

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Účinky multipotentních sloučenin ovlivňujících neurotransmisi
ve farmakologických animálních modelech kognitivního deficitu**

**Effects of Neurotransmission-Modulating Multipotent Compounds
in Pharmacological Animal Models of Cognitive Deficit**

Markéta Chvojková

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a následně kombinovaného studia doktorského studijního programu Neurovědy na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky a Národním ústavu duševního zdraví.

Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D., Národní ústav duševního zdraví,
Topolová 748, 250 67 Klecany

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Neurovědy
dne v odhod.
Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu: prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D.,
Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Děkan fakulty: prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR č. 20-12047S Nové neuroprotektivní látky na bázi antagonistu NMDA receptorů a cholinergní stimulace, AZV č. NU20-08-00296 Duálně účinné potenciátory kognice pro paliativní léčbu Alzheimerovy choroby, a Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání (OP VVV): projekt “PharmaBrain” (č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007444).

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1 Úvod do problematiky.....	6
2 Hypotézy a cíle disertační práce.....	9
3 Materiál a metodika.....	10
4 Výsledky.....	15
5 Diskuse.....	21
6 Závěry.....	25
7 Resumé.....	26
8 Summary	27
9 Použitá literatura	28
10 Přehled publikační činnosti autora	31

Účinky multipotentních sloučenin ovlivňujících neurotransmisi ve farmakologických animálních modelech kognitivního deficitu

Abstrakt

V rámci preklinického výzkumu farmakoterapie Alzheimerovy nemoci je v současnosti věnována pozornost multipotentním sloučeninám, umožňujícím intenzifikaci účinku zasažením více patofyziologických mechanismů. Práce se proto zabývala posouzením účinnosti multipotentních sloučenin a kombinované aplikace v modelech kognitivního deficitu u potkana. Společným mechanismem účinku testovaných látek byla modulace neurotransmiterových systémů. Cílem první části práce bylo porovnání účinku experimentální monoterapie a kombinované terapie antagonistou N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a pozitivním modulátorem receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A (GABA_A) v modelu vyvolaném trimethylcínem. Superiorita kombinované terapie byla prokázána histologickou analýzou hipokampální neurodegenerace, ale v kognitivním testu nedosáhla statistické signifikance. Předmětem zbývajících částí práce byly multipotentní deriváty takrinu. Prokázali jsme pozitivní efekt dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu a dále dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, působících také jako inhibitory acetylcholinesterázy, v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem. V případě jiných takrinových derivátů působících také jako antagonisté NMDA receptorů jsme prokázali nízké riziko závažných nežádoucích účinků, což opravňuje zahájení preklinických testů účinnosti. Pozitivní výsledky provedených experimentů jsou podnětem k dalšímu výzkumu účinků testovaných typů látek v modelech Alzheimerovy nemoci.

Effects of Neurotransmission-Modulating Multipotent Compounds in Pharmacological Animal Models of Cognitive Deficit

Abstract

In preclinical research on Alzheimer's disease pharmacotherapy, attention is paid to multipotent compounds, enabling intensification of the effect by targeting multiple pathophysiological mechanisms. The aim of the thesis was to assess the effect of multipotent compounds and combination therapy in models of cognitive deficit in the rat. The mechanism of action of the tested compounds was modulation of neurotransmitter systems. The aim of the first part of the study was to compare the effect of experimental monotherapy and combination therapy with an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist and a γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor positive modulator in the trimethyltin-induced model. Superiority of the combination therapy was proven by histological analysis of hippocampal neurodegeneration; however, it did not reach statistical significance in the cognitive test. The other part of the thesis focused on multipotent tacrine derivatives. We demonstrated a positive effect of 6-chlorotacrine-6-nitrobenzothiazole hybrid, as well as 6-chlorotacrine-L-tryptophan hybrid, acting as acetylcholinesterase inhibitors, in the scopolamine-induced model of cognitive deficit. Besides, we demonstrated a low risk of serious side effects of other tacrine derivatives acting as NMDA receptor antagonists. This finding justifies initiation of preclinical efficacy studies. The positive results prompt further research on the effects of the tested compounds in Alzheimer's disease models.

1 Úvod do problematiky

1.1 Alzheimerova choroba

Onemocnění centrální nervové soustavy asociovaná s demencí, zejména sporadická forma Alzheimerovy choroby, představují závažný socioekonomický problém. Alzheimerova choroba je komplexní multifaktoriální onemocnění nejasné etiologie, charakterizované ztrátou kognitivních funkcí, progresivní neurodegenerací a vznikem patologických proteinových agregátů (Alves et al., 2012). Bylo formulováno několik hypotéz vzniku choroby včetně cholinergní hypotézy založené na dysfunkci cholinergního systému (Bartus et al., 1982), amyloidní hypotézy poukazující na roli agregátů amyloidu beta (Hardy and Allsop, 1991), tau hypotézy (Mudher and Lovestone, 2002), nebo hypotéz zaměřených na poruchy neurotransmise, konkrétně zejména N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a související excitotoxicity glutamátu (Parsons et al., 2013). Pozornost je věnována mimo jiné i možné roli dysbalance excitační a inhibiční neurotransmise (Nava-Mesa et al., 2014).

Oproti tomu farmakoterapie je v současnosti omezena na inhibitory acetylcholinesterázy (enzymu zodpovědného za degradaci acetylcholinu) a antagonistu NMDA receptorů memantin, jejichž účinnost je limitovaná (Parsons et al., 2013). Jiné strategie dosud nevyústily (s recentní výjimkou látky aducanumab) v zavedení odpovídající farmakoterapie.

1.2 Polyfarmakologie: kombinovaná terapie a multipotentní sloučeniny

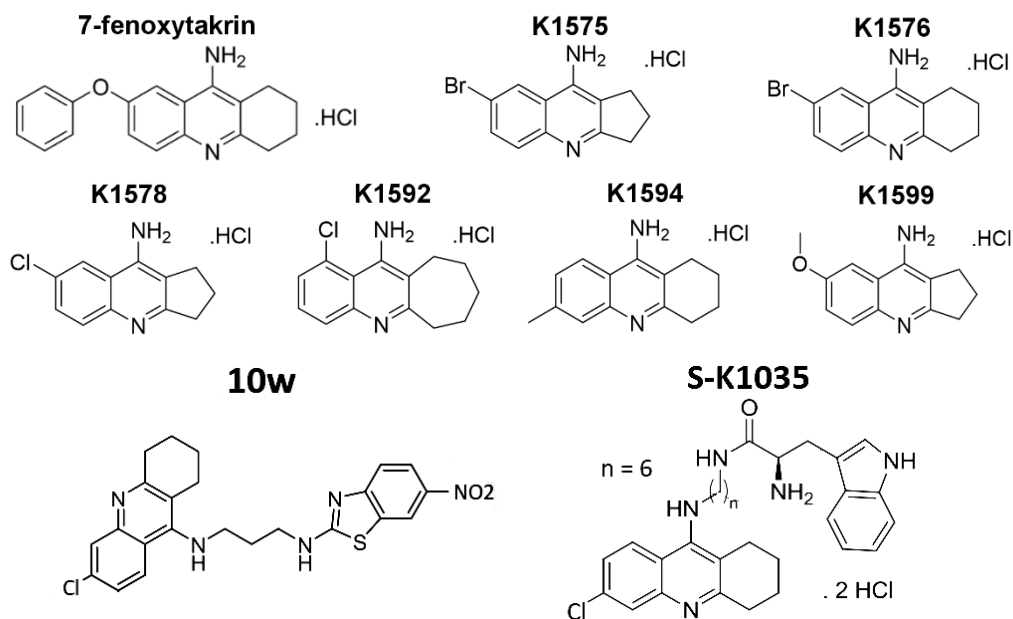
Vzhledem ke komplexní povaze Alzheimerovy choroby a neúspěchu mnoha testovaných vysoce specifických léků se dosažení výrazného terapeutického efektu pomocí látek zacílených na jednu konkrétní patofyziologickou dráhu nejeví příliš pravděpodobné. Ve vývoji léků je věnována pozornost polyfarmakologii, tedy současnému ovlivnění dvou nebo více patofyziologických drah nebo molekulárních cílů, potenciálně umožňujícímu optimalizaci účinnosti a omezení nežádoucích účinků (Bolognesi, 2019). Uvedeného lze dosáhnout docílit kombinovanou terapií (koaplikací více látek) nebo multipotentními sloučeninami, které jsou upřednostňovány.

Kombinovaná terapie antagonisty NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy vykazuje vylepšenou účinnost a je již s úspěchem využívána v klinické praxi (Calhoun et al., 2018). Jiný nadějný přístup by dle preklinických studií mohla představovat koaplikace antagonistů NMDA receptorů s pozitivními modulátory receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A (GABA_A). Jmenované látky mohou mít synergistické protektivní účinky v modelech excitotoxicity (Lyden and Lonzo, 1994; Shibuta et al., 2006) a mohly by umožnit obnovu rovnováhy excitace a inhibice v mozkových strukturách a tím i zmírnění kognitivních symptomů (Nava-Mesa et al., 2014).

Multipotentní sloučeniny působí na více molekulárních cílů zároveň. Látky cíleně syntetizované za tímto účelem se označují multi-target-directed ligandy. Jejich design je realizován propojením farmakoforů, z nichž každý dodává molekule jeden z účinků. Klíčovým počátečním krokem je volba vhodné kombinace mechanismů účinku (Benek et al., 2020). Vhodnost kombinace může být do jisté míry ověřena porovnáním účinků kombinované terapie a monoterapie danými typy látek.

1.2.1 Modelové multipotentní takrinové deriváty

Nové multipotentní sloučeniny studované v disertační práci vychází z molekuly takrinu, inhibitoru acetylcholinesterázy v minulosti používaného k léčbě Alzheimerovy choroby. První typ látek představují monotakrinové deriváty působící jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy (**7-fenoxytakrin** a série derivátů pracovně označených **K1575**, **K1576**, **K1578**, **K1592**, **K1594** a **K1599**; obr. 1). Látky se liší preferencí pro podjednotky NMDA receptorů a pro acetyl-/butyrylcholinesterázu (Gorecki et al., 2021; Kaniakova et al., 2021). Dané mechanismy účinku se mohou vhodně doplňovat, u antagonistů NMDA receptorů však může obecně hrozit riziko nežádoucích psychotomimetických účinků, manifestovaných u hlodavců jako hyperlokomoce a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Andiné et al., 1999; Bast et al., 2000).



Obr. 1 Struktura studovaných multipotentních takrinových derivátů. V horní části monotakrinové deriváty, zcela dole takrinové heterodimery: vlevo dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu, označený 10w dle (Nepovimova et al., 2021), vpravo dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, označený S-K1035 dle (Chalupova et al., 2019). Sestaveno dle (Chalupova et al., 2019; Gorecki et al., 2021; Kaniakova et al., 2021; Nepovimova et al., 2021).

Jiný přístup představují takrinové heterodimery. Jejich studovanými zástupci jsou **dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu** spojený tříčlenným uhlíkovým řetězcem (pracovně označený **10w**; obr. 1 dole vlevo), a dále **dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu** spojený šestičlenným uhlíkovým řetězcem (označený **S-K1035**; obr. 1 dole vpravo). Kromě inhibice

acetylcholinesterázy působí oba i jako inhibitory agregace amyloidu beta (Chalupova et al., 2019; Nepovimova et al., 2021).

1.3 Animální modely kognitivního deficitu

V rámci preklinických testů účinnosti farmak je klíčové posouzení efektu v animálních modelech kognitivního deficitu. V práci byly použity následující farmakologicky indukované modely.

1.3.1 Model kognitivního deficitu indukovaný trimethylcínem u potkana

Jednorázová systémová aplikace trimethylcínu (TMT) vyvolává u potkana selektivní neurodegenerativní poškození hipokampu a kognitivní deficit. Model odráží i některé další rysy Alzheimerovy choroby (Geloso et al., 2011). Byly popsány i alterace neurotransmiterových systémů: zvýšení hladiny glutamátu (Aschner et al., 1992) a dysfunkce GABAergního systému (Earley et al., 1992). Tyto změny by mohly napodobovat dysbalanci excitace a inhibice pravděpodobně přítomnou u Alzheimerovy choroby.

1.3.2 Model kognitivního deficitu indukovaný skopolaminem u potkana

Akutní aplikace skopolaminu narušuje prostřednictvím blokády muskarinových cholinergních receptorů cholinergní neurotransmisi a tím i kognitivní funkce (von Linstow Roloff et al., 2007), což do jisté míry napodobuje situaci u pacientů (Bartus et al., 1982). Kognitivní deficit je možno zmírnit aplikací inhibitorů acetylcholinesterázy (Bejar et al., 1999).

1.4 Vybrané behaviorální úlohy

Morrisovo vodní bludiště (Morris Water Maze, MWM) je úloha zaměřená na prostorovou kognici hlodavců. Úkolem zvířete je zapamatovat si pozici skrytého ostrůvku v nádrži s vodou (Morris, 1984). Řešení úlohy závisí na schopnosti alotetické navigace a klíčovou strukturu představuje hipokampus (Morris et al., 1982). Základními parametry kognitivního výkonu jsou latence a dráha do nalezení ostrůvku (Morris, 1984). Pro translační validitu svědčí i kognitivní deficit prokázaný u pacientů s Alzheimerovou chorobou při řešení analogické počítačové úlohy (Kalová et al., 2005).

Další relevantní behaviorální úlohy zahrnují **test otevřeného pole** ke studiu spontánní lokomoční aktivity v novém prostředí, **vyvýšené křížové bludiště** testující anxieta na základě explorační otevřených a uzavřených ramen bludiště (Pellow et al., 1985), **test prepulzní inhibice úlekové reakce** (PPI) jako měřítko sensorimotorického zpracování (Hoffman and Searle, 1965) a **kontextuální strachové podmiňování** zaměřené na asociativní učení (Curzon et al., 2008).

2 Hypotézy a cíle disertační práce

Celkovým cílem práce bylo posouzení účinnosti vybraných multipotentních sloučenin a kombinované aplikace v modelech kognitivního deficitu u laboratorního potkana a charakterizace behaviorálních účinků těchto látek. Společný mechanismus účinku testovaných látek představovala modulace neurotransmitterových systémů. Dílčí experimenty jsou rozděleny do tří tematických okruhů (Experiment 1, Experiment 2, Experiment 3).

2.1 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

Cílem první části práce bylo porovnání účinku experimentální monoterapie a kombinované terapie antagonistou NMDA receptorů a pozitivním modulátorem GABA_A receptorů v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace vyvolaném TMT. Testovali jsme hypotézu, že kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu povede k výraznějšímu efektu, než samostatná aplikace těchto látek.

2.2 Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

Cílem Experimentu 2 bylo posouzení účinnosti nově syntetizovaných multipotentních takrinových derivátů: heterodimeru 6-chlorotakrinu s 6-nitrobenzothiazolem (látka 10w, Experiment 2A) nebo s L-tryptofanem (látka S-K1035, Experiment 2B), působících mimo jiné jako inhibitory acetylcholinesterázy, v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem. Testovali jsme hypotézu, že aplikace jmenovaných látek povede ke zmírnění kognitivního deficitu.

2.3 Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory

Cílem Experimentu 3 bylo stanovení rizika závažných nežádoucích behaviorálních účinků nových multipotentních monotakrinových derivátů působících jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy (7-fenoxytakrin, Experiment 3A, a série látek pracovně označených K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599, Experiment 3B). Na základě známých vedlejších účinků antagonistů NMDA receptorů jsme se domnívali, že by u studovaných látek mohlo hrozit riziko nežádoucích psychotomimetických účinků, které se u laboratorních hlodavců manifestují jako hyperlokomoce a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce, a dále by se daly očekávat anxiolytické účinky.

3 Materiál a metodika

3.1 Zvířata

Byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar, ustájení v párech (s výjimkou Experimentu 1) v klecích (20 × 25 × 40 cm) při konstantní teplotě (22 °C), vlhkosti (50–60%) a světelném cyklu (světelná fáze: 6.00–18.00 h). Voda a krmivo byly k dispozici *ad libitum*. Experimenty probíhaly ve světelné části dne po uplynutí navykací doby a byly v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

3.2 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

3.2.1 Zvířata, aplikace látek a design experimentu

Bylo použito 32 zvířat (10–11 týdnů, 380–490 g) z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Potkani byli rozděleni do pěti skupin: FYZ, TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam, TMT + MK-801 + midazolam. V den 0 jim byl *i. p.* injikován TMT (trimethylcín chlorid, 8 mg/kg), kontrolním zvířatům (FYZ) pak fyziologický roztok. MK-801 ((+)-MK-801 hydrogen maleát, Sigma-Aldrich; 0,1 mg/kg/den), midazolam (midazolam hydrochlorid, Dormicum, Roche; 5 mg/kg/den) nebo obojí byly aplikovány *i. p.* zvířatům z příslušných skupin 30 min před aplikací TMT a poté denně do dne 11. Skupinám FYZ a skupiny TMT byl aplikován fyziologický roztok. Počet zvířat byl: 7 (FYZ), 8 (TMT), 6 (TMT + MK-801), 6 (TMT + midazolam), 5 (TMT + MK-801 + midazolam).

3.2.2 Morrisovo vodní bludiště

Aparatura sestávala z kruhového bazénu (průměr 180 cm) s vodou, obsahujícího průhlednou plošinu („ostrůvek“, průměr 10 cm), ponořenou 1 cm pod hladinou. Ve všech experimentech v této práci byla pozice ostrůvku neměnná. Úkolem zvířat bylo nalézt ostrůvek. Během čtyř po sobě následujících dnů zvířata absolvovala daný počet plaveb denně z různých startovních pozic. Pokud nenalezla ostrůvek do 60 s, byla na ostrůvek navedena. Pozice potkana byla snímána pomocí kamery a digitálního trekovacího systému (iTrack, Biosignal Group), data byla analyzována pomocí programu Carousel Maze Manager 0.4.0 (Bahník, 2014).

Testování v MWM probíhalo 12.–15. den po aplikaci TMT (8 plaveb/den) a kognitivními parametry byla dráha, latence, průměrná vzdálenost od ostrůvku a kumulativní latence (součet latencí ze 3. a 4. dne MWM). Poslední den byla navíc provedena tzv. zkušební plavba (probe trial) bez ostrůvku (30 s), kdy bylo analyzováno procento času stráveného v cílovém kvadrantu, a plavba s viditelným ostrůvkem vyvýšeným nad hladinu (60 s) k vyloučení senzomotorického deficitu.

3.2.3 Test otevřeného pole

Posouzení lokomoční aktivity v testu otevřeného pole (10 min) bylo provedeno k vyloučení závažného ovlivnění zdravotního stavu toxickými účinky TMT. Test byl proveden v den 0 před podáním TMT, dále v den 7, den 14 a den 21. Závislou proměnnou byla celková dráha.

3.2.4 Kontextuální strachové podmiňování

Sedmnáctý den po aplikaci TMT byl zvířeti ve speciální aparatuře (TSE Multi Conditioning System, TSE Systems) administrován elektrický impuls. Za 24 h bylo zvíře navraceno do aparatury a byl analyzován freezing (kumulativní doba absence pohybů zvířete).

3.2.5 Histologie

Osmadvacátý den po aplikaci TMT byla odebrána mozková tkáň metodou transkardiální perfuze. Mozky byly krájeny v koronální rovině (50 μ m řezy) do šesti sérií. Jedna série byla použita pro Nisslovo barvení (kresylviolet; pro morfometrii hipokampu), následující série pro histochemické barvení FluoroJade B za účelem vizualizace degenerujících neuronů (Schmued and Hopkins, 2000) a třetí série pro imunohistochemické značení neuronálních jader (NeuN; sekundární protilátka vizualizována metodou avidin-biotin, postup modifikován dle (Kršek et al., 2004); pro stereologickou analýzu neuronální denzity).

3.2.6 Stereologický odhad neuronální denzity v CA2/3 v dorzálním hipokampu

Hipokampální neurodegenerace byla kvantifikována na základě neuronální denzity stanovené stereologicky s využitím optického frakcionátoru. Metoda umožňuje výpočet odhadu celkového počtu buněk v celém objemu studované tkáně na základě spočítání buněk ve známé frakci tkáně. Analyzovanou oblastí byla pyramidální vrstva CA2/3 v části dorzálního hipokampu vymezené vzdáleností $-2,92$ až $-4,08$ od Bregmy (Paxinos and Watson, 2007) v pěti histologických řezech. Byl použit mikroskop Olympus BX51 s programem Stereo Investigator (MBF Bioscience).

3.2.7 Morfometrie vybrané části dorzálního hipokampu

Neurodegenerace vyvolaná TMT může vést k morfologickým alteracím hipokampu (Dyer et al., 1982). Jako doplňující histologické parametry byla proto s pomocí softwaru Fiji (ImageJ 2.0.0,) provedena následující měření z mikrofotografií dorzálního hipokampu: velikost plochy *gyru dentatu*, délka linie pyramidálních buněk, výška hipokampu, CA1 a *gyru dentatu*. Plocha *gyru dentatu* zahrnovala kromě granulární vrstvy a oblasti *hilu* i část pyramidální vrstvy CA3 (oblast CA3c), která je zvláště senzitivní vůči neurotoxickým účinkům TMT (Whittington et al., 1989).

3.2.8 Statistické vyhodnocení

Ke statistické analýze výsledků všech experimentů v disertační práci byl použit program GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) a rozdíly byly považovány za významné při $p < 0,05$. Pokud není uvedeno jinak, sloupcové grafy ukazují skupinový průměr + střední chyba průměru (SEM).

V Experimentu 1 byla k analýze dráhy, latence a průměrné vzdálenosti od ostrůvku v MWM použita dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními (faktory skupina a den) s Bonferroniho post hoc testy. Při zkušební plavbě bylo porovnáno procento času stráveného v cílovém kvadrantu s hodnotou 25 % (náhodná preference) jednovýběrovým t-testem. K analýze ostatních dat byla použita ANOVA, při nesplnění předpokladu normality pak Kruskalův–Wallisův test s Dunnovým post hoc testem.

3.3 Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

3.3.1 Zvířata

Bylo použito celkem 33 zvířat (z toho 8 zvířat pro orientační stanovení toxicity a 25 zvířat pro MWM; 12 týdnů, 400–550 g) z chovu Fyziologického ústavu AV ČR.

3.3.2 Orientační stanovení maximální tolerované dávky

Látka 10w (syntetizovaná dle (Nepovimova et al., 2021)) byla aplikována *i. p.* v dávce 1 mg/kg a 10 mg/kg a zvířata byla observována.

3.3.3 Morrisovo vodní bludiště

Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin: VEH, SKOP, 10w + SKOP, takrin + SKOP. Počet zvířat ve skupinách byl 6 (7 ve skupině VEH). Zvířatům byly aplikovány dvě *i. p.* injekce. 20 min před experimentem byl aplikován skopolamin hydrobromid (2,5 mg/kg); kontrolní skupině VEH pak fyziologický roztok. Studovaná látka 10w (2 mg/kg) nebo takrin hydrochlorid (2,5 mg/kg) byly aplikovány příslušným skupinám (10w + SKOP, apl. 5 min před testem, resp. takrin + SKOP, apl. 30 min před testem); zvířatům ve skupinách VEH a SKOP bylo aplikováno vehikulum.

Testování v MWM probíhalo během čtyř dnů (8 plaveb/den), látky byly aplikovány denně. Byla analyzována dráha a latence finální den experimentu (ANOVA a Tukeyho post hoc test).

3.4 Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

Bylo použito 30 zvířat (9–12 týdnů, 370–500 g) z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Pro pozdější *i. c. v.* aplikaci testované látky jim byly 7 dní před experimentem implantovány kanyly

do laterálních mozkových komor. Potkani byli rozděleni do pěti skupin: FYZ + FYZ, FYZ + SKOP, S-K1035 100 + FYZ, S-K1035 10 + SKOP, S-K1035 100 + SKOP, kde první zkratka označuje látku aplikovanou *i. c. v.* (bilat.) 60 min před MWM a druhá zkratka látku aplikovanou *i. p.* 20 min před MWM. (FYZ = fyziologický roztok, SKOP = skopolamin 5 mg/kg, S-K1035 10 = 10nM koncentrace, S-K1035 100 = 100nM koncentrace). Počet zvířat ve skupinách byl šest.

MWM probíhalo během čtyř dnů (4 plavby/den), látky byly aplikovány 4. den. Byla analyzována dráha, latence a průměrná vzdálenost od ostrůvku 4. den (ANOVA a Tukeyho post hoc test).

3.5 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu

3.5.1 Zvířata, experimentální skupiny a aplikace látek

Byla použita zvířata z chovu Velaz (3–4 měsíce, 360–450 g). Účinek 7-fenoxytakrinu byl testován samostatně i v koaplikaci s MK-801. Potkani byli rozděleni do šesti skupin: FYZ + DMSO, FYZ + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg), FYZ + 7-fenoxytakrin (10 mg/kg), MK-801 + DMSO, MK-801 + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg), MK-801 + 7-fenoxytakrin (10 mg/kg). Zvířatům byly 30 min před testem aplikovány dvě *i. p.* injekce: MK-801 (nebo vehikulum: fyziologický roztok – FYZ) a 7-fenoxytakrin (nebo vehikulum: 5% DMSO v redestilované vodě). Dávka MK-801 byla 0,3 mg/kg (test otevřeného pole), resp. 0,1 mg/kg (vyvýšené křížové bludiště).

3.5.2 Test otevřeného pole

Vliv 7-fenoxytakrinu na spontánní lokomoční aktivitu byl studován v testu otevřeného pole ve čtvercové aréně (80 × 80 cm). Pozice potkana byla po dobu 10 min snímána kamerou s použitím programu EthoVision 11.5. Závislou proměnnou byla dráha. Ve skupinách bylo 8 zvířat, kromě skupin FYZ + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg) a MK-801 + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg), kde bylo 6 zvířat.

3.5.3 Vyvýšené křížové bludiště

Vliv 7-fenoxytakrinu na anxieta byl studován ve vyvýšeném křížovém bludišti (aparatura tvaru „+“ s dvěma otevřenými rameny bez okrajů a dvěma rameny s okraji (výška okrajů 35 cm, rozměr ramene 40 × 15 cm). Pozice potkana byla 10 min monitorována programem EthoVision 11.5 a analyzována doba strávená v otevřených ramenech bludiště. Počet zvířat ve skupinách byl 8.

3.5.4 Statistické vyhodnocení

Byla použita dvoucestná ANOVA s faktory: fenotyp (FYZ/MK-801) a látka (7-fenoxytakrin/DMSO). V případě signifikantního výsledku byl použit Bonferroniho post hoc test.

3.6 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů

3.6.1 Zvířata, experimentální skupiny a aplikace látek

Byla použita zvířata z chovu Velaz (2–3 měsíce, 280–400 g). Potkani byli rozděleni do 16 skupin: DMSO (kontrola pro 1 mg/kg skupiny), K1575 (1 mg/kg), K1576 (1 mg/kg), K1578 (1 mg/kg), K1592 (1 mg/kg), K1594 (1 mg/kg), K1599 (1 mg/kg), DMSO (kontrola pro 5 mg/kg skupiny), K1575 (5 mg/kg), K1576 (5 mg/kg), K1578 (5 mg/kg), K1592 (5 mg/kg), K1594 (5 mg/kg), K1599 (5 mg/kg), 7-methoxytakrin (5 mg/kg) a MK-801. Látky K1575–K1599 rozpuštěné v 5% dimethylsulfoxidu (DMSO) ve fyziologickém roztoku byly aplikovány *i. p.* 15 min před pokusem. 7-methoxytakrin a MK-801 (0,2 mg/kg v testu otevřeného pole a 0,3 mg/kg v testu PPI) byly podány 30 min před pokusem, skupinám DMSO bylo podáno vehikulum.

3.6.2 Test otevřeného pole

Vliv látek na lokomoční aktivitu byl posouzen v testu otevřeného pole (aréna 80 × 80 cm), dráha byla analyzována s použitím programu EthoVision 14. Počet zvířat ve skupinách byl 6, s výjimkou skupin DMSO (1 ml/kg) a MK-801, kde bylo 8 zvířat.

3.6.3 Prepulzní inhibice úlekové reakce

Vliv látek na prepulzní inhibici akustické úlekové reakce (PPI) byl studován s využitím speciální aparatury (SR-LAB, San Diego Instruments). Byly analyzovány amplitudy úlekové reakce (motorické odpovědi zvířat na prezentované zvukové stimuly). Při PPI testu bylo prezentováno 6 pulsů (125 dB/40 ms), poté 60 trialů: A) puls 40 ms 125 dB; B) prepuls-puls: 20 ms prepuls intenzity 83 dB nebo 91 dB následovaný po různě dlouhém intervalu (30, 60 nebo 120 ms) pulsem (125 dB, 40 ms); C) kontrolní měření bez stimulu (60 ms). Poté bylo opět prezentováno 6 pulsů (125 dB/40 ms). Procento PPI bylo spočteno podle vzorce: $PPI = 100 - (\text{průměrná odpověď na stimul typu prepuls-puls} / \text{průměrná odpověď na stimul typu puls}) \times 100$. Počet zvířat ve skupinách byl 6, s výjimkou skupin DMSO (2,5 ml/kg), K1599 (1 mg/kg) a K1592 (5 mg/kg), kde bylo 8 zvířat.

3.6.4 Statistické vyhodnocení

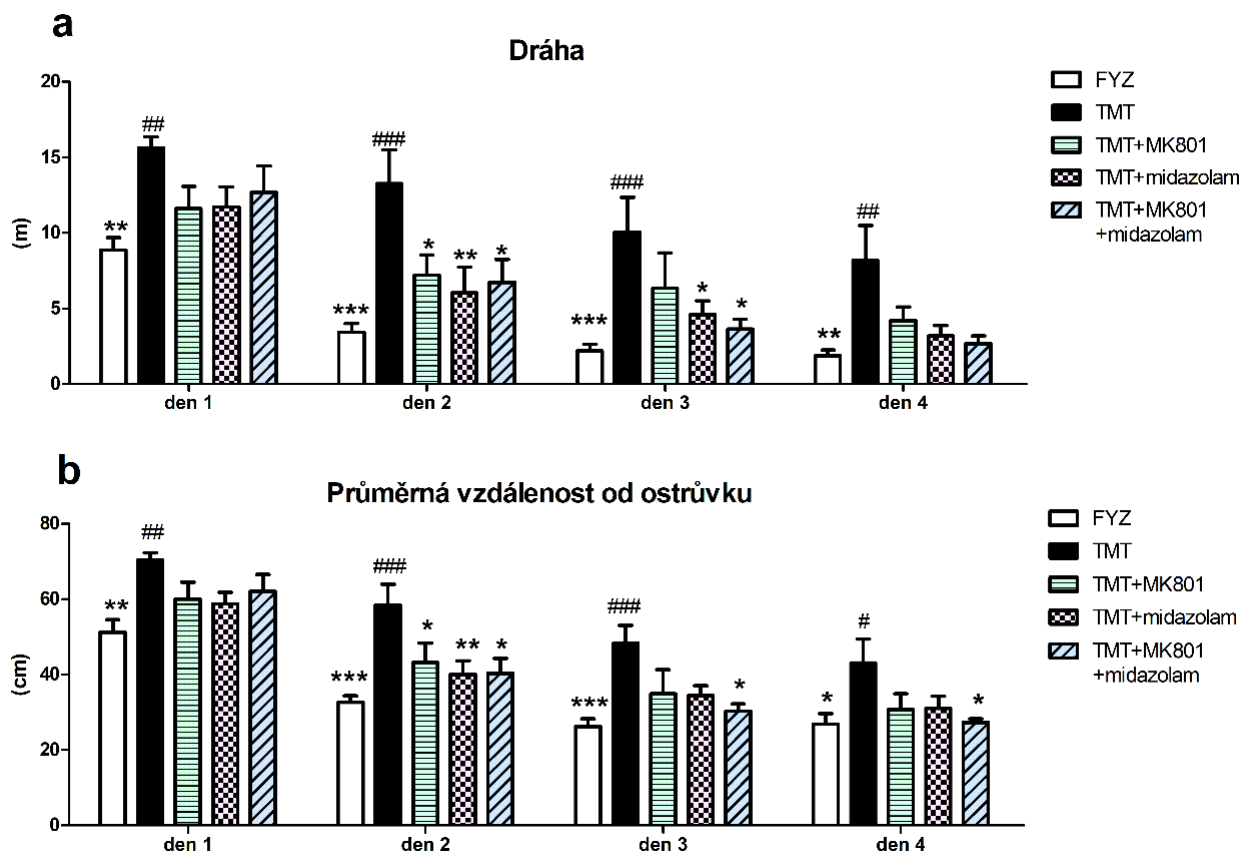
Byla použita ANOVA s Bonferroniho post hoc testem (vs. DMSO), pro data z testu otevřeného pole (dávky 5 mg/kg) pak Brown-Forsythe ANOVA s Dunnettovým T3 post hoc testem.

4 Výsledky

4.1 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

4.1.1 Behaviorální analýzy

Analýza dráhy (dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními; obr. 2a) v MWM prokázala efekt skupiny ($F_{4,81} = 6,23$, $p = 0,0011$) a dne ($F_{3,81} = 60,22$, $p < 0,0001$), rovněž analýza průměrné vzdálenosti od ostrůvku (obr. 2b) prokázala efekt skupiny ($F_{4,81} = 5,973$, $p = 0,0014$) i dne ($F_{3,81} = 119,1$, $p < 0,0001$). Trimethylcín (TMT) způsobil výrazný kognitivní deficit, manifestovaný jako zvýšení hodnot těchto parametrů všechny dny experimentu. Naopak skupiny s experimentální protektivní léčbou (TMT + MK-801, TMT + midazolam, TMT + MK-801 + midazolam) se signifikantně nelišily od kontrolních zvířat (FYZ) a v některých dnech dosáhly lepšího výkonu než skupina TMT.



Obr. 2 Vliv MK-801, midazolamu a jejich koaplikace na kognitivní deficit vyvolaný TMT v úloze MWM. **a:** Dráha, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. TMT, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. FYZ. **b:** Průměrná vzdálenost od ostrůvku (efekt skupiny v rámci dne), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. TMT, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. FYZ.

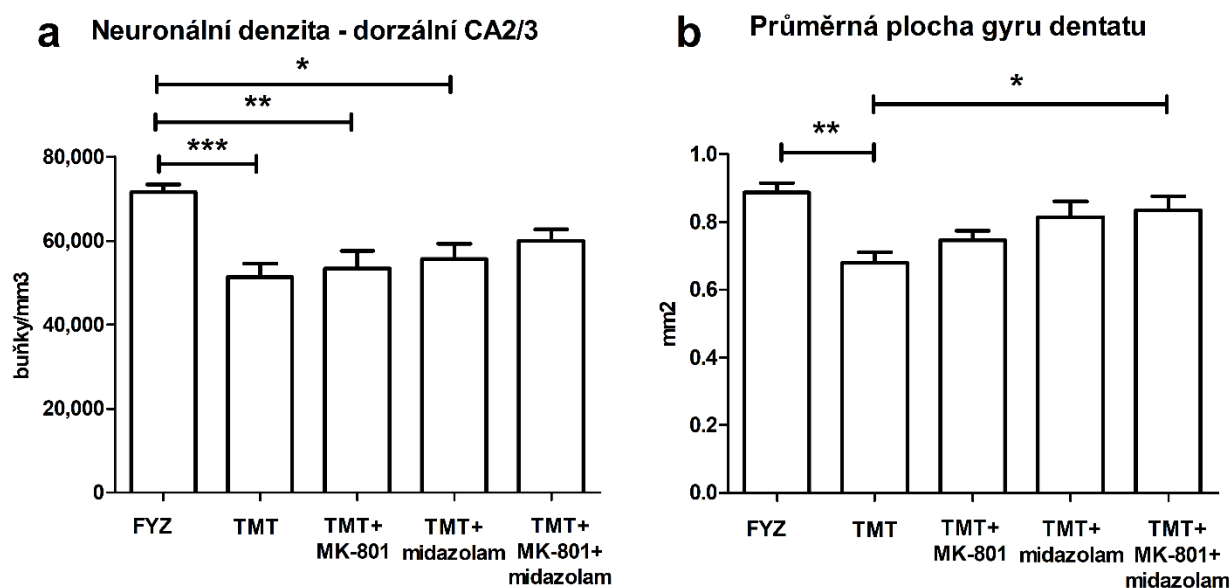
Analýza kumulativní latence ukázala efekt skupiny (Kruskalův-Wallisův test, $H = 14,25$, $p = 0,0065$). Skupina TMT vykazovala zvýšenou hodnotu kumulativní latence (vs. FYZ, Dunnův post hoc test, $p < 0,01$) a nedosáhla tedy výkonu kontrolních zvířat. Oproti tomu skupiny s protektivní aplikací se od kontrolních zvířat nelišily. Během zkušební plavby (probe trial) všechny skupiny preferovaly kvadrant, kde byl dříve umístěn ostrůvek. Analýza latence nalezení ostrůvku při testu s viditelným ostrůvkem neukázala signifikantní efekt skupiny, neprokázalo se tedy závažné ovlivnění senzomotorických funkcí.

Analýza kontextuálního strachového podmiňování neprokázala rozdíly mezi skupinami.

4.1.2 Histologické analýzy

Analýza neuronální denzity v oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu coby parametru neurodegenerace ukázala efekt skupiny (ANOVA, $F_{4,27} = 6,733$, $p = 0,0007$). Neuronální denzita u skupin TMT ($p < 0,001$), TMT + MK-801 ($p < 0,01$) a TMT + midazolam ($p < 0,05$) byla signifikantně nižší než u kontrolních zvířat (FYZ; Tukeyho post hoc test). Aplikace samotného MK-801 ani midazolamu tedy nepostačovala k signifikantnímu zmírnění TMT-indukované neurodegenerace. Oproti tomu skupina s kombinovanou léčbou (TMT + MK-801 + midazolam) se od kontrolních zvířat nelišila, což naznačuje mírný neuroprotektivní účinek (obr. 3a).

Výsledky morfometrické analýzy průměrné velikosti plochy *gyru dentatu* v dané části dorzálního hipokampu byly v souladu s tímto výsledkem (obr. 3b).



Obr. 3 Histologická analýza dorzálního hipokampu. **a:** Stereologický odhad neuronální denzity v CA2/3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **b:** Průměrná velikost plochy *gyru dentatu* (včetně oblasti CA3c; ANOVA a Tukeyho post hoc test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

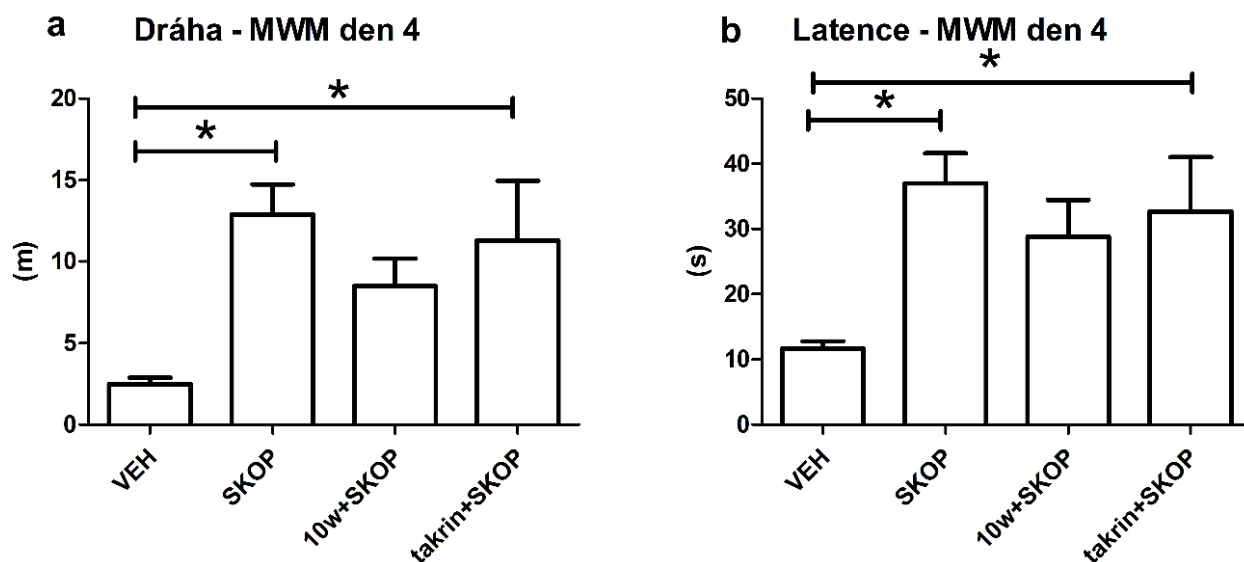
4.2 Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

4.2.1 Orientační stanovení maximální tolerované dávky

Při aplikaci studovaného dimeru pracovním označeného 10w v dávce 1 mg/kg nebyly evidovány nežádoucí účinky. Po aplikaci dávky 10 mg/kg byly pozorovány příznaky cholinergní stimulace mírného až středního stupně závažnosti, spontánně ustupující do 5 h.

4.2.2 Morrisovo vodní bludiště

Analýza dat ze 4. dne (ANOVA) ukázala efekt skupiny v parametrech dráhy ($F_{3, 21} = 4,838$, $p = 0,0103$; obr. 4a) a latence ($F_{3, 21} = 4,599$, $p = 0,0126$; obr. 4b). Skopolamin indukoval kognitivní deficit, manifestovaný jako prodloužení dráhy ($p < 0,05$) i latence ($p < 0,05$, vs. VEH, Tukeyho post hoc test). Aplikace zvolené dávky takrinu (2,5 mg/kg) kognitivní deficit nezmírnila (takrin + SKOP vs. VEH: dráha $p < 0,05$, latence $p < 0,05$). Oproti tomu zvířata po koaplikaci dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (10w, 2 mg/kg) a skopolaminu se v žádném z parametrů signifikantně nelišila od kontrolní skupiny (VEH), což naznačuje mírný terapeutický efekt.

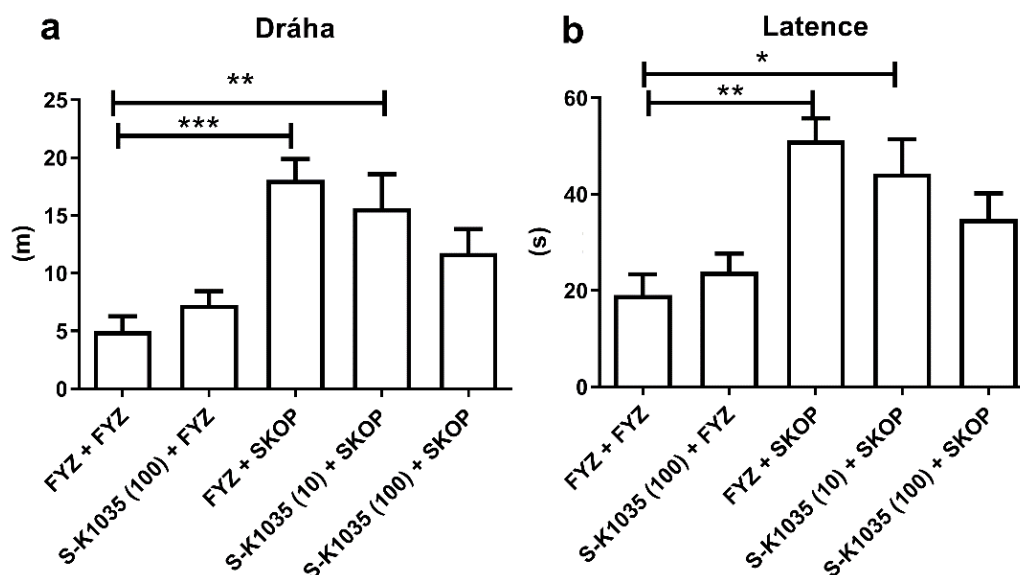


Obr. 4 Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka 10w) ve skopolaminem indukovaném modelu kognitivního deficitu v MWM. Látka 10w (2 mg/kg), ale nikoli takrin (2,5 mg/kg), poskytla částečný protektivní účinek proti kognitivnímu deficitu. (VEH – kontrolní zvířata s aplikací vehikula, SKOP – skopolamin.) **a:** Dráha 4. den experimentu, * $p < 0,05$, **b:** latence nalezení ostrůvku 4. den experimentu, * $p < 0,05$.

4.3 Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

Analýza kognitivního výkonu zvířat finální den experimentu ukázala efekt skupiny ve všech sledovaných parametrech (ANOVA, dráha: $F_{4,25} = 7,870$, $p = 0,0003$; latence: $F_{4,25} = 6,801$, $p = 0,0008$; průměrná vzdálenost od ostrůvku: $F_{4,25} = 6,840$, $p = 0,0007$).

Samotná látka S-K1035 (100nM) neměla vliv na uplavanou dráhu. Skopolamin (FYZ + SKOP) způsobil zvýšení dráhy a tedy kognitivní deficit (vs. FYZ + FYZ; Tukeyho post hoc test, $p < 0,001$). Nižší (10nM) koncentrace látky S-K1035 kognitivní deficit nezmírnila (S-K1035 10 + SKOP vs. FYZ + FYZ: $p < 0,01$). Oproti tomu zvířata aplikovanou vyšší koncentrací S-K1035 a skopolaminem (S-K1035 100+SKOP) se dráhou nelišila od kontrolní skupiny (FYZ + FYZ), což ukazuje zmírnění kognitivního deficitu (obr. 5a). Analýza latence nalezení ostrůvku (obr. 5b) a průměrné vzdálenosti od ostrůvku vedla k obdobným výsledkům.



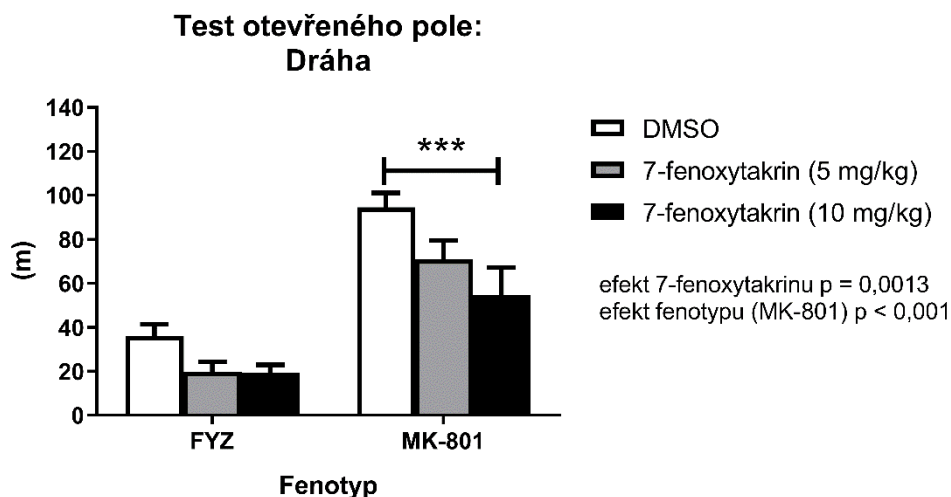
Obr. 5 Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka S-K1035) v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem v MWM (4. den experimentu). Vyšší testovaná koncentrace látky S-K1035 (100nM) zmírnila kognitivní deficit. (FYZ – fyziologický roztok, SKOP – skopolamin.) **a:** Dráha, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **b:** latence, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu

4.4.1 Test otevřeného pole

V testu otevřeného pole jsme studovali vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu a dále na hyperlokomoci vyvolanou MK-801. Analýza (dvojcestná ANOVA) dráhy ukázala efekt obou faktorů: 7-fenoxytakrinu ($F_{2,38} = 7,90$, $p = 0,0013$) a fenotypu, tj. MK-801 ($F_{1,38} = 59,07$, $p < 0,0001$). Samotný 7-fenoxytakrin neměl na dráhu signifikantní vliv. Nebyla tedy přítomna

hyperlokomoce, která je projevem nežádoucích psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů. Naopak aplikace nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801 vyvolala hyperlokomoci. Po koaplikaci vyšší použité dávky 7-fenoxytakrinu (10 mg/kg) s MK-801 došlo ke zmírnění hyperlokomoce indukované MK-801 ($p < 0,001$; Bonferroniho post hoc test; obr. 6).



Obr. 6 Vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole. Graf ukazuje dráhu u zvířat dvou různých fenotypů: zvířat po aplikaci fyziologického roztoku (FYZ) nebo po aplikaci MK-801 (0,3 mg/kg), kterým byl aplikován DMSO (vehikulum; bílé sloupce) nebo 7-fenoxytakrin v dávce 5 mg/kg (šedé sloupce) nebo 10 mg/kg (černé sloupce). 7-fenoxytakrin neměl u zvířat s fenotypem FYZ signifikantní vliv na lokomoci. U zvířat s fenotypem MK-801 vyšší testovaná dávka 7-fenoxytakrinu snížila hyperlokomoci vyvolanou MK-801. *** $p < 0,001$.

4.4.2 Vyvýšené křížové bludiště

Analýza (dvoucestná ANOVA) času stráveného v otevřených ramenech bludiště ukázala efekt fenotypu, tj. MK-801 ($F_{1, 39} = 6,845$, $p = 0,0126$). Aplikace MK-801 vedla ke zvýšení času stráveného v otevřených ramenech, což naznačuje anxiolytický účinek. Naopak podání 7-fenoxytakrinu (samostatně ani v kombinaci s MK-801) nemělo vliv ($F_{2, 39} = 1,30$, $p = 0,2829$).

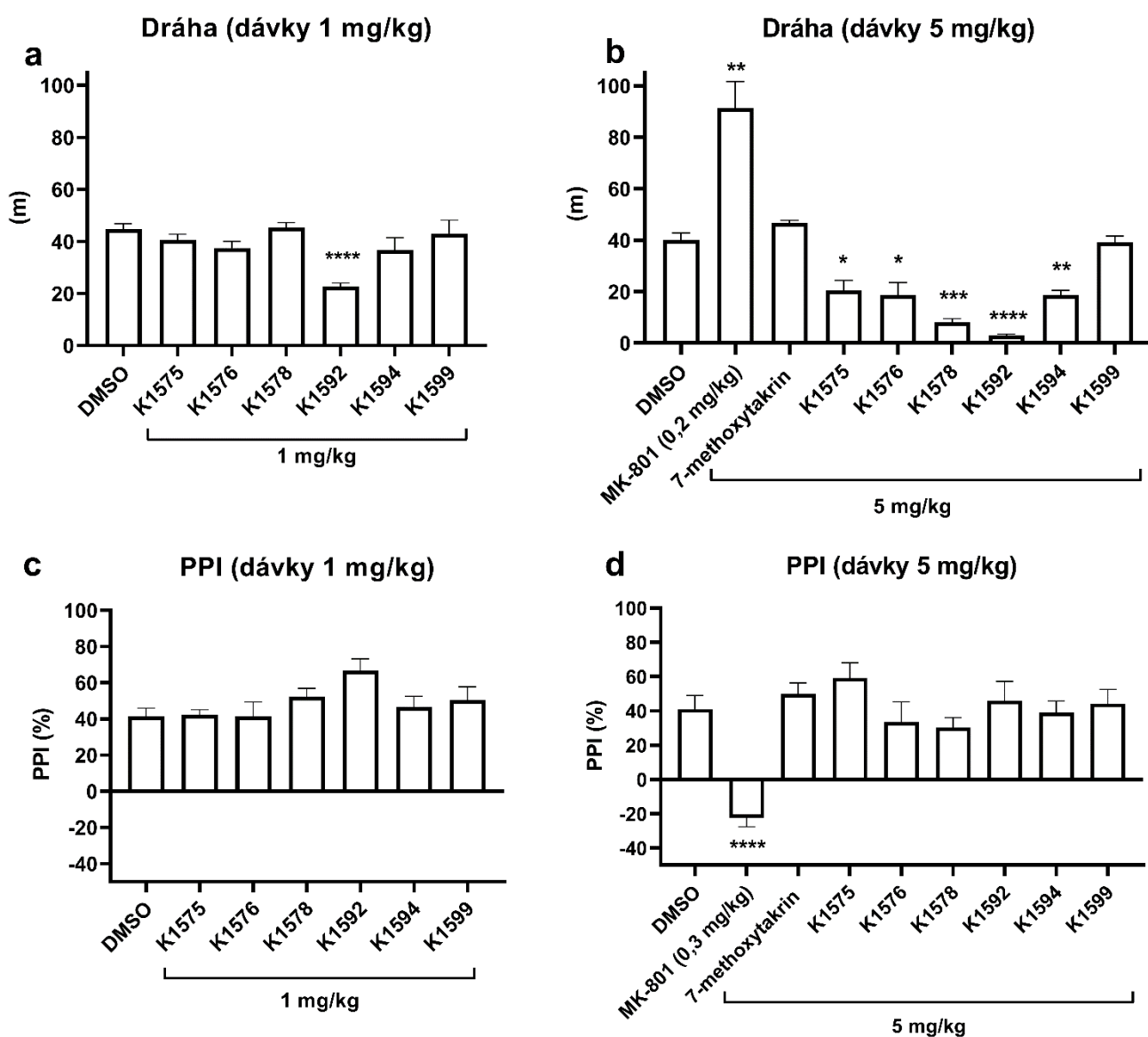
4.5 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů

4.5.1 Test otevřeného pole

Analýza dráhy u skupin s nižší dávkou studovaných látek (1 mg/kg) odhalila efekt skupiny (ANOVA; $F_{6, 37} = 6,269$, $p = 0,0001$). Látka K1592 snížila lokomoci ($p < 0,0001$ vs. DMSO), ostatní látky neměly vliv (obr. 7a). Analýza dráhy u skupin s vyšší dávkou (5 mg/kg) prokázala efekt skupiny (Brown-Forsythe ANOVA; $F_{*8, 13,37} = 38,00$, $p < 0,0001$). Látky K1575, K1576, K1578, K1592 a K1594 snížily lokomoční aktivitu (5 mg/kg; vs. DMSO, $p = 0,0194$, $p = 0,0374$, $p = 0,0001$, $p < 0,0001$ a $p = 0,0013$). Naopak MK-801 (0,2 mg/kg) vyvolalo nežádoucí zvýšení lokomoce (vs. DMSO, $p = 0,0098$). Látka K1599 ani 7-methoxytakrin neměly vliv (obr. 7b).

4.5.2 Prepulzní inhibice úlekové reakce

Nižší dávky testovaných látek (1 mg/kg) nenarušily PPI (obr. 7c). Vliv vyšší dávky látek (5 mg/kg) na PPI byl porovnán i s účinky 7-methoxytakrinu a MK-801. Tato analýza odhalila efekt skupiny (ANOVA; $F_{8, 48} = 7,377$, $p < 0,0001$). MK-801 vyvolalo deficit PPI (0,3 mg/kg, $p < 0,0001$ vs. DMSO). Žádná z testovaných látek ani 7-methoxytakrin PPI signifikantně neovlivnily (obr. 7d). Výsledky z PPI i z testu otevřeného pole tedy ukazují nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků testovaných takrinových derivátů.



Obr. 7 Behaviorální účinky monotakrinových derivátů označených K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 v porovnání s MK-801 a 7-methoxytakrinem. Takrinové deriváty nevyvolaly nežádoucí zvýšení lokomoční aktivity ani narušení PPI. **a:** Dráha v testu otevřeného pole – dávky 1 mg/kg, **b:** dráha v testu otevřeného pole – dávky 5 mg/kg, **c:** PPI – dávky 1 mg/kg, **d:** PPI – dávky 5 mg/kg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. DMSO.

5 Diskuse

5.1 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

V Experimentu 1 jsme porovnávali účinnost experimentální kombinované aplikace a monoterapie antagonistou NMDA receptorů (MK-801) a pozitivním modulátorem GABA_A receptorů (midazolam). Výsledky jsou obsahem publikace (Chvojkova et al., 2021). V souladu s literaturou (Earley et al., 1992; Whittington et al., 1989) trimethylcín (TMT) indukoval kognitivní deficit v MWM a neurodegeneraci v dorzálním hipokampu. V klíčové kognitivní úloze jsme prokázali příznivý účinek samostatné i kombinované aplikace obou testovaných látek bez signifikantní superiority kombinované aplikace. V následné stereologické analýze hipokampální neurodegenerace jsme prokázali mírný protektivní efekt kombinované aplikace, zatímco efekt monoterapií prokázán nebyl. Hypotéza o superioritě kombinované aplikace se tedy zcela nepotvrdila.

Kognitivní deficit indukovaný TMT se projevil sníženou efektivitou a opožděným nástupem učení v MWM. Šlo pravděpodobně o selektivní deficit kognitivních funkcí, jelikož kontrolní procedury neprokázaly narušení nekognitivních (zejm. senzomotorických) funkcí, které by mohlo ovlivnit chování v MWM. Pozorovaný pozitivní vliv aplikace MK-801 i aplikace midazolamu na kognici je v souladu s popsányými účinky příbuzných látek gaboxadolu (O'Connell et al., 1994) a fencyklidinu (Earley et al., 1990) v tomto modelu. Kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu však nevedla ke zvýšení účinnosti, navzdory nesignifikantní tendenci v některých parametrech (kumulativní latence, vzdálenost od ostrůvku poslední 2 dny MWM).

Následně byla analyzována hipokampální neurodegenerace. TMT snížil neuronální denzitu v oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu. Experimentální monoterapie MK-801 nebo midazolamem za daných podmínek nepostačovala ke zmírnění neurodegenerace. Neuroprotektivní účinnost antagonistů NMDA receptorů ani pozitivních modulátorů GABA_A receptorů není v TMT modelu příliš prozkoumaná a výsledky jsou také spíše negativní (Gunasekar et al., 2001; Shuto et al., 2009; Zimmer et al., 1985). Oproti tomu kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu měla částečný protektivní vliv na neuronální denzitu, což naznačuje superioritu koaplikace. Podobných výsledků bylo dosaženo i v parametru velikosti plochy gyru *dentatu* zahrnující zasaženou oblast CA3c. Zvýšená neuroprotektivní účinnost kombinované aplikace zástupců antagonistů NMDA receptorů a pozitivních modulátorů GABA_A receptorů byla již popsána v *in vitro* (Shibuta et al., 2006) i *in vivo* modelech excitotoxicity a ischemie (Lyden and

Lonzo, 1994) i dalších patologií CNS. V TMT modelu není mechanismus pozorované neuroprotektce zcela zřejmý, mohlo by k němu přispívat zmírnění excitotoxicity nebo antioxidační působení (Corvino et al., 2013; Koczyk, 1996; Liu et al., 2017).

Výsledky tedy ukázaly mírnou superioritu kombinované aplikace na histologické, ale nikoli behaviorální úrovni. Interpretace je komplikována komplexním mechanismem působení TMT a nejasnou rolí alterací neurotransmiterových systémů v tomto mechanismu, které jsou některými autory považovány za možný faktor přispívající k neurotoxicitě TMT (Koczyk, 1996), zatímco jiní autoři je považují spíše za sekundární fenomén neurodegenerace, který přispívá k výslednému kognitivnímu deficitu (Corvino et al., 2013). Souvislost mezi prokognitivními a neuroprotektivními účinky látek tak není zcela zřejmá. Protože z hlediska potenciálního klinického využití považujeme zmírnění kognitivních symptomů za významnější než histologické nálezy, nemůžeme konstatovat potvrzení hypotézy o superioritě kombinované terapie. Další představu o relevanci dané kombinace mechanismů účinku pro léčbu Alzheimerovy choroby by mohlo poskytnout studium účinnosti i v dalších jejích modelech.

5.2 Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

V Experimentu 2 jsme prokázali terapeutický účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka pracovně označená 10w), a dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka pracovně označená S-K1035), multipotentních sloučenin působících jako inhibitory acetylcholinesterázy a inhibitory agregace amyloidu beta, v modelu kognitivního deficitu v MWM vyvolaném skopolaminem u potkana. Výsledky jsou součástí publikací (Chalupova et al., 2019; Nepovimova et al., 2021).

Skopolamin v souladu s literaturou (Bejar et al., 1999; von Linstow Roloff et al., 2007) vyvolal deficit prostorové kognice v MWM. Zmírnění kognitivního deficitu po aplikaci studovaných multipotentních takrinových heterodimerů prokazuje účinnost těchto nových molekul *in vivo* a tedy potenciál pro léčbu Alzheimerovy choroby, a je v souladu se známými účinky inhibitorů acetylcholinesterázy (Bejar et al., 1999; Laczó et al., 2017).

Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka označená 10w, Experiment 2A) byl porovnán s účinky takrinu, přičemž obě látky byly aplikovány v dávce prosté závažných nežádoucích účinků. Zmírnění kognitivního deficitu se dostavilo pouze po podání látky 10w. Příčinou absence terapeutických účinků takrinu mohla být spíše nízká zvolená dávka (srovnejte (Bejar et al., 1999; Jackson and Soliman, 1995)). Je známo, že účinné dávky takrinu se mohou

blížit dávkám, které již mají nežádoucí účinky (Yoshida and Suzuki, 1993). Získané výsledky naznačují možný příznivější profil terapeutické účinnosti a nežádoucích účinků látky 10w v porovnání s takrinem. Jednou z příčin by mohla být selektivita látky 10w (ale nikoli takrinu (Hunter et al., 1989)) pro acetylcholinesterázu (vs. butyrylcholinesterázu). Vyšší selektivita může vést k omezení cholinergních nežádoucích účinků (Liston et al., 2004), které obecně limitují dávkování inhibitorů acetylcholinesterázy (Farlow et al., 2011) a tím potenciálně i dosažení optimální účinnosti.

V případě dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka S-K1035, Experiment 2B) jsme z důvodu suboptimálních farmakokinetických vlastností zvolili *i. c. v.* aplikaci, což si vyžádalo méně obvyklý design experimentu s jednorázovou aplikací látek poslední den MWM po předchozím intaktním tréninku, modifikovaný dle (Jackson and Soliman, 1995). Podařilo se vyvolat kognitivní deficit i prokázat dávkově závislý terapeutický efekt látky S-K1035. Účinná dávka látky S-K1035 byla prosta nežádoucích účinků u zdravých zvířat. Negativem látky zůstává suboptimální průnik hematoencefalickou bariérou, který je obecným rizikem multi-target-directed ligandů v podobě dimerů s vysokou molekulovou hmotností, spojených uhlíkovým řetězcem (Benek et al., 2020).

5.3 Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory

Látky působící jako antagonisté NMDA receptorů disponují potenciálem pro léčbu Alzheimerovy choroby, použití mnohých zástupců těchto látek je však limitováno závažnými behaviorálními nežádoucími účinky (Krystal et al., 1994; Muir and Lees, 1995). V Experimentu 3 jsme prokázali nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků studovaných multipotentních monotakrinových derivátů, působících jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy (7-fenoxytakrin – Experiment 3A, a série látek označených K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 – Experiment 3B). Tyto příznivé výsledky opravňují zahájení preklinických testů účinnosti v modelech Alzheimerovy choroby. Výsledky jsou součástí publikací (Gorecki et al., 2021; Kaniakova et al., 2021).

Vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole byl porovnán s účinky antagonisty NMDA receptorů MK-801. V souladu s literaturou (Andiné et al., 1999) MK-801 vyvolalo hyperlokomoci, považovanou za ekvivalent psychotických příznaků (Andiné et al., 1999). Naopak 7-fenoxytakrin lokomoční aktivitu nezvýšil, což naznačuje nízké riziko psychotomimetických účinků. Riziko nežádoucích účinků antagonistů NMDA receptorů je ovlivněno mírou interference s fyziologickou funkcí NMDA receptorů a tedy přesným molekulárním mechanismem působení látky (Depoortere et al., 1999; Fraser et al., 1996). Příčinou

příznivého profilu nežádoucích účinků 7-fenoxytakrinu by mohlo být jeho preferenční působení na subpopulaci NMDA receptorů nesoucí NR2B podjednotku (Depoortere et al., 1999; Fraser et al., 1996) a/nebo jeho současné inhibiční působení na acetylcholinesterázu, jelikož účinky NMDA antagonistů a inhibitorů acetylcholinesterázy na lokomoční aktivitu se dají označit za protichůdné (Andiné et al., 1999; Csernansky et al., 2005).

V experimentu zaměřeném na interakci 7-fenoxytakrinu a MK-801 jsme prokázali zmírnění MK-801-indukované hyperlokomoce po aplikaci vyšší (10 mg/kg) testované dávky 7-fenoxytakrinu. Podobných výsledků bylo dříve dosaženo s 7-methoxytakrinem (Kaniakova et al., 2018). Příčinou by mohla být *in vivo* kompetice látek o vazbu v iontovém kanálu NMDA receptorů (Kaniakova et al., 2021) a/nebo současná inhibice acetylcholinesterázy (Csernansky et al., 2005).

Vzhledem k anxiolytickým účinkům některých antagonistů NMDA receptorů (Wiley et al., 1995) byla charakterizace behaviorálních účinků 7-fenoxytakrinu doplněna prověřením vlivu na anxieta ve vyvýšeném křížovém bludišti. Přítomnost anxiolytických účinků se nepotvrdila.

V případě série monotakrinových derivátů jsme (na rozdíl od MK-801) neprokázali indukci hyperlokomoce ani narušení prepulzní inhibice úlekové reakce, což obojí poukazuje na nízké riziko psychotomimetických účinků studovaných takrinových derivátů.

Na druhou stranu látka K1592 v obou dávkách (1 a 5 mg/kg) a látky K1575, K1576, K1578, a K1594 ve vyšší testované dávce (5 mg/kg) snížily lokomoční aktivitu, což je pravděpodobně důsledkem inhibice cholinesteráz (Carriero et al., 1997; Csernansky et al., 2005). Tyto účinky byly popsány i u klinicky využívaných inhibitorů acetylcholinesterázy (Csernansky et al., 2005) a nemusí tak nutně představovat překážku pro potenciální využití látek. V návaznosti na příznivé výsledky bylo u studovaných takrinových derivátů přistoupeno k preklinickým testům účinnosti v modelech patologií asociovaných s Alzheimerovou chorobou.

6 Závěry

V rámci preklinického vývoje léků pro Alzheimerovu chorobu je věnována rostoucí pozornost multipotentním sloučeninám, potenciálně umožňujícím intenzifikaci účinku simultánním zasažením více patofyziologických mechanismů. Práce se zabývala posouzením účinnosti multipotentních sloučenin a kombinované terapie na bázi modulátorů neurotransmiterových systémů ve farmakologicky indukovaných modelech kognitivního deficitu a dále i možnými behaviorálními nežádoucími účinky některých těchto látek u potkana.

Klíčovým počátečním krokem ve vývoji multipotentních sloučenin je volba kombinace mechanismů účinku. Zda zvolená kombinace účinků povede ke zvýšení celkového efektu, lze posoudit na základě porovnání účinků kombinované terapie a monoterapie danými typy látek. Cílem první části práce bylo porovnání účinku samostatné a kombinované aplikace antagonisty NMDA receptorů a pozitivního modulátoru GABA_A receptorů v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace vyvolaném TMT. Domnívali jsme se, že kombinovaná aplikace umožní zvýšení účinnosti. Superiorita protektivní účinnosti kombinované terapie byla prokázána na histologické úrovni, avšak v kognitivním testu nedosáhla statistické signifikance. Protože zmírnění kognitivních symptomů považujeme za klíčové, nemůžeme konstatovat potvrzení hypotézy. Pozitivní výsledek histologické části nicméně naznačuje, že koaplikace daných typů látek není zcela iracionální strategií. Bližší představu o relevanci dané kombinace mechanismů účinku by mohlo poskytnout posouzení účinnosti i v dalších modelech Alzheimerovy choroby.

Zbývající část práce se zabývala behaviorálními účinky multipotentních takrinových derivátů vyvinutých jako potenciální léky pro Alzheimerovu chorobu. Zde jsme prokázali terapeutický efekt dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu a dále dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, působících kromě jiného jako inhibitory acetylcholinesterázy, v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem. Účinnost dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu přitom ve zvolené dávce překonala účinnost takrinu. U jiných takrinových derivátů působících jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy jsme se zaměřili na charakterizaci nežádoucích účinků, kde jsme prokázali nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů. Příznivé výsledky umožnily zahájení preklinických testů účinnosti.

Celkově jsou pozitivní výsledky experimentů provedených v rámci této práce podnětem k dalším preklinickým testům účinnosti testovaných typů látek v animálních modelech Alzheimerovy choroby a k vývoji látek s obdobným mechanismem působení a vylepšenými vlastnostmi a snad i s perspektivou budoucího postupu do fáze klinických testů.

7 Resumé

7.1 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

V této studii jsme porovnali účinek experimentální monoterapie a kombinované terapie antagonistou NMDA receptorů MK-801 a pozitivním modulátorem GABA_A receptorů midazolamem v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace indukovaném trimethylcínem u potkana. Prokázali jsme zmírnění kognitivního deficitu v úloze MWM po aplikaci MK-801, midazolamu i po jejich koaplikaci, bez superiority koaplikace. Pozdější histologická analýza ukázala částečný protektivní efekt koaplikace proti TMT-indukované neurodegeneraci v oblasti CA2/3 dorzálního hipokampu, zatímco monoterapie byly v daném časovém bodě neefektivní. Pouze histologická část studie tudíž naznačila mírnou superioritu účinku kombinované aplikace.

7.2 Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

V této části práce jsme stanovili účinnost nových takrinových derivátů, vyvinutých jako multi-target-directed ligandy s potenciálem pro léčbu Alzheimerovy choroby: dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka označená 10w) a dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka S-K1035). Jmenované látky působí mimo jiné jako inhibitory acetylcholinesterázy. Prokázali jsme pozitivní efekt obou látek v modelu kognitivního deficitu na bázi cholinerní dysfunkce vyvolaném skopolaminem v úloze MWM u potkana.

7.3 Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory

Předmětem této části práce byly nové multipotentní takrinové deriváty působící jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory acetylcholinesterázy. Protože u antagonistů NMDA receptorů může hrozit riziko závažných psychotomimetických nežádoucích účinků, manifestovaných u potkana jako hyperlokomoce a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce, zaměřili jsme se na tyto behaviorální projevy. Po aplikaci studovaného 7-fenoxytakrinu jsme neprokázali přítomnost hyperlokomoce. Obdobně v případě série monotakrinových derivátů jsme neprokázali přítomnost hyperlokomoce ani deficitu prepulzní inhibice úlekové reakce. Tyto příznivé nálezy ukazují nízké riziko psychotomimetických účinků a opravňují zahájení preklinických testů účinnosti.

8 Summary

8.1 Experiment 1: Effects of MK-801, Midazolam and Co-application Thereof in the Trimethyltin-Induced Model of Neurodegeneration and Cognitive Deficit

In this study, we compared the effect of monotherapy and combined application of the NMDA receptor antagonist MK-801 and the positive GABA_A receptor modulator midazolam in the trimethyltin-induced rat model of cognitive deficit and hippocampal neurodegeneration. We demonstrated a beneficial effect of MK-801, midazolam, as well as co-application thereof, on cognition in the Morris water maze, without significant superiority of the combination therapy. Histological analysis performed at a later time point indicated a partial protective effect of the combination therapy against TMT-induced neurodegeneration in the CA2/3 in the dorsal hippocampus, while monotherapies were ineffective. Therefore, only histological analyses suggested superiority of the combination therapy.

8.2 Experiment 2: Effects of Multipotent Tacrine Derivatives Inhibiting Acetylcholinesterase in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit

In these experiments we investigated the effects of novel tacrine derivatives, multi-target-directed ligands developed as potential drugs for Alzheimer's disease: the 6-chlorotacrine – 6-nitrobenzothiazole hybrid (named 10w) and the 6-chlorotacrine – L-tryptophan hybrid (named S-K1035). These compounds act, among others, as acetylcholinesterase inhibitors. We proved their beneficial effect in Morris water maze in a rat model of cognitive deficit based on scopolamine-induced cholinergic dysfunction.

8.3 Experiment 3: Behavioral Effects of Tacrine Derivatives Acting as Acetylcholinesterase Inhibitors and NMDA Receptor Antagonists

In these experiments we investigated behavioral effects of novel multipotent tacrine derivatives acting as NMDA receptor antagonists and acetylcholinesterase inhibitors. NMDA receptor antagonists may possess serious psychotomimetic side effects. Here we demonstrated absence of hyperlocomotion after administration of 7-phenoxytacrine, and the absence of hyperlocomotion as well as of disruption of prepulse inhibition of acoustic startle response after administration of monotacrine derivatives named K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599. These findings indicate a low risk of psychotomimetic side effects and therefore justify the initiation of preclinical efficacy studies.

9 Použitá literatura

- Alves, L., Correia, A.S.A., Miguel, R., Alegria, P., Bugalho, P., 2012. Alzheimer's disease: A clinical practice-oriented review. *Front. Neurol.* 3, 63.
- Andiné, P., Widermark, N., Axelsson, R., Nyberg, G., Olofsson, U., Mårtensson, E., Sandberg, M., 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1393–1408.
- Aschner, M., Gannon, M., Kimelberg, H.K., 1992. Interactions of trimethyl tin (TMT) with rat primary astrocyte cultures: altered uptake and efflux of rubidium, l-glutamate and D-aspartate. *Brain Res.* 582, 181–185.
- Bahník, Š., 2014. Carousel Maze Manager (Version 0.4.0) [Software]. Available from https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_4_0.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (80-)*. 217, 408–417.
- Bast, T., Zhang, W., Feldon, J., White, I.M., 2000. Effects of MK801 and neuroleptics on prepulse inhibition: re-examination in two strains of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 647–658.
- Bejar, C., Wang, R.H., Weinstock, M., 1999. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *J. Pharmacol.* 383, 231–240.
- Benek, O., Korabecny, J., Soukup, O., 2020. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 434–445.
- Bolognesi, M.L., 2019. Harnessing Polypharmacology with Medicinal Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 273–275.
- Calhoun, A., King, C., Houry, R., Grossberg, G.T., 2018. An evaluation of memantine ER + donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 19, 1711–1717.
- Carriero, D.L., Outslay, G., Mayorga, A.J., Aberman, J., Gianutsos, G., Salamone, J.D., 1997. Motor dysfunction produced by tacrine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58, 851–858.
- Chalupova, K., Korabecny, J., Bartolini, M., Monti, B., Lamba, D., Caliandro, R., Pesaresi, A., Brazzolotto, X., Gastellier, A.J., Nachon, F., Pejchal, J., Jarosova, M., Hepnarova, V., Jun, D., Hrabanova, M., Dolezal, R., Zdarova Karasova, J., Mzik, M., Kristofikova, Z., Misik, J., Muckova, L., Jost, P., Soukup, O., Benkova, M., Setnicka, V., Habartova, L., Chvojikova, M., Kleteckova, L., Vales, K., Mezeiova, E., Uliassi, E., Valis, M., Nepovimova, E., Bolognesi, M.L., Kuca, K., 2019. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 168, 491–514.
- Chvojikova, M., Kubova, H., Vales, K., 2021. Effects of Dizocilpine, Midazolam and Their Co-Application on the Trimethyltin (TMT)-Induced Rat Model of Cognitive Deficit. *Brain Sci.* 11, 400.
- Corvino, V., Marchese, E., Michetti, F., Geloso, M.C., 2013. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. *Neurochem Res* 38, 240–253.
- Csernansky, J.G., Martin, M., Shah, R., Bertchume, A., Colvin, J., Dong, H., 2005. Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology* 30, 2135–2143.
- Curzon, P., Rustay, N., Browman, K., 2008. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents, in: Buccafusco, J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd Edition. CRC Press/Taylor & Francis, pp. 19–37.
- Depoortere, R., Perrault, G., Sanger, D.J., 1999. Prepulse inhibition of the startle reflex in rats: Effects of compounds acting at various sites on the NMDA receptor complex. *Behav. Pharmacol.* 10, 51–62.
- Dyer, R.S., Deshields, T.L., Wonderlin, W.F., 1982. Trimethyltin-induced changes in gross morphology of the hippocampus. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 141–147.
- Earley, B., Burke, M., Leonard, B.E., 1992. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem Int* 21, 351–366.
- Earley, B., Burke, M., Leonard, B.E., Gouret, C.J., Junien, J.L., 1990. A comparison of the psychopharmacological profiles of phencyclidine, ketamine and (+) SKF 10,047 in the trimethyltin rat model. *Neuropharmacology* 29, 695–703.
- Farlow, M., Veloso, F., Moline, M., Yardley, J., Brand-Schieber, E., Bibbiani, F., Zou, H., Hsu, T., Satlin, A., 2011. Safety and tolerability of donepezil 23 mg in moderate to severe Alzheimer's disease. *BMC Neurol.* 11, 57.
- Fraser, C.M., Cooke, M.J., Fisher, A., Thompson, I.D., Stone, T.W., 1996. Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 6, 311–316.
- Geloso, M.C., Corvino, V., Michetti, F., 2011. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochem Int* 58, 729–738.
- Gorecki, L., Misiachna, A., Damborsky, J., Dolezal, R., Korabecny, J., Cejkova, L., Hakenova, K., Chvojikova, M., Karasova, J., Prchal, L., Novak, M., Kolcheva, M., Kortus, S., Vales, K., Horak, M., Soukup, O., 2021. Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-d-aspartate receptors. *Eur. J. Med. Chem.* 219, 113434.
- Gunasekar, P., Li, L., Prabhakaran, K., Eybl, V., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2001. Mechanisms of the apoptotic and

- necrotic actions of trimethyltin in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 64, 83–89.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hoffman, H.S., Searle, J.L., 1965. Acoustic variables in the modification of startle reaction in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 60, 53–58.
- Hunter, A.J., Murray, T.K., Jones, J.A., Cross, A.J., Green, A.R., 1989. The cholinergic pharmacology of tetrahydroaminoacridine in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 98, 79–86.
- Jackson, J.J., Soliman, M.R.I., 1995. Effects of tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. *Life Sci.* 58, 47–54.
- Kalová, E., Vlček, K., Jarolímová, E., Bureš, J., 2005. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: Corresponding results in real space tests and computer tests. *Behav. Brain Res.* 159, 175–186.
- Kaniakova, M., Kleteckova, L., Lichnerova, K., Holubova, K., Skrenkova, K., Korinek, M., Krusek, J., Smejkalova, T., Korabecny, J., Vales, K., Soukup, O., Horak, M., 2018. 7-Methoxyderivative of tacrine is a “foot-in-the-door” open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* 140, 217–232.
- Kaniakova, M., Korabecny, J., Holubova, K., Kleteckova, L., Chvojikova, M., Hakenova, K., Prchal, L., Novak, M., Dolezal, R., Hepnarova, V., Svobodova, B., Kucera, T., Lichnerova, K., Krausova, B., Horak, M., Vales, K., Soukup, O., 2021. 7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 186, 114460.
- Koczyk, D., 1996. How does trimethyltin affect the brain: Facts and hypotheses. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*.
- Kršek, P., Mikulecká, A., Druga, R., Kubová, H., Hlíňák, Z., Suchomelová, L., Mareš, P., 2004. Long-term behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 5, 180–191.
- Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers M. B., J., Charney, D.S., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51, 199–214.
- Laczó, J., Markova, H., Lobellova, V., Gazova, I., Parizkova, M., Cerman, J., Nekovarova, T., Vales, K., Klovzova, S., Harrison, J., Windisch, M., Vlcek, K., Svoboda, J., Hort, J., Stuchlik, A., 2017. Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 234, 535–547.
- Liston, D.R., Nielsen, J.A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S.B., Hubbard, S.T., Shalaby, I.A., Ramirez, A., Nason, D., White, W.F., 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: Implications for use in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 486, 9–17.
- Liu, J.Y., Guo, F., Wu, H.L., Wang, Y., Liu, J.S., 2017. Midazolam anesthesia protects neuronal cells from oxidative stress-induced death via activation of the JNK-ERK pathway. *Mol. Med. Rep.* 15, 169–179.
- Lyden, P.D., Lonzo, L., 1994. Combination Therapy Protects Ischemic Brain in Rats: A glutamate antagonist plus a γ -Aminobutyric acid agonist. *Stroke* 25, 189–195.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Mudher, A., Lovestone, S., 2002. Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.*
- Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503–513.
- Nava-Mesa, M.O., Jiménez-Díaz, L., Yajeya, J., Navarro-Lopez, J.D., 2014. GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 167.
- Nepovimova, E., Svobodova, L., Dolezal, R., Hepnarova, V., Junova, L., Jun, D., Korabecny, J., Kucera, T., Gazova, Z., Motykova, K., Kubackova, J., Bednarikova, Z., Janockova, J., Jesus, C., Cortes, L., Pina, J., Rostohar, D., Serpa, C., Soukup, O., Aitken, L., Hughes, R.E., Musilek, K., Muckova, L., Jost, P., Chvojikova, M., Vales, K., Valis, M., Chrienova, Z., Chalupova, K., Kuca, K., 2021. Tacrine – Benzothiazoles: Novel class of potential multitarget anti-Alzheimer's drugs dealing with cholinergic, amyloid and mitochondrial systems. *Bioorg. Chem.* 107, 104596.
- O'Connell, A., Earley, B., Leonard, B.E., 1994. Effects of the GABA agonist THIP (gaboxadol) on trimethyltin-induced behavioural neurotoxicity in the rat. *Med. Sci. Res.* 22, 201–202.
- Parsons, C.G., Danysz, W., Dekundy, A., Pulte, I., 2013. Memantine and cholinesterase inhibitors: Complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* 24, 358–369.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th editio. ed. Academic Press, London, United Kingdom.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000. Fluoro-Jade B: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal

- degeneration. *Brain Res.* 874, 123–130.
- Shibuta, S., Varathan, S., Mashimo, T., 2006. Ketamine and thiopental sodium: individual and combined neuroprotective effects on cortical cultures exposed to NMDA or nitric oxide. *Br J Anaesth* 97, 517–524.
- Shuto, M., Seko, K., Kuramoto, N., Sugiyama, C., Kawada, K., Yoneyama, M., Nagashima, R., Ogita, K., 2009. Activation of c-Jun N-terminal kinase cascades is involved in part of the neuronal degeneration induced by trimethyltin in cortical neurons of mice. *J Pharmacol Sci* 109, 60–70.
- von Linstow Roloff, E., Harbaran, D., Micheau, J., Platt, B., Riedel, G., 2007. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience* 146, 875–889.
- Whittington, D.L., Woodruff, M.L., Baisden, R.H., 1989. The time-course of trimethyltin-induced fiber and terminal degeneration in hippocampus. *Neurotoxicol Teratol* 11, 21–33.
- Wiley, J.L., Cristello, A.F., Balster, R.L., 1995. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 101–107.
- Yoshida, S., Suzuki, N., 1993. Antiamnesic and cholinomimetic side-effects of the cholinesterase inhibitors, physostigmine, tacrine and NIK-247 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 250, 117–124.
- Zimmer, L., Woolley, D., Chang, L., 1985. Does phenobarbital protect against trimethyltin-induced neuropathology of limbic structures? *Life Sci* 36, 851–858.

10 Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace (s impakt faktorem):

Chvojkova, M., Kubova, H., Vales, K., 2021. Effects of Dizocilpine, Midazolam and Their Co-Application on the Trimethyltin (TMT)-Induced Rat Model of Cognitive Deficit. *Brain Sciences*. 11, 400. **IF₂₀₂₀ = 3,394**.

Nepovimova, E., Svobodova, L., Dolezal, R., Hepnarova, V., Junova, L., Jun, D., Korabecny, J., Kucera, T., Gazova, Z., Motykova, K., Kubackova, J., Bednarikova, Z., Janockova, J., Jesus, C., Cortes, L., Pina, J., Rostohar, D., Serpa, C., Soukup, O., Aitken, L., Hughes, R.E., Musilek, K., Muckova, L., Jost, P., **Chvojkova, M.**, Vales, K., Valis, M., Chrienova, Z., Chalupova, K., Kuca, K., 2021. Tacrine – Benzothiazoles: Novel class of potential multitarget anti-Alzheimer's drugs dealing with cholinergic, amyloid and mitochondrial systems. *Bioorganic Chemistry*. 107, 104596. **IF₂₀₂₀ = 5,275**.

Chalupova, K., Korabecny, J., Bartolini, M., Monti, B., Lamba, D., Caliandro, R., Pesaresi, A., Brazzolotto, X., Gastellier, A.J., Nachon, F., Pejchal, J., Jarosova, M., Hepnarova, V., Jun, D., Hrabinoval, M., Dolezal, R., Zdarova Karasova, J., Mzik, M., Kristofikova, Z., Misik, J., Muckova, L., Jost, P., Soukup, O., Benkova, M., Setnicka, V., Habartova, L., **Chvojkova, M.**, Kleteckova, L., Vales, K., Mezeiova, E., Uliassi, E., Valis, M., Nepovimova, E., Bolognesi, M.L., Kuca, K., 2019. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 168, 491–514. **IF₂₀₁₉ = 5,573**.

Kaniakova, M., Korabecny, J., Holubova, K., Kleteckova, L., **Chvojkova, M.**, Hakenova, K., Prchal, L., Novak, M., Dolezal, R., Hepnarova, V., Svobodova, B., Kucera, T., Lichnerova, K., Krausova, B., Horak, M., Vales, K., Soukup, O., 2021. 7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 186, 114460. **IF₂₀₂₀ = 5,858**.

Gorecki, L., Misiachna, A., Damborsky, J., Dolezal, R., Korabecny, J., Cejkova, L., Hakenova, K., **Chvojkova, M.**, Karasova, J., Prchal, L., Novak, M., Kolcheva, M., Kortus, S., Vales, K., Horak, M., Soukup, O., 2021. Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-D-aspartate receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 219, 113434. **IF₂₀₂₀ = 6,514**.

Původní vědecké práce s impakt faktorem, které nejsou podkladem disertační práce:

Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B., Balik, A., Korinek, M., Borovska, J., Horak, M., **Chvojkova, M.**, Kleteckova, L., Vales, K., Cerny, J., Nekardova, M., Chodounska, H., Kudova, E., Vyklicky, L., 2016. Preferential inhibition of tonically over phasically activated NMDA receptors by pregnane derivatives. *Journal of Neuroscience*. 36, 2161–2175. **IF₂₀₁₆ = 5,988**.

Chvojkova, M., Rambousek, L., Chodounska, H., Kudova, E., Vales, K., 2020. Synthetic structural modifications of neurosteroid pregnanolone sulfate: Assessment of neuroprotective effects in vivo. *European Journal of Pharmacology*. 881, 173187. **IF₂₀₂₀ = 4,432**.

Holubova, K., **Chvojkova, M.**, Krausova, B.H., Vyklicky, V., Kudova, E., Chodounska, H., Vyklicky, L., Vales, K., 2021. Pitfalls of NMDA Receptor Modulation by Neuroactive Steroids. The Effect of Positive and Negative Modulation of NMDA Receptors in an Animal Model of Schizophrenia. *Biomolecules*. 11, 1026. **IF₂₀₂₀ = 4,879**.

Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních:

Valeš K., Holubová K., Nekovářová T., **Chvojková M.**, Pistovčáková J., Stuchlík A. Antidepressant Properties of 3 α C Substituted Derivatives of Pregnanolone, Novel Use-dependent NMDA Antagonists [poster]. 15th Biennial Meeting of the European Behavioural Pharmacology Society, La Rochelle, France, 6.–9. 9. 2013.

Chvojková M., Trimethylcínem vyvolaný model neurodegenerace jako nástroj pro testování neuroprotektiv [přednáška]. Vědecká konference 2. LF UK, 20.–21. 4. 2016.

Chvojková M., Kletečková L., Stuchlík A., Lobellová V., Soukup O., Korábečný J., Valeš K., Comparison of effects of intrahippocampally and intraperitoneally applied acetylcholinesterase inhibitor tacrine on scopolamine-induced memory deficit in rat [poster]. The 11th Conference of the Czech Neuroscience Society, Praha, 28.–29. 11. 2017.

Valeš K., **Chvojková M.**, Hakenová K., Holubová K., Pitfalls of NMDA Receptor Modulation by Neuroactive Steroids [poster]. Biennial Meeting of the European Behavioural Pharmacology Society, Braga, Portugal, 28.–31. 8. 2019.

Chvojková M., Rambousek L., Chodounská H., Kudová E., Valeš K., Neuroprotective effects of synthetic structural modifications of neurosteroid pregnanolone sulfate: Structure-activity relationship [poster]. The 12th Conference of the Czech Neuroscience Society, Praha, 26.–27. 11. 2019.

