* **52**:39-44.

Lahti, A.C.; Weiler, M.A.; Tamara Michaelidis, B.A.; Parwani, A.; Tamminga, C.A. (2001) Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* **25**:455-467.

- Lane, H.Y.; Chang, Y.C.; Liu, Y.C.; Chiu, C.C.; Tsai, G.E. (2005) Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Archives of General Psychiatry* **62**:1196-1204.
- Lane, H.Y.; Liu, Y.C.; Huang, C.L.; Chang, Y.C.; Liao, C.H.; Perng, C.H.; Tsai, G.E. (2008) Sarcosine (N-methylglycine) treatment for acute schizophrenia: a randomized, double-blind study. *Biological Psychiatry* **63**:9-12.
- Lauritzen, M.; Rice, M.E.; Okada, Y.; Nicholson, C. (1988) Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Research* **475**:317-327.
- Lauterborn, J.C.; Truong, G.S.; Baudry, M.; Bi, X.; Lynch, G.; Gall, C.M. (2003) Chronic elevation of brain-derived neurotrophic factor by ampakines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **307**:297-305.
- Leão, A.A.P. (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* **7**:359-390.
- Lebrun, C.; Pillière, E.; Lestage, P. (2000) Effects of S19896-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats. *European Journal of Pharmacology* **401**:205-212.
- Ledgerwood, L.; Richardson, R.; Cranney, J. (2005) D-cycloserine facilitates extinction of learned fear: effects on reacquisition and generalized extinction. *Biological Psychiatry* **57**:841-847.
- Leever, J.D.; Clark, S.; Weeks, A.M.; Partin, K.M. (2003) Identification of a site in GluR1 and GluR2 that is important for modulation of deactivation and desensitization. *Molecular Pharmacology* **64**:5-10.
- Lerma, J.; Paternain, A.V.; Rodríguez-Moreno, A.; López-García, J.C. (2001) Molecular physiology of kainate receptors. *Physiological Reviews* **81**:971-998.
- Levy, L.M.; Warr, O.; Attwell, D. (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na-dependent glutamate uptake. *The Journal of Neuroscience* **18**:9620-9628.
- Lockhart, B.; Iop, F.; Closier, M.; Lestage, P. (2000) (S)-2,3-dihydro-[3,4]cyclopentano-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide: (S19896-1) a positive modulator of AMPA receptors enhances (S)-AMPA-mediated [3H]noradrenaline release from rat hippocampal and frontal cortex slices. *European Journal of Pharmacology* **401**:145-153.
- Löscher, W.; Fredow, G.; Ganter, M. (1991) Comparison of pharmacodynamic effects of the non-competitive NMDA receptor antagonists MK-801 and ketamine in pigs. *European Journal of Pharmacology* **192**:377-382.
- Lukasiewicz, P.D.; Wilson, J.A.; Lawrence, J.E. (1997) AMPA-preferring receptors mediate excitatory synaptic input to retinal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology* **77**:57-64.
- Lynch, G.; Granger, R.; Ambros-Ingerson, J.; Davis, C.M.; Kessler, M.; Schehr, R. (1997) Evidence that a positive modulator of AMPA-type glutamate receptors improves delayed recall in aged humans. *Experimental Neurology* **145**:89-92.

- Magyar, K.; Lengyel, J.; Klebovich, I.; Urmös, I.; Grézal, G. (1998) Distribution of deramciclane (EGIS-3886) in rat brain regions. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **23**:125-131.
- Manahan-Vaughan, D.; Wildförster, V.; Thomsen, C. (2008) Rescue of hippocampal LTP and learning deficits in a rat model of psychosis by inhibition of glycine transporter-1 (GlyT1) *European Journal of Neuroscience* **28**:1342-1350.
- Marder, S.R.; Fenton, W.; Youens, K. (2004). Schizophrenia, IX: Cognition in schizophrenia—The MATRICS initiative. *American Journal of Psychiatry* **161**:25.
- Marranes, R.; Willems, R.; De Prins, E.; Wauquier, A. (1988) Evidence for a role of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat, *Brain Research* **457**:226-240.
- Martina, M.; Gorfinkel, Y.; Halman, S.; Lowe, J.A.; Periyalwar, P.; Schmidt, C.J.; Bergeron, R. (2004) Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *The Journal of Physiology* **557**:489-500.
- Martins-Ferreira, H. de Oliveira Castro, G. (1966) Light scattering changes accompanying spreading depression in isolated chick retina, *Journal of Neurophysiology* **29**:715-726.
- Martins-Ferreira, H.; Ribeiro, L.J.; do-Carmo, R.J. (1993) Threshold determination of spreading depression evoking substances in the retina in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **26**:875-877.
- Martins-Ferreira, H.; Nedergaard, M.; Nicholson, C. (2000) Perspectives on spreading depression. *Brain Research Reviews* **32**:215-234.
- Mattson, M.P.; Magnus, T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews. Neuroscience* **7**:278-294.
- McHugh, T.J.; Blum, K.I.; Tsien, J.Z.; Tonegawa, S.; Wilson, M.A. (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* **87**:1339-1349.
- Mealing, G.A.R.; Lanthorn, T.H.; Murray, C.L.; Small, D.L.; Morley, P. (1999) Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive *N*-methyl-D-aspartic acid receptor antagonists with similar kinetics of block. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**:204-210.
- Meunier, M.; Bachevalier, J.; Mishkin, M.; Murray, E.A. (1993) Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in Rhesus monkeys. *The Journal of Neuroscience* **13**:5418-5432.
- Mitchell, T.W.; Mufson, E.J.; Schneider, J.A.; Cochran, E.J.; Nissanov, J.; Han, L.Y.; Bienias, J.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q.; Bennett, D.A.; Arnold, S.E. (2002) Parahippocampal tau pathology in healthy aging, mild cognitive impairment, and early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* **51**:182-189.
- Morris, R.G.M.; Anderson, A.; Lynch, G.S.; Baudry, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP-5. *Nature* **319**:774-776.

- Müller, M.; Somjen, G. (2000) Na⁺ and K⁺ concentrations, extra- and intracellular voltages and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* **83**:735-745.
- Nakajima, Y.; Iwakabe, H.; Akazawa, C.; Nawa, H.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Nakanishi, S. (1993) Molecular characterisation of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:11868-11873.
- Nakazawa, K.; Quirk, M.C.; Chitwood, R.A.; Watanabe, M.; Yeckel, M.F.; Sun, L.D.; Kato, A.; Carr, C.A.; Johnston, D.; Wilson, M.A.; Tonegawa, S. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**:211–218.
- Nellgård, B.; Wieloch, T. (1992) NMDA-receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica* **146**:497-503.
- Nelson, P.T.; Braak, H.; Markesbery, W.R. (2009) Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer Disease: a complex but coherent relationship. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **68**:1-14.
- Newcomer, J.W.; Farber, N.B.; Jevtovic-Todorovic, V.; Selke, G.; Melson, A.K.; Hershey, T.; Craft, S.; Olney, J.W. (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* **20**:106-118.
- Neyman, S.; Manahan-Vaughan, D. (2008) Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *European Journal of Neuroscience* **27**:1345-1352.
- Nieuwenhuys, R. (1994) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anatomy and Embryology* (Berlin) **190**:307–337.
- Nilsson, M.; Hansson, S.; Carlsson, A.; Carlsson, M.L. (2007) Differential effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice. *Neuroscience* **149**:123-130.
- Nishi, M.; Hinds, H.; Lu, H.P.; Kawata, M.; Hayashi, Y. (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *The Journal of Neuroscience* **21**:RC185.
- Obrenovitch, T.P.; Zilkha, E. (1995) High extracellular potassium, and not extracellular glutamate is required for the propagation of spreading depression. *Journal of Neurophysiology* **73**:2107-2114.
- Obrenovitch, T.P.; Zilkha, E. (1996) Inhibition of cortical spreading depression by L-701,324, a novel antagonist at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *British Journal of Pharmacology* **117**:931-937.
- Obrenovitch, T.P.; Hardy, A.M.; Urenjak, J. (1997) High extracellular glycine does not potentiate N-methyl-D-aspartate-evoked depolarization in vivo. *Brain Research* **746**:190-194.
- Ogiso, T.; Iwaki, M.; Tanino, T.; Ikeda, K.; Paku, T.; Horibe, Y.; Suzuki, H. (1998) Pharmacokinetics of aniracetam and its metabolites in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87**:594-598.

- Ogiso, T.; Uchiyama, K.; Suzuki, H.; Yoshimoro, M.; Tanino, T.; Iwakai, M.; Uno, S. (2000) Pharmacokinetics of aniracetam and its metabolites in rat brain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **23**:482-486.
- O'Neill, M.J.; Dix, S. (2007) AMPA receptor potentiators as cognitive enhancers. *IDrugs* **10**:185-192.
- Papp, M.; Moryl, E. (1994) Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *European Journal of Pharmacology* **263**:1-7.
- Park, Y.; Jo, J.; Isaac, J.T.; Cho, K. (2006) Long-term depression of kainate receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* **49**:95-106.
- Parsons, C.G.; Stöffler, A.; Danysz, W. (2007) 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* **53**:699-723.
- Partin, K.M.; Patneau, D.K.; Winters, C.A.; Mayer M.L.; Buonanno, A. (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* **11**:1069-1082.
- Partin, K.M.; Mayer, M.L. (1996) Negative allosteric modulation of wild-type and mutant AMPA receptors by GYKI 53655. *Molecular Pharmacology* **49**:142-148.
- Partin, K.M.; Fleck, M.W.; Mayer, M.L. (1996) AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam and thiocyanate. *The Journal of Neuroscience* **16**:6634-6647.
- Paternain, A.V.; Morales, M.; Lerma, J. (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* **14**, 185-189.
- Paternain, A.V.; Vicente, A.; Nielsen, E.O.; Lerma, J. (1996) Comparative antagonism of kainate-activated kainite and AMPA receptors in hippocampal neurons. *The European Journal of Neuroscience* **8**:2129-2136.
- Peixoto, N.L.V.; Fernandes de Lima, V.M.; Hanke, W. (2001) Correlation of the electrical and intrinsic optical signals in the chicken spreading depression phenomenon. *Neuroscience Letters* **299**:89-92.
- Pietá Dias, C.; de Lima, M.N.M.; Presti-Torres, J.; Dornelles, A.; Garcia, V.A.; Siciliani Scalco, F.; Rewsaat Gumiarães, M.; Constantion, L.; Budni, P.; Dal-Pizzol, F.; Schröder, N. (2007) Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* **146**:1719-1725.
- Pin, J.P.; Duvoisin, R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**:1-26.
- Pitsikas, N.; Boultsadakis, A.; Sakellariadis, N. (2008) Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience* **154**:454-460.
- Porrino, L.J.; Daunais, J.B.; Rogers, G.A.; Hampson, R.E.; Deadwyler, S.A. (2005) Facilitation of task performance and removal of the effects of sleep deprivation by an Ampakine (CX717) in nonhuman primates. *PLoS Biology* **3**:e299. (1639-1652.)

- Puma, C.; Baudoin, C.; Bizot, J.C. (1998) Effects of intraseptal infusions of NMDA receptor ligands on memory in an object recognition task in rats. *Neuroscience Letters* **244**:97-100.
- Puma, C.; Bizot, J.C. (1998) Intraseptal infusions of a low dose of AP-5, a NMDA receptor antagonist, improves memory in an object recognition task in rats. *Neuroscience Letters* **248**:183-186.
- Pitsikas, N.; Sakellaridis, N. (2007) Memantine and recognition memory: Possible facilitation of its behavioral effects by the nitric oxide (NO) donor molsidomine. *European Journal of Pharmacology* **571**:174-179.
- Pittaluga, A.; Bonfanti, A.; Arvigo D.; Raiteri, M. (1999) Aniracetam, 1-BCP and cyclothiazide differentially modulate the function of NMDA and AMPA receptors mediating enhancement of noradrenaline release in rat hippocampal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **359**:272-279.
- Pow, D.V.; Hendrickson, A.E. (1999) Distribution of the glycine transporter glyt-1 in mammalian and nonmammalian retinæ. *Visual Neuroscience* **16**:231-239.
- Ptak, C.P.; Ahmed, A.H.; Oswald, R.E. (2009) Probing the allosteric modulator binding site of GluR2 with thiazide derivatives. *Biochemistry* **48**:8594–8602.
- Quillfeldt, J.A.; Schmitz, P.K.; Walz, R.; Bianchin, M.; Zanatta, M.S.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. (1994) CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **48**:437-440.
- Rammes, G.; Danysz, W.; Parsons, C.G. (2008) Pharmacodynamics of memantine: an update. *Current Neuropharmacology* **6**:55-78.
- Reynolds GP. (2004) Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology* **18**:340-345.
- Réus, G.Z.; Valvassori, S.S.; Machado, R.A.; Martins, M.R.; Gavioli, E.C.; Quevedo, J. (2008) Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **376**:295-300.
- Riedel, G.; Micheau, J.; Lam, A.G.; Roloff, E.L.; Martin, S.J.; Bridge, H.; de Hoz, L.; Poeschel, B.; McCulloch, J.; Morris, R.G.M. (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience* **2**:898-905.
- Robbins T.W.; Murphy, E.R. (2006) Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**:141–148.
- Rogawski, M.A. (1993). Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends in Pharmacological Sciences* **14**, 325-331.
- Rogawski, M.A. (2008). Common pathophysiologic mechanisms in migraine and epilepsy. *Archives of Neurology* **65**:709-714.
- Rogawski, M.A.; Gryder, D.; Castaneda, D.; Yonekawa, W.; Banks, M.K.; Lia, H. (2003) GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences* **985**:150-162.

Roux, M.J.; Supplisson, S. (2000) Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* **25**:373-383.

Sargolini, F.; Rouillet, P.; Oliverio, A.; Mele, A. (2003) Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice. *Behavioural Brain Research* **138**:153-163.

Sárosi A.; Gonda X.; Balogh G.; Székely A.; Sasvári M.; Faludi G. (2008) A depresszió neurokognitív összetevőinek és nemi különbségeinek vizsgálata. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* **X**:191-199.

Schechter, L.E.; Ring, R.H.; Beyer, C.E.; Hughes, Z.A.; Khawaja, X.; Malberg, J.E.; Rosenzweig-Lipson, S. (2005) Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx* **2**:590-611.

Schoepp, D.D.; Conn, P.J. (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacological Sciences* **14**:13-20.

Schwartz, N.E.; Alford, S. (2000) Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release. *Journal of Neurophysiology* **84**:415-427.

Sheardown, M.J. (1993) The triggering of spreading depression in the chicken retina: A pharmacological study. *Brain Research* **607**:189-194.

Shigeri, Y.; Seal, R.P.; Shimamoto, K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews* **45**:250-265.

Singer, P.; Feldon, J.; Yee, B.K.; (2009) The glycine transporter inhibitor SSR504734 enhances working memory performance in a continuous delayed alternation task in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology* **202**:371-384.

Snow, R.W.; Taylor, C.P. Dudek, F.E. (1983) Electrophysiological and optical changes in slices of rat hippocampus during spreading depression. *Journal of Neurophysiology* **50**:561-572.

Somjen, GG. (2001) Mechanism of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews* **81**:1065-1096.

Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakman, B., Seeburg, P.H. (1990) Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**: 1580-1585.

Staubli, U.; Rogers, G.; Lynch, G. (1994) Facilitation of glutamate receptors enhances memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 777-781.

Streit, D.S.; Ferreira Filho, C.R.; Martins-Ferreira, H. (1995) Spreading depression in isolated spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **74**:888-890.

Sugiyama, H.; Ito, I.; Watanabe, M. (1989) Glutamate receptor subtypes may be classified into two major categories: a study on *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Neuron* **3**:129-132.

Sun, Y.; Olson, R.; Horning, M.; Armstrong, N.; Mayer, M.; Gouaux, E. (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitisation. *Nature* **417**:245-253.

Supplisson, S; Bergman, C. (1997) Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Neuroscience* **17**:4580-4590.

Supplisson, S.; Roux, M.J. (2002) Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Letters* **529**:93-101.

Szádóczy, E. (2003) Hangulatzavarok. In: *A pszichiátria rövidített kézikönyve. Szerk.: Füredi, J.; Németh, A.; Tariska, P. (Medicina)* pp. 281-301.

Szénási, G.; Végh, M.; Szabó, G.; Kertész, S.; Kapus, G.; Albert, M.; Greff, Z.; Ling, I.; Barkóczy, J.; Simig, G.; Spedding, M.; Hársing Jr, L.G. (2008) 2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects. *Neurochemistry International* **52**:166-183.

Takeuchi, H.; Mizuno, T.; Mizuno, T.; Zhang, G.; Wang, J.; Kawanokuchi, J.; Kuno, R.; Suzumura, A. (2005) Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 10444-10454.

Tang, Y.P.; Shimizu, E.; Dube, G.R.; Rampon, C.; Kerchner, G.A.; Zhou, M.; Liu, G.; Tsien, J.Z. (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**:63–69.

Tarnawa, I.; Farkas, S.; Berzsenyi, P.; Pataki, Á.; András, F. (1989). Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466. *European Journal of Pharmacology* **167**:193-199.

Tarnawa, I.; Vizi, E.S. (1998). 2,3-Benzodiazepine AMPA antagonists. *Restorative Neurology and Neuroscience* **12**:1-17.

Thompson, D.M.; Guidotti, A.; DiBella, M.; Costa, E. (1995) 7-Chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine S,S-dioxide (IDRA 21), a congener of aniracetam, potently abates pharmacologically induced cognitive impairments in patas monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:7667-7671.

Torzsa P.; Rihmer Z.; Gonda X.; Sebestyén B.; Szokontor N.; Kalabay L. (2008) A depresszió prevalenciája az alapellátásban Magyarországon. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* **X**:265-270.

Trullas R, Skolnick P. (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology* **185**:1-10.

Tsien, J.Z.; Huerta, P.T.; Tonegawa, S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**:1327-1338.

van Harrevelde, A. (1959) Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *Journal of Neurochemistry* **3**:300-315.

van Marum, R.J. (2009) Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **5**:237–247.

- Veruki, M.L.; Morkve, S.H.; Hartveit, E. (2003) Functional properties of spontaneous EPSCs and non-NMDA receptors in rod amacrine (All) cells in the rat retina, *The Journal of Physiology* **549**:759-774.
- Viggiano, M.P.; Galli, G.; Righi, S.; Brancati, C.; Gori, G.; Cincotta, M. (2008) Visual recognition memory in Alzheimer's disease: repetition-lag effects. *Experimental Aging Research* **34**:267-281.
- Világi, I.; Klapka N.; és Luhmann, H.J. (2001) Optical recording of spreading depression in rat neocortical slices. *Brain Research* **898**:288-296.
- Wadiche, J.I.; Jahr, C.E. (2005) Patterned expression of Purkinje cell glutamate transporters controls synaptic plasticity. *Nature Neuroscience* **8**:1329-1334.
- Wald R, Dodman N, Shuster L. (2009) The combined effects of memantine and fluoxetine on an animal model of obsessive compulsive disorder. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* **17**:191-197.
- Walker, D.L.; Ressler, K.J., Lu, K.T.; Davis, M. (2002) Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration of intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *The Journal of Neuroscience* **22**:2343-2351.
- Wiedemann, M.; Fernandes de Lima, V.F.; Hanke, W. (1996) Effects of antimigraine drugs on retinal spreading depression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **353**:552-556.
- Williams, M.M.; Xiong, C.; Morris, J.C.; Galvin, J.E. (2006) Survival and mortality differences between dementia with Lew bodies vs Alzheimer disease. *Neurology* **67**:1935-1941.
- Winters, B.D.; Bussey, T.J. (2005) Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory, *The Journal of Neuroscience* **25**:4243-4251.
- Winters, B.D.; Saksida, L.M.; Bussey, T.J. (2008) Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **32**:1055-1070.
- Wu, A.; Fujikawa, D.G. (2002) Effects of AMPA-receptor and voltage-sensitive sodium channel blockade on high potassium-induced glutamate release and neuronal death in vivo. *Brain Research* **946**:119-129.
- Yamada, K.A.; Turetsky, D.M. (1996) Allosteric interactions between cyclothiazide and AMPA/kainate receptor antagonists. *British Journal of Pharmacology* **117**:1663-1672.
- Yang, J.H.; Maple, B.; Gao, F.; Maguire, G.; and Wu, S.M. (1998) Postsynaptic responses of horizontal cells in the tiger salamander retina are mediated by AMPA-preferring receptors. *Brain Research* **797**:125-134.
- Yang, C.R.; Svensson, K.A. (2008) Allosteric modulation of NMDA receptor via elevation of brain glycine and D-serine: The therapeutic potentials for schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics* **120**:317-332.
- Yee, B.K.; Balic, E.; Singer, P.; Schwerdel, C.; Grampp, T.; Gabernet, L.; Knuesel, I.; Benke, D.; Feldon, J.; Mohler, H.; Boison, D. (2006) Disruption of glycine transporter 1 restricted to

forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *The Journal of Neuroscience* **26**:3169-3181.

Young, S.L. (1994) NMDA process mediates anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context pre-exposure. *Behavioral Neuroscience* **108**:19-29.

Young, J.W.; Powell, S.B.; Risbrough, V.; Marston, H.M.; Geyer, M.A. (2009) Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics* **122**:150-202.

Zarate, C.A. Jr; Singh, J.B.; Quiroz, J.A.; De Jesus, G.; Denicoff, K.K.; Luckenbaugh, D.A.; Manji, H.K.; Charney, D.S. (2006) A double-blind, placebo-controlled study of memantine in the treatment of major depression. *American Journal of Psychiatry* **163**:153-155.

Zhang, H.X., Hyrc, K.; Thio, L.L. (2009) The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *The Journal of Physiology* **587**:3207-3220.

Zorumski, C.H.; Yamada, K.A.; Price, M.T.; Olney, J.W. (1993). A benzodiazepine recognition site associated with the non-NMDA glutamate receptor. *Neuron* **10**:61-67.

Az értekezéshez kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

Kertész, S.; Kapus, G.; Gacsályi, I.; Lévy, G. Deramciclane improves object recognition in rats: potential role of NMDA receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; Közlésre benyújtva

Kertész, S.; Végh, M.; Kapus, G.; Kovács, G.; Lévy, G. (2005) Deramciclane (EGIS-3886) negatively modulates N-methyl-D-aspartate receptor function *in vitro*. *European Neuropsychopharmacology* **15**:S636.

Kertész, S.; Kapus, G.; Lévy, G. (2004) Interactions of allosteric modulators of AMPA/kainate receptors on spreading depression in the chicken retina. *Brain Research* **1025**:123-129.

Kapus, G., Kertész, S.; Vegh, M.; Hársing, L.G. Jr.; Levay, G. (2002) Interaction of AMPA receptor modulators in the chicken retina. *British Journal of Pharmacology* **135**: 87P. (poszter)

Kapus, G.; Kertész, S.; Vegh, M.; Lévy, G. (2001) AMPA receptor modulátorok hatása csirke retinában. Magyar Idegtudományi Társaság 8. konferenciája, Szeged (poszter)

Egyéb publikációk és előadáskivonatok

Szénási, G.; Végh, M.; Szabó, G.; Kertész, S.; Kapus, G.; Albert, M.; Greff, Z.; Ling, I.; Barkóczy, J.; Simig, G.; Spedding, M.; Hársing, L.G. Jr. (2008) 2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects. *Neurochemistry International* **52**:166-183.

Gigler, G.; Móricz, K.; Ágoston, M.; Simó, A.; Albert, M.; Benedek, A.; Kapus, G.; Kertész, S.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Markó, B.; Szabó, G.; Matucz, E.; Gacsályi, I.; Lévy, G.; Hársing, L.G. Jr.; Szénási, G. (2007) Neuroprotective and anticonvulsant effects of EGIS-8332, a non-competitive AMPA receptor antagonist, in a range of animal models. *British Journal of Pharmacology* **152**:151-160.

Kertész, S.; Vegh, M.; Kapus, G.; Gigler, G.; Wellmann, J.; Szénási, G.; Barkóczy, J.; Hársing, L.G. Jr.; Simig, G.; Levay, G. (2007) Improvement of AMPA antagonist activity by methyl substitution on the aniline ring of 2,3-benzo diazepine derivatives. *European Neuropsychopharmacology* **17**:S267

Gressens, P.; Spedding, M.; Gigler, G.; Kertész, S.; Villa, P.; Medja, F.; Williamson, T.; Kapus, G.; Lévy, G.; Szénási, G.; Barkóczy, J.; Hársing, L.G. Jr. (2005) The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology* **519**:58-67.

Kapus, G.; Kertész, S.; Gigler, G.; Simó, A.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Hársing Jr, L.G.; Szabó, G.; Lévy, G. (2004) Comparison of the AMPA antagonist action of new 2,3 benzodiazepines *in vitro* and their neuroprotective effects *in vivo*. *Pharmaceutical Research* **21**:317-323.

Kapus, G.; Kertész, S.; Gigler, G.; Simó, A.; Vegh, M.; Barkóczy, J.; Lévy, G. (2001) *In vitro* methods poorly predict structure-activity relationship in *in vivo* stroke models for testing AMPA antagonists. 3rd Joint Meeting of Hungarian and German Societies of Neuropathology, Budapest

Végh, M.; Kapus, G.; Kertész, S.; Kovács, G.; Szabó, G.; Lévy, G. (2000) Effects of modulatory compounds on AMPA/kainate receptors tested on hippocampal slices, primary telencephalon cultures and a CHO cell line expressing GluR1 (flop) receptor subtype. IBRO-MITT Milleniumi Konferencia, a Magyar Idegtudományi Társaság VII. konferenciája, Budapest

Kertész, S.; Gigler, G.; Simó, A.; Végh, M.; Kapus, G.; Barkóczy, J.; Lévy, G. (2000) Relations between the histological and behavioural neuroprotective effects of 2,3-benzodiazepines in global ischemia model. 8th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, Germany

Megyeri, K.; Kertész, S.; Kovács, A.; Egyed, A.; Szénási, G. (1999) Preconditioning with serotonin is not mediated by 5HT_{2A} receptors in isolated rat hearts. XX. Meeting of the International Society for Heart Research, European Section. Maastricht, The Netherlands; *J. Mol. Cel. Cardiol.* **31**:A93, Fr71

Szénási, G.; Megyeri, K.; Pacher, P.; Kertész, S.; Gyönös, I.; Kovács, A.; Egyed, A. Kecskeméti, V. (1998) Electrophysiological and cytoprotective effects of EGIS-7229, a novel class IB/III/IV antiarrhythmic drug in rat hearts. International Symposium on Myocardial Cytoprotection - From Basic Sciences to Clinical Perspectives, Pécs

Megyeri, K.; Kertész, S.; Kovács, A.; Egyed, A.; Szénási, G. (1998) Serotonin-induced preconditioning in isolated, Langendorff-perfused rat hearts. International Symposium on Myocardial Cytoprotection - From Basic Sciences to Clinical Perspectives, Pécs

Szénási, G.; Kertész, S.; Kovács, A.; Egyed, A.; Megyeri, K. (1998) Szerotonin prekondicionáló hatása patkányszíven. Magyar Kardiológus Társaság 1998. évi kongresszusa, Balatonfüred

Megyeri, K.; Kertész, S.; Szilvássy, Z.; Kovács, A.; Szénási, G. (1997) Protective effect of a new 5HT_{2A} ligand, EGIS-8237 in ischemic hearts. Német Kísérletes Klinikai Farmakológiai és Toxikológiai Társaság Kongresszusa, Bécs, Ausztria

Kertész, S.; Konkoly-Thege, M.; Kiszelly, E. (1995) Az EGIS-7304 gasztroprotektív hatása. MÉT V. Vándorgyűlése

Szabadalmak

Reiter, J.; Berecz, G.; Barkóczy, J.; Egyed, A.; Ivanicsné Megyeri, K.; Miklósné Kovács, A.; Simig, Gy.; Szénási, G.; Drabant, S.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Szécseyné Hegedűs, M.; Wellmann, J.; Pallagi, K.; Schmidt, É.; Tihanyi, K.; Trinka, P.; Csörgő, M. (1997) 1,3,4-Tiadiazol-származékok és eljárás előállításukra. Bejelentés száma: P9700103

Reiter, J.; Berecz, G.; Barkóczy, J.; Egyed, A.; Ivanicsné Megyeri, K.; Miklósné Kovács, A.; Simig, Gy.; Szénási, G.; Drabant, S.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Szécseyné Hegedűs, M.; Wellmann, J.; Pallagi, K.; Schmidt, É.; Tihanyi, K.; Trinka, P.; Csörgő, M. (1997) 1,3,4-Tiadiazol-származékok, ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények, és eljárás a hatóanyag előállítására. Bejelentés száma: P9700104

Reiter, J.; Berecz, G.; Barkóczy, J.; Egyed, A.; Ivanicsné Megyeri, K.; Miklósné Kovács, A.; Simig, Gy.; Szénási, G.; Drabant, S.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Szécseyné Hegedűs, M.; Wellmann, J.; Pallagi, K.; Schmidt, É.; Tihanyi, K.; Trinka, P.; Csörgő, M. (1997) 5-Fenil-1,3,4-tiadiazol-származékok, eljárás az előállításukra, és ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények. Bejelentés száma: P9700105

Reiter, J.; Berecz, G.; Barkóczy, J.; Egyed, A.; Ivanicsné Megyeri, K.; Miklósné Kovács, A.; Simig, Gy.; Szénási, G.; Drabant, S.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Szécseyné Hegedűs, M.; Wellmann, J.; Pallagi, K.; Schmidt, É.; Tihanyi, K.; Trinka, P.; Csörgő, M. (1997) 5-(Aminoalkoxi-fenil)-1,3,4-tiadiazol-származékok, ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények, és eljárás a hatóanyag előállítására. Bejelentés száma: P9700106

Tímári, G.; Riedl, Z.; Bátor, S.; Hajós, G.; Miklósné Kovács, A.; Szénási, G.; Megyeri, K.; Wellmann, J.; Egyed, A.; Szécseyné Hegedűs, M.; Gyönös, I.; Kertész, Sz.; Pallagi, K.; Tihanyi, K. (1997) Pirano[3,2-c]piridin-származékok és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, eljárás előállításukra, alkalmazásuk. Bejelentés száma: P9701865

Reiter, J.; Ágai, B.; Kovács, A.; Egyed, A.; Gyertyán, I.; Pallagi, K.; Szénási, G.; Simig, Gy.; Rivó, E.; Gacsályi, I.; Schmidt, É.; Megyeri, K.; Szabados, T.; Lévy, Gy.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Ondi, L.; Nagy, Z.T. (1998) Piperazinil-alkil-benzofurán-származékok, ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény, és eljárás a hatóanyag előállítására. Bejelentés száma: P9801085

Reiter, J.; Ágai, B.; Kovács, A.; Egyed, A.; Gyertyán, I.; Pallagi, K.; Szénási, G.; Simig, Gy.; Rivó, E.; Gacsályi, I.; Schmidt, É.; Megyeri, K.; Szabados, T.; Lévy, Gy.; Kertész, Sz.; Gyönös, I.; Ondi, L.; Nagy, Z.T. (1998) Benzofurán-származékok, ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények, eljárás a hatóanyag előállítására és intermedierjeik. Bejelentés száma: P9801086

Barkóczy, J.; Ling, I.; Szénási, G.; Simig, Gy.; Kertész, Sz.; Gígler, G.; Szűcs, Gy.; Szabó, G.; Végh, M.; Hársing, L.G. (2003) 8-Klór-2,3-benzodiazepin-származékok, ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények és eljárás előállításukra. Bejelentés száma: P0302449

Ling, I.; Barkóczy, J.; Greff, Z.; Szénási, G.; Gigler, G.; Kertész, Sz.; Szűcs, Gy.; Albert, M.; Kapus, G.; Szabó, G.; Végh, M.; Ágoston, M.; Lévy, Gy.; Móricz, K.; Hársing, L.G. (2005) Dihidro-2,3-benzodiazepin-származékok optikai izomerjei, eljárás ezek sztereoselektív szintézisére, alkalmazásuk, az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények és az eljárás közbenső termékei. Bejelentés száma: P0501211

Ling, I.; Barkóczy, J.; Greff, Z.; Szénási, G.; Gigler, G.; Kertész, Sz.; Szűcs, Gy.; Albert, M.; Kapus, G.; Szabó, G.; Végh, M.; Ágoston, M.; Lévy, Gy.; Móricz, K.; Hársing, L.G. (2005) Dihidro-2,3-benzodiazepin optikai izomerjei, ezek sztereoselektív szintézise, az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények és alkalmazásuk. Bejelentés száma: P0501212

Gacsályi, I.; Gigler, G.; Ágoston, M.; Kompagne, H.; Kertész, Sz.; Móricz, K.; Lévy, Gy.; Szénási, G.; Hársing, L.G. Barkóczy, J.; Simig, Gy. (2006) 4-Klór-5-{2-[4-(6-fluor-1,2-benzioxazol-3-il)piperidin-1-il]etil-amino}-2-metil-3-(2H) piridazinon felhasználása kognitív funkció befolyásolására és neuroprotektív hatás kiváltására alkalmas gyógyászati készítmények előállítására. Bejelentés száma: P0600555

Leveleki, Cs.; Hársing, L.G.; Lévy, Gy.; Kapus, G.; Simig, Gy.; Gacsályi, I.; Mezei, T.; Kertész Sz.; Lukács, Gy.; Végh, M.; Porcs-Makkay, M.; Barkóczy, J. (2006) 3,4-Dihidrobenzo[1,2,3]tiadiazin-1,1-dioxid-származékok, eljárás előállításukra, az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények és alkalmazásuk. Bejelentés száma: P0600651

Porcs-Makkay, M.; Lukács, Gy.; Kapus, G.; Gacsályi, I.; Simig, Gy.; Lévy, Gy.; Mezei, T.; Végh, M.; Kertész Sz.; Barkóczy, J. Leveleki, Cs.; Hársing, L.G.; (2007) Benzo[1,2,3]tiadiazin-1,1-dioxid-származékok, eljárás előállításukra, az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények és alkalmazásuk. Bejelentés száma: P0700504

9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1-BCP	1-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-piperidin
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav
AP-5	2-amino-5-foszfovaleriánsav
CX516	1-(kinoxalin-6-ilcarbonil)-piperidin
CA1, CA3	a hippocampusz régiói
CNQX	6-ciano-7-nitrokinoxalin-2,3-dion
CPP	(+/-)-3-(2-karboxipiperazin-4-il)propil-1-foszfonsav
DMSO	dimetilszulfoxid
EAAT	serkentő aminosav transzporter
EC₅₀	50 %-os SD potencírozást eredményező koncentráció érték
EPSC	serkentő posztzinaptikus áram
EPSP	serkentő posztzinaptikus potenciál
GABA	γ -amino-vajsav
GYKI 52466	1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metiléndioxi-5H-2,3-benzodiazepin
GYKI 53405	1-(4-aminofenil)-3-acetil-4-metil-3,4-dihidro-7,8-metilén-diox-5H-2,3-benzodiazepin
GYKI 53655	1-(4-aminofenil)-3N-metilkarbamoil-4-metil-3,4-dihidro-7,8-metiléndioxi-5H-2,3-benzodiazepin
GlyT	Glicin transzporter
IC₅₀	50 %-os SD gátlást okozó koncentráció érték
IDRA 21	7-kloro-3-metil-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazin-1,1-dioxid
JSTX	Joro spider toxin
LTD	hosszú idejű gátlás
LTP	tartós potencírozás (long-term potentiation)
MCI	enyhe kognitív károsodás
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo-[a,d]ciklo-heptén-5,10-imin-maleát
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
NFPS	N[3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)-propil]szarkozin
NBQX	6-nitro-7-szulfamoilbenzo(f)kinoxalin-2,3-dion
OR	tárgyfelismerés teszt (object recognition)
Org 24461	R,S (+/-)N-metil-N-[(4-trifluorometil)fenoxi]-3-fenil-propilglicin

PCP	fenilciklohexilpiperidin (fenciklidin)
PEPA	4-(2-fenilszulfonilamino)etiltio)-2,6-difluoro-fenoxi-acetamid
RG	relatív gátlás: az az arányszám, amely kifejezi, hogy az egyes pozitív modulátor vegyületek jelenlétében hányszorosára nőtt a GYKI 52466-nak az SD gátlásra vonatkozó IC_{50} értéke (IC_{50}/IC_{50} kontroll)
S 18986	(S)-2,3-dihidro-[3,4]ciklopentano-1,2,4-benzotiadiazin-1,1-dioxid
SD	tovaterjedő depolarizáció (spreading depression)
VGLUT	vezikuláris glutaminsav transzporter

RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS (Tézisek)

A doktori értekezés glutamát receptorra ható vegyületeknek a tovaaterjedő depolarizációra *in vitro*, valamint felismerési memória teszten az emléknym kialakulására *in vivo* gyakorolt hatását tárgyalja gyógyszerfejlesztési szempontok figyelembevételével.

- Az EGIS Gyógyszergyárban a glutamáterg vegyületek vizsgálatára beállítottuk a tovaaterjedő depolarizáció (spreading depression, SD) *in vitro* modelljét csirke retinában. AMPA és kainát receptorra ható specifikus ligandok alkalmazásával kimutattuk, hogy a kainát receptorral szemben az AMPA receptor felel döntően az SD kialakulásáért. Az irodalomban elsőként írtuk le az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületeknek az SD-re gyakorolt hatását. Vizsgáltuk pozitív modulátor vegyületeknek egymással, illetve a receptort negatívan moduláló GYKI 52466-tal való interakcióját. A pozitív modulátorok azonos hatékonyságú, SD potenciózó koncentrációban kompetitív módon, de eltérő mértékben befolyásolták a GYKI 52466 gátló hatását. A pozitív modulátorok egymással való kölcsönhatásának jellegét – addíció, ill. annak hiánya – elsődlegesen nem a vegyületek szerkezeti rokonsága határozta meg. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban közölt adatokkal, amennyiben közvetve arra utalnak, hogy 1) a pozitív és negatív modulátor vegyületek AMPA receptorhoz kötődése részben azonos helyen történik; 2) a pozitív modulátorok kötődésében pedig önmagában a szoros szerkezeti rokonság nem jelent azonos kötőhelyet, esetükben több allosztérikus helyet feltételezhetünk.
- Az EGIS Gyógyszergyárban új szerkezetű AMPA receptor pozitív és negative modulátor vegyületek kifejlesztésében vettem részt.
- Igazoltuk, hogy a csirke retinán mért SD alkalmas az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) gátló anyagok kvalitatív, szemikvantitatív vizsgálatára; az ilyen típusú anyagok gyógyszerfejlesztési célzatú szűrővizsgálatára.
- Csirke retina preparátumon összevetettük a deramciklán (EGIS-3886) NMDA receptor gátló hatását az ionsatorna gátló MK-801 és memantin, valamint a kompetitív antagonistá CPP hatásával. Kimutattuk, hogy a deramciklán, a csatornagátló vegyületekhez hasonlóan, aktivitásfüggő módon gátolja az NMDA receptor működését.
- Patkány tárgyfelismerés teszten *in vivo* végzett vizsgálatokban kimutattuk, hogy az AMPA receptor működését serkentő, pozitív modulátor vegyületek a szakirodalomban leírtakkal megegyezően memóriafokozó hatásúak. Kísérleti körülményeink között az NMDA receptor működésére pozitívan ható, GlyT1 gátló vegyületek nem bizonyultak memória-serkentőnek. A szakirodalomban elsőként közöltünk adatot arról, hogy a deramciklán javítja a patkányok memóriáját tárgyfelismerés teszten. A deramciklán prokognitív hatásában – a memantinhoz hasonlóan – feltehetően szerepet játszanak a vegyület NMDA receptor gátló tulajdonságának jellegzetességei.

SUMMARY

(PhD Thesis)

This thesis discusses the effect of glutamatergic ligands on the retinal spreading depression (SD) *in vitro*, and on recognition memory *in vivo*.

- The chicken retinal SD model was set up at the EGIS Pharmaceuticals Plc to investigate the effect of glutamatergic ligands on SD. Using specific AMPA and kainate receptor ligands, we demonstrated that mainly AMPA receptors mediate, and kainate receptors may scarcely participate in initiating SD in the retina. We were the first to publish the effect of AMPA receptor positive modulators on SD. Also the interaction of positive modulators with each other or with the negative modulator, GYKI 52466 was tested. Equiactive SD potentiating concentrations of positive modulators shifted the AMPA antagonist effect of GYKI 52466 to the right in a competitive manner but to various degrees. Regarding positive modulators, the measured addition or the lack of addition of SD potentiating effect of the compounds was not determined by the structural homology of positive modulators. Our results are in accordance with the literature, as they indicate that 1) positive and negative modulators bind to the AMPA receptors at least partly at the same binding site; 2) the close structural similarity of the positive modulators does not refer to the same binding site at the AMPA receptor, rather to the existence of separated allosteric sites or subsites.
- We contributed to the development of new AMPA receptor positive and negative modulator compounds at EGIS Pharmaceuticals Plc.
- We demonstrated that SD in the chicken retina is suitable for qualitative, semiquantitative pharmacological screening of the glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitory potency of different compounds.
- The NMDA antagonist effect of deramciclane (EGIS-3886) in the chicken retinal SD was determined and compared to that of the uncompetitive antagonists, MK-801 and memantine, and of the competitive antagonist, CPP. We described that deramciclane inhibited SD in an uncompetitive, activity-dependent manner, similarly to memantine and MK-801.
- Object recognition test (OR) in the rat was performed to evaluate procognitive efficacy of different glutamatergic ligands. AMPA receptor positive modulators were found to improve memory retrieval in OR. Our results are in accordance with data in the literature. The GlyT1 inhibitors that indirectly facilitate NMDA receptor mediated neurotransmission, however, showed no procognitive activity on our experimental conditions. We were the first to demonstrate that deramciclane improved memory retrieval in OR in the rat, and proposed that the NMDA antagonist potency and characteristics – similarly to memantine – may play a pivotal role in the procognitive effect of deramciclane.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazon munkatársaimnak, akik az EGIS Gyógyszergyárban munkájukkal, javaslataikkal és biztatásukkal elősegítették, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Külön köszönöm témavezetőmnek, dr. Lévay Györgynek mindazt a szakmai iránymutatást, segítséget és buzdítást, amelynek eredményeképpen ez az értekezés megszülethetett.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Kapus Gábor kollégámnak, akinek ötletei, tanácsai és kritikai megjegyzései jelentősen hozzájárultak dolgozatom elkészültéhez.

Köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek a türelmet, kitartást és szeretetet, amellyel az elmúlt időszakban is körülvettek és támogattak.