

Kognitív hatású anyagok fMRI vizsgálata

Doktori tézisek

dr. Hegedűs Nikolett

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Tihanyi Károly tudományos tanácsadó, C.Sc.

Hivatalos bírálók:

Dr. Tábi Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Tarnawa István csoportvezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Bagdy György egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Világi Ildikó egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Gál Viktor kutató, Ph.D.

Budapest
2016

Bevezetés

A kogníció egy komplex mentális folyamat, mely fontos szerepet játszik a figyelemben, probléma megoldásban, döntés hozatalban és a working, vagy másnéven munka memóriában. Több agyterület is érintett e folyamatban, többek között a prefrontális kéreg (PFC), a hippocampus, a temporális és a parietális kéreg is. Neurológiai és pszichiátriai betegségek gyakran társulnak kognitív hanyatlással, mely a mild cognitive impairment-től (MCI) a különböző demenciákig terjedve befolyásolja a mindennapi életet. Mindezek mellett a természetes öregedési folyamatok is jelentős hatást gyakorolnak a kognitív képességekre.

A kognitív hanyatlás teljes patológiai háttere sajnos még nem ismert, így terápiája jelenleg nem megoldott. Több állatmodell létezik már, mely a patomechanizmus jobb megértését és ezáltal egy hatásos kezelés kifejlesztését célozza több-kevesebb sikerrel. Ezen állatmodellek azonban kis transzlációs erővel bírnak, így alkalmatlanok arra, hogy nagy pontossággal előre vetítsék a szer humán szervezetre kifejtett hatásait. Mindezek együttesen hatalmas terhet rónak a gyógyszercégekre és a kutatókra egyaránt. Jelenleg a prokognitív szerek kutatása és fejlesztése az egyik legnagyobb kihívás a gyógyszeripar számára. Számos negatív klinikai fázisvizsgálat igazolja a meglévő állatmodellek alacsony prediktív értékét és hívja fel a figyelmet új targetek keresésére.

Az utóbbi időben elterjedt kisállatok vizsgálatára alkalmas funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (MRI) hatékony transzlációs módszernek mondható, mely radioaktív sugárzástól mentes, non-invazív vizsgálatokat tesz lehetővé kontrasztanyag alkalmazása nélkül. Transzlációs ereje abban rejlik, hogy hasonló mérési körülmények között mind az állat, mind a humán kísérletek elvégezhetőek. A kinyert biokémiai, strukturális és funkcionális információkból egyértelmű következtetések vonhatóak le az agy fiziológiás integrációjára vonatkozólag. E nagy transzlációs erővel rendelkező képalkotó modalitás lehetővé teszi farmakonok centrális és perifériás hatásainak vizsgálatát is (phMRI – farmakológiai MRI). Az eredményeket a kognitív kutatásokban elterjedt viselkedésfarmakológiai tesztekkel (vízi labirintus teszt) összevetve a módszer könnyen validálhatóvá válik.

Kognitív folyamatokban elengedhetetlen fontosságú a kolinerg neurotranszmitter rendszer ép működése és részvétele. Az acetilkolin (Ach) mint fő ingerületátvivő anyag muszkarinerg és nikotinerg receptorain keresztül fejti ki hatását testszerte. A

muszkarinerg antagonistá szkopolamin centrális kolinerg deficitet létrehozva képes kognítív romlást előidézni mind az emberi, mind az állati szervezetben. Kognítív kutatásokban való széles körű elterjedését reverzibilis antagonistá tulajdonsága magyarázza, mely lehetővé teszi alkalmazását különböző memória fényesítő drogok tesztelésében. A szkopolamin kognítív képességeket rontó tulajdonságához feltételezhetően hozzájárul a szer vaszkuláris rendszerre gyakorolt hatása is.

Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki egy preklinikai kutatásokban használatos, nagy transzlációs erejű, nagy térbeli és időbeli felbontású fMRI provokációs állatmodell kifejlesztését, mely alkalmas különböző hatásmechanizmusú memória fényesítő ágensek tesztelésére. A munkafolyamat főbb lépéseit az alábbi pontokban foglaltam össze:

- Első lépésként munkacsoportommal a gold standardként ismert szkopolamin alapú provokációs állatmodell optimalizálását tűztük ki célul a rendelkezésünkre álló MRI készülék tulajdonságai alapján. Szerettük volna meghatározni a mérésünk szempontjából optimális anyagadási módot, valamint az anyagadás előtti és utáni mérési idők hosszát. A modell kidolgozását követően, a memóriarontó szkopolamint több különböző dózisban (1-5 mg/kg) teszteltük, hogy dózis-hatás görbéjét felállítva meghatározhassuk a maximális farmakológiai hatás kiváltásához szükséges minimális dózist.
- Ezt követően több különböző kereskedelmi forgalomban kapható memóriajavító ágenszt (donepezil, piracetam, vinpocetin) teszteltünk szkopolamin-alapú provokációs modellünkben.
- Vizsgáltunk két ígéretesnek tűnő kognítív javító vegyületet (EVP-6124, PNU-120596), melyek jelenleg fejlesztési fázisban vannak. A jelölt farmakonoktól az előzetesen publikált adatok alapján kognítív javulást és növekvő BOLD jelet vártunk a kognícióban kiemelt szerepet játszó agyi régiókban.
- A Richter Gedeon Gyógyszergyár által újonnan fejlesztett RG2260 nevű vegyületről jelenleg limitált mennyiségű farmakokinetikai és farmakodinámiás adattal rendelkezünk. Ezek alapján célul tűztük ki a kérdéses vegyület dózis-hatás

görbájének vizsgálatát modellrendszerünkben, valamint az ágens minimális effektív dózisának meghatározását.

- A két, Richter Gedeon Gyógyszergyár által fejlesztett vegyület (vinpocetin, RG2260) szerkezeti hasonlóságát alapul véve, szeretnénk volna összehasonlítani a vegyületek hatékonyságát és meghatározni mindkét esetben azt a minimális dózist, mely közel azonos kognitív javulást eredményez.
- Feltételezve a kognitív folyamatok centrális és vaszkuláris szabályozottságát, célunk volt a kognitív hanyatlás vaszkuláris komponensének vizsgálata. Kognitív rontó vegyületként butilszkopolamint (buscopan) alkalmaztunk, mely szerkezetéből adódóan képtelen átjutni a központi idegrendszert védő véragy-gáton. A vaszkuláris komponens jelenlétét feltételezve, romló kognitív képességekre és csökkenő BOLD jelre számítottunk a releváns agyterületeken.
- Ezt követően célunk volt a kognitív javulás vaszkuláris komponensének vizsgálata neosztigmin nevű vegyület segítségével. Ezen vegyület szerkezetéből adódóan szintén nem képes átjutni a véragy-gáton, így hatását perifériásan fejti ki. Ebben az esetben javuló kognitív képességekre és növekvő BOLD jelre számítottunk a kognícióban szerepet játszó agyi régiókban.
- Végül, az fMRI mérések során kapott eredményeinket szeretnénk volna egy kognitív kutatásokban már régóta elfogadott és használt módszer (vízi labirintus teszt) eredményeivel összehasonlítani. A viselkedésfarmakológiai mérések hasonló kísérleti protokoll alapján zajlottak mint az fMRI mérések, így ez eredmények tekintetében is hasonló változásokra számítottunk.

Módszerek

fMRI mérés

Méréseinket kizárólag hím Wistar patkányokon (240-260 g) végeztük, melyek az állatvédelmi törvények előírásainak megfelelő körülmények között voltak tartva. Az állatok altatása izoflurán (Sigma-Aldrich) inhalációs narkotikummal történt 5%-os kezdeti dózisban, melyet a mérés során 1.5 %-ra csökkentettünk. A későbbi, mágnesben történő anyagadáshoz minden állat farokvénájába kanült helyeztünk. Ezután kerültek a kísérleti állatok a 9.4 T Varian MRI készülékbe. A felvételek készítéséhez az állatok fejére fejtekercs került, mely a mérés alapját képező rádiófrekvenciás impulzusokat

bocsájtotta ki. A keletkező jeleket a fej dorzális felszínéhez helyezett vevő tekerccsel detektáltuk. A mérés során nagy felbontású anatómiai, T1-súlyozású és kisebb felbontású funkcionális, T2*-súlyozású felvételek készültek (9 szelet, 1 mm szeletvastagság, 0.2 mm rés).

Minden mérés egy 1000 szekundum hosszú kontroll periódus (baseline) felvételével kezdődött, mely elengedhetetlen fontosságú volt a szignifikáns anyaghatások megállapításához. 1000 másodperc elteltével történt a memóriarontó ágens (szkopolamin-hidrobromid, buscopan/butilszkopolamin – Sigma-Aldrich) adása intravénásan egy egyedileg kifejlesztett anyagbeadó automata segítségével. A prokognitív szerek (Sigma-Aldrich) intraperitoneálisan kerültek beadásra a kognitív rontó ágens injektálását megelőzően egy órával a megfelelő oldószerben oldva (saline – donepezil-hidroklorid, piracetam, neosztigmin-bromid; 5% Tween 80 - vinpocetin, PNU-120596, EVP-6124, RG2260). A pontos adagolási protokoll az 1. táblázatban olvasható:

1. táblázat fMRI mérések során alkalmazott prokognitív szerek adagolási protokollja

| | Oldószer | Adagolási mód | Alkalmazott dózisok (mg/kg) |
|--------------------|-----------------|----------------------|------------------------------------|
| Donepezil | Saline | i.p. | 1; 4; 10 |
| Piracetam | Saline | i.p. | 100; 500; 1000 |
| Vinpocetin | 5% Tween 80 | i.p. | 5 |
| PNU-120596 | 5% Tween 80 | i.p. | 3 |
| EVP-6124 | 5% Tween 80 | i.p. | 1 |
| Neosztigmin | Saline | i.p. | 0.01; 0.03, 0.1; 0.3 |
| RG2260 | 5% Tween 80 | i.p. | 1.25 |

Az adatok kiértékelését egy speciális, laborunk által készített Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) script segítségével végeztük. Az első lépésként végzett mozgáskorrekció során az egy voxelnél nagyobb elmozdulást tartalmazó képek kizárásra kerültek a további analízisből. A funkcionális felvételek minden egyes voxelére kétmintás t-próbát végezve az anyagadás előtti és utáni időpontokban, meghatároztuk azon agyterületeket ahol szignifikáns változás történt. Az analízis eredményeként színekódolt, 9 szeletes t-térképeket kapunk.

Paxinos & Watson Rat Brain Atlas-a alapján ROI (region of interest) analízist végezve az egyes ROI-kból származó jeleket átlagoltuk. Az anyagadás előtti és utáni

időpontok átlagolt ROI értékeiket ANOVA (Statistica 8.0, StatSoft, USA, Tulsa) teszt segítségével értékeltük ki és post-hoc Fisher tesztet végezve vizsgáltuk a csoportok közti szignifikanciát.

Viselkedésfarmakológiai mérés

Méréseinket hím Wistar patkányokon (n = 10 per csoport; 180-200 g) végeztük. Az éles tesztek előtt az állatok kondicionáláson vettek részt, ahol hozzászoktak a vízes környezethez, a labirintushoz és a vízbe helyezett emelvényhez. A tesztek során az állatoknak három alkalommal kellett döntést hozniuk a labirintusban úszva, kiválasztva a helyes továbbhaladási irányt, hogy elérhessék az emelvényt. Az elkövetett hibák számából következtetéseket vontunk le az állatok memóriáját és tanulási képességeit illetően.

A kognitív rontó ágens (szkopolamin-hidrobromid, buscopan/butilszkopolamin – Sigma-Aldrich) adása fél órával a tesztek elvégzése előtt történt intraperitoneális formában. A javító ágensek (Sigma-Aldrich) tesztelése során a prokognitív szer adása mindig a szkopolamin/buscopan kezelést megelőzően történt per os szondán keresztül (kivéve neosztigmin-bromid, RG2260). Az anyagadási formák és az alkalmazott dózisok a viselkedésfarmakológiai mérések esetében kismértékben eltértek az MRI mérések során alkalmazottaktól, mely a mérések érzékenységekülönbségével magyarázható. A pontos adagolási protokoll a 2. táblázatban olvasható:

2. táblázat Viselkedésfarmakológiai tesztek során alkalmazott prokognitív szerek adagolási protokollja

| | Oldószer | Adagolási mód | Alkalmazott dózisok (mg/kg) |
|--------------------|-----------------|----------------------|------------------------------------|
| Donepezil | 5 % Tween 80 | p.o. | 0.25; 0.5; 1; 4; |
| Piracetam | Desztillált víz | p.o. | 500; 750; 1000 |
| Vinpocetin | Aszkorbinsav | p.o. | 5; 7.5; 10 |
| PNU-120596 | PEG 400 | p.o. | 3; 10 |
| EVP-6124 | 5 % Tween 80 | p.o. | 0.3; 1; 3 |
| Neosztigmin | 5 % Tween 80 | i.p. | 0.3 |
| RG2260 | 5 % Tween 80 | i.p. | 0.625; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 |

Mérési eredményeinket ANOVA (Statistica 8.0, StatSoft, USA, Tulsa) teszt segítségével értékeltük ki és post-hoc Duncan tesztet végezve vizsgáltuk a csoportok

közti szignifikanciát. A kognitív javító ágensek hatékonyságát az alábbi formula segítségével számoltuk:

$$\% = \frac{N_{\text{err}} \text{ (butil)szkopolamin} - N_{\text{err}} \text{ nootróp}}{N_{\text{err}} \text{ (butil)szkopolamin} - N_{\text{err}} \text{ kontroll}} \times 100$$

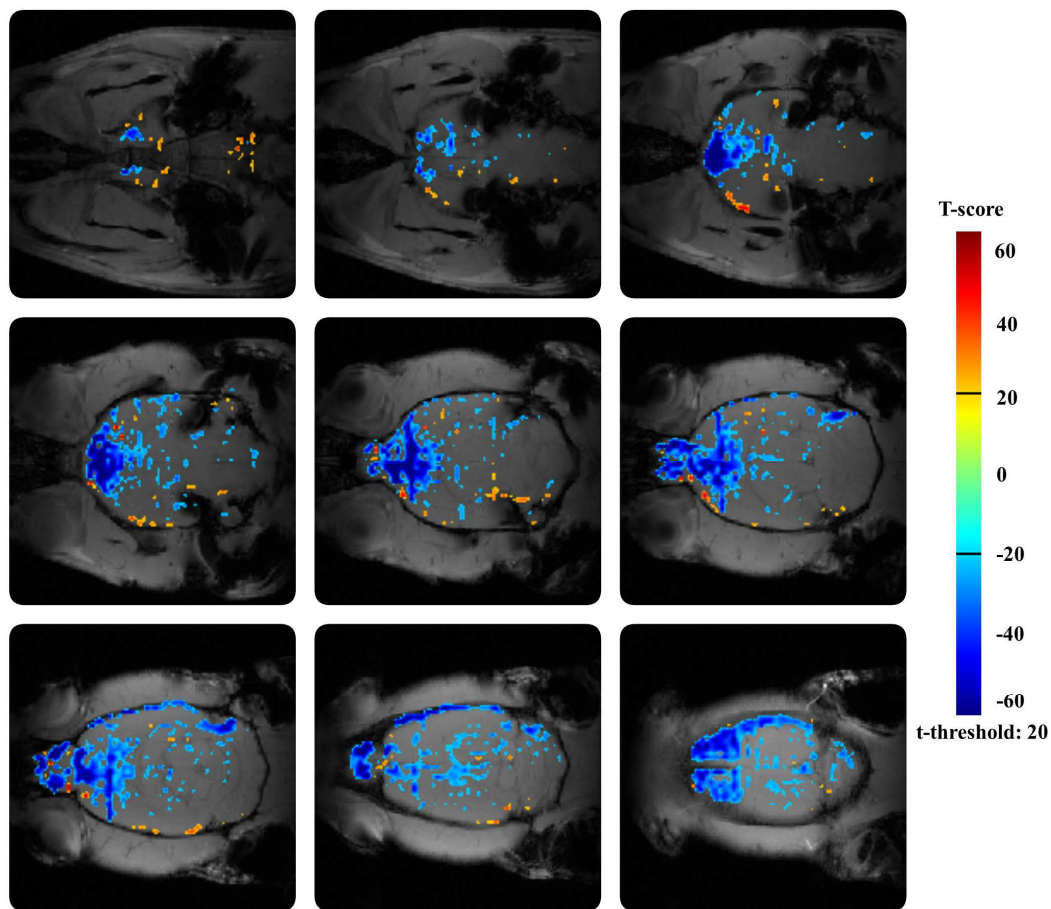
N_{err} - hibák száma.

Eredmények

fMRI mérés

A kognitív rontó **szkopolamin** hatására szignifikáns (1 mg/kg, n=85, $p < 0.001$) aktivitás csökkenés volt megfigyelhető az állatok prefrontális kérgében, míg a hosszútávú memóriában központi szerepet betöltő hippocampális területek nem mutattak szignifikáns aktivitásváltozást (1. ábra).

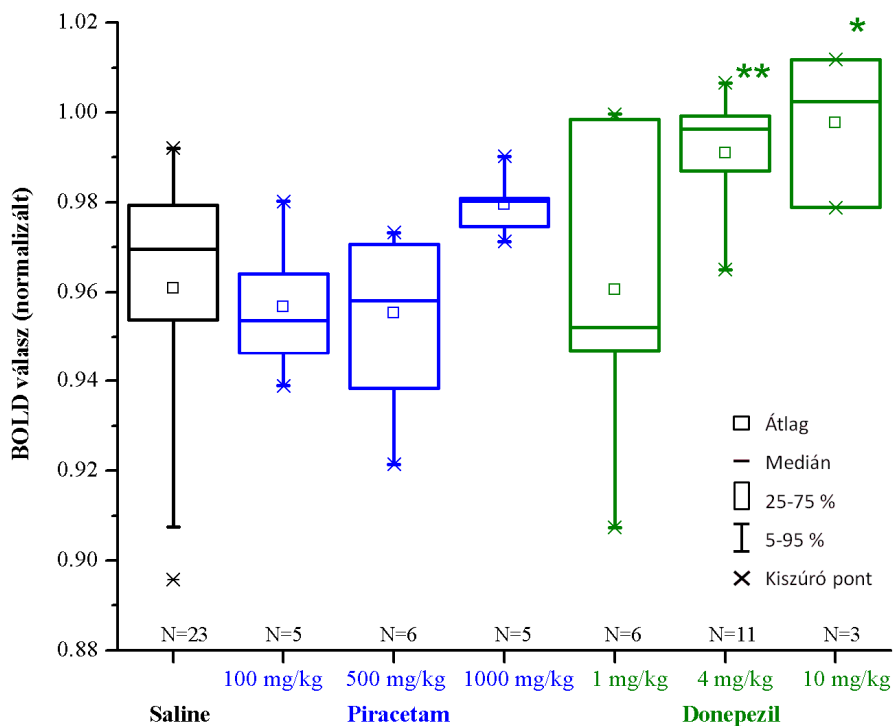
A szkopolamin butil analógját (**butilszkopolamin**) vizsgálva, hasonló eredményeket kaptunk. 1 mg/kg dózisban alkalmazva a kognitív rontó ágenszt szignifikáns (n=7, $p < 0.05$) BOLD jel csökkenést regisztráltunk a PFC területén, míg más agyterületek esetében nem volt szignifikáns változás.



1. ábra A kognitív rontó szkopolamin BOLD válaszra gyakorolt hatása saline előkezelést követően. Erőteljes BOLD jel csökkenés figyelhető meg a patkány prefrontális kérgi területén.

A vízdékony prokognitív szerek hatását (donepezil, piracetam, neosztigmin) önálló adás mellett is megvizsgáltuk. A **donepezillel** kezelt állatok felvételein 1 mg/kg-os dózist alkalmazva nem volt észlelhető BOLD jel változás, 4 mg/kg-os dózist tesztelve gyenge jelnövekedést lehetett észlelni 10-15 perccel az anyagadást követően a kérgi és hippocampális területeken. Növelve a dózist, 10 mg/kg donepezil adását követően rövid és gyenge BOLD jel növekedés volt megfigyelhető az egész agyban, mely lassú lecsengést mutatott. Önálló **piracetam** adás hatására a vizsgált agyterületek gyors, rövid, dóziszfüggő BOLD jel növekedéssel reagáltak. A **neosztigmin**, hasonlóan a donepezilhez, önálló adás mellett nem mutatott szignifikáns aktivitásváltozást a vizsgált agyterületeken. **Vinpocetin**, **EVP-6124**, **PNU-120596** és az **RG2260** önálló hatásainak vizsgálatát a vegyületek gyenge vízdékonyasága nem tette lehetővé.

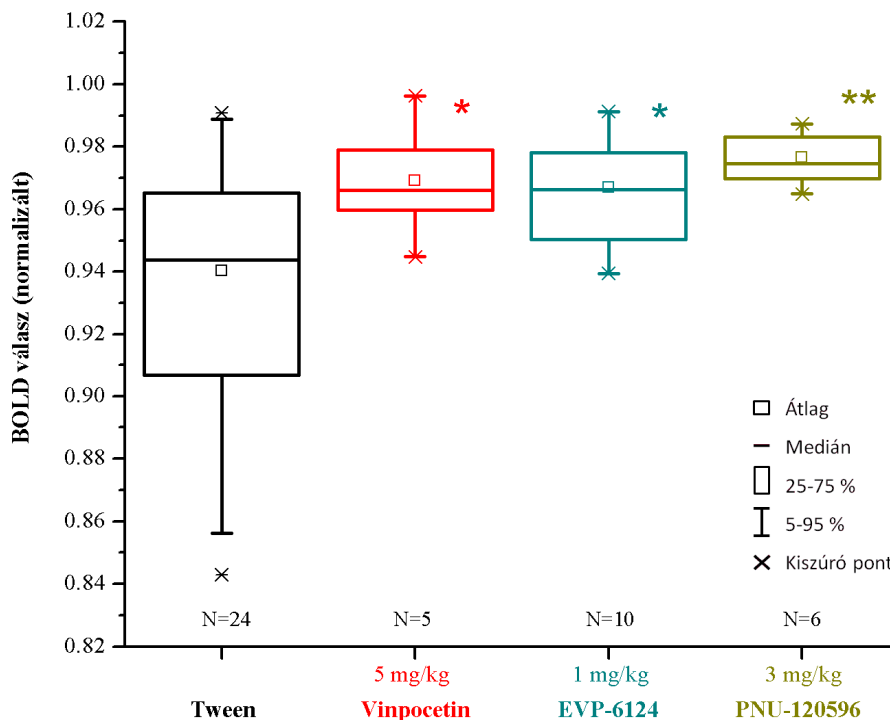
Provokációs modellben vizsgálva a memória fényesítő ágenseket az alábbi eredményeket kaptuk: **Piracetam** esetében a legnagyobb 1000 mg/kg-os dózis (n=5) mutatott csupán enyhe BOLD jel változást, azonban hatékonysága nem közelítette meg a donepezilét. 4 mg/kg-os dózisban alkalmazva a reverzibilis kolinészteráz inhibitor **donepezil**, szignifikáns (n=11, $p<0.01$) változásokat tapasztaltunk, ugyanis a farmakon teljes mértékben képes volt kivédeni a memóriarontó ágens hatását. A nagyobb, 10 mg/kg-os dózissal (n=3) végzett méréseket a fellépő súlyos mellékhatások miatt megszakítottuk (2. ábra).



2. ábra Piracetam és donepezil előkezelés hatásai a szkopolamin által kiváltott BOLD jel változásra a PFC területén. A piracetam 100, 500 és 1000 mg/kg-os dózisban, míg a donepezil 1, 4 és 10 mg/kg-os dózisban intraperitoneálisan lett injektálva. A szkopolamin kezelés 1 mg/kg-os intravénás dózissal történt. (ANOVA, Fisher post-hoc teszt; * $p<0.05$; ** $p<0.01$)

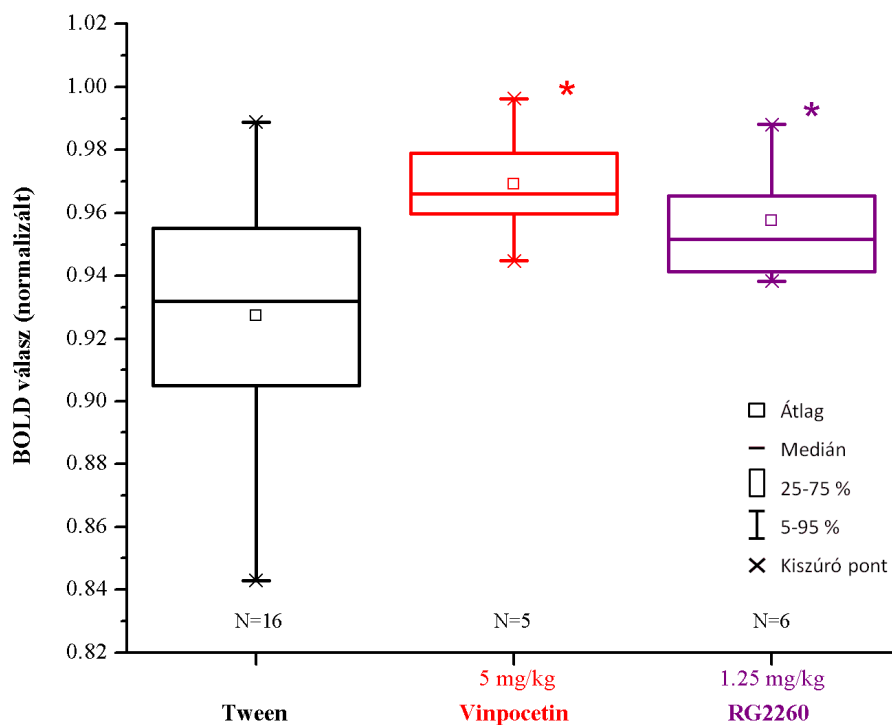
5 mg/kg-os dózisban vizsgálva a Richter Gedeon Nyrt. Cavinton nevű gyógyszerének hatóanyagát (**vinpocetin**, n=5, $p<0.05$) szignifikáns változást tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest. A farmakon képes volt kivédeni a memóriarontó ágens káros hatásait. Az alfa 7 nikotinergerceptor ortosztérikus agonista **EVP-6124** 1 mg/kg-os dózisban (n=10, $p<0.05$), míg az alfa 7 nikotinergerceptor

pozitív allosztérikus modulátor **PNU-120596** 3 mg/kg-os dózisban (n=6, $p<0.01$) bizonyult hatékonynak tesztjeink során (3. ábra).



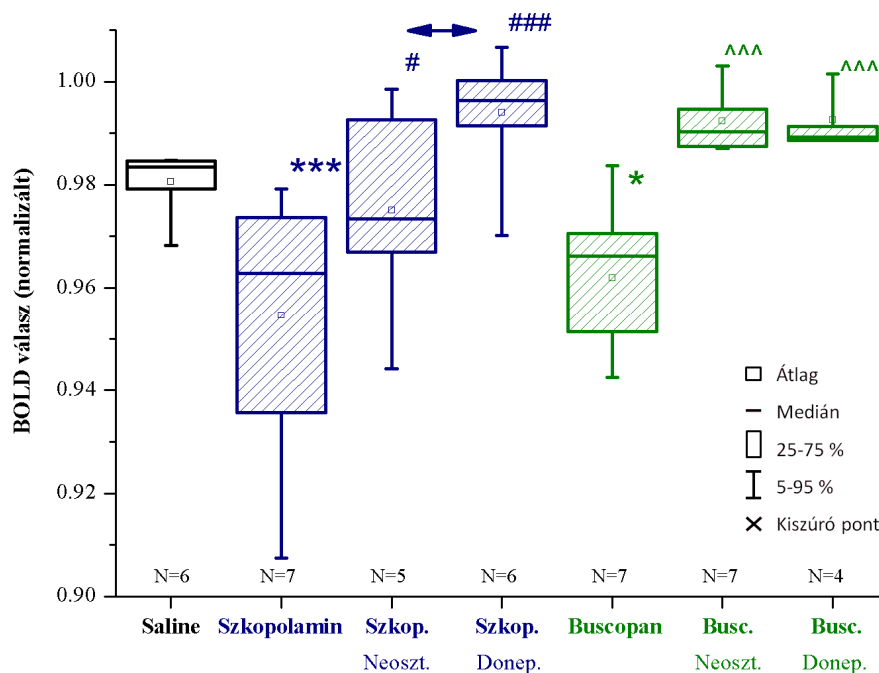
3. ábra Vinpocetin, EVP-6124 és PNU-120596 előkezelés hatásai a szkopolamin által kiváltott BOLD jel változásra a PFC területén. A vinpocetin 5 mg/kg-os, az EVP-6124 1 mg/kg-os, míg a PNU-120596 3 mg/kg-os dózisban intraperitoneálisan lett injektálva. A szkopolamin kezelés 1 mg/kg-os intravénás dózissal történt. (ANOVA, Fisher post-hoc teszt; * $p<0.05$; ** $p<0.01$)

A Richter Gedeon Nyrt. által kifejlesztett új vinpocetin analógot, az **RG2260**-at több dózisban is teszteltük provokációs modellünkben. Szignifikáns anyaghatásokat 1.25 (n=6, $p<0.05$) és 5 mg/kg-os (n=5, $p<0.01$) dózisokban sikerült egyértelműen kimutatnunk. Meglepő módon az RG2260, az anyavegyületnél jóval kisebb dózisban (1.25 mg/kg) is szignifikáns változásokat tudott elérni (4. ábra).



4. ábra Vinpocetin és RG2260 előkezelés hatásai a szkopolamin által kiváltott BOLD jel változásra a PFC területén. A vinpocetin 5 mg/kg-os dózisban, míg az RG2260 1.25 mg/kg-os dózisban intraperitoneális lett injektálva. A szkopolamin kezelés 1 mg/kg-os intravénás dózissal történt. (ANOVA, Fisher post-hoc teszt; * $p < 0.05$)

Utolsó vegyületként a kvaterner szerkezetű, reverzibilis kolinészteráz gátló **neosztigmin** teszteltük két különböző provokációs modellben (szkopolamin és butilszkopolamin alapú modell). A donepezilhez hasonlóan, a neosztigmin szignifikáns módon (szkopolamin modell: $n=5$, $p < 0.05$; butilszkopolamin modell: $n=7$, $p < 0.001$) képes volt kivédeni a memória rontó ágensek hatásait 0.1 mg/kg-os dózisban alkalmazva. Szkopolamin modellben vizsgálva a két kolinészteráz gátló hatásait, szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget regisztráltunk a 0.1 mg/kg dózisban alkalmazott neosztigmin és a 4 mg/kg dózisú donepezil hatásai közt (5. ábra).



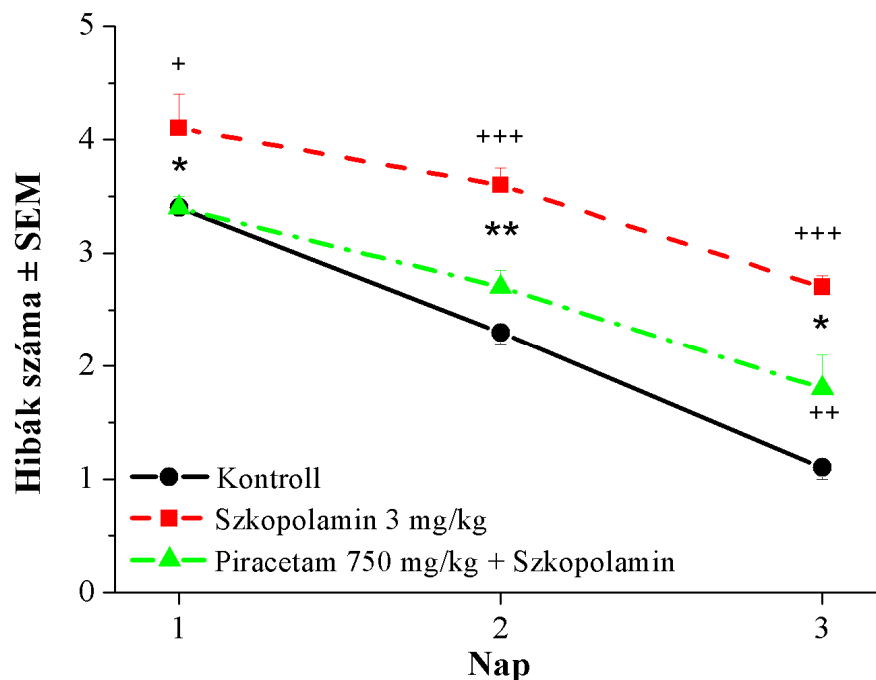
5. ábra Szkopolamin és butilszkopolamin (buscopan) BOLD válaszra gyakorolt hatásai saline, neosztigmin és donepezil előkezelést követően. A szkopolamin (szkop) és buscopan (busc) 1 mg/kg-os dózisban intravénásan lettek injektálva. A neosztigmin (neoszt) 0.1 mg/kg-os, míg a donepezil (donep) 4 mg/kg-os dózisban intraperitoneálisan lett tesztelve. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ saline-nal összevetve; # $p < 0.05$, ### $p < 0.005$ szkopolaminnal összevetve; ^^ $p < 0.005$ butilszkopolaminnal összevetve. A feltüntetett nyíl a neosztigmin és donepezil szkopolaminnal szemben mért hatásai közti szignifikáns különbséget szemlélteti $p < 0.05$ (ANOVA, Fisher post-hoc teszt).

Viselkedésfarmakológiai mérés

Viselkedésfarmakológiai tesztjeink során az állatok által elkövetett hibák számát regisztráltuk három egymást követő napon végzett tesztek során.

A memória rontó **szkopolamint** 3 mg/kg-os dózisban alkalmazva, szignifikáns mértékben megnövekedett a patkányok által elkövetett hibák száma a kontroll csoporthoz képest (6. ábra).

Piracetam előkezelést alkalmazva, 750 mg/kg-os vagy annál nagyobb dózisok esetén memóriajavulást tapasztaltunk, az állatok által elkövetett hibák száma szignifikánsan lecsökkent ($p < 0.01$, 6. ábra).



6. ábra Piracetam memóriajavító hatása vízi labirintus tesztekben szkopolaminnal szemben alkalmazva. A piracetam 750 mg/kg-os dózisban per os lett alkalmazva. A szkopolamin 3 mg/kg-os dózisban lett intraperitoneálisan injektálva. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ kontroll csoporthoz képest; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ szkopolaminnal kezelt csoporthoz képest (ANOVA, post-hoc Duncan teszt)

A Cavintonként ismert memóriajavító **vinpocetin** 7.5 ($p < 0.05$) és 10 mg/kg-os ($p < 0.001$) dózisokban memóriajavulást idézett elő, szignifikáns módon csökkentette az állatok által elkövetett hibák számát.

Donepezil előkezelést alkalmazva, már 0.25 mg/kg-os dózis esetén szignifikáns ($p < 0.01$) javulást tapasztaltunk az állatok memóriáját illetően. Magasabb dózisokat is megvizsgálva, a kognitív javulás dóziszfüggőnek mutatkozott.

A központi idegrendszeri mellékhatásoktól mentes, perifériás kolinészterázgátló **neosztigmint** 0.3 mg/kg-os dózisban alkalmazva eliminálta ($p < 0.01$) a memória rontó ágens hatását.

A jelenleg is fejlesztés alatt álló alfa 7 nikotinerg receptor ortosztérikus agonista **EVP-6124** mindhárom tesztelt dózisban (0.3, 1, 3 mg/kg; $p < 0.05$) szignifikáns javulást eredményezett, míg a szintén fejlesztési fázisban lévő alfa 7 nikotinerg receptor PAM (pozitív allostérikus modulátor) **PNU-120596** esetében nem sikerült szignifikáns változásokat regisztrálni.

A Richter Gedeon Nyrt. által újonnan kifejlesztett vinpocetin analóg, az **RG2260** esetén hat különböző dózist vizsgáltunk a 0.625 - 20 mg/kg-os dózistartományon belül. A maximális hatás 2.5 és 5 mg/kg alkalmazott dózisoknál jelentkezett ($p < 0.01$, $p < 0.001$), ahol az elkövetett hibák száma szinte azonos volt a kontroll csoport hibáinak számával.

A **butilszkopolamin**, a szkopolaminhoz hasonlóan, dózisfüggő módon kognitív károsodást okozott, hatására szignifikáns ($p < 0.05$) mértékben megnövekedett az állatok által elkövetett hibák száma.

Következtetések

Ph.D. munkám során sikeresen kidolgoztam munkatársaim segítségével egy nagy transzlációs erővel bíró, jó térbeli- és időbeli felbontással jellemezhető szkopolamin alapú provokációs kisállat fMRI módszert, melyet több különböző hatásmechanizmusú memória javító ágenssel validáltunk (donepezil, piracetam, vinpocetin, EVP-6124, PNU-120596, RG2260 és neosztigmin).

- Munkacsoportommal sikeresen kidolgoztunk egy szkopolamin alapú kisállat provokációs modellt, melyet a laborban található MRI készülékre optimalizáltunk. A modell alapját a kognitív rontó szkopolamin képezte, melyet az fMRI mérés közben (1000 sec elteltével) injektáltunk az azonnali hatás eléréséhez. A prokognitív szerek előkezelésként (szkopolamin injektálását megelőzően 1 órával) való alkalmazásával sikeresen kiküszöböltük az oldódást segítő detergens anyagok farmakológiai zavaró hatása. Egy teljes fMRI mérés 3000 sec-nak adódott.
- A memóriarontó szkopolamint 1 mg/kg dózisban alkalmazva szignifikáns BOLD jel csökkenést tapasztaltunk a PFC területén, míg a kognitív folyamatokban kiemelt szerepet játszó hippocampus területén nem történt változás. Több különböző dózist vizsgálva (1-5 mg/kg) a szkopolamin hatása nem mutatott dózisfüggést. A maximális hatás kialakulásához 1 mg/kg dózis elegendő volt.
- Mindhárom kereskedelmi forgalomban kapható memóriajavító ágens (donepezil, piracetam, vinpocetin) növelte a BOLD jel intenzitását a szkopolaminnal kezelt állatok prefrontális kérgében. Szignifikáns javulást azonban csak a 4 és 10 mg/kg

dózisban alkalmazott donepezil és 5 mg/kg dózisban tesztelt vinpocetin esetén tapasztaltunk.

- Mindkét vizsgált, még fejlesztés alatt álló nikotinerg ágens (EVP-6124, PNU-120596) szignifikáns BOLD jel növekedést okozott a szkopolaminnal kezelt csoport esetén.
- A Richter Gedeon Nyrt. által újonnan fejlesztett RG2260 nevű vegyületet egy szélesebb dózistartományban (0.01-10 mg/kg) vizsgáltuk. A vegyület U-alakú dózis-hatás görbéje alapján a minimális effektív dózis 1.25 mg/kg-nak adódott. Szignifikáns BOLD jel növekedést 1.25 és 5 mg/kg dózisok alkalmazásakor tapasztaltunk.
- A szerkezetileg hasonló, két Richter vegyület (vinpocetin 5 mg/kg, RG2260 1.25 mg/kg) összehasonlító vizsgálata közel azonos BOLD jel változást eredményezett, azonban a hatás kiváltásához szükséges minimális dózis az RG2260 vegyület esetében sokkal alacsonyabb volt.
- Butilszkopolamin alkalmazásával sikeresen igazoltuk a vaszkuláris komponens jelenlétét kognitív folyamatokban. A szkopolamin butil analógját 1 mg/kg dózisban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a szer szignifikáns mértékben csökkentette a PFC területén mérhető BOLD jel intenzitását a szkopolaminhoz hasonló mértékben.
- Neosztigmin alkalmazásával sikeresen igazoltuk a vaszkuláris komponens jelenlétét kognitív folyamatokban. 0.1 mg/kg dózisban alkalmazva, a neosztigmin sikeresen kivédte mind a szkopolamin, mind a butilszkopolamin negatív hatásait.
- Végül, fMRI méréseink eredményeit egy, a kognitív idegtudományok területén régóta használt és elfogadott viselkedésfarmakológiai teszttel (vízi labirintus teszt) összevetve hasonló eredményeket kaptunk. A vízi labirintus tesztekben alkalmazott kognitív rontó ágensek (szkopolamin, butilszkopolamin) szignifikáns mértékben megnövelték az állatok által elkövetett hibák számát, míg ezen hibák száma prokognitív szerek alkalmazását követően lecsökkent.
- A vízi labirintus tesztek során kapott eredmények segítségével sikeresen validáltuk a szkopolamin alapú kisállat fMRI modellünket és igazoltuk eredményeink relevanciáját.

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Hegedűs N**, Laszy J, Gyertyán I, Kocsis P, Gajári D, Dávid S, Deli L, Pozsgay Z, Tihanyi K. (2015) Scopolamine provocation-based pharmacological MRI model for testing procognitive agents. *J Psychopharmacol*, 29: 447-455.
2. Kocsis P, Gyertyán I, Éles J, Laszy J, **Hegedűs N**, Gajári D, Deli L, Pozsgay Z, Dávid S, Tihanyi K. (2014) Vascular action as the primary mechanism of cognitive effects of cholinergic, CNS-acting drugs, a rat phMRI BOLD study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 995-1000.

Egyéb közlemények jegyzéke

1. Sárvári M, Kocsis P, Deli L, Gajári D, Dávid S, Pozsgay Z, **Hegedűs N**, Tihanyi K, Liposits Z. (2014) Ghrelin Modulates the fMRI BOLD Response of Homeostatic and Hedonic Brain Centers Regulating Energy Balance in the Rat. *PLoS ONE*, 9: e97651.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak akik az elmúlt 3 év során támogattak és biztattak, valamint segítségemre voltak doktori munkám során.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tihanyi Károlynak, akitől az elmúlt évek során rengeteget tanulhattam és mindenben támogatott.

Külön köszönet illeti Dr. Kocsis Pált, aki biológiai ismereteivel és imaging tudásával sokat segített munkám során, és akihez bármikor fordulhattam egy-egy felmerülő probléma kapcsán.

Szeretnék köszönetet mondani munkatársaimnak, a Preklinikai Képző és Biomarker Központ dolgozóinak, akik nélkül ez a komplex mérési sorozat nem jöhetett volna létre. Köszönet illeti Gajári Dávidot és Dávid Szabolcsot az fMRI felvételek és a technikai háttér biztosításáért, Tóth Katalint és Schreiber Petrát az állatkísérletek háttérének biztosításáért, Pozsgay Zsófiát a statisztikai elemzésekért, valamint Deli Leventét az anatómiai háttér biztosításáért.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Noszál Bélának, aki felhívta figyelmemet erre az egyedülálló Ph.D. lehetőségre, valamint az Aesculap Alapítványnak, aki a szükséges finansziális támogatás nyújtotta.

Köszönet illeti a Richter Gedeon Nyrt.-t, akik lehetővé tették számomra, hogy tudományos kutató munkámat a Preklinikai Képző és Biomarker Központban folytathassam.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy támogattak és biztattak az elmúlt pár évben, valamint biztos háttérrel nyújtottak kutató munkámhoz.