

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A kolinerg és glutamáterg neurotranszmisszió interakciójának
vizsgálata kognitív zavarok állatkísérletes modelljeiben**

PhD értekezés

Bali Zsolt Kristóf

Témavezető:

Dr. Hernádi István

PhD, habil.

egyetemi docens

PÉCS, 2016

1. BEVEZETÉS

A tanulás és a memória az állatok és az ember legfontosabb adaptációs képességei közé tartoznak, melyeknek számos különböző formáját különböztethetjük meg az emléknymok fennmaradásának időtartama alapján, illetve aszerint, hogy a tanulás milyen jellegű információk vagy készségek megszerzésére irányul. Elkülönítünk tehát rövidtávú vagy munkamemóriát (STM) és hosszútávú memóriát (LTM), melyeket egyes modellek még egy közép-hosszútávú memóriaformával egészítenek ki [1]. Az eltárolt információk minősége szempontjából megkülönböztetünk deklaratív (explicit) memóriát, melynek tartalma szavakkal konkrétan és pontosan leírható (tények illetve átélt események) [2,3], valamint nem-deklaratív memóriát, ami készségek elsajátítására irányul, és elsősorban adott feladatok végrehajtása során mutatott teljesítménnyel írható le. Az elmúlt évtizedek neurofiziológiai eredményei alapján valószínűsíthető, hogy míg a STM funkciók elsősorban neocorticalis területekhez (különösen a prefrontalis cortex-hez: PFC) kapcsolódnak, addig a deklaratív LTM-ben kulcsszerepet játszanak a mediális temporális lebeny (MTL) struktúrái, köztük a hippocampus [4–6]. A MTL ugyanakkor a memória egy speciális formájával, a térbeli tájékozódással és a kognitív térkép fogalmával is szorosan összekapcsolódik [7–9], olyannyira, hogy a memóriaműködések állatkísérletes vizsgálatában elterjedten alkalmazzák rágcsálók térbeli memóriatesztjeit [10–12].

Számos, napjainkban súlyos népegészségügyi problémát jelentő betegség együtt jár a memóriaműködések illetve más kognitív funkciók zavarával illetve fokozatos leépülésével. Az ún. fő neurokognitív zavarokban (melyek közül legismertebb és leggyakoribb az Alzheimer-kór: AD) a tanulási és memóriaképességek leépülése központi tünetnek számít [13], azonban a kognitív képességek általános hanyatlása más betegségekhez is társulhat, melyek közül kiemelendő az elsődlegesen pszichotikus jellegeket hordozó skizofrénia [14].

A glutamáterg és a kolinerg neurotranszmisszió számos ponton kapcsolódik a fiziológias memóriaműködésekhez, ugyanakkor a kognitív zavarokkal járó betegségek hátterében is kimutatható rendellenes működésük. A memóriaműködésekben több glutamáterg sejtípus szerepet játszik, mint például a MTL hely- illetve rácsejtjei [7,8], továbbá a PFC-i késleltetési sejtek [15]. A glutamát-receptorok (különösen az NMDA-típusú) továbbá kulcsszerepet játszanak a tanulás celluláris szintű mechanizmusának tekintett hosszútávú potenciáció (LTP) jelenségében [16–18]. Az acetilkolin (ACh) elsősorban modulátoros szerepe van a kognitív képességekkel összefüggő agyterületek működésében. A bazális előagyi Meynert-mag kolinerg projekciói a neocortex-et látják el ACh-nal, és valószínűleg a figyelmet szabályozzák [19], míg a mediális septum és a diagonális köteg kolinerg sejtjei a MTL struktúráit idegzik be, és a hippocampus-függő térbeli illetve deklaratív memóriafolyamatokat modulálják [20–22].

Az említett két transzmitter-rendszer AD-ban beállt zavarainak egyike a memóriával összefüggő glutamáterg neuronok kiterjedt pusztulása, valamint a Meynert-mag kolinerg sejtjeinek szelektív léziója. Továbbá molekuláris szintű változások is beállnak mind a glutamát-receptorok expressziójában és ligandkötésében, mind az ACh-anyagcsere enzimeinek aktivitásában és az ACh-receptorok (AChR) denzitásában (ld. Schaeffer és Gattaz (2008) összefoglalóját [23]). A receptorszintű elváltozások közül kiemelendők az NMDA-típusú glutamát-receptorok, illetve az $\alpha 7$ nikotinos AChR-ok (nAChR), melyeknek expressziója illetve funkciója mind AD-ban, mind skizofréniában zavart szenved [24].

Mind a memória fiziológiás és patológias mechanizmusainak vizsgálatában, mind a gyógyszerfejlesztésben fontos szerepet töltenek be a különböző állatkísérletes betegségmodellek. Az ideális állatmodell a betegség etiológiáját, patofiziológiáját, tüneteit és gyógyszerekre való érzékenységet egyaránt jól utánozza. A kognitív zavarok illetve az AD kutatásában használatos rágszáló-modellek között megkülönböztethetünk többek között spontán, genetikailag módosított, léziós, komorbiditási, valamint toxinokkal indukált demencia-modelleket [25]. A jelenleg rendelkezésre álló modellek a fenti kritériumok összességét ugyan nem teljesítik, azonban egy adott kérdéskör kutatásához megfelelőnek bizonyultak. A magatartás-farmakológiai és hatóanyagtesztelési vizsgálatokban különleges népszerűségnek örvendenek a farmakológiai úton kiváltott tranziens amnézia-modellek [26,27], annak ellenére, hogy a konkrét betegségek (pl. AD) egyedi jellegzetességeit és patomechanizmusát nem utánozzák. Ugyanakkor reverzibilis, olcsó és egyszerű módszerrel váltható ki velük memóriazavar, ami lehetőséget ad a neurotranszmitter-rendszerek deficitjének viszonylag szelektív vizsgálatára, és a kognitív serkentő farmakonok hatásosságának tesztelésére. A tranziens amnéziát leggyakrabban muszkarinos AChR (mAChR) antagonisták (szkopolamin), különböző nAChR antagonisták (pl. metil-akonitin: MLA) vagy NMDAR antagonisták (pl. MK-801) szisztémás vagy centrális beadásával váltják ki.

Az AD terápiájában jelenleg rendelkezésre álló gyógyszerek hatásmechanizmus alapján két csoportba sorolhatók. Az AChE gátlók alkalmazásának célja a csökkent ACh-szint ellensúlyozása a lebomlás lassításával [28], míg a memantin nevű hatóanyag az NMDAR-ok kompetitív antagonistájaként a „patológias” aktiváció gátlásával javítja a glutamáterg transzmisszió jel/zaj arányát [29]. Továbbra is szükséges azonban új farmakológiai célpontok azonosítása és hatékonyabb készítmények fejlesztése a kognitív zavarok enyhítésére, melyek közül kiemelt jelentőségűek az $\alpha 7$ nAChR agonisták. Az $\alpha 7$ nAChR-ok aktiválása mind az AD, mind a skizofrénia preklinikai állatmodelljeiben hatékonyan enyhíti a kognitív tüneteket, ezért a jövőben akár a két betegség terápiájában közös pontot is jelenthetnek az $\alpha 7$ nAChR agonisták [30,31]. Mivel ezeknek a vegyületeknek a prokognitív hatása mögött álló mechanizmusok még nem teljesen ismertek, kutatásunk céljával az $\alpha 7$

nAChR-ok működésének glutamáterg transzmisszióval való összefüggéseit vizsgáltuk magatartás-farmakológiai és *in vivo* elektrofiziológiai módszerekkel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- I. Megvizsgálni egy $\alpha 7$ nAChR agonista (PHA-543613) kognitív teljesítményt növelő hatását patkányok jutalmazás nélküli, hippocampus-függő térbeli munkamemória-tesztjében.
- II. Vizsgálni, hogy a kolinerg illetve glutamáterg transzmitter-rendszerekben beállt zavarok hogyan befolyásolják az $\alpha 7$ nAChR agonista hatékonyságát két különböző támadáspontú (mAChR antagonistá szkopolaminnal illetve NMDAR antagonistá MK-801-el kiváltott) farmakológiai amnézia-modellben.
- III. Megvizsgálni a hippocampus CA1-régió piramis sejtek rétegében a neuronok glutamáterg és kolinerg neurotranszmisszióval összefüggő neuronális aktivitását *in vivo* elektrofiziológiai módszerekkel. Kísérleteink során az alábbi lépéseket határoztuk meg:
 1. Optimalizálni egycsatornás, mikroiontoforézissel kombinált elvezetési technikánkat a hippocampalis piramis sejtek és interneuronok megbízható elkülönítése érdekében.
 2. Megvizsgálni az NMDA és az ACh lokális hatásait a piramis sejtek tüzelésére.
 3. Vizsgálni a glutamáterg és kolinerg neurotranszmisszió interakcióját a piramis sejtek tüzelésének modulációjában az NMDA és az ACh kombinált iontoforézisével.
 4. Megállapítani a különböző AChR-ok szerepét az NMDA és az ACh önálló és kombinált hatásaiban, illetve a két transzmitter-rendszer kölcsönhatásában.
- IV. Elektrofiziológiai kísérleteink eredményei alapján modell alkotása a vizsgált farmakonok magatartás kísérletekben tapasztalt kognitív hatásainak mechanizmusára vonatkozóan.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az $\alpha 7$ nAChR agonista PHA-543613 hatásainak vizsgálata a térbeli munkamemóriára két különböző farmakológiai amnézia-modellben

Az $\alpha 7$ nAChR agonista PHA-543613 prokognitív hatásait patkányok spontán alternálási tesztjében vizsgáltuk, ami a rágcsálók természetes explorációs viselkedését használja ki, ezért nincs szükség a kísérlet során jutalom alkalmazására. A spontán alternálási kísérleteket T-labirintusban végeztük, melynek elkészítésében Deacon és Rawlins (2006) [11] tanulmányában leírtakat követtük. A spontán alternációs tesztprotokollban többnyire Spowart-Manning és van der Staay (2004) [32] által közölt protokollt követtük csekély módosításokkal. A kísérleti ülések kezdetén a hím Wistar patkányokat a T-labirintus start karjába helyeztük, majd az ajtó felnyitása után az állatnak lehetősége nyílt az egyik

célkar felfedezésére. Miután a patkány visszatért a kiinduló pontra, 10 másodpercig visszatartottuk, majd az ajtó ismételt felnyitása után a következő próbában ismét választania kellett a két célkar közül. A térbeli munkamemória normális működése esetén az állat a labirintus optimális felderítése érdekében az ellenkező oldalra megy, mint amelyik kart az előző próba során meglátogatta – az ilyen helyes választásokat nevezzük alternálásnak. A kísérleteket 15 próba teljesítéséig vagy 25 percig végeztük, az alternáló választások és az összes lehetséges alternálás arányából pedig alternálási rátát számoltunk.

$$\text{Alternálási ráta} = \frac{\text{Alternáló választások száma}}{\text{Próbák száma} - 1}$$

A PHA-543613 hatásait a spontán alternálásra két különböző támadáspontú, farmakológiailag kiváltott amnézia-modellben vizsgáltuk: az első kísérletben mAChR antagonistá szkopolaminnal (0,5 mg/ttkg-os dózisban, i.p. adva a kísérlet előtt 10 perccel: Scop), míg a másodikban NMDAR antagonistá MK-801-el (0,1 mg/ttkg-os dózisban, s.c. adva, a kísérlet előtt 35 perccel: MK) idéztünk elő az alternálási teljesítmény romlásával járó tranzienst memóriazavart. A PHA-543613 beadása mindkét kísérletsorozatban 1 illetve 3 mg/ttkg-os dózisban (PHA1.0, PHA3.0), s.c. történt, 40 perccel a tesztelés előtt. Első kísérletsorozatunkban a következő kezelések hatásait hasonlítottuk össze: Scop önmagában, PHA1.0+Scop, PHA3.0+Scop. Második kísérletsorozatunk kezeléseit: MK önmagában, PHA1.0+MK, PHA3.0+MK. Mindkét kísérletsorozatot kiegyensúlyozott latin-négyzet elrendezésben végeztük, így minden állat alá lett vetve mindhárom (adott kísérletben vizsgált) kezelésnek. A különböző kezelések hatásait ismétléses ANOVA-val hasonlítottuk össze, az alternálási teljesítmény véletlen szinttől való eltérését pedig kétszélű binomiális teszt segítségével határoztuk meg.

3.2. Glutamáterg illetve kolinerg hatások és interakcióik vizsgálata a hippocampus neuronjain in vivo elektrofiziológiai módszerekkel

Az elektrofiziológiai kísérletek során altatott (klorál-hidrát, 400 mg/ttkg, i.p.) nőtény és hím Wistar patkányok dorsalis hippocampus-ának CA1-es piramisrejtés rétegéből (AP –3,5-5,0, ML 1,5-2,5, DV 1,8-3,4 mm a Bregmától, Paxinos és Watson, 2014 alapján [33]) extracellulárisan vezettük el a neuronok kisülését jelző tüskeaktivitást (spike). Az elvezetések a többcsatornás mikroelektrodok központi szénzáján keresztül történtek, a központi csatornát körülvevő kapillárisokon keresztül pedig mikroiontoforézissel jutattunk neuroaktív vegyületeket (NMDA, ACh) az idegsejtek közvetlen környezetébe.

3.2.1. *Neuronális szubpopulációk elkülönítése a hippocampus CA1-régiójában, a jelszeperálás validálása*

A hippocampus piramissejtes rétegében interneuronok is elhelyezkednek, melyeknek farmakológiai viselkedése jelentősen eltérhet a principális sejtektől, ezért szükségesnek ítéltük megfelelő szeperálási technika beállítását és validálását az általunk használt kísérleti elrendezésben. Irodalmi adatok alapján a CA1-es rétegben elektrofiziológiai szempontból két neuronpopuláció különíthető el (szimpla-tüzelésű illetve komplex-tüzelésű), melyek megkülönböztethetők a spike-ok hullámalakja, valamint jellegzetes tüzelési mintázatuk alapján, és megfelelnek az interneuronok illetve a piramissejtek csoportjának [34]. A két neuronpopuláció elektrofiziológiai elkülönítéséhez szükséges analízist a Klusters szoftverrel végeztük (Lynn Hazan, Rutgers Egyetem, NJ, USA) [35], az eredeti regisztráló programból (Spike2) a Klusters-be történő adatkonverziót saját fejlesztésű Spike2 szkripttel végeztük¹.

A továbbiakban elektrofiziológiai és farmakológiai markerek alapján teszteltük a szeperálás megbízhatóságát saját, egycsatornás extracelluláris elvezetésünk eredményei és többcsatornás elvezetésekkel készült irodalmi eredmények összehasonlításával. Ennek érdekében meghatároztuk a következő hullámalak paramétereit a szimpla- és komplex-tüzelésű csoportba sorolt spike-okon: 1.) a csúcs (angol: „peak”, P) és az ezt követő hullámvölgy (angol: „trough”, T) amplitudója, 2.) a csúcstól a hullámvölgyig mért amplitudó (P-T amplitudó), 3.) a két amplitudó aránya (P/T hányados), 4.) a csúcstól a hullámvölgyig mért idő (P-T idő), 5.) fél-csúcs szélesség (angol: half-peak duration, HPD). A továbbiakban összehasonlítottuk a két neuronpopuláció spontán tüzelési frekvenciáját (Hz), valamint iontoforetikusan alkalmazott NMDA-ra adott válaszaikat. A két neuronpopuláció hullámalak paramétereit és tüzelési frekvencia értékeit párosított statisztikai próbákkal elemeztük (Student t-teszt, vagy Wilcoxon előjeles rangteszt).

3.2.2. *Lokálisan adott NMDA-ra illetve ACh-ra adott tüzelési válaszok, valamint szisztémásan alkalmazott mAChR és $\alpha 7$ nAChR antagonisták hatásainak vizsgálata*

A további elektrofiziológiai kísérletekben már kizárólag a fenti módszerrel elkülönített piramissejtek tüzelési sajátosságait és farmakológiai érzékenységét vizsgáltuk. A kísérletek során mértük 1.) az idegsejtek spontán tüzelési aktivitását (Sp), 2.) iontoforézissel adott NMDA illetve 3.) ACh által kiváltott tüzelési frekvenciát (NMDA illetve ACh), valamint 4.) a két vegyület szimultán alkalmazása során az NMDA és ACh kombinált hatására (ACh_NMDA) fellépő tüzelési aktivitást. A négy tüzelési kondícióban kontroll értéket vettünk fel, majd az állatokat szisztémásan injektáltuk mAChR

¹ <http://www.neurobio.pte.hu/kutatas/sites/elfiz.html>

https://www.researchgate.net/publication/268980233_Export_data_from_Spike2_to_Klusters_Spike2_script

https://www.researchgate.net/publication/268980057_Import_data_from_Klusters_to_Spike2_Spike2_script

antagonista szkopolaminnal vagy $\alpha 7$ nAChR antagonista MLA-val, és vizsgáltuk, hogyan hat a két kolinolitikum a neuronok négyféle tüzelési kondícióban mért aktivitására. Vizsgáltuk továbbá, hogy az NMDA és az ACh kombinált alkalmazása szuperadditív módon növelte-e a neuronok tüzelési aktivitását a két vegyület önálló alkalmazásakor mérték összegéhez képest. Az elemzéshez a következő képletet használtuk [36]:

$$H_0: (NMDA - Sp) + (ACh - Sp) = ACh_NMDA - Sp$$

Az eredmények statisztikai analizéséhez több-tényezős hierarchikus lineáris modelleket használtunk R környezetben, a post-hoc összehasonlításokat Holm módszerével korrigáltuk (*lme4*, *lmerTest*, *lsmeans*, *ggplot2* csomagok).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Az $\alpha 7$ nAChR agonista PHA-543613 hatásainak vizsgálata a térbeli munkamemóriára két különböző farmakológiai amnézia-modellben

A mAChR antagonista szkopolamin hatására a patkányok (N=10) teljesítménye jelentősen romlott: az alternálási ráta $0,71 \pm 0,03$ -ról (átlag \pm standard hiba) $0,25 \pm 0,03$ -ra csökkent, ami $p < 0,01$ szinten szignifikáns különbség. A szkopolaminnal kezelt állatok továbbá nem mutattak alternáló magatartást, vagyis az alternálások aránya nem haladta meg szignifikánsan a véletlen szintet (0,5). A PHA-543613 nevű $\alpha 7$ nAChR agonista dózisfüggő módon fordította vissza a szkopolamin hatását. Annak ellenére, hogy a szkopolaminnal és a kisebb dózisu PHA-543613-mal kezelt állatok átlagos alternálási rátája ($0,45 \pm 0,07$) nem haladta meg szignifikánsan sem a véletlen szintet, sem a kizárólag szkopolaminnal történt kezelés után mért alternálási rátát, a PHA-543613 nagyobb dózisban már szignifikánsan növelte az alternálási teljesítményt a szkopolamin kezeléshez viszonyítva ($0,25 \pm 0,03$ szemben $0,59 \pm 0,06$ -tal; $p < 0,01$). Továbbá a szkopolaminnal és 3,0 mg/kg PHA-543613-mal kezelt állatok szignifikánsan a véletlenszerű alternálás szintje felett teljesítettek, és alternálási rátájuk nem tért el szignifikánsan a kontrolltól ($p > 0,05$), tehát a nagyobb dózisu PHA-543613 teljes mértékben visszafordította a szkopolamin amnesztikus hatását a térbeli munkamemória tekintetében.

A szkopolaminhoz hasonlóan az NMDA receptor antagonista MK-801 is szignifikánsan csökkentette a patkányok (N=14) alternálási rátáját ($0,71 \pm 0,02$ -ről $0,43 \pm 0,03$ -ra; $p < 0,001$), így az alternáló választások száma nem haladta meg a véletlen szintet. A kisebb dózisu PHA-543613-mal történt kezelés után az alternálási teljesítmény szignifikánsan nagyobb volt az NMDAR antagonista önmagában való alkalmazásakor mérthez képest (MK: $0,43 \pm 0,03$, ezzel szemben PHA1.0+MK: $0,56 \pm 0,02$; $p < 0,05$). A PHA1.0 kezelés azonban nem tudta visszafordítani teljes mértékben az MK-801 amnesztikus hatását, mivel az alternálási ráta továbbra is szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll

helyzetben mérténél (kontroll: $0,71 \pm 0,02$ illetve PHA1.0+MK: $0,56 \pm 0,02$; $p < 0,001$), és az alternáló karválasztások száma nem tért el a véletlen szinttől ($p = 0,1$). A nagyobb dózisu (3,0 mg/ttkg) PHA-543613 alkalmazása tesztünkben hatástalannak bizonyult az MK-801-el szemben, mivel az állatok alternálási rátája hasonló értéket vett fel, mint az NMDAR antagonistá önmagában való alkalmazásakor (MK: $0,43 \pm 0,03$ illetve PHA3.0+MK: $0,44 \pm 0,03$; $p = 0,95$). Tehát a PHA-543613 fordított U-alakú dózis-hatás görbét mutatott az MK-801-el kiváltott tranzien amnézia-modellben a térbeli munkamemória teljesítmény tekintetében a vizsgált dózistartományban. Mindezen eredményeink azt mutatják, hogy az $\alpha 7$ nAChR agonista PHA-543613 jó hatékonysággal képes visszafordítani egy kolinerg eredetű memória deficitet, azonban a vegyület nem elég hatékony akkor, ha az NMDAR-ok blokkolása áll a zavarok hátterében.

4.2. Glutamáterg illetve kolinerg hatások és interakcióik vizsgálata a hippocampus neuronjain *in vivo* elektrofiziológiai módszerekkel

4.2.1. Neuronális szubpopulációk elkülönítése a hippocampus CA1-régiójában, a jelszeparálás validálása

Első elektrofiziológiai kísérletsorozatunkban 44 idegsejtről vezettünk el extracelluláris elektromos jeleket altatott patkányok hippocampus-ának CA1-es régiójából, melyek közül 11 olyan felvételt találtunk, melyen szimultán vezettünk el komplex- és szimpla-tüzelésű neuronokról, így ezekben az elvezetésekben hasonlítottuk össze a szimpla-tüzelésű és komplex-tüzelésű neuronok elektrofiziológiai jellegzetességeinek illetve farmakológiai viselkedésének összehasonlítását.

A tüskék nagyságát illető mértékegységek közül nem találtunk különbséget a két elkülönített populáció között 1.) a csúcs (P) illetve a hullámvölgy (T) nagyságában és 2.) a P-T amplitudóban. Markánsan különbözött azonban a két populáció a két csúcs amplitudójának arányában (szimpla- illetve komplex-tüzelésű, sorban: $2,22 \pm 0,13$ illetve $1,54 \pm 0,10$; $p < 0,001$), valamint a két csúcs között eltelt időben (P-T idő: $0,283 \pm 0,016$ ms illetve $0,538 \pm 0,043$ ms, $p < 0,001$) és a fél-csúcs szélességben (HPD: $0,150 \pm 0,009$ ms illetve $0,201 \pm 0,015$ ms; $p < 0,01$). A szimpla- illetve komplex-tüzelésű spike-ok hullámalak paramétereiben talált különbségek megegyeznek az irodalomban leírtaknak [37,38], tehát ebből a szempontból sikeresen validáltuk a szeparációs technikánkat.

Annak ellenére, hogy a szimpla- és komplex-tüzelési neuronok spontán tüzelési aktivitásában nem találtunk különbséget, a komplex-tüzelésű sejtek NMDA-val kiváltott tüzelési frekvenciája szignifikánsan magasabb volt ($40,04 \pm 6,27$ Hz), mint a szimpla-tüzelésűeké ($9,86 \pm 2,06$ Hz; $p < 0,001$). A spontán tüzeléshez képest így a komplex-tüzelésű sejtek aktivitása átlagosan $58,0 \pm 23,0$ -szorosára növekedett NMDA hatására, míg a szimpla-tüzelésűeké csupán $11,4 \pm 3,6$ -szoros növekedést muta-

tott ($p < 0,01$). A komplex-tüzelésű neuronok nagyobb érzékenysége NMDA-ra irodalmi adatok alapján megerősíti, hogy az elektrofiziológiai alapon azonosított neuronpopuláció a piramissejteknek felel meg. A piramissejtek NMDA aktivációra mutatott nagyobb érzékenységét támasztják alá korábbi, *in vitro* rendszerekben mért elektrofiziológiai és kalcium-képződési vizsgálatok [39,40], továbbá a piramissejtek glutamát neurotoxicitásnak való nagyobb kitettségére és a felszínükön expresszált NMDA és AMPA receptorok arányaival kapcsolatos irodalmi adatok [41,42].

4.2.2. Lokálisan adott NMDA-ra illetve ACh-ra adott tüzelési válaszok, valamint szisztémásan alkalmazott mAChR és $\alpha 7$ nAChR antagonisták hatásainak vizsgálata

A második elektrofiziológiai kísérletsorozatban összesen 15 patkányból vezettünk el elektrofiziológiai jeleket. A NMDA és az ACh lokális hatásainak vizsgálata után 7 állaton szisztémásan alkalmazott szkopolamin, 8 állaton pedig az MLA hatásait vizsgáltuk.

A szisztémás kezelések előtti kontroll mérések összehasonlítása azt mutatta, hogy az NMDA és az ACh hasonló mértékben és szignifikánsan növelte a piramissejtek tüzelési frekvenciáját (Sp: $5,6 \pm 2,0$ Hz; NMDA: $58,5 \pm 8,9$ Hz, Sp – NMDA: $p < 0,001$; ACh: $59,3 \pm 9,2$ Hz, Sp – ACh: $p < 0,001$), a két ligand szimultán iontoforézise pedig még nagyobb mértékű tüzelési aktivitás növekedést váltott ki (ACh_NMDA: $125,4 \pm 13,2$ Hz, Sp – ACh_NMDA: $p < 0,001$). A kombinált iontoforetikus beadás szuperadditív hatású volt, mivel szignifikánsan nagyobb tüzelési frekvencia növekedést idézett elő ($121,3 \pm 13,6$ Hz), mint a NMDA és az ACh önmagában történő iontoforézisekor mért hatások összege ($99,6 \pm 12,5$ Hz, $F(1, 11) = 5,95$; $p < 0,05$), ami egy olyan mechanizmus életbelépésére utal, ami az egyszerű kezelések során nem befolyásolja a tüzelési frekvenciát. Feltételezzük, hogy a szuperadditív hatás a glutamáterg szinapszisok kolinerg facilitációjával magyarázható, amit irodalmi adatok is alátámasztanak [43,44].

A szkopolamin beadása után nem mutattunk ki változást a spontán tüzelési aktivitásban, azonban az NMDA-val, az ACh-nal illetve a kombinált kezeléssel (ACh_NMDA) kiváltott tüzelési frekvencia szignifikánsan csökkent a mAChR antagonista hatására. Konkrétan, 30 perccel a szkopolamin beadása után az NMDA-val kiváltott tüzelési frekvencia $64,6 \pm 13,2$ Hz-ről $39,9 \pm 19,3$ Hz-re ($p < 0,05$), az ACh-nal kiváltott tüzelési aktivitás $51,8 \pm 12,9$ Hz-ről $3,0 \pm 1,6$ Hz-re ($p < 0,001$), míg a kombinált iontoforézissel kiváltott tüzelés (ACh_NMDA) $117,0 \pm 18,1$ Hz-ről $56,5 \pm 20,1$ Hz-re csökkent ($p < 0,001$). Vizsgáltuk továbbá a szkopolamin hatását a szuperadditív változókra, és azt találtuk, hogy mindkét származtatott változó hasonló mértékben, egymással párhuzamosan csökkent (IDŐ főhatás: $F(3, 17) = 27,58$; $p < 0,001$), és a szuperadditív hatás mindvégig megmaradt (ADDITIVITÁS főhatás: $F(1, 6,1) = 8,92$; $p < 0,05$). A szkopolamin tehát markánsan blokkolta a lokálisan felszabadított ACh serkentő hatását a piramissejtek tónusos tüzelésére, azonban nem befolyásolta az ACh-nak az

NMDA-val kiváltott tüzelést facilitáló hatását. Ebből arra következtettünk, hogy a glutamáterg neurotranszmisszió kísérletünkben kimutatott kolinerg potencírozásához nem járultak hozzá kritikus mértékben a mAChR-ok vagy a szkopolamin ebben a farmakológiailag releváns dózisban alkalmazva nem kötődik a preszinaptikus mAChR-okhoz.

Az $\alpha 7$ nAChR antagonistá MLA a beadástól eltelt 30 percen belül nem módosította sem a spontán tüzelési frekvenciát, sem az NMDA-val illetve ACh-nal gerjesztett tüzelés frekvenciáját, a NMDA és ACh együttes iontoforézisének hatását viszont szignifikánsan csökkentette, ami 30 perc elteltével a beadás előtt mért $139,4 \pm 17,7$ Hz-ről $91,7 \pm 14,7$ Hz-re csökkent ($p < 0,05$). A szuperadditivitási változók analízise során azt találtuk, hogy az MLA beadása után a NMDA és az ACh szimultán iontoforézisének hatása lecsökkent a két ligand önálló hatásával megegyező szintre, és az utolsó mérési pontban már nem volt kimutatható a kombinált kezelés szuperadditív hatása ($103,6 \pm 18,7$ Hz illetve $88,8 \pm 15,0$ Hz; $F(1, 6) = 1,45$; $p = 0,27$). Az MLA szisztémás beadásával végzett kísérletekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a lokálisan felszabaduló ACh tónusos tüzelést moduláló hatása csak kis mértékben függ az $\alpha 7$ nAChR-októl, azonban ezeken a receptorok kritikus szerepet játszanak a glutamáterg terminális működésének kolinerg potencírozásában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunkban két szinten (magatartás-farmakológia és *in vivo* egy-sejt elektrofiziológia) tanulmányoztuk a kolinerg és glutamáterg transzmisszió kölcsönhatásait a memóriafolyamatok szempontjából. Magatartás-farmakológiai kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a PHA-543613 dózisfüggően és teljes mértékben visszafordította a szkopolamin által kiváltott memóriadeficitet, azonban nem elég hatékony, ha a NMDAR-ok működését blokkoltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy az $\alpha 7$ nAChR agonisták kognitív serkentő hatása nagy mértékben összefügg az NMDAR-ok működésével, és hatékonyságukhoz elengedhetetlen megfelelő mértékben fenntartott, NMDAR-okon keresztül megvalósuló glutamáterg neurotranszmisszió.

Elektrofiziológiai munkánk során első lépésben a laboratóriumunkban használt extracelluláris elvezetési technika optimalizálását végeztük el annak érdekében, hogy a hippocampus CA1-es piramissejtes rétegében a principális sejtjeit és interneuronjait megbízhatóan elkülöníthessük elektrofiziológiai jelük alapján. A metodológiai munka során a Spike2 és Klusters szoftverek közötti adatkonverziót szolgáló szkript fejlesztésére is sor került. A szeparálás során két csoportba sorolt spike-ok hullámalak paraméterei az irodalmi adatokkal megegyező különbséget mutattak, valamint a komplex-tüzelésű sejtek lényegesen nagyobb érzékenységet mutattak NMDA-ra, ami megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a két neuronpopuláció jó megbízhatósággal megfeleltethető a piramissejtek illetve interneuronok csoportjainak. Az eredmények egyúttal megerősítik, hogy a

mikroiontoforézissel kombinált egycsatornás extracelluláris elvezetési technika is alkalmas a piramissejtek és az interneuronok szelektív vizsgálatára.

További elektrofiziológiai kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a lokálisan alkalmazott NMDA és ACh a hippocampalis piramissejtek aktivitását, valamint milyen interakció figyelhető meg hatásaikban együttes alkalmazásuk során, és ezekben a mechanizmusokban mely kolinerg receptor-típusok játszanak szerepet. A hippocampus CA1-es piramissejtjein az ACh-nak két jól körülírható hatását különítettük el: 1.) egy tónusos aktiváló hatást, ami a neuronok tüzelési frekvenciáját fokozza, valamint 2.) a glutamáterg szinapszisokkal összefüggő, NMDAR-on keresztüli transzmissziót potencírozó hatást. Szkopolaminnal és MLA-val végzett szisztémás kezelések nyomán megállapítottuk, hogy az ACh lokális hatásai közül a tónusos aktiváló hatás elsősorban a mAChR-okhoz kötődik, míg a glutamáterg transzmisszió potencírozása főleg az $\alpha 7$ nAChR-okon keresztül valósul meg.

Magatartás-farmakológiai és elektrofiziológiai eredményeink egymással összhangban *in vivo* rendszerekben demonstrálják az $\alpha 7$ nAChR és az NMDAR kölcsönhatását, valamint a kolinerg és a glutamáterg neurotranszmisszió interakciójának kritikus szerepét a kognitív folyamatokban. Kutatásunk hasznos adatokat biztosíthat továbbá a különböző farmakológiailag indukált amnézia-modellekben (szkopolamin, MK-801, MLA) mért eredmények interpretálásához, az általunk beállított elektrofiziológiai teszt-protokoll pedig a továbbiakban alkalmas lehet potenciális kognitív serkentő farmakonok celluláris elektrofiziológiai szintű hatásmechanizmusainak vizsgálatára.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] ROSENZWEIG MR, BENNETT EL, COLOMBO PJ, LEE DW, SERRANO PA (1993). Short-term, intermediate-term, and long-term memories. *Behav Brain Res* 57:193–8.
- [2] TULVING E (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53:1–25.
- [3] TULVING E, SCHACTER DL, MCLACHLAN DR, MOSCOVITCH M (1988). Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. *Brain Cogn* 8:3–20.
- [4] SCOVILLE WB, MILNER B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21.
- [5] LEUNG HC, GORE JC, GOLDMAN-RAKIC PS (2002). Sustained mnemonic response in the human middle frontal gyrus during on-line storage of spatial memoranda. *J Cogn Neurosci* 14:659–71.
- [6] FUNAHASHI S (2006). Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience* 139:251–61.
- [7] O'KEEFE J, DOSTROVSKY J (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–5.
- [8] FYHN M, MOLDEN S, WITTER MP, MOSER EI, MOSER MB (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305:1258–64.
- [9] TOLMAN EC (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55:189–208.
- [10] OLTON DS, SAMUELSON RJ (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2:97–116.
- [11] DEACON RMJ, RAWLINS JNP (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* 1:7–12.
- [12] MORRIS R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- [13] AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013). Neurocognitive Disorders. *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders*. (5th ed.), American Psychiatric Association, Washington, DC.
- [14] O'CARROLL R (2000). Cognitive impairment in schizophrenia. *Adv Psychiatr Treat* 6:161–8.
- [15] GOLDMAN-RAKIC P., HAVEN N (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477–85.
- [16] BLISS T, LOMO T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331–56.
- [17] TSIEN JZ, HUERTA PT, TONEGAWA S (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327–38.
- [18] TAKAHASHI T, SVOBODA K, MALINOW R (2003). Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. *Science* 299:1585–8.
- [19] SARTER M, BRUNO JP (1999). Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: Differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* 95:933–52.
- [20] MESULAM MM, MUFSON EJ, WAINER BH, LEVEY AI (1983). Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). *Neuroscience* 10:1185–201.
- [21] HASSELMO ME (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710–5.
- [22] DOUCHAMPS V, JEEWAJEE A, BLUNDELL P, BURGESS N, LEVER C (2013). Evidence for encoding versus retrieval scheduling in the hippocampus by theta phase and acetylcholine. *J Neurosci* 33:8689–704.
- [23] SCHAEFFER EL, GATTAZ WF (2008). Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)* 198:1–27.
- [24] MARTIN LF, FREEDMAN R (2007). Schizophrenia and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Int Rev Neurobiol* 78:225–46.
- [25] VAN DAM D, DE DEYN PP (2006). Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5:956–70.

- [26] BUCCAFUSCO JJ (2009). The Revival of Scopolamine Reversal for the Assessment of Cognition-Enhancing Drugs. In: Buccafusco JJ (eds.): *Methods Of Behavior Analysis In Neuroscience*. (2nd ed.), p. 329–43., CRC Press, Boca Raton (FL).
- [27] ELLISON G (1995). The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev* 20:250–67.
- [28] LANE RM, KIVIPELTO M, GREIG NH (2004). Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol* 27:141–9.
- [29] PARSONS CG, 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.
- [30] WALLACE TL, PORTER RHP (2011). Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol* 82:891–903.
- [31] PICHAT P, BERGIS OE, TERRANOVA JP, URANI A, DUARTE C, SANTUCCI V, GUEUDET C, VOLTZ C, STEINBERG R, STEMMELIN J, OURY-DONAT F, AVENET P, GRIEBEL G, SCATTON B (2007). SSR180711, a novel selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist: (II) efficacy in experimental models predictive of activity against cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 32:17–34.
- [32] SPOWART-MANNING L, VAN DER STAAY FJ (2004). The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behav Brain Res* 151:37–46.
- [33] PAXINOS G, WATSON C (2014). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. (7th ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- [34] CSICSVARI J, HIRASE H, CZURKO A, BUZSÁKI G (1998). Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron* 21:179–89.
- [35] HAZAN L, ZUGARO M, BUZSÁKI G (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *J Neurosci Methods* 155:207–16.
- [36] TRUNK A, STEFANICS G, ZENTAI N, BACSKAY I, FELINGER A, THURÓCZY G, HERNÁDI I (2015). Effects of concurrent caffeine and mobile phone exposure on local target probability processing in the human brain. *Sci Rep* 5:14434.
- [37] MIZUSEKI K, SIROTA A, PASTALKOVA E, BUZSÁKI G (2009). Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64:267–80.
- [38] FOX SE, RANCK JB (1981). Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Exp Brain Res* 41-41:399–410.
- [39] MARTINA M, COMAS T, MEALING GAR (2013). Selective Pharmacological Modulation of Pyramidal Neurons and Interneurons in the CA1 Region of the Rat Hippocampus. *Front Pharmacol* 4:24.
- [40] SEGAL M, GREENBERGER V (1992). Acidic amino acids evoke a smaller [Ca²⁺]_i rise in GABAergic than non-GABAergic hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 140:243–6.
- [41] AVIGNONE E, FRENGUELLI BG, IRVING AJ (2005). Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur J Neurosci* 22:3077–90.
- [42] NYÍRI G, STEPHENSON F, FREUND T, SOMOGYI P (2003). Large variability in synaptic n-methyl-d-aspartate receptor density on interneurons and a comparison with pyramidal-cell spines in the rat hippocampus. *Neuroscience* 119:347–63.
- [43] MARKRAM H, SEGAL M (1990). Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol* 427:381–93.
- [44] MARKRAM H, SEGAL M (1990). Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 113:62–5.