

NEUROFARMAKOLOGICKÁ PODSTATA PŮSOBNÍ MEMANTINU V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY DEMENCE

Miloš Petrovič, Miloslav Sedláček, Martin Horák, Ladislav Vyklícký jr.

Fyziologický ústav AVČR, Praha

N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory patří do skupiny ionotropních glutamátových receptorů, které společně s dalším podtypem glutamátových receptorů – AMPA/kainátovým receptorem zprostředkovávají rychlý synaptický přenos na většině excitačních synapsí v centrální nervové soustavě. NMDA receptory hrají zásadní úlohu pro zajištění komplexních funkcí nervové soustavy jako celku. Jejich aktivace je nutná pro navození dlouhodobé potenciace synaptického přenosu (LTP), o níž se předpokládá, že představuje buněčný mechanismus, který se ve specifických oblastech nervové soustavy uplatňuje na vytváření paměťových stop. Nadměrná aktivace NMDA receptorů vede k patologickým procesům, které mohou vyústit až ve specifickou formu smrti neuronů (excitotoxicita). Existují experimentální důkazy o tom, že se excitotoxicita podílí na vzniku celé řady neurodegenerativních onemocnění a že antagonisté NMDA receptorů mohou představovat terapeutický potenciál pro léčbu onemocnění vykazující jak akutní, tak chronické formy neurodegenerace včetně Alzheimerovy demence. Memantin je látkou, která akompetitivním a napětově závislým způsobem blokuje iontové kanály NMDA receptorů a existují důkazy o tom, že zlepšuje kognitivní funkce a zpomaluje jejich zhoršování u Alzheimerovy demence. Cílem tohoto přehledu je shrnout současné poznatky o mechanismech působení memantinu na NMDA receptorech a představy o jeho možném využití při léčbě některých klinických syndromů, s nimiž se setkáváme u neurodegenerativních chorob, především Alzheimerovy demence.

Klíčová slova: NMDA receptory, excitotoxicita, glutamát, memantin, Alzheimerova demence, blokátor iontového kanálu.

TRE NEUROPHARMACOLOGICAL BASIS OF MEMANTINE ACTION IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors belong to the group of ionotropic glutamate receptors and together with AMPA/kainate receptors mediate fast excitatory synaptic transmission in the brain and spinal cord and play a key role in maintaining complex functions of the central nervous system. Their activation is an important step in the induction of long term changes in the efficacy of synaptic transmission (LTP) that is considered to represent the cellular mechanism underlying memory acquisition in specific brain regions. Excessive activation of NMDA receptors results in pathological states that may lead to a specific form of neuronal cell death (excitotoxicity). Experimental evidence suggests that excitotoxicity participates in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders of the central nervous system. Therefore, NMDA receptor antagonists may act as potential therapeutic agents in both, the acute and chronic forms of neurodegeneration. Memantine is an uncompetitive and voltage-dependent blocker of NMDA receptor channels and was shown beneficial in improving cognition and slowing the progression of Alzheimer's disease. The aim of this review is to summarize the present knowledge on the mechanisms involved in the effects of memantine on NMDA receptors and the ideas on its use as a potential remedy in the treatment of clinical symptoms that accompany Alzheimer's dementia.

Key words: NMDA receptor, excitotoxicity, glutamate, memantine, Alzheimer dementia, ion channel blocker.

Úvod

Memantin (1-amino-3,5-dimetyladamantan) patří do skupiny aminoadamantanů – organických látek vyznačujících se tricyklickou strukturou (obrázek 1A). První látkou z této skupiny byl klinicky užívaný amantadin uvedený na trh v roce 1966 pro jeho antivirové působení. Při profylaktickém užívání amantadinu proti chřipkové nákaze bylo pozorováno, že u některých pacientů trpících Parkinsonovou chorobou došlo ke zlepšení symptomů – především třesu (1). Memantin byl poprvé syntetizován v roce 1960 ve snaze vyvinout nová antidiabetika. Antidiabetická aktivita u něj sice nebyla zjištěna, ale ukázalo se, že memantin, podobně jako amantadin, působí na nervový systém. Později bylo zjištěno, že blokuje iontové kanály NMDA receptorů (2, 3).

Memantin byl poprvé registrován v Německu v roce 1978 jako neurotonikum k „všeobecnému

použití“. V roce 1989 mu byla udělena licence pro léčbu demencí. Řada studií následně přinesla důkazy o tom, že jde o látku vhodnou pro léčbu Alzheimerovy demence (AD) a vaskulární demence (4, 5, 6), u nichž zlepšuje kognitivní schopnosti a snižuje závislost na péči (7).

Cílem tohoto přehledu je ukázat molekulární mechanismy, jež se uplatňují při působení memantinu na NMDA receptory a naznačit, jak se vyhnout anebo omezit nežádoucí vedlejší účinky při léčbě AD.

1. NMDA receptory a působení memantinu

1.1. NMDA typ glutamátem aktivovaného iontového kanálu

V centrální nervové soustavě obratlovců existují dvě skupiny receptorů pro neuroprénašeč

glutamát: metabotropní (spřažené s G-proteiny) a ionotropní (glutamátem aktivované iontové kanály). Na základě farmakologických a molekulárně biologických studií bylo ukázáno, že existují tři podskupiny ionotropních glutamátových receptorů, které jsou označovány podle selektivních agonistů: (S)-Amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolepropionové (AMPA), kainátové a N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory (8).

NMDA receptory se vyskytují ve velkém množství v celém mozku a jsou nezbytné pro jeho normální činnost. Jsou exprimovány na všech neuronech a jsou přítomny nejen v synapsích, ale i v mimosynaptických oblastech. Synaptické NMDA receptory společně s dalšími typy ionotropních glutamátových receptorů zprostředkovávají excitační synaptický přenos přibližně na

polovině všech synapsí v mozku a míše. Signální kaskády aktivované vtokem Ca^{2+} do neuronů synaptickými NMDA receptory, představují kritický krok pro indukci dlouhodobé potenciace synaptického přenosu (LTP; z anglického – long term potentiation) a tedy i pro neuronovou plasticitu a vznik paměti. Funkce extrasynaptických NMDA receptorů je zatím nejasná, ale experimentální práce naznačují, že jejich dlouhodobá aktivace vede k buněčné smrti (9).

Funkční a farmakologické vlastnosti NMDA receptorů byly zpočátku studovány pouze na nativních NMDA receptorech, ale rozvoj molekulárně biologických technik umožnil jejich studium i na rekombinantních NMDA receptorech. NMDA receptory jsou pravděpodobně heterotetramery tvořené kombinací různých typů podjednotek označovaných NR1, NR2 a NR3 (10, 11, 12, 13, 14, 15). Předpokládá se, že funkční NMDA receptory vznikají kombinací dvou podjednotek NR1 typu a dvou podjednotek NR2A-D nebo NR3A-B typu (16, 17). Zatímco NR1 podjednotka je exprimována ve velkém množství v celém mozku, exprese podjednotek NR2 je výrazně regionálně ohraničena (11, 12). NR2A a NR2B podjednotky jsou exprimovány v hipokampu a neokortexu, NR2C podjednotka je přítomna téměř výlučně v cerebellu a NR2D podjednotka je přechodně exprimována během embryonálního vývoje. Z experimentů provedených na rekombinantních i nativních NMDA receptorech vyplynulo, že podjednotkové složení receptoru ovlivňuje jeho funkční a farmakologické vlastnosti (10, 12, 18).

Pro otevření iontového kanálu NMDA receptorů, selektivně propustného pro Na^+ a Ca^{2+} , je nezbytná současná aktivace vazebných míst specifických pro glutamát a glycin (19, 20). Fyziologickým agonistou glutamátového místa je též L-aspartát, který je na rozdíl od glutamátu selektivním agonistou pouze NMDA receptorů (21). Na glycin vázícím místě působí za fyziologických podmínek též D-serin (19, 22, 23) (obrázek 1B).

Zjištění, že NMDA receptory hrají významnou roli při vzniku patologické excitace v centrální nervové soustavě, např. té, která vzniká během epileptických záchvatů nebo glutamátem vyvolané excitotoxicity vznikající v souvislosti s traumatem nebo mozkovou příhodou, vedla k intenzivní snaze vyvinout látky, které by aktivitu tohoto typu receptorů inhibovaly a omezovaly tak rozvoj patologických procesů.

Z farmakologického hlediska lze tyto látky rozdělit do čtyř skupin (obrázek 1B) (8):

- kompetitivní antagonisté působící na glutamát vázícím místě: D-2-amino-5-fosfonoverolová kyselina

- kompetitivní antagonisté působící na glycin vázícím místě: 7-dichlorokynurenát
- nekompetitivní antagonisté se vážou na odlišná místa než představují vlastní vazebná místa pro glutamát a glycin i těch, která jsou lokalizována v iontovém kanálu: Zn^{2+} , Cu^{2+} a H^+ ionty, redoxní látky, polyaminy, ifenprodil, neurosteroidy
- akompetitivní antagonisté se vážou uvnitř iontového kanálu NMDA receptoru: Mg^{2+} ionty, dizocilpin (MK-801), memantin, fencyklidin (PCP), ketamin.

I přes značnou schopnost některých látek inhibovat odpovědi NMDA receptorů, klinické uplatnění našla jen omezená skupina látek, které blokují iontový kanál – akompetitivní antagonisté NMDA receptorů.

1.2. Blokátory iontových kanálů NMDA receptorů

Společnou vlastností blokátorů iontových kanálů NMDA receptorů je jejich primární struktura, vazba do iontového kanálu a působení, jež je závislé na membránovém potenciálu a aktivaci receptoru. Ve farmakologické terminologii jsou blokátory označovány podle výše zmiňovaných vlastností též jako látky s napěťově závislým působením (voltage-dependent inhibitor), akompetitivní inhibitor nebo látky s působením závislým na aktivaci receptoru (use-dependent inhibitor).

Všechny blokátory iontového kanálu NMDA receptoru jsou kationy, jejichž velikost je nepatrně větší než pór otevřeného iontového kanálu tj. $> 0,55 \text{ nm}$ (24). Tato velikost jim umožňuje do iontového kanálu vstupovat, ale ne jím volně procházet do intracelulárního prostoru.

Přítomnost blokátorů uvnitř iontového kanálu zabraňuje toku Na^+ a Ca^{2+} kanálem a tudíž brání funkčním projevům aktivace NMDA receptorů (obrázek 2).

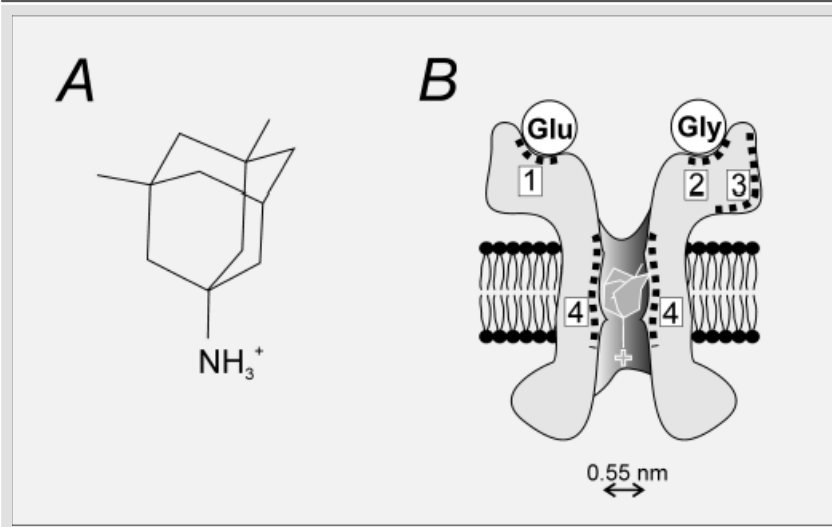
Na negativních membránových potenciálech mají látky s kladným nábojem přirozenou tendenci se pohybovat z extracelulárního prostoru do nitra buňky. To platí obecně pro všechny kationy ať procházejí (Na^+ , Ca^{2+}) nebo neprocházejí přes membránu (Mg^{2+} , memantin, ketamin, MK-801 i PCP). Míra této tendence je podmíněna velikostí membránového potenciálu s tím, že se zvětšuje s hyperpolarizací a snižuje s depolarizací.

Místo, kde se blokátory váží, je umístěno uvnitř iontového kanálu a je dostupné zpravidla pouze tehdy, je-li kanál otevřen, tj. v konformačním stavu vzniklém v důsledku aktivace NMDA receptoru glutamátem a glycinem. Vzhledem k této vlastnosti se dá předpokládat, že tyto látky budou působit především v těch oblastech mozku, kde jsou NMDA receptory nadměrně aktivovány (25).

Farmakologický účinek blokátorů je podmíněn jejich afinitou. Podle ní lze blokátory kanálů NMDA receptorů rozdělit do čtyř skupin:

- látky s nízkou afinitou ($\sim 100 \mu\text{M}$ na membránovém potenciálu -70 mV) se vyznačují rychlou kinetikou vazby a odvazování; jejich typickým představitelem je Mg^{2+} , který má zásadní význam pro regulování funkce NMDA receptorů za fyziologických podmínek, a výrazně se tak podílí na glutamátem vyvolané excitabilitě nervových buněk
- látky se střední afinitou ($\sim 1 \mu\text{M}$ na membránovém potenciálu -70 mV); typickým

Obrázek 1. Struktura a místo působení memantinu – blokátoru iontových kanálů NMDA receptorů. A. Chemická struktura memantinu. B. Schematická ilustrace NMDA receptoru. Transmembránový proteinový komplex, prochází po vazbě glutamátu (Glu) a glycinu (Gly) konformačními změnami vedoucími k otevření iontového kanálu propustného pro Na^+ a Ca^{2+} . Receptor vytváří řadu vazebných míst pro inhibitory – 1. kompetitivní antagonisté působící na glutamát vázícím místě; 2. kompetitivní antagonisté působící na glycin vázícím místě; 3. nekompetitivní antagonisté; 4. akompetitivní antagonisté (blokátory), které se váží uvnitř iontového kanálu NMDA receptoru



představitelem této skupiny látek je memantín, který zlepšuje kognitivní schopnosti u pacientů s AD; v terapeuticky účinných dávkách má memantín překvapivě málo vedlejších účinků

- k látkám s vyšší afinitou ($\sim 0,1 \mu\text{M}$ na membránovém potenciálu -70 mV) patří některá celková anestetika např. ketamin, který v nízkých dávkách vyvolává zvýšenou lokomoci a ataxii a při vyšších dávkách má celkově anestetické účinky (znehybnění, analgezie a amnézie); v dávkách nižších než je anestetické působení vede podání těchto látek u lidí k řadě psychotropních účinků – halucinacím a disociaci, která je popisovaná jako pocit oddělení od vlastního těla
- psychotropní účinky pak dominují u blokátorů s vysokou afinitou ($< 0,1 \mu\text{M}$ na membránovém potenciálu -70 mV) mezi něž patří PCP a MK-801; ty vyvolávají stavy podobné psychóze s příznaky připomínajícími schizofrenii (26, 27).

Toto rozdělení je nutné považovat pouze za orientační, poněvadž hranice mezi jednotlivými skupinami nelze stanovit ostře. Je to mimo jiné i proto, že o biologickém účinku rozhoduje nejen afinita látky, ale i velikost rychlostní konstanty vazby a odvazování. Nicméně schéma odráží skutečnost, že blokátory s vysokou afinitou mají řadu nežádoucích účinků.

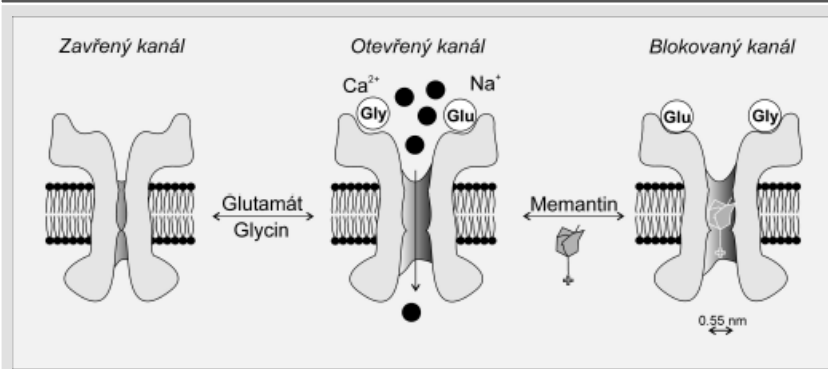
1.3. Molekulární mechanismus blokady kanálů NMDA receptorů memantinem

Důležitý význam při uvažování o molekulárních mechanismech působení memantinu na NMDA receptorech je určení koncentrací, kterých je dosaženo v mozku po podání terapeuticky relevantních dávek. Ukázalo se, že u lidí obvyklá denní dávka 20 mg memantinu vede k $0,5\text{--}1 \mu\text{M}$ koncentraci v séru a $0,4\text{--}0,7 \mu\text{M}$ koncentraci v cerebrospinálním moku (28–30). V těchto koncentracích je působení memantinu omezeno pouze na NMDA receptory a je nepravděpodobné, že by jeho biologický účinek byl podmíněn interakcí s jiným typem receptoru (31).

1.3.1. Afinita

Mechanismus působení memantinu na NMDA receptorech byl zkoumán řadou experimentálních přístupů. Důležité výsledky byly získány za pomoci elektrofyziologické techniky „patch-clamp“, která umožňuje registraci proudů vzniklých aktivací NMDA receptorů na různých membránových potenciálech (3). Výsledky těchto pokusů ukázaly, že memantín inhibuje proudové odpovědi vyvolané aktivací NMDA receptorů a snižuje

Obrázek 2. Schematická ilustrace blokady iontových kanálů NMDA receptorů memantinem. Iontový kanál NMDA receptoru je v nepřítomnosti agonistů vždy zavřený. V důsledku vazby agonistů – glutamátu a glycinu – dochází k řadě konformačních změn, které mohou vyústit v otevření iontového kanálu. Tím prochází podél elektrochemického gradientu (tj. do nitra buňky) ionty sodíku a vápníku. Tento tok iontů vede k depolarizaci a zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Memantín vstupuje do iontového kanálu podobně jako $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Vzhledem ke své velikosti, která je větší než pór iontového kanálu ($0,55 \text{ nm}$) (24), však nemůže kanálem projít a brání (blokuje) průchodu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanálem. Tento mechanismus je též nazýván sekvenční



na membránovém potenciálu -60 až -70 mV koncentračně závislým způsobem (IC_{50} v rozsahu $0,5\text{--}3 \mu\text{M}$) (32–36). Hodnota Hillova koeficientu byla ~ 1 , což nasvědčuje tomu, že k blokování iontového kanálu je zapotřebí jediné molekuly memantinu. Detailní analýza však odhalila existenci dvou vazebných míst uvnitř kanálu, která mohou být současně obsazena dvěma molekulami memantinu (36). Studie rekombinantních NMDA receptorů, u kterých jsou geny kódující jednotlivé podjednotky přechodně exprimovány v buňkách normálně nevytvářející tento typ receptoru, potvrdily výsledky na nativních receptorech (37) a naznačily mírně podjednotkově vázané působení memantinu (37). Zatímco heterodimerické receptory NR1/NR2A a NR1/NR2B měly IC_{50} stanovené na membránovém potenciálu -70 mV $0,93$ a $0,82 \mu\text{M}$, hodnota pro NR1/NR2C a NR1/NR2D byla nižší, $0,3$ a $0,47 \mu\text{M}$ (37, 38).

1.3.2. Kinetika blokady

Látky s nižší afinitou mají zpravidla rychlejší kinetiku vazby na receptor i odvazování než látky s vysokou afinitou. Z rychlostní konstanty vazby memantinu do iontových kanálů NMDA receptorů $0,5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (30) lze odvodit, že při koncentraci memantinu $1 \mu\text{M}$ má nástup inhibice časovou konstantu $\sim 2 \text{ s}$ (obrázek 3A). Vzhledem k tomu, že se NMDA receptory aktivované během synaptického přenosu otvírají na dobu kratší (desítky až stovky ms), memantín je může ovlivnit jen nepatrně (39, 40) (obrázek 5). Stejná koncentrace memantinu však vyvolá přibližně 50% inhibici odpovědi NMDA receptorů vyvolaných trvalou přítomností glutamátu. Narozdíl od memantinu je blokáda NMDA receptorů vyvolaná Mg^{2+} přibližně $1000\times$ rychlejší (41), což naznačuje, že tento blokátor ovlivní stejně synaptické receptory

aktivované fázicky uvolněným glutamátem, tak receptory aktivované tonicky (obrázek 3A). Rychlostní konstanta disociace memantinu z iontových kanálů NMDA receptorů ($0,25 \text{ s}^{-1}$) (30) naznačuje, že k návratu z inhibice dojde přibližně $100\times$ rychleji v případě memantinu než MK-801 (42, 43). Proto narozdíl od MK-801 se v případě memantinu blokáda uvolní již během krátkodobé depolarizace.

Souhrnně lze říci, že memantín je středně afinitní blokátor iontových kanálů NMDA receptorů, který v terapeutických koncentracích inhibuje tyto receptory, jestliže jsou trvale aktivované zvýšenou koncentrací glutamátu, avšak vzhledem k rychlostním konstantám vazby má jen malý vliv na synapticky aktivované receptory (obrázek 3A a 5).

1.3.3. Napěťově závislá blokáda

Blokáda iontových kanálů NMDA receptorů memantinem je silně napěťově závislá (obrázek 3B). Podle teorie Woodhullové (44) je tento napěťově závislý účinek vysvětlen tím, že afinita tohoto blokátoru k vazbě do iontového kanálu je funkcí membránového potenciálu. Blok lze uvolnit silnou depolarizací, například tou, ke které dochází během excitačního synaptického přenosu (37, 45). Přestože vysoce afinitní blokátory iontových kanálů NMDA receptorů vyvolávají též napěťově závislou blokádu, musela by depolarizace, vzhledem k pomalé disociaci těchto látek, trvat řadu minut, aby došlo k uvolnění blokady. Vzhledem k tomu, že k podobné depolarizaci neuronů nedochází, zůstanou jak synaptické tak mimosynaptické receptory trvale inhibovány blokátory s vysokou afinitou – MK-801 a PCP.

Elektrofyziologické studie mohou rovněž poskytnout odhad hloubky, kde se v iontovém kanálu blokátory váží (44). Místo, kde se váže memantín, leží v iontovém kanálu přibližně

uprostřed vzdálenosti mezi extracelulárním a intracelulárním ústím (36). Poněvadž i ostatní blokátory se váží ve stejné hloubce, je jejich místo vazby pravděpodobně identické nebo podobné (46).

1.3.4. Memantin je blokátor otevřeného iontového kanálu

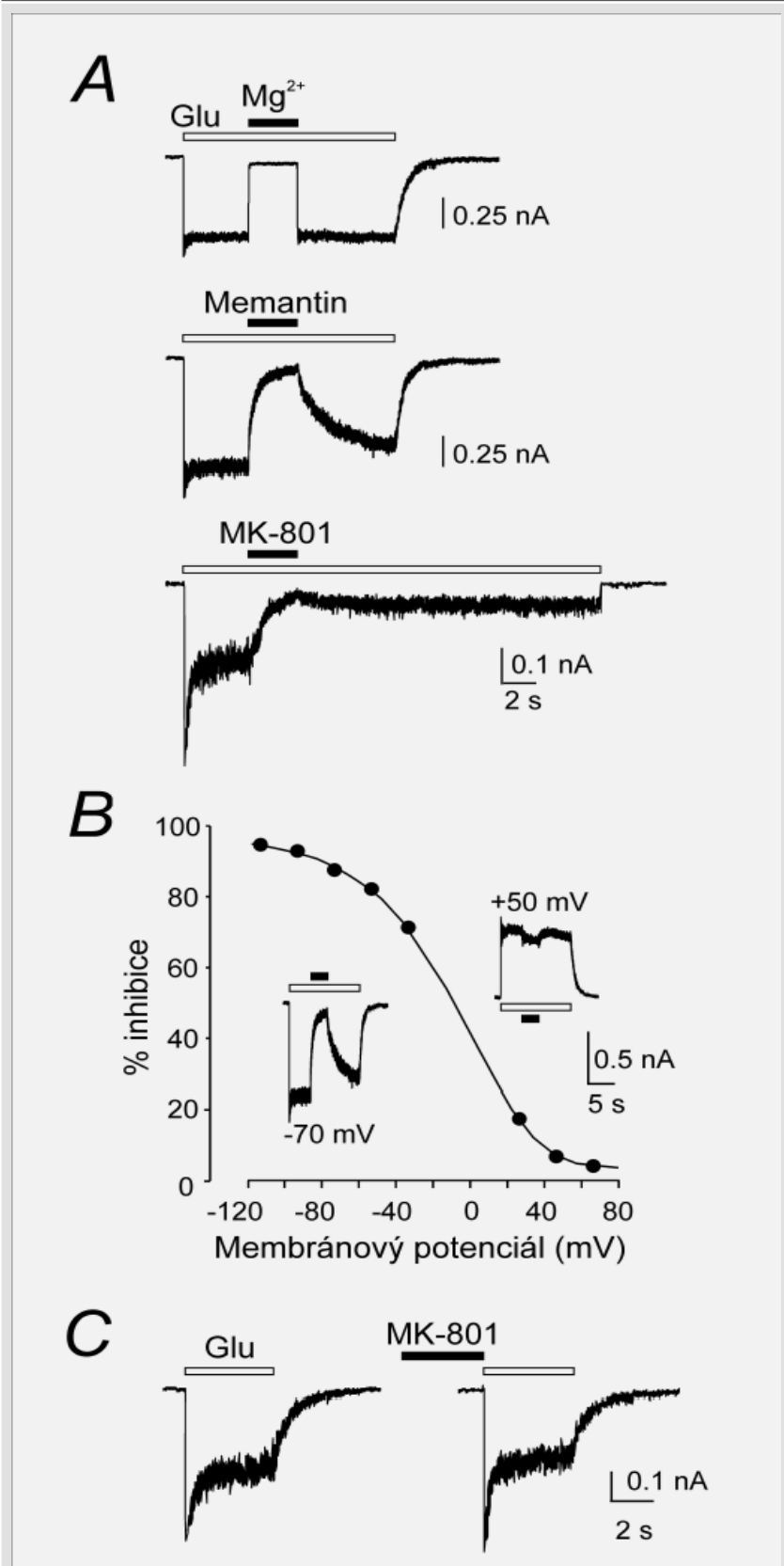
Pro působení blokátorů je charakteristické, že se váží uvnitř iontového kanálu. Místo, kam se většina blokátorů váže, je uloženo relativně hluboko a je zpravidla dostupné pouze v případě, kdy je kanál v otevřeném stavu. Vzhledem k tomu, že k otevření iontového kanálu dochází v přímém důsledku aktivace receptoru agonistou, je zřejmé, že blokátory působí pouze na aktivované receptory a nemohou se vázat na receptory neaktivované (obrázek 3C). Pro působení blokátorů bylo navrženo sekvenční schéma mechanismu působení, které je zobrazeno na obrázku 2 a platí i pro memantin. Přítomnost blokátoru uvnitř iontového kanálu sice brání průchodu iontů a tím biologickému účinku, ale nevadí tomu, aby se po odstranění agonisty iontový kanál zavřel. Blokující látka může v závislosti na její primární struktuře zůstat uvězněna uvnitř kanálu nebo disociovat mimo receptor (30, 32, 42). Schopnost blokátoru opustit iontový kanál je považována za příznivou z hlediska její tolerance a závažnosti vedlejších účinků (42).

2. Excitační synaptický přenos

L-glutamová kyselina je hlavní excitační neuroprůběhač mezi neurony centrální nervové soustavy (CNS). K syntéze této dikarboxylové aminokyseliny dochází v terminálech presynaptických neuronů (47, 48). Specifické vezikulární transportéry koncentrují glutamát v synaptických váčcích, které jsou v blízkosti presynaptické membrány uspořádány do aktivních zón. Do synaptické štěrbině se glutamát uvolňuje Ca^{2+} závislým mechanismem.

Presynaptická aktivní zóna má svou kontaktní oblast na postsynaptickém neuronu ve formě tzv. postsynaptické denzity tvořené řadou proteinů včetně různých typů glutamátových receptorů. Uvolnění glutamátu z terminálů během excitačního synaptického přenosu vede ke krátkodobému (~1 ms) zvýšení jeho koncentrace v synaptické štěrbině až na milimolární úroveň (49, 50), aktivaci ionotropních glutamátových receptorů a vzniku AMPA/kainátové a NMDA komponenty excitačního postsynaptického proudu. Glutamát je z extracelulárního prostoru odstraňován výsoce kapacitním systémem transportérů, který sníží během krátké doby jeho hladinu až na nanomolární koncentrace (51, 52). Tyto transportéry jsou exprimovány jak na neuronech, tak na gliových buňkách (53). Extracelulární

Obrázek 3. Vliv blokátorů na odpovědi vyvolané aktivací rekombinantních NMDA receptorů (NR1-1a/NR2B). A. Různá kinetika vazby a odvazování Mg^{2+} , memantinu a MK-801 – blokátorů iontových kanálů NMDA receptorů. Pověšimněte si odlišného časového průběhu nástupu inhibice vyvolané současnou aplikací 1 mM glutamátu a 1 mM Mg^{2+} , 10 μM memantinu nebo 10 μM MK-801. Odmytí blokátoru vede k návratu odpovědi (~1 ms po aplikaci 1 mM Mg^{2+} , ~1 s po memantinu a minuty po MK-801). B. Působení memantinu (10 μM) na NMDA receptory je výrazně napětově závislé. Míra inhibice klesá s depolarizací. C. Působení blokátorů je závislé na aktivaci NMDA receptorů. Aplikace MK-801 po dobu 30 s v nepřítomnosti agonistů NMDA receptorů nevede k inhibici. Srovnajte s odpovědí vyvolanou současnou aplikací glutamátu a MK-801 (panel A). (Dosud nepublikované výsledky Petrovič a Vyklický)



glutamát je transportován do glií a metabolizován na glutamin, který glutamátové receptory neaktivuje. Glutamin může přecházet zpět do extracelulárního prostoru, odkud je transportován do neuronů a přeměněn zpět na glutamát (obrázek 4A).

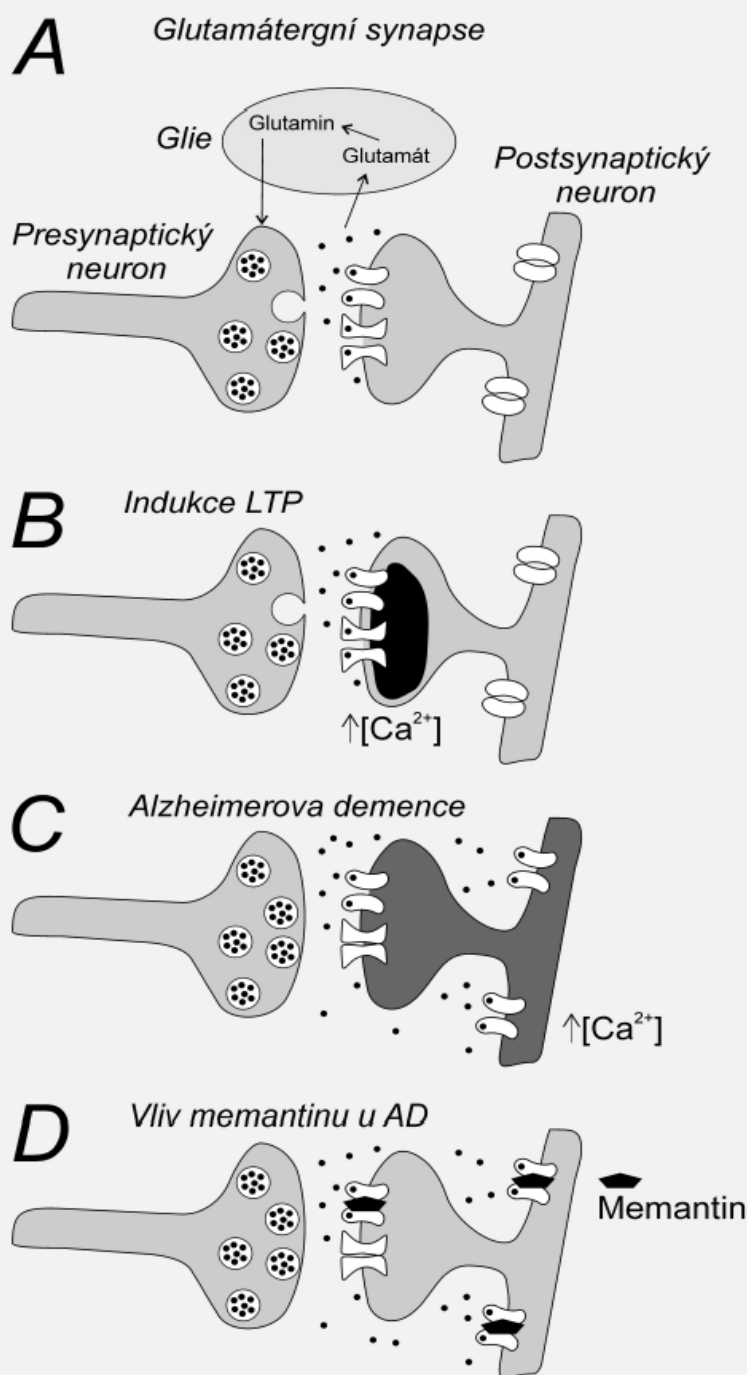
LTP je specifická forma synaptické plasticity charakteristická pro glutamatergní synapse. Předpokládá se, že je buněčným základem vzniku paměťových stop a učení. Přestože molekulární mechanismus vzniku LTP nebyl doposud zcela objasněn, shoduje se většina autorů na tom, že v iniciálních fázích indukce LTP je nezbytná aktivace NMDA receptorů. Vstup Ca^{2+} právě těmito receptory do postsynaptického neuronu vede k aktivaci buněčných mechanismů, které zesilují účinnost synaptického přenosu omezenou pouze na aktivovanou synapsi (obrázek 4B) (54).

Za patologických stavů (např. při hromadění specifických proteinů – viz níže, K^+ nebo nedostatku kyslíku) může docházet k poruchám transportních mechanismů pro glutamát a hromadění této excitační aminokyseliny v extracelulárním prostoru. NMDA receptory mají přibližně 30× větší afinitu pro glutamát než AMPA/kainátové receptory, což je za těchto podmínek příčinou jejich dlouhotrvající aktivace. Mírné zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} vyvolané dlouhodobou aktivací NMDA receptorů nízkou koncentrací glutamátu vede paradoxně k inaktivaci buněčných mechanismů odpovědných za indukci LTP. To se u experimentálních zvířat projevuje sníženou schopností se učit a pravděpodobně jde o mechanismus, uplatňující se v indukci kognitivního deficitu, jímž trpí nemocní AD. Při postupu patologických procesů, kdy dojde k dalšímu zvýšení koncentrace glutamátu v extracelulárním prostředí, dochází v důsledku nadměrné aktivace NMDA receptorů ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} na úroveň, která vede k excitotoxické buněčné smrti (obrázek 4C).

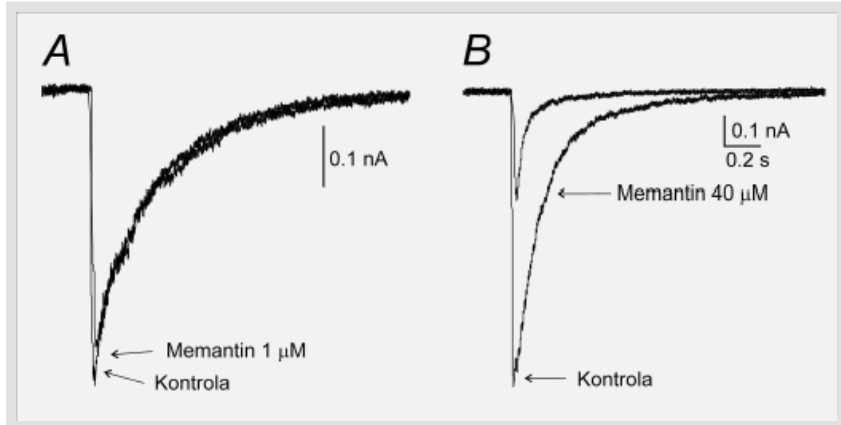
3. Alzheimerova demence

Předpokládá se, že patologické změny glutamatergního systému jsou příčinou vzniku některých neurodegenerativních onemocnění (např. Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba) včetně AD. Odhaduje se, že AD trpí více jak 15 milionů lidí na celém světě a že počet nemocných stoupá se zvyšující se průměrnou délkou lidského života. Tato choroba je charakteristická ztrátou neuronů především v CA1 oblasti hipokampu, nucleus basalis Meynerti a neokortexu. Existují však důkazy o tom, že změny, ke kterým dochází, zahrnují i schopnost přežívajících neuronů vytvářet LTP. Pravděpodobně kombinace obou

Obrázek 4. Glutamatergní synapse v normě a za patologických stavů. A. Glutamát je uvolňován z presynaptického zakončení a na velmi krátkou dobu stoupne jeho koncentrace v synaptické štěrbině na milimolární hodnoty. Na postsynaptické membráně aktivuje ionotropní glutamátové receptory AMPA/kainátového a NMDA typu. Ze synaptické štěrbině difunduje glutamát do extracelulárního prostoru odkud je odstraněn během ~1 ms transportním mechanismem do glií. B. Opakovaná stimulace glutamatergních synapsí vede ke krátkodobému a lokalizovanému zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} v okolí postsynaptické membrány a iniciaci metabolických cest vedoucích ke vzniku LTP – dlouhodobé změny účinnosti synaptického přenosu. C. Za patologických stavů, ke kterým dochází u AD, ale i jiných neurodegenerativních onemocnění, dochází k poruchám majícím za následek trvalé zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu a zvýšený vtok Ca^{2+} přes iontové kanály NMDA receptorů. Jsou-li za těchto okolností aktivovány především synaptické receptory, dojde k inaktivaci mechanismů nutných pro indukci LTP. Jsou-li aktivovány i mimosynaptické NMDA receptory, může tato situace vyústit až v excitotoxickou smrt neuronu. D. Tím, že memantin blokuje trvale aktivované NMDA receptory, snižuje vtok Ca^{2+} a tím brání inaktivaci mechanismů, které vedou k LTP a excitotoxicitě. Vzhledem k tomu, že memantin je napěťově závislý blokátor s pomalou kinetikou vazby, ovlivňuje jen nepatrně synaptické NMDA receptory



Obrázek 5. Působení memantinu na excitační postsynaptické proudy mediované NMDA receptory (NMDA EPSC). Proudby byly snímány z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu u 14denních potkanů technikou „patch-clamp“. Udržovaný membránový potenciál byl -65 mV. Proudby byly vyvolány lokální elektrickou stimulací aferentních vláken ve vrstvě I. A. Memantin v koncentraci 1 μM neměl vliv na amplitudu ani časový průběh NMDA EPSC. B. Amplituda NMDA EPSC snímáných v přítomnosti vysoké koncentrace memantinu (40 μM) byla snížena o ~60 % a časový průběh deaktivace byl zkrácen. (Dosud nepublikované výsledky Sedláček a Vyklický)



mechanismů – jak ztráta, tak změna funkčních vlastností neuronů způsobují poruchy kognitivních funkcí (55, 56).

V mozcích pacientů trpících AD je typický nález extracelulárních plaků a intracelulárních neurofibrilárních uzlíků (z angl. tangles). Součástí plaků je beta-amyloidní peptid ($\beta\text{-AP}$), který se hromadí v průběhu nemoci (57). Vytváří se z amyloidního prekurzorového proteinu (APP), který se může metabolizovat dvěma způsoby, přičemž dává vznik peptidům o různé délce. Za normálních okolností se APP štěpí enzymem alfa-reduktázou. Avšak působí-li na APP nejprve beta-reduktáza, dochází ke vzniku $\beta\text{-AP}$, který existuje ve formě $\beta\text{-AP}(1-42)$. Tento protein se skládá ze 42 aminokyselin a je náchylnější k agregaci. O dvě aminokyseliny kratší forma $\beta\text{-AP}(1-40)$ převládá v rozvinuté formě plaků.

Tau protein je asociován s cytoskeletárními mikrotubuly a za normálních okolností podporuje jejich polymerizaci a stabilizaci. Fosforylovaný tau protein se shromažďuje ve formě helikálních neurofilamentů, které jsou hlavní složkou neurofibrilárních uzlíků, jež se objevují v mozcích pacientů trpících AD.

I když je hromadění $\beta\text{-AP}$ a tau proteinu dáváno do souvislosti s AD po dlouhou řadu let, neexistují přímé důkazy, které by na základě experimentálních údajů vysvětlily mechanismy, jimiž se tyto peptidy podílejí na vzniku kognitivního deficitu a neurodegeneraci. Není ani jasné, zda hromadění $\beta\text{-AP}$ a tau proteinu je příčina nebo důsledek neurodegenerativního procesu. Následující hypotézy je proto nutno považovat do jisté míry za spekulativní.

Prvá hypotéza předpokládá, že v důsledku hromadění $\beta\text{-AP}$ dochází k chronické poruše uvolňování a vychytávání glutamátu,

jehož extracelulární koncentrace stoupne natolik, že vede k trvalé aktivaci NMDA receptorů (58). Protože iontový kanál NMDA receptorů je propustný pro Ca^{2+} , dochází v důsledku zvýšení jeho intracelulární koncentrace k narušení signálních kaskád zodpovědných za vznik LTP. V případě, že tento proces neustává a koncentrace intracelulárního Ca^{2+} stoupne ještě víc, dojde k vytváření volných radikálů, poškození mitochondrií, změnám jaderného chromatinu a fragmentaci DNA a tím k poškození neuronů a jejich smrti. Tento proces je označován jako „excitotoxicita“ a předpokládá se, že je příčinou neurodegenerace u AD a dalších demencí degenerativního původu (59, 60).

Druhá hypotéza vzniku AD, nazývaná též glutamatergní, se opírá o následující experimentální údaje:

- $\beta\text{-AP}$ zvyšuje citlivost kultivovaných neuronů k buněčné smrti vyvolané současným podáním glutamátu (61)
- $\beta\text{-AP}$ ovlivňuje glutamatergní synaptický přenos mezi hipokampálními neurony (62); aplikací inhibitorů NMDA receptorů bylo možno zabránit buněčné smrti, která vzniká pravděpodobně v důsledku změn v intracelulární koncentraci Ca^{2+} (63)
- $\beta\text{-AP}$ vyvolává zvýšené uvolnění glutamátu z hipokampálních řízků v závislosti na stáří experimentálního zvířete (64)
- $\beta\text{-AP}(25-35)$, což je fragment základního $\beta\text{-AP}$ obsahující aminokyseliny od pozice 25 do 35, snižuje zpětné vychytávání glutamátu zprostředkované transportérem EAAT2 (65–67); tento transportér může za patologických stavů transportovat glutamát i opačně, tj. z nitrobuňčného prostředí do mimobuněčného prostoru (68)

- výsledky dalších experimentů ukázaly, že $\beta\text{-AP}$ specificky zvětšuje odpovědi NMDA receptorů, ale ne AMPA receptorů (69)
- zvýšená aktivita NMDA receptorů vede ke zvýšení koncentrace intraneuronálního tau proteinu (70) a jeho patologické fosforylaci s možnými funkčními důsledky (71, 72).

Tyto nálezy naznačují, že v mozcích pacientů trpících AD dochází k patologickým změnám vedoucím ke zvýšení mimobuněčné koncentrace glutamátu. Ten působí trvalou aktivaci NMDA receptorů a nadměrné vnikání Ca^{2+} do neuronů, čímž dochází k narušení buněčných mechanismů nutných pro indukci LTP a dalším změnám, které mohou vyústit v excitotoxickou smrt neuronů.

4. Memantin a jeho působení u AD

Ve shodě s glutamatergní hypotézou je kognitivní defekt pozorovaný u neurodegenerativních onemocnění, jako je AD, způsoben nadměrnou aktivací NMDA receptorů, která vede ke zvýšenému vstupu Ca^{2+} do buněk a poškození neuronů (73). Proto terapeutickým cílem musí být snaha předcházet tomuto poškození, aniž by docházelo k ovlivnění synaptického přenosu a plasticity nezbytné pro formování paměti a učení. Vlastnosti memantinu, který je napětově závislý, středně afinitním, akompetitivním antagonistou NMDA receptorů, mohou vysvětlit jeho terapeutické účinky u AD (obrázek 4D). Již dříve bylo ukázáno, že memantin chrání kultivované potkaní neurony izolované z hipokampu nebo neokortexu proti excitotoxické smrti vyvolané glutamátem nebo NMDA (74, 75, 76). Existují též experimentální údaje, že memantin má ochranný účinek proti poškození mozku hypoxií a ischemií na modelech in vivo (39, 77). Tyto studie jsou ve shodě s představou, že memantin má silný ochranný vliv proti excitotoxickému působení glutamátu. I když nejsou známy specifické důvody, které by u AD vysvětlovaly zvýšenou vulnerabilitu cholinergních neuronů, je možné, že příčinou může být nadměrná aktivace NMDA receptorů, které tyto neurony exprimují. V souladu s touto představou jsou výsledky pokusů s potkany, které ukázaly, že ztrátě cholinergních neuronů a kognitivním deficitům vyvolaným lokální aplikací agonistů NMDA receptorů do anatomicky odpovídajících struktur nucleus basalis Meynerti u člověka lze zabránit aplikací terapeuticky relevantních dávek memantinu (78, 79, 80).

V poslední době bylo ukázáno, že dlouhodobá infuze memantinu snižovala ztráty neuronů vyvolané injekcí $\beta\text{-AP}$ do hipokampu

laboratorních potkanů (81). Tato protektivní úloha byla potvrzena i na animálních modelech za použití geneticky modifikovaných zvířat nadměrně produkujících toxické formy β -AP typické pro familiární formy AD. I na těchto modelech memantin zlepšoval některé formy paměti.

Řada studií přinesla důkazy o tom, že memantin má pozitivní účinky především u středních a těžkých forem AD, ale též u vaskulární demence (6, 82). Jako příklad může sloužit velká studie provedená v několika centrech (randomizovaná, dvojité slepá, placebem kontrolovaná, 28 týdnů trvající) u pacientů trpících středně těžkou až těžkou formou AD (28). Skupina, které byl podáván memantin, vykazovala významně méně funkčních a kognitivních deficitů, lepší vigilitu a jejich pomalejší úbytek než ta, které bylo podáváno placebo. Ostatní studie ukázaly podobný účinek (83). Současné výsledky

klinických studií ukazují, že u pacientů s AD dlouhodobě léčených inhibitory cholinesterázy, memantin výrazně zlepšoval jejich stav (84). Tyto výsledky klinických studií jsou ve shodě s pokusy na animálních modelech AD a farmakologickými studiemi NMDA receptorů, které dokazují, že memantin selektivně snižuje zvýšený vtok Ca^{2+} přes iontové kanály NMDA receptorů trvale aktivované zvýšenou koncentrací glutamátu. Vzhledem k jeho napěťové závislosti a pomalé kinetice vazby však podstatně neovlivní vtok Ca^{2+} vyvolaný fyziologickými podněty a nebrání tak vzniku paměťových stop (60) (obrázek 5).

Závěr

Existují přesvědčivé důkazy, že memantin je účinným a dobře tolerovaným lékem využitelným při symptomatické léčbě AD a některých dalších demencí. I když zatím přesně neznáme všechny mechanismy,

kteří se uplatňují na zlepšení kognitivních schopností a zpomalení průběhu AD, výsledky preklinických studií se shodují v tom, že memantin v klinicky relevantních dávkách působí v mozku pacientů jako napěťově závislý, středně afinitní, akompetitivní antagonist NMDA receptorů. Z pohledu možného významu NMDA receptorů při vzniku řady neurodegenerativních onemocnění představuje léčba memantinem další účinnou možnost symptomatické léčby AD a důležitý krok na cestě léčby AD směřující k zlepšení kvality života a usnadňující péči o pacienty trpící touto chorobou.

Poděkování

Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. 309/04/1537), Výzkumným projektem AV ČR (AVOZ 5011) a Grantem Ministerstva kultury, mládeže a vzdělávání (LN00B122).

Literatura

- Schwab RS, Poskanzer DC, England AC, Jr., Young RR. Amantadine in Parkinson's disease. Review of more than two years' experience. *JAMA* 1972; 222: 792–795.
- Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M, Riederer P. Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1989; 166: 589–590.
- Bormann J. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol* 1989; 166: 591–592.
- Areosa SA, Sherriff F. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD003154.
- Jain KK. Evaluation of memantine for neuroprotection in dementia. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 1397–1406.
- Patočka J. Memantin a jeho terapeutický potenciál u degenerativních poruch CNS. *Psychiatrie* 2002; 6: 35–40.
- Winblad B, Poritis N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry* 1999; 14: 135–146.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7–61.
- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171–182.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 1993; 268: 2836–2843.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 1991; 354: 31–37.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1217–1221.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, et al. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 1995; 15: 6509–6520.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, et al. Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 1993; 10: 943–954.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, et al. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 2002; 415: 793–798.
- McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994; 74: 723–760.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, et al. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998; 393: 377–381.
- Medina I, Filippova N, Charton G, et al. Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 1995; 482 (Pt 3): 567–573.
- Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987; 325: 529–531.
- Mayer ML, Wyklicky L, Jr., Clements J. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 1989; 338: 425–427.
- Patneau DK, Mayer ML. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 1990; 10: 2385–2399.
- Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988; 241: 835–837.
- Clements JD, Westbrook GL. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 1991; 7: 605–613.
- Vyklicky L, Jr., Krusek J, Edwards C. Differences in the pore sizes of the N-methyl-D-aspartate and kainate cation channels. *Neurosci Lett* 1988; 89: 313–318.
- Rogawski MA. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 325–331.
- Abi-Saab WM, D'Souza DC, Moghaddam B, Krystal JH. The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31 Suppl 2: 104–109.
- Enarson MC, Hays H, Woodroffe MA. Clinical experience with oral ketamine. *J Pain Symptom Manage* 1999; 17: 384–386.
- Reisberg B, Doody R, Stoffer A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 1333–1341.
- Kornhuber J, Quack G. Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. *Neurosci Lett* 1995; 195: 137–139.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist – a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 1999; 38: 735–767.
- Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* 2003; 9: 275–308.
- Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J Neurophysiol* 1997; 77: 309–323.
- Chen HS, Lipton SA. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J Physiol* 1997; 499 (Pt 1): 27–46.
- Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen CD, et al. Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 533–545.
- Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology* 1993; 32: 1337–1350.
- Sobolevsky AI, Koshlev SG, Khodorov BI. Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. *J Physiol* 1998; 512 (Pt 1): 47–60.
- Bresink I, Benke TA, Collett VJ, et al. Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 195–204.
- Parsons CG, Danysz W, Bartmann A, et al. Amino-alkyl-cyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. *Neuropharmacology* 1999; 38: 85–108.
- Chen HS, Wang YF, Rayudu PV, et al. Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic

vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 1998; 86: 1121–1132.

40. Sedláček M, Horák M, Petrovič M, Vyklický L. NMDA receptory a důsledky jejich farmakologického ovlivnění. *Psychiatrie* 2003; 7(Suppl.1): 41–45.

41. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462–465.

42. Mealing GA, Lanthorn TH, Murray CL, Small DL, Morley P. Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists with similar kinetics of block. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 204–210.

43. Parsons CG, Quack G, Bresink I, et al. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1239–1258.

44. Woodhull AM. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 1973; 61: 687–708.

45. Muller WE, Mutschler E, Riederer P. Noncompetitive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency as potential therapeutic agents for Alzheimer's dementia. *Pharmacopsychiatry* 1995; 28: 113–124.

46. Subramaniam S, Donevan SD, Rogawski MA. Hydrophobic interactions of n-alkyl diamines with the N-methyl-D-aspartate receptor: voltage-dependent and -independent blocking sites. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 117–124.

47. Ottersen OP, Zhang N, Walberg F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 1992; 46: 519–534.

48. Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W, Haug FM, Torp R. Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J Chem Neuroanat* 1996; 12: 1–14.

49. Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 1992; 258: 1498–1501.

50. Diamond JS, Jahr CE. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J Neurosci* 1997; 17: 4672–4687.

51. Zerangue N, Kavanaugh MP. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 1996; 383: 634–637.

52. Levy LM, Warr O, Attwell D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 1998; 18: 9620–9628.

53. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1–105.

54. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31–39.

55. Maragos WF, Greenamyre JT, Penney J, John B., Young AB. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends in Neurosciences* 1987; 10: 65–68.

56. Alvarez XA, Miguel-Hidalgo JJ, Fernandez-Novoa L, Cacabelos R. Intrahippocampal injections of the beta-amyloid 1-28 fragment induces behavioral deficits in rats. *Methods And Findings In Experimental And Clinical Pharmacology* 1997; 19: 471–479.

57. Ashall F, Goate AM. Role of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 42–46.

58. Lee HG, Zhu X, Ghanbari HA, et al. Differential regulation of glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 2002; 11: 282–292.

59. Cacabelos R, Takeda M, Winblad B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 1999; 14: 3–47.

60. Danysz W, Parsons CG, Mobius H, Stoffer A, Quack G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research* 2000; 2: 85–97.

61. Koh JY, Yang LL, Cotman CW. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res* 1990; 533: 315–320.

62. Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ. The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25–35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol* 1995; 26: 325–338.

63. Harkany T, Abraham I, Timmerman W, et al. beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2735–2745.

64. Arias C, Arrieta I, Tapia R. beta-Amyloid peptide fragment 25–35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 1995; 41: 561–566.

65. Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Hensley K, Butterfield DA, Carney JM. Amyloid beta peptide (25–35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem* 1996; 67: 277–286.

66. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 901–911.

67. Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Hansen LA. Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 1041–1052.

68. Noda M, Nakanishi H, Akaike N. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 1999; 92: 1465–1474.

69. Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 1995; 6: 2409–2413.

70. Couratier P, Sindou P, Tabaraud F, Diop AG, Spencer PS, Hugon J. Modulation of tau neuronal expression induced by NMDA, non-NMDA and metabotropic glutamate receptor agonists. *Neurodegeneration* 1995; 4: 33–41.

71. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 425–427.

72. Couratier P, Lesort M, Sindou P, Esclaire F, Yardin C, Hugon J. Modifications of neuronal phosphorylated tau immunoreactivity induced by NMDA toxicity. *Mol Chem Neuropathol* 1996; 27: 259–273.

73. Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 2003; 17: 641–652.

74. Erdo SL, Schafer M. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 1991; 198: 215–217.

75. Kriegstein J. Mechanisms of neuroprotective drug actions. *Clin Neurosci* 1997; 4: 184–193.

76. Kriegstein J, Lippert K, Poch G. Apparent independent action of nimodipine and glutamate antagonists to protect cultured neurons against glutamate-induced damage. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1737–1742.

77. Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K, Riederer P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *J Neural Transm Suppl* 1994; 43: 91–104.

78. Wenk GL, Danysz W, Mobley SL. Investigations of neurotoxicity and neuroprotection within the nucleus basalis of the rat. *Brain Res* 1994; 655: 7–11.

79. Wenk GL, Danysz W, Mobley SL. MK-801, memantine and amantadine show neuroprotective activity in the nucleus basalis magnocellularis. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 267–270.

80. Wenk GL, Zajackowski W, Danysz W. Neuroprotection of acetylcholinergic basal forebrain neurons by memantine and neurokinin B. *Behav Brain Res* 1997; 83: 129–133.

81. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1–40). *Brain Res* 2002; 958: 210–221.

82. Ditzler K. Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. A double-blind, placebo controlled trial. *Arzneimittelforschung* 1991; 41: 773–780.

83. Ruthner E, Glaser A, Bleich S, Degner D, Wiltfang J. A prospective PMS study to validate the sensitivity for change of the D- scale in advanced stages of dementia using the NMDA-antagonist memantine. *Pharmacopsychiatry* 2000; 33: 103–108.

84. Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 317–324.