

**ISMÉTELT ENYHE KOPONYATRAUMÁN
ÁTESETT PATKÁNYOK KOGNITÍV
ZAVARÁNAK ENYHÍTÉSE MEMANTIN ÉS
ALFA7 NIKOTINOS RECEPTOR LIGANDOK
ALKALMAZÁSÁVAL**

35. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Kolozsvári Áron Olivér

biológus MSc hallgató

Témavezetők: Dr. Bali Zsolt, Dr. Hernádi István

PTE TTK Biológiai Intézet

Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék,

Szentágotthai Kutatóközpont, Idegtudományi Centrum



Pécs, 2021

TARTALOMJEGYZÉK:

1. BEVEZETÉS.....	3
1.1. Traumás agysérülés.....	3
1.2. A traumás agysérülések epidemiológiája.....	5
1.3. A TBI neuropatológiája.....	6
1.4. A TBI mint a demencia kockázati tényezője.....	7
1.5. Ismételt enyhe TBI kialakítására használt állatmodellek.....	8
1.6. TBI indukálta kognitív zavarok terápiája.....	9
1.7. $\alpha 7$ -nAChR agonisták, mint gyógyszerjelölt vegyületek.....	10
1.8. Kombinált terápiák hatékonysága	11
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
3.1 A kísérleti állatok elhelyezése és tartása.....	12
3.2 Kognitív károsodás kialakítása Marmarou módszerrel előidézett TBI következtébe.....	12
3.3 Magatartás tesztek.....	13
3.3.1 Neurológiai tesztelés (modified neurological severity scores, mNSS).....	13
3.3.2 Új tárgy felismerési teszt (Novel Object Recognition Test, NOR).....	14
3.4 A kísérletek menete és a használt farmakonok.....	15
3.5 Statisztikai értékelés.....	17
4. EREDMÉNYEK.....	17
4.1. Kognitív funkciók mérése mNSS tesztben.....	17
4.2. Az álműtött állatok és az rmTBI-on átesett állatok teljesítménye NOR tesztben.....	18
4.3. A memantin monokezelés hatása az rmTBI-on átesett állatok teljesítményére a NOR tesztben.....	18
4.4. A PHA-543613 monokezelés hatása az rmTBI-on átesett állatok teljesítményére NOR tesztben.....	19
4.5. A kombinált kezelések hatása a NOR tesztben.....	20
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	21
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	24
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	30

1. Bevezetés

A traumás agysérülés (Traumatic Brain Injury, TBI) az egyik leggyakoribb formája a fogyatékkal vagy halállal végződő idegrendszeri sérüléseknek (Rubiano et al., 2015). Sok esetben azonban a TBI hatása nem ennyire drasztikus, mégis az érintettekben komoly neurológiai, érzelmi és személyiségbeli változásokat idézhet elő (Schretlen & Shapiro, 2003). A fiatalok körében különösen gyakori a TBI a különböző sportsérülések miatt, de a 65 év felettiekénél sem ritka, amelynek oka többek között a gyakori elesések (Ricker & Arenth, 2006). Csak az Amerikai Egyesült Államokban évente több mint 300.000 olyan esetet regisztrálnak, amiben sportolók eszméletüket veszítették traumás agysérülés miatt (Blennow et al., 2012).

1.1 Traumás agysérülések

Az emberi agy egy rendkívül komplex szerv, ami felelős a motoros funkciókért, az érzékelésért, a viselkedésért, a tanulásért és még sok más az élethez nélkülözhetetlen funkcióért. Az agy ezt a komplex feladatot száz millió neuron és száz billió szinapszis segítségével felügyeli és látja el (Ho et al., 2011).

Az agyban található neuronokat és szinapszisokat a koponya védi, azonban traumás agysérülés során a nyíró erők és az agynak a koponyához való ütdése hatására ezek sérülhetnek. Egy ilyen sérülésnek sokféle különböző oka lehet, amik között lehet egy fejre mért ütés, a koponyacsont törése, robbanás vagy a fej gyors elmozdulása például egy autóbaleset során (Dixon, 2017). A tünetek többek között a rövid ideig tartó eszméletvesztés, zavartság, memóriazavar, fejfájás, szédülés és ájulás (Effgen & Morrison, 2017). A sérülés után sok esetben csak enyhe tünetek jelentkeznek, de ezeket sem szabad figyelmen kívül hagyni, főleg, ha egy második vagy további ütés (second impact syndrome) is éri a koponyát, aminek már komolyabb hatásai lehetnek (Bey & Ostik, 2009). Klinikai kutatások szerint az eszméletvesztés utáni változások az agyban 1 hónap után állnak vissza az ütés előtti állapotba, de az axonopátia akár évekig is fennmaradhat (Ling et al., 2015).

Ezeknek a sérüléseknek lehetnek hosszú- és rövidtávú hatásai is kezdve a normális életben bekövetkező minimális változásoktól egészen a fizikális és pszichoszociális változásokig, amik kihathatnak a mindennapi életünkre (Dixon, 2017). Hogy hogyan hat a többszöri TBI az agyban lezajló bonyolult mechanizmusokra és milyen sérülési mechanizmusokat indít el, az a mai napig tisztázatlan. A betegek tüneteit pihenéssel és fájdalomcsillapítókkal lehet csillapítani, azonban nincs olyan terápiás kezelés, ami az akut patológiás biomechanikai útvonalakat célozná meg és hosszútávú hatása lenne (Effgen & Morrison, 2017). Ezeknek a megértésére állatmodellek állnak rendelkezésre, amelyekben a vizsgálatok jól kontrollálható körülmények között

kivitelezhetőek és az eredmények később a gyógyszerek fejlesztésében is fontos szerepet játszanak (Xiong et al., 2013).

A TBI általános definíciója szerint egy olyan módosulás vagy patológiás elváltozás az agyi funkciók terén, amit külső erő okozott (Xiong et al., 2013). Azonban ez a definíció az évek során folyamatosan változik, hiszen egy nagyon összetett és szerteágazó betegségről beszélünk. A sérülések enyhe, közepes és súlyos csoportokba sorolhatóak traumás agysérülés esetén a Glasgow Kóma Skála pontrendszer szerint (GCS) (Sternbach, 2000). A skála pontrendszer 3 részre oszlik: szem nyitása, verbális válasz és motoros válasz, amikből jó következtetéseket lehet levonni a beteg állapotáról. Minél kevesebb pont gyűlik össze annál súlyosabb a TBI mértéke. A GCS szerint 13-15 pontot kapott páciensek enyhe TBI-t szenvedtek. Az ilyen esetekben általában egy agyrázkódásról van szó, ami fejfájást okozhat, de a gyógyulás önmagától megtörténik pár nap pihenéssel. 9-12 között közepes TBI-ról beszélünk, ami már szöveti zúzódásokkal járhat az agyszövetben. A 3-8 pontot kapott betegek súlyos TBI-t szenvedtek, amiktől szöveti sérülések, vérzések keletkezhetnek az agyban. Azok a betegek, akik közepes TBI-t szenvedtek jó eséllyel felépülnek vagy megtanulják kompenzálni a fennálló deficitet, míg azok, akik súlyos TBI-on esnek át nagy eséllyel életük hátralévő részében kognitív deficitekkel fognak élni (Dixon, 2017).

Megkülönböztetünk továbbá elsődleges és másodlagos sérüléseket is. Hirtelen történő lineáris gyorsulás, lassulás és csavaró erők vagy ezek kombinációinak hatására az agyban elsődleges sérülések alakulhatnak ki, amelyek zúzódásokat vagy tépődéseket okozhatnak az agyi parenchymában, erek sérülhetnek, hematómák keletkezhetnek, valamint diffúzan sérülhetnek az axonok is (Dashnaw et al., 2012; Sande & West, 2010). Sejtszinten bekövetkező azonnali hatás az axotómia, ami az axonok nyújtó és nyíró sérülései miatt jön létre, ami az axon citoszkeleton vázának sérülését eredményezi (Tadepalli et al., 2020). A másodlagos intrakraniális sérülések később a trauma indirekt hatásaként jelennek meg. Ezeket másodlagos axotómiának nevezzük, melyek során elektrokémiai változások történnek az idegsejtekben, és ez funkcióváltozást idéz elő (Tadepalli et al., 2020). Ilyen változás a serkentő neurotranszmitterek által mediált reaktív oxigén gyökök (ROS), és proinflammátoros citokinek keletkezése, amik hozzájárulhatnak a sejtek sérüléséhez és a sejthalálhoz, vagy az agy vérkeringésében és a vér-agy gát dinamikájában bekövetkező változásokat idézhetnek elő (Dashnaw et al., 2012; Sande & West, 2010).

Vizsgált válasz	Kapott válasz	Pontszám
Szem nyitása	Spontán	4
	Megszólításra	3
	Fájdalomra	2
	Nincs	1
Verbális válasz	Orientált	5
	Zavart	4
	Nem megfelelő szavak	3
	Artikulálatlan hangok	2
	Nincs	1
Motoros válasz	Felszólításra	6
	Fájdalmat lokalizál	5
	Végtagok elhúzza érintésre	4
	Dekortikált testpozíció	3
	Decerebrált testpozíció	2
	Nincs	1

1. táblázat: A Glasgow kóma skála pontrendszere

1.2 A traumás agysérülések epidemiológiája

Martland 1928-ban olyan betegség együttest írt le bokszolóknál, amit a köznyelvben részeg szindrómának neveztek el. Ez volt az első olyan esettanulmány, amiben ismétlődő enyhe TBI-on átesett betegeket vizsgáltak. A következő évtizedekben újabb tanulmányok születtek, amikben az ismétlődő TBI hatására krónikus és progresszív neuropszichiátriai rendellenességeket és patológiás elváltozásokat írtak le, amit „demencia pugilisztikának” neveztek el. Azonban a betegség megértésében nem voltak további törekvések egészen addig, amíg ugyanezek a neuropatológiás elváltozások más sportolóknál és nem sportolóknál is megjelentek, akik ismétlődő enyhe TBI-on estek át pályafutásuk alatt. Az esetek között volt amerikai futballista, jégkorongozó, birkózó, veterán katona, akiknél érzelmi labilitást, memóriazavarokat és demenciát, kisagyi neuronvesztést, személyiségváltozást, motoros diszfunkciókat írtak le. Legújabb kutatások szerint a TBI hozzájárul a leggyakoribb demencia típus, az Alzheimer-kór (AD) kialakulásához. Újabban ezeket az állításokat nagyon sok esettanulmány cáfolja vagy nem tudja megerősíteni (Smith et al., 2013; Faden & Loane, 2015). A rengeteg epidemiológiai tanulmánynak köszönhetően biztosan állíthatjuk, hogy a TBI elősegítheti a demencia kialakulását, ezzel kapcsolatban azonban számos kérdés is felvetődött, hogy hogyan függ össze és milyen közös útvonalakat használ a két betegség (Mendez, 2017).

1.3 A TBI neuropatológiája

Egy felnőtt emberben az axonregeneráció a központi idegrendszerben extrém módon limitált (Sivanandam & Thakur, 2012). A fejét ért ütés hatására az agy a koponyacsont intrakraniális felszínhez ütődhet, ami megsértheti az agyszövetet. Ez a sérülés az egész agy felszínét érintheti, ahogyan az agy mozog a koponyában. Az agyrázkódás egy enyhébb TBI, ami nem feltétlenül eredményez tüneteket, ami miatt a betegek nem esnek át további vizsgálatokon. Az esetek nagyobb részében viszont az agyrázkódás tünetei megjelennek a betegeken, ilyen a fejfájás, hányinger kognitív diszfunkció, ájulás, figyelmi zavar. Ezek a tünetek, néhány nap vagy akár néhány hét alatt múlnak el, de vannak esetek, amikor egy év után is jelen vannak. Ebben az egy éves intervallumban a legnagyobb veszélyt az ismételt TBI jelenti, amit második csapás szindrómának neveznek. Azoknál a betegeknél, akik még nem épültek fel az előző TBI-ból, sokkal nagyobb valószínűséggel alakulnak ki neurokognitív betegségek, ödéma, hiperémia és idiopathiás intrakraniális hipertenzió, szubdurális hematóma, és bár kevés ilyen esetet regisztráltak, ezek akár halállal is végződhetnek (Saigal & Berger, 2014).

Az ismétlődő agyrázkódás közepes kognitív károsodáshoz is vezethet, mint például memóriazavarok, agresszivitás, gyenge impulzuskontroll, parkinsonizmus, viselkedési rendellenesség, személyiségváltozás, a beszéd szabálytalansága vagy a járásban megmutatkozó rendellenességek (Mannix et al., 2013). A krónikus traumatikus encephalopátia (CTE) ismétlődő TBI-nál használatos újabban bevezetett fogalom, amit a sportolók között elterjedt sérüléseknél használnak. A CTE egy trauma által indukált neurodegeneráció, aminek jellegzetes neurokognitív és neuropatológiai megjelenései vannak és jellemzően évekkel a trauma után alakul ki ellentétben, az agyrázkódás tüneteivel. A neurodegeneráció miatt személyiségbeli változások, depresszió, öngyilkossági hajlam, apátia és elzárkózás léphet fel a betegeken (Mendez, 2017; Saigal & Berger, 2014). A CTE-s betegeknél jellemzően taupátia jelentkezik a nagy mennyiségű taufehérje lerakódások miatt, amik neurofibrilláris kötegekbe (NFT) rendeződnek. A neurodegeneratív betegségekkel (mint pl. Alzheimer-kór, AD) ellentétben a betegség már fiatalabb korban is megjelenhet. Egyes kutatásokban TBI után emelkedett amiloid prekursor protein szintet mértek, ami a sérült axonokban neurotoxikus amiloid- β ($A\beta$) plakkokká formálódhat. A CTE neuropatológiája során kialakuló plakkok feltűnően hasonlóak az AD-ban találhatóakhoz, annyi különbséggel, hogy a sérülés után már órákkal megjelennek, míg AD során lassan formálódnak az évek alatt. Mivel a plakkok hasonlóak, az axon duzzanat jelenléte jó kiindulópont lehet a két betegség megkülönböztetésére. Egyes esettanulmányokban viszont nem találtak $A\beta$ plakkokat CTE-s

betegekben, ezért sokan úgy gondolják, hogy a plakkok jelenléte vagy hiánya lehet a kulcs a TBI és az AD megkülönböztetésének. Habár az A β plakkoknak ismeretlen a szerepe a sérülés során kialakuló kaszkádban, sok preklinikai tanulmányban korrelációt találtak a csökkent A β plakkok jelenléte és a jobb végekimenetel között. (Sivanandam & Thakur, 2012). Ma már sok marker ismert a vérben és az agy-gerincvelői folyadékában, melyek a többszöri agyrázkódásos sérülések után jelennek meg, ennek ellenére a szérumbiomarkerekben bekövetkező időbeli változások és a TBI utáni relevanciájuk és prediktív értékük vitatható vagy részben ismeretlen (Tadepalli et al., 2020).

1.4 A TBI mint a demencia kockázati tényezője

A világon összesen körülbelül 50 millió ember él valamilyenfajta demenciával, és ez a szám 2050-re elérheti a 152 milliót (Baumgart et al., 2015).

A demencia egy klinikai szindróma, ami a kognitív és emocionális képességek elvesztéséhez vezet, ami annyira súlyos, hogy a mindennapi életben is problémát okozhat (Avid et al., 1996). A betegség kihat valamennyi jelentős agyi funkcióra, és folyamatos leépülést okoz a betegeknél. A leépülés során az egyén emlékezőképességének, koncentrációképességének, logikus gondolkodási képességének, térbeli és időbeli tájékozódási képességeinek hanyatlása figyelhető meg. Kognitív tünetei közt szerepelhet még az afázia, agnózia, apraxia, de lehetnek különböző affektív zavarok, mint a szorongás vagy depresszió, agresszivitás, hallucináció, agitáció és a személyiség megváltozása (Bruszt és mtsai., 2016). A demencia kialakulásában számos tényező közrejátszik, mint a kor, a családi és genetikai háttér. A leggyakoribb demencia az AD, amelynek kialakulásához sok tanulmány szerint a TBI-nak is köze lehet (Lee et al., 2013).

Csak az Amerikai Egyesült Államokban évente 1,7 millió ember szenved TBI-t, aminek negyede közepes vagy súlyos, emiatt körülbelül 5,3 millió amerikai állampolgár él TBI miatt kialakult hosszútávú fogyatékkal (Smith et al., 2013). A súlyosabb TBI minden bizonnyal elősegíti a neurodegeneratív betegségek kialakulását, mint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, vagy az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS). A többszöri enyhe TBI főleg a kontaktsportokban fordul elő, mint az amerikai futball vagy az ökölvívás (Gardner & Yaffe, 2015). Egy tanulmány során 3439 profi amerikai futball játékost hasonlítottak össze hétköznapi emberekkel és az eredmények azt mutatták, hogy az általános halálozási ráta nem magasabb, de ezen belül majdnem háromszoros volt a neurodegeneráció miatti, és négyszer magasabb az ALS és AD miatt elhunytak száma (Saigal & Berger, 2014).

Számos kísérleti eredmény is bizonyítja, hogy az egyszeri TBI okozhat progresszív

neurodegenerációt akár hónapokkal vagy évekkel a sérülés után is. Folyadék ütési modell használatával patkányokban kimutatták a progresszív atrófiát és a neuronális sejthalált 1 évvel a sérülés után a kéregben, a hippocampusban, thalamusban és a septumban. Továbbá mágneses rezonancia képalkotással egerekben kimutattak progresszív lézió növekedést és a hippocampus sejtsökkenését 1 évvel a kontrollált kortikális ütés után. Sok klinikai képalkotó vizsgálat során kimutattak longitudinális változásokat egyes agyterületeken TBI után 6 hónaptól egy évig terjedő intervallumban (Faden & Loane, 2015).

1.5 Ismételt enyhe TBI kialakítására használt állatmodellek

A neuropszichológiai változások mögötti mechanizmusok és a kognitív következmények a mai napig nem tisztázottak az ismételt enyhe TBI (rmTBI) során. Az állatmodellek egyedülálló lehetőséget adnak a hisztológiai vizsgálatok során feltárt celluláris és molekuláris válaszok megértésére. A vizsgálatokkal jó belátást nyerhetünk a neuropszichológiai változásokra, amik az agy sérülésének előrehaladtával folyamatosan változnak. A vizsgálati módszerek az egyszeri TBI-ról egyre inkább a többszöri enyhe TBI felé kezdtek el változni, aminek jobb klinikai relevanciája van tekintve, hogy ezek a leggyakoribb sérülések. Sok definíciója létezik az agyrázkódásnak, ami a leggyakoribb formája az enyhe traumatikus agysérülésnek, de klinikai értelemben tipikusan egy direkt nem penetráló ütés által okozott sérülés, amit zárt koponya ütésnek is hívnak (Hoogenboom et al., 2019).

Állatokban háromféle modellt alkalmaznak, ami alkalmas enyhe TBI kialakítására. Leggyakrabban a Marmarou és munkatársai (Marmarou et al., 1994) által kidolgozott súlyejtéses modellt alkalmazzák, ami az emberben is kialakuló diffúz sérülést modellezi le, ami tipikusan motor vagy autóbaleseteknél, illetve elesésnél következik be. A modellben egy súlyt ejtenek az állat fejére, aminek tömegét és leesési magasságát változtatni lehet, ezzel befolyásolva a sérülés mértékét. Fontos, hogy az állat fejét szabadon hagyják, ezzel is illusztrálva a balesetek utáni erőket, amik az agyra és a fejre hatnak. Ezek az erők alakítják ki azokat a diffúz sérüléseket, amik jellemzőek az enyhe TBI során. Számos esetben bizonyították, hogy azok a rágcsálók, akik súlyejtéses rmTBI-t szenvedtek el, rosszabbul teljesítettek a Morris-féle víziútvesztőben, valamint azok, akik ismételt ütest kaptak rosszabb eredményeket értek el különböző tesztekben, mint akik csak egy ütest kaptak. Az ütés miatt a hippocampus idegsejtvesztése és fokozott tauopátia is jellemző volt az állatoknál (Tadepalli et al., 2020).

A folyadékütési modellben különböző mennyiségű sóoldatot injektálnak a koponyaüregbe, ezzel egy nyomásimpulzust idéznek elő, amely az agyszövet rugalmas alakváltozását eredményezi (Hoogenboom et al., 2019). Akut neurológiai kísérletekben

patkányban a folyadékütéses sérülés halált, irreverzibilis vagy átmeneti apnoét, illetve poszturális és nem poszturális funkciók reverzibilis szupresszióját idézte elő. Ahogy a sérülés erőssége nőtt, a halálozási ráta is nőtt, és a szomatomotoros reflexek szupressziója csökkent. A többi patkány modellel ellentétben, ahol agyrázkódás alakul ki az ütés miatt, itt csupán a túlélők 13%-a szenvedett agyrázkódást. Közepes erejű ütest szenvedett állatok krónikus lokomotoros deficiteket mutattak 4-8 napig (Dixon et al., 1987).

A kontrollált kérgi ütésmodellekben szabályozott ütésmérőt használnak, amivel ütest mérnek az intakt dura materre. Ezzel a modellel sikeresen kialakítható az agykéregben bekövetkező sejtelhalás, akut szubdurális hematóma, axon sérülés, vér-agy gát diszfunkció, agyrázkódás vagy akár kóma is. A modell nagy előnye, hogy az idő, a gyorsulás és az ütés mélysége is kontrollálható (Xiong et al., 2013). A kísérletek során megállapították, hogy a sérülés nagyságának növekedésével nő a szomatomotoros reflexek szupressziója, valamint a krónikus vesztibuláris motoros deficit mértéke. Magasabb sérülési szint esetén kortikális zúródást és intraparenchymás vérzést tapasztaltak, amely az idő előrehaladtával egyre nekrotikusabb hatást váltott ki. Továbbá axonális sérülést találtak az egész agytörzsben, és a legtöbb sérült axon a kisagyban és a pontomedulláris junkcióban fordult elő (Dixon et al., 1991).

1.6 TBI indukált kognitív zavarok terápiája

Preklinikai TBI modellek szerint a glutamát-mediálta excitotoxicitásnak jelentős szerepe van a másodlagos sérülések kaszkádjának kialakításában. Kifejezetten az rmTBI gyógyítására kitalált terápiáknak a hiánya miatt az egyéb útvonalakat támadó gyógyszerek is hatékonyak lehetnek a később kialakuló betegségek ellen. Azok a gyógyszerek, amik kifejezetten az N-metil-D-aszparát receptorok (NMDAR) antagonistái, jó gyógyszerjelöltek lehetnek egyes kutatások szerint, bár ezeknek a hatékonysága preklinikai és klinikai szempontból még nincs alátámasztva (Mei et al., 2018).

A glutamáterg rendszer diszfunkciója a kogníció károsodásához vezethet, hosszú távon pedig idegsejtelhaláshoz. A glutamát felel a központi idegrendszer excitátoros neurotranszmissziójának 70%-áért, különösen a kortikális részeken és a hippocampusban. Alapból az NMDAR-ok egy Mg^{2+} blokk alatt állnak, amit a poszt-szinaptikus membrán depolarizációja és a glutamát együttes hatása szüntet meg, így Ca^{2+} beáramlás történik a sejtbe. Normális fiziológiás állapotban a Ca^{2+} beáramlás aktivál egy jelátviteli kaszkádot, ami szinaptikus plaszticitást eredményez (hosszútávú potenciáció, LTP), ami szükséges a tanulás és a memória folyamatához. Egyes hipotézisek szerint ezek az NMDA receptorok Alzheimer-kór esetén folyamatosan nyitva vannak, emiatt folyamatos Ca^{2+} beáramlás történik, és ez később

kóros elváltozásokhoz vezethet. Azok a toxikus anyagok, amik az NMDAR-on keresztül hatnak, mint az amiloid- β -oligomerek, képesek megnövelni a glutamát receptorok érzékenységét vagy tónikus aktivitását, ami pedig sejtpusztuláshoz vezet (Parsons et al., 2013).

A memóriában és a tanulásban bekövetkező változások hibás agyműködésre utalnak, ami részben a kolinerg rendszerre vezethető vissza. A legnagyobb kolinerg központok a bazális előagyban és a felső agytörzsben vannak, amik gyakran a TBI miatt patológiás elváltozáson mennek át. Ezeket az elsődleges TBI által kiváltott elváltozásokat laboratóriumi állatokon és postmortem emberi vizsgálatokban is kimutatták, valamint a kolinerg rendszer zavarait is leírták (Tenovuo, 2005). A másik ígéretes TBI terápiát ezért az acetilkolin-észteráz gátlók jelentik, mint a donepezil, a galantamin és a rivastigmin. Ezek az anyagok a kolinészteráz gátlásával emelik az acetilkolin (ACh) szintet ezzel megelőzve a kolinerg rendszer zavarait. Egyes kutatások szerint az emelkedett ACh növeli a nikotinos acetilkolin receptorok számát a kolinerg rendszer neuronjain (Parsons et al., 2013).

1.7 Az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor agonisták, mint gyógyszerjelölt vegyületek

Az $\alpha 7$ nikotinos ACh receptorok ($\alpha 7$ -nAChR) fontos szerepet játszanak a transzmitter felszabadulás szabályozásában, valamint neuroprotektív hatásukat is bizonyították, emiatt egy jó célpontok lehetnek a kognitív betegségek gyógyítására. Kutatások szerint ezeknek a receptoroknak a szintje az agyban a korral csökken, ami miatt az öregedés során kialakuló demenciákban is fontos szerepük lehet. Azoknál a betegeknél, akiknek neurodegeneratív betegségek alakultak ki csökkent $\alpha 7$ -nAChR szintet mértek (Ma & Qian, 2019).

Számos $\alpha 7$ -nAChR agonista képes volt patkányokban visszafordítani a scopolamine-nal, illetve MK-801-el előidézett memóriadeficitet (Wallace & Porter, 2011). Bali és munkatársai szkopolaminnal, illetve MK-801-gyel kezelt patkányokat vizsgáltak T-labirintus tesztben. Az állatokat a nagy szelektivitású PHA-543613 anyaggal kezelték, ami az $\alpha 7$ -nAChR agonistája. Az anyag sikeresen visszafordította scopolamine, illetve az MK-801 által előidézett deficitet (Bali et al., 2015). Ugyanilyen kísérleti felállásban a teljesen $\alpha 7$ -nAChR agonista SEN12333 is sikeresnek bizonyult a patkányokkal elvégzett tárgy felismerési tesztben, ami arra enged következtetni, hogy a receptor stimulálása képes kompenzálni a kolinerg és glutamáterg rendszerben bekövetkezett változásokat (Wallace & Porter, 2011).

Az AD leggyakoribb patológiás elváltozása az intra- és extracelluláris A β plakkok megjelenése. Azok a neuronok, amik intracelluláris A β peptidet tartalmaznak változatlanul képesek expresszálni $\alpha 7$ -nAChR-okat. Az A β képes hozzákötődni az $\alpha 7$ -es receptorokhoz, amivel blokkolja ligand kötő aktivitását, ezzel pedig neuron diszfunkciót és kognitív deficitet

lépes kialakítani. Ezt a hatást az $\alpha 7$ -nAChR antagonistá metyllycaconitine (MLA) képes volt visszafordítani, ami azt sugallja, hogy ezek a receptorok mediátorai az A β neurotoxikus hatásainak (Ma & Qian, 2019).

A nAChR-ok egyik fontos tulajdonsága a deszenzitizáció. A megfelelő agonista megkötése után egy konformáció változás következik be, emiatt teljesen inaktívvá válik a receptor, az inaktív állapot hossza receptor típusonként változik. A leggyorsabb deszenzitizációra képes típus az $\alpha 7$ -nAChR. Agonista jelenlétében <100 ms elteltével a receptor funkciója teljesen megszűnik, ami megnehezíti a receptorral történő vizsgálatokat a központi idegrendszerben, valamint magyarázat lehet az agonistára adott fordított U alakú dózis-hatás görbére. Ez a jelenség számos kísérletben megfigyelhető volt és emiatt nagy kihívás lehet a megfelelő dózis kiválasztása a későbbi klinikai tesztekben (Nagy és mtsai., 2017; Wallace & Porter, 2011).

A nAChR-ok nagy számban vannak jelen a központi idegrendszerben, ami miatt jó célpontok lehetnek a kognitív betegségek kezelésében. Az $\alpha 7$ -nAChR-t célba vevő vegyületeknek, nagy figyelmet kaptak az elmúlt évtizedben, de sajnos áttörő sikert eddig nem sikerült elérni (Hoskin et al., 2019; Ma & Qian, 2019).

1.8 Kombinált terápiák hatékonysága

A memantin egy nem-kompetitív NMDAR antagonistá, ami képes szelektíven blokkolni az abnormális glutamáterg transzmisszió miatt kialakuló toxikus hatásokat, és ezáltal biztosítja a normális sejtműködéshez szükséges fiziológiai jelátvitelt (Ho et al., 2011; Parsons et al., 2013). Ismerünk ugyanakkor olyan NMDAR antagonistát is, mint az MK-801, amely nem bizonyult hatékony gyógyszernek, mert túlzottan befolyásolta az agyi aktivitást emiatt a betegeknél pszichózis vagy kóma lépett fel (Effgen & Morrison, 2017). Egyes preklinikai kutatások arról számoltak be, hogy a memantin nem szelektív NMDAR antagonistá, számos más receptorhoz is affinitást mutat. Sőt egyesek szerint ez a hatás más receptorokon (pl. $\alpha 7$ -nAChR) jelentősebb a kognitív hatás szempontjából. Aracava és mtsai. patkány hippocampus neuronjain vizsgálták klinikailag releváns dózisban a memantin hatását, és azt találták, hogy a memantin nagyobb affinitást mutatott az $\alpha 7$ -nAChR-ra, mint az NMDAR-ra. (Aracava et al., 2005).

2. Célpontok

Az NMDAR-okra, valamint az $\alpha 7$ -nAChR-okra ható farmakonok jó célpontnak ígérkeznek a TBI hátterében lezajló patológiás elváltozások megelőzésére vagy visszafordítására. Ezeket a receptorokat célba vevő vegyületek, mint a memantin vagy a PHA-543613 már korábbi kísérletekben is bizonyították a kognitív teljesítményt javító hatásait, ezen kísérletünkben

pedig a kombinált kezelések hatékonyságát szeretnénk volna vizsgálni. A farmakonok kognitív teljesítményfokozó hatását többszöri enyhe TBI által indukált demencia modellben vizsgáltuk patkányokon a transzlációs szempontból leginkább releváns szubkrónikus kezelési programok folyamán.

A konkrét célkitűzésink a következők voltak:

1. Az ismételt enyhe TBI (rmTBI) kognitív funkciókra gyakorolt hosszútávú hatásának patkányban történő modellezése.
2. Az rmTBI által kialakított kognitív zavarok enyhítése mono- és kombinált kezelések alkalmazásával.
3. Klinikai szempontból releváns memantin és $\alpha 7$ -nAChR agonista vegyületek vizsgálata szubkrónikus kezelésekben.

3. Anyagok és módszerek

3.1 A kísérleti állatok elhelyezése és tartása

A kísérletekben 197 db 7 hónapos, 400-500 g tömegű hím Long Evans patkányt alkalmaztunk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Szentágotthai János Kutatóközpontjának (PTE SZKK) állatházában tartottuk, ahol klímaberendezés biztosította a szabályozott hőmérsékletet (22 +/- 2 °C) és a megfelelő páratartalmat (30-70%) számukra. Az állatház megvilágítása automatikusan váltakozott 12 órás világos (7 órától 19 óráig) és 12 órás sötét (19 órától 7 óráig) periódusok között. A patkányokat 150 cm² alapterületű ketrecekben, párosával tartottuk. Az állatoknak fejenként napi 17 g standard laboratóriumi tápot, vizet pedig ad libitum biztosítottunk. A táplálékmennyiség korlátozására azért volt szükség, hogy az elhízás lehetőségét ezzel kizárjuk, valamint megfelelő motivációt adott az állatoknak az egyes kísérletek során. Az állatokat a kísérleteket megelőzően kézhez szoktattuk, ezzel is minimalizálva a stresszt számukra. Az állatok laboratóriumi tartásánál, és a vizsgálatok ideje alatt a hatályos jogszabályokat és irányelveket (2010/63/EU direktíva, valamint 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet) szem előtt tartva végeztük kísérleteinket. A kísérletek végzésére a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa (ÁTET) által kiadott engedéllyel rendelkezünk (Engedélyszám: BA02 / 2000-69 / 2017).

3.2 Kognitív károsodás kialakítása Marmarou módszerrel előidézett TBI következtében

A műtéti beavatkozásokat kivétel nélkül a PTE SZKK Neurotrauma Kutatócsoportja végezte. A patkányokat először 4%-os izofluránnal (Forane, Abbott, Hungary) altattuk 70%-os N₂O és 30%-os O₂ gázzal telített indukciós dobozban 5 percig. Az altatás és az érzéstelenítés

fenntartásához ezután az állatokat 1,5% izofluránnal és 70% N₂O és 30% O₂ gázkeverékkel lélegeztettük (Inspira ASV, Harvard Apparatus, Holliston, USA). Az állatok élettani funkcióit a műtét során folyamatosan monitoroztuk (testhőmérséklet, pulzus, oxigénellátottság). Ha minden paraméter a megfelelő tartományban volt az állatokat traumás agysérülésnek vetettük alá Marmarou (Marmarou et al., 1994) protokollja alapján. Először bemetszést ejtettünk az agykoponya középvonalában, ezzel felfedve a koponyacsontot. Ezután a lambda és bregma kraniometriai pontok közé a sagittális középvonalba egy rozsdamentes acél lapot (10 mm átmérőjű, 3 mm vastag) rögzítettünk. A lap rögzítése után az állatokat egy habágyra helyeztük, amely fölött egy 2 méter hosszú plexi csövet (10 mm átmérőjű) állítottunk fel. Ebbe tettük az egyenként 50 g tömegű sárgarézből készült hengert, amelyből 9 darabot rögzítettünk egymáshoz. A 450 g tömegű hengereket a patkány koponyájára rögzített acéllemezre ejtettük. Az okozott sérülés mértéke tehát az ejtési magasságtól és nem a súly tömegétől függ. Miután megtörtént a beavatkozás az acéllemezt eltávolítottuk, az állatok fejbőrét pedig összevarrtuk. Végül az állatot az altatásból történő felébredéséig a jobb megfigyelhetőség céljából egy üres ketrecbe helyeztük. Az álműtött (Sham) állatok műtési előkészületei ugyanígy megtörténtek mind az 5 napon keresztül, viszont esetükben nem történt meg a 450 g-os hengerek ráejtése az acéllemezre, azaz a traumás agysérülés létrehozása.

A sérülés súlyosságának meghatározásakor korábbi előkísérletek adatait vettük alapul (Tadepalli és mtsai. 2020), amelyekben megállapítottuk, hogy az egyszeri 15 cm magasról ejtett súlyok nem okoznak szignifikáns változást a patkányok kognitív teljesítményében, míg az ismétlődő (ötszöri) TBI kognitív zavarok kialakulását idézi elő. Kísérleteinkben, így két csoportot állítottunk fel: 1) egy ismétlődő enyhe (repetitive mild) TBI (rmTBI) csoportot, amiben az állatok 5 napon át egy ütést kaptak, 25 cm magasságból, 450g tömegű súllyal és 2) egy Sham csoportot.

3.3 Magatartás tesztek

3.3.1 Neurológiai vizsgálatok (modified neurological severity scores, mNSS)

A preoperatív neurológiai tesztek során az volt a célunk, hogy kiszűrjük azokat az állatokat, akik már eleve rendelkeznek valamilyen motoros vagy szenzoros deficiettel, mert ez egyrészt befolyásolhatja a TBI kimenetelét, másrészt a későbbi kognitív tesztek eredményeit is. A diszfunkciók mértékét pontrendszerrel határoztuk meg, ahol maximálisan 18 pontot szerezhettek az állatok (Chen et al., 2006, Liu et al., 2020).

A tesztek több részből tevődtek össze. Vizsgáltuk az állatok reflexeit, motoros aktivitását, izomtónusát és rendellenes mozgásait. A mellső és hátsó lábak flexiójának, valamint a fej

tartásának vizsgálatakor az állatot farkánál fogva egy asztal felett emeltük fel. Normális esetben a mellső és hátsó lábait az állat kinyújtja, törzsét pedig egyenesen tartja. Kognitív deficit esetén az állat lábait behajlítja, keresztbe teszi, törzsét kifordítja, fejét pedig a vízszintes tengely felé fordítja $>10^\circ$ szögben.

Az állatok szenzoros rendszerét is vizsgáltuk a vizuális, taktilis és propioceptív funkciók tesztelésével. Normális esetben az állat mellső végtagjait az asztal szélére helyezi, amint meglátja az asztal szélét. A taktilis tesztben a patkány szemét letakartuk és mellső végtagjait az asztal széléhez érintettük. A propioceptív teszt során az állatot az asztal széléhez helyeztük majd lábát óvatosan lehúztuk az asztalról.

Teszteltük az állatok reflexeit is, amely során pinna, cornea és startle reflexeket vizsgáltunk, valamint az epilepszia, mioklonus és disztónia jelenlétét is figyeltük. A pinna reflex vizsgálatakor egy puha hegyes tárggyal (fülpiszkáló) megérintettük a patkány hallójáratát. Cornea reflex vizsgálatakor az állat szaruhártyáját vattaszállal érintettük meg. Klikkert alkalmaztunk a startle (megrettenési) reflex vizsgálatára, aminek hangjára a patkány normális esetben megijed és összerezzen.

A patkányok egyensúlyának tesztelésére az ún. Beam Balance tesztet alkalmaztuk. A tesztben egy 60 cm hosszú, 1,75 cm széles, 4 cm vastag deszkát használtunk, amit a padló felett 90 cm-re rögzítettünk egy asztalhoz. Az állatoknak ezen kellett végigmenni, miközben az egyensúlyozó képességüket 30 mp-ig vizsgáltuk háromszor egymás után, a tesztek között kis szüneteket hagyva.

Deficit mértéke	Pontszám
Enyhe	1-6
Közepes	7-12
Súlyos	13-18

2. táblázat: Az mNSS során alkalmazott táblázat a deficit mértéke és a kapott pontszám összehasonlítására (Chen et al., 2006).

3.3.2 Új tárgy felismerési teszt (Novel Object Recognition Test, NOR)

Az új tárgy felismerési tesztben (Novel Object Recognition Test, NOR) az állatok deklaratív memóriáját vizsgáltuk. A patkányok feladata az volt, hogy különbséget tegyenek az új és a régi tárgy között. Az állatokat egy $57,5 \times 57,5 \times 39,5$ cm-es fadobozban (aréna) helyeztük el, melyben a mozgásszervi aktivitásukat vizsgáltuk. A szürke alapszínű aréna alját fekete festett vonalak osztották 16 db négyzetre, amiből a közepén elhelyezkedő 4 négyzetet

neveztük az aréna belső régiójának. A vizsgálatot rögzítettük nagysebességű videokamerával (JVC super LoLux, JVC KENWOOD, Yokohama, Japán) és Ethovision XT10 szoftverrel (Noldus, Wageningen, Hollandia). Az első próba során két azonos tárgyat helyeztünk az arénába, amelyeket az állat 3 percig vizsgálhatott. Ezután az állatot visszatettük a lakóketrecébe társa mellé és 3 vagy 24 óra retenciós idő elteltével következett a második próba. A 3 órás retenciós idő leteltéig az állatokat a labor melletti sötét, csendes szobában helyeztük el normál ketrecekben, míg a 24 órás retenciós idő leteltéig az állatokat visszavittük az állatházba. A második próba során a régi, ismert tárgy mellé egy új tárgy került. Minden próba után megtisztítottuk az arénát és a tárgyakat is 20%-os etanollal, ezzel elfedve az előző állat szagát. A próbák során manuálisan mértük a tárgyak vizsgálásával (exploráció) eltöltött időt stopperóra segítségével. Azt tekintettük felfedező magatartásnak, amikor az állat közel dugta az orrát a tárgyhöz vagy szimatolta azt. Négy különböző objektumpárt használtunk, amiket latin-négyzet elrendezés szerint osztottunk szét véletlenszerűen a kísérleti ülések és az állatok között. A második próbában diszkriminációs indexet számoltunk (DI) a következő egyenlet alapján: $DI = (E_n - E_f) / (E_n + E_f)$, ahol E_n az új tárgy, E_f pedig az ismert tárgy felfedezésével eltöltött idő. Nulla körüli DI értéket kaptunk, ha az állatok közel hasonló ideig vizsgálták a régi és az új tárgyat. A DI negatív szám amennyiben az állat az ismert objektumot hosszabb ideig figyelte meg, míg a DI pozitív, ha az új tárgyat figyelte meg hosszabb ideig. Azokat az állatokat, akik bármelyik 4 NOR teszt alatt ± 1 DI értéket produkáltak, kizártuk a kiértékelésből.

3.4 A kísérletek menete és a használt farmakonok

A kísérletek során minden állat eredményét a saját, szubkrónikus kezeléseket megelőző teljesítményükhöz hasonlítottuk (within-subject).

Ezen kísérletek előtt az állatoknak fiziológiás sóoldatot injektáltunk 1 ml-es fecskendő segítségével szubkután (SC) 1ml/kg-os végtérfogatban a tényleges farmakonokos kezelésekkkel megegyező módon.

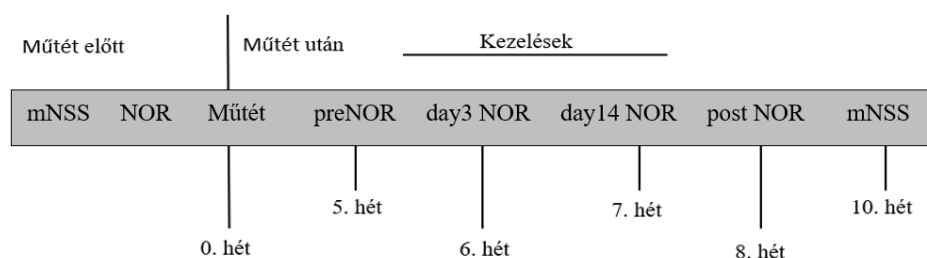
A műtétek előtt minden állaton elvégeztük a neurológiai tesztet és a NOR paradigmát is. Ezután következett a műtét, amely során repetitív enyhe TBI-on (rmTBI) vagy álműtött (sham) estek át az állatok. A műtét utáni 5. héten végeztük el az első NOR tesztet, amelyben az állatok még semmilyen kezelésben nem részesültek. A kezelések a 6. héten indultak és a 7. héten fejeződtek be. Ezalatt az idő alatt két NOR tesztet végeztünk el, egyet a kezelés 3. napján egyet pedig a kezelés 14. napján. A negyedik NOR tesztet a műtét után 8 héttel végeztük el. Végül a műtéttől számított 10. héten a műtét utáni mNSS tesztet végeztük el.

A NOR tesztek során memantint, $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613-t, valamint ezen

vegyületek kombinációit alkalmaztuk. A vizsgált vegyületeket 14 napon át 12 óránként szubkután (SC) adtuk be az állatoknak. Kísérleti napokon a napi első anyagbeadás a tesztek előtt 3 órával történt. A vegyületeket fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Kontrollnak tekintettük azokat az állatokat, akiknek fiziológiás sóoldatot (VEH) injektáltunk az egész kísérlet során. A NOR tesztek során monoterápiában alkalmaztunk memantint (0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg) és PHA-543613-at (0,1 mg/kg; 2,0 mg/kg), illetve a kombinált terápiák során memantin (0,03 mg/ttkg) + PHA-543613 (0,1 mg/ttkg) és memantin (0,3 mg/ttkg) + PHA-543613 (0,1 mg/ttkg) kezeléseket alkalmaztunk a már említett VEH-os állatokkal kiegészítve az egyes csoportokat.

	Vegyület neve	(mg/ttkg)
MONO- TERÁPIA	Memantin	0,03
		0,3
	PHA-543613	0,1
		2,0
KOMBINÁLT TERÁPIA	Memantin +	0,03
	PHA-543613	0,1
	Memantin +	0,3
	PHA-543613	0,1

3. táblázat: A kezelések során alkalmazott kognitív teljesítményfokozó kezelések táblázatos összefoglalása a használt vegyület nevével és az alkalmazott dózissal



1. ábra: A kísérletek időbeli ütemezése.

Jelmagyarázat: preNOR: kezelés előtti új tárgy felismerési (NOR) teszt; day3 NOR: kezelés 3. napján mért NOR teszt; day15 NOR: kezelés 15. napján mért NOR teszt; postNOR: kezelés befejezése utáni NOR teszt

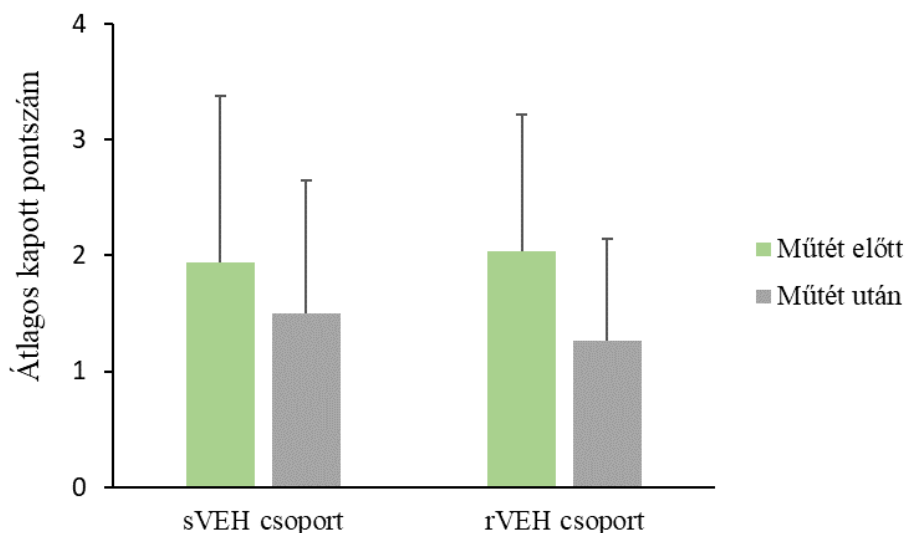
3.6 Statisztikai értékelés

Az mNSS és NOR tesztben kapott eredményekből számolt átlagot és standard hibát ($\pm$ S.E.M) Excel táblázatkezelő program segítségével oszlopdiagramon ábrázoltuk. A statisztikai kiértékelés során Jamovi 2.3.18 programot használtunk. Az álműtött (sVEH) és rmTBI-on átesett (rVEH) állatok, akik nem kaptak farmakológiai kezelést, mNSS eredményeit oszlopdiagramon ábrázoltuk. Ugyanezen állatok NOR tesztben kapott diszkriminációs indexeinek és az explorációs időinek összehasonlítására független kétmintás T-tesztet és két utas ANOVA tesztet alkalmaztunk. A farmakológiai kezelésen átesett állatok NOR tesztben két különböző mérési időpontokban kapott diszkriminációs indexek közötti különbség kimutatására egyutas ismétléses varianciatesztet (repeated measures ANOVA) alkalmaztunk. Ha a főhatások szignifikánsnak bizonyultak, a Tukey-féle post-hoc tesztet is elvégeztük. Az új és ismert tárgy explorációjával eltöltött idő kiértékelésére párosított T-tesztet alkalmaztunk. Minden eredményt $p < 0,05$ érték esetén tekintettünk szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1 Neurológiai deficitok mérése mNSS tesztben

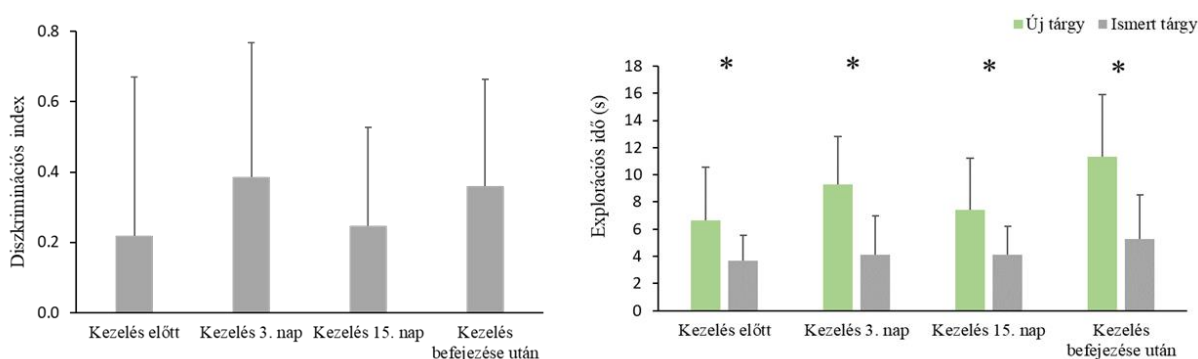
Az mNSS tesztben az állatok átlagos kapott pontszámának mediánja az enyhe kategóriába sorolható, emiatt elmondható, hogy nem okozott motoros vagy szenzoros deficitet a műtét az állatokban.



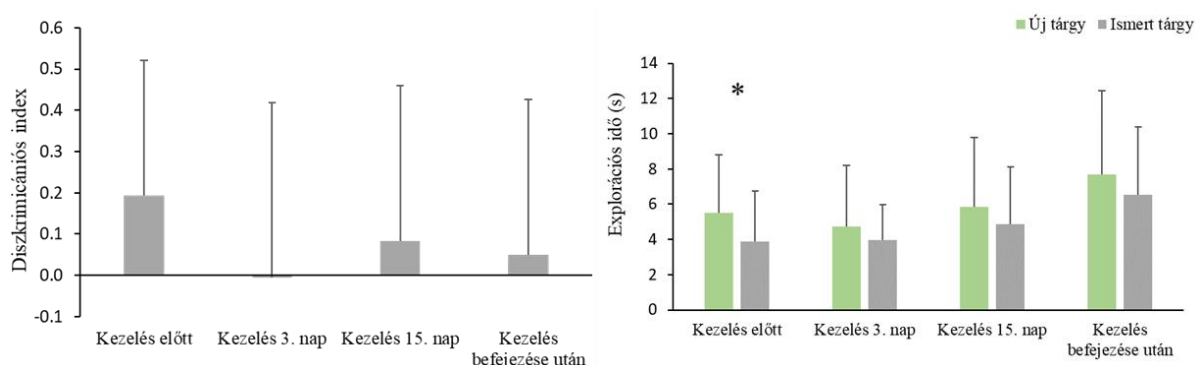
1. ábra Az álműtött (sVEH, $N=18$) és az ismételt enyhe traumás agysérülésen (rVEH, $N=25$) átesett csoport átlagos kapott pontszámainak mediánja műtét előtt és után.

4.2 Az álműtött állatok és az rmTBI-on átesett állatok teljesítménye a NOR testben

A műtétek előtt a NOR teszt második próbájában az új tárgyat szignifikánsan többet explorálták mind az sVEH, mind az rVEH csoportba tartozó állatok. A műtét utáni 6. héten azonban az sVEH csoport szignifikánsan többet vizsgálta az új tárgyat a vehikulumos kezelések alatt és után is ($F=0.908$; $p=0.445$) (3. ábra). Ezzel szemben az rVEH csoport nem tudott diszkriminálni az új és a régi tárgy között ($F=1.17$; $p=0.327$) (4. ábra).



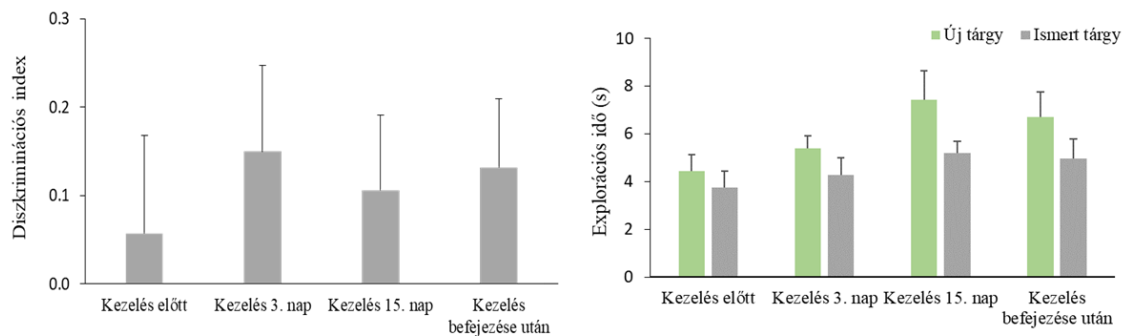
3. ábra: Álműtött (sVEH, $N=18$) állatok teljesítménye az új tárgy felismerési (NOR) tesztben. A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között, viszont az explorációs idő tekintetében a kezelés előtt és a kezeléseket alatt is szignifikánsan többet explorálták az új tárgyat.



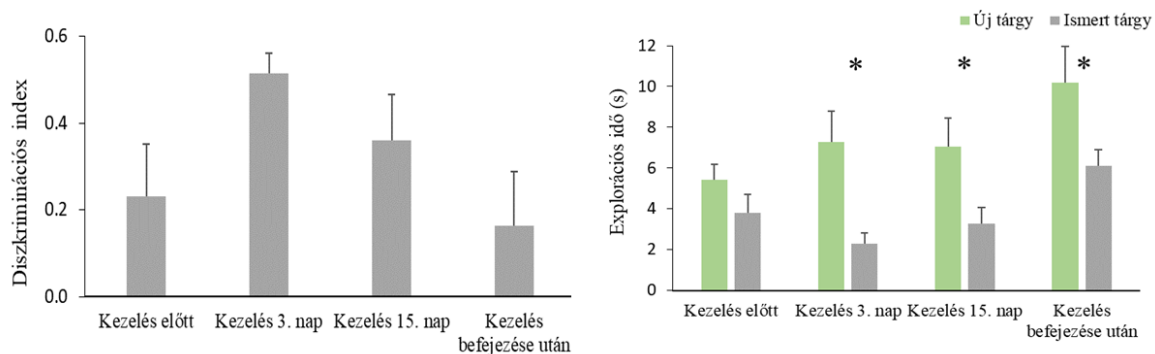
4. ábra: A traumatikus agysérülésen átesett (rVEH, $N=25$) állatok teljesítménye az új tárgy felismerési (NOR) tesztben. A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között. Az állatok csak a műtét előtt explorálták többet az új tárgyat, a műtét után nem tudtak különbséget tenni az új és a régi tárgy között.

4.3 A memantin monokezelés hatása az rmTBI-on átesett állatok teljesítményére a NOR testben

A monokezelésben alkalmazott memantin alacsonyabb dózisa (0,03 mg/ttkg) nem tudta visszafordítani a TBI okozta kognitív deficitet ($F=0.138$; $p=0.936$) (5. ábra). Ezzel szemben a magasabb dózis már a kezelés 3. napján hatékonynak bizonyult és ez a hatás a kezelés befejezése után is fennmaradt. A diszkriminációs index tekintetében egy tolerancia figyelhető meg a kezelés előrehaladtával ($F=2.0$; $p=0.132$) (6. ábra).



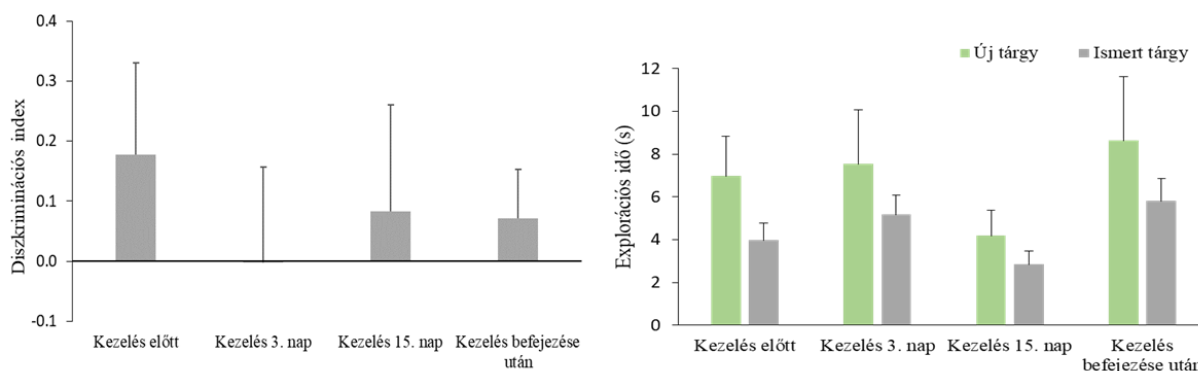
5. ábra: Az alacsonyabb dózisú memantin (0,03 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=13). A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között. Az állatok a kezelések előtt és a kezelések után sem tudtak különbséget tenni az új és a régi tárgy között.



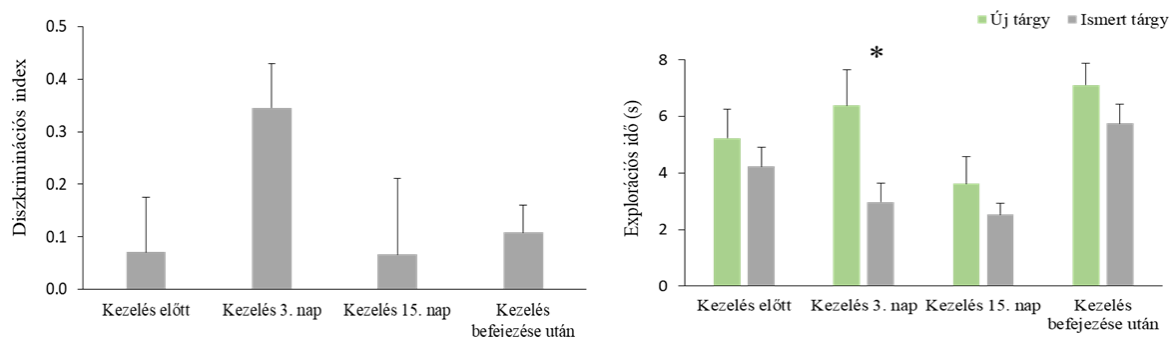
6. ábra: A magasabb dózisú memantin (0,3 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=11). A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között. Az állatok a kezelések alatt és a kezelések befejezése után is diszkrimináltak az új és a régi tárgy között.

4.4 A PHA-543613 monokezelés hatása az rmTBI-on átesett állatok teljesítményére NOR tesztben

A monokezelésben alkalmazott PHA-543613 alacsonyabb dózisa (0,1 mg/ttkg) nem tudta visszafordítani a TBI okozta kognitív deficitet ($F=0.415$; $p=0.743$) (7. ábra). A magasabb dózis a kezelés 3. napján javította az állatok teljesítményét, diszkrimináltak az új és a régi tárgy között ($F=1.86$; $p=0.159$) (8. ábra). Mindkét dózis esetében a kezelés előrehaladtával az explorációs időben egy csökkenő tendencia figyelhető meg, ami a kezelések befejezése után az alap értékre áll vissza.



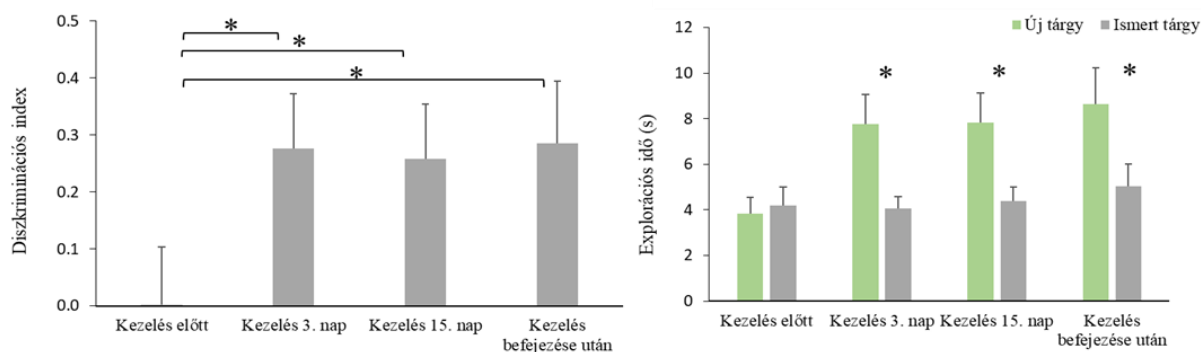
7. ábra: Az alacsonyabb dózisú PHA-543613 (0,1 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=11). A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között. Az állatok teljesítményében nem volt jelentős eltérés a mérési napok között.



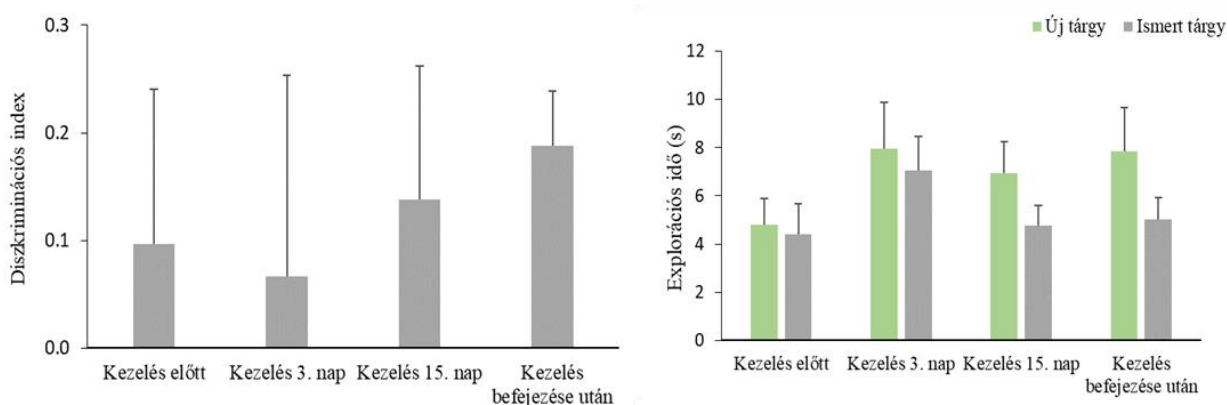
8. ábra: A magas dózisú PHA-543613 (2,0 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=12). A diszkriminációs index tekintetében nem volt eltérés a mérési napok között. Az állatok teljesítményében a kezelés 3. napján javulás volt látható, diszkrimináltak a régi és az új tárgy között.

4.5 A kombinált kezelések hatása a NOR tesztben

Az alacsonyabb dózisú memantin (0,03 mg/ttkg) kombinálva az alacsonyabb dózisú PHA-543613-mal (0,1 mg/ttkg) hatékonyan visszafordította a TBI által kialakított kognitív deficitet. Az állatok diszkriminációs indexe jelentősen javult a kezelések előtti állapothoz képest, szignifikánsan többet explorálták az új tárgyat ($F=2.59$; $p=0.071$) (9. ábra). A magasabb dózisú memantin (0,3 mg/ttkg) kombinálva az alacsonyabb dózisú PHA-543613-mal (0,1 mg/ttkg) nem bizonyult hatékonynak. Az állatok nem tudtak különbséget tenni az új és a régi tárgy között ($F=0.119$; $p=0.948$) (10. ábra)



9. ábra: Az alacsonyabb dózisú memantin (0,03 mg/ttkg) és az alacsonyabb dózisú PHA-543613 (0,1 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=13). A diszkriminációs indexben a kezelések alatt és a kezelések után is javulást értünk el a kezelés előtti mérési ponthoz képest. Az állatok többet exploráltak az új tárgyat a kezelések alatt és után is.



10. ábra: A magasabb dózisú memantin (0,3 mg/ttkg) és az alacsonyabb dózisú PHA-543613 (0,1 mg/kg) hatása az új tárgy felismerési (NOR) tesztben (N=8). Az állatok teljesítményét a kezelések alatt és a kezelések után sem javította ez a kombinált kezelés.

5. Eredmények megvitatása

Kísérleteinkben 7 hónapos Long Evans patkányokon vizsgáltuk, hogy az NMDAR antagonistá memantin kombinált alkalmazása az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 vegyülettel hogyan hatnak a repetitív enyhe traumás agysérülésen (rmTBI) átesett állatok deklaratív memóriájára, amit új tárgy felismerési tesztben (NOR) vizsgáltunk. Az állatokat neurológiai tesztnek (mNSS) is alávetettük, hogy kizárjuk az esetleges alapvető szenzoros vagy motoros deficitet. Az rmTBI kivitelezéséhez Marmarou súlyejtési modelljét alkalmaztuk, azt remélve, hogy az állatoknál fellépnek a memóriadeficit tünetei, melyet igazoltunk is az álműtött (sVEH) és a rmTBI-on (rVEH) átesett állatok eredményeivel a NOR tesztben.

Az mNSS során a műtét előtti kontrollhoz képest az sVEH és az rVEH csoport sem teljesített szignifikánsan rosszabbul, amiből arra következtetünk, hogy a műtét és a súlyejtés

nem okozott szenzoros vagy motoros károsodást az állatokban. Továbbá az összesített pontszámok alapján minden állat a normális állapot vagy az enyhe deficit kategóriájába esett a deficit súlyossága alapján. Mindezeknek köszönhetően kizárható volt, hogy az állatok a TBI miatt kialakult motoros és szenzoros deficitok miatt teljesítenek rosszul a kísérletekben.

Az rVEH és sVEH csoportok NOR teljesítményét megvizsgálva azt találtuk, hogy mindkét csoport szignifikánsan többet vizsgálta az új tárgyat a műtétek előtt, ám ezt a teljesítményt csak az sVEH csoport tudta fenntartani a műtét után, minden mérési napon szignifikánsan többet vizsgálták az új tárgyat. Ebből az a következtetés vonható le, hogy az alkalmazott rmTBI modell hatásos volt.

Az NMDAR antagonistá memantin kognitív teljesítményfokozó hatását NOR tesztben vizsgáltunk, ahol a szubeffektív dózis (0,03 mg/kg) nem bizonyult hatékonynak. Ezzel szemben a szintén monokezelésben alkalmazott magasabb dózisú memantinnal (0,3 mg/ttkg) kezelt állatok a kezelések ideje alatt és a kezelések befejezése után is diszkrimináltak az új és a régi tárgy között. Hasonló eredményekről számolnak be más kutatások is az alacsony és magas dózissal történő kezelések során (Barber et al., 2010; Minkeviciene et al., 2004). A memantin hosszútávú neuroprotektív hatása jól látszik, hiszen az kezelések után az állatok szignifikánsan többet explorálták az új tárgyat. Ezt a hatást mások is tapasztalták a NOR teszt során, valamint bizonyítékkal támasztották alá, hogy a magas dózis képes volt visszafordítani a káros oxidatív sérüléseket a memóriában fontos szerepet játszó cortexben és hippocampusban (Pietá Dias et al., 2007). A memantin a neuroprotektív hatást jelen kísérletünkben nem támasztottuk alá szövettani eredményekkel, azonban számos traumatikus agysérülésre alapozó állatsérülésben és humán szövettani vizsgálatban már korábban igazolták a magas dózisú memantin neuroprotektív hatását (Day et al., 2017; Khan et al., 2021; Mei et al., 2018).

Az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 szubeffektív dózisú (0,1 mg/ml) kezelés nem bizonyult hatékonynak, hiszen az állatok diszkriminációs indexe a kezelések alatt és után sem javult. Eredményeinkkel ellentétben az alacsony dózisú PHA-543613 képes volt visszafordítani a stroke okozta károsodásokat egerekben (Han et al., 2014). Hasonló hatást figyeltek meg A β -val kezelt egerekben, ugyanis a PHA-543613 képes volt visszafordítani A β kezelés miatt kialakult deficitet a memóriában a Morris-féle vízi útvesztőben (Sadigh-Eteghad et al., 2015). A magasabb dózis (2,0 mg/kg) rövid távon hatásos volt, hiszen a kezelés 3. napján az állatok diszkrimináltak a régi és az új tárgy között, de ez a hatás a kezelés 15. napján lecsökken. A diszkriminációs indexben egyfajta tolerancia látható, hiszen a kezelések megkezdésekor a legmagasabb a hatás és a kezelések alatt folyamatosan csökken. Általánosan elmondható, hogy amíg az állatok kezelve vannak javulás érhető el az explorációs idő tekintetében, de egy

tolerancia alakul ki a kezelés hatására.

A szubeffektív memantin (0,03 mg/ttkg) és a szubeffektív PHA-543613 (0,1 mg/ttkg) kombinált terápiája a kezelés 3. napján már javította az állatok deklaratív memóriáját, diszkrimináltak az új és a régi tárgy között. A két kognitív teljesítményfokozó kezelés önmagában nem volt hatásos, viszont a kombinált kezeléssel a terápia alatt és az után is több ideig explorálták az állatok az új tárgyat. A magasabb dózisú memantin (0,3 mg/ttkg) a szubeffektív PHA-543613-mal (0,1 mg/ttkg) alkalmazva már nem volt ilyen hatásos, nem javította sem a diszkriminációs indexet, sem pedig az explorációs időt.

Összeségében elmondható, hogy a memantin és a PHA-543613 szubeffektív dózisú kombinált terápiájával javulás érhető el az állatok deklaratív memóriájában a NOR tesztben. Önmagukban a szubeffektív dózisok nem voltak hatékonyak, de kombinált kezelésben olyan interakció jöhet létre a két kognitív teljesítményfokozó hatása között, amelyek egymást kiegészítve hatékonyabban enyhítik az rmTBI okozta kognitív hanyatlást, mint a monoterápiák.

Az rmTBI okozta patológiás elváltozások sok esetben csak a sérülés után évekkel jelennek meg, emiatt fontos az olyan alap preklinikai vizsgálatok elvégzése, amelyben ennek a nagyon diverz patológiás elváltozásokat okozó betegségnek a kutatása áll a központban. Az rmTBI-t kialakító sérülés az emberekben sok esetben nagyon változó okokra vezethető vissza, azonban az állatkísérletekben használt TBI modellek jól kontrollálható alternatívát nyújtanak a TBI vizsgálatára. Számos TBI modell áll rendelkezésre, amelyekkel diffúz vagy lokális sérülés alakítható ki, így akár egyes agyterületek is vizsgálhatóvá válnak.

Jövőbeli vizsgálatunk tárgyát fogja képezni a postmortem szövettani és proteomikai vizsgálatok elvégzése és kiértékelése. Ezekben a kísérletekben szeretnénk célzottan olyan TBI során fellépő markereket vizsgálni, amelyekkel jobban megérthetjük a TBI patomechanizmusát, valamint az $\alpha 7$ -nAChR-ok expresszióját is szeretnénk vizsgálni a különböző sejtípusokon az egyes kezelési csoportokban.

6. Irodalomjegyzék:

- Aracava, Y., Pereira, E. F. R., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (2005). Memantine blocks $\alpha 7^*$ nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(3), 1195–1205. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.077172>
- Geldmacher, D. S., & Whitehouse, P. J. (1996). Evaluation of dementia. *The New England journal of medicine*, 335(5), 330–336. <https://doi.org/10.1056/NEJM199608013350507>
- Bali, Z. K., Inkeller, J., Csurgó, R., Bruszt, N., Horváth, H., & Hernádi, I. (2015). Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behavioural Brain Research*, 278, 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.030>
- Barber, T. A., Meyers, R. A., & McGettigan, B. F. (2010). Memantine improves memory for taste-avoidance learning in day-old chicks exposed to isolation stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.01.006>
- Baumgart, M., Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Fazio, S., Kim, H., & Johns, H. (2015). Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimer's and Dementia*, 11(6), 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.05.016>
- Bey, T., & Ostick, B. (2009). Second impact syndrome. *The western journal of emergency medicine*, 10(1), 6–10.
- Blennow, K., Hardy, J., & Zetterberg, H. (2012). The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. In *Neuron* (Vol. 76, Issue 5, pp. 886–899). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.021>
- Bruszt, N., Bali, Z. K., Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., & Hernádi, I. (2021). Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer's disease medication memantine by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task. *Psychopharmacology*, 238(11), 3273–3281. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05942-4>

- Chen, J., Zacharek, A., Li, A., Zhang, C., Ding, J., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A., & Chopp, M. (2006). Vascular endothelial growth factor mediates atorvastatin-induced mammalian achaete-scute homologue-1 gene expression and neuronal differentiation after stroke in retired breeder rats. *Neuroscience*, 141(2), 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.042>
- Dashnaw, M. L., Petraglia, A. L., & Bailes, J. E. (2012). An overview of the basic science of concussion and subconcussion: Where we are and where we are going. *Neurosurgical Focus*, 33(6). <https://doi.org/10.3171/2012.10.FOCUS12284>
- Day, N. L., Carle, M. S., & Floyd, C. L. (2017). Post-injury administration of a combination of memantine and 17 β -estradiol is protective in a rat model of traumatic brain injury. *Neurochemistry International*, 111, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.04.018>
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., & Hayes, R. L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 39(3), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90104-8)
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F., & Hayes, R. L. (1987). A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of neurosurgery*, 67(1), 110–119. <https://doi.org/10.3171/jns.1987.67.1.0110>
- Dixon, K. J. (2017). Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. In *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* (Vol. 28, Issue 2, pp. 215–225). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.12.001>
- Effgen, G. B., & Morrison, B. (2017). Memantine Reduced Cell Death, Astrogliosis, and Functional Deficits in an in vitro Model of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 34(4), 934–942. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4528>
- Faden, A. I., & Loane, D. J. (2015). Chronic Neurodegeneration After Traumatic Brain Injury: Alzheimer Disease, Chronic Traumatic Encephalopathy, or Persistent Neuroinflammation? *Neurotherapeutics*, 12(1), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0319-5>
- Gardner, R. C., & Yaffe, K. (2015). Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. In *Molecular and Cellular Neuroscience* (Vol. 66, Issue PB, pp. 75–80). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.001>

- Han, Z., Li, L., Wang, L., Degos, V., Maze, M., & Su, H. (2014). Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture. *Journal of Neurochemistry*, 131(4), 498–508. <https://doi.org/10.1111/jnc.12817>
- Ho, V. M., Lee, J. A., & Martin, K. C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. In *Science* (Vol. 334, Issue 6056, pp. 623–628). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1209236>
- Hoogenboom, W. S., Branch, C. A., & Lipton, M. L. (2019). Animal models of closed-skull, repetitive mild traumatic brain injury. *Pharmacology and Therapeutics*, 198, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.016>
- Hoskin, J. L., Al-Hasan, Y., & Sabbagh, M. N. (2019). Nicotinic acetylcholine receptor agonists for the treatment of Alzheimer’s dementia: An update. *Nicotine and Tobacco Research*, 21(3), 370–376. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty116>
- Khan, S., Ali, A. S., Kadir, B., Ahmed, Z., & di Pietro, V. (2021). *Effects of Memantine in Patients with Traumatic Brain Injury: A Systematic Review*. <https://doi.org/10.3390/traumas>
- Lee, Y. K., Hou, S. W., Lee, C. C., Hsu, C. Y., Huang, Y. S., & Su, Y. C. (2013). Increased Risk of Dementia in Patients with Mild Traumatic Brain Injury: A Nationwide Cohort Study. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062422>
- Ling, H., Hardy, J., & Zetterberg, H. (2015). Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. In *Molecular and Cellular Neuroscience* (Vol. 66, Issue PB, pp. 114–122). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.012>
- Liu, Z. H., Chen, N. Y., Tu, P. H., Wu, C. te, Chiu, S. C., Huang, Y. C., Lim, S. N., & Yip, P. K. (2020). Dha attenuates cerebral edema following traumatic brain injury via the reduction in blood–brain barrier permeability. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21176291>
- Ma, K. G., & Qian, Y. H. (2019). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer’s disease. In *Neuropeptides* (Vol. 73, pp. 96–106). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.12.003>
- Mannix, R., Meehan, W. P., Mandeville, J., Grant, P. E., Gray, T., Berglass, J., Zhang, J., Bryant, J., Rezaie, S., Chung, J. Y., Peters, N. v., Lee, C., Tien, L. W., Kaplan, D. L., Feany, M., &

- Whalen, M. (2013). Clinical correlates in an experimental model of repetitive mild brain injury. *Annals of Neurology*, 74(1), 65–75. <https://doi.org/10.1002/ana.23858>
- Marmarou, A., Abd-elfattah Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., Demetriadou, K., & Roland Reynolds, R. (1994a). A new model of diffuse brain injury in rats Part I: Pathophysiology and biomechanics. In *J. Neurosurg* (Vol. 80).
- Mei, Z., Qiu, J., Alcon, S., Hashim, J., Rotenberg, A., Sun, Y., Meehan, W. P., & Mannix, R. (2018). Memantine improves outcomes after repetitive traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*, 340, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.017>
- Mendez, M. F. (2017). What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 3, pp. 667–681). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-161002>
- Minkeviciene, R., Banerjee, P., & Tanila, H. (2004). Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 677–682. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.071027>
- Nóra Bruszt, Zsolt Bali, & István Hernádi. (2016). Memantin és PHA543613 kombinált hatásának vizsgálata szkopolaminnal indukált demencia modellben patkányban. *Diplomamunka* 1–35.
- Parsons, C. G., Danysz, W., Dekundy, A., & Pulte, I. (2013). Memantine and cholinesterase inhibitors: Complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 24, Issue 3, pp. 358–369). <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9398-z>
- Pietá Dias, C., Martins de Lima, M. N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V. A., Siciliani Scalco, F., Rewsaat Guimarães, M., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., & Schröder, N. (2007). Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146(4), 1719–1725. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.018>
- Ricker, J. H., & Arenth, P. M. (2006). Traumatic brain injury. In *Functional MRI: Applications in Clinical Neurology and Psychiatry* (pp. 197–206). CRC Press. <https://doi.org/10.1177/0963689717714102>

- Rubiano, A. M., Carney, N., Chesnut, R., & Puyana, J. C. (2015). Global neurotrauma research challenges and opportunities. In *Nature* (Vol. 527, Issue 7578, pp. S193–S197). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature16035>
- Sadigh-Eteghad, S., Talebi, M., Mahmoudi, J., Babri, S., & Shanehbandi, D. (2015). Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by PHA-543613 improves A β 25-35-mediated cognitive deficits in mice. *Neuroscience*, 298, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.017>
- Saigal, R., & Berger, M. S. (2014). The long-term effects of repetitive mild head injuries in sports. *Neurosurgery*, 75, S149–S155. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000497>
- Sande, A., & West, C. (2010). Traumatic brain injury: A review of pathophysiology and management. In *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* (Vol. 20, Issue 2, pp. 177–190). <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2010.00527.x>
- Schretlen, D. J., & Shapiro, A. M. (2003). A quantitative review of the effects of traumatic brain injury on cognitive functioning. In *International Review of Psychiatry* (Vol. 15, Issue 4, pp. 341–349). <https://doi.org/10.1080/09540260310001606728>
- Sivanandam, T. M., & Thakur, M. K. (2012). Traumatic brain injury: A risk factor for Alzheimer's disease. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 36, Issue 5, pp. 1376–1381). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.013>
- Smith, D. H., Johnson, V. E., & Stewart, W. (2013). Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: Substrates of dementia? *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 211–221. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.29>
- Sternbach G. L. (2000). The Glasgow coma scale. *The Journal of emergency medicine*, 19(1), 67–71. [https://doi.org/10.1016/s0736-4679\(00\)00182-7](https://doi.org/10.1016/s0736-4679(00)00182-7)
- Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., Bruszt, N., Nagy, L. V., Amrein, K., Fazekas, B., Büki, A., Czeiter, E., & Hernádi, I. (2020). Long-term cognitive impairment without diffuse axonal injury following repetitive mild traumatic brain injury in rats. *Behavioural Brain Research*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112268>
- Tenovuo, O. (2005). Central acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of chronic traumatic brain injury - Clinical experience in 111 patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.10.006>

- Wallace, T. L., & Porter, R. H. P. (2011). Targeting the nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 891–903.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.034>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 2, pp. 128–142).
<https://doi.org/10.1038/nrn3407>

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Bali Zsolt Kristófnak és Dr. Hernádi Istvánnak a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítséget és az OTDK dolgozatom elkészüléséhez nélkülözhetetlen útmutatásukat. Továbbá szeretném megköszönni Bruszt Nórának, Nagy Lilinek a kísérletek során nyújtott segítségüket, valamint a neurotrauma kutatócsoport tagjainak Prof. Dr. Büki Andrásnak, Dr. Czeiter Endrének, Amrein Krisztinának és Fazekas Bálintnak, hogy lehetővé tették a kísérleteinket a rmTBI kezelések kivitelezésével.