

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Neurovědy



**Mgr. Markéta Chvojková**

Účinky multipotentních sloučenin ovlivňujících neurotransmisi  
ve farmakologických animálních modelech kognitivního deficitu

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

Disertační práce

Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 9. 2021

Markéta CHVOJKOVÁ

**Poděkování:**

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D. Mé poděkování patří i doc. PharmDr. Haně Kubové, DrSc. a paní Blance Čejkové z oddělení Vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR za cenné metodické rady a konzultace. Za provedení stereotaktických operací v rámci Experimentu 2B děkuji kolegyni Mgr. Lence Kletečkové, Ph.D.

## 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  $\gamma$ -aminomáselnou typu A (GABA<sub>A</sub>) 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.

Klíčová slova: Alzheimerova nemoc, animální modely, antagonisté NMDA receptorů, behaviorální farmakologie, demence, inhibitory acetylcholinesterázy, kognitivní deficit, kombinovaná terapie, multipotentní sloučeniny, multi-target-directed ligandy, takrin.

## 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  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) 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.

Key words: acetylcholinesterase inhibitor, Alzheimer's disease, animal models, behavioral pharmacology, dementia, cognitive deficit, combination therapy, multipotent compounds, multi-target-directed ligands, NMDA receptor antagonist, tacrine.

## SEZNAM ZKRATEK

ABAD	alkoholdehydrogenáza vázající amyloid beta (z angl. amyloid beta-binding alcohol dehydrogenase)
AD	Alzheimerova nemoc (z angl. Alzheimer's disease)
AChE	acetylcholinesteráza
ANOVA	analýza rozptylu
APP	amyloidový prekurzorový protein
BChE	butyrylcholinesteráza
CA1	<i>cornu Ammonis</i> 1 (hipokampální oblast)
CA2/3	<i>cornu Ammonis</i> 2 a 3 (hipokampální oblast)
CA3	<i>cornu Ammonis</i> 3 (hipokampální oblast)
CNS	centrální nervový systém
DMSO	dimethylsulfoxid
FYZ	fyzilogický roztok (označení experimentální skupiny zvířat)
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GABA <sub>A</sub> receptor	receptor typu A pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou
GABA <sub>B</sub> receptor	receptor typu B pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (z angl. glial fibrillary acidic protein)
GluN2A	podjednotka NMDA receptoru – typ A
GluN2B	podjednotka NMDA receptoru – typ B
<i>i. c. v.</i>	intracerebroventrikulární
IC <sub>50</sub>	koncentrace testovaného inhibitoru potřebná k inhibici daného biologického procesu o 50 %
<i>i. p.</i>	intraperitoneální
MK-801	dizocilpin
MTDL	multi-target-directed ligand
MWM	Morrisovo vodní bludiště (z angl. Morris water maze)
NMDA receptor	N-methyl-D-aspartátový receptor
nNOS	neuronální forma NO syntázy
PBS	fosfátový pufr obohacený o soli (z angl. phosphate-buffered saline)
SEM	střední chyba průměru
SKOP	skopolamin (označení experimentální skupiny zvířat)
S-K1035	dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu spojený šestičlenným uhlíkovým řetězcem (označení dle (Chalupova et al., 2019))
TMT	trimethylcín
10w	dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu spojený tříčlenným uhlíkovým řetězcem (označení dle (Nepovimova et al., 2021))

# OBSAH

<b>1</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>12</b>
1.1	Demence	12
1.2	Alzheimerova nemoc	12
1.2.1	Cholinergní hypotéza	13
1.2.2	Amyloidní hypotéza	15
1.2.3	Tau hypotéza	17
1.2.4	Role NMDA receptorů a glutamatergního systému	17
1.3	Farmakoterapie Alzheimerovy nemoci	18
1.3.1	Inhibitory acetylcholinesterázy	19
1.3.2	Antagonisté NMDA receptorů	20
1.3.3	Další přístupy ve vývoji farmak pro léčbu Alzheimerovy nemoci	21
1.3.3.1	Modulace GABAergního systému	22
1.4	Polyfarmakologie	23
1.5	Kombinovaná terapie	24
1.5.1	Kombinovaná terapie inhibitory acetylcholinesterázy a antagonisty NMDA receptorů v klinické praxi	24
1.5.2	Kombinovaná terapie antagonisty NMDA receptorů a pozitivními modulátory GABA <sub>A</sub> receptorů v preklinických studiích	25
1.6	Multipotentní sloučeniny	26
1.6.1	Monotakrinové deriváty inhibující acetylcholinesterázu a NMDA receptory	27
1.6.1.1	Biologické vlastnosti modelové molekuly 7-fenoxytakrin	28
1.6.1.2	Biologické vlastnosti modelové série monotakrinových derivátů	28
1.6.2	Multipotentní takrinové heterodimery	30
1.6.2.1	Dimery takrinu a benzothiazolu a biologické vlastnosti modelové molekuly 10w	30
1.6.2.2	Dimery takrinu a L-tryptofanu a biologické vlastnosti modelové molekuly S-K1035	31
1.7	Animální modely Alzheimerovy nemoci a asociovaného kognitivního deficitu	32
1.7.1	Model kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace indukovaný trimethylcínem u potkana	33
1.7.2	Model kognitivního deficitu a cholinergní dysfunkce indukovaný skopolaminem u potkana	34
1.8	Vybrané behaviorální úlohy	36
1.8.1	Morrisovo vodní bludiště	36
1.8.2	Další behaviorální úlohy	36

<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY .....</b>	<b>38</b>
2.1	Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem.....	38
2.1.1	Hypotéza.....	38
2.1.2	Cíle práce.....	39
2.2	Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	39
2.2.1	Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	40
2.2.1.1	Hypotéza.....	40
2.2.1.2	Cíle práce.....	40
2.2.2	Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	40
2.2.2.1	Hypotéza.....	40
2.2.2.2	Cíle práce.....	40
2.3	Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory.....	40
2.3.1	Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu .....	41
2.3.1.1	Hypotéza.....	41
2.3.1.2	Cíle práce.....	41
2.3.2	Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů .....	41
2.3.2.1	Hypotéza.....	41
2.3.2.2	Cíle práce.....	41
<b>3</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>42</b>
3.1	Obecné metodické přístupy .....	42
3.1.1	Zvířata.....	42
3.1.2	Morrisovo vodní bludiště: aparatura, základní postup a parametry .....	42
3.1.3	Statistické vyhodnocení .....	43
3.2	Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem.....	43
3.2.1	Zvířata, aplikace látek a design experimentu .....	43
3.2.2	Morrisovo vodní bludiště: postup a parametry.....	44
3.2.3	Test otevřeného pole.....	45
3.2.4	Kontextuální strachové podmiňování.....	45
3.2.5	Odběr tkáně pro histologii .....	46
3.2.6	Imunohistochemické značení neuronů pro stereologickou analýzu .....	47
3.2.7	Nisslovo barvení.....	48
3.2.8	Histochemické barvení Fluoro Jade B.....	48
3.2.9	Dvojití barvení Fluoro-Jade B a GFAP .....	48



3.2.10	Stereologický odhad neuronální denzity v oblasti CA2/3 ve vybrané části dorzálního hipokampu.....	49
3.2.11	Morfometrie vybrané části dorzálního hipokampu .....	50
3.2.11.1	Velikost plochy gyru dentatu .....	51
3.2.11.2	Délka linie pyramidálních buněk .....	51
3.2.11.3	Výška hipokampu, CA1 a gyru dentatu .....	51
3.2.12	Statistické vyhodnocení .....	52
3.3	Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem .....	53
3.3.1	Zvířata.....	53
3.3.2	Orientační stanovení maximální tolerované dávky .....	53
3.3.3	Morrisovo vodní bludiště .....	53
3.3.3.1	Experimentální skupiny a aplikace látek.....	53
3.3.3.2	Morrisovo vodní bludiště: postup a vyhodnocení.....	54
3.4	Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem .....	54
3.4.1	Zvířata, operace .....	54
3.4.2	Experimentální skupiny a aplikace látek .....	55
3.4.3	Morrisovo vodní bludiště: postup a analýza.....	55
3.5	Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu .....	56
3.5.1	Zvířata, experimentální skupiny a aplikace látek .....	56
3.5.2	Test otevřeného pole.....	56
3.5.3	Vyvýšené křížové bludiště.....	56
3.5.4	Statistické vyhodnocení .....	57
3.6	Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů.....	57
3.6.1	Zvířata, experimentální skupiny a aplikace látek .....	57
3.6.2	Test otevřeného pole.....	57
3.6.3	Prepulzní inhibice úlekové reakce .....	58
3.6.4	Statistické vyhodnocení .....	58
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>60</b>
4.1	Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem.....	60
4.1.1	Morrisovo vodní bludiště .....	60
4.1.2	Kontextuální strachové podmiňování.....	63
4.1.3	Test otevřeného pole.....	64
4.1.4	Stereologický odhad neuronální denzity v oblasti CA2/3 ve vybrané části dorzálního hipokampu.....	64
4.1.5	Morfometrie dorzálního hipokampu.....	66
4.1.5.1	Velikost plochy gyru dentatu .....	66

4.1.5.2	Délka linie pyramidálních buněk .....	67
4.1.5.3	Výška hipokampu, CA1 a gyru dentatu .....	67
4.1.6	Histochemické barvení Fluoro-Jade B .....	68
4.2	Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem .....	70
4.2.1	Orientační stanovení maximální tolerované dávky .....	70
4.2.2	Morrisovo vodní bludiště .....	70
4.3	Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem .....	72
4.4	Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu .....	75
4.4.1	Test otevřeného pole.....	75
4.4.2	Vyvýšené křížové bludiště.....	76
4.5	Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů.....	78
4.5.1	Test otevřeného pole.....	78
4.5.2	Prepulzní inhibice úlekové reakce.....	78
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>80</b>
5.1	Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem.....	80
5.1.1	Behaviorální analýza: pozitivní vliv kombinované aplikace i monoterapií ..	81
5.1.2	Histologická analýza: pozitivní vliv kombinované aplikace.....	82
5.1.3	Celkový efekt testovaných látek v TMT modelu a možné mechanismy účinku 83	
5.1.4	Výsledky barvení Fluoro-Jade B .....	85
5.2	Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	88
5.2.1	Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	88
5.2.2	Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	91
5.3	Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory.....	94
5.3.1	Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu .....	94
5.3.2	Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů .....	97
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>SHRNUTÍ.....</b>	<b>102</b>
7.1	Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem.....	102
7.2	Experiment 2: Účinek multipotentních takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	102

7.2.1	Experiment 2A: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	102
7.2.2	Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem.....	103
7.3	Experiment 3: Behaviorální účinky takrinových derivátů inhibujících acetylcholinesterázu a NMDA receptory.....	103
7.3.1	Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu .....	103
7.3.2	Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů .....	103
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>104</b>
8.1	Experiment 1: Effects of MK-801, Midazolam and Co-application Thereof in the Trimethyltin-Induced Model of Neurodegeneration and Cognitive Deficit.....	104
8.2	Experiment 2: Effects of Multipotent Tacrine Derivatives Inhibiting Acetylcholinesterase in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit .....	104
8.2.1	Experiment 2A: Effect of 6-Chlorotacrine–6-Nitrobenzothiazole Hybrid in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit .....	104
8.2.2	Experiment 2B: Effect of 6-Chlorotacrine – L-Tryptophan Hybrid in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit .....	105
8.3	Experiment 3: Behavioral Effects of Tacrine Derivatives Acting as Acetylcholinesterase Inhibitors and NMDA Receptor Antagonists .....	105
8.3.1	Experiment 3A: Behavioral Effects of 7-Phenoxytacrine .....	105
8.3.2	Experiment 3B: Behavioral Effects of a Novel Series of Monotacrine Derivatives .....	105
<b>9</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ.....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>132</b>

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Demence

Demence je souhrnný název pro skupinu organických psychických poruch charakterizovaných narušením kognitivních funkcí. Projevuje se narušením paměti doprovázeným některými dalšími kognitivními poruchami: afázií, apraxií, agnózií nebo narušením exekutivních funkcí (Wetherell and Jeste, 2003). Progresivní kognitivní deficit má zásadní vliv na kvalitu života pacientů, kteří se postupně stávají závislými na péči okolí, což představuje značnou zátěž pro zdravotnictví i rodiny pacientů. Přes enormní pozornost věnovanou výzkumu těchto onemocnění jsou znalosti v oblastech etiopatogeneze, včasné diagnostiky, prevence a terapie stále omezené. Vzhledem k nárůstu prevalence demencí s věkem a stárnutí populace tak tato onemocnění představují stále závažnější celosvětový socioekonomický problém (Cunningham et al., 2015; Holmes and Amin, 2020). Nejčastější příčinou demence je Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease, AD), následovaná vaskulární demencí, demencí s Lewyho tělísky a frontotemporální demencí. Většina těchto onemocnění je asociována s patologickou agregací proteinů (Cunningham et al., 2015). V této práci bude věnována pozornost AD, a to její častější sporadické formě.

## 1.2 Alzheimerova nemoc

AD je charakterizována progresivní neurodegenerací a ztrátou kognitivních funkcí. Existují dvě formy AD: familiární a sporadická. Familiární forma vzniká v důsledku autozomálně dominantní mutace genů pro amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin 1 či presenilin 2 a často se manifestuje i v mladších věkových skupinách (pod 65 let). Převážnou většinu (přibližně 95 %) případů AD však tvoří forma sporadická, která má stejné klinické projevy, ale nastupuje spíše ve vyšším věku (nad 65 let) a její vznik je podstatně méně objasněn; pravděpodobně k němu přispívá více environmentálních a genetických faktorů (vč. nositelství alely epsilon 4 pro apolipoprotein E) (Liu et al., 2019; Piaceri et al., 2013).

Projevům AD předchází dlouhá preklinická fáze. U symptomatické choroby se rozlišuje lehké, střední a těžké stadium AD. Nástup příznaků je většinou plíživý. V lehkém stadiu bývá nejvýraznějším příznakem narušení krátkodobé paměti, případně i exekutivních funkcí a občasná prostorová nebo časová dezorientace, obtížná formulace vět. Z behaviorálních symptomů může být přítomna apatie nebo depresivní příznaky. Ve středním stadiu se pokles kognitivních funkcí prohlubuje. Narušení exekutivních funkcí, snížená schopnost

zapamatování nového a dezorientace i ve známém prostředí omezují zvládání každodenních činností. Behaviorální symptomy mohou zahrnovat halucinace, bludy, agitovanost, narušení cyklu spánku a bdění. Těžké stadium doprovází ztráta téměř všech kognitivních funkcí, omezení řeči, inkontinence a celkové chřadnutí a mnohdy upoutání na lůžko. Pacient se stává zcela závislým na péči okolí (Tarawneh and Holtzman, 2012).

Diagnostika je v praxi založena především na klinické evaluaci kognitivních funkcí pomocí standardizovaných testů. Pozitivní výsledek spolu s dalšími kritérii (progresivní průběh, vyšší věk) vede k diagnóze pravděpodobné AD. Definitivní diagnózu potvrdí až případný histopatologický nález amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek (tangles) tvořených hyperfosforylovaným tau proteinem v limbických strukturách a kůře (Alves et al., 2012; Hyman and Trojanowski, 1997; Tarawneh and Holtzman, 2012). Neuritické plaky byly popsány roku 1907 Aloisem Alzheimerem (Stelzmann et al., 1995) a nezávisle i Oskarem Fischerem (Goedert, 2009) a je jim přisuzována zásadní role v patofyziologii AD (Alves et al., 2012). Vedle toho byly navrženy další hypotézy vzniku sporadické AD (Liu et al., 2019). Dle současných poznatků je sporadická AD komplexním onemocněním nejasné etiologie, při kterém dochází k více patologickým procesům, které spolu navzájem interagují.

V průběhu AD dochází k synaptické dysfunkci, snížení synaptické denzity (Terry et al., 1991) i počtu neuronů v mozkové kůře a hipokampu (Andrade-Moraes et al., 2013). V důsledku toho byla na makroskopické úrovni u pacientů s AD popsána atrofie hipokampu (Peng et al., 2015; Schuff et al., 2009) a mozkové kůry (Lerch et al., 2005). Snížení počtu synapsí, (Terry et al., 1991) neuronů (Andrade-Moraes et al., 2013) i objemu hipokampu (Peng et al., 2015) přitom koreluje se závažností demence.

### **1.2.1 Cholinerní hypotéza**

Neurotransmitter acetylcholin je syntetizován cholin acetyltransferázou v nervových zakončeních cholinerních neuronů, transportován do váčků a po výlevu do synaptické štěrbině vykonává své neuromodulační účinky v centrálním nervovém systému (CNS) prostřednictvím metabotropních muskarinových (M1–M5 subtyp) a ionotropních nikotinových cholinerních receptorů. Synaptický přenos je ukončen hydrolýzou acetylcholinu cholinesterázami: acetylcholinesterázou (AChE), případně butyrylcholinesterázou (BChE). Hlavním zdrojem cholinerní inervace je bazální přední mozek. Cholinerní inervace kůry je zajištěna neurony projikujícími z bazálního Meynertova jádra, zatímco cholinerní inervace hipokampu vychází především

z mediálního septálního jádra a Brocova diagonálního svazku (Mesulam, 2004). Acetylcholin v hipokampu a kůře moduluje synaptickou plasticitu a tedy i procesy učení a paměti (Fadda et al., 2000; Flicker et al., 1983; Shinoe et al., 2005). V kůře se acetylcholin též účastní regulace pozornosti (Liu et al., 2018). Vedle svých neuromodulačních účinků v CNS působí acetylcholin na periferii jako neurotransmitter v somatomotorickém a parasympatickém autonomním nervovém systému (Soukup et al., 2016).

Cholinergní hypotéza vzniku sporadické AD byla navržena v roce 1976 na základě neurochemické studie ukazující pokles cholinergních markerů cholin acetyltransferázy a AChE v hipokampu, kůře a amygdale pacientů s AD (Davies and Maloney, 1976). Dále bylo prokázáno, že farmakologická disrupce cholinergního systému může u zdravých subjektů vyvolat přechodný kognitivní deficit, a naopak kognitivní deficit přítomný ve stáří může být někdy zmírněn podáním látek s cholinomimetickým účinkem. Tyto poznatky poukázaly na význam dysfunkce cholinergního systému při rozvoji příznaků AD (Bartus et al., 1982). U pacientů s AD dochází k významné selektivní degeneraci cholinergních neuronů v bazálním Meynertově jádře (Whitehouse et al., 1982) a následné redukci cholinergní inervace kůry, přičemž zejména v temporální kůře může ztráta cholinergních axonů dosáhnout i 85 % (Geula and Mesulam, 1996). Denzita cholinergních terminál je snížena i v hipokampu (Mesulam et al., 2002). Narušení cholinergní neurotransmise v jednotlivých strukturách různou měrou přispívá ke kognitivnímu deficitu v doménách paměti, pozornosti a grafomotoriky a k některým behaviorálním příznakům AD (Minger et al., 2000; Pappas et al., 2000). Porušení integrity cholinergních struktur bazálního předního mozku byla prokázáno již u pacientů s mírnou kognitivní poruchou, která rozvoji AD často předchází (Grothe et al., 2010).

V průběhu AD doznává změn i exprese a funkce cholinesteráz. Za normálních okolností představuje AChE enzym primárně zodpovědný za hydrolýzu acetylcholinu (Hartmann et al., 2007), přítomný presynapticky na axonech cholinergních neuronů a postsynapticky na tělech cholinocceptivních neuronů zejména v kůře a hipokampu (Mesulam et al., 2002). BChE je rovněž přítomna v těchto cholinergně inervovaných strukturách, ale za fyziologických podmínek je v porovnání s AChE méně abundantní a pravděpodobně se nalézá i na gliových buňkách (Mesulam et al., 2002). Fyziologická role BChE je méně objasněná. BChE může hydrolyzovat acetylcholin a pravděpodobně převzít roli AChE zejména v situacích, kdy je tato depletována (Hartmann et al., 2007; Mesulam et al., 2002). K tomu by mohlo docházet i za patologických podmínek v případě AD (Wu et al., 2017),

jelikož u pacientů s AD bylo popsáno snížení aktivity AChE v hipokampu a kůře (Ciro et al., 2012; Perry et al., 1978), zatímco aktivita BChE tamtéž je nezměněna či mírně zvýšena (Ciro et al., 2012; Perry et al., 1978).

Pozdější formulace dalších hypotéz vzniku AD, zejména v současné době uznávané amyloidní hypotézy, vedla k přehodnocení role cholinergní dysfunkce v patofyziologii AD. V současné době již není cholinergní dysfunkce považována za primární patogenetický faktor, ale spíše za důsledek působení amyloidu; přesto však hraje významnou roli a nezanedbatelnou měrou přispívá ke kognitivnímu deficitu (Mesulam, 2004). U pacientů s AD byla v cholinergních neuronech bazálního předního mozku prokázána kumulace oligomerů amyloidu beta (Baker-Nigh et al., 2015) a dle výsledků preklinických studií by právě amyloid mohl být příčinou narušení cholinergní neurotransmise a degenerace cholinergních neuronů u AD (Kelly et al., 1996; Nyakas et al., 2011). Výsledky experimentů *in vitro* zároveň naznačují, že aktivace cholinergních receptorů může chránit neurony před toxickými účinky amyloidu beta (Gu et al., 2003; Kihara et al., 1997), omezovat jeho vznik (Nitsch et al., 1992) a snižovat fosforylaci tau (Sadot et al., 1996). Lze se proto domnívat, že dysfunkce cholinergního systému vzniklá v důsledku působení amyloidu může nadále přispívat k prohlubování patologií spojených s amyloidem beta a tau proteinem.

Další zajímavou interakcí cholinergního systému a amyloidních patologií u AD je urychlení agregace amyloidu beta působením AChE. AChE je v mozcích pacientů trpících AD kolokalizována s amyloidními plaky a neurofibrilárními klubky (Carson et al., 1991) a může prostřednictvím svého periferního anionického místa interagovat s amyloidem beta, navodit jeho konformační změnu (Inestrosa et al., 1996) a tím urychlovat agregaci amyloidu (Bartolini et al., 2003; Inestrosa et al., 1996). Toxické účinky komplexů AChE s amyloidem beta přitom převyšují toxicitu fibrilárního amyloidu beta (Reyes et al., 2004). Rovněž i BChE je kolokalizována s amyloidními plaky a mohla by se podílet na jejich vzniku (Mesulam and Geula, 1994; Reid and Darvesh, 2015).

### **1.2.2 Amyloidní hypotéza**

APP je transmembránový protein, jehož štěpení beta a gama sekretázou, probíhající při AD ve zvýšené míře, vede ke vzniku amyloidu beta, peptidu o délce 39–43 aminokyselin. Nejčastější izoformou je amyloid beta 1–40, následovaný amyloidem beta 1–42, vyznačujícím se snadnější polymerizací a vyšší toxicitou. Amyloid beta může následně

agregovat za vzniku nerozpustných fibrilárních, nebo rozpustných oligomerních forem (Alves et al., 2012; Liu et al., 2019; Wu et al., 2017).

Amyloidní hypotéza AD byla navržena v roce 1991 v důsledku objevu mutace genu pro APP na chromozomu 21 v případě familiární AD. To vedlo autory k domněnce, že právě narušení metabolismu APP a následné hromadění a agregace amyloidu beta a vznik plaků, složených z vláken amyloidu obklopených narušenými neuronálními výběžky a aktivovanými gliovými buňkami, jsou klíčovými faktory v patofyziologii obou forem AD. Další patologické procesy jako vznik neurofibrilárních klubek a neurodegenerace jsou dle této hypotézy následkem těchto jevů (Hardy and Allsop, 1991).

Klíčová role byla zpočátku přisuzována fibrilární formě amyloidu beta tvořící plaky (Lorenzo and Yankner, 1994; J. Wang et al., 1999), avšak kvantita plaků vykazuje pouze slabou korelaci se závažností demence (Terry et al., 1991) a amyloidní plaky mohou být přítomny i v mozcích osob vysokého věku bez klinických příznaků narušení kognitivních funkcí (Balasubramanian et al., 2012). Později se pozornost přesunula i k oligomerním formám amyloidu. Lokální aplikace oligomerů amyloidu laboratorním hlodavcům vyvolává kognitivní deficit a neurotoxické účinky (Brouillette et al., 2012; Shankar et al., 2008) a oligomery mohou způsobovat synaptickou dysfunkci a narušit paměť interferencí s procesem dlouhodobé potenciace, který je jejím podkladem (Shankar et al., 2008). Neurotoxické účinky amyloidu beta jsou pravděpodobně zprostředkovány různými mechanismy: mitochondriální dysfunkcí, oxidačním stresem, zvýšením permeability membrán, zánětem, synaptickou dysfunkcí a excitotoxicitou (Carrillo-Mora et al., 2014). Amyloid beta může být mimo jiné internalizován do buněk a importován do mitochondrií (Hansson Petersen et al., 2008), kde interaguje s enzymem alkoholdehydrogenázou vázající amyloid beta (amyloid beta-binding alcohol dehydrogenase; ABAD), což prostřednictvím následného úniku volných radikálů a mitochondriální dysfunkce přispívá k degeneraci neuronů (Lustbader et al., 2004).

Pravděpodobná klíčová role amyloidu beta v etiologii sporadické AD je široce přijímána odbornou veřejností a rozhodujícím způsobem ovlivnila směřování výzkumu (použití genetických animálních modelů založených na manipulaci exprese APP nebo sekretáz rezultující v tvorbu amyloidních plaků, výzkum terapeutických intervencí umožňujících omezení tvorby nebo agregace amyloidu beta, nebo zvýšení jeho odbourávání). Přímý důkaz klíčové kauzální role amyloidu však dosud podán nebyl.



### 1.2.3 Tau hypotéza

Dle tau hypotézy je rozhodujícím faktorem vzniku AD aberantní fosforylace a agregace proteinu tau, který za fyziologických podmínek stabilizuje mikrotubuly. Při AD dochází k jeho hyperfosforylaci, disociaci od mikrotubulů a agregaci za vzniku neurofibrilárních klubek, což má za následek depolymerizaci mikrotubulů, kolaps axonálního transportu a neurotransmise a degeneraci neuronu (Liu et al., 2019). Výskyt neurofibrilárních klubek má typickou časoprostorovou dynamiku: zpočátku je omezen na transentorinální oblast, později se klubka nalézají i v limbických strukturách a nakonec i v kůře (Braak and Braak, 1991), přičemž tato stadia odrážejí stupeň demence (Nagy et al., 1999). Agregáty tau proteinu pravděpodobně mohou svou přítomností indukovat vznik dalších agregátů a tím vést k šíření patologie (Frost et al., 2009). Patologie spojené s tau proteinem různými mechanismy interagují s patologiemi vyvolanými amyloidem beta (Liu et al., 2019), přičemž přítomnost tau proteinu přispívá ke škodlivým účinkům amyloidu (Roberson et al., 2007).

### 1.2.4 Role NMDA receptorů a glutamátergního systému

Glutamát, hlavní excitační neurotransmitter CNS, působí prostřednictvím ionotropních a metabotropních receptorů. Iontropní glutamátové receptory se dále dělí na N-methyl-D-aspartátové (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a kainátové receptory. NMDA receptory se od zbylých dvou skupin odlišují specifickou funkcí a vlastnostmi. NMDA receptory jsou tetramery nejčastěji obsahující GluN1 a některé z GluN2A–D podjednotek. Aktivace NMDA receptoru vyžaduje kromě vazby koagonistů glutamátu a glycinu též současnou depolarizaci postsynaptického neuronu, která uvolní  $Mg^{2+}$  ionty, jež za klidového membránového potenciálu blokují iontový kanál receptoru (Dingledine et al., 1999). NMDA receptory hrají klíčovou roli v procesu dlouhodobé potenciace, která je podkladem procesů učení a paměti. Při ní aktivace NMDA receptorů umožní vtok  $Ca^{2+}$  do buňky, který prostřednictvím aktivace kináz spouští procesy vedoucí k modifikaci pre- a postsynaptické části a tím posílení spojení mezi neurony (Lynch, 2004).

Glutamátergní systém v CNS interaguje se systémem GABAergním. Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem CNS a působí prostřednictvím ionotropních  $GABA_A$  receptorů (jejichž aktivace vede k otevření iontového kanálu pro  $Cl^-$  a hyperpolarizaci) a metabotropních  $GABA_B$  receptorů. GABAergní systém moduluje excitační neurotransmisi v CNS a tedy i procesy učení a paměti (Nava-Mesa et al., 2014).

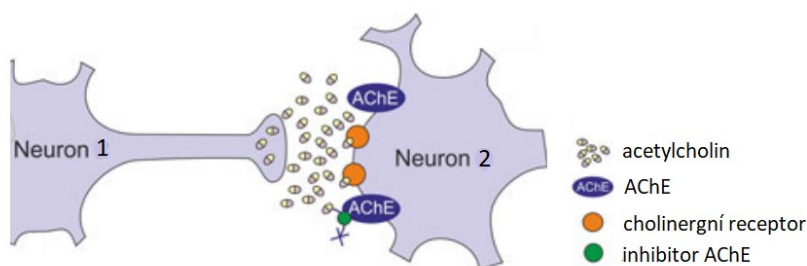
Dle výsledků studií využívajících animální modely AD dochází pravděpodobně již v časných stádiích AD k synaptické dysfunkci v hipokampu asociované s kognitivním deficitem. Jejím podkladem by mohla být dysbalance excitační a inhibiční neurotransmise (ve prospěch excitace) způsobená amyloidem beta (Chumakov et al., 2015; Nava-Mesa et al., 2014; Palop et al., 2007; Verret et al., 2012). V průběhu AD dochází i v následných stádiích k nadměrné aktivitě glutamatergního systému a zvýšené stimulaci NMDA receptorů (Danysz and Parsons, 2003). Příčinou může být zvýšení hladiny glutamátu v důsledku nedostatečného odčerpávání glutamátu astrocyty ze synaptické štěrbin (Harkany et al., 2000) nebo i zvýšení senzitivity NMDA receptorů působením amyloidu beta (Koh et al., 1990; Molnár et al., 2004). Tonická stimulace NMDA receptorů glutamátem a související zvýšení intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  v postsynaptickém neuronu podle některých autorů interferuje s fyziologickou neurotransmisí zprostředkovanou NMDA receptory a znemožňuje postsynaptickým elementům tyto signály správně detekovat. Vzhledem k významu NMDA receptorů pro synaptickou plasticitu zmíněné narušení jejich funkce přispívá ke kognitivnímu deficitu (Danysz and Parsons, 2003). Kromě toho může prolongovaná expozice neuronů mírně zvýšené hladině glutamátu vést k excitotoxické smrti neuronů nebo poškození synapsí. Vtok  $Ca^{2+}$  do neuronu prostřednictvím NMDA receptorů spouští více škodlivých procesů: mitochondriální oxidační stres, aktivaci kaspáz a indukci apoptózy, nebo aktivaci neuronální NO syntázy (nNOS) a tím vznik toxické sloučeniny peroxynitritu (Chen and Lipton, 2006). Excitotoxicita vyvolaná působením amyloidu beta při AD může mimo jiné přispívat i k degeneraci cholinergních neuronů (Harkany et al., 2000). Nadměrná aktivace NMDA receptorů může dále přispívat k fosforylaci tau (Couratier et al., 1996), nebo v případě extrasynaptických NMDA receptorů ke zvýšení produkce amyloidu beta (Bordji et al., 2010), a tím dále prohlubovat patologické procesy.

### **1.3 Farmakoterapie Alzheimerovy nemoci**

V současné době jsou schválenými léky pro léčbu AD inhibitory AChE donepezil, galantamin a rivastigmin, které jsou indikovány již počínaje mírným stadiem AD, a antagonistu NMDA receptorů memantin, určený pro léčbu středně těžkého a těžkého stadia nemoci (Parsons et al., 2013). Zcela novým lékem je aducanumab, monoklonální protilátka zacílená na amyloid beta, schválená k léčbě AD ve Spojených státech amerických v letošním roce.

### 1.3.1 Inhibitory acetylcholinesterázy

Inhibitory AChE omezují hydrolýzu acetylcholinu, čímž zvyšují jeho hladinu v synaptické štěrbině (obr. 1). Facilitují tak cholinergní neurotransmisi, která je při AD narušena, a zmírňují související projevy kognitivního deficitu (Parsons et al., 2013). Prvním schváleným inhibítorem AChE a zároveň prvním lékem na AD celkově byl takrin (1,2,3,4,-tetrahydroakridin-9-amin). Takrin disponoval klinickou účinností, ale z důvodu nežádoucích účinků, zejména hepatotoxicity, bylo jeho použití záhy přerušeno (Summers et al., 1986; Watkins et al., 1994). Pro své vhodné strukturální vlastnosti však takrin zůstává zajímavou výchozí molekulou pro syntézu derivátů s vylepšenou bezpečností a účinností včetně multipotentních sloučenin (Wu et al., 2017). Takrin byl později nahrazen donepezilem, galantaminem a rivastigminem. Inhibitory AChE zmírňují kognitivní deficit a zlepšují zvládnání aktivit denního života (Birks, 2006; Canal and Imbimbo, 1996; Wilkinson et al., 2002) a mohou snižovat i závažnost nekognitivních behaviorálních příznaků, jako je apatie a anxieta (Gauthier et al., 2002) u pacientů s mírnou až středně závažnou AD. Účinek je však pouze symptomatický a neumožňuje zastavení progresu choroby. Dávkování inhibitorů AChE je limitováno indukcí periferních cholinergních nežádoucích účinků, zejména gastrointestinálních, při podání vyšších dávek (Farlow et al., 2011; Maelicke et al., 2010; Parsons et al., 2013).



**Obr. 1** Schématické znázornění cholinergní synapse a jejího ovlivnění inhibitory AChE. Inhibitory AChE omezují degradaci acetylcholinu, čímž zvyšují jeho dostupnost v synaptické štěrbině a facilitují cholinergní neurotransmisi. Upraveno dle (Parsons et al., 2013).

Uvedené látky se liší svou preferencí pro jednotlivé cholinesterázy. Zatímco donepezil a galantamin jsou selektivními inhibitory AChE, rivastigmin a takrin jsou neselektivní, tedy kromě AChE významnou měrou inhibují i BChE (Hunter et al., 1989; Parsons et al., 2013). S ohledem na známé změny relativního zastoupení cholinesteráz při AD ve prospěch BChE (Perry et al., 1978) by se zejména v pokročilejších stádiích choroby dala předpokládat větší účinnost neselektivních inhibitorů cholinesteráz (Weinstock, 1999). V případě farmak schválených k léčbě AD však zásadní rozdíly v účinnosti selektivních a neselektivních inhibitorů AChE u pacientů shledány nebyly (Wattmo et al., 2011; Wilkinson et al., 2002).

Některé preklinické výsledky naznačují zvýšení rizika indukce vedlejších účinků u neselektivních inhibitorů (Dronfield et al., 2000; Liston et al., 2004), klinické výsledky ale nejsou zcela jednoznačné (Weinstock, 1999; Wilkinson et al., 2002).

Inhibitory AChE používané k léčbě AD jsou zpravidla jejími reverzibilními inhibitory (Parsons et al., 2013), které interagují s aktivním místem AChE, nacházejícím se uvnitř kavity enzymu. Některé látky mohou interagovat zároveň i s periferním anionickým místem, umístěným při vstupu do kavity (Weinstock, 1999). Prostřednictvím tohoto místa AChE interaguje s amyloidem beta a urychluje jeho agregaci (Inestrosa et al., 1996). Z tohoto důvodu je ve vývoji nových inhibitorů AChE věnována pozornost i tzv. duálním inhibitorům, interagujícím s aktivním katalytickým i s periferním anionickým místem, které by dle výsledků preklinických studií mohly vedle facilitace cholinergní neurotransmise přinášet přidanou hodnotu v podobě redukce agregace amyloidu (Bartolini et al., 2003; Inestrosa et al., 1996).

### **1.3.2 Antagonisté NMDA receptorů**

Za mechanismus terapeutického účinku memantinu u AD je považováno snížení nadměrné aktivace NMDA receptorů. Memantin působí v iontovém kanálu aktivovaných NMDA receptorů a pravděpodobně tak do určité míry nahrazuje funkci  $Mg^{2+}$  iontů, které za fyziologických podmínek při klidovém membránovém potenciálu blokují NMDA receptory, ale za patologické tonické stimulace glutamátem mohou být vytěsněny. Blokáda patologicky aktivovaných NMDA receptorů memantinem pravděpodobně může jednak normalizovat fyziologickou signalizaci NMDA receptorů při procesech spojených s pamětí, a dále může bránit excitotoxické smrti neuronů. Zároveň memantin díky specifickým farmakologickým vlastnostem (závislost účinku na napětí, středně silná afinita, rychlá kinetika disociace) při fyziologické fázické stimulaci spojené se silnou depolarizací disociuje od receptoru, tudíž fyziologická neurotransmise není narušena (Chen and Lipton, 2006; Danysz and Parsons, 2003). Memantin redukuje zhoršování klinických příznaků u pacientů se středně těžkou až těžkou AD (Wilkinson and Andersen, 2007), zatímco u pacientů s mírnou AD je přínos léčby sporný (Doody et al., 2007; Schneider et al., 2011). Výsledky preklinických studií navíc naznačují i další příznivé účinky memantinu, jako potlačení amyloidem beta indukované degenerace cholinergních neuronů (Nyakas et al., 2011) nebo snížení hladin amyloidu beta a tau (Martinez-Coria et al., 2010).

Protektivní účinky proti excitotoxicitě glutamátu byly v animálních modelech prokázány i u jiných antagonistů NMDA receptorů včetně dizocilpinu (MK-801) (Church et al., 1988; McDonald et al., 1989). Mnohé tyto látky však mohou interferovat s fyziologickou neurotransmisí a indukovat závažné psychotomimetické nežádoucí účinky znemožňující klinické využití (Grotta et al., 1995; Krystal et al., 1994; Muir and Lees, 1995), projevující se u laboratorních hlodavců mimo jiné jako hyperlokomoce (Andiné et al., 1999) a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Bast et al., 2000). Nedílnou součástí preklinického testování nových antagonistů NMDA receptorů je proto screening nežádoucích behaviorálních účinků. Profil žádoucích a nežádoucích účinků antagonistů NMDA receptorů závisí na přesném molekulárním mechanismu interakce látky s receptorem. Komplexní mechanismus aktivace NMDA receptoru a existence různých podjednotek a alosterických vazebných míst umožňuje více způsobů farmakologické modulace funkce receptoru a tím snad i vývoj látek s vylepšenými vlastnostmi, tedy výraznou inhibicí patologicky, ale nikoli fyziologicky aktivovaných receptorů (Vyklícky et al., 2014).

### **1.3.3 Další přístupy ve vývoji farmak pro léčbu Alzheimerovy nemoci**

Vzhledem k nedostatečné účinnosti stávající léčby AD je pochopitelně věnováno velké úsilí vývoji nových léčiv. Ultimátním cílem vývoje léků je dosažení choroby modifikujícího účinku (disease-modifying effect) a zvrácení progresu. Tento přístup však dosud nevedl k zavedení odpovídající léčby a je limitován nedostatečnou znalostí etiologie. Z těchto důvodů představuje významnou strategii rovněž i optimalizace účinnosti symptomatické léčby (Francis et al., 2012). Nutnou vlastností a primárním parametrem účinnosti všech testovaných látek zůstává zmírnění hlavních projevů onemocnění, tedy kognitivních a neuropsychiatrických symptomů.

Testované látky zaměřené na patologie spojené s amyloidem beta zahrnují inhibitory beta a gama sekretáz, protilátky proti amyloidu beta, látky facilitující jeho proteolytickou degradaci nebo zamezující jeho agregaci (Liu et al., 2019). Agregaci může být zabráněno aplikací molekul interagujících s aromatickými skupinami aminokyselin v molekule amyloidu, které se pravděpodobně účastní zaujetí nefyziologické konformace (misfolding) (Scherzer-Attali et al., 2010). Další možností je inhibice chaperonů urychlujících agregaci amyloidu, včetně dříve zmíněné AChE (Inestrosa et al., 1996). Mezi strategie zacílené na tau protein patří inhibice agregace tau, jeho kináz, stabilizace mikrotubulů a imunoterapie (Liu et al., 2019).

Významným předmětem výzkumu jsou i látky ovlivňující neurotransmisi (Liu et al., 2019). Vedle snahy o vývoj látek různými mechanismy facilitujících cholinergní neurotransmisi nebo antagonistů NMDA receptorů s vylepšenou účinností a redukovanými nežádoucími účinky (Francis et al., 2012) je v současné době věnována pozornost i možné roli facilitace serotonergní (Liu et al., 2019) nebo GABAergní neurotransmise (Nava-Mesa et al., 2014; Pilipenko et al., 2019). Vzhledem k významu pro tuto práci bude o ovlivnění GABAergního systému pojednáno podrobněji.

Některá z výše zmíněných experimentálních farmak jsou v současné době ve fázi klinického testování. U jiných bylo navzdory nadějným výsledkům preklinických studií klinické testování ukončeno, mnohdy z důvodu nedostatečné účinnosti (Liu et al., 2019). Výjimkou je aducanumab, jehož schválení se však neobešlo bez kontroverze a účinnost ve smyslu snížení kognitivního deficitu není v současnosti podpořena dostatkem důkazů (Tagliavini et al., 2021). Žádná z dalších strategií dosud nevyústila v zavedení adekvátní terapie.

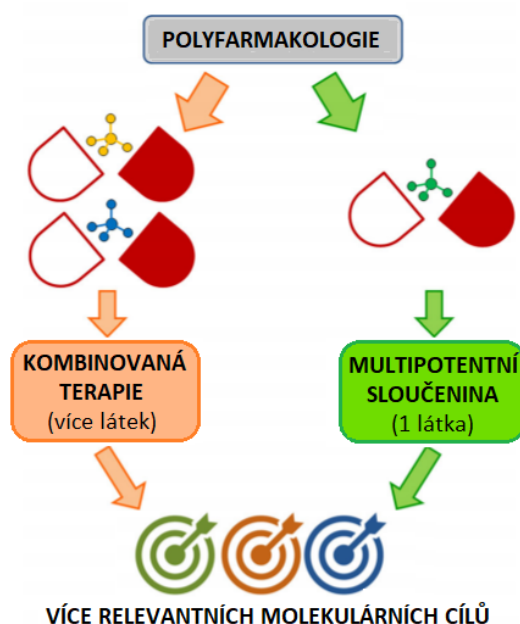
### **1.3.3.1 Modulační GABAergního systému**

Zájem o studium účinků pozitivních modulatorů GABA<sub>A</sub> receptorů včetně benzodiazepinů v modelech AD vzrostl během poslední dekády. Benzodiazepiny jsou pozitivní alosterické modulatory GABA<sub>A</sub> receptorů, jež facilitují inhibiční účinky GABA (Delorey and Olsens, 1992). Výsledky recentní preklinické studie naznačují pozitivní vliv benzodiazepinů v časných fázích AD, pravděpodobně zprostředkovaný zmírněním synaptické dysfunkce a dysbalance mezi excitací a inhibicí v CNS a manifestovaný jako prokognitivní, neuroprotektivní a protizánětlivý efekt a normalizace cholinergních funkcí v netransgenním modelu časně AD u potkana (Nava-Mesa et al., 2014; Pilipenko et al., 2019). Pozitivní modulatory GABA<sub>A</sub> receptorů by se mohly potenciálně uplatnit i v pozdějších fázích AD, jelikož dle výsledků studií *in vitro* mohou zmírňovat excitotoxicitu (Mazzone and Nistri, 2019; Nelson et al., 2000) včetně excitotoxicity vyvolané amyloidem beta (Gu et al., 2003). Benzodiazepiny navíc mohou u pacientů potlačovat i behaviorální symptomy, jako agitovanost a agresi. Nevýhodou je v tomto případě riziko sedativních a jiných nežádoucích účinků (Lancôt et al., 2004).

V preklinických studiích byl nadějnou látkou tramiprosat (homotaurin), který redukuje agregaci amyloidu a chrání před jeho toxickými účinky částečně prostřednictvím agonismu na GABA<sub>A</sub> receptorech. Tramiprosat postoupil do III. fáze klinické studie, kde byl dobře tolerován a zmírnil pokles objemu hipokampu, avšak zpomalení progresu kognitivního deficitu nedosáhlo statistické signifikance (Aisen et al., 2011).

## 1.4 Polyfarmakologie

Vzhledem k multifaktoriální povaze AD a neúspěchu mnoha vysoce specifických testovaných léků se dosažení uspokojivého terapeutického efektu pomocí látek zacílených na jednu konkrétní patofyziologickou dráhu v současné době nejeví příliš pravděpodobné (Bolognesi, 2019; Chumakov et al., 2015). Jak bylo opakovaně zmíněno výše, různé patofyziologické procesy probíhající při AD spolu vzájemně interagují a synergisticky mohou vést k prohloubení celkového patologického stavu. Biologické systémy navíc mohou disponovat redundantními mechanismy kompenzujícími funkci receptoru či dráhy ovlivněné jedním vysoce specifickým léčivem (Bolognesi, 2019). V současné době je proto v rámci vývoje nových farmakologických přístupů věnována stále větší pozornost konceptu polyfarmakologie, tedy farmakologickému ovlivnění dvou nebo více různých molekulárních cílů nebo drah relevantních v patofyziologii dané choroby, potenciálně umožňujícímu optimalizaci účinnosti (Bolognesi, 2019). Při racionálně zvolené kombinaci mechanismů účinku může docházet k pozitivním aditivním nebo i synergistickým farmakodynamickým interakcím, vedoucím k vyššímu celkovému terapeutickému efektu bez dosažení dávek jednotlivých látek, které jsou spojeny s nástupem nežádoucích účinků limitujících použití (Albertini et al., 2020; Benek et al., 2020; Chumakov et al., 2015; Parsons et al., 2013).



**Obr. 2** Možné přístupy v rámci polyfarmakologie. Simultánního ovlivnění více molekulárních cílů relevantních v patofyziologii choroby a tím i zvýšení terapeutického efektu lze docílit použitím kombinované terapie, nebo multipotentních sloučenin, mezi něž se řadí i MTDL. Upraveno podle (Albertini et al., 2020).

Současné modulace více drah lze docílit buď kombinovanou terapií (koaplikací více látek), nebo použitím multipotentních sloučenin působících na více molekulárních cílů zároveň (obr. 2). Poslední jmenovaný přístup je pro některé výhody upřednostňován a design, syntéza a preklinické testování biologických účinků těchto sloučenin je v posledních dvou dekadách předmětem rostoucího zájmu (Albertini et al., 2020; Benek et al., 2020; Bolognesi, 2019).

## **1.5 Kombinovaná terapie**

Kombinovaná terapie je způsob léčby spočívající v koaplikaci dvou nebo více látek. Tento přístup umožňuje simultánní modulaci více patologických mechanismů, nevýhodou může být složitý dávkovací režim a snížení compliance. Řešení by mohly představovat multikomponentní přípravky obsahující dvě nebo více účinných látek v jedné lékové formě. Výroba a použití takových však preparátů však není ve všech případech reálné např. z důvodu odlišných farmakokinetických vlastností dvojice látek (Benek et al., 2020).

### **1.5.1 Kombinovaná terapie inhibitory acetylcholinesterázy a antagonisty NMDA receptorů v klinické praxi**

Kombinovaná terapie memantinem a některým z inhibitorů AChE se v současné době používá v klinické praxi (Francis et al., 2012) a příznivé výsledky vyústily ve schválení kombinace definovaných dávek memantinu a donepezilu v podobě přípravku Namzaric (Calhoun et al., 2018).

Antagonisté NMDA receptorů a inhibitory AChE se mohou ve svých účincích více mechanismy vhodně doplňovat, jelikož glutamátergní a cholinergní systém za fyziologických i patologických situací blízce interagují. Podle preklinických studií tak mohou antagonisté NMDA receptorů prostřednictvím snížení aktivity GABAergních interneuronů v septu vyvolávat zvýšení výlevu acetylcholinu v hipokampu (Giovannini et al., 1994). Dalším mechanismem příznivého působení antagonistů NMDA receptorů na cholinergní systém by mohlo být zmírnění excitotoxické degenerace cholinergních neuronů (Nyakas et al., 2011). Na druhou stranu také inhibitory AChE by potenciálně mohly zmírňovat důsledky alterace glutamátergního systému, protože stimulace cholinergních receptorů acetylcholinem může působit proti excitotoxicitě glutamátu (Akaike et al., 1994; Gu et al., 2003).

Výsledky preklinických studií potvrzují synergistické účinky uvedených látek v kognitivních úlohách, a to v případě koaplikace memantinu a donepezilu v transgenním



myším modelu založeném na amyloidní hypotéze (Neumeister and Riepe, 2012), nebo koaplikace galantaminu a memantinu v modelu AD vyvolaném skopolaminem (Busquet et al., 2012). V klinických studiích vedlo doplnění memantinu ke stávající léčbě inhibitory AChE ke zvýšené účinnosti v doménách kognice a chování u pacientů se středně těžkou až těžkou AD, přičemž léčba byla dobře tolerovaná (Grossberg et al., 2013; Tariot et al., 2004). U pacientů se středně těžkou až těžkou AD nereagující na léčbu inhibitory AChE byl pozorován příznivý efekt kombinované terapie memantinem a rivastigminem na kognitivní funkce (Dantoine et al., 2006). Naopak v případě mírné až středně těžké AD superiorita kombinované terapie prokázána nebyla (Porsteinsson et al., 2008).

### **1.5.2 Kombinovaná terapie antagonisty NMDA receptorů a pozitivními modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů v preklinických studiích**

Jeden z experimentálních terapeutických přístupů studovaných v této práci představuje koaplikace antagonisty NMDA receptorů a pozitivního alosterického modulátoru GABA<sub>A</sub> receptorů. Bylo prokázáno, že tyto látky mohou mít synergistické protektivní účinky v modelech excitotoxicity (Lyden and Lonzo, 1994; Shibuta et al., 2006) i modelech dalších patologií CNS (Martin and Kapur, 2008; Niquet et al., 2016; Shakarjian et al., 2015). Dříve zmíněná dysbalance excitační a inhibiční neurotransmise pravděpodobně přítomná při AD a prokázané terapeutické účinky antagonistů NMDA receptorů a patrně i pozitivních modulátorů GABA<sub>A</sub> receptorů v modelech AD vedou k domněnce, že tyto látky by při koaplikaci mohly synergistickými mechanismy pomoci obnovit rovnováhu excitace a inhibice v hipokampu a dalších strukturách, a tím umožnit výraznější zmírnění kognitivních symptomů (Nava-Mesa et al., 2014). Účinkům koaplikace těchto látek v animálních modelech kognitivního deficitu nebyla dosud věnována větší pozornost.

Oprávněnosti simultánní modulace glutamatergního a GABAergního nicméně nasvědčují pozitivní účinky koaplikace jiných látek v modelu AD: akamprosátu (derivát dříve zmíněného tramiprosatu), který ne zcela objasněnými mechanismy (pravděpodobně zahrnujícími inhibici glutamatergních receptorů a potenciaci inhibiční neurotransmise) snižuje hyperexcitabilitu a obnovuje rovnováhu excitace a inhibice, a baklofenu, agonisty GABA<sub>B</sub> receptorů. Uvedené látky potlačovaly více patologických procesů přítomných u AD a vykazovaly synergistické terapeutické účinky v *in vitro* modelu neurotoxicity amyloidu beta i v myším modelu kognitivního deficitu, vyvolaném intracerebroventrikulární (*i. c. v.*) aplikací oligomerů amyloidu beta (Chumakov et al., 2015).

## 1.6 Multipotentní sloučeniny

Multipotentní sloučeniny jsou látky simultánně působící na více molekulárních cílů. Multipotentními účinky relevantními pro léčbu AD mohou disponovat různé sloučeniny včetně některých látek přírodního původu (Ji and Zhang, 2008). Syntetické látky cíleně designované za účelem simultánního ovlivnění dvou nebo více molekulárních cílů nebo drah relevantních v patofyziologii choroby se označují multi-target-directed ligandy (MTDL, z angl. multi-target-directed ligand). MTDL jsou upřednostňovanou alternativou kombinované terapie, protože by mohly umožňovat snížení rizika nežádoucích účinků a interakcí a zjednodušení dávkovacího režimu a tedy zlepšení compliance (Benek et al., 2020; Bolognesi, 2019). MTDL navíc v některých případech mohou disponovat dalšími příznivými účinky, které výchozí látky postrádají (Chalupova et al., 2019). Studie srovnávající efekt kombinované terapie a monoterapie konkrétními látkami proto neslouží jen k posouzení relevance kombinované terapie coby terapeutické modality *per se*, ale v případě příznivého výsledku mohou zároveň představovat východisko určující směr budoucího vývoje MTDL.

Klíčovým krokem designu MTDL je racionální volba kombinace farmakoforů, z nichž každý dodává molekule jeden z plánovaných účinků. Použité látky by měly působit na patologické mechanismy relevantní ve stejné fázi choroby a mít podobný mechanismus účinku a vyváženou (řádově podobnou) afinitu pro své cíle, jelikož kombinací odlišných mechanismů účinku (vazba na receptor/strukturálně nespecifický účinek; reverzibilní/ireverzibilní vazba) roste riziko nekompatibilních vlastností (rozdílné účinné dávky nebo farmakokinetické vlastnosti). Výsledné MTDL zároveň musí vykazovat optimální farmakokinetické vlastnosti (zejm. průnik hematoencefalickou bariérou), je tedy nutno vzít v úvahu molekulovou hmotnost a další fyzikálně chemické vlastnosti. Spojení farmakoforů může být realizováno třemi způsoby: uhlíkovým řetězcem („linked MTDL“), přímým spojením obou molekul („fused“) nebo modifikací molekul s podobným strukturálním motivem tak, že se jejich struktury překrývají („merged“). Poslední zmíněný přístup je nejnáročnější a je podmíněn přítomností podobných strukturálních prvků dvojice molekul, nespornou výhodou však představuje menší molekulová hmotnost (Benek et al., 2020).

V rámci vývoje MTDL pro léčbu AD je zpravidla jeden z farmakoforů inhibítorem AChE. Vzhledem k relevanci pro tuto práci bude věnována pozornost pouze multipotentním sloučeninám odvozeným od takrinu, který je díky nízké molekulové hmotnosti a vhodným

chemickým vlastnostem často využívanou výchozí molekulou (Wu et al., 2017). Cílem designu derivátů takrinu bývá vedle dosažení multipotentních vlastností i zvýšení potence inhibice cholinesteráz a redukce nežádoucích, zejména hepatotoxických a parasymptomimetických účinků (Misik et al., 2018).

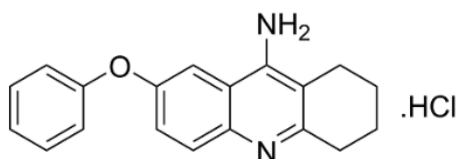
### **1.6.1 Monotakrinové deriváty inhibující acetylcholinesterázu a NMDA receptory**

Takrin vedle potentní inhibice cholinesteráz vyvolává i další účinky v CNS a působí jako antagonist NMDA receptorů (Horak et al., 2017; Kaniakova et al., 2018). Praktická relevance tohoto účinku je pro slabou afinitu nejasná (Horak et al., 2017). Vyváženější inhibitor cholinesteráz a NMDA receptorů představuje jeho derivát 7-methoxytakrin. 7-methoxytakrin vykázal v *in vivo* modelu excitotoxicity výraznější neuroprotektivní účinky než memantin nebo takrin, přičemž nezpůsobuje nežádoucí psychotomimetické účinky antagonistů NMDA receptorů ani toxické účinky takrinu (Kaniakova et al., 2018). Takrin i 7-methoxytakrin působí na NMDA receptorech jako blokátory otevřeného iontového kanálu tzv. „foot-in-the-door“ typu (Kaniakova et al., 2018). Tento mechanismus účinku je považován za zvláště výhodný, jelikož by mohl umožnit výraznější preferenční inhibici patologicky tonicky aktivovaných NMDA receptorů bez významné interference s fyziologickým synaptickým přenosem, podobně nebo účinněji než memantin (Vyklícky et al., 2014). Významu přístupů založených na kombinaci inhibice AChE s vhodným mechanismem inhibice NMDA receptorů pro léčbu symptomatických stadií AD nasvědčují i výše zmíněné klinické studie účinnosti kombinované terapie. Jedním z cílů syntézy takrinových derivátů je tedy dosažení vyváženější inhibice AChE a NMDA receptorů.

Naopak jiný takrinový derivát 6-chlorotakrin vyniká ve srovnání s takrinem vyšší selektivitou a potencí inhibice AChE, zatímco účinek na NMDA receptoru je relativně méně významný (Kaniakova et al., 2019). 6-chlorotakrin tedy není vyváženým inhibitorem AChE a NMDA receptorů, avšak pro silnou inhibici AChE bývá s výhodou použit pro syntézu heterodimerních MTDL (včetně dvou sloučenin testovaných v rámci této práce). Vyšší lipofilita 6-chlorotakrinu zajišťuje lepší penetraci do mozku, což by mohlo vést k nižšímu riziku periferních nežádoucích účinků. Dalším příznivým nálezem je výraznější terapeutický účinek 6-chlorotakrinu v porovnání s takrinem v modelu kognitivního deficitu indukovaného inhibicí muskarinových cholinergních receptorů u potkana při použití ekvitoxických dávek testovaných látek, a pravděpodobně nepřilíš vysoké riziko hepatotoxicity (Misik et al., 2018).

### 1.6.1.1 Biologické vlastnosti modelové molekuly 7-fenoxytakrin

V návaznosti na příznivé výsledky s 7-methoxytakrinem byl syntetizován 7-fenoxytakrin (obr. 3) a charakterizovány jeho biologické účinky (Kaniakova et al., 2021). Jeho výhodou je potentní a vyrovnaná inhibice obou cholinesteráz ( $IC_{50}$  (AChE) = 2,4  $\mu$ M;  $IC_{50}$  (BChE) = 4,9  $\mu$ M) a NMDA receptorů ( $IC_{50}$  (GluN1/GluN2B) = 1,7  $\mu$ M). 7-fenoxytakrin má unikátní mechanismus účinku na NMDA receptorech. Interakce s ifenprodilovým vazebným místem způsobuje preferenční inhibici NMDA receptorů nesoucích podjednotku GluN2B (dříve též NR2B), což by mohlo být výhodné vzhledem k významné roli této subpopulace NMDA receptorů při excitotoxicitě (Liu et al., 2007; Martel et al., 2012). Zároveň dochází i k o něco méně potentní inhibici ostatních NMDA receptorů prostřednictvím blokády otevřeného iontového kanálu (Kaniakova et al., 2021). Následná farmakokinetická analýza prokázala uspokojivý průnik 7-fenoxytakrinu hematoencefalickou bariérou. Po intraperitoneální (*i. p.*) aplikaci dávky 24 mg/kg u potkana byla maximální koncentrace v mozku i plazmě dosažena ve 20. min po aplikaci; biologický poločas v mozku i plazmě byl zhruba 50 min (Kaniakova et al., 2021).



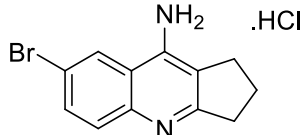
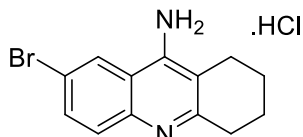
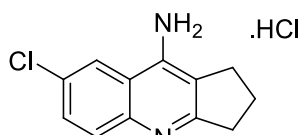
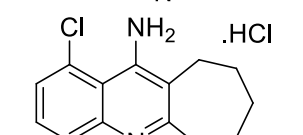
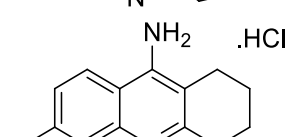
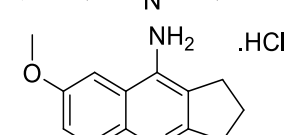
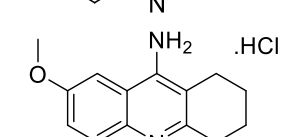
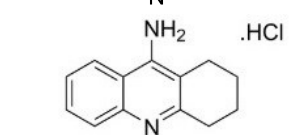
**Obr. 3** Struktura 7-fenoxytakrinu.  
Převzato z (Kaniakova et al., 2021).

### 1.6.1.2 Biologické vlastnosti modelové série monotakrinových derivátů

Závislost účinku 7-fenoxytakrinu na podjednotkovém složení NMDA receptorů podnítila zájem o cílenou syntézu dalších takrinových derivátů s různou preferencí pro NMDA receptory nesoucí podjednotku GluN2A nebo GluN2B a objasnění vztahu jejich struktury a účinku na NMDA receptorech (Gorecki et al., 2021). Byly použity dva typy strukturálních modifikací takrinu: substituce na aromatické části molekuly a modifikace cykloalkylového zbytku (cyklopentan, cyklohexan, cykloheptan). První zmíněná modifikace by měla mimo jiné bránit vzniku hepatotoxických metabolitů. Bylo syntetizováno 30 nových derivátů s různými kombinacemi afinit pro GluN2A/GluN2B podjednotku NMDA receptorů a pro AChE/BChE. Pro testování *in vivo* účinků byly vyselektovány následující molekuly: s podobnou afinitou k AChE, BChE i NMDA receptorům (látka K1575 a K1576), s vyšší afinitou k cholinesterázám než k NMDA receptorům s podjednotkou GluN2B (K1578), s potentní inhibicí obou cholinesteráz (K1592), selektivní potentní inhibicí AChE a preferencí pro podjednotku GluN2B NMDA receptoru (K1594) a s preferencí pro

podjednotku GluN2A (K1599). Co se týče vlivu na NMDA receptory, látky K1575 a K1576 inhibovaly oba typy receptorů, K1578 a K1594 vykazovaly preferenci pro podjednotku GluN2B a K1592 a K1599 naopak pro GluN2A. Strukturu látek a jejich inhibiční aktivity ukazuje tab. 1. Farmakokinetická analýza prokázala u všech těchto vybraných molekul průnik hematoencefalickou bariérou (Gorecki et al., 2021); výsledky zobrazuje tab. 2.

**Tab. 1** Struktura studované série takrinových derivátů a jejich inhibiční účinky vůči NMDA receptorům (dle podjednotkového složení), AChE a BChE

Označení molekuly	Struktura	IC <sub>50</sub> ± SEM (μM)				Index selektivity (IC <sub>50</sub> hBChE/IC <sub>50</sub> hAChE)
		GluN1/ GluN2B (-60 mV)	GluN1/ GluN2A (-60 mV)	hAChE	hBChE	
K1575	 .HCl	8,24 ± 0,80	6,31 ± 0,27	5,69 ± 0,28	16,9 ± 1,5	3,03
K1576	 .HCl	8,32 ± 0,97	6,93 ± 1,03	4,79 ± 0,02	20,8 ± 1,2	4,34
K1578	 .HCl	8,69 ± 0,60	21,01 ± 0,71	1,58 ± 0,05	6,88 ± 0,65	4,35
K1592	 .HCl	22,07 ± 1,11	7,29 ± 0,57	0,223 ± 0,006	0,311 ± 0,016	1,39
K1594	 .HCl	7,83 ± 0,34	17,05 ± 1,59	0,072 ± 0,003	2,90 ± 0,08	40,2
K1599	 .HCl	14,56 ± 1,37	4,16 ± 0,37	8,22 ± 0,35	10,6 ± 0,3	1,23
7-methoxy-takrin	 .HCl	7,24 ± 0,34	5,05 ± 0,62	10,0 ± 1,0	17,6 ± 0,8	1,76
takrin	 .HCl	19,7 ± 1,8	9,1 ± 0,5	0,32 ± 0,013	0,08 ± 0,001	0,25

Sestaveno dle (Gorecki et al., 2021).

**Tab. 2** Farmakokinetické vlastnosti série takrinových derivátů: koncentrace v plazmě a mozku u myši po *i. p.* aplikaci dávky 5 mg/kg

Molekula	Koncentrace v 15. min (nM)		Koncentrace v 60. min (nM)		Poměr koncentrace mozek/plazma (% , v 15. min)
	Plazma	Mozek	Plazma	Mozek	
<b>K1575</b>	2 522	1 176	154	116	47
<b>K1576</b>	1 334	1 376	170	218	103
<b>K1578</b>	1 657	1 003	389	173	61
<b>K1592</b>	2 297	762	185	32	33
<b>K1594</b>	1 304	731	87	251	56
<b>K1599</b>	1 673	2 315	207	326	138

Převzato z (Gorecki et al., 2021).

## 1.6.2 Multipotentní takrinové heterodimery

Takrin bývá použit i k syntéze heterodimerních hybridních sloučenin s vlastnostmi MTDL. Obě části molekuly bývají propojeny uhlíkovým řetězcem zpravidla přes aminoskupinu takrinu, což může mimo jiné umožnit snížení hepatotoxicity a dále případně i dosažení žádoucí interakce s oběma anionickými místy AChE. Bylo syntetizováno více typů těchto hybridních sloučenin takrinu s různými látkami, působících vedle inhibice AChE i inhibici agregace amyloidu, inhibici beta sekretázy nebo antioxidační a další účinky (Wu et al., 2017). Kromě takrinu mohou být k syntéze MTDL použity i jeho deriváty jako 6-chlorotakrin; z těchto látek lze jmenovat dimery 6-chlorotakrinu a memantinu (Kaniakova et al., 2019). Dále se zaměříme jen na látky relevantní pro tuto práci.

### 1.6.2.1 Dimery takrinu a benzothiazolu a biologické vlastnosti modelové molekuly 10w

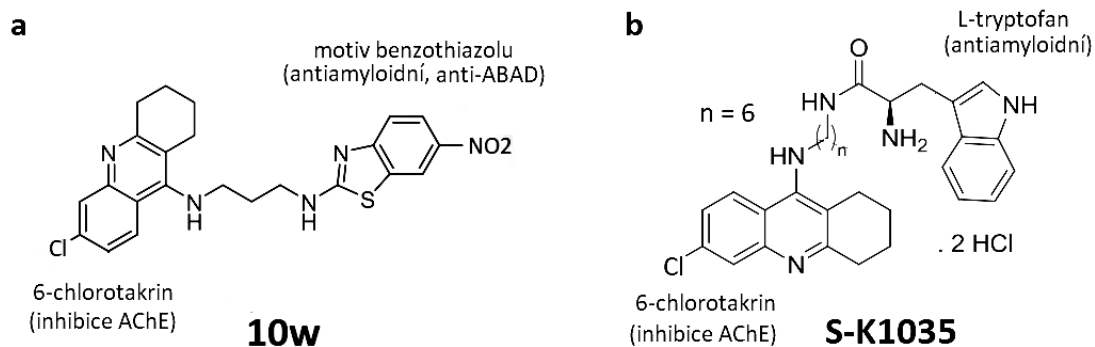
Skupina nových hybridních molekul s vlastnostmi MTDL vychází z takrinu a benzothiazolu. Deriváty benzothiazolu mají rozmanité biologické účinky a jsou často využívány v medicíně. Některé z nich včetně thioflavinu T vážou amyloid beta a již tradičně se používají jako proby k histologické detekci jeho agregátů (Kelényi, 1967). Různé hybridy takrinu a benzothiazolu inhibující AChE a agregaci amyloidu byly již dříve představeny (Keri et al., 2013; Rajeshwari et al., 2019). Design, syntéza a účinky nových derivátů s vylepšenou účinností inhibice AChE i inhibice agregace amyloidu a navíc s funkcí inhibice ABAD jsou obsahem publikace (Nepovimova et al., 2021). Bylo syntetizováno 21 molekul první generace, dimerů spojených alifatickým řetězcem o různé délce. Takrin, 6-chlorotakrin nebo 7-methoxytakrin molekule udělovaly inhibiční účinky na AChE různé intenzity a selektivity. Nejsilnějšími inhibitory AChE byly hybridy 6-chlorotakrinu. Na základě

biologických vlastností byla vyselektována molekula označená 10p, dimer 6-chlorotakrinu a benzothiazolu spojený tříčlenným uhlíkovým řetězcem, a substitucí na pozici 6 benzothiazolu byla vytvořena druhá generace molekul. Z nich byl k testování *in vivo* účinků na cholinergní systém zvolen dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu spojený tříčlenným uhlíkovým řetězcem, v publikaci označený 10w (obr. 4a). Látka 10w je stejně potentním inhibitorem AChE jako výchozí 6-chlorotakrin ( $IC_{50} = 18 \text{ nM}$ ), je však ještě více selektivní pro AChE. Ze všech molekul vykazoval nejsilnější antiagregační vlastnosti, interagoval i s periferním anionickým místem AChE a byl středně silným inhibitorem ABAD. Penetrace 10w hematoencefalickou bariérou byla potvrzena na základě průniku arteficiální membránou (Nepovimova et al., 2021).

#### **1.6.2.2 Dimery takrinu a L-tryptofanu a biologické vlastnosti modelové molekuly S-K1035**

Další skupina heterodimerů s vlastnostmi MTDL vychází z molekul takrinu a L-tryptofanu, spojených alifatickým řetězcem o různé délce. Zamýšleným účinkem byla opět především inhibice AChE a inhibice agregace amyloidu beta. Bylo syntetizováno přes 20 heterodimerů (označených S-K1024–S-K1044). Jejich design a charakterizace biologických vlastností je předmětem publikace (Chalupova et al., 2019). Opět byl použit takrin, 7-methoxytakrin nebo 6-chlorotakrin, které zajišťovaly silnou inhibici AChE a BChE (s různou preferencí ovlivněnou použitým takrinovým derivátem, a intenzitou ovlivněnou délkou spojovacího řetězce). L-tryptofan byl použit především za účelem inhibice samovolné agregace amyloidu beta interakcí s aromatickými skupinami amyloidu. Antiagregačním vlastnostem tryptofanu nasvědčují mimo jiné příznivé výsledky dosažené s naftochinon-tryptofanovými deriváty (Scherzer-Attali et al., 2010). Vedle toho dimery takrinu a L-tryptofanu interagují i s periferním anionickým místem AChE a snižují tak i AChE-indukovanou agregaci amyloidu. Specifickou vlastností heterodimerů, nepřítomnou u výchozích molekul, byla středně silná inhibice nNOS, potenciálně relevantní pro zmírnění důsledků excitotoxicity (Chalupova et al., 2019).

Na základě nejvýhodnějších vlastností byla vyselektována látka označená S-K1035, představující dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu spojený šestičlenným uhlíkovým řetězcem (obr. 4b). S-K1035 je nejsilnějším inhibitorem AChE a BChE z testovaných látek a disponuje vyrovnaným poměrem inhibice AChE a BChE ( $IC_{50}$  6,3, resp. 9,1 nM). Představuje tedy efektivnější inhibitor cholinesteráz než 6-chlorotakrin a takrin.



**Obr. 4** Struktura studovaných takrinových heterodimerů s vlastnostmi MTDL. **a:** Dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu, označený 10w dle (Nepovimova et al., 2021), **b:** dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, označený S-K1035 dle (Chalupova et al., 2019). Popisky ukazují použité strukturální motivy i hlavní biologické vlastnosti jimi poskytované. Upraveno dle (Nepovimova et al., 2021) a (Chalupova et al., 2019).

## 1.7 Animální modely Alzheimerovy nemoci a asociovaného kognitivního deficitu

Významný nástroj pro výzkum AD a možné farmakoterapie představují animální modely. V současnosti jsou často využívaným přístupem myši transgenní modely, založené zejména na mutacích APP a sekretáz, případně zároveň i tau proteinu v případě tzv. 3×Tg modelu. Kognitivní deficit bývá většinou v různé míře přítomen, ale ne vždy odráží dynamiku choroby u lidí (Drummond and Wisniewski, 2017). Z transgenních modelů využívajících potkana lze jmenovat model McGill, nesoucí mutaci APP a vykazující alterace v kognitivních i nekognitivních behaviorálních doménách (Petrasek et al., 2018). Genetické modely však odrážejí spíše familiární formu AD, mohou postrádat důležité aspekty jako neurodegeneraci a atrofii mozkových struktur (Drummond and Wisniewski, 2017) a jejich validita je některými autory zpochybňována (Krstic and Knuesel, 2013). Alternativní modely AD a souvisejícího kognitivního deficitu nezahrnující genetickou modifikaci využívají hlavně potkana a mohou být vyvolány *i. c. v.* infuzí amyloidu beta samostatně (Nitta et al., 1994) nebo společně s prooxidačními sloučeninami v podobě tzv. modelu Samaritan (Petrasek et al., 2016), infuzí streptozotocinu ovlivňující energetický metabolismus (Lannert and Hoyer, 1998) nebo kyseliny okadaové způsobující hyperfosforylaci tau (Zhang and Simpkins, 2010). Většina modelů odráží pouze část patofyziologických znaků AD a při volbě modelu pro farmakologické studie by měl být zohledněn i mechanismus účinku testované látky. Dále budou podrobněji popsány farmakologicky indukované modely použité v této práci: komplexní model neurodegenerace a kognitivního deficitu vyvolaný trimethylcínem (TMT), a model cholinergní dysfunkce vyvolaný skopolaminem u potkana.



### 1.7.1 Model kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace indukovaný trimethylcínem u potkana

Trimethylcín (TMT) je organokovová sloučenina, která po jednorázové systémové aplikaci vyvolává selektivní poškození limbického systému, především hipokampu, a behaviorální změny včetně kognitivního deficitu u laboratorních hlodavců (Balaban et al., 1988; Brown et al., 1979; Earley et al., 1992; Lalkovicova et al., 2016; Robertson et al., 1987). Lokalizace (Peng et al., 2015; Schuff et al., 2009) a projev poškození tedy napodobuje situaci u pacientů s AD a TMT je používán jako model neurodegenerace asociované s kognitivním deficitem (Geloso et al., 2011). Kromě toho model replikuje další rysy přítomné u AD: výraznější poškození u starších zvířat (Scallet et al., 2000), účast oxidačního stresu (Kaur and Nehru, 2013), mitochondriální dysfunkce (Misiti et al., 2008) a aktivace mikroglíí (Brabeck et al., 2002) a astrocytů (Brock and O'Callaghan, 1987). Dále byla zjištěna i alterace exprese APP, presenilinu 1 (Little et al., 2012; Nilsberth et al., 2002) a tau (Anderson et al., 1992). Neurodegenerace indukovaná jednorázovou aplikací TMT má navíc u potkana progresivní charakter a probíhá po dobu několika týdnů (Brock and O'Callaghan, 1987; Brown et al., 1979; Latini et al., 2010; Whittington et al., 1989), pravděpodobně díky afinitě TMT k hemoglobinu a tedy prolongované eliminaci (Kaur and Nehru, 2013; Koczyk, 1996).

Na behaviorální úrovni způsobuje aplikace TMT tzv. „TMT syndrom“, který zahrnuje projevy agrese, hyperexcitability, hyperaktivity, tremor, spontánní záchvaty a kognitivní deficit v úlohách zaměřených na prostorovou kognici (Morrisovo a Bielovo vodní bludiště), krátkodobou paměť (T bludiště) a asociativní učení (pasivní a aktivní vyhýbání, strachové podmiňování). Tyto projevy bývají nejčastěji pozorovány 3.–21. den po aplikaci TMT a některé z nich mohou přetrvávat i později (Brown et al., 1979; Earley et al., 1992; Ishida et al., 1997; Kaur and Nehru, 2013; Lalkovicova et al., 2016; Takahashi, 2004).

Na histologické úrovni neurodegenerace selektivně zasahuje limbický systém včetně entorinální a piriformní kůry, amygdaly a zejména hipokampu (Balaban et al., 1988; Brown et al., 1979). Jednotlivé hipokampální neuronální populace vykazují různou senzitivitu k neurotoxickým účinkům TMT, která je dále ovlivněna pozicí podél septotemporální osy hipokampu (Chang, 1986). Vysoce senzitivní oblast představuje *cornu Ammonis* (CA) 3 v dorzálním hipokampu a zejména její podoblast CA3c (část CA3 obklopená dorzálním a ventrálním listem *gyru dentatu*) tamtéž, která může být v důsledku neurodegenerace prakticky eliminována (Robertson et al., 1987; Whittington et al., 1989). Degenerace může

na makroskopické úrovni rezultovat ve snížení objemu hipokampu a alteraci dalších jeho morfologických parametrů (Brown et al., 1979; Dyer et al., 1982; Robertson et al., 1987).

Mechanismus účinku TMT je komplexní a ne zcela prozkoumaný. Nutnou, ale pravděpodobně nikoli postačující podmínkou senzitivity neuronů k TMT je exprese mitochondriálního proteinu stanninu, se kterým TMT interaguje (Buck et al., 2004; Davidson et al., 2004; Thompson et al., 1996). Procesy vedoucí v konečném důsledku k buněčné smrti zahrnují oxidační stres, narušení funkce mitochondrií a zvýšení intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  (Geloso et al., 2011). V souladu s tím byl prokázán terapeutický efekt různých farmak s antioxidačním či protizánětlivým mechanismem účinku nebo působících na základě normalizace neurotransmise (Corvino et al., 2013). V TMT modelu byly popsány i alterace neurotransmiterových systémů: glutamatergního, GABAergního, cholinergního i monoaminergního. Popsané nálezy naznačují zvýšenou hladinu glutamátu (Aschner et al., 1992; Dawson et al., 1995) a sníženou hladinu GABA v hipokampu (Earley et al., 1992). Tyto změny pravděpodobně přispívají ke kognitivnímu deficitu, jelikož agonisté GABA<sub>A</sub> receptorů (O'Connell et al., 1994) nebo antagonisté NMDA receptorů (Earley et al., 1990) mohou TMT-indukovaný kognitivní deficit zmírňovat. Zda změny neurotransmise přispívají i k neurodegeneraci, nebo jde spíše o sekundární jev, není zcela zřejmé (Corvino et al., 2013; Gunasekar et al., 2001; Koczyk, 1996; Zimmer et al., 1985).

### **1.7.2 Model kognitivního deficitu a cholinergní dysfunkce indukovaný skopolaminem u potkana**

Cholinergní inervace hipokampu a kůry moduluje neuronální excitabilitu a tím i procesy učení a paměti (Fadda et al., 2000; Flicker et al., 1983; Shinoe et al., 2005; von Linstow Roloff et al., 2007). V těchto procesech byla prokázána účast muskarinových cholinergních receptorů (Leaderbrand et al., 2016; Mitsushima et al., 2013; Shinoe et al., 2005). V souladu s tím je možno u zdravých dobrovolníků nebo u laboratorních zvířat aplikací centrálně účinných antagonistů muskarinových receptorů dočasně indukovat kognitivní deficit (Laczó et al., 2017; Misik et al., 2018; von Linstow Roloff et al., 2007). K tomuto účelu se často používá akutní aplikace skopolaminu, rostlinného alkaloidu působícího jako kompetitivní antagonistu muskarinových receptorů všech subtypů (M1–M5) (Bolden et al., 1992; Hulme et al., 1978). Skopolaminovému modelu kognitivního deficitu byla věnována velká pozornost po představení cholinergní hypotézy kognitivních poruch ve stáří (Bartus et al., 1982). Přes pozdější formulaci dalších hypotéz vzniku AD a související reevaluaci role cholinergní dysfunkce coby pouze jednoho z více faktorů přítomných při AD, i objasnění

některých limitací skopolaminem indukovaného modelu, má tento model stále své místo v preklinickém testování nových farmak pro léčbu AD na bázi inhibitorů AChE.

Skopolamin vyvolává u laboratorních hlodavců kognitivní deficit v úlohách zaměřených na dlouhodobou i krátkodobou prostorovou paměť (Morrisovo vodní bludiště, aktivní alotetické vyhýbání místu, radiální bludiště), epizodickou paměť (rozpoznání objektu) a asociativní učení (pasivní vyhýbání, strachové podmiňování) (Entlerova et al., 2013; Kim and Ryu, 2008; Laczó et al., 2017; Puri et al., 2014; Rashid and Ahmed, 2019; Vales and Stuchlik, 2005; Zhang and O'Donnell, 2000). Vedle procesů učení a paměti má skopolamin negativní vliv i na související kognitivní aspekty jako je pozornost (Cheal, 1981). V úlohách zaměřených na prostorovou paměť skopolamin ovlivňuje zejména samotný proces učení (akvizice) (Bejar et al., 1999; Kim and Ryu, 2008); vybavení již dříve naučeného (retrieval) se jeví méně senzitivní (Buresova et al., 1986; Kim and Ryu, 2008). K deficitu prostorové paměti ve skopolaminovém modelu zásadně přispívá narušení cholinergní neurotransmise v hipokampu (Antonova et al., 2011; Blokland et al., 1992; Rashid and Ahmed, 2019). Vedle kognitivního deficitu může opakovaná nebo i jednorázová aplikace skopolaminu vyvolat i další procesy přítomné u AD, jako oxidační stres, (Pattanashetti et al., 2017; Puri et al., 2014; Upadhyay et al., 2018), ovlivnění hladin amyloidu beta, tau proteinu a jeho hyperfosforylaci (Bihaqi et al., 2012; Brunson et al., 2001; Khan and Fatima Shad, 2020; Pattanashetti et al., 2017), neuroinflamaci (Ahmad et al., 2014) a degeneraci korových a hipokampálních neuronů (Bihaqi et al., 2012; Pattanashetti et al., 2017).

Kognitivní deficit indukovaný skopolaminem je možno zmírnit aplikací inhibitorů AChE včetně klinicky používaného donepezilu, galantaminu a rivastigminu. Po aplikaci těchto látek může dále docházet i k normalizaci aktivity AChE, snížení oxidačního stresu a snížení koncentrace amyloidu beta (Bejar et al., 1999; Busquet et al., 2012; Janas et al., 2005; Laczó et al., 2017; Pattanashetti et al., 2017). Mechanismem redukce kognitivního deficitu inhibitory AChE je pravděpodobně částečné vytěsnění skopolaminu z vazby na receptor v důsledku kompetice se zvýšeným množstvím acetylcholinu (Janas et al., 2005).

Nevýhodu modelu může představovat nízká selektivita účinku pro kognitivní funkce. Ovlivněním muskarinových receptorů různých subtypů (Bolden et al., 1992) v centrální i periferní nervové soustavě může systémová aplikace skopolaminu vyvolávat i parasimpatolytický efekt, hyperlokomoci (Sipos et al., 1999) nebo senzomotorický deficit s nejasným vlivem na výkon zvířat v kognitivních testech (Saucier et al., 1996; von Linstow Roloff et al., 2007). Vhodnější alternativu modelu by dle některých autorů mohlo

představovat podání selektivních antagonistů M1 receptorů (Klinkenberg and Blokland, 2010); výsledky studií však nejsou příliš přesvědčivé (Popelíková et al., 2018).

## 1.8 Vybrané behaviorální úlohy

### 1.8.1 Morrisovo vodní bludiště

Morrisovo vodní bludiště (Morris Water Maze, MWM) je dobře etablovaná a běžně využívaná behaviorální metoda hodnocení prostorové kognice laboratorních hlodavců. Úloha využívá averzivní motivace a úkolem zvířete je nalezení ostrůvku skrytého pod vodní hladinou v nádrži kruhového půdorysu (Morris, 1984, 1981; Vorhees and Williams, 2006). V základní verzi úlohy, představené R. Morrisem v 80. letech 20. století, je poloha ostrůvku neměnná (zpravidla ve středu jednoho z kvadrantů) a zvíře je opakovaně vypouštěno z různých míst na periferii bazénu (Morris, 1981). Řešení úlohy závisí na schopnosti alocentrické (alotetické) navigace, tedy prostorové navigace s využitím vzdálených orientačních bodů (Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2014). Klíčovou strukturu pro řešení úlohy představuje hipokampus (Florian and Roulet, 2004; Morris et al., 1982). Základními parametry kognitivního výkonu zvířat jsou latence a dráha do nalezení ostrůvku (Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2006). Kromě popsané základní verze MWM, nazývané někdy jako verze pro dlouhodobou nebo pro referenční paměť, byly představeny i modifikace úlohy určené pro testování pracovní paměti, kognitivní flexibility a dalších aspektů (Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2006).

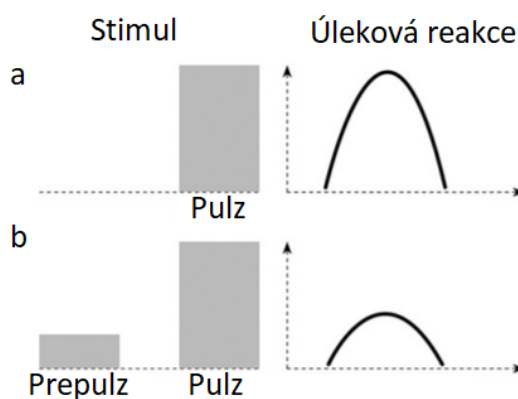
Úloha tedy umožňuje identifikaci deficitu prostorové orientace a učení, fenoménů přítomných u pacientů s AD, a bývá využívána k testování terapeutického účinku farmak v animálních modelech kognitivního deficitu. Pro translační validitu úlohy svědčí výsledky z analogické úlohy určené pro testování lidských subjektů, rovněž založené na lokalizaci skrytého cíle s využitím vzdálených orientačních značek v reálném prostoru ve speciální aréně (tzv. Blue Velvet Arena) nebo ve virtuálním prostoru v počítačové verzi, kdy v obou těchto verzích byl prokázán deficit alotetické orientace u pacientů s AD (Kalová et al., 2005).

### 1.8.2 Další behaviorální úlohy

Jinou relevantní kognitivní úlohou je **kontextuální strachové podmiňování**, úloha založená na asociaci nepodmíněného stimulu (nepříjemný podnět) s prostředím (kontextem), kde byl tento podnět aplikován. Opětovné vystavení kontextu pak vede u intaktních zvířat k projevům tzv. freezingu, tedy absence pohybu, odrážejícím strachovou reakci a tedy intaktní schopnost učení (Curzon et al., 2008).

V odůvodněných případech byly v práci využity i nekognitivní úlohy. Jednou z nich je **test otevřeného pole**, jenž slouží ke studiu spontánní lokomoční aktivity v novém prostředí (Walsh and Cummins, 1976).

Další úlohu představuje test **prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (PPI)**. Úleková reakce je reflexní odpověď na náhlý intenzivní stimul. PPI označuje fyziologické snížení amplitudy úlekové reakce, způsobené prezentací stimulu (prepulzu) nižší intenzity, samostatně nedostačujícího k vyvolání úlekové reakce, bezprostředně před zvukovým stimulem (pulzem) vyvolávajícím úlek (obr. 5). Tento fenomén je měřítkem sensorimotorického zpracování (gatingu) a je zprostředkován mozkovým kmenem za modulace limbickými strukturami (Hoffman and Searle, 1965; Kohl et al., 2013).



**Obr. 5** Schématické znázornění principu prepulzní inhibice úlekové reakce. **a:** Prezentace zvukového pulzu vyvolá úlekovou reakci (motorickou odpověď). **b:** Prezentace prepulzu nižší intenzity bezprostředně před pulzem vede u zdravého zvířete k prepulzní inhibici úlekové reakce, tj. snížení amplitudy motorické odpovědi. Upraveno dle (Kohl et al., 2013).

**Vyvýšené křížové bludiště** je běžně využívaná úloha k hodnocení anxiety laboratorních hlodavců. Úloha je založena na přirozené preferenci tmavých uzavřených prostor a averzi k otevřeným prostorům, a konfliktu těchto tendencí s přirozenou explorační aktivitou. Podání anxiolytik má za následek intenzivnější explorační aktivitu v otevřených ramen bludiště a tedy i prodloužení doby zde strávené (Pellow et al., 1985; Walf and Frye, 2007).

## 2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Nedílnou součástí preklinických testů nových látek s potenciálem pro léčbu AD představuje testování účinnosti v animálních modelech kognitivního deficitu. Vzhledem k multifaktoriální povaze AD je v současné době v rámci vývoje nových farmakologických přístupů věnována pozornost konceptu simultánního ovlivnění více relevantních cílů či patofyziologických drah, potenciálně umožňujícímu vylepšení celkového terapeutického efektu. Uvedeného lze docílit prostřednictvím kombinované terapie nebo multipotentních sloučenin.

Celkovým cílem práce proto bylo posouzení účinnosti vybraných multipotentních sloučenin a kombinované aplikace v modelech kognitivního deficitu u laboratorního potkana a charakterizace behaviorálních účinků těchto látek. Obecným mechanismem účinku společným pro testované látky je působení na neurotransmitterové systémy mozku: glutamatergní, GABAergní a/nebo cholinergní systém. Dílčí experimenty provedené v rámci této práce 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

Dle recentních preklinických poznatků by se v léčbě AD mohly vedle antagonistů NMDA receptorů potenciálně uplatnit i pozitivní alosterické modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů. Lze předpokládat, že při koaplikaci by tyto typy látek mohly působit synergisticky ve smyslu obnovy rovnováhy excitace a inhibice a následného zmírnění kognitivního deficitu. Tato část práce se proto zabývá porovnáním účinku experimentální kombinované terapie antagonisty NMDA receptorů (MK-801) a pozitivními modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů (midazolam) s účinky monoterapie v animálním modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace vyvolaném TMT. Pozitivní výsledky by mohly být podnětem pro další budoucí výzkum s perspektivou vývoje MTDL.

#### 2.1.1 Hypotéza

Kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu povede k výraznějším terapeutickým efektům, než monoterapie těmito látkami.

### **2.1.2 Cíle práce**

Cílem Experimentu 1 bylo:

- zavést model kognitivního deficitu u potkana vyvolaný TMT na našem pracovišti;
- porovnat účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu kognitivního deficitu indukovaném TMT v úlohách MWM a kontextuální strachové podmiňování;
- pomocí kontrolních behaviorálních procedur vyloučit významné ovlivnění výkonu zvířat v kognitivních úlohách nespécifickými účinky TMT na celkový zdravotní stav;
- porovnat vliv MK-801, midazolamu a jejich koaplikace na TMT-indukovanou neuronální degeneraci v dorzálním hipokampu, a to s využitím stereologického odhadu neuronální denzity v oblasti CA2/3 a dále i morfometrických analýz dorzálního hipokampu a histochemického značení degenerujících neuronů.

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

Inhibitory AChE mohou prostřednictvím facilitace cholinergní neurotransmise zmírňovat projevy kognitivního deficitu v klinické praxi i v animálních modelech. Inhibice AChE často představuje jeden z mechanismů účinku nově vyvíjených multipotentních sloučenin. Experiment 2 byl zaměřen na testování účinnosti nově syntetizovaných takrinových derivátů s vlastnostmi MTDL: heterodimeru 6-chlorotakrinu s 6-nitrobenzothiazolem (látka 10w, Experiment 2A) nebo s L-tryptofanem (látka S-K1035, Experiment 2B). Společnou vlastností těchto látek, podstatnou pro tuto práci, je inhibiční působení na AChE. Účinek látek byl studován v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem, jehož podkladem je disrupce cholinergní neurotransmise. Vedle námi analyzovaného účinku na cholinergní systém tyto MTDL disponují i inhibičním působením vůči agregaci amyloidu beta a některými z dalších účinků potenciálně relevantních pro léčbu AD (inhibice nNOS, inhibice AβAD).

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

### **2.2.1.1 Hypotéza**

Aplikace dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka 10w) jakožto inhibitoru AChE povede ke zmírnění kognitivního deficitu indukovaného skopolaminem.

### **2.2.1.2 Cíle práce**

Cílem Experimentu 2A bylo:

- orientačně zjistit maximální tolerovanou dávku testované látky 10w;
- prozkoumat účinek látky 10w v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem v úloze MWM a porovnat jej s účinkem takrinu.

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

### **2.2.2.1 Hypotéza**

Aplikace dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka S-K1035) jakožto inhibitoru AChE a BChE povede ke zmírnění kognitivního deficitu indukovaného skopolaminem.

### **2.2.2.2 Cíle práce**

Cílem Experimentu 2B bylo:

- zjistit účinek látky S-K1035 v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem v úloze MWM;
- ověřit vliv samotné látky na chování zdravých zvířat v úloze MWM.

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

Inhibitory AChE i antagonisté NMDA receptorů disponují potenciálem pro léčbu AD a jejich účinky se mohou vhodně doplňovat. Mnozí zástupci antagonistů NMDA receptorů však vykazují závažné nežádoucí psychotomimetické účinky, které znemožňují klinické využití a u laboratorních hlodavců se projevují mimo jiné jako hyperlokomoce a narušení prepulzní inhibice úlekové reakce. Screening behaviorálních účinků proto v případě antagonistů NMDA receptorů představuje integrální součást preklinického výzkumu, předcházející testům terapeutické účinnosti. Předmětem této části práce je proto charakterizace behaviorálních účinků nových monotakrinových derivátů působících jako



inhibitory AChE a antagonisté NMDA receptorů (7-fenoxytakrin, Experiment 3A, a série látek pracovně nazvaných K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599, Experiment 3B).

### **2.3.1 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu**

#### **2.3.1.1 Hypotéza**

Vzhledem ke známým vedlejším účinkům antagonistů NMDA receptorů by se u 7-fenoxytakrinu dalo očekávat riziko indukce hyperlokomoce, a dále anxiolytické účinky.

#### **2.3.1.2 Cíle práce**

Cílem Experimentu 3A bylo:

- zjistit vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu zdravých potkanů;
- zjistit vliv 7-fenoxytakrinu na hyperlokomoci indukovanou antagonistou NMDA receptorů MK-801;
- zjistit vliv 7-fenoxytakrinu na anxiету u zdravých potkanů;
- zjistit vliv koaplikace 7-fenoxytakrinu a MK-801 na anxiету.

### **2.3.2 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů**

#### **2.3.2.1 Hypotéza**

Vzhledem ke známým nežádoucím účinkům antagonistů NMDA receptorů by se dalo u studovaných látek (nové deriváty takrinu nazvané K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599) očekávat riziko psychotomimetických účinků, manifestovaných jako hyperlokomoce a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce.

#### **2.3.2.2 Cíle práce**

Cílem Experimentu 3B bylo:

- zjistit vliv testovaných látek na lokomoční aktivitu;
- zjistit vliv testovaných látek na prepulzní inhibici úlekové reakce.

## 3 METODIKA

### 3.1 Obecné metodické přístupy

#### 3.1.1 Zvířata

Ve všech experimentech byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar. Věk, hmotnost a dodavatel zvířat i počet zvířat v experimentálních skupinách v rámci jednotlivých experimentů jsou specifikovány níže. Potkani byli ustájeni v průhledných plastových klecích (20 × 25 × 40 cm) umístěných v klimatizovaném zvířetníku s konstantní teplotou (22 °C), vlhkostí vzduchu (50–60 %) a 12h světelným cyklem (světelná fáze: 6.00–18.00 h). Voda a krmivo byly k dispozici *ad libitum*. Pokud není uvedeno jinak (Experiment 1), potkani byli ustájeni v párech. Experimenty byly zahájeny po uplynutí sedmidenní navykací doby a probíhaly ve světelné části dne.

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

#### 3.1.2 Morrisovo vodní bludiště: aparatura, základní postup a parametry

Aparatura pro MWM sestávala z modrého plastového kruhového bazénu o průměru 180 cm naplněného vodou (hloubka 28 cm) o definované teplotě, zbarvenou malým množstvím netoxické šedé barvy. V bazénu byla ve středu určeného kvadrantu umístěna plošina („ostrůvek“) kruhového půdorysu (průměr 10 cm) z průhledného plastu, ponořená 1 cm pod vodní hladinou. Úkolem zvířat bylo naučit se tento ostrůvek nalézt. Ve všech experimentech byla použita základní verze úlohy s konstantní pozicí skrytého ostrůvku po celou dobu experimentu. Experiment probíhal během čtyř po sobě následujících dnů. Každý den zvířata absolvovala daný počet plaveb (dle jednotlivých experimentů). Zvířata byla vypouštěna do vody z různých startovních míst na periferii bazénu (označených podle světových stran), a to hlavou směrem k vnitřní stěně bazénu. Časový limit pro jednu plavbu byl 60 s. Pokud zvíře nenašlo ostrůvek v časovém limitu, bylo na ostrůvek navedeno experimentátorem. Konkrétní experimentální design použitý u jednotlivých experimentů je popsán níže v příslušných kapitolách.

K zaznamenávání polohy potkana během experimentu sloužila kamera umístěná nad středem bazénu, připojená k digitálnímu systému (iTrack, Biosignal Group, New York, NY, USA) umožňujícímu záznam pozic potkana se vzorkovací frekvencí 25 Hz. Data byla

později analyzována pomocí programu Carousel Maze Manager 0.4.0 (Bahník, 2014). Sledovanými parametry kognitivního výkonu při tréninkových plavbách byla latence a dráha uražená potkanem do nalezení ostrůvku (nebo do uplynutí časového limitu plavby). Výhodou dráhy je menší riziko jejího ovlivnění rychlostí pohybu zvířete (Vorhees and Williams, 2006). Dráha byla definována jako součet vzdáleností mezi pozicemi potkana snímanými v 1s intervalech. Ve vybraných případech byla analyzována i průměrná vzdálenost od ostrůvku (průměr vzdáleností pozic zvířete od ostrůvku, snímaných s vzorkovací frekvencí kamery během celé plavby), která představuje méně často využívaný parametr, ale dle některých autorů přesněji odráží prostorovou strategii učení (Whiting and Kokiko-Cochran, 2016). Zvířata s narušenou schopností alotetické orientace mohou zaujímat různé alternativní neprostorové strategie (např. pohyb v kruzích v určité vzdálenosti od stěny bazénu – „circling“), které mohou občas vést ke spíše náhodnému nalezení ostrůvku (Gallagher et al., 1993). Na rozdíl od latence není průměrná vzdálenost od ostrůvku ovlivněna těmito situacemi (Whiting and Kokiko-Cochran, 2016). Všechny výše jmenované parametry jsou vyjádřeny jako průměr hodnot ze všech plaveb za daný den. V Experimentu 1 byly analyzovány i další parametry, které budou popsány níže.

### **3.1.3 Statistické vyhodnocení**

Ke statistické analýze byl použit program GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA). V případě Experimentu 3B byla použita verze GraphPad Prism 8. Rozdíly byly považovány za významné při  $p < 0,05$ . Symboly (\*, #) v grafech označují statistickou signifikanci, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Pokud není uvedeno jinak, sloupcové grafy ukazují skupinový průměr + střední chyba průměru (SEM). Statistické metody použité při analýze jednotlivých experimentů jsou popsány v příslušných oddílech.

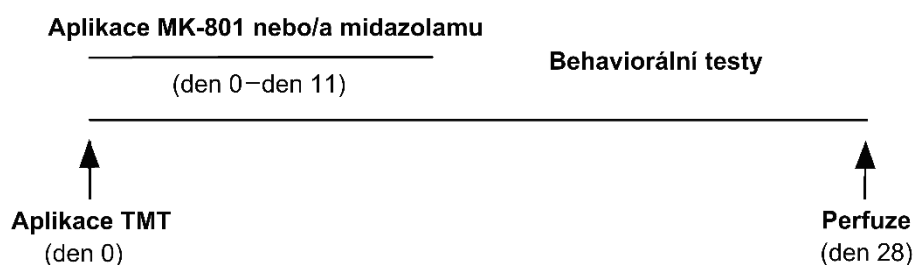
## **3.2 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem**

### **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. Úzké věkové rozmezí 10–11 týdnů při vstupu do experimentu bylo zvoleno na základě výsledků pilotních experimentů a bylo pečlivě dodrženo kvůli věkové závislosti účinku TMT (Scallet et al., 2000). Z důvodu možného rozvoje agresivity po aplikaci TMT (Brown et al., 1979; Kaur and Nehru, 2013) byla zvířata ode dne aplikace TMT ustájena samostatně.

Potkani byli pseudonáhodně rozděleni do pěti skupin dle aplikovaných látek: FYZ (fyziologický roztok), TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam, TMT + MK-801 + midazolam. Na počátku experimentu (označeno den 0) byl zvířatům *i. p.* injikován TMT v dávce 8 mg/kg tělesné hmotnosti (trimethylcín chlorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; hmotnost TMT vyjádřena jako celková sůl, rozpuštěný v 0,9% fyziologickém roztoku, 8 mg/ml). Dávka TMT byla zvolena na základě literatury (Balaban et al., 1988; Earley et al., 1990; O'Connell et al., 1994). Kontrolní zvířata (skupina FYZ) obdržela odpovídající objem fyziologického roztoku. MK-801 v dávce 0,1 mg/kg/den ((+)-MK-801 hydrogen maleát, Sigma-Aldrich, rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, 0,1 mg/ml), midazolam v dávce 5 mg/kg/den (midazolam hydrochlorid, Dormicum, Roche, Praha, ČR; 5 mg/ml) nebo obojí byly aplikovány zvířatům z příslušných skupin 30 min před aplikací TMT v den 0 a poté denně až do dne 11. Kontrolním zvířatům (FYZ) a zvířatům ze skupiny TMT byl aplikován fyziologický roztok. Všechny látky byly podávány *i. p.* Po ukončení protektivní aplikace následovaly behaviorální testy a odběr materiálu pro histologii. Pro přehlednost je zařazen obr. 6, ukazující časové schéma experimentu.

Počet zvířat ve skupinách byl: 7 (FYZ), 8 (TMT), 6 (TMT + MK-801), 6 (TMT + midazolam) a 5 (TMT + MK-801 + midazolam).



Obr. 6 Schéma časového uspořádání experimentu.

### 3.2.2 Morrisovo vodní bludiště: postup a parametry

Testování prostorové paměti v MWM bylo zahájeno 12. den po aplikaci TMT a probíhalo během čtyř po sobě následujících dnů. Každý den zvířata absolvovala 8 tréninkových plaveb z různých startovních míst (v pseudonáhodném pořadí: SZ, SV, JV, Z, J, S, JZ, E). Ostrůvek byl umístěn v JZ kvadrantu, teplota vody byla 21–22 °C. Poslední den MWM byla po absolvování tréninkových plaveb provedena tzv. zkušební plavba (probe trial): ostrůvek byl odstraněn a zvíře bylo na 30 s vypuštěno do bazénu. Následovala plavba s viditelným ostrůvkem, kdy byl ostrůvek vrácen na původní pozici, vyvýšen 1 cm nad hladinu a opatřen kontrastním okrajem pro lepší viditelnost. Časový limit pro tuto plavbu byl 60 s.

Analyzovanými parametry tréninkových plaveb byly dráha, latence a průměrná vzdálenost od ostrůvku. Kromě toho byla vypočtena tzv. kumulativní latence (součet latencí všech plaveb ze 3. a 4. dne MWM) jako měřítko nejlepšího dosaženého výkonu (Mátéffyová et al., 2006). Tyto dny byly zvoleny na základě dosažení asymptotické úrovně výkonu ve všech skupinách (mezi výkonem dané skupiny 3. a 4. den MWM nebyl statisticky významný rozdíl; platilo pro dráhu i latenci; dvoucestná analýza rozptylu (ANOVA) s opakovanými měřeními a Bonferroniho post hoc testy). Při zkušební plavbě bylo analyzováno procento času stráveného v cílovém kvadrantu, kde byl původně umístěn ostrůvek, jako další parametr prostorové paměti (Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2006). Plavba s viditelným ostrůvkem byla kontrolní procedurou k prověření možné přítomnosti nekognitivních fenoménů (např. změny motivace nebo motorických a sensorických funkcí), které by mohly nespecificky ovlivnit hodnoty kognitivních parametrů; závislou proměnnou byla latence nalezení ostrůvku. Zhoršená výkonnost v tréninkových plavbách v MWM doprovázená intaktním výkonem v testu s viditelným ostrůvkem naznačuje selektivní poškození kognitivních funkcí (Morris, 1984), zatímco za současného narušení schopnosti nalezení viditelného ostrůvku nelze klíčovou roli kognitivního deficitu potvrdit (Vorhees and Williams, 2006).

### **3.2.3 Test otevřeného pole**

Test otevřeného pole posuzující spontánní lokomoční aktivitu sloužil jako kontrolní procedura a byl opakován v týdenních intervalech: v den 0 před podáním TMT, dále v den 7, den 14 a den 21. Byla použita aparatura TSE Multi Conditioning System (TSE Systems, Bad Homburg, Německo) čtvercového půdorysu (44 × 44 cm) s odpovídajícím softwarem (TSE ActiMot). Aktivita zvířete byla sledována po dobu 10 min. Závislou proměnnou představovala dráha, kterou zvíře urazilo. Pro poruchu aparatury bylo jedno zvíře ze skupiny FYZ a jedno zvíře ze skupiny TMT vyloučeno z následné analýzy.

### **3.2.4 Kontextuální strachové podmiňování**

Byla použita aparatura TSE Multi Conditioning System se softwarem TSE ActiMot, umožňující administraci elektrického impulsu i následnou analýzu aktivity zvířat pomocí infračervených senzorů. Experiment probíhal 17. a 18. den po aplikaci TMT a sestával ze dvou fází. Během první fáze (učení) bylo zvíře na umístěno do testovacího boxu (44 × 44 cm; podlážku tvořila mřížka z koroziuvzdorné oceli). Po 3 min byl prostřednictvím podlážky administrován elektrický impuls (1 mA, stejnosměrný, 2 000 ms). Po dalších 2 min se impuls zopakoval a poté bylo zvíře vyjmut. Za 24 h následovala druhá (testovací) fáze, kdy bylo

zvíře na 5 min umístěno do stejného boxu (bez elektrického impulsu) a byla zaznamenávána jeho pohybová aktivita. Měřenou veličinou byl freezing, definovaný jako absence pohybů zvířete po dobu více než 2 s. Byla analyzována celková (kumulativní) doba freezingu během sezení.

### **3.2.5 Odběr tkáně pro histologii**

Osmadvacátý den po aplikaci TMT bylo přistoupeno k fixaci a odběru mozkové tkáně pro histologické účely metodou transkardiální perfuze. Pro účely perfuze byl připraven roztok 0,01M fosfátového pufru obohaceného o soli (PBS) a roztok fixativa. Pro přípravu 1 l 0,01M PBS bylo použito 900 ml destilované H<sub>2</sub>O, 82,5 ml roztoku 1 (připraveného smísením 42,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 238,4 g NaCl a 3 l destilované H<sub>2</sub>O) a 17,5 ml roztoku 2 (připraveného smísením 13,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 79,5 g NaCl, a 1 l destilované H<sub>2</sub>O); pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,4. Jako fixativum byl použit roztok 4% paraformaldehydu a 15% kyseliny pikrové v 0,15M fosfátovém pufru (pH 7,4). Pro přípravu 1 l fixativa bylo rozpuštěno 40 g paraformaldehydu v 200 ml destilované H<sub>2</sub>O, přidáno 20 kapek (cca 750 µl) 8M NaOH, roztok temperován na 60 °C a míchán do vyčerení. Poté bylo přidáno 375 ml 0,4M fosfátového pufru (0,4M fosfátový pufr byl připraven smísením 46,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O a 1 l destilované H<sub>2</sub>O) a 150 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové (vše Sigma-Aldrich). Roztok byl doplněn destilovanou H<sub>2</sub>O na objem 1l a přefiltrován. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 a roztok ochlazen v ledové lázni.

Před perfuzí byla zvířata předávkována směsí anestetik ketaminu (Narketan, Vétoquinol, Lure, Francie; 120 mg/kg) a xylazinu (Rometar, Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR; 6 mg/kg). Poté byl otevřen hrudní koš, podvázána břišní aorta, prostřížena pravá srdeční předsíň a do levé srdeční komory byla zavedena ztupená kanyla a provedeno promytí 0,01M roztokem PBS (pH 7,4) a poté perfuze vychlazeným roztokem fixativa. Čerpání perfuzních roztoků zajišťovala peristaltická pumpa (Gilson, Middleton, WI, USA). K perfuzi jednoho potkana bylo použito přibližně 100 ml 0,01M PBS a 300 ml roztoku fixativa, průtok byl 50 ml/min. Následně byl vypreparován mozek a provedena postfixace ponořením do roztoku fixativa přes noc při 4 °C, poté byly vzorky opláchnuty 0,01M PBS a provedena kryoprotekce vzestupnou koncentrační řadou (10% a 30%) roztoků sacharózy v PBS při 4 °C. Po dokončení kryoprotekce (poklesnutí vzorku na dno nádobky s 30% sacharózou) byly mozky zmrazeny na suchém ledu a uskladněny při -80 °C.

Mozky byly krájeny v koronální rovině na řezy o síle 50  $\mu\text{m}$  pomocí kryokatu Leica CM1850 (Leica Biosystems, Nussloch, Německo) při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mozky byly krájeny do šesti sérií. Jedna náhodně zvolená série (tj. každý 6. řez) byla následně použita pro Nisslovo barvení. Po ní následující série byla použita na histochemické barvení FluoroJade B a třetí série na imunohistochemické barvení neuronálních jader (NeuN).

### **3.2.6 Imunohistochemické značení neuronů pro stereologickou analýzu**

Pro účely následné stereologické kvantifikace byly neurony imunohistochemicky značeny protilátkou proti neuronálnímu jadernému antigenu NeuN, jenž je markerem neuronů (Mullen et al., 1992). Sekundární protilátka byla vizualizována metodou avidin-biotin. Postup byl modifikován dle (Kršek et al., 2004).

Histologické řezy byly čtyřikrát promyty 0,01M PBS (pH 7,6), poté 10 min inkubovány v 0,15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  v 0,01M PBS, čtyřikrát promyty v 0,01M PBS, inkubovány po dobu 10 min v 0,1M glycinu a 0,1M lysinu v 0,01M PBS a promyty dvakrát v 0,01M PBS a jednou v 0,3% Tritonu-100 v 0,01M PBS. Následně byly řezy inkubovány po dobu 60 min v roztoku obsahujícím 2% normální koňské sérum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 0,3% Triton-100 a biotin (250 mg/ml) v 0,01M PBS (blokování). Následovala inkubace po dobu 72 h v roztoku obsahujícím primární protilátku (anti-NeuN, myší monoklonální, klon A60, Chemicon International, Temecula, CA, USA, ředění 1 : 1 000), 1,5% normální koňské sérum, 0,3% Triton-100 a azid sodný (0,2 mg/ml) v 0,01M PBS při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byly řezy čtyřikrát promyty v 0,01M PBS a jednou v 0,3% Triton-100 v 0,01M PBS a inkubovány po dobu 60 min v roztoku obsahujícím sekundární protilátku (biotinylovaný koňský anti-myší IgG, BA-2001, Vector Laboratories, ředění 1 : 200), 1,5% normální koňské sérum a 0,3% Triton-100 v 0,01M PBS. Poté byly řezy opět čtyřikrát promyty v 0,01M PBS a inkubovány po dobu 60 min s použitím ABC kitu (komplex avidin/biotinylovaný enzym; Vectastain ABC-HRP kit, Peroxidase, Standard, Vector Laboratories) v 0,01M PBS. Po čtyřech promytích v 0,01M PBS a jednom v 0,05M TRIS (pH 7,4) byly sekundární protilátky vizualizovány pomocí 0,05% roztoku 3,3-diaminobenzidinu a 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  v 0,05M TRIS. Po třech promytích v 0,01 M PBS byly řezy nataženy na želatinou potažená podložní skla a usušeny přes noc při pokojové teplotě. Druhý den byly ponořeny do xylenu a s použitím montovacího média Solakryl BMX (Solakryl, Česká republika) překryty krycím sklem. (Pokud není uvedeno jinak, výrobcem chemikálií je Sigma-Aldrich.)

### 3.2.7 Nisslovo barvení

Histologické řezy určené na morfometrické analýzy hipokampu byly obarveny kresylvioletí (Nisslovo barvení). Řezy byly nataženy na želatinou potažená podložní skla a usušeny přes noc při pokojové teplotě. Poté byla skla s řezy inkubována v 96% etanolu (10 min), 70% etanolu (5 min) a 50% etanolu (5 min), opláchnuta ponořením v 0,1% CH<sub>3</sub>COOH, inkubována v roztoku kresylvioleti (Sigma-Aldrich; 0,5% roztok kresylvioleti v 0,1% CH<sub>3</sub>COOH), opláchnuta v 0,1% CH<sub>3</sub>COOH a poté pod tekoucí destilovanou vodou. Následovala inkubace 70% etanolu (5 min), 96% etanolu (5 min), xylenu (5 min) a překrytí preparátu krycím sklem.

### 3.2.8 Histochemické barvení Fluoro Jade B

Za účelem vizualizace degenerujících neuronů byla jedna série histologických řezů histochemicky barvena anionickým fluorochromem Fluoro jade B (Schmued and Hopkins, 2000a). Řezy byly nataženy na želatinou potažená podložní skla a usušeny přes noc při 37 °C. Druhý den byla skla s řezy inkubována v absolutním etanolu (3 min), 70% etanolu (3 min), opláchnuta v destilované vodě (2 min), 0,06% roztoku KMnO<sub>4</sub> (15 min) a opět opláchnuta v destilované vodě (2 min). Následovala inkubace v 0,001% roztoku Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) v 0,1% CH<sub>3</sub>COOH za tmy za mírného kývání (30 min) a oplach v destilované vodě (3× 1 min). Po usušení při 37 °C do druhého dne byly preparáty odvodněny v xylenu a překryty krycími skly. Preparáty byly vizualizovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX53 s filtry FITC. Vzhledem k výsledkům analýza sestávala pouze z vizuálního posouzení oblasti dorzálního hipokampu.

### 3.2.9 Dvojí barvení Fluoro-Jade B a GFAP

V návaznosti na nález Fluoro-Jade B pozitivních objektů astrocytální morfologie v hipokampu zvířat ze skupin TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam a TMT + MK-801 + midazolam bylo u jednoho zvířete ze skupiny TMT a jednoho kontrolního ze skupiny FYZ provedeno dodatečné dvojí barvení Fluoro-Jade B a GFAP za účelem objasnění domnělého astrocytálního původu pozorovaných objektů. Histologické řezy byly čtyřikrát promyty v 0,01M PBS (pH 7,6), 60 min inkubovány při pokojové teplotě v 5% normálním kozím séru (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a 0,3% Triton-100 v 0,01M PBS (blokování), přes noc inkubovány při 8 °C v roztoku s primární protilátkou (anti-GFAP, králičí polyklonální, Z334, Dako Schweiz AG, Švýcarsko, ředění 1 : 5 000) v 2% kozím séru a 0,3% Triton-100 v 0,01M PBS. Následně byly řezy čtyřikrát promyty v PBS a inkubovány 4 h při pokojové teplotě bez přístupu světla se sekundární protilátkou (kozí anti-králičí IgG značený



Alexa Fluor Plus 555, A32732, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) v 2% kozím séru a 0,3% Triton-100 v 0,01M PBS. Poté byly řezy čtyřikrát promyty v PBS, nataženy na želatinou potažené podložní sklo a vysušeny. Následovalo barvení Fluoro-Jade B: inkubace v 70% etanolu (4 min), destilované vodě (2 min), 0,06% roztoku  $\text{KMnO}_4$  (12 min), destilované vodě (2 min), 0,0001% roztoku Fluoro-Jade B v 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  za tmy za mírného kývání (20 min) a oplach v destilované vodě ( $3 \times 1$  min). Nakonec byl preparát překryt krycím sklem s využitím média Solakryl. Řezy byly zobrazeny fluorescenčním mikroskopem a byla vizuálně hodnocena kolokalizace Fluoro-Jade B a GFAP v oblasti *hilu gyru dentatu*.

### **3.2.10 Stereologický odhad neuronální denzity v oblasti CA2/3 ve vybrané části dorzálního hipokampu**

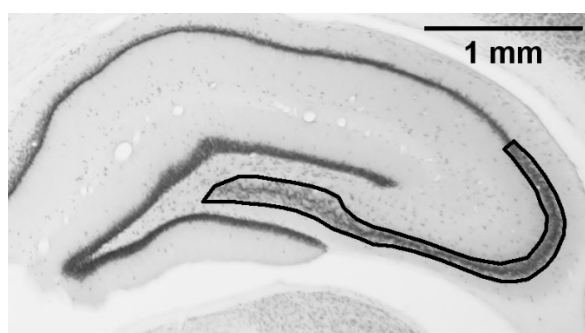
Hipokampální neurodegenerace byla kvantifikována na základě neuronální denzity. Analyzovanou oblastí byla pyramidální vrstva CA2/3 (obr. 7) v části dorzálního hipokampu vymezené vzdáleností  $-2,92$  až  $-4,08$  od Bregmy dle stereotaktického atlasu mozku potkana (Paxinos and Watson, 2007). Oblast CA3 je citlivá na poškození vyvolané TMT (Whittington et al., 1989) a zároveň i nutná pro řešení MWM (Florian and Rouillet, 2004). Protože hranice CA3/CA2 není vždy snadno detekovatelná, oblast CA2 byla rovněž zahrnuta do měřené oblasti. Od každého zvířete použito pět histologických řezů barvených NeuN, levý a pravý hipokampus byly analyzovány zvlášť. (Nomenklatura CA3, CA2 dle (Paxinos and Watson, 2007).)

K analýze počtu neuronů byl využit optický frakcionátor, stereologická metoda umožňující výpočet odhadu celkového počtu buněk v celém objemu studované tkáně na základě stanovení počtu těchto buněk pomocí 3D proby, a sice optického disektoru, ve známé frakci objemu tkáně, zvolené systematickým rovnoměrným a náhodným výběrem. Při vhodném designu experimentu tato kombinace optického disektoru a frakcionátoru umožňuje získání přesného a nevychýleného („unbiased“) odhadu počtu buněk (West et al., 1991). Umožňuje tedy přesnější a objektivnější hodnocení neurodegenerace než semikvantitativní metody (skórování poškození). Nevýhodou metody je časová náročnost.

Byl použit mikroskop Olympus BX51 s motorizovaným stolcem, kamerou a programem Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). Po vyznačení hranic sledované oblasti v daném řezu (objektiv  $10\times$ ) probíhalo vlastní počítání neuronů (objektiv  $100\times$ , imerzní) s využitím počítačích okének o rozměrech  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . Systematický rovnoměrný a náhodný výběr vzorkovacích míst zajišťovala náhodně umístěná mřížka o rozměrech

150 × 150 μm. Výška disektoru byla 7 μm. Tloušťka tkáně byla měřena na každém vzorkovacím místě. Byly použity ochranné zóny, aby se zabránilo ovlivnění výsledku abnormalitami povrchu tkáně; vzdálenost ochranné zóny byla 0,6 μm. Koeficient chyby pro jedno měření (Gundersen,  $m = 1$ ) byl  $\leq 0,07$ .

Vedle odhadu počtu neuronů program vypočetl i objem analyzované části tkáně. Neuronální denzita byla poté vypočítána jako podíl stereologického odhadu celkového počtu neuronů a objemu analyzované tkáně. Pravý a levý hipokampus byl analyzován samostatně a následně byla pro každé zvíře vypočítána průměrná hodnota neuronální denzity ve studované oblasti a použita pro statistickou analýzu.



**Obr. 7** Vymezení oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu, v níž byla analyzována neuronální denzita. Koronální řez, pravý hipokampus, neurony značeny imunohistochemicky (NeuN).

### 3.2.11 Morfometrie vybrané části dorzálního hipokampu

Neurodegenerace vyvolaná TMT může vést k morfologickým alteracím hipokampu (Dyer et al., 1982). Jako doplňující parametry hipokampální degenerace byla proto provedena následující měření. S výjimkou měření výšky hipokampu bylo použito pět řezů obarvených kresylvioletí, odpovídajících řezům obarveným NeuN. Pomocí mikroskopu (Olympus BX53; objektiv 2×) s kamerou (Olympus DP74) a softwarem (Olympus CellSens Dimension 1.18) byly pořízeny mikrofotografie řezů. K měření byl následně použit software Fiji (ImageJ 2.0.0, Bethesda, MD, USA). Měření byla vždy provedena pro levý i pravý hipokampus ve všech analyzovaných řezech a poté byl pro daného jedince vypočítán průměr ze všech těchto měření.

### **3.2.11.1 Velikost plochy gyru dentatu**

Měření plochy *gyru dentatu* bylo zařazeno na základě popsaného ztenčení *gyru dentatu* v důsledku intenzivní TMT-indukované neurodegenerace v podoblasti CA3c v dorzálním hipokampu (Dyer et al., 1982). (Oblast CA3c definována dle (Hunsaker et al., 2008).) Měřená oblast byla vymezena obkreslením vnějších okrajů suprapyramidální a infrapyramidální části granulórní vrstvy *gyru dentatu*. Útvar byl uzavřen propojením temporálních konců suprapyramidální a infrapyramidální části granulórní vrstvy úsečkou. Vznikl tedy útvar zahrnující granulórní vrstvu *gyru dentatu*, část pyramidální vrstvy CA3 a oblast *hilu*. Byla změřena velikost plochy útvaru (obr. 8a).

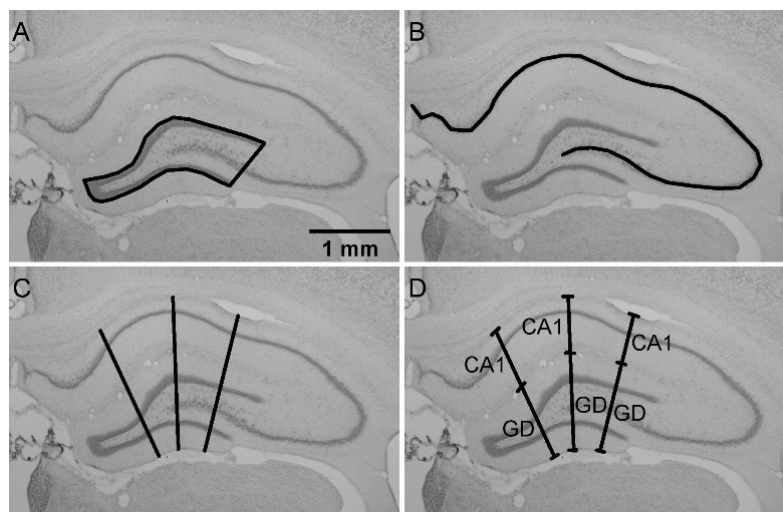
### **3.2.11.2 Délka linie pyramidálních buněk**

Neurodegenerace vyvolaná TMT je nejintenzivnější v podoblasti CA3c, která může být z velké části eliminována. V případě závažnějšího poškození se intenzivní degenerace může šířit z CA3c směrem k CA3a. V důsledku toho může být pozorováno zkrácení linie pyramidálních buněk (Dyer et al., 1982). V našem experimentu studovaná oblast sestávala z oblastí CA3, CA2, CA1 a dále také *fasciola cinereum*. Podél této oblasti byla vedena křivka, jejíž délka byla změřena (obr. 8b).

### **3.2.11.3 Výška hipokampu, CA1 a gyru dentatu**

Po aplikaci TMT bylo popsáno ztenčení hipokampu a zejména jeho dorzální části (Robertson et al., 1987). Metoda měření výšky (tloušťky) hipokampu a CA1 byla modifikována dle (Nairismägi et al., 2006). Z původních pěti řezů byly pro tato měření použity pouze tři posteriorní řezy. Byly sestrojeny tři úsečky spojující *alveus* a ventrální povrch infrapyramidální molekulární vrstvy *gyru dentatu*, vedené tak, aby rozdělávaly granulórní vrstvu *gyru dentatu* na čtyři přibližně stejné části. Délka všech úseček byla změřena. Tato měření byla provedena pro levý i pravý hipokampus ve všech třech analyzovaných řezech a poté byl vypočítán průměr ze všech těchto měření (18 úseček), představující výšku hipokampu (obr. 8c).

Výška hipokampu je součtem výšky oblastí CA1 a *gyrus dentatus* (zahrnující i *hilus* a část CA3). Hranicí těchto oblastí je hipokampální fisura. Výška obou těchto oblastí byla rovněž změřena (obr. 8d). Měření byla opět provedena pro levý i pravý hipokampus ve všech analyzovaných řezech a poté byl vypočítán průměr.



**Obr. 8** Morfometrie hipokampu – měřené oblasti. Koronální řezy barvené kresylvioletí ukazují pravý dorzální hipokampus s vyznačenými měřenými oblastmi: **a:** plocha *gyru dentatu*, **b:** délka linie pyramidálních buněk, **c:** výška hipokampu, **d:** výška CA1 a výška *gyru dentatu* (označeno GD).

### 3.2.12 Statistické vyhodnocení

K analýze dráhy, latence a průměrné vzdálenosti od ostrůvku v MWM byla použita dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními (faktory skupina a den) následovaná Bonferroniho post hoc testy k posouzení efektu skupiny (rozdíly mezi skupinami v rámci každého dne). Pro dráhu byl proveden i Bonferroniho post hoc test k posouzení efektu dne (rozdíly mezi dny v rámci každé skupiny). Při zkušební plavbě bylo porovnáno procento času stráveného v cílovém kvadrantu s hodnotou odpovídající náhodné preferenci kvadrantů (25 %) pomocí jednovýběrového t-testu. Data latence při plavbě s viditelným ostrůvkem a kumulativní latence v MWM nespĺňovala předpoklady pro ANOVA (normální rozdělení dat a homogenita rozptylů, dle Kolmogorovova–Smirnovova testu, resp. Bartlettova testu), byl proto použit Kruskalův–Wallisův test následovaný Dunnovým post hoc testem. Tato data jsou graficky vyjádřena jako medián s mezikvartilovým rozpětím.

K analýze dráhy při testu otevřeného pole (jednotlivá sezení zvláště), doby freezingu při strachovém podmiňování a hodnot histologických parametrů (neuronální denzita v dorzálním CA2/3, morfometrické parametry hipokampu) byla použita ANOVA s Tukeyho post hoc testem. V případě dat z testu otevřeného pole byl použit Bonferroniho post hoc test (srovnání se skupinou FYZ).

### **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**

Při orientačním stanovení maximální tolerované dávky látky 10w při *i. p.* aplikaci u potkana jsme postupovali dle (Misik et al., 2018). Látka 10w syntetizovaná na katedře chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové dle (Nepovimova et al., 2021) byla rozpuštěna v 5% dimethylsulfoxidu (DMSO) a redestilované vodě (1 mg/ml) a aplikována v dávce 1 mg/kg. Kontrolnímu zvířeti bylo aplikováno vehikulum. Na základě výsledků (absence relevantních příznaků během 48 h) bylo přistoupeno k aplikaci dávky 10 mg/kg (3 zvířata pro každou dávku). Z důvodu suboptimální rozpustnosti byl připraven roztok o koncentraci 5 mg/ml v 10% DMSO a redestilované vodě a aplikován v injekčním objemu 2 ml/kg. Vzhledem k zjištěné limitované rozpustnosti látky, znemožňující aplikaci dávek nad 10 mg/kg, byla místo maximální tolerované dávky orientačně stanovena tzv. maximum feasible dose (MFD) (Robinson et al., 2009).

Zvířata byla nepřetržitě observována 5 h po aplikaci a poté periodicky během dalších 48 h. Byla hodnocena přítomnost respiračních, kardiovaskulárních a centrálních i periferních nervových (zejm. sedace/excitace, tremor, piloerekce, salivace) příznaků. Jejich závažnost byla hodnocena na stupnici mírná, střední a vysoká. Pokud by se objevily závažné příznaky, bylo by ihned přistoupeno k humánnímu utracení zvířat. Pokud by k úhynu nebo závažným příznakům došlo krátce po aplikaci látky prvnímu zvířeti ve skupině, zbylým zvířatům by byla aplikována nižší dávka. K těmto situacím nedošlo.

#### **3.3.3 Morrisovo vodní bludiště**

##### **3.3.3.1 Experimentální skupiny a aplikace látek**

V MWM byl testován účinek látky 10w v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem a porovnán s účinkem takrinu. Zvířata byla pseudonáhodně rozdělena do čtyř skupin označených dle aplikovaných látek: VEH, SKOP, 10w + SKOP, takrin + SKOP. Počet zvířat ve skupině VEH byl 7, v ostatních skupinách bylo 6 zvířat. Každému zvířeti byly aplikovány dvě *i. p.* injekce. Injekční objem byl 1 ml/kg pro každý roztok. Zvířatům ze skupin SKOP, 10w + SKOP, takrin + SKOP byl 20 min před experimentem aplikován

skopolamin hydrobromid (2,5 mg/kg; Sigma-Aldrich) rozpuštěný ve fyziologickém roztoku; kontrolní skupině VEH byl místo skopolaminu aplikován stejný objem fyziologického roztoku. Dávka skopolaminu byla zvolena na základě literatury (Azizi-Malekabadí et al., 2012; Entlerova et al., 2013) a pilotního experimentu. Látka 10w byla rozpuštěna v 5% DMSO v redestilované vodě a aplikována v dávce 2 mg/kg 5 min před začátkem experimentu příslušné skupině (10w + SKOP). Dávka prostá nežádoucích účinků i čas aplikace byly zvoleny na základě předchozího stanovení tzv. maximum feasible dose. Zvířatům ve skupinách VEH a SKOP byl aplikován stejný objem vehikula (tj. 5% DMSO v redestilované vodě). Takrin hydrochlorid (Sigma-Aldrich) v dávce 2,5 mg/kg rozpuštěný v 5% DMSO v redestilované vodě byl aplikován zvířatům z příslušné skupiny (takrin + SKOP) 10 min před podáním skopolaminu. Při předchozích experimentech bylo prokázáno, že zvolená dávka takrinu je prostá výraznějších nežádoucích parasymptomatimických účinků.

### **3.3.3.2 Morrisovo vodní bludiště: postup a vyhodnocení**

Testování v MWM probíhalo během čtyř po sobě následujících dnů, látky byly aplikovány každý den před zahájením experimentu. Ostrůvek byl umístěn pod hladinou vody na neměnném místě (střed SZ kvadrantu). Každý den bylo provedeno osm plaveb z různých startovních míst (S, J, Z, V, SZ, SV, JZ, JV), jejichž pořadí se v jednotlivé dny měnilo. Teplota vody byla 23 °C. Sledovanými parametry byla dráha a latence do nalezení ostrůvku finální den experimentu. K analýze byla použita ANOVA a Tukeyho post hoc test.

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

### **3.4.1 Zvířata, operace**

Bylo použito 30 zvířat (9–12 týdnů, 370–500 g) z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Pro pozdější *i. c. v.* aplikaci testované látky byly zvířatům implantovány kanyly do laterálních mozkových komor. Operace byla provedena za inhalační anestezie 2% izofluranem (Abbot Laboratories, North Chicago, IL, USA). Zvíře bylo upevněno do stereotaktického přístroje a po oholení srsti a odkrytí lebky byla na dvou definovaných místech provedena kraniotomie návrtem a voperovány vodící kanyly do obou laterálních komor v definované vzdálenosti od Bregmy: –0,80 mm AP, 1,5 mm ML a 3,5 mm DV od povrchu lebky. Kanyly byly upevněny k lebce dentálním cementem a dvěma šrouby z nerezové oceli. Po operaci byla zvířatům

podávána analgetika v pitné vodě (ibuprofen, Nurofen, Reckitt Benckiser, ČR; 2,5 ml/0,5 l vody). Testování zvířat v MWM bylo zahájeno 7 dní po operaci.

### **3.4.2 Experimentální skupiny a aplikace látek**

Potkani byli pseudonáhodně rozděleni do pěti experimentálních skupin označených dle aplikovaných látek a jejich koncentrace: 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.* a druhá zkratka látku aplikovanou *i. p.* (FYZ = fyziologický roztok, SKOP = skopolamin, S-K1035 10 = 10nM koncentrace, S-K1035 100 = 100nM koncentrace). Počet zvířat v každé skupině byl šest.

Látka S-K1035, syntetizovaná dle (Chalupova et al., 2019), byla rozpuštěna ve sterilním fyziologickém roztoku v 10nM a 100nM koncentraci a podána 60 min před začátkem testování v MWM *i. c. v.* cestou (bilaterálně) zvířatům z příslušných skupin. Látka byla aplikována pomocí mikroinfuzní pumpy (TSE Systems, Bad Homburg, Německo) rychlostí 0,5  $\mu$ l/min v objemu 1  $\mu$ l roztoku. Kontrolním skupinám zvířat (FYZ + FYZ, FYZ + SKOP) byl podán sterilní fyziologický roztok (*i. c. v.*). Skopolamin (skopolamin hydrobromid, Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku (5 mg/ml) a aplikován *i. p.* v dávce 5 mg/kg 20 min před začátkem MWM příslušným skupinám (FYZ + SKOP, S-K1035 10 + SKOP, S-K1035 100 + SKOP). Skupinám FYZ + FYZ a S-K1035 100 + FYZ byl místo skopolaminu podán fyziologický roztok.

### **3.4.3 Morrisovo vodní bludiště: postup a analýza**

Experiment v MWM probíhal během čtyř po sobě následujících dnů. Každý den byly provedeny čtyři plavby ze startovních míst označených jako S, J, Z a V, jejichž pořadí se v jednotlivé dny měnilo. Teplota vody byla 23–24 °C. Během prvních tří dnů probíhalo učení bez předchozí aplikace látek. Čtvrtý den byly před začátkem experimentu aplikovány testované látky a následovaly čtyři plavby v MWM s nezměněnou pozicí ostrůvku (střed SZ kvadrantu).

Byla analyzována data ze 3. a 4. dne MWM. Měřenými parametry byly uplavaná dráha, latence do nalezení ostrůvku a průměrná vzdálenost od ostrůvku (průměr vzdáleností pozic potkana od ostrůvku) 3. a 4. den MWM. Analýza výkonu 3. den byla provedena pro ověření, že se před podáním látek skupiny od sebe nelišily. Analýza chování 4. den ukazovala vliv studovaných látek na výkon v MWM. K analýzám byla využita 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 ve dvou dávkách samostatně i v koaplikaci s MK-801 v testu otevřeného pole a ve vyvýšeném křížovém bludišti. Potkani byli pseudonáhodně 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). Každému zvířeti byly 30 min před začátkem behaviorálního testu aplikovány dvě *i. p.* injekce: MK-801 ((+)-MK-801 hydrogen maleát, Sigma-Aldrich) rozpuštěné ve fyziologickém roztoku (nebo vehikulum: fyziologický roztok, označ. FYZ) a 7-fenoxytakrin syntetizovaný dle (Kaniakova et al., 2021) a rozpuštěný v 5% DMSO v redestilované vodě (nebo vehikulum: 5% DMSO v redestilované vodě, označ. DMSO). Objem každé injekce byl 1 ml/kg. Látka MK-801 byla aplikována v dávkách 0,3 mg/kg (test otevřeného pole) a 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. Aparaturu tvořila čtvercová aréna z černého plastu (80 × 80 cm), umístěná v oddělené místnosti s definovaným osvětlením (80 lx). Pozice potkana v aréně byla po dobu 10 min snímána kamerou umístěnou nad středem bludiště s použitím programu EthoVision 11.5 (Noldus, Wageningen, Nizozemsko). Závislou proměnnou byla dráha. Počet zvířat ve skupinách byl: 8 zvířat ve skupinách FYZ + DMSO, FYZ + 7-fenoxytakrin (10 mg/kg), MK-801 + DMSO, MK-801 + 7-fenoxytakrin (10 mg/kg), a 6 zvířat ve skupinách FYZ + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg) a MK-801 + 7-fenoxytakrin (5 mg/kg).

#### 3.5.3 Vyvýšené křížové bludiště

Vliv 7-fenoxytakrinu na anxieta byl studován ve vyvýšeném křížovém bludišti. Aparaturu tvořilo bludiště z černého plastu ve tvaru „+“, kde dvě protilehlá ramena byla otevřená (bez okrajů) a zbylá dvě ramena byla opatřena okraji (výška 35 cm). Délka ramen byla 40 cm, šířka 15 cm a celé bludiště bylo vyvýšeno 47 cm nad podlahou. Potkan byl umístěn do středu bludiště, přičemž hlavou směřoval do jednoho z uzavřených ramen, a jeho pozice v bludišti byla po dobu 10 min monitorována programem EthoVision 11.5. Závislou proměnnou byla celková doba strávená v otevřených ramenech bludiště a celková ušlá dráha. Počet zvířat v každé skupině byl 8.



### 3.5.4 Statistické vyhodnocení

K analýze byla použita dvoucestná ANOVA s faktory: fenotyp (FYZ/MK-801) a látka (7-fenoxytakrin/DMSO). Odlehlé hodnoty byly vyloučeny. V případě signifikantního výsledku ANOVA 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). Byly testovány akutní účinky látek K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 v dávkách 1 a 5 mg/kg v testu otevřeného pole a testu prepulzní inhibice úlekové reakce. Účinek byl porovnán s MK-801 a 7-methoxytakrinem. Potkani byli proto pseudonáhodně rozděleni do 16 experimentálních skupin: DMSO (1 ml/kg, kontrolní skupina pro skupiny s dávkou 1 mg/kg), 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 (2,5 ml/kg, kontrolní skupina pro skupiny s dávkou 5 mg/kg), 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. Testované látky K1575–K1599 syntetizované dle (Gorecki et al., 2021) byly aplikovány *i. p.* 15 min před zahájením behaviorálního experimentu. Komparátory MK-801 a 7-methoxytakrin byly aplikovány 30 min před zahájením experimentu (na základě předchozí studie (Kaniakova et al., 2018)). Pro aplikace dávek 1 mg/kg byly látky K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 rozpuštěny v 5% DMSO ve fyziologickém roztoku (1 mg/ml) a aplikovány v injekčním objemu 1 ml/kg. Pro aplikaci dávek 5 mg/kg byly tyto látky i 7-methoxytakrin rozpuštěny ve stejném vehikulu v koncentraci 2 mg/ml a aplikovány v injekčním objemu 2,5 ml/kg. Látka MK-801 ((+)-MK-801 hydrogen maleát, Sigma-Aldrich) byla aplikována v dávce 0,2 mg/kg v testu otevřeného pole a 0,3 mg/kg v testu prepulzní inhibice úlekové reakce; byla rozpuštěna ve stejném vehikulu jako ostatní látky a roztok aplikován v injekčním objemu 2,5 ml/kg. K rozpuštění látky K1575 byla z důvodu suboptimální rozpustnosti místo fyziologického roztoku použita redestilovaná voda. Kontrolním skupinám (skupiny DMSO) byl aplikován odpovídající objem vehikula (injekční objem 1 nebo 2,5 ml/kg).

### 3.6.2 Test otevřeného pole

Vliv látek na spontánní lokomoční aktivitu byl posouzen v testu otevřeného pole. Aparaturu tvořila čtvercová aréna z černého plastu (80 × 80 cm), umístěná v oddělené místnosti s definovaným osvětlením (80 lx). Potkan byl umístěn do středu arény a jeho pozice v aréně

byla po dobu 10 min snímána kamerou umístěnou nad středem bludiště s použitím programu EthoVision 14 (Noldus, Wageningen, Nizozemsko). Před testováním dalšího zvířete byla aréna pečlivě vyčištěna. Závislou proměnnou byla celková dráha. 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

Aparatura pro studium prepulzní inhibice (PPI) akustické úlekové reakce (SR-LAB, San Diego Instruments, CA, USA) sestávala z průhledného plastového válce pro umístění zvířete (průměr 9 cm, délka 17 cm) vybaveného piezoelektrickým akcelerometrem pro měření amplitudy motorické odpovědi a umístěného ve ventilovaném osvětleném zvukotěsném boxu opatřeném reproduktorem pro prezentaci zvukových stimulů. Prezentaci stimulů, záznam odpovědí a jejich analýzu zajišťoval příslušný software (SR-LAB). Jako zvukové pozadí byl po dobu celého experimentu prezentován bílý šum (75 dB). 48 h před testovací fází podstoupila intaktní zvířata habituační sezení v aparatuře, kdy jim po 5min habituaci bylo prezentováno 6 zvukových pulsů (125 dB/40 ms). Před zahájením testovací fáze byly aplikovány látky. Po 5min habituaci v aparatuře následoval PPI test s celkem 72 trialů s automaticky randomizovaným intervalem mezi nimi (4–20 s, průměr 12,27 s). Na začátku bylo prezentováno 6 pulsů (125 dB/40 ms). Poté bylo v pseudonáhodném pořadí prezentováno 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). Na konci sezení bylo opět prezentováno 6 pulsů (125 dB/40 ms). Parametrem úlekové reakce byla průměrná hodnota napětí (mV) generovaného motorickou odpovědí zvířete na stimul v 150ms časovém okně. Procento PPI bylo spočteno podle následujícího vzorce:

$$\text{PPI} = 100 - \left( \frac{\text{průměrná odpověď na stimul typu prepuls-puls}}{\text{průměrná odpověď na stimul typu puls}} \right) \times 100.$$

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

Z dat z dráhy v testu otevřeného pole a z PPI byly vyloučeny odlehlé hodnoty (outlier), identifikované pomocí Grubbsova testu (byly nalezeny dvě odlehlé hodnoty v datech z testu otevřeného pole – ve skupině K1592 (5 mg/kg) a 7-methoxytakrin (5 mg/kg), a jedna odlehlá hodnota v PPI – ve skupině K1592 (5 mg/kg)). K analýze dat z PPI byla využita ANOVA

následovaná Bonferroniho post hoc testem (porovnání se skupinou DMSO). Data z testu otevřeného pole u skupin s dávkami 5 mg/kg nesplňovala předpoklad homogenity rozptylů pro validní použití ANOVA (Bartlettův test). K analýze byla proto použita Brown-Forsythe ANOVA s Dunnettovým T3 post hoc testem.

## 4 VÝSLEDKY

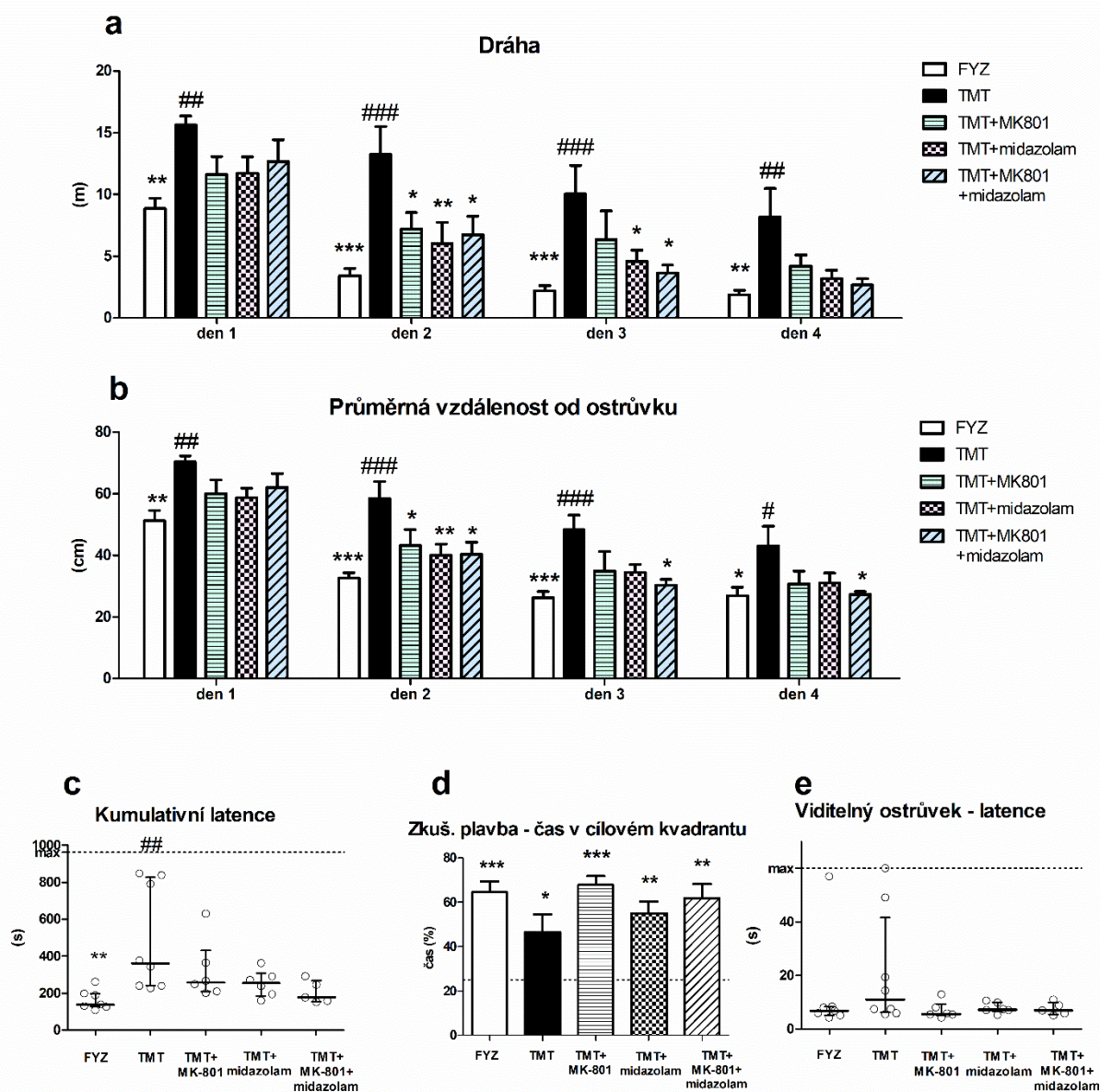
### 4.1 Experiment 1: Účinek MK-801, midazolamu a jejich koaplikace v modelu neurodegenerace a kognitivního deficitu indukovaném trimethylcínem

Cílem této studie bylo porovnat účinky experimentální monoterapie a kombinované terapie antagonistou NMDA receptorů (MK-801) a pozitivním modulátorem GABA<sub>A</sub> receptorů (midazolam) v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace indukované TMT. Většina uvedených výsledků je předmětem publikace „Effects of Dizocilpine, Midazolam and Their Co-Application on the Trimethyltin (TMT)-Induced Rat Model of Cognitive Deficit“ (Chvojkova et al., 2021).

#### 4.1.1 Morrisovo vodní bludiště

Po dokončení protektivní léčby byla testována prostorová kognice zvířat v úloze MWM. Parametry kognitivní výkonnosti při tréninkových plavbách byly dráha, latence a průměrná vzdálenost od ostrůvku. Analýza průměrné dráhy v jednotlivých dnech MWM (dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními) prokázala signifikantní efekt aplikovaných látek ( $F_{4, 81} = 6,23$ ,  $p = 0,0011$ ) a dne ( $F_{3, 81} = 60,22$ ,  $p < 0,0001$ ), bez interakce. Analýza efektu skupiny v rámci dne (Bonferroniho post hoc testy) ukázala, že aplikace TMT (skupina TMT) vedla ke zvýšení dráhy v porovnání s kontrolními zvířaty (FYZ) ve všech dnech MWM ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  a  $p < 0,01$  pro den 1, 2, 3 a 4), což naznačuje zhoršenou kognitivní výkonnost. Naopak skupiny s protektivní léčbou (TMT + MK-801, TMT + midazolam, TMT + MK-801 + midazolam) se během celého experimentu nelišily v uplavané dráze od kontrolních zvířat (FYZ). V některých dnech byla navíc dráha u těchto skupin signifikantně kratší než dráha skupiny TMT: 2. den MWM u skupiny TMT + MK-801 ( $p < 0,05$ ) a 2. i 3. den u skupin TMT + midazolam ( $p < 0,01$  pro 2. den a  $p < 0,05$  pro 3. den) a TMT + MK-801 + midazolam ( $p < 0,05$  pro oba dny; obr. 9a).

Dále byl analyzován i efekt dne v rámci skupiny (Bonferroniho post hoc testy). U kontrolních zvířat (FYZ) i skupin s protektivní léčbou (TMT + MK-801, TMT + midazolam, TMT + MK-801 + midazolam) došlo již 2. den MWM k signifikantnímu snížení dráhy (v porovnání s výkonem dané skupiny 1. den;  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). Oproti tomu u skupiny TMT došlo ke zlepšení až 3. den (vs. 1. den;  $p < 0,001$ ), což naznačuje opožděný nástup učení.



**Obr. 9** Vliv MK-801, midazolamu a jejich koaplikace na kognitivní deficit vyvolaný TMT v úloze MWM. **a:** Dráha (efekt skupiny v rámci dne), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  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. **c:** Kumulativní latence, \*\*  $p < 0,01$  vs. TMT, ##  $p < 0,01$  vs. FYZ, medián s mezikvartilovým rozpětím, kolečka představují hodnoty od jednotlivých zvířat. **d:** Zkušební plavba – čas v cílovém kvadrantu, hvězdičky označují signifikantní rozdíl od náhodné preference kvadrantů (25 %, tečkovaná čára), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . **e:** Plavba s viditelným ostrůvkem – latence nalezení ostrůvku, medián s mezikvartilovým rozpětím, kolečka ukazují hodnoty jednotlivých zvířat.

Analýza latence nalezení ostrůvku (dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními) ukázala efekt skupiny ( $F_{4,81} = 6,93$ ,  $p = 0,0006$ ) a dne ( $F_{3,81} = 88,16$ ,  $p < 0,0001$ ). TMT způsobil prodloužení latence nalezení ostrůvku (vs. FYZ; Bonferroniho post hoc testy,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  pro den 1, 2, 3 a 4). Naopak zvířata s experimentální protektivní aplikací se nelišila od skupiny FYZ. Během některých dnů vykazovaly skupiny s protektivní

léčbou kratší latenci než skupina TMT: skupina TMT + MK-801 2. den ( $p < 0,05$ ), skupina TMT + midazolam 1., 2. a 3. den ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) a skupina TMT + MK-801 + midazolam 2., 3. a 4. den ( $p < 0,05$  pro všechny dny).

Dále byla analyzována i průměrná vzdálenost potkana od ostrůvku, která představuje méně často používaný, avšak poměrně senzitivní parametr, odrážející na rozdíl od dráhy i prostorovou strategii (Whiting and Kokiko-Cochran, 2016). Analýza (dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními) prokázala efekt skupiny ( $F_{4,81} = 5,973$ ,  $p = 0,0014$ ) a dne ( $F_{3,81} = 119,1$ ,  $p < 0,0001$ ). Aplikace TMT vedla k prodloužení průměrné vzdálenosti od ostrůvku během celého experimentu (vs. FYZ, Bonferroniho post hoc test,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ , a  $p < 0,05$  pro den 1, 2, 3 a 4). Naopak skupiny s experimentální protektivní aplikací se od skupiny FYZ nelišily. Skupiny s protektivní léčbou měly během určitých dnů nižší průměrnou vzdálenost od ostrůvku v porovnání se skupinou TMT: skupina TMT + MK-801 během 2. dne ( $p < 0,05$ ), skupina TMT + midazolam ( $p < 0,01$ ) také během 2. dne a skupina TMT + MK-801 + midazolam během 2., 3. i 4. dne ( $p < 0,05$  pro všechny dny; obr. 9b).

Analýza kumulativní latence (součet všech latencí z 3. a 4. dne MWM) coby míry nejlepšího dosaženého výkonu v MWM (Mátéffyová et al., 2006) ukázala signifikantní rozdíly mezi skupinami (Kruskalův-Wallisův test,  $H = 14,25$ ,  $N_1 = 7$ ,  $N_2 = 8$ ,  $N_3 = 6$ ,  $N_4 = 6$ ,  $N_5 = 5$ ,  $p = 0,0065$ ). Zvířata ze skupiny TMT vykazovala zvýšenou hodnotu kumulativní latence (vs. FYZ, Dunnův post hoc test,  $p < 0,01$ ). Jejich výkon v MWM tedy nedosáhl úrovně kontrolních zvířat. Oproti tomu skupiny s protektivní aplikací se od kontrolních zvířat nelišily. Přestože jsme pozorovali rozdíly mezi hodnotami kumulativní latence jednotlivých skupin s protektivní aplikací, kdy nejnižší skupinový průměr vykazovala skupina s kombinovanou terapií (TMT + MK-801 + midazolam), tyto rozdíly nedosáhly statistické signifikance (obr. 9c). Ve skupině TMT byla přítomna tři zvířata se značně vysokou kumulativní latencí. Tato zvířata se zároveň výrazně více zdržovala u stěn bazénu (průměrný čas strávený v mezikruží o šířce 18 cm u stěny bazénu 3. a 4. den byl 66–78 %, což představuje nejvyšší hodnoty ze všech testovaných zvířat). Takové chování není u zdravých potkanů po několika dnech tréninku v MWM běžné a poukazuje na sníženou schopnost zaujmout optimální strategii řešení úlohy (Vorhees and Williams, 2006). Jedno zvíře ve skupině TMT + MK-801 vykazovalo mírnější stupeň popsaného chování, naopak v dalších skupinách k podobnému chování nedocházelo.

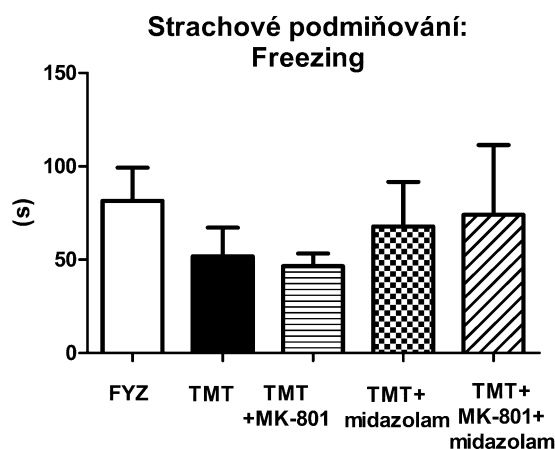
Celkově tedy výsledky analýz tréninkových plaveb v MWM ukazují výrazně sníženou efektivitu prostorového učení během celého experimentu u zvířat po aplikaci TMT. Naopak u všech skupin s protektivní aplikací došlo ke zmírnění projevů kognitivního deficitu.

Během zkušební plavby (probe trial) všechny skupiny preferovaly kvadrant, kde byl dříve umístěn ostrůvek (čas strávený v cílovém kvadrantu byl vyšší než hodnota odpovídající náhodnému výběru kvadrantů (25 %); jednovýběrový t-test,  $t_6 = 7,929$ ,  $p = 0,0002$  pro FYZ,  $t_7 = 2,668$ ,  $p = 0,0321$  pro TMT,  $t_5 = 10,61$ ,  $p = 0,0001$  pro TMT + MK-801,  $t_5 = 5,544$ ,  $p = 0,0026$  pro TMT + midazolam,  $t_4 = 5,728$ ,  $p = 0,0046$  pro TMT + MK-801 + midazolam; obr. 9d).

Analýza latence nalezení ostrůvku při testu s viditelným ostrůvkem neukázala signifikantní efekt skupiny (Kruskalův–Wallisův test). Neprokázalo se tedy závažné ovlivnění nekognitivních schopností (zejm. sensorických nebo motorických funkcí, motivace), jež by mohlo nespecificky negativně ovlivnit schopnost zvířat řešit úlohu MWM (obr. 9e).

#### 4.1.2 Kontextuální strachové podmiňování

Za účelem posouzení schopnosti asociativního učení jsme zařadili úlohu kontextuálního strachového podmiňování. Při prvním (podmiňovacím) sezení jsme po administraci averzivního stimulu u zvířat ze všech skupin pozorovali typický behaviorální projev (úleková reakce, vokalizace; nekvantifikováno). Parametrem odrážejícím asociaci stimulu s kontextem byla kumulativní doba freezingu v testovacím sezení. Pozorovali jsme rozdílné skupinové průměry hodnot tohoto parametru, analýza (ANOVA) však neprokázala statisticky významný efekt skupiny (obr. 10).



**Obr. 10** Kontextuální strachové podmiňování: kumulativní doba freezingu při testovacím sezení. Analýza neprokázala signifikantní vliv aplikovaných látek na výkon zvířat v tomto kognitivním testu. (Skupinový průměr + SEM.)

#### **4.1.3 Test otevřeného pole**

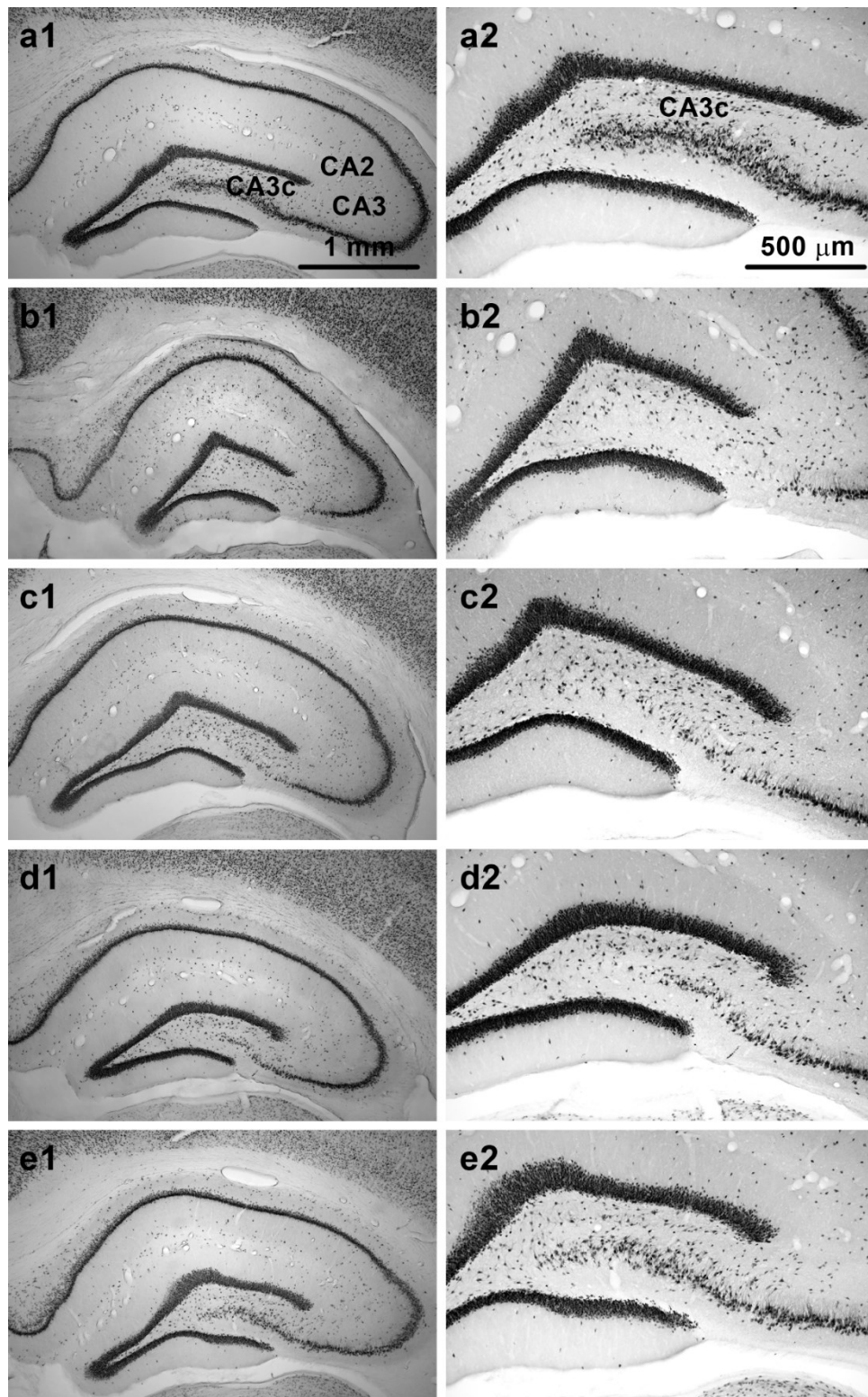
Test otevřeného pole (open field test) byl proveden za účelem vyloučení přítomnosti snížení či absence lokomoční aktivity, které by mohlo poukazovat na výrazné negativní ovlivnění celkového zdravotního stavu toxickými účinky TMT. Analýza (ANOVA) dráhy v testu otevřeného pole ze dne 0, dne 14 a dne 21 neukázala statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami. V případě testu otevřeného pole ze dne 7 byl přítomen efekt skupiny ( $F_{4,25} = 3,426$ ,  $p = 0,0230$ ), ale Bonferroniho post hoc test neukázal signifikantní rozdíly skupin od skupiny FYZ. Neprokázali jsme tedy snížení pohybové aktivity v důsledku toxických účinků TMT a konstatujeme nepříliš vysoké riziko ovlivnění výkonu zvířat v kognitivních úlohách nesespecifickými účinky TMT.

#### **4.1.4 Stereologický odhad neuronální denzity v oblasti CA2/3 ve vybrané části dorzálního hipokampu**

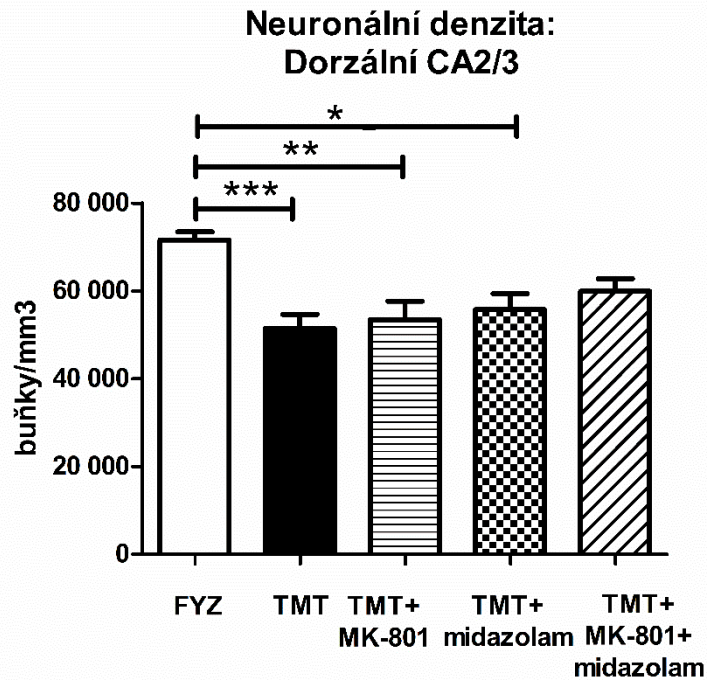
Po dokončení behaviorálních testů byla stereologicky kvantifikována neurodegenerace v dorzálním hipokampu v CA2/3, oblasti senzitivní k neurotoxickým účinkům TMT. U zvířat ze skupin TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam a TMT + MK-801 + midazolam byl zejména v podoblasti CA3c v různé míře patrný úbytek neuronů, přičemž u některých jedinců došlo prakticky k eliminaci oblasti CA3c. Reprezentativní mikrofotografie histologických řezů hipokampu s imunohistochemicky značenými neurony od zvířat z jednotlivých skupin jsou zobrazeny na obr. 11 a pochází od zvířat, jejichž hodnota neuronální denzity v dorzálním CA2/3 (viz dále) byla blízká skupinovému průměru. Již na základě pouhého vizuálního posouzení řezů je možno pozorovat rozdíly mezi skupinami.

Analýza stereologického odhadu neuronální denzity v oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu 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 při daném designu experimentu nepostačovala k signifikantnímu zmírnění TMT-indukované neurodegenerace v této oblasti. Oproti tomu skupina s kombinovanou aplikací (TMT + MK-801 + midazolam) se od kontrolních zvířat nelišila, což naznačuje mírný neuroprotektivní účinek (obr. 12).





**Obr. 11** Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů dorzálního hipokampu obarvených protilátkou anti-NeuN. Histologické řezy pochází od zvířat z následujících skupin: **a1, a2:** FYZ, **b1, b2:** TMT, **c1, c2:** TMT + MK-801, **d1, d2:** TMT + midazolam, **e1, e2:** TMT + MK-801 + midazolam. Levé panely (1) ukazují celkový pohled na pravý dorzální hipokampus (objektiv 4×), pravé panely (2) ukazují detail oblasti CA3c (objektiv 10×). Pověšimněte si odlišné neuronální denzity v oblasti CA3c. (Mikrofotografie na byly pořízeny pomocí mikroskopu s kamerou (levé panely: Zeiss Axio Observer D1, objektiv 4×/0,1, kamera Zeiss AxioCam MRm; pravé panely: Olympus BX53, objektiv 10×/0,40, kamera Olympus DP74) mikroskopii ve světelném poli s použitím černobílého módu kamery.)



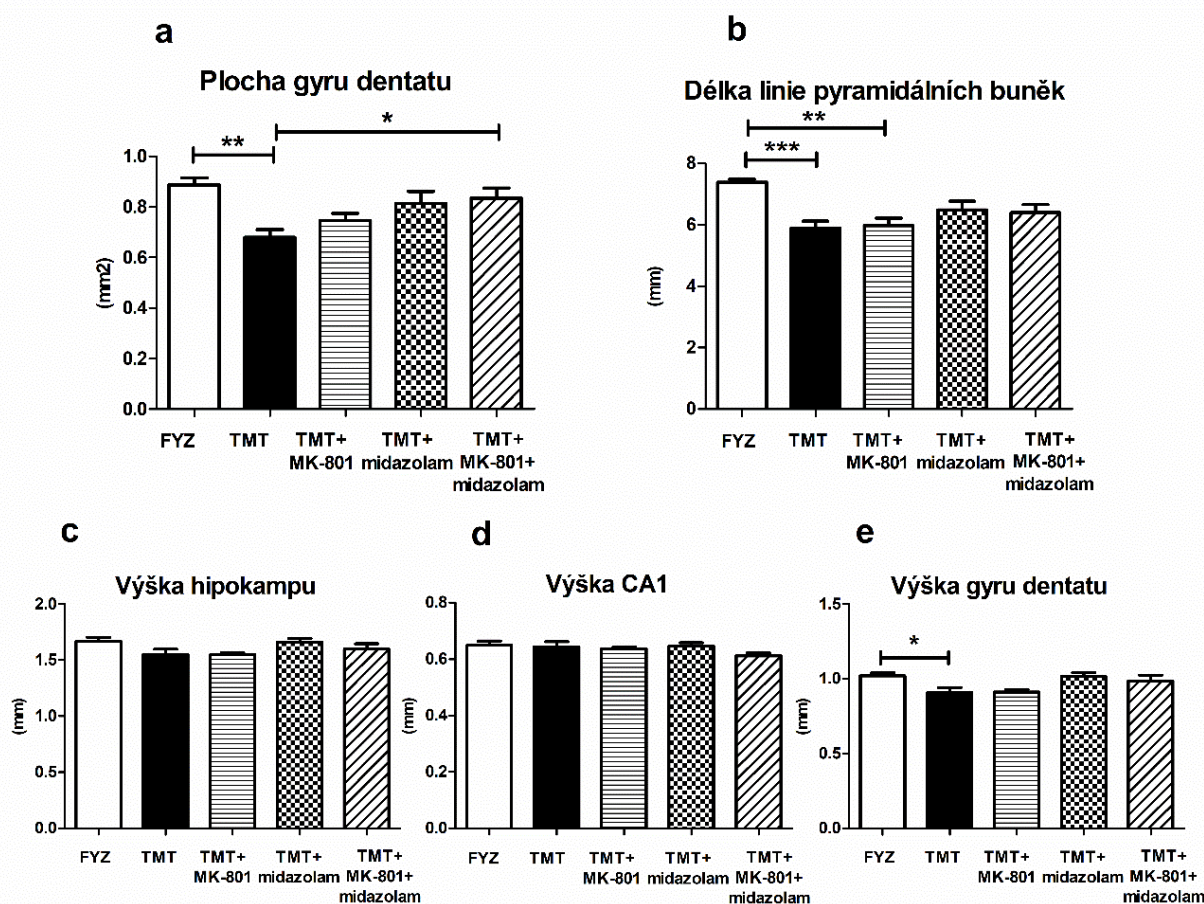
**Obr. 12** Stereologický odhad neuronální denzity v oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu. Kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu poskytla parciální protektivní efekt proti neurodegeneraci indukované aplikací TMT. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (Skupinový průměr + SEM.)

#### 4.1.5 Morfometrie dorzálního hipokampu

Neurodegenerace indukovaná TMT může na makroskopické úrovni rezultovat v morfologické alterace hipokampu. Vedle neuronální denzity jako hlavního histologického parametru neuroprotektivní účinnosti testovaných látek jsme proto zařadili i následující morfometrické parametry. Analyzována byla tatáž část dorzálního hipokampu, jež byla podrobena stereologickému stanovení neuronální denzity v oblasti CA2/3.

##### 4.1.5.1 Velikost plochy gyru dentatu

Analýza průměrné plochy gyru dentatu (zahrnující granulární buněčnou vrstvu, oblast *hilu* a CA3c) prokázala signifikantní rozdíly mezi skupinami (ANOVA;  $F_{4, 27} = 5,978$ ,  $p = 0,0014$ ). Plocha gyru dentatu u zvířat ze skupiny TMT byla menší než u kontrolní skupiny (Tukeyho post hoc test;  $p < 0,01$ ), patrně v důsledku závažné neurodegenerace v oblasti CA3c. Naopak skupiny s protektivní aplikací se od kontrolních zvířat nelišily a u skupiny s kombinací MK-801 a midazolamu jsme prokázali signifikantně větší plochu gyru dentatu v porovnání se skupinou TMT ( $p < 0,05$ ), což naznačuje protektivní efekt kombinované aplikace a její superioritu nad samostatně aplikovanými látkami (obr. 13a).



**Obr. 13** Vliv aplikovaných látek na morfometrické parametry dorzálního hipokampu. **a:** Plocha *gyru dentatu*, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , **b:** délka linie pyramidálních buněk, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , **c:** výška dorzálního hipokampu, **d:** výška CA1, **e:** výška *gyru dentatu*, \*  $p < 0,05$ . (Skupinový průměr + SEM.)

#### 4.1.5.2 Délka linie pyramidálních buněk

U zvířat s aplikovaným TMT jsme pozorovali zkrácení linie pyramidálních buněk, způsobené patrně především intenzivní neurodegenerací v oblasti CA3c, šířící se v některých případech různou měrou směrem do CA3b. U sledovaného parametru byl prokázán signifikantní efekt skupiny (ANOVA;  $F_{4, 27} = 7,350$ ,  $p = 0,0004$ ). Podání TMT mělo za následek zkrácení linie pyramidálních buněk (FYZ vs. TMT,  $p < 0,001$ , Tukeyho post hoc test). Zkrácení linie pyramidálních buněk bylo přítomno i u skupiny TMT + MK-801 (FYZ vs. TMT + MK-801,  $p < 0,01$ ). Oproti tomu u skupiny s aplikovaným midazolamem a u skupiny s koaplikací MK-801 a midazolamu ke zkrácení linie nedošlo, což by se dalo interpretovat jako částečný protektivní efekt (obr. 13b).

#### 4.1.5.3 Výška hipokampu, CA1 a gyru dentatu

Výška (tloušťka) dorzálního hipokampu byla zařazena mezi měřené parametry vzhledem k možnému ztenčení dorzálního hipokampu v důsledku neurodegenerace vyvolané TMT (Robertson et al., 1987). Jelikož při zvolené metodě měření je výška hipokampu součtem

výšky oblasti CA1 a *gyru dentatu*, zaměřili jsme se dále i individuálně na tyto oblasti. Mezi skupinami nebyl statisticky signifikantní rozdíl (ANOVA) ve výšce celého dorzálního hipokampu (obr. 13c) ani oblasti CA1 (obr. 13d). Oproti tomu analýza výšky *gyru dentatu* prokázala efekt skupiny (ANOVA;  $F_{4, 27} = 4,080$ ,  $p = 0,0103$ ). Aplikace TMT bez současné protektivní aplikace vedla ke ztenčení *gyru dentatu* (FYZ vs. TMT,  $p < 0,05$ , Tukeyho post hoc test). Tento výsledek, podobně jako plocha *gyru dentatu*, patrně odráží zmenšení oblasti *hilu* v důsledku degenerace neuronů v CA3c. Žádné další rozdíly mezi skupinami nebyly nalezeny (obr. 13e).

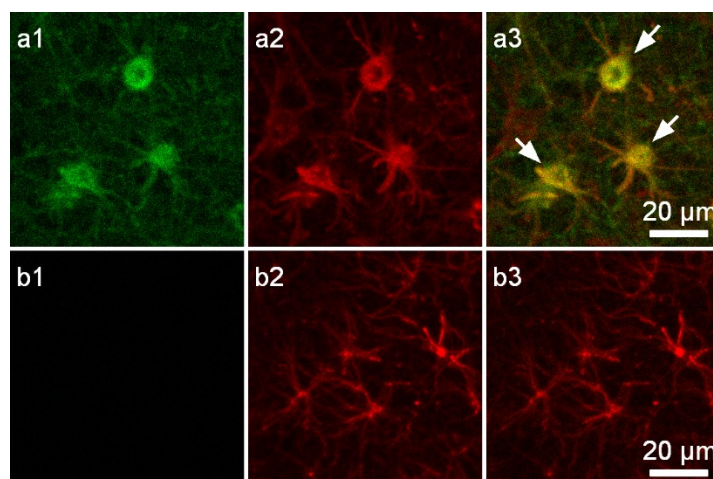
#### 4.1.6 Histochemické barvení Fluoro-Jade B

Barvení Fluoro-Jade B, používané ke značení degenerujících neuronů, bylo plánováno jako doplňková metoda hodnocení neurodegenerace v dorzálním hipokampu. Použitá histochemická metoda byla shledána nepříliš vhodnou k hodnocení neurodegenerace při zvoleném experimentálním designu. V pyramidální buněčné vrstvě byly u téměř všech jedinců ze skupin TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam a TMT + MK-801 + midazolam (nikoli u kontrolních zvířat) přítomny Fluoro-Jade B-pozitivní neurony v pyramidální vrstvě, a to zejména v oblasti CA1, dále také v CA3. Jejich počet byl ale většinou nízký (většinou 0–10 buněk/řez; hodnoceno 5 řezů), kromě 5 zvířat (3 ze skupiny TMT, 1 ze skupiny TMT + midazolam a 1 ze skupiny TMT + MK-801 + midazolam), u nichž byly pozorovány početnější shluky Fluoro-Jade B pozitivních neuronů. Vzhledem k nízkému počtu Fluoro-Jade B-pozitivních neuronů u většiny zvířat nebylo přistoupeno ke kvantifikaci.

Dále jsme však poněkud nečekaně téměř u všech jedinců ze skupin TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam a TMT + MK-801 + midazolam (ale nikoli u kontrolních zvířat) pozorovali zejména v oblasti *hilu gyru dentatu* (vč. CA3c) velké množství Fluoro-Jade B-pozitivních útvarů, které vykazovaly morfologické znaky astrocytů. U vybraných histologických řezů (od zvířete ze skupiny TMT a od kontrolního zvířete) jsme proto dodatečně provedli i dvojí barvení Fluoro-Jade B spolu s imunohistochemickým značením gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP), který je markerem astrocytů. Výsledky barvení ukázaly u zvířete ze skupiny TMT kolokalizaci a podpořily tak suspektní astrocytální původ pozorovaných objektů (obr. 14).

Kromě toho téměř u všech zvířat z těchto skupin (TMT, TMT + MK-801, TMT + midazolam a TMT + MK-801 + midazolam; ne u kontrolních zvířat) byl intenzivní Fluoro-Jade B signál

přítomen i mimo buněčné hipokampální vrstvy, především ve *stratu radiatu*. Vzhledem k afinitě Fluoro-Jade k axonům a terminálám degenerujících neuronů, popsané v modelech neurodegenerace v pozdějších časových obdobích (Schmued and Hopkins, 2000b)) a pravděpodobné přítomnosti degenerujících axonů v daných oblastech a období po aplikaci TMT (Whittington et al., 1989) by bylo možné spekulovat, že šlo o vlákna degenerujících nebo již odumřelých neuronů. Jiné příčiny vč. nespecifického barvení však nelze vyloučit.



**Obr. 14** Dvojití barvení Fluoro-Jade B (zelená fluorescence) s GFAP, markerem astrocytů (červená fluorescence). Obrázek zachycuje oblast *hilu gyru dentatu* v dorzálním hipokampu. Panely **a**: zvíře ze skupiny TMT, panely **b**: kontrolní zvíře. Levé panely (**1**): Fluoro-Jade B, prostřední panely (**2**): GFAP, pravé panely (**3**): výsledný snímek Fluoro-Jade B a GFAP. U zvířete ze skupiny TMT byly pozorovány Fluoro-Jade B pozitivní elementy identifikované jako astrocyty. (Maximální projekce ze Z stacku 14  $\mu\text{m}$  s krokem 1  $\mu\text{m}$  byly snímány na konfokálním mikroskopu Leica SP8 X s imerzním objektivem Leica HC Plan Apo 20 $\times$ /0,75 IMM a excitačními vlnovými délkami 458 a 550 nm. K detekci byly použity Leica HyD detektory s nastaveními spektrálních oblastí 490–540 nm a 570–605 nm při formátu 1024 $\times$ 1024 pxls (velikost pixelu 71 $\times$ 71 nm při zoomu 8 $\times$ .)



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

Předmětem této části práce byla nová multipotentní sloučenina s potenciálem pro léčbu AD, dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu spojený tříčlenným uhlíkovým řetězcem (látka pracovně označená 10w), působící mimo jiné jako inhibitor AChE. Cílem bylo orientačně stanovit dávkovou závislost vedlejších účinků a následně prozkoumat účinek této látky v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem a porovnat jej s účinkem takrinu. Výsledky jsou součástí publikace „Tacrine – Benzothiazoles: Novel class of potential multitarget anti-Alzheimer’s drugs dealing with cholinergic, amyloid and mitochondrial systems“ (Nepovimova et al., 2021).

### **4.2.1 Orientační stanovení maximální tolerované dávky**

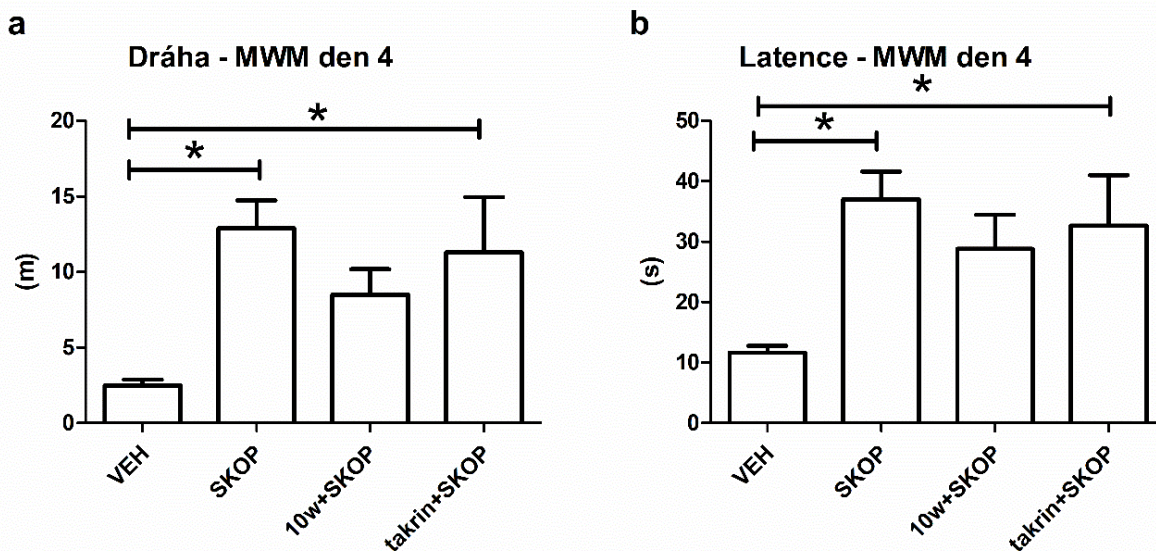
Při aplikaci látky 10w v dávce 1 mg/kg nebyly pozorovány příznaky narušení nervových, respiračních ani kardiovaskulárních funkcí. Vzhledem k limitované rozpustnosti látky znemožňující aplikaci vyšších dávek byla místo maximální tolerované dávky orientačně stanovena tzv. maximum feasible dose. V případě vyšší testované dávky (10 mg/kg) byly pozorovány příznaky mírného až středního stupně závažnosti, spontánně ustupující do 5 h. Přibližně 10 min po aplikaci bylo u všech zvířat evidováno snížení pohybové aktivity. Další příznaky zahrnovaly žvýkací pohyby a přivírání očí (1 ze 3 zvířat, 30 min po aplikaci) a průjem (2 ze 3 zvířat, 50 min po aplikaci). Do 3 h po aplikaci došlo k normalizaci pohybové aktivity u dvou zvířat, do 5 h po aplikaci již u všech zvířat.

### **4.2.2 Morrisovo vodní bludiště**

Na základě orientačního stanovení nežádoucích účinků byla zvolena dávka s nízkým rizikem závažných nežádoucích účinků (2 mg/kg) a bylo přistoupeno k posouzení účinnosti látky 10w v modelu kognitivního deficitu v MWM vyvolaném skopolaminem. Účinek látky 10w byl porovnán s účinkem takrinu. Zaměřili jsme se na analýzu chování ve finální fázi experimentu. Analýza dat ze 4. dne experimentu (ANOVA) ukázala efekt skupiny v parametrech dráhy ( $F_{3, 21} = 4,838$ ,  $p = 0,0103$ ; obr. 15a) i latence nalezení ostrůvku ( $F_{3, 21} = 4,599$ ,  $p = 0,0126$ ; obr. 15b). Prodloužení dráhy ( $p < 0,05$ ) a latence ( $p < 0,05$ ) u skupiny SKOP (vs. VEH, Tukeyho post hoc test) potvrdilo přítomnost kognitivního deficitu u zvířat po aplikaci skopolaminu a tedy validitu modelu.

Zvířata po koaplikaci látky 10w a skopolaminu se v parametrech dráhy a latence signifikantně nelišila od kontrolní skupiny (VEH), což naznačuje částečné zmírnění

kognitivního deficitu. Oproti tomu po podání zvolené dávky takrinu (2,5 mg/kg) se zmírnění kognitivního deficitu vyvolaného skopolaminem neprokázalo (skupina takrin + SKOP se signifikantně lišila od skupiny VEH v parametru dráhy ( $p < 0,05$ ) i latence ( $p < 0,05$ ).



**Obr. 15** Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka 10w) ve skopolaminem indukovaném modelu kognitivního deficitu v úloze MWM. Látka 10w (2 mg/kg), ale nikoli takrin (2,5 mg/kg), poskytla částečný protektivní účinek proti kognitivnímu deficitu vyvolanému skopolaminem. (VEH – kontrolní zvířata s aplikací vehikula, SKOP – skopolamin.) **a:** Dráha 4. den experimentu, \*  $p < 0,05$ , **b:** latence nalezení ostrůvku 4. den experimentu, \*  $p < 0,05$ . (Skupinový průměr + SEM.)

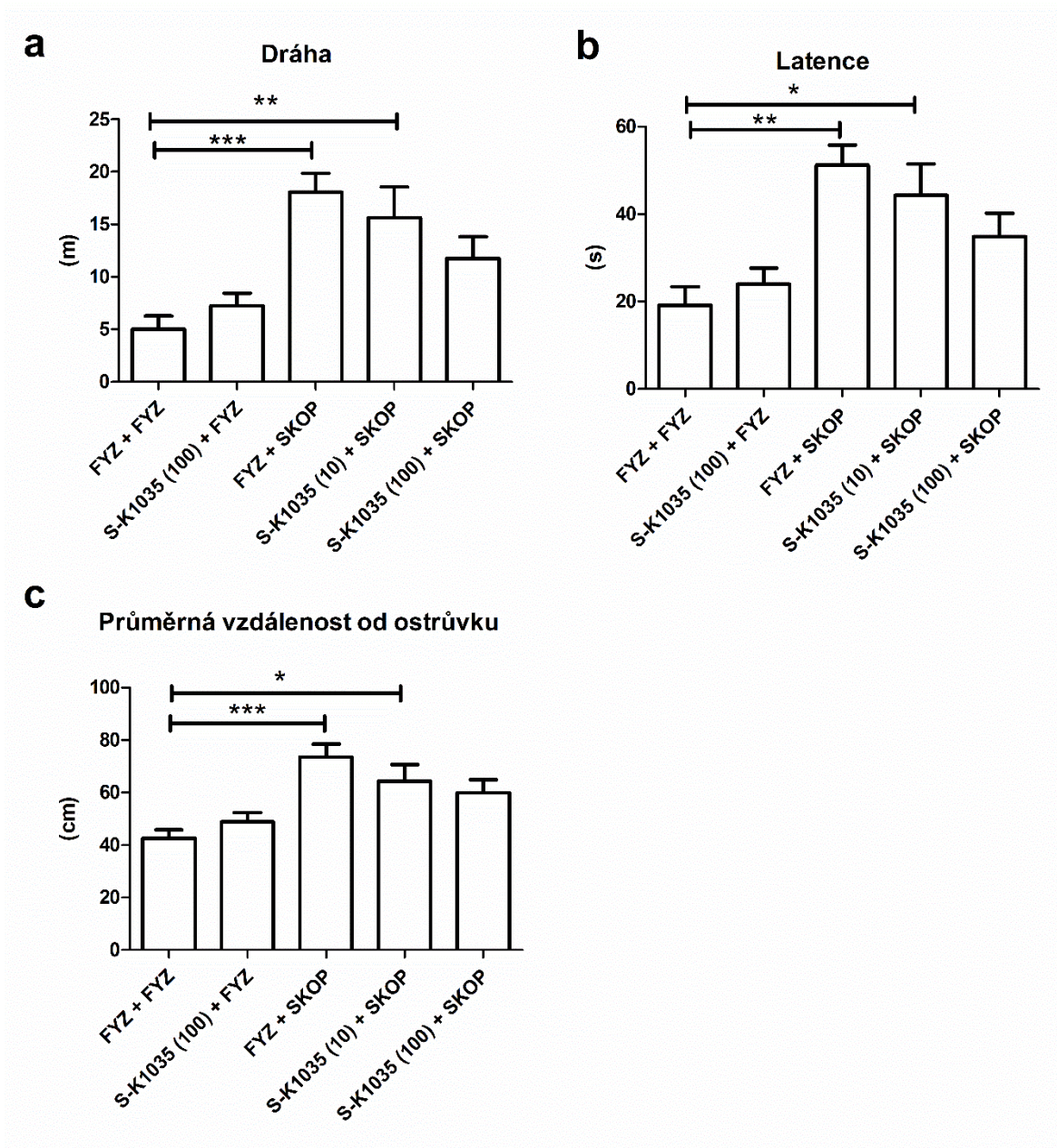
### 4.3 Experiment 2B: Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem

Předmětem této části práce byl dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka pracovně nazvaná S-K1035) s MTDL vlastnostmi zahrnujícími inhibici cholinesteráz. Cílem bylo otestovat účinek této látky v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem a dále ověřit, že látka S-K1035 aplikovaná samostatně nemá nežádoucí účinky na chování zvířat v MWM. Tento experiment je součástí publikace „Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target-directed ligands as potential treatment for Alzheimer’s disease“ (Chalupova et al., 2019).

Nejprve zvířata absolvovala třídní předtrénink v MWM bez aplikace látek. Ověřili jsme, že během posledního dne předtréninku vykazovaly všechny skupiny zvířat stejnou výchozí úroveň výkonu (nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami v žádném ze sledovaných parametrů; ANOVA). Skupinové průměry latence nalezení ostrůvku byly 22–28 s, což ukazuje jistý stupeň naučení úlohy.

Čtvrtý den byla před zahájením experimentu aplikována testovaná látka S-K1035 (10nM nebo 100nM koncentrace; *i. c. v.*) a skopolamin (*i. p.*). Byla zařazena i skupina zvířat s látkou S-K1035 (100nM) bez koaplikace skopolaminu. Hlavními sledovanými parametry byla dráha, latence nalezení ostrůvku a průměrná vzdálenost od ostrůvku. Analýza dráhy ukázala signifikantní efekt skupiny (ANOVA,  $F_{4,25} = 7,870$ ,  $p = 0,0003$ ). Samotná látka S-K1035 ve vyšší testované dávce (skupina S-K1035 100 + FYZ) neovlivnila výkon zvířat (vs. FYZ + FYZ; Tukeyho post hoc test). Podání skopolaminu (FYZ + SKOP) vedlo ke zvýšení dráhy v porovnání s kontrolními zvířaty (FYZ + FYZ; Tukeyho post hoc test,  $p < 0,001$ ). Rovněž zvířata s koaplikací nižší koncentrace látky S-K1035 a skopolaminu (S-K1035 10 + SKOP) vykazovala vyšší hodnoty dráhy než kontrolní zvířata (FYZ + FYZ;  $p < 0,01$ ). Nižší použitá koncentrace látky S-K1035 tedy nezvrátila projevy skopolaminem indukovaného kognitivního deficitu v tomto parametru. Oproti tomu skupina s aplikovanou vyšší koncentrací látky S-K1035 spolu se skopolaminem (S-K1035 100 + SKOP) se v parametru dráhy nelišila od kontrolní skupiny FYZ + FYZ, což ukazuje zmírnění skopolaminem indukovaného kognitivního deficitu u této skupiny (obr. 16a).





**Obr. 16** Účinek dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látky S-K1035) v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem v úloze MWM. Jsou zobrazena data ze 4. dne experimentu, kdy byly látky aplikovány. Vyšší testovaná koncentrace látky S-K1035 (100nM) poskytla protektivní účinek proti kognitivnímu deficitu indukovanému skopolaminem. (FYZ – kontrolní skupina s aplikací fyziologického roztoku, SKOP – skopolamin.) **a:** Dráha, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , **b:** latence nalezení ostrůvku, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , **c:** průměrná vzdálenost od ostrůvku, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (Skupinový průměr + SEM.)

Analýza latence vedla k podobným výsledkům. Byl přítomen efekt skupiny (ANOVA,  $F_{4,25} = 6,801$ ,  $p = 0,0008$ ). Samotná látka S-K1035 (S-K1035 100 + FYZ) latenci neovlivnila, skopolamin (FYZ + SKOP,  $p < 0,01$ ) i jeho koaplikace s nižší koncentrací S-K1035 (S-K1035 10 + SKOP;  $p < 0,05$ ) latenci zvýšil (v porovnání se skupinou FYZ + FYZ). Skupina S-K1035 100 + SKOP se nelišila od skupiny FYZ + FYZ (Tukeyho post hoc test; obr. 16b).

Obdobné byly i výsledky analýzy průměrné vzdálenosti od ostrůvku. Skupiny se signifikantně lišily ( $F_{4,25} = 6,840$ ,  $p = 0,0007$ ). Samotná látka S-K1035 (S-K1035 100 + FYZ) neměla vliv, skopolamin (FYZ + SKOP,  $p < 0,001$ ) i skopolamin s 10nM S-K1035 ( $p < 0,05$ ) vedly ke zvýšení průměrné vzdálenosti od ostrůvku (vs. FYZ + FYZ). Skupina s vyšší koncentrací testované látky a skopolaminem (S-K1035 100 + SKOP) se nelišila od kontrolní (FYZ + FYZ) skupiny (obr. 16c).

Výsledky tedy ukazují, že samotná látka S-K1035 podaná ve 100nM koncentraci neovlivnila chování zdravých zvířat (bez koaplikace skopolaminu) v MWM. Taktéž koncentrace látky S-K1035 zároveň zmírnila kognitivní deficit u zvířat po aplikaci skopolaminu.

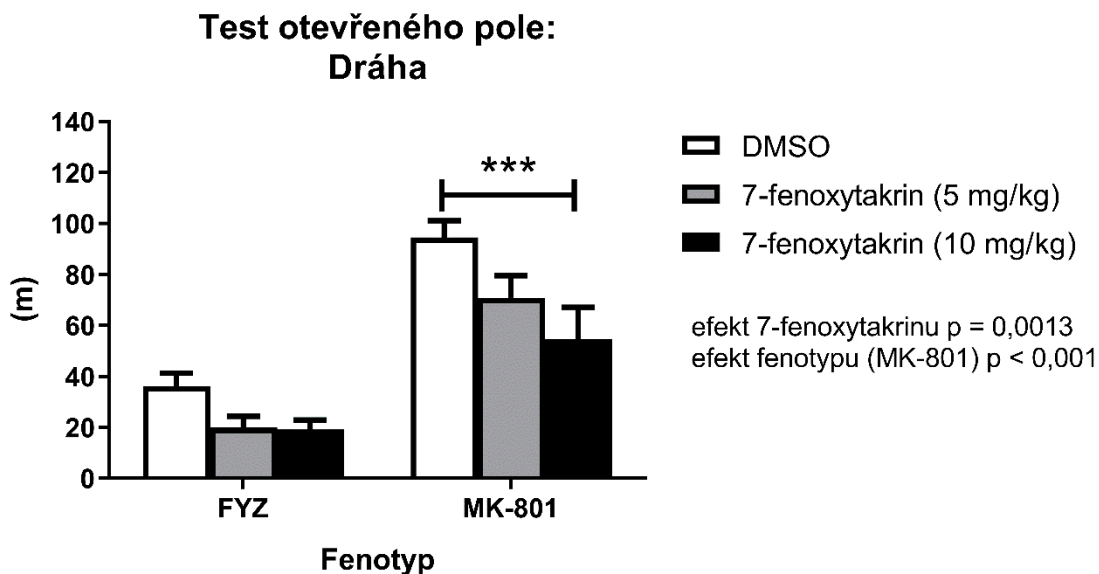
#### 4.4 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv 7-fenoxytakrinu, derivátu takrinu působícího jako inhibitor AChE a antagonist NMDA receptorů, na lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole a na anxiету ve zvýšeném křížovém bludišti. Behaviorální úlohy byly zvoleny na základě známých účinků antagonistů NMDA receptorů. Dále byla v těchto úlohách studována interakce 7-fenoxytakrinu s MK-801, nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů. Výsledky jsou součástí publikace „7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy *in vivo*“ (Kaniakova et al., 2021).

##### 4.4.1 Test otevřeného pole

V testu otevřeného pole jsme studovali vliv 7-fenoxytakrinu v dávkách 5 a 10 mg/kg na spontánní lokomoční aktivitu a dále na hyperlokomoci vyvolanou MK-801 (0,3 mg/kg). Analýza (dvojcestná ANOVA) dráhy ukázala signifikantní efekt obou faktorů: 7-fenoxytakrinu ( $F_{2,38} = 7,90$ ,  $p = 0,0013$ ) a fenotypu, tj. MK-801 ( $F_{1,38} = 59,07$ ,  $p < 0,0001$ ). 7-fenoxytakrin při samostatné aplikaci (tj. bez koaplikace MK-801, fenotyp „FYZ“) neměl signifikantní vliv na dráhu. Nebyla tedy přítomna nežádoucí hyperlokomoce, charakteristická pro některé antagonisty NMDA receptorů; naopak jsme evidovali nesignifikantní tendenci ke snížení dráhy v porovnání s kontrolní skupinou FYZ + DMSO (obr. 17). Nízké riziko hyperlokomoce a tedy nežádoucích psychotomimetických účinků 7-fenoxytakrinu představuje hlavní a příznivý výstup Experimentu 3A.

Oproti tomu aplikace MK-801 vyvolala hyperlokomoci, považovanou za jeden z projevů psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů. V případě koaplikace 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. 17).



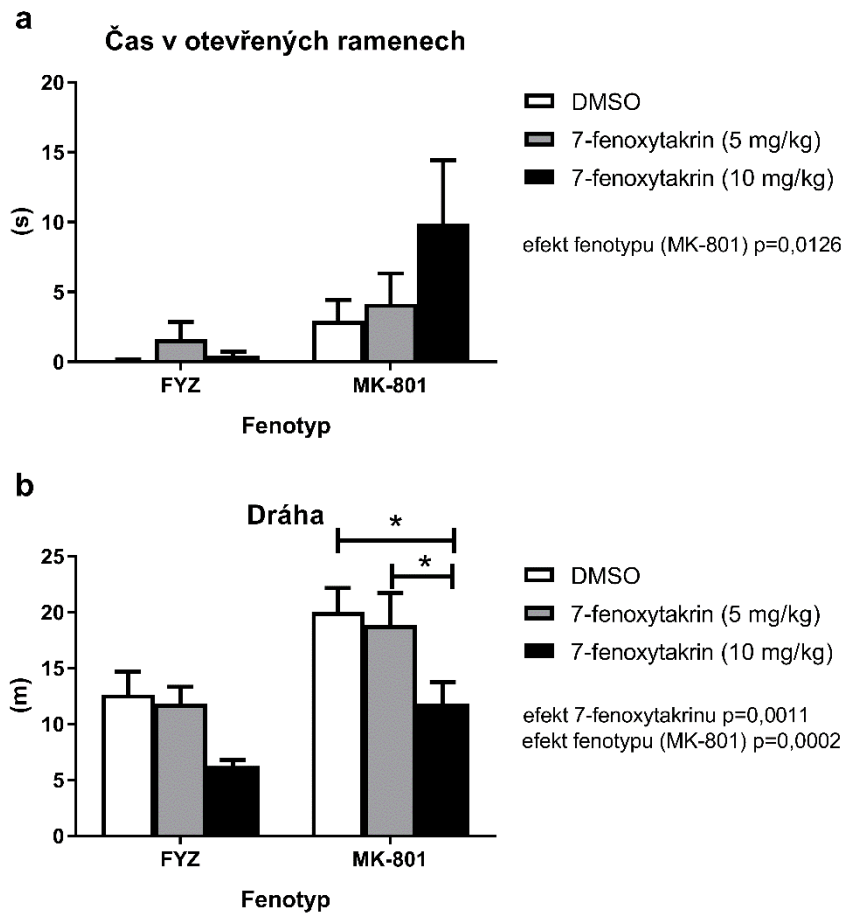
**Obr. 17** Vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole. Graf ukazuje celkovou dráhu v testu otevřeného pole u zvířat dvou různých fenotypů: zvířat po aplikaci fyziologického roztoku (FYZ) nebo po aplikaci MK-801 (0,3 mg/kg), kterým byl aplikován DMSO (vehikulum 7-fenoxytakrinu; 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 lokomoční aktivitu, zatímco u zvířat s fenotypem MK-801 vyšší testovaná dávka 7-fenoxytakrinu snížila hyperlokomoci vyvolanou MK-801. \*\*\*  $p < 0,001$ . (Skupinový průměr + SEM.)

#### 4.4.2 Vyvýšené křížové bludiště

Vzhledem k anxiolytickým účinkům zástupců antagonistů NMDA receptorů jsme zařadili i test vlivu 7-fenoxytakrinu na anxieta ve vyvýšeném křížovém bludišti. Dále jsme v této úloze studovali i interakci účinků 7-fenoxytakrinu s účinky MK-801 (0,1 mg/kg). Vliv látek na anxieta byl hodnocen na základě času stráveného v otevřených ramenech bludiště. Analýza (dvoucestná ANOVA) tohoto parametru ukázala efekt fenotypu, tj. MK-801 ( $F_{1, 39} = 6,845$ ,  $p = 0,0126$ ). Aplikace MK-801 vedla k prodloužení doby strávené v otevřených ramenech bludiště, což naznačuje anxiolytický účinek. Naopak podání 7-fenoxytakrinu (samostatně ani v kombinaci s MK-801) nemělo na tento parametr signifikantní vliv ( $F_{2, 39} = 1,30$ ,  $p = 0,2829$ ). Pozorovali jsme ale nesignifikantní tendenci ke zvýšení času stráveného v otevřených ramenech u skupiny MK-801 + 7-fenoxytakrin (10 mg/kg) (obr. 18a).

Ve vyvýšeném křížovém bludišti byl vedle vlivu látek na anxieta sledován i jejich vliv na lokomoční aktivitu. Analýza (dvoucestná ANOVA) dráhy ukázala signifikantní efekt MK-801 ( $F_{1, 42} = 17,26$ ,  $p = 0,0002$ ) i fenoxytakrinu ( $F_{2, 42} = 8,108$ ,  $p = 0,0011$ ). Vyšší dávka 7-fenoxytakrinu (10 mg/kg) potlačila hyperlokomoci indukovanou MK-801 ( $p < 0,05$ ; Bonferroniho post hoc test; obr. 18b), což je v souladu s výsledky z testu otevřeného pole.

### Vyvýšené křížové bludiště



**Obr. 18** Vliv 7-fenoxytakrinu na anxietu a lokomoční aktivitu ve vyvýšeném křížovém bludišti. Grafy ukazují chování zvířat dvou různých fenotypů: zvířat po aplikaci fyziologického roztoku (FYZ) nebo po aplikaci MK-801 (0,3 mg/kg), kterým byl aplikován DMSO (vehikulum 7-fenoxytakrinu; bílé sloupce) nebo 7-fenoxytakrin v dávce 5 mg/kg (šedé sloupce) nebo 10 mg/kg (černé sloupce). **a:** Čas v otevřených ramenech bludiště. Vyšší čas v otevřených ramenech naznačuje anxiolytické působení látek. **b:** Celková dráha. U zvířat s fenotypem MK-801 vyšší testovaná dávka 7-fenoxytakrinu snížila hyperlokomoci vyvolanou MK-801. \*  $p < 0,05$ . (Skupinový průměr + SEM.)

## 4.5 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů

Předmětem Experimentu 3B byly nové deriváty takrinu působící jako inhibitory AChE a antagonisté NMDA receptorů (látky pracovně označené K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599). Cílem bylo otestovat přítomnost nežádoucích účinků antagonistů NMDA receptorů, které se u laboratorních hlodavců projevují jako hyperlokomoce a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce. Účinky látek byly studovány v dávkách 1 a 5 mg/kg a byly porovnány s účinky 7-methoxytakrinu a s účinky nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801. Výsledky jsou součástí publikace „Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-D-aspartate receptors“ (Gorecki et al., 2021).

### 4.5.1 Test otevřeného pole

V testu otevřeného pole byl studován vliv látek na lokomoční aktivitu; účinky nižší a vyšší dávky testovaných látek byly analyzovány separátně. Analýza dráhy u skupin s nižší dávkou látek (1 mg/kg) odhalila efekt skupiny (ANOVA;  $F_{6,37} = 6,269$ ,  $p = 0,0001$ ). Bonferroniho post hoc test ukázal snížení lokomoční aktivity po aplikaci látky K1592 ( $p < 0,0001$  vs. DMSO). Ostatní látky v této dávce lokomoční aktivitu signifikantně neovlivnily (obr. 19a).

Dále byla analyzována lokomoční aktivita zvířat po podání vyšší dávky testovaných látek (5 mg/kg) a účinky byly porovnány s účinky 7-methoxytakrinu a MK-801. Analýza dráhy prokázala efekt skupiny (Brown-Forsythe ANOVA;  $F_{8,13,37} = 38,00$ ,  $p < 0,0001$ ). Dunnettův T3 post hoc test ukázal snížení lokomoční aktivity u skupin s látkami K1575, K1576, K1578, K1592 a K1594 (5 mg/kg; vs. DMSO,  $p = 0,0194$ ,  $p = 0,0374$ ,  $p = 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  a  $p = 0,0013$ ). Naopak aplikace MK-801 (0,2 mg/kg) vyvolala zvýšení lokomoční aktivity (vs. DMSO,  $p = 0,0098$ ). Látka K1599 ani 7-methoxytakrin lokomoci neovlivnily (obr. 19b).

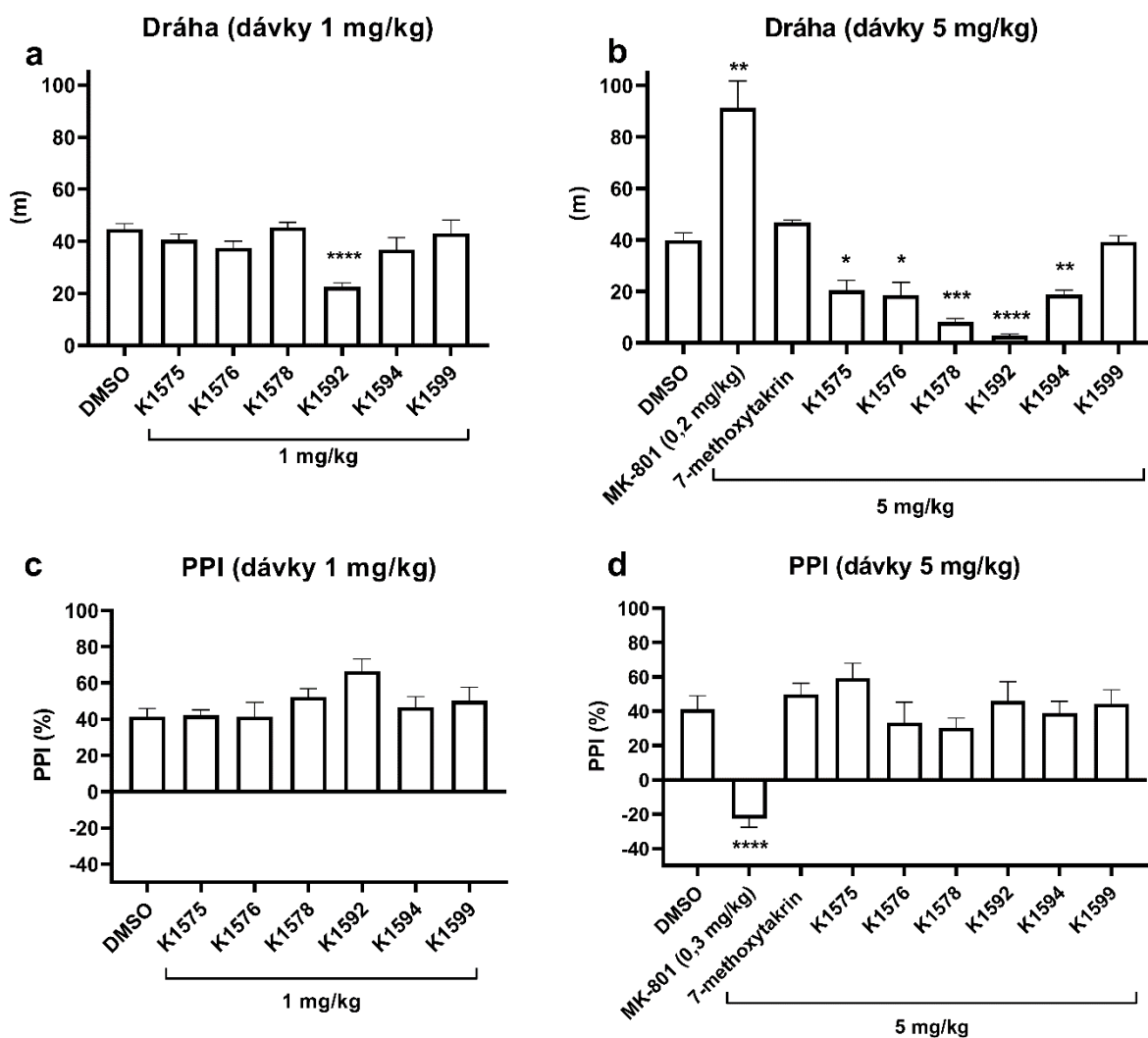
Hlavním výstupem experimentu je nízké riziko indukce hyperlokomoce po aplikaci testovaných takrinových derivátů působících jako antagonisté NMDA receptorů, což naznačuje nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků.

### 4.5.2 Prepulzní inhibice úlekové reakce

V rámci screeningu potenciálních psychotomimetických účinků testovaných látek byl zařazen i test PPI. PPI je fyziologický fenomén, který je důsledkem senzomotorického zpracování a aplikací psychotomimetik může být narušen.

Analýza PPI u zvířat po aplikaci nižší dávky testovaných látek (1 mg/kg) neprokázala efekt skupiny (ANOVA; obr. 19c). Vliv vyšší dávky testovaných látek (5 mg/kg) na PPI byl porovnán i s účinky 7-methoxytakrinu a MK-801. Tato analýza odhalila efekt skupiny (ANOVA;  $F_{8,48} = 7,377$ ,  $p < 0,0001$ ). Bonferroniho post hoc test ukázal pouze signifikantní snížení PPI u skupiny po aplikaci MK-801 (0,3 mg/kg,  $p < 0,0001$  vs. DMSO). Žádná z testovaných látek ani 7-methoxytakrin PPI signifikantně neovlivnily (obr. 19d).

Příznivé výsledky z PPI tedy spolu s výsledky z testu otevřeného pole ukazují nízký psychotomimetický potenciál testovaných takrinových derivátů.



**Obr. 19** Behaviorální účinky monotakrinových derivátů K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 a jejich srovnání s účinky MK-801 a 7-methoxytakrinu. Testované 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. (Skupinový průměr + SEM.)

## 5 DISKUZE

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

Vedle narušení glutamatergní neurotransmise naznačují recentní poznatky z modelů AD i možnou přítomnost dysfunkce GABAergního systému a dysbalanci mezi těmito excitačními a inhibičními systémy ve prospěch excitace mimo jiné i v hipokampu. Tyto alterace mohou přispívat ke kognitivnímu deficitu (Nava-Mesa et al., 2014; Palop et al., 2007; Verret et al., 2012). Vedle antagonistů NMDA receptorů, jejichž zástupce memantin je schváleným lékem proti AD, by se tak v léčbě mohly uplatnit i látky ovlivňující GABAergní systém a lze se domnívat, že současná farmakologická modulace obou těchto systémů by mohla komplementárními mechanismy napomoci k znovunastolení rovnováhy mezi excitací a inhibicí a tím i k výraznějšímu zmírnění kognitivního deficitu (Nava-Mesa et al., 2014). Cílem práce proto bylo porovnání účinku experimentální kombinované terapie a monoterapie antagonistou NMDA receptorů a pozitivním modulátorem GABA<sub>A</sub> receptorů. Jako antagonistu NMDA receptorů jsme použili MK-801 (dizocilpin), vysokoafinní blokátor otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru s relativně vysokou selektivitou pro tento typ glutamatergních receptorů (Ellison, 1995). Jako pozitivní modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů byl zvolen midazolam, jehož výhodou oproti většině jiných benzodiazepinů je rozpustnost ve vodě (Kanto, 1985).

Účinky opakované aplikace těchto látek byly studovány v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace vyvolané TMT u potkana, v němž kromě jiných procesů relevantních vzhledem k AD pravděpodobně dochází i k alteracím glutamatergního a GABAergního systému: zvýšení výlevu a snížení odčerpávání glutamátu (Aschner et al., 1992; Dawson et al., 1995), snížení hladiny GABA v hipokampu (Earley et al., 1992), změnám exprese GABA receptorů (Nishimura et al., 2001) a degeneraci GABAergních košičkových buněk v *gyru dentatu* (Chang and Dyer, 1985). Tyto změny by mohly do určité míry napodobovat dysbalanci excitace a inhibice. Po ukončení protektivní aplikace byla studována prostorová kognice a asociativní učení a experiment byl zakončen odběrem tkáně pro účely analýz hipokampální neurodegenerace. Oproti původní hypotéze jsme v klíčové kognitivní úloze prokázali účinek samostatné i kombinované aplikace testovaných látek bez signifikantní superiority kombinované aplikace. V následné stereologické analýze



hipokampální neurodegenerace jsme prokázali mírný protektivní efekt kombinované terapie, zatímco signifikantní efekt monoterapií prokázán nebyl.

### **5.1.1 Behaviorální analýza: pozitivní vliv kombinované aplikace i monoterapií**

Prostorová kognice zvířat byla testována v hipokampálně závislé úloze MWM. V souladu s literaturou (Earley et al., 1992; Lalkovicova et al., 2016; O'Connell et al., 1994) TMT indukoval kognitivní deficit. Zvířata po aplikaci TMT vykazovala zhoršené kognitivní schopnosti během celého experimentu, nástup učení byl opožděný a dle kumulativní latence jejich výkon ve finální fázi experimentu nedosáhl úrovně kontrolních zvířat. Tyto projevy jsou pravděpodobně důsledkem selektivního deficitu kognitivních funkcí, jelikož kontrolní procedury (plavba s viditelným ostrůvkem a testy otevřeného pole) neprokázaly přítomnost významné poruchy nekognitivních (zejm. senzoryckých a motorických) funkcí, která by mohla chování v MWM nespecificky ovlivnit.

Aplikace MK-801, midazolamu i jejich koaplikace zmírnila projevy kognitivního deficitu ve sledovaných parametrech. Účinky monoterapií jsou v souladu s dříve popsaným terapeutickým účinkem látek s podobným mechanismem účinku v použitém modelu a úloze, a sice gaboxadolu (THIP) (O'Connell et al., 1994), který je agonistou extrasynaptických GABA<sub>A</sub> receptorů (Meera et al., 2011), a dále fencyklidinu, který představuje nepříliš selektivního antagonistu NMDA receptorů (Earley et al., 1990).

Kombinovaná aplikace MK-801 a midazolamu však ve většině parametrů vykazovala podobnou účinnost jako tyto látky aplikované samostatně. Výsledkem, který by mohl naznačovat tendenci k vyšší účinnosti kombinované aplikace, byla signifikantně nižší průměrná vzdálenost od ostrůvku u skupiny s kombinovanou aplikací (TMT + MK-801 + midazolam), ale nikoli u skupin s monoterapií (TMT + MK-801 a TMT + midazolam) v posledních dvou dnech experimentu v porovnání se skupinou TMT. Tento nálezn odráží efektivnější prostorovou strategii těchto zvířat (Whiting and Kokiko-Cochran, 2016). V souladu s tím jsme u skupiny s kombinovanou aplikací pozorovali nižší skupinový průměr kumulativní latence než u skupin s monoterapií; rozdíl však nedosáhl statistické signifikance. Nelze tedy vyloučit možnost, že subtilní rozdíl mezi kognitivní výkonností skupin s monoterapií a kombinovanou aplikací byl přítomen, avšak použitá základní verze MWM nebyla dostatečně citlivá, aby jej detekovala. Celkově se však signifikantní superioritu kombinované aplikace nad monoterapiemi prokázat nepodařilo.

Druhou použitou kognitivní úlohu představovalo kontextuální strachové podmiňování, averzivní asociativní úloha vyžadující integritu amygdaly a do jisté míry i hipokampu (Kochli et al., 2015; Maren and Fanselow, 1997; Wiltgen et al., 2006). Analýza studovaného kognitivního parametru, kumulativní doby freezingu, neprokázala signifikantní rozdíly mezi skupinami, ačkoli byla pozorována nesignifikantní tendence ke zhoršení výkonu u skupin TMT a TMT + MK-801. Výsledky jsou v rozporu se studií, kde signifikantní snížení freezingu po aplikaci TMT přítomno bylo (Takahashi, 2004). Příčinou této diskrepance by mohly být odlišnosti experimentálního designu.

### **5.1.2 Histologická analýza: pozitivní vliv kombinované aplikace**

Po skončení behaviorálních experimentů bylo přistoupeno k odběru mozkové tkáně a analýze neurodegenerace v senzitivní oblasti hipokampu pomocí stereologických metod. V souladu s literaturou (Robertson et al., 1987; Whittington et al., 1989) aplikace TMT rezultovala ve výrazný pokles neuronální denzity v oblasti CA2/3 v dorzálním hipokampu. Monoterapie MK-801 nebo midazolamem v podmínkách použitého experimentálního designu a načasování odběru nepostačovala k signifikantnímu zmírnění neurodegenerace, zatímco kombinovaná aplikace (TMT + MK-801 + midazolam) měla částečný protektivní efekt. Histologické výsledky tedy naznačují superioritu kombinované aplikace.

Neuroprotektivní účinnost samostatné aplikace antagonistů NMDA receptorů ani pozitivních modulátorů GABA<sub>A</sub> receptorů v TMT modelu není příliš prozkoumaná a výsledky studií jsou spíše negativní (Gunasekar et al., 2001; Shuto et al., 2009; Zimmer et al., 1985). Naše výsledky však naznačují, že koaplikací těchto látek je možno jistého protektivního účinku dosáhnout. I pozorovaný částečný protektivní efekt považujeme za významný vzhledem k prodlevě mezi ukončením protektivní aplikace a odběrem histologického materiálu, během které degenerace pokračovala (Latini et al., 2010; Robertson et al., 1987; Whittington et al., 1989), a dále vzhledem ke skutečnosti, že analyzovaná oblast hipokampu zahrnovala oblast CA3c, považovanou za extrémně senzitivní k neurotoickým účinkům TMT (Robertson et al., 1987; Whittington et al., 1989).

Stereologická analýza byla doplněna analýzou morfometrických parametrů téže části dorzálního hipokampu, volených na základě popsaného ztenčení hipokampu a konkrétně zejména *gyru dentatu* v důsledku intenzivní TMT-indukované neurodegenerace v oblasti CA3c (Brown et al., 1979; Dyer et al., 1982; Robertson et al., 1987). Intenzivní degenerace se dle stupně závažnosti může šířit z CA3c směrem k CA3b a CA3a, což se může projevit

jako zkrácení linie pyramidálních buněk (Dyer et al., 1982). V souladu s tím jsme prokázali zmenšení plochy *gyru dentatu* a zkrácení linie pyramidálních buněk u zvířat s aplikovaným TMT; ztenčení dorzálního hipokampu prokázáno nebylo. Redukce plochy *gyru dentatu* byla signifikantně zmírněna kombinovanou aplikací studovaných protektivních látek, zatímco efekt monoterapií byl pouze parciální, což spolu se stereologickými výsledky naznačuje superioritu kombinované aplikace. V parametru délky linie pyramidálních buněk jsme vedle kombinované aplikace pozorovali i protektivní vliv samotného midazolamu.

### **5.1.3 Celkový efekt testovaných látek v TMT modelu a možné mechanismy účinku**

Celkově tedy behaviorální a histologické analýzy vedly k odlišným výsledkům, kdy všechny tři léčebné režimy podobnou měrou zmírnily kognitivní deficit v MWM, zatímco v pozdějším stanovení neuronální denzity v dorzálním CA2/3 byl signifikantní protektivní efekt potvrzen pouze u skupiny s kombinovanou aplikací. Zároveň je třeba podotknout, že tento neuroprotektivní efekt kombinované aplikace byl ve zvoleném časovém bodě pouze mírný, a naopak v MWM jsme pozorovali nesignifikantní tendenci k vylepšení výkonu u skupiny s kombinovanou aplikací. Protože však zmírnění kognitivního deficitu považujeme za klíčový parametr účinnosti studovaných látek, nemůžeme konstatovat potvrzení původní hypotézy o superioritě kombinované aplikace.

Naše výsledky proto zcela nepotvrzují synergistické interakce antagonistů NMDA receptorů a pozitivních modulátorů GABA<sub>A</sub> receptorů popsané v jiných modelech patologií CNS. Jmenované látky mohou mít synergistické protektivní účinky v modelech excitotoxicity, jak bylo dokázáno koaplikací ketaminu a thiopentalu sodného ve studii *in vitro* (Shibuta et al., 2006). V *in vivo* modelu ischemie a excitotoxicity zvýšila koaplikace MK-801 a agonisty GABA<sub>A</sub> receptorů muscimolu protektivní účinnost ve smyslu neuroprotektce i zmírnění následného kognitivního deficitu (Lyden and Lonzo, 1994). Kromě toho antagonisté NMDA receptorů a pozitivní modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů včetně benzodiazepinů mohou vykazovat synergistické účinky i v modelech jiných patologií CNS, a to epilepsie (Martin and Kapur, 2008; Niquet et al., 2016; Shakarjian et al., 2015) a následného kognitivního deficitu (Niquet et al., 2016). Jiná studie však synergistické antikonvulzivní účinky neprokázala (Fidecka and Pirogowicz, 2002).

Interpretace našich výsledků a identifikace možných mechanismů účinku a interakcí studovaných látek je limitována ne zcela známým mechanismem neurotoxicity TMT

a nejasnou rolí alterací neurotransmitterových systémů v tomto mechanismu. Alterace neurotransmise a excitotoxicita glutamátu byly považovány za jeden z možných faktorů přispívajících k neurotoxickým účinkům TMT (Koczyk, 1996). Na druhou stranu výsledky studií naznačují, že modulátory neurotransmitterových receptorů mohou zmírňovat behaviorální projevy indukované TMT (Earley et al., 1990; O'Connell et al., 1994), avšak zmírnění neurodegenerace a asociovaných procesů je podstatně méně uspokojujivé (Gunasekar et al., 2001; Shuto et al., 2009; Zimmer et al., 1985). Tato skutečnost vedla některé autory k domněnce, že alterace neurotransmise je v TMT modelu spíše sekundárním jevem přispívajícím ke kognitivnímu deficitu, než významnou příčinou neurodegenerace (Corvino et al., 2013). Prokognitivní a neuroprotektivní účinky látek ovlivňujících neurotransmisi v TMT modelu proto nemusí být nutně zprostředkovány stejnými mechanismy a není zřejmé, zda hlavním podkladem prokognitivních účinků antagonistů NMDA receptorů a pozitivních modulátorů/agonistů GABA<sub>A</sub> receptorů v TMT modelu je zmírnění neurodegenerace nebo jiné mechanismy. V této souvislosti je třeba zdůraznit, že v námi provedeném experimentu byly z etických důvodů k behaviorálním a následným histologickým experimentům použity stejné skupiny zvířat, což vedlo k 17denní prodlevě mezi ukončením aplikace testovaných látek a odběrem histologického materiálu. Histologické analýzy tak neposkytují informaci o úrovni neuroprotektce v době ukončení aplikace, ani si nekladou za cíl studium vztahu histologických a behaviorálních účinků látek.

Jako jeden z možných mechanismů pozorovaného neuroprotektivního účinku kombinované aplikace se jeví zmírnění excitotoxicity glutamátu, jelikož protektivní působení antagonistů NMDA receptorů (McDonald et al., 1989; Schauwecker, 2010) i pozitivních modulátorů GABA<sub>A</sub> receptorů (Ito et al., 1999; Mazzone and Nistri, 2019; Nelson et al., 2000) proti excitotoxicitě je známo a při jejich koaplikaci mohou být tyto jejich účinky synergistické (Shibuta et al., 2006). TMT není sám o sobě excitotoxinem, tj. neaktivuje přímo glutamatergní receptory (Krüger et al., 2005), avšak nepřímou indukovanou excitotoxicitu a hyperstimulační poškození neuronů byly zvažovány jako jeden z možných mechanismů jeho neurotoxicity. Účast excitotoxicity zůstává do současné doby nejasná a nebyla přímo potvrzena (Corvino et al., 2013). Hypotéza hyperstimulačního mechanismu neurotoxicity TMT byla navržena v 80. letech 20. století L. W. Changem (Chang, 1986). Charakter poškození mozku vyvolaného TMT byl skupinou L. W. Changa připodobňován k poškození indukovanému excitotoxinem (Dyer et al., 1982) a degenerace pyramidálních neuronů v CA3 byla připisována jejich hyperstimulaci disinhibovanými granulózními buňkami *gyru dentatu* (Chang, 1986; Chang and Dyer, 1985; Whittington et al., 1989). Příčinou disinhibice

granulárních buněk může být ztráta inhibiční kontroly v důsledku degenerace GABAergních košičkových buněk v *gyru dentatu* v časných fázích intoxikace TMT (Chang and Dyer, 1985). Tyto hypotézy byly podpořeny detailními studii spatio-temporální dynamiky degenerace v jednotlivých hipokampálních oblastech. Bylo prokázáno, že oblast CA3 je více zasažena v septálním, zatímco granulární vrstva *gyru dentatu* naopak v temporálním hipokampu (Chang, 1986). Opačný gradient poškození těchto neuronálních populací podél septo-temporální osy hipokampu podporoval domněnku, že funkční granulární buňky by mohly být nutným předpokladem pro degeneraci přilehlých pyramidálních buněk v CA3 (Chang, 1986; Whittington et al., 1989). Byla navržena i hypotetická role NMDA receptorů v patologickém procesu (Aschner and Aschner, 1992). S hypotézou hyperstimulačního mechanismu neurotoxicity TMT je konzistentní i nález zvýšené hladiny glutamátu (Aschner et al., 1992; Dawson et al., 1995).

Aplikace antagonistů NMDA receptorů, u nichž by se v případě účasti excitotoxicity dal očekávat neuroprotektivní efekt, však nevedla k zásadnímu zmírnění neurodegenerace (Shuto et al., 2009) ani souvisejících patologických procesů vyvolaných TMT (Dawson et al., 1995; Gunasekar et al., 2001). V pozdější době se pozornost přesunula k jiným možným mechanismům toxicity TMT (např. role proteinu stanninu (Thompson et al., 1996)) a relevance hypotéz hyperstimulačního poškození pyramidálních neuronů tak zůstává nejasná. Dle současných poznatků excitotoxicita a související aktivace NMDA receptorů nepředstavuje hlavní mechanismus zodpovědný za neurotoxicitu TMT, mohla by však prohlubovat oxidační stres vznikající primárně jinými mechanismy a tím k degeneraci přispívat (Geloso et al., 2011; Gunasekar et al., 2001). V tomto případě by se mohl uplatnit také antioxidační efekt aplikovaného midazolamu (Liu et al., 2017).

Závěrem můžeme konstatovat, že třebaže jsme u kombinované aplikace pozorovali zvýšení neuroprotektivní účinnosti a nesignifikantní tendenci k vylepšení účinku na kognici, signifikantní rozdíl mezi kombinovanou aplikací a monoterapií v klíčovém kognitivním testu prokázán nebyl a původní hypotéza se tedy nepotvrdila.

#### **5.1.4 Výsledky barvení Fluoro-Jade B**

Histochemické barvení Fluoro-Jade B bylo původně plánováno jako doplňková metoda hodnocení hipokampální neurodegenerace. Fluoro-Jade je anionický fluorochrom s ne zcela objasněným mechanismem působení, primárně používaný ke značení degenerujících neuronů. Metoda byla představena v roce 1997 a validována korelací s výsledky tradičních

histologických metod ve více různých modelech neurodegenerace u potkana (Schmued et al., 1997). Později bylo představeno barvení Fluoro-Jade B vynikající vyšší specificitou (Schmued and Hopkins, 2000a), které bylo s úspěchem použito také v TMT modelu ke kvantifikaci degenerace neuronů v oblasti CA1 ve vzorcích odebraných 7 dní po aplikaci TMT (Lalkovicova et al., 2016). Oproti tomu v námi zvoleném experimentálním designu zahrnujícím odběr tkáně v pozdější fázi neurodegenerace vyvolané TMT nebyla tato metoda shledána příliš vhodnou. V pyramidální buněčné vrstvě (zejm. oblast CA1) v dorzálním hipokampu byly u zvířat po aplikaci TMT (samostatně i v koaplikaci se studovanými protektivními režimy; nikoli u kontrolních zvířat) přítomny Fluoro-Jade B-pozitivní neurony. U většiny těchto zvířat ale byl jejich počet nízký a nebylo přistoupeno ke kvantifikaci. Je pravděpodobné, že ve zvoleném časovém bodě odběru tkáně byla neurodegenerace i přes známý prolongovaný průběh již za svou vrcholnou fází (Latini et al., 2010; Robertson et al., 1987). Dále potenciálně mohla hrát roli i některá specifika Fluoro-Jade barvení v chronických fázích neurodegenerace.

Interesantním vedlejším nálezem byla přítomnost Fluoro-Jade pozitivních elementů identifikovaných dle jejich morfologie jako možné astrocyty. Tyto buňky jsme pozorovali téměř u všech zvířat po aplikaci TMT bez ohledu na současnou protektivní léčbu, a to zejména v oblasti *hilu gyru dentatu* (včetně CA3c), zatímco u kontrolních zvířat přítomny nebyly. Suspektní astrocytální původ Fluoro-Jade B pozitivních elementů u zvířete s aplikovaným TMT byl posléze podpořen výsledky dvojího barvení Fluoro-Jade B s imunohistochemickým značením astrocytů (GFAP), provedeného u vybraných histologických řezů a ukazujícího kolokalizaci.

Přítomnost aktivovaných astrocytů v hipokampu, zejména v oblasti CA3 a v *hilu gyru dentatu* v pokročilejších časových obdobích po aplikaci TMT je známá z literatury (Balaban et al., 1988; Brock and O'Callaghan, 1987; Latini et al., 2010). Příčiny afinity Fluoro-Jade B k astrocytům jsou však nejasné. Nález Fluoro-Jade B pozitivních astrocytů byl popsán omezeným počtem studií v několika různých modelech patologií CNS, a to zejména v pozdějších časových obdobích. Selektivita barvení Fluoro-Jade pro degenerující neurony byla zpochybněna identifikací Fluoro-Jade pozitivních reaktivních astrocytů a časných diferencujících astroglálních buněk v histologických řezech z mozkové kůry pacientů s AD a také z modelu chirurgické korové léze u primátů (Colombo and Puissant, 2002). Podobný jev byl údajně pozorován i přímo v modelu neurodegenerace indukovaném TMT v pokročilejším časovém období (Pennypacker et al., as cited in (Butler et al., 2002)); jde

však o sekundární citaci nepublikovaných výsledků a není zřejmé, zda byl astrocytální původ buněk potvrzen imunohistochemicky. Fluoro-Jade pozitivní astrocyty byly pozorovány dále i ve vzorcích mozků potkanů odebraných 2 měsíce po indukci prionového onemocnění (Schmued and Hopkins, 2000b) a ve striatu od 14. dne po okluzi střední mozkové tepny (Butler et al., 2002). Skutečnost, že Fluoro-Jade pozitivní astrocyty byly pozorovány až od 14. dne po inzultu, ačkoli k aktivaci astrocytů (identifikované imunohistochemickým barvením GFAP) dochází již jeden den po inzultu, vedla autory k domněnce, že příčinou positivity astrocytů na Fluoro-Jade nemusí být pouhá jejich aktivace, ale může jít o astrocyty v procesu buněčného poškození (Butler et al., 2002). Na druhou stranu Fluoro-Jade může barvit i quiescentní astrocyty v míše intaktních zvířat (Anderson et al., 2003). Netypické výsledky barvení Fluoro-Jade B reportovala i M. Damjanac a kol. v myším dvojité transgenním modelu AD založeném na amyloidní hypotéze. Navzdory známé masivní neurodegeneraci v oblasti CA1 v tomto modelu autoři nepotvrdili přítomnost Fluoro-Jade B pozitivních neuronů, v uvedené oblasti ale byly nalezeny Fluoro-Jade B-pozitivní buněčné elementy identifikované pomocí dvojího barvení se specifickou protilátkou GFAP jako aktivované astrocyty. V souladu s našimi výsledky tak autoři konstatují, že méně známým využitím barvení Fluoro-Jade B, používaného u akutních inzultů k detekci degenerujících neuronů, by při chronických neurodegenerativních procesech vč. modelů AD mohla být identifikace a studium aktivovaných astrocytů (Damjanac et al., 2007).

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

Multipotentní sloučeniny jsou v současné době v popředí zájmu odborné veřejnosti zabývající se vývojem potenciálních léků pro léčbu AD. V Experimentu 2 jsme prokázali terapeutický efekt dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka pracovně označená 10w) a dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka pracovně označená S-K1035), nových multipotentních sloučenin působících mimo jiné jako inhibitory AChE, v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem u potkana. Skopolamin prostřednictvím blokady muskarinových cholinergních receptorů (Bolden et al., 1992; Hulme et al., 1978) narušuje cholinergní neurotransmisi a tím i kognitivní funkce (von Linstow Roloff et al., 2007), což do jisté míry napodobuje situaci u pacientů s AD (Bartus et al., 1982; Davies and Maloney, 1976) a umožňuje preklinické testování prokognitivních účinků inhibitorů AChE. Jako test prostorové kognice bylo použito MWM.

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

První studovaná látka, dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (látka 10w), představuje inhibitor AChE s vysokou potencí ( $IC_{50} = 18 \text{ nM}$ ) a velmi výraznou selektivitou pro AChE oproti BChE. Dalšími vlastnostmi této látky potenciálně relevantními pro léčbu AD je inhibice agregace amyloidu beta a středně silná inhibice ABAD (Nepovimova et al., 2021). Při orientačním posouzení nežádoucích účinků látky 10w byla dávka 1 mg/kg (*i. p.*) shledána bezpečnou, zatímco v dávce 10 mg/kg jsme pozorovali mírné až středně závažné příznaky (snížení aktivity, průjem, žvýkací pohyby). Zmíněné příznaky patří mezi známé projevy intenzivní cholinergní stimulace (Bejar et al., 1999; Carriero et al., 1997; Hunter et al., 1989; Misik et al., 2018; Namba, 1971).

Cílem následné části experimentu bylo stanovení efektu látky 10w v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem a porovnání s účinky takrinu ( $IC_{50} (\text{AChE}) = 320 \text{ nM}$  a  $IC_{50} (\text{BChE}) = 88 \text{ nM}$  (Nepovimova et al., 2021)). Oba inhibitory AChE byly aplikovány v dávkách, které při samostatné aplikaci nezpůsobují významné nežádoucí (např. parasymptomimetické) behaviorální účinky. V případě látky 10w byla zvolena dávka 2 mg/kg. Obdobně i takrin ve zvolené dávce 2,5 mg/kg (ale nikoli 5 mg/kg) nemá dle výsledků našich dřívějších experimentů významné cholinergní nežádoucí účinky (slabost,



tremor, salivace, abdukce zadních končetin), které by interferovaly s chováním zvířat v úloze MWM.

Skopolamin vyvolal deficit prostorové paměti v MWM, což je v souladu s literaturou (Bejar et al., 1999; Entlerova et al., 2013; Janas et al., 2005; Puri et al., 2014; von Linstow Roloff et al., 2007). Při koaplikaci látky 10w se podařilo prokázat zmírnění kognitivního deficitu a tedy účinnost předmětné látky *in vivo*. Skopolaminem indukovaný kognitivní deficit v úloze MWM může být redukován či eliminován aplikací mnoha dalších inhibitorů AChE včetně klinicky používaného donepezilu (Laczó et al., 2017) a rivastigminu (Bejar et al., 1999) a dále například fenserinu (Janas et al., 2005), takrinu (Bejar et al., 1999; H. Wang et al., 1999a), bis-7-takrinu (H. Wang et al., 1999a) nebo určitých rostlinných extraktů (Puri et al., 2014; Upadhyay et al., 2018). Obdobně v případě 6-chlorotakrinu, výchozí molekuly testované látky 10w, byl zaznamenán pozitivní efekt v modelu kognitivního deficitu vyvolaném quinuclidinyl benzilátem (Misik et al., 2018), který má obdobný mechanismus účinku i biologické účinky jako skopolamin (Misik et al., 2014). Inhibitory AChE zvyšují hladinu acetylcholinu, který patrně kompeticí se skopolaminem omezuje vazbu skopolaminu na muskarinové receptory a zmírňuje biologické účinky skopolaminu (Janas et al., 2005).

V případě takrinu jsme na rozdíl od látky 10w pozitivní vliv na kognitivní funkce neprokázali. Výsledky tedy ukazují superioritu účinku látky 10w nad účinky takrinu ve zvolených dávkách. Námi pozorovaná absence účinku takrinu je v rozporu s výsledky studií popisujících alespoň parciální efekt takrinu ve skopolaminem vyvolaném modelu kognitivního deficitu v různých modifikacích MWM (Bejar et al., 1999; H. Wang et al., 1999a). Příčinou neúčinnosti takrinu v našem experimentu by mohlo být použití nízké dávky. Dávková závislost prokognitivních účinků inhibitorů AChE je ve skopolaminem vyvolaném modelu kognitivního deficitu u potkana (Bejar et al., 1999; Braida et al., 1996) i u pacientů s AD (Canal and Imbimbo, 1996) někdy popisována křivkou ve tvaru obráceného písmene „U“. Příliš nízké dávky inhibitorů AChE patrně nevyvolají dostatečné zvýšení hladiny acetylcholinu, které by vytěsnilo skopolamin z vazby na muskarinový receptor, zatímco důvodem neúčinnosti příliš vysokých dávek by mohla být aktivace presynaptických cholinergních autoreceptorů značně zvýšenou hladinou acetylcholinu a následná redukce výlevu acetylcholinu (Braida et al., 1996; Weinstock, 1999). Dle výsledků preklinických studií jsou inhibitory AChE optimálně účinné v dávkách způsobujících 15–50% inhibici aktivity mozkových cholinesteráz (Braida et al., 1996; Misik et al., 2018). Rozmezí účinných dávek inhibitorů AChE včetně takrinu ve skopolaminem

indukovaném animálním modelu kognitivního deficitu může být poměrně úzké, jak bylo zjištěno při experimentech v radiálním bludišti (Braidá et al., 1996); naopak v určitém designu experimentu v MWM byl takrin účinný v širokém rozmezí dávek (Bejar et al., 1999). Důvody těchto rozdílných výsledků jsou nejasné. Antiamnestický účinek inhibitorů AChE je navíc ovlivněn i použitou dávkou skopolaminu a typem a designem úlohy (Bejar et al., 1999), což dále komplikuje porovnání a interpretaci výsledků předchozích studií.

Dávky takrinu popisované jako účinné v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem jsou ve srovnání s námi zvolenou dávkou často relativně vysoké (např. 8 mg/kg takrinu při současné aplikaci 5 mg/kg skopolaminu *i. p.* (Jackson and Soliman, 1995), nebo až 17,7 mg/kg takrinu a 0,5 mg/kg skopolaminu, subkutánní aplikace (Bejar et al., 1999)) a mohou se v některých případech blížit dávkám, které již mají nežádoucí účinky při samostatné aplikaci (Yoshida and Suzuki, 1993). Také podle našich předchozích výsledků takrin ve srovnatelně vysokých dávkách (7,5 mg/kg, bez současné aplikace skopolaminu) způsoboval závažné vedlejší účinky, které narušením motorických funkcí prakticky znemožnily testování zvířat v MWM (nepublikovaná data). Je-li společně s takrinem koaplikován skopolamin, může nežádoucí účinky takrinu potlačit (Hunter et al., 1989; Nielsen et al., 1989). Protože v publikovaných studiích prokazujících účinek takrinu v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem mnohdy nejsou zařazeny skupiny se samostatnou aplikací takrinu bez koaplikace skopolaminu, nelze vyloučit, že účinné dávky takrinu by v některých případech při samostatné aplikaci již mohly disponovat potenciálem indukce nežádoucích účinků. Oproti tomu v námi provedeném experimentu byla použita nižší dávka takrinu volená na základě absence nežádoucích účinků při samostatném podání, což mohlo být příčinou nedostatečné účinnosti. K ne zcela výhodnému profilu takrinu může přispívat spíše nízká inhibice cholinesteráz v hipokampu a relativně vysoká inhibice cholinesteráz ve striatu a ve svalech (Bejar et al., 1999).

V dávkách zvolených na základě absence zřejmých projevů nežádoucích účinků jsme tedy prokázali mírný efekt látky 10w, ale nikoli takrinu, což může naznačovat příznivější profil terapeutické účinnosti a nežádoucích účinků látky 10w. Faktorem přispívajícím k rozdílnému profilu testovaných látek by mohla být jejich rozdílná selektivita pro AChE. Takrin je neselektivním inhibitorem AChE i BChE (Hunter et al., 1989), kterážto vlastnost může být dle literatury asociována se zvýšením rizika periferních nežádoucích účinků, ale ne nutně se zvýšením účinnosti v CNS (Liston et al., 2004). V souladu s (Liston et al., 2004) se tak použití látky s vyšší selektivitou a potencií inhibice AChE, reprezentovanou v našem

experimentu látkou 10w (Nepovimova et al., 2021), jeví výhodnější. Obdobně i výsledky studie zaměřené na porovnání účinnosti takrinu s bis-7-takrinem, který je podobně jako látka 10w inhibitorem AChE s vyšší potencí a selektivitou než takrin (Pang et al., 1996), ukázaly vyšší účinnost bis-7-takrinu v modelu kognitivního deficitu indukovaném skopolaminem (H. Wang et al., 1999a). Celkově tedy výsledky našich experimentů potvrzují potenciál dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (10w) pro léčbu AD.

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

Předmětem druhé části studie (Experiment 2B) byl dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (látka S-K1035), působící jako potentní a vyvážený inhibitor obou cholinesteráz ( $IC_{50}$  (AChE) = 6,3 nM a  $IC_{50}$  (BChE) = 9,1 nM). Od výchozího 6-chlorotakrinu se tedy liší silnější inhibicí cholinesteráz a absencí selektivity pro AChE. Dalšími přínosnými účinky multipotentní sloučeniny S-K1035 jsou inhibice spontánní i AChE-indukované agregace amyloidu beta a středně silná inhibice nNOS (Chalupova et al., 2019). V našem experimentu jsme prokázali dávkově závislý pozitivní efekt látky S-K1035 ve skopolaminem indukovaném modelu kognitivního deficitu u potkana.

Pro ne zcela optimální farmakokinetické vlastnosti (průnik hematoencefalickou bariérou) jsme zvolili *i. c. v.* aplikaci studované látky, což si vyžádalo modifikaci designu MWM. Protože každodenní *i. c. v.* aplikace nebyla z praktických důvodů (mj. nebezpečí infekce, poškození implantátu) žádoucí, zvolili jsme jednorázovou aplikaci testované látky a skopolaminu poslední den MWM po předchozím tréninku intaktních zvířat bez farmakologické intervence.

V modelech kognitivního deficitu ve verzi MWM pro dlouhodobou paměť je skopolamin většinou aplikován denně již od počátku prostorového tréninku zvířat. Narušení akvizice skopolaminem v tomto uspořádání experimentu je zřejmé (Bejar et al., 1999; Entlerova et al., 2013; Janas et al., 2005; Puri et al., 2014). Oproti tomu vliv skopolaminu na vybavení (retrieval) informací předtím naučených intaktními zvířaty bez vlivu skopolaminu je studován méně často, role cholinergního systému a muskarinových receptorů v tomto procesu je méně objasněná a výsledky ohledně vlivu skopolaminu na vybavení prostorové paměti v MWM se rozcházejí (Jackson and Soliman, 1995; Kim and Ryu, 2008). Dávky skopolaminu narušující akvizici nemusí být dostačující k narušení vybavení (Kim and Ryu, 2008), kdy může být nutné podat vyšší dávku skopolaminu (Buresova et al., 1986).

Aplikovali jsme proto relativně vysokou dávku skopolaminu 5 mg/kg, zvolenou dle studie J. J. Jackson a M. R. I. Solimana (Jackson and Soliman, 1995). Ve jmenované studii byl použit nepřilíš intenzivní intaktní prostorový předtrénink. Použili jsme proto třídenní intaktní prostorový předtrénink se sníženým počtem plaveb. Skupinové průměry latence nalezení ostrůvku 22–28 s poslední den předtréninku ukázaly jistý stupeň naučení úlohy, ale dle našich zkušeností pravděpodobně ještě nebylo dosaženo asymptotické úrovně výkonu. Testovaná látka i skopolamin byly aplikovány 4. den experimentu. V souladu se studií (Jackson and Soliman, 1995) se aplikací skopolaminu podařilo vyvolat kognitivní deficit. Skopolamin tedy může za určitých okolností narušit paměť i ve fázi vybavení. K výlevu acetylcholinu v hipokampu dochází i při řešení již naučené prostorové úlohy (Fadda et al., 2000) a navzdory dřívějším názorům (Kim and Ryu, 2008) se cholinergní neurotransmise prostřednictvím muskarinových receptorů pravděpodobně účastní i fáze vybavení paměti v úloze MWM (Rashid and Ahmed, 2019). Podobně bylo narušení vybavení paměti skopolaminem prokázáno i v prostorové kognitivní úloze aktivního alotetického vyhýbání místu (i po dosažení asymptotické úrovně výkonu (Vales and Stuchlik, 2005)), úloze rozpoznání objektu (Kim and Ryu, 2008), strachového podmiňování (Rashid and Ahmed, 2019) a kontextuálního strachového podmiňování (Leaderbrand et al., 2016).

Při současné *i. c. v.* aplikaci vyšší (100nM) koncentrace testované látky S-K1035 se podařilo docílit zmírnění kognitivního deficitu. Tento příznivý výsledek prokazuje účinnost látky *in vivo* a je v souladu s dříve zmíněnými obecně známými účinky inhibitorů AChE v modelu indukovaném skopolaminem. Dále jsme prověřili, zda samotná *i. c. v.* aplikace účinné (100nM) koncentrace S-K1035 neovlivňuje chování v MWM u zdravých zvířat. Inhibitory AChE mohou vyvolávat centrální nežádoucí účinky, jako je tremor a hypolokomoce (Liston et al., 2004; Nielsen et al., 1989), které by při koaplikaci se skopolaminem mohly být potlačeny účinky skopolaminu (Hunter et al., 1989; Nielsen et al., 1989), ale při samostatné aplikaci by se mohly potenciálně projevit a narušit chování v MWM. Takové účinky se nedostavily a aplikace samotné látky S-K1035 neměla vliv na výkon zvířat v MWM. Látka tedy zmírňuje kognitivní deficit v koncentraci, která nemá závažné centrální nežádoucí účinky. Celkově jsme tedy prokázali terapeutický účinek látky S-K1035. Negativem látky jsou suboptimální farmakokinetické vlastnosti, což je obecným rizikem MTDL na bázi dimerů spojených uhlíkovým řetězcem, které se vyznačují vysokou molekulovou hmotností (Benek et al., 2020).

Studovaný dimer 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu (S-K1035) je inhibítozem AChE i BChE, zatímco dimer 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu (10w) je selektivním inhibítozem AChE. Porovnání jejich účinnosti není možné pro odlišný způsob aplikace a design experimentu. V klinické praxi se používají oba typy inhibítozů (Parsons et al., 2013) a nebyl sledován významný rozdíl v jejich účinnosti (Wattmo et al., 2011; Wilkinson et al., 2002). Oba typy také vykazují efekt v animálním modelu indukovaném skopolaminem (Bejar et al., 1999; Laczó et al., 2017; H. Wang et al., 1999a). Neselektivní inhibítozy cholinesteráz by mohly představovat vhodnější alternativu pro léčbu AD (Weinstock, 1999) z důvodu relativního zvýšení zastoupení BChE v pokročilejších stádiích AD (Perry et al., 1978). Na druhou stranu bylo u neselektivních inhibítozů v porovnání se selektivními inhibítozy AChE v preklinických studiích popsáno zvýšené riziko indukce periferních nežádoucích účinků za současné absence významného zvýšení žádoucího centrálního cholinergního účinku nad úroveň vyvolanou izolovanou inhibicí AChE (Dronfield et al., 2000; Liston et al., 2004). Uvedené výsledky ale pochází z experimentů provedených u intaktních zvířat a účinky látek v CNS tedy nemusí plně reflektovat situaci u pacientů s AD, u nichž je centrální exprese cholinesteráz alterována. V současné době je věnována pozornost vývoji látek s oběma typy účinku, přičemž neselektivní inhibítozy AChE mohly být vhodnější pro léčbu pokročilejších stádií AD, zatímco v léčbě méně pokročilých stádií by se mohly uplatnit spíše inhibítozy selektivní pro AChE (Nepovimova et al., 2021).

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

Jeden z potenciálně relevantních přístupů v rámci multipotentních sloučenin pro budoucí léčbu AD představuje vývoj látek působících jako inhibitory AChE a zároveň jako antagonisté NMDA receptorů. Mnozí zástupci antagonistů NMDA receptorů však vedle příznivých účinků mohou vykazovat i nežádoucí psychotomimetické účinky, manifestované u hlodavců jako hyperlokomoce a deficit PPI (Andiné et al., 1999; Bast et al., 2000). Cílem Experimentu 3 byla proto charakterizace behaviorálních účinků nových monotakrinových derivátů inhibujících AChE a NMDA receptory: 7-fenoxytakrinu a série látek K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599, a porovnání s účinky nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801. Hlavním a příznivým výstupem Experimentu 3 byl důkaz nízkého rizika psychotomimetických účinků všech testovaných takrinových derivátů. Behaviorální účinky zároveň v některých případech částečně naznačily i působení látek na cholinergní systém *in vivo*.

#### 5.3.1 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu

7-fenoxytakrin působí jako vyvážený inhibitor obou cholinesteráz ( $IC_{50}$  (AChE) = 2,4  $\mu$ M;  $IC_{50}$  (BChE) = 4,9  $\mu$ M) a NMDA receptorů ( $IC_{50}$  (GluN1/ GluN2B) = 1,7  $\mu$ M). Jeho výhodou je tedy vyrovnanější poměr afinit k těmto cílovým strukturám v porovnání s výchozí molekulou takrinem.

Vliv 7-fenoxytakrinu na spontánní lokomoční aktivitu byl studován pomocí testu otevřeného pole a porovnán s účinky MK-801. V souladu s literaturou (Andiné et al., 1999; Feinstein and Kritzer, 2013) aplikace MK-801 vyvolala hyperlokomoci, která je považována za ekvivalent psychotických příznaků (Andiné et al., 1999). Naopak 7-fenoxytakrin zvýšení lokomoční aktivity nevyvolal, což naznačuje nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků.

Riziko nežádoucích behaviorálních účinků antagonistů NMDA receptorů je ovlivněno mírou interference s fyziologickou funkcí NMDA receptorů a tedy přesným molekulárním mechanismem působení látky na receptor (Danysz et al., 1994; Depoortere et al., 1999; Fraser et al., 1996; Vyklícky et al., 2014). Antagonisté NMDA receptorů se dle vazebného místa dělí na kompetitivní a nekompetitivní. Potenciál kompetitivních antagonistů glutamátového vazebného místa jako neuroprotektivních léčiv je spíše malý, jelikož kompeticí s glutamátem mohou narušovat fyziologickou neurotransmisi a způsobovat

nežádoucí účinky, zatímco za patologických podmínek jsou z receptoru do značné míry vytěsněni zvýšenou hladinou glutamátu (Chen and Lipton, 2006; Grotta et al., 1995; Vyklicky et al., 2014).

Nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů mohou mít neuroprotektivní účinky a představují heterogenní skupinu látek co do přesného mechanismu interakce s receptorem i do míry rizika nežádoucích účinků (Andiné et al., 1999; Chen and Lipton, 2006; Danysz and Parsons, 2003). Obecně lze příznivější profil očekávat u látek, jež preferenčně inhibují patologicky tonicky aktivované NMDA receptory bez současného významného omezení fázické aktivace receptorů při fyziologické neurotransmisí. Tyto podmínky mohou splňovat mimo jiné některé blokátory otevřeného iontového kanálu aktivovaných NMDA receptorů (Vyklicky et al., 2014). Zatímco vysokoafinní blokátory otevřeného iontového kanálu jako MK-801 působí závažné psychotomimetické účinky a aplikace těchto látek laboratorním hlodavcům se dokonce používá jako model schizofrenii podobného chování (Andiné et al., 1999; Bast et al., 2000; Feinstein and Kritzer, 2013), zástupce blokátorů s nižší afinitou memantin má profil vedlejších účinků příznivější, ačkoli i on může vyvolávat mírné zvýšení lokomoční aktivity (Danysz et al., 1994).

Ještě výhodnější mechanismus účinku s vyšší selektivitou pro patologicky aktivované receptory a tedy s nižším rizikem nežádoucích účinků by mohla představovat inhibice otevřeného iontového kanálu tzv. „foot-in-the-door“ typu (Vyklicky et al., 2014). Právě tento mechanismus účinku sdílí také takrin a 7-methoxytakrin (Kaniakova et al., 2018), po jejichž aplikaci nebyla prokázána indukce nežádoucí hyperlokomoce (Kaniakova et al., 2018; Keseberg and Schmidt, 1993). Také 7-fenoxytakrin pravděpodobně působí jako blokátor otevřeného iontového kanálu NMDA receptorů; zda jde přímo o interakci typu „foot-in-the-door“, není v současnosti zřejmé. Vedle toho však 7-fenoxytakrin interaguje i s ifenprodilovým vazebným místem NMDA receptoru, což zajišťuje preferenční inhibici NMDA receptorů nesoucích podjednotku GluN2B (Kaniakova et al., 2021). Tento mechanismus účinku je potenciálně výhodný vzhledem k zásadní roli NMDA receptorů obsahujících podjednotku GluN2B při excitotoxické smrti neuronů (Liu et al., 2007; Martel et al., 2012), a zároveň nepřilíš vysokému (ač ne zcela nulovému) riziku psychotomimetických nežádoucích účinků antagonistů selektivních pro tuto subpopulaci NMDA receptorů (Depoortere et al., 1999; Fraser et al., 1996; Kemp and McKernan, 2002; Patat et al., 1994). Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem by tak příčinou příznivého profilu nežádoucích účinků 7-fenoxytakrinu (absence hyperlokomoce) mohl být jeho

specifický mechanismus vazby na NMDA receptor. Jistou roli by mohla hrát i simultánní inhibice AChE (Csernansky et al., 2005).

Přestože v našem uspořádání experimentu nebyl prokázán signifikantní vliv 7-fenoxytakrinu na lokomoční aktivitu zdravých zvířat, u skupin s aplikovaným 7-fenoxytakrinem jsme evidovali tendenci ke snížení lokomoční aktivity. Protože podání inhibitorů AChE včetně takrinu, donepezilu a fysostigminu může vyvolat snížení lokomoční aktivity (Carriero et al., 1997; Csernansky et al., 2005; Keseberg and Schmidt, 1993), domníváme se, že by pozorované projevy mohly být důsledkem inhibice cholinesteráz.

V další části experimentu zaměřené na vliv 7-fenoxytakrinu na hyperlokomoci vyvolanou aplikací MK-801 jsme prokázali zmírnění hyperlokomoce po aplikaci vyšší (10 mg/kg) testované dávky 7-fenoxytakrinu. Podobných výsledků bylo dříve dosaženo s 7-methoxytakrinem a za možný mechanismus tohoto účinku byla považována *in vivo* kompetice látky s MK-801 o vazbu v iontovém kanálu aktivovaných NMDA receptorů (Kaniakova et al., 2018). V případě 7-fenoxytakrinu by příčina mohla být obdobná, čemuž by mohly nasvědčovat i výsledky elektrofyzilogických analýz naznačující kompetici 7-fenoxytakrinu s MK-801 (Kaniakova et al., 2021). Vedle toho by ke snížení hyperlokomoce mohly přispívat i nepřímé cholinomimetické účinky 7-fenoxytakrinu, jelikož po aplikaci některých inhibitorů AChE jako takrinu a fysostigminu bylo popsáno dávkově závislé zmírnění hyperlokomoce indukované MK-801 (Csernansky et al., 2005; Keseberg and Schmidt, 1993).

Vzhledem ke známým anxiolytickým účinkům některých zástupců antagonistů NMDA receptorů (Wierońska et al., 2003; Wiley et al., 1995) byla charakterizace behaviorálních účinků 7-fenoxytakrinu doplněna prověřením vlivu na anxieta ve vyvýšeném křížovém bludišti. Zatímco po aplikaci MK-801 jsme v souladu s literaturou (Fraser et al., 1996; Wierońska et al., 2003) pozorovali anxiolytické účinky, v případě 7-fenoxytakrinu anxiolytické působení prokázáno nebylo. Při koaplikaci MK-801 s 7-fenoxytakrinem byl anxiolytický efekt MK-801 zachován. 7-fenoxytakrin tedy vyvolal odlišné účinky než jiný antagonist NMDA receptorů nesoucí GluN2B podjednotku ifenprodil, po jehož aplikaci byly naopak popsány anxiolytické účinky, které byly v případě koaplikace s MK-801 potlačeny (Fraser et al., 1996). Příčiny této diskrepance jsou nejasné, nelze ale vyloučit možné ovlivnění výsledného behaviorálního efektu 7-fenoxytakrinu jeho současnými účinky na cholinergní systém. Působení cholinergního systému na anxieta je komplexní



a v závislosti na míře stresu a dalších okolnostech mohou inhibitory AChE vyvolávat jak anxiolytické, tak i anxiogenní účinky (Mineur et al., 2013; Papp et al., 2016).

Závěrem můžeme zdůraznit nejvýznamnější výstup experimentu, a sice nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků 7-fenoxytakrinu. V návaznosti na tento příznivý výsledek bylo přistoupeno k posouzení účinnosti látky v modelu excitotoxického poškození hipokampu indukovaném lokální aplikací NMDA, kde podobně jako dříve v případě 7-methoxytakrinu (Kaniakova et al., 2018) kolegové prokázali neuroprotektivní účinky 7-fenoxytakrinu převyšující účinky memantinu i takrinu (Kaniakova et al., 2021).

### **5.3.2 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů**

Látky K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 představují nové takrinové deriváty působící jako inhibitory cholinesteráz a NMDA receptorů s různými kombinacemi afinit pro AChE/BChE a GluN2A/GluN2B podjednotku NMDA receptorů. V rámci stanovení rizika psychotomimetických účinků těchto látek byl hodnocen vliv na lokomoční aktivitu a dále i na sensorimotorické zpracování v testu PPI. PPI je fyziologické snížení amplitudy úlekové reakce méně intenzivním stimulem (prepulzem) prezentovaným bezprostředně před vlastním stimulem vyvolávajícím úlekovou reakci (Hoffman and Searle, 1965; Kohl et al., 2013). U pacientů se schizofrenií je PPI redukována (tj. úlekové reakce dosahují vyšších amplitud, než u zdravých subjektů), což je považováno za jeden z projevů aberantního zpracování a filtrace sensorických vstupů (Braff et al., 1978). Snížení PPI je zároveň i jedním z možných projevů nežádoucích psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů (Depoortere et al., 1999; Hohnadel et al., 2007).

Aplikace nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801 v souladu s literaturou (Andiné et al., 1999; Depoortere et al., 1999; Feinstein and Kritzer, 2013; Hohnadel et al., 2007) vyvolala hyperlokomoci a narušila PPI. Oproti tomu žádný ze studovaných takrinových derivátů hyperlokomoci ani deficit PPI nezpůsobil. Absence nežádoucích účinků přitom nebyla způsobena nedostatečným průnikem látek na místo účinku v CNS, jelikož penetrace látek hematoencefalickou bariérou byla ověřena předchozí farmakokinetickou studií (Gorecki et al., 2021). Příznivý výsledek behaviorálních testů tedy ukazuje nízké riziko indukce nežádoucích psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů po podání testovaných látek. Rovněž v případě 7-methoxytakrinu nebyly prokázány projevy nežádoucích účinků, což je ve shodě s předchozími výsledky (Kaniakova et al., 2018).

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) lokomoční aktivitu naopak snížily. Tyto projevy v testu otevřeného pole jsou spolu s výsledky z PPI konzistentní se známými účinky inhibitorů AChE. Inhibitory AChE zpravidla nenarušují PPI (Hohnadel et al., 2007), ale, jak bylo vysvětleno výše, selektivní (Csernansky et al., 2005) i neselektivní inhibitory AChE (Carriero et al., 1997; Keseberg and Schmidt, 1993) mohou snižovat lokomoční aktivitu. Možné roli inhibice AChE dále nasvědčuje skutečnost, že 7-methoxytakrin a K1599 (5 mg/kg), které představují nejméně potentní inhibitory AChE ze všech testovaných látek (Gorecki et al., 2021), na rozdíl od ostatních látek ve vyšší testované dávce lokomoční aktivitu nepotlačily, a naopak po podání látky K1592, potentního inhibitoru obou cholinesteráz (Gorecki et al., 2021), bylo snížení lokomoce nejvýraznější. Stupeň snížení lokomoční aktivity u jednotlivých skupin zvířat však nekoresponduje zcela hodnotám  $IC_{50}$  (AChE) aplikovaných látek (např. látka K1594, nejsilnější inhibitor AChE z testovaných látek, nevyvolala nejvýraznější pokles lokomoce). *In vivo* mechanismus účinku je tedy pravděpodobně komplexnější a může být výsledkem působení více faktorů.

Co do účinků na cholinesterázy se testované látky se liší nejen potencí jejich inhibice, ovlivněnou substituentem aromatické části takrinu a jeho pozicí, ale také stupněm preference pro AChE (index selektivity,  $IC_{50}$  (BChE)/  $IC_{50}$  (AChE)), ovlivněným také velikostí cykloalkylového zbytku a nabývajícím různých hodnot od selektivní inhibice AChE až po srovnatelnou míru inhibice obou cholinesteráz (Gorecki et al., 2021). Protože BChE pravděpodobně může do jisté míry převzít roli AChE v situacích, kdy je funkce AChE omezena (Hartmann et al., 2007), domníváme se, že v podmínkách potentní inhibice AChE by mohl být výsledný vliv na lokomoční aktivitu významně ovlivněn i mírou inhibičního působení dané látky na BChE. V této souvislosti se jeví zajímavým srovnání biologických účinků látek K1592 a K1594, které jsou obě potentními inhibitory AChE překonávajícími účinnost takrinu; látka K1592 je však silným inhibitorem obou cholinesteráz (index selektivity = 1,39), zatímco K1594 je vysoce selektivní pro AChE (index selektivity = 40,2) (Gorecki et al., 2021). Právě silné inhibiční působení látky K1592 na obě cholinesterázy by možná mohlo vysvětlovat, proč tato látka měla výraznější supresivní vliv na lokomoční aktivitu než látka K1594, přestože K1594 představuje nejpotentnější inhibitor AChE ze všech testovaných látek. Tyto nálezy by navíc mohly být v souladu s výsledky studie srovnávající míru hypolokomočních účinků jiných inhibitorů AChE, a to takrinu a bis-7-takrinu. Takrin navzdory výrazně slabší potenci inhibice AChE potlačuje lokomoční aktivitu výrazněji než bis-7-takrin (Pan et al., 2009). Takrin přitom inhibuje obě cholinesterázy

podobnou měrou, zatímco bis-7-takrin je selektivní pro AChE (index selektivity 0,41 pro takrin, resp. 99,38 pro bis-7-takrin (H. Wang et al., 1999b)), což by dle našeho názoru mohlo vysvětlovat intenzivnější vliv takrinu na lokomoci.

Ke snížení lokomoční aktivity po podání inhibitorů AChE mohou pravděpodobně přispívat centrální i periferní mechanismy. Inhibitory cholinesteráz mohou zvýšit cholinergní aktivitu ve striatu, což může vést k bradykinezi (Carriero et al., 1997; Ott and Lannon, 1992). Kromě toho může v důsledku inhibice AChE docházet ke zvýšení aktivity parasympatiku (Umegaki and Khookhor, 2013). Možnou roli periferní cholinergní stimulace při hypolokomočních účincích inhibitorů cholinesteráz naznačuje také snížení lokomoční aktivity u myši popsané po periferní aplikaci pyridostigminu, inhibitoru cholinesteráz s výrazně omezenou schopností penetrace hematoencefalickou bariérou (Lenina et al., 2020). Zároveň je známo, že BChE je abundantní zvláště na periférii a neselektivní inhibice AChE a BChE zvyšuje intenzitu projevů periferní, ale nikoli centrální cholinergní stimulace v porovnání se selektivní inhibicí AChE (Liston et al., 2004). K výraznému snížení lokomoční aktivity potentními neselektivními inhibitory AChE by tak možná mohly přispívat i periferní mechanismy. Vzhledem k multipotentnímu charakteru látek a skutečnosti, že látky se liší nejen afinitou a selektivitou pro cholinesterázy, ale zároveň i pro podjednotky NMDA receptorů, je však identifikace mechanismů zodpovědných za behaviorální účinky komplikovaná. Nelze tedy zcela vyloučit současnou účast dalších faktorů, včetně působení na NMDA receptory, v rámci pozorovaného behaviorálního efektu.

Jednoznačně příznivým nálezem je tedy absence psychotomimetických účinků testovaných takrinových derivátů. Jediným zjištěným behaviorálním vedlejším účinkem je snížení lokomoční aktivity, které bylo u většiny látek přítomno jen po podání vyšší z testovaných dávek a představuje očekávaný efekt asociovaný s mechanismem účinku. Snížení lokomoční aktivity u laboratorních zvířat bylo popsáno i po podání některých klinicky využívaných inhibitorů AChE, tento účinek tedy na rozdíl od psychotomimetických účinků antagonistů NMDA receptorů nemusí nutně představovat překážku pro potenciální využití látek. V návaznosti na tyto výsledky bylo recentně přistoupeno k testování účinnosti těchto nových takrinových derivátů v modelech dysfunkce cholinergního a glutamatergního systému.

## 6 ZÁVĚR

AD představuje závažné komplexní onemocnění s rostoucí prevalencí, omezenými možnostmi terapie a enormními dopady na kvalitu života pacientů i na zdravotní systém. V rámci vývoje nových možných léků je věnována stále větší pozornost multipotentním sloučeninám, potenciálně umožňujícím zvýšení účinnosti simultánním zasažením více relevantních drah. Práce se proto zabývala posouzením farmakologického potenciálu multipotentních sloučenin a kombinované aplikace na bázi modulátorů neurotransmitterových 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 vhodné kombinace mechanismů účinku, která povede k intenzifikaci celkového efektu. Racionalitu volby kombinace účinků je možno posoudit na základě porovnání účinnosti kombinované terapie a monoterapie danými typy látek. Cílem první části práce bylo proto porovnání efektů experimentální monoterapie a kombinované terapie antagonistou NMDA receptorů a pozitivním modulátorem GABA<sub>A</sub> receptorů v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace vyvolaném TMT. Domnívali jsme se, že při koaplikaci tyto látky komplementárními mechanismy umožní dosažení rovnováhy excitace a inhibice a tím i zvýšení terapeutického účinku. Superiorita protektivní účinnosti kombinované aplikace byla prokázána na histologické úrovni, avšak v kognitivním testu nedosáhla statistické signifikance. Protože z hlediska potenciálního klinického využití považujeme zmírnění kognitivních symptomů za nadřazené histologickým nálezům, nemůžeme konstatovat potvrzení původní hypotézy o superioritě kombinované aplikace. Interpretace tohoto ne zcela jednoznačného výsledku a identifikace možných mechanismů účinku a interakcí testovaných látek v TMT modelu je komplikována komplexním a ne zcela prozkoumaným mechanismem působení TMT. Pozitivní výsledek histologické části studie nicméně naznačuje, že koaplikace daných typů látek není zcela iracionální strategií. Ačkoli je aplikace TMT zajímavým méně známým modelem využitelným při výzkumu AD, nemůže modelovat onemocnění v celé jeho komplexitě. Porovnání účinků samostatné a kombinované aplikace studovaných látek i v jiných modelech AD odrážejících další její aspekty by mohlo poskytnout bližší představu o potenciální relevanci této kombinace mechanismů účinku pro léčbu AD.

Zbývající část práce se zabývala behaviorálními účinky nových multipotentních takrinových derivátů navržených a syntetizovaných jako potenciální léky pro AD. Zde jsme prokázali pozitivní efekt dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu a dále dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, působících kromě jiného jako inhibitory AChE, v modelu kognitivního deficitu vyvolaném aplikací skopolaminu. Tyto výsledky potvrzují potenciál daných látek pro léčbu AD. Účinnost dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu přitom ve zvolených dávkách překonala účinnost takrinu.

U jiných takrinových derivátů působících jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory AChE jsme se zaměřili na charakterizaci behaviorálních nežádoucích účinků. Zde jsme prokázali nízké riziko závažných psychotomimetických nežádoucích účinků, typických pro mnohé jiné antagonisty NMDA receptorů. Tyto příznivé výsledky umožnily zahájení preklinických testů účinnosti těchto látek.

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

## 7 SHRUTÍ

### 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<sub>A</sub> receptorů midazolamem v modelu kognitivního deficitu a hipokampální neurodegenerace indukovaném TMT u potkana. Prokázali jsme pozitivní efekt MK-801, midazolamu i jejich koaplikace v modelu kognitivního deficitu v úloze MWM, statisticky signifikantní superioritu kombinované aplikace nad monoterapií se však nepodařilo prokázat. Histologická analýza provedená s časovým odstupem po ukončení protektivní léčby ukázala parciální protektivní efekt kombinované aplikace proti TMT-indukované neurodegeneraci v oblasti CA2/3 dorzálního hipokampu, zatímco monoterapie byly v daném časovém bodě neefektivní. Behaviorální a histologické analýzy tedy vedly k odlišným výstupům, kdy pouze histologické výsledky ukázaly signifikantní superioritu kombinované aplikace.

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

Výsledky následujících studií prokazují účinnost takrinových derivátů, vyvinutých jako MTDL s potenciálem pro léčbu AD, v modelu kognitivního deficitu na bázi cholinerní dysfunkce u potkana.

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

V tomto experimentu jsme prokázali mírný pozitivní efekt látky 10w, dimeru 6-chlorotakrinu a 6-nitrobenzothiazolu s MTDL účinky zahrnujícími inhibici AChE, v MWM v modelu kognitivního deficitu vyvolaném aplikací skopolaminu. Naopak u takrinu v dávce volené na základě absence závažných vedlejších účinků terapeutický efekt prokázán nebyl. Naše výsledky tak naznačují možný příznivější profil účinnosti a nežádoucích účinků nově syntetizovaného takrinového derivátu ve srovnání s původní molekulou takrinem, dříve klinicky používaným k léčbě AD.

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

Výsledky této práce ukazují dávkově závislý pozitivní efekt látky S-K1035, dimeru 6-chlorotakrinu a L-tryptofanu, v MWM v modelu kognitivního deficitu vyvolaném skopolaminem. Předmětná látka představuje MTDL působící mimo jiné jako inhibitor cholinesteráz. Při samostatné aplikaci látka S-K1035 neovlivňuje chování zdravých zvířat v MWM.

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

Výsledky následujících studií ukazují nízké riziko nežádoucích psychotomimetických účinků multipotentních takrinových derivátů působících jako antagonisté NMDA receptorů a inhibitory AChE u potkana. Absence závažných nežádoucích účinků charakteristických pro antagonisty NMDA receptorů je nutným předpokladem pro potenciální budoucí využití látek pro léčbu AD a opravňuje zahájení následných testů účinnosti v modelech patologických procesů přítomných při AD.

#### **7.3.1 Experiment 3A: Behaviorální účinky 7-fenoxytakrinu**

V této studii jsme na základě absence projevů hyperlokomoce u potkana prokázali nízké riziko psychotomimetických nežádoucích účinků testované látky 7-fenoxytakrinu. Dále jsme ukázali, že 7-fenoxytakrin snižuje hyperlokomoci vyvolanou aplikací nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801. Nebyl zaznamenán žádný vliv 7-fenoxytakrinu na projevy anxiety ve zvýšeném křížovém bludišti.

#### **7.3.2 Experiment 3B: Behaviorální účinky série monotakrinových derivátů**

Výsledky této práce ukazují absenci hyperlokomoce a absenci deficitu PPI a tedy nízké riziko psychotomimetických nežádoucích účinků takrinových derivátů označených K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599. Po aplikaci vyšší dávky jsme u většiny látek evidovali snížení lokomoční aktivity, což je pravděpodobně projevem inhibice cholinesteráz.

## **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 experimental monotherapy and combination therapy with the NMDA receptor antagonist MK-801 and the positive GABA<sub>A</sub> receptor modulator midazolam in the trimethyltin-induced rat model of cognitive deficit and hippocampal neurodegeneration. We have demonstrated a therapeutic effect of MK-801, midazolam, as well as co-application thereof, in the model of cognitive deficit in the Morris water maze. However, we failed to prove statistically significant superiority of the combination therapy over monotherapy. Histological analysis performed with a time lag after the cessation of protective treatment indicated a partial protective effect of the combination therapy against trimethyltin-induced neurodegeneration in the CA2/3 subfield in the dorsal hippocampus, while monotherapies were ineffective at that time point. Therefore, behavioral and histological analyses provided different results, with only the latter suggesting 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 the following experiments we proved therapeutic effects of novel tacrine derivatives, multi-target-directed ligands developed as potential drugs for Alzheimer's disease, in a rat model of cognitive deficit based on cholinergic dysfunction.

#### **8.2.1 Experiment 2A: Effect of 6-Chlorotacrine–6-Nitrobenzothiazole Hybrid in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit**

In this experiment, we demonstrated a moderate therapeutic effect of the 6-chlorotacrine – 6-nitrobenzothiazole hybrid (named 10w) in the scopolamine-induced model of cognitive deficit in the Morris water maze. The compound 10w is a multi-target-directed ligand acting among others as an acetylcholinesterase inhibitor. The effect of the compound 10w was compared to the effect of the parent compound tacrine; doses devoid of obvious side effects were used. As opposed to 10w, we failed to demonstrate therapeutic effect of tacrine. Therefore, our results seem to indicate a likely more favorable effectiveness/safety profile



of the novel compound 10w compared to the parent compound tacrine, formerly used clinically for the treatment of Alzheimer's disease.

### **8.2.2 Experiment 2B: Effect of 6-Chlorotacrine – L-Tryptophan Hybrid in the Scopolamine-Induced Model of Cognitive Deficit**

The results of this study demonstrate a dose-dependent therapeutic effect of the 6-chlorotacrine – L-tryptophan hybrid (named S-K1035) in the scopolamine-induced model of cognitive deficit in the Morris water maze. The compound S-K1035 is a multi-target-directed ligand acting among others as an inhibitor of acetylcholinesterase. In healthy animals without scopolamine co-application, S-K1035 did not interfere with normal performance in the Morris water maze.

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

In the following experiments we demonstrated a low risk of undesirable psychotomimetic side effects of multipotent tacrine derivatives acting as NMDA receptor antagonists and acetylcholinesterase inhibitors. The absence of serious adverse effects, that are characteristic for many other NMDA receptor antagonists, is a prerequisite for the potential future use of the compounds in question for Alzheimer's disease treatment. Therefore, the absence of serious adverse effects in the rat justifies initiation of preclinical efficacy studies in the models of pathological processes associated with Alzheimer's disease.

#### **8.3.1 Experiment 3A: Behavioral Effects of 7-Phenoxytacrine**

In this study, we demonstrated the absence of hyperlocomotion after administration of 7-phenoxytacrine in the rat. This finding indicates a low risk of psychotomimetic side effects. We further showed that 7-phenoxytacrine mitigates the hyperlocomotion induced by the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801. In the anxiety test in the elevated plus maze, no effect of 7-phenoxytacrine was found.

#### **8.3.2 Experiment 3B: Behavioral Effects of a Novel Series of Monotacrine Derivatives**

The results of this study show the absence of hyperlocomotion and the absence of disruption of prepulse inhibition of acoustic startle response after administration of tacrine derivatives named K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 and K1599. Therefore, the risk of psychotomimetic side effects of the compounds in question is low. Conversely, when

administered at the higher selected dose, the majority of the tested compounds decreased the locomotor activity, probably via inhibition of cholinesterases.

## 9 LITERATURA

- Ahmad, A., Ramasamy, K., Jaafar, S.M., Majeed, A.B.A., Mani, V., 2014. Total isoflavones from soybean and tempeh reversed scopolamine-induced amnesia, improved cholinergic activities and reduced neuroinflammation in brain. *Food Chem. Toxicol.* 65, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.025>
- Aisen, P.S., Gauthier, S., Ferris, S.H., Saumier, D., Haine, D., Garceau, D., Duong, A., Suhy, J., Oh, J., Lau, W.C., Sampalis, J., 2011. Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the alphase study). *Arch. Med. Sci.* 7, 102–111. <https://doi.org/10.5114/aoms.2011.20612>
- Akaike, A., Tamura, Y., Yokota, T., Shimohama, S., Kimura, J., 1994. Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* 644, 181–187. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91678-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91678-0)
- Albertini, C., Salerno, A., de Sena Murteira Pinheiro, P., Bolognesi, M.L., 2020. From combinations to multitarget-directed ligands: A continuum in Alzheimer's disease polypharmacology. *Med. Res. Rev.* <https://doi.org/10.1002/med.21699>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00063>
- Anderson, K.J., Fugaccia, I., Scheff, S.W., 2003. Fluoro-Jade B Stains Quiescent and Reactive Astrocytes in the Rodent Spinal Cord. *J. Neurotrauma* 20, 1223–1231. <https://doi.org/10.1089/089771503770802899>
- Anderson, V.E.R., Hajimohammadreza, I., Gallo, J.M., Anderton, B.H., Uney, J., Brown, A.W., Nolan, C.C., Cavanagh, J.B., Leigh, P.N., 1992. Ubiquitin, PGP 9.5 and dense body formation in trimethyltin intoxication: Differential neuronal responses to chemically induced cell damage. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 18, 360–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1992.tb00798.x>
- 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.
- Andrade-Moraes, C.H., Oliveira-Pinto, A. V., Castro-Fonseca, E., da Silva, C.G., Guimarães, D.M., Szczupak, D., Parente-Bruno, D.R., Carvalho, L.R.B., Polichiso, L., Gomes, B. V., Oliveira, L.M., Rodriguez, R.D., Leite, R.E.P., Ferretti-Rebustini, R.E.L., Jacob-Filho, W., Pasqualucci, C.A., Grinberg, L.T., Lent, R., 2013. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* 136, 3738–3752. <https://doi.org/10.1093/brain/awt273>
- Antonova, E., Parslow, D., Brammer, M., Simmons, A., Williams, S., Dawson, G.R., Morris, R., 2011. Scopolamine disrupts hippocampal activity during allocentric spatial memory in humans: An fMRI study using a virtual reality analogue of the Morris Water Maze. *J. Psychopharmacol.* 25, 1256–1265. <https://doi.org/10.1177/0269881110379285>
- Aschner, M., Aschner, J.L., 1992. Cellular and molecular effects of trimethyltin and triethyltin: Relevance to organotin neurotoxicity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 427–

435. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80184-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80184-8)

- 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. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90131-R](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90131-R)
- Azizi-Malekabadi, H., Hosseini, M., Soukhtanloo, M., Sadeghian, R., Fereidoni, M., Khodabandehloo, F., 2012. Different effects of scopolamine on learning, memory, and nitric oxide metabolite levels in hippocampal tissues of ovariectomized and sham-operated rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 70, 447–452. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2012000600012>
- Bahník, Š., 2014. Carousel Maze Manager (Version 0.4.0) [Software]. Available from [https://github.com/bahniks/CM\\_Manager\\_0\\_4\\_0](https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_4_0).
- Baker-Nigh, A., Vahedi, S., Davis, E.G., Weintraub, S., Bigio, E.H., Klein, W.L., Geula, C., 2015. Neuronal amyloid- $\beta$  accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* 138, 1722–1737. <https://doi.org/10.1093/brain/awv024>
- Balaban, C.D., O'Callaghan, J.P., Billingsley, M.L., 1988. Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience* 26, 337–361. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90150-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90150-9)
- Balasubramanian, A.B., Kawas, C.H., Peltz, C.B., Brookmeyer, R., Corrada, M.M., 2012. Alzheimer disease pathology and longitudinal cognitive performance in the oldest-old with no dementia. *Neurology* 79, 915–921. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318266fc77>
- Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V., 2003.  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* 65, 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01514-9)
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217, 408–417. <https://doi.org/10.1126/science.7046051>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00409-3](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00409-3)
- Bejar, C., Wang, R.H., Weinstock, M., 1999. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 383, 231–240. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00643-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00643-3)
- Benek, O., Korabecny, J., Soukup, O., 2020. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.04.008>
- Bihaqi, S., Singh, A., Tiwari, M., 2012. Supplementation of *Convolvulus pluricaulis* attenuates scopolamine-induced increased tau and Amyloid precursor protein (A $\beta$ PP) expression in rat brain. *Indian J. Pharmacol.* 44, 593–598. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.100383>
- Birks, J., 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst.*

Rev. (1), CD005593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005593>

- Blokland, A., Honig, W., Raaijmakers, W.G.M., 1992. Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 109, 373–376. <https://doi.org/10.1007/BF02245886>
- Bolden, C., Cusack, B., Richelson, E., 1992. Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 576–580.
- Bolognesi, M.L., 2019. Harnessing Polypharmacology with Medicinal Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 273–275. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00039>
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., Buisson, A., 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- $\beta$  production. *J. Neurosci.* 30, 15927–15942. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3021-10.2010>
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braff, D., Stone, C., Callaway, E., Geyer, M., Glick, I., Bali, L., 1978. Prestimulus Effects on Human Startle Reflex in Normals and Schizophrenics. *Psychophysiology* 15, 339–343. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1978.tb01390.x>
- Braida, D., Paladini, E., Griffini, P., Lamperti, M., Maggi, A., Sala, M., 1996. An inverted U-shaped curve for heptylphosphostigmine on radial maze performance in rats: Comparison with other cholinesterase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 302, 13–20. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00072-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00072-6)
- Brock, T.O., O’Callaghan, J.P., 1987. Quantitative changes in the synaptic vesicle proteins synapsin I and p38 and the astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein are associated with chemical-induced injury to the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 7, 931–942. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-04-00931.1987>
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., de Strooper, B., Buée, L., 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid- $\beta$  1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci.* 32, 7852–7861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5901-11.2012>
- Brown, A.W., Aldridge, W.N., Street, B.W., Verschoyle, R.D., 1979. The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. *Am J Pathol* 97, 59–82.
- Brunson, K.L., Khanna, A., Cromwell, H.C., Cohen, R.W., 2001. Effect of the noncompetitive NMDA antagonists MK-801 and ketamine on the spastic Han-Wistar mutant: A rat model of excitotoxicity. *Dev. Neurosci.* 23, 31–40. <https://doi.org/10.1159/000048694>
- Buck, B.A., Mascioni, A., Cramer, C.J., Veglia, G., 2004. Interactions of alkyltin salts with biological dithiols: Dealkylation and induction of a regular  $\beta$ -turn structure in peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14400–14410. <https://doi.org/10.1021/ja046093s>

- Buresova, O., Bolhuis, J.J., Bures, J., 1986. Differential Effects of Cholinergic Blockade on Performance of Rats in the Water Tank Navigation Task and in a Radial Water Maze. *Behav. Neurosci.* 100, 476–482. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.100.4.476>
- Busquet, P., Capurro, V., Cavalli, A., Piomelli, D., Reggiani, A., Bertorelli, R., 2012. Synergistic effects of galantamine and memantine in attenuating scopolamine-induced amnesia in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 305–309. <https://doi.org/10.1254/jphs.12166SC>
- Butler, T.L., Kassed, C.A., Sanberg, P.R., Willing, A.E., Pennypacker, K.R., 2002. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 929, 252–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03371-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03371-6)
- Calhoun, A., King, C., Khoury, R., Grossberg, G.T., 2018. An evaluation of memantine ER + donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 19, 1711–1717. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1519022>
- Canal, N., Imbimbo, B.P., 1996. Relationship between pharmacodynamic activity and cognitive effects of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60, 218–228. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(96\)90138-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(96)90138-1)
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(97\)98986-3](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(97)98986-3)
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., Colín-Barenque, L., 2014. Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>
- Carson, K.A., Geula, C., Mesulam, M.M., 1991. Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* 540, 204–208. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90508-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90508-S)
- Chalupova, K., Korabecny, J., Bartolini, M., Monti, B., Lamba, D., Caliendo, R., Pesaresi, A., Brazzolotto, X., Gastellier, A.J., Nachon, F., Pejchal, J., Jarosova, M., Hepnarova, V., Jun, D., Hrabínova, M., Dolezal, R., Zdarova Karasova, J., Mzik, M., Kristofikova, Z., Misik, J., Muckova, L., Jost, P., Soukup, O., Benkova, M., Setnicka, V., Habartova, L., Chvojková, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.021>
- Chang, L.W., 1986. Neuropathology of trimethyltin: a proposed pathogenetic mechanism. *Fundam Appl Toxicol* 6, 217–232. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(86\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0272-0590(86)90235-6)
- Chang, L.W., Dyer, R.S., 1985. Early effects of trimethyltin on the dentate gyrus basket cells: a morphological study. *J Toxicol Env. Heal.* 16, 641–653. <https://doi.org/10.1080/15287398509530770>
- Cheal, M. Lou, 1981. Scopolamine disrupts maintenance of attention rather than memory processes. *Behav. Neural Biol.* 33, 163–187. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(81\)91612-5](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(81)91612-5)
- Chen, H.S.V., Lipton, S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA

- receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611–1626. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>
- Chumakov, I., Nabirovichkin, S., Cholet, N., Milet, A., Boucard, A., Toulorge, D., Pereira, Y., Graudens, E., Traore, S., Fouquier, J., Guedj, M., Vial, E., Callizot, N., Steinschneider, R., Maurice, T., Bertrand, V., Scart-Gres, C., Hajj, R., Cohen, D., 2015. Combining two repurposed drugs as a promising approach for Alzheimer's disease therapy. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep07608>
- Church, J., Zeman, S., Lodge, D., 1988. The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* 69, 702–709. <https://doi.org/10.1097/00000542-198811000-00011>
- 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 Sci.* 11, 400. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030400>
- Ciro, A., Park, J., Burkhard, G., Yan, N., Geula, C., 2012. Biochemical Differentiation of Cholinesterases from Normal and Alzheimers Disease Cortex. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 138–143. <https://doi.org/10.2174/156720512799015127>
- Colombo, J.A., Puissant, V.I., 2002. Fluoro Jade stains early and reactive astroglia in the primate cerebral cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1135–1137. <https://doi.org/10.1177/002215540205000815>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0932-9>
- Couratier, P., Lesort, M., Sindou, P., Esclaire, F., Yardin, C., Hugon, J., 1996. Modifications of neuronal phosphorylated  $\tau$  immunoreactivity induced by NMDA toxicity. *Mol. Chem. Neuropathol.* 27, 259–273. <https://doi.org/10.1007/BF02815108>
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300761>
- Cunningham, E., Mcguinness, B., Herron B, Passmore, A., 2015. Dementia. *Ulster Med. J.* 84, 79–87.
- 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. <https://doi.org/10.1201/noe1420052343.ch2>
- Damjanac, M., Bilan, A.R., Barrier, L., Pontcharraud, R., Anne, C., Hugon, J., Page, G., 2007. Fluoro-Jade® B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1128, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.050>
- Dantoine, T., Auriacombe, S., Sarazin, M., Becker, H., Pere, J.J., Bourdeix, I., 2006. Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. *Int. J. Clin. Pract.* 60, 110–118.

<https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2005.00769.x>

- Danysz, W., Essmann, U., Bresink, I., Wilk, R., 1994. Glutamate antagonists have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48, 111–118. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90506-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90506-1)
- Danysz, W., Parsons, C.G., 2003. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, S23–S32. <https://doi.org/10.1002/gps.938>
- Davidson, C.E., Reese, B.E., Billingsley, M.L., Yun, J.K., 2004. Stannin, a protein that localizes to the mitochondria and sensitizes NIH-3T3 cells to trimethyltin and dimethyltin toxicity. *Mol. Pharmacol.* 66, 855–863. <https://doi.org/10.1124/mol.104.001719>
- Davies, P., Maloney, A.J.F., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 308, 1403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- Dawson, R.J., Patterson, T.A., Eppler, B., 1995. Endogenous excitatory amino acid release from brain slices and astrocyte cultures evoked by trimethyltin and other neurotoxic agents. *Neurochem Res* 20, 847–858. <https://doi.org/10.1007/bf00969697>
- Delorey, T.M., Olsens, R.W., 1992.  $\gamma$ -Aminobutyric Acid A Receptor Structure and Function. *J. Biol. Chem.* 267, 16747–16750.
- 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. <https://doi.org/10.1097/00008877-199902000-00005>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
- Doody, R.S., Tariot, P.N., Pfeiffer, E., Olin, J.T., Graham, S.M., 2007. Meta-analysis of six-month memantine trials in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 3, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2006.10.004>
- Dronfield, S., Egan, K., Marsden, C.A., Green, A.R., 2000. Comparison of donepezil-, tacrine-, rivastigmine- and metrifonate-induced central and peripheral cholinergically mediated responses in the rat. *J. Psychopharmacol.* 14, 275–279. <https://doi.org/10.1177/026988110001400301>
- Drummond, E., Wisniewski, T., 2017. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 133, 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90186-u](https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90186-u)
- 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.



[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(90\)90121-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(90)90121-7)

- Ellison, G., 1995. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res. Rev.* 20, 250–267. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00014-G](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00014-G)
- Entlerova, M., Lobellova, V., Hatalova, H., Zemanova, A., Vales, K., Stuchlik, A., 2013. Comparison of Long-Evans and Wistar rats in sensitivity to central cholinergic blockade with scopolamine in two spatial tasks: An active place avoidance and the Morris water maze. *Physiol. Behav.* 120, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.06.024>
- Fadda, F., Cocco, S., Stancampiano, R., 2000. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport* 11, 2265–2269. <https://doi.org/10.1097/00001756-200007140-00040>
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-57>
- Feinstein, I., Kritzer, M.F., 2013. Acute N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction induced by MK801 evokes sex-specific changes in behaviors observed in open-field testing in adult male and proestrus female rats. *Neuroscience* 228, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.026>
- Fidecka, S., Pirogowicz, E., 2002. Lack of interaction between the behavioral effects of ketamine and benzodiazepines in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 54, 111–117.
- Flicker, C., Dean, R.L., Watkins, D.L., Fisher, S.K., Bartus, R.T., 1983. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18, 973–981. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(83\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(83)80023-9)
- Florian, C., Rouillet, P., 2004. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav. Brain Res.* 154, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.003>
- Francis, P.T., Parsons, C.G., Jones, R.W., 2012. Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 12, 1351–1365. <https://doi.org/10.1586/ERN.12.124>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(96)00036-3)
- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I., 2009. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Gallagher, M., Burwell, R., Burchinal, M.R., 1993. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 107, 618–626. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.107.4.618>

- Gauthier, S., Feldman, H., Hecker, J., Vellas, B., Ames, D., Subbiah, P., Whalen, E., Emir, B., Albarède, P.J., Ancill, R.J., Atallah, S., Bailey, P., Black, S.E., Borrie, M.J., Boundy, K., Clarnette, R., Cohen, S., Darby, D.G., Ewer, M., Farcnik, K., Helme, R.D., Hogan, D., Kertesz, A., Masters, C., Maupetit, J., McCracken, P., Mohr, E., Molloy, D.W., Mordasini, M., Moscovitch, A., Patterson, C., Pillay, N., Rabheru, K., Rajput, A., Rousseau, F., Tessier, D., Veloso, F., Willmer, J., 2002. Efficacy of donepezil on behavioral symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatrics* 14, 389–404. <https://doi.org/10.1017/S104161020200858X>
- Geloso, M.C., Corvino, V., Michetti, F., 2011. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochem Int* 58, 729–738. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.009>
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1996. Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 6, 165–177. <https://doi.org/10.1093/cercor/6.2.165>
- Giovannini, M.G., Mutolo, D., Bianchi, L., Michelassi, A., Pepeu, G., 1994. NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: A microdialysis study. *J. Neurosci.* 14, 1358–1365. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01358.1994>
- Goedert, M., 2009. Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain* 132, 1102–1111. <https://doi.org/10.1093/brain/awn256>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113434>
- Grossberg, G.T., Manes, F., Allegri, R.F., Gutiérrez-Robledo, L.M., Gloger, S., Xie, L., Jia, X.D., Pejović, V., Miller, M.L., Perhach, J.L., Graham, S.M., 2013. The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): A multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs* 27, 469–478. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0077-7>
- Grothe, M., Zaborszky, L., Atienza, M., Gil-Neciga, E., Rodriguez-Romero, R., Teipel, S.J., Amunts, K., Suarez-Gonzalez, A., Cantero, J.L., 2010. Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 20, 1685–1695. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp232>
- Grotta, J., Clark, W., Coull, B., Pettigrew, L.C., Mackay, B., Goldstein, L.B., Meissner, I., Murphy, D., LaRue, L., 1995. Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke* 26, 602–605.
- Gu, Z., Zhong, P., Yan, Z., 2003. Activation of muscarinic receptors inhibits  $\beta$ -amyloid peptide-induced signaling in cortical slices. *J. Biol. Chem.* 278, 17546–17556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209892200>

- 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. <https://doi.org/10.1093/toxsci/64.1.83>
- Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., Ankarcrona, M., 2008. The amyloid  $\beta$ -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13145–13150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105>
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- Harkany, T., Ábrahám, I., Timmerman, W., Laskay, G., Tóth, B., Sasvári, M., Kónya, C., Sebens, J.B., Korf, J., Nyakas, C., Zarándi, M., Soós, K., Penke, B., Luiten, P.G.M., 2000.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2735–2745. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00164.x>
- Hartmann, J., Kiewert, C., Duysen, E.G., Lockridge, O., Greig, N.H., Klein, J., 2007. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *J. Neurochem.* 100, 1421–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04347.x>
- 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. <https://doi.org/10.1037/h0022325>
- Hohnadel, E., Bouchard, K., Terry, A. V., 2007. Galantamine and donepezil attenuate pharmacologically induced deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuropharmacology* 52, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.08.025>
- Holmes, C., Amin, J., 2020. Dementia. *Med. (United Kingdom)* 48, 742–745. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.08.014>
- Horak, M., Holubova, K., Nepovimova, E., Krusek, J., Kaniakova, M., Korabecny, J., Vyklicky, L., Kuca, K., Stuchlik, A., Rícný, J., Vales, K., Soukup, O., 2017. The pharmacology of tacrine at N-methyl-D-aspartate receptors. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 75, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.01.003>
- Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V., Mehta, P., 1978. The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 14, 737–750.
- Hunsaker, M.R., Rosenberg, J.S., Kesner, R.P., 2008. The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus* 18, 1064–1073. <https://doi.org/10.1002/hipo.20464>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb16865.x>
- Hyman, B.T., Trojanowski, J.Q., 1997. Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the national institute on aging and the

- Reagan institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1095–1097. <https://doi.org/10.1097/00005072-199710000-00002>
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- $\beta$ -peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16, 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80108-7)
- Ishida, N., Akaike, M., Tsutsumi, S., Kanai, H., Masui, A., Sadamatsu, M., Kuroda, Y., Watanabe, Y., McEwen, B.S., Kato, N., 1997. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. *Neuroscience* 81, 1183–1191. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00220-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00220-0)
- Ito, H., Watanabe, Y., Isshiki, A., Uchino, H., 1999. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABA(A) receptors. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 43, 153–162. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.1999.430206.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02254-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02254-6)
- Janas, A.M., Cunningham, S.C., Duffy, K.B., Devan, B.D., Greig, N.H., Holloway, H.W., Yu, Q.S., Markowska, A.L., Ingram, D.K., Spangler, E.L., 2005. The cholinesterase inhibitor, phenserine, improves Morris water maze performance of scopolamine-treated rats. *Life Sci.* 76, 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.06.028>
- Ji, H.F., Zhang, H.Y., 2008. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. *Acta Pharmacol. Sin.* 29, 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00752.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.10.016>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.010>
- 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. *Biochem. Pharmacol.* 186, 114460. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114460>
- Kaniakova, M., Nepovimova, E., Kleteckova, L., Skrenkova, K., Holubova, K., Chrienova, Z., Hepnarova, V., Kucera, T., Kobrlova, T., Vales, K., Korabecny, J., Soukup, O., Horak, M., 2019. Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-

- Target Compound against Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 821–833. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190228122218>
- Kanto, J.H., 1985. Midazolam: The First Water-soluble Benzodiazepine. *Pharmacology, Pharmacokinetics and Efficacy in Insomnia and Anesthesia. Pharmacotherapy* 5, 138–155. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1985.tb03411.x>
- Kaur, S., Nehru, B., 2013. Alteration in glutathione homeostasis and oxidative stress during the sequelae of trimethyltin syndrome in rat brain. *Biol Trace Elem Res* 153, 299–308. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9676-x>
- Kelényi, G., 1967. On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 172–180. <https://doi.org/10.1177/15.3.172>
- Kelly, J.F., Furukawa, K., Barger, S.W., Rengen, M.R., Mark, R.J., Blanc, E.M., Roth, G.S., Mattson, M.P., 1996. Amyloid  $\beta$ -peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6753–6758. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6753>
- Kemp, J.A., McKernan, R.M., 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn936>
- Keri, R.S., Quintanova, C., Marques, S.M., Esteves, A.R., Cardoso, S.M., Santos, M.A., 2013. Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine-benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorganic Med. Chem.* 21, 4559–4569. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.028>
- Keseberg, U., Schmidt, W.J., 1993. Tetrahydroaminoacridine attenuates dizocilpine-induced behavioural changes. *Behav. Brain Res.* 53, 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80270-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80270-0)
- Khan, S., Fatima Shad, K., 2020. Neuroprotective Effects of Curcumin and Vitamin D3 on Scopolamine-Induced Learning-Impaired Rat Model of Alzheimer's Disease, in: *Neurological and Mental Disorders.* IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92407>
- Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Kochiyama, H., Maeda, T., Akaike, A., 1997. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against  $\beta$ -amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* 42, 159–163. <https://doi.org/10.1002/ana.410420205>
- Kim, D.H., Ryu, J.H., 2008. Differential effects of scopolamine on memory processes in the object recognition test and the Morris water maze test in mice. *Biomol. Ther.* 16, 173–178. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2008.16.3.173>
- Klinkenberg, I., Blokland, A., 2010. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 1307–1350. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.001>
- Kochli, D.E., Thompson, E.C., Fricke, E.A., Postle, A.F., Quinn, J.J., 2015. The amygdala is critical for trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* 22, 92–100. <https://doi.org/10.1101/lm.034918.114>
- Koczyk, D., 1996. How does trimethyltin affect the brain: Facts and hypotheses. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).*

- Koh, J. young, Yang, L.L., Cotman, C.W., 1990.  $\beta$ -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533, 315–320. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91355-K](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91355-K)
- Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J., Kuhn, J., 2013. Prepulse inhibition in psychiatric disorders - Apart from schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 47, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.11.018>
- Kršek, P., Mikulecká, A., Druga, R., Kubová, H., Hlišák, Z., Suchomelová, L., Mareš, P., 2004. Long-term behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 5, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2003.11.032>
- Krstic, D., Knuesel, I., 2013. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 25–34. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.236>
- Krüger, K., Diepgrond, V., Ahnefeld, M., Wackerbeck, C., Madeja, M., Binding, N., Musshoff, U., 2005. Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. *Br. J. Pharmacol.* 144, 283–292. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706083>
- 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., Klovrzova, 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. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4488-2>
- Lalkovicova, M., Burda, J., Nemethova, M., Burda, R., Danielisova, V., 2016. Postconditioning effectively prevents trimethyltin induced neuronal damage in the rat brain. *Folia Biol.* 64, 97–103. [https://doi.org/10.3409/fb64\\_2.97](https://doi.org/10.3409/fb64_2.97)
- Lancôt, K.L., Herrman, N., Mazzotta, P., Khan, L.R., Ingber, N., 2004. GABAergic function in Alzheimer's disease: Evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia. *Can. J. Psychiatry* 49, 439–453. <https://doi.org/10.1177/070674370404900705>
- Lannert, H., Hoyer, S., 1998. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long- term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112, 1199–1208. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.5.1199>
- Latini, L., Geloso, M.C., Corvino, V., Giannetti, S., Florenzano, F., Viscomi, M.T., Michetti, F., Molinari, M., 2010. Trimethyltin intoxication up-regulates nitric oxide synthase in neurons and purinergic ionotropic receptor 2 in astrocytes in the hippocampus. *J Neurosci Res* 88, 500–509. <https://doi.org/10.1002/jnr.22238>
- Leaderbrand, K., Chen, H.J., Corcoran, K.A., Guedea, A.L., Jovasevic, V., Wess, J., Radulovic, J., 2016. Muscarinic acetylcholine receptors act in synergy to facilitate

learning and memory. *Learn. Mem.* 23, 631–638.  
<https://doi.org/10.1101/lm.043133.116>

- Lenina, O.A., Zueva, I. V., Zobov, V. V., Semenov, V.E., Masson, P., Petrov, K.A., 2020. Slow-binding reversible inhibitor of acetylcholinesterase with long-lasting action for prophylaxis of organophosphate poisoning. *Sci. Rep.* 10.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73822-6>
- Lerch, J.P., Pruessner, J.C., Zijdenbos, A., Hampel, H., Teipel, S.J., Evans, A.C., 2005. Focal decline of cortical thickness in Alzheimer's disease identified by computational neuroanatomy. *Cereb. Cortex* 15, 995–1001. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh200>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.080>
- Little, A.R., Miller, D.B., Li, S., Kashon, M.L., O'Callaghan, J.P., 2012. Trimethyltin-induced neurotoxicity: Gene expression pathway analysis, q-RT-PCR and immunoblotting reveal early effects associated with hippocampal damage and gliosis. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.09.012>
- 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. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6031>
- Liu, P.P., Xie, Y., Meng, X.Y., Kang, J.S., 2019. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4, 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, R., Crawford, J., Callahan, P.M., Terry, A. V., Constantinidis, C., Blake, D.T., 2018. Intermittent stimulation in the nucleus basalis of Meynert improves sustained attention in rhesus monkeys. *Neuropharmacology* 137, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.026>
- Liu, Y., Tak, P.W., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Ted, W.L., Dong, C.W., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Yu, T.W., 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 27, 2846–2857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007>
- Lorenzo, A., Yankner, B.A., 1994.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12243–12247. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12243>
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L.F., Walker, D.G., Kappasamy, P., Zewier, Z.L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S.S. Du, Wu, H., 2004. A $\beta$  Directly Links A $\beta$  to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science* (80-. ). 304, 448–452. <https://doi.org/10.1126/science.1091230>
- Lyden, P.D., Lonzo, L., 1994. Combination Therapy Protects Ischemic Brain in Rats: A glutamate antagonist plus a  $\gamma$ -Aminobutyric acid agonist. *Stroke* 25, 189–195. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.1.189>

- Lynch, M.A., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol. Rev.* 84, 87–136. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
- Maelicke, A., Hoeffle-Maas, A., Ludwig, J., Maus, A., Samochocki, M., Jordis, U., Koepke, A.K.E., 2010. Memogain is a galantamine pro-drug having dramatically reduced adverse effects and enhanced efficacy. *J. Mol. Neurosci.* 40, 135–137. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9269-5>
- Maren, S., Fanselow, M.S., 1997. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 142–149. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3752>
- Martel, M.A., Ryan, T.J., Bell, K.F.S., Fowler, J.H., McMahon, A., Al-Mubarak, B., Komiyama, N.H., Horsburgh, K., Kind, P.C., Grant, S.G.N., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E., 2012. The Subtype of GluN2 C-terminal Domain Determines the Response to Excitotoxic Insults. *Neuron* 74, 543–556. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.021>
- Martin, B.S., Kapur, J., 2008. A combination of ketamine and diazepam synergistically controls refractory status epilepticus induced by cholinergic stimulation. *Epilepsia* 49, 248–255. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01384.x>
- Martinez-Coria, H., Green, K.N., Billings, L.M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., Parsons, C.G., Gupta, S., Banerjee, P., LaFerla, F.M., 2010. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer’s-like neuropathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 176, 870–880. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090452>
- Mátéffyová, A., Otáhal, J., Tsenov, G., Mareš, P., Kubová, H., 2006. Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life. *Eur. J. Neurosci.* 24, 351–360. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04910.x>
- Mazzone, G.L., Nistri, A., 2019. Modulation of extrasynaptic GABAergic receptor activity influences glutamate release and neuronal survival following excitotoxic damage to mouse spinal cord neurons. *Neurochem. Int.* 128, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.018>
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M. V., 1989. Neuroprotective effects of MK-801, TCP, PCP and CPP against N-methyl-d-aspartate induced neurotoxicity in an in vivo perinatal rat model. *Brain Res.* 490, 33–40. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90427-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90427-7)
- Meera, P., Wallner, M., Otis, T.S., 2011. Molecular basis for the high THIP/gaboxadol sensitivity of extrasynaptic GABA A receptors. *J. Neurophysiol.* 106, 2057–2064. <https://doi.org/10.1152/jn.00450.2011>
- Mesulam, M., 2004. The Cholinergic Lesion of Alzheimer’s Disease: Pivotal Factor or Side Show? *Learn. Mem.* 11, 43–49. <https://doi.org/10.1101/lm.69204>
- Mesulam, M., Geula, C., 1994. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann. Neurol.* 36, 722–727. <https://doi.org/10.1002/ana.410360506>



- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., Quinn, B., 2002. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.* 9, 88–93. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0462>
- Mineur, Y.S., Obayemi, A., Wigstrand, M.B., Fote, G.M., Calarco, C.A., Li, A.M., Picciotto, M.R., 2013. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3573–3578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219731110>
- Minger, S.L., Esiri, M.M., McDonald, B., Keene, J., Carter, J., Hope, T., Francis, P.T., 2000. Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology* 55, 1460–1467. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.10.1460>
- Misik, J., Nepovimova, E., Pejchal, J., Kassa, J., Korabecny, J., Soukup, O., 2018. Cholinesterase Inhibitor 6-Chlorotacrine - In Vivo Toxicological Profile and Behavioural Effects. *Curr. Alzheimer Res.* 15, 552–560. <https://doi.org/10.2174/1567205015666171212105412>
- Misik, J., Vanek, J., Musilek, K., Kassa, J., 2014. Cholinergic antagonist 3-quinuclidinyl benzilate - Impact on learning and memory in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 266, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.001>
- Mitsushima, D., Sano, A., Takahashi, T., 2013. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. *Nat. Commun.* 4, 2760. <https://doi.org/10.1038/ncomms3760>
- Molnár, Z., Soós, K., Lengyel, I., Penke, B., Szegedi, V., Budai, D., 2004. Enhancement of NMDA responses by  $\beta$ -amyloid peptides in the hippocampus in vivo. *Neuroreport* 15, 1649–1652. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000134471.06244.d2>
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Morris, R.G.M., 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
- 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. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503–513.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211.
- Nagy, Z., Hindley, N.J., Braak, H., Braak, E., Yilmazer-Hanke, D.M., Schultz, C., Barnetson, L., King, E.M., Jobst, K.A., Smith, A.D., 1999. The progression of Alzheimer's disease from limbic regions to the neocortex: clinical, radiological and pathological relationships. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10, 115–120. <https://doi.org/10.1159/000017111>
- Nairismägi, J., Pitkänen, A., Kettunen, M.I., Kauppinen, R.A., Kubova, H., 2006. Status

- epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: A histologic and MRI study. *Epilepsia* 47, 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00455.x>
- Namba, T., 1971. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull. World Health Organ.* 44, 289–307.
- 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. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00167>
- Nelson, R.M., Green, A.R., Lambert, D.G., Hainsworth, A.H., 2000. On the regulation of ischaemia-induced glutamate efflux from rat cortex by GABA; In vitro studies with GABA, clomethiazole and pentobarbitone. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1124–1130. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703398>
- 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. *Bioorg. Chem.* 107, 104596. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104596>
- Neumeister, K.L., Riepe, M.W., 2012. Synergistic effects of antidementia drugs on spatial learning and recall in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 30, 245–251. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111643>
- Nielsen, J.A., Mena, E.E., Williams, I.H., Nocerini, M.R., Liston, D., 1989. Correlation of brain levels of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioral changes. *Eur. J. Pharmacol.* 173, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90008-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90008-3)
- Nilsberth, C., Kostyszyn, B., Luthman, J., 2002. Changes in APP, PS1 and other factors related to Alzheimer's disease pathophysiology after trimethyltin-induced brain lesion in the rat. *Neurotox. Res.* 4, 625–636. <https://doi.org/10.1080/1029842021000045471>
- Niquet, J., Baldwin, R., Norman, K., Suchomelova, L., Lumley, L., Wasterlain, C.G., 2016. Midazolam-ketamine dual therapy stops cholinergic status epilepticus and reduces Morris water maze deficits. *Epilepsia* 57, 1406–1415. <https://doi.org/10.1111/epi.13480>
- Nishimura, T., Schwarzer, C., Furtinger, S., Imai, H., Kato, N., Sperk, G., 2001. Changes in the GABA-ergic system induced by trimethyltin application in the rat. *Mol. Brain Res.* 97, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00278-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00278-9)
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science.* 258, 304–307. <https://doi.org/10.1126/science.1411529>
- Nitta, A., Itoh, A., Hasegawa, T., Nabeshima, T., 1994. Beta-amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci. Lett.* 170, 63–66.

- Nyakas, C., Granic, I., Halmy, L.G., Banerjee, P., Luiten, P.G.M., 2011. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- $\beta$ 42 with memantine. *Behav. Brain Res.* 221, 594–603. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.033>
- 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.
- Ott, B.R., Lannon, M.C., 1992. Exacerbation of parkinsonism by tacrine. *Clin. Neuropharmacol.* 15, 322–325. <https://doi.org/10.1097/00002826-199208000-00008>
- Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., Wang, J., Thwin, M.T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K.O., Yu, G.Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J.L., Mucke, L., 2007. Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron* 55, 697–711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.025>
- Pan, S.Y., Yu, Z.L., Xiang, C.J., Dong, H., Fang, H.Y., Ko, K.M., 2009. Comparison studies of tacrine and bis(7)-tacrine on the suppression of scopolamine-induced behavioral changes and inhibition of acetylcholinesterase in mice. *Pharmacology* 83, 294–300. <https://doi.org/10.1159/000211668>
- Pang, Y.P., Quiram, P., Jelacic, T., Hong, F., Brimijoin, S., 1996. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 23646–23649. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23646>
- Papp, M., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., Willner, P., 2016. Antidepressant, anxiolytic and procognitive effects of rivastigmine and donepezil in the chronic mild stress model in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 1235–1243. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4206-0>
- Pappas, B.A., Bayley, P.J., Bui, B.K., Hansen, L.A., Thal, L.J., 2000. Choline acetyltransferase activity and cognitive domain scores of Alzheimer's patients. *Neurobiol. Aging* 21, 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00090-7)
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9398-z>
- Patat, A., Molinier, P., Hergueta, T., Brohier, S., Zieleniuk, I., Danjou, P.H., Warot, D., Puech, A., 1994. Lack of amnestic, psychotomimetic or impairing effect on psychomotor performance of eliprodil, a new nmda antagonist. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 9, 155–162. <https://doi.org/10.1097/00004850-199409000-00003>
- Pattanashetti, L.A., Taranalli, A.D., Parvatrao, V., Malabade, R.H., Kumar, D., 2017. Evaluation of neuroprotective effect of quercetin with donepezil in scopolamine-induced amnesia in rats. *Indian J. Pharmacol.* 49, 60–64. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.201016>
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edition. 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. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Peng, G.P., Feng, Z., He, F.P., Chen, Z.Q., Liu, X.Y., Liu, P., Luo, B.Y., 2015. Correlation of Hippocampal Volume and Cognitive Performances in Patients with Either Mild Cognitive Impairment or Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 15–22. <https://doi.org/10.1111/cns.12317>
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E., 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4, 273–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1978.tb00545.x>
- Petrasek, T., Skurlova, M., Maleninska, K., Vojtechova, I., Kristofikova, Z., Matuskova, H., Sirova, J., Vales, K., Ripova, D., Stuchlik, A., 2016. A rat model of Alzheimer's disease based on Abeta42 and pro-oxidative substances exhibits cognitive deficit and alterations in glutamatergic and cholinergic neurotransmitter systems. *Front. Aging Neurosci.* 8, 83. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00083>
- Petrasek, T., Vojtechova, I., Lobellova, V., Popelikova, A., Janikova, M., Brozka, H., Houdek, P., Sladek, M., Sumova, A., Kristofikova, Z., Vales, K., Stuchlik, A., 2018. The McGill Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease Displays Cognitive and Motor Impairments, Changes in Anxiety and Social Behavior, and Altered Circadian Activity. *Front. Aging Neurosci.* 10, 250. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00250>
- Piaceri, I., Nacmias, B., Sorbi, S., 2013. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front. Biosci. - Elit.* 5, 167–177. <https://doi.org/10.2741/e605>
- Pilipenko, V., Narbute, K., Pupure, J., Rumaks, J., Jansone, B., Klusa, V., 2019. Neuroprotective action of diazepam at very low and moderate doses in Alzheimer's disease model rats. *Neuropharmacology* 144, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.003>
- Popelíková, A., Bahník, Š., Lobellová, V., Svoboda, J., Stuchlík, A., 2018. Mnemonic and behavioral effects of biperiden, an M1-selective antagonist, in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 235, 2013–2025. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4899-3>
- Porsteinsson, A., Grossberg, G., Mintzer, J., Olin, J., 2008. Memantine Treatment in Patients with Mild to Moderate Alzheimers Disease Already Receiving a Cholinesterase Inhibitor: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 83–89. <https://doi.org/10.2174/156720508783884576>
- Puri, A., Srivastava, P., Pandey, P., Yadav, R., Bhatt, P., 2014. Scopolamine induced behavioral and biochemical modifications and protective effect of *Celastrus paniculatus* and *Angelica glauca* in rats. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 4, 158. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.132675>
- Rajeshwari, R., Chand, K., Candeias, E., Cardoso, S., Chaves, S., Santos, M., 2019. New Multitarget Hybrids Bearing Tacrine and Phenylbenzothiazole Motifs as Potential Drug Candidates for Alzheimer's Disease. *Molecules* 24, 587. <https://doi.org/10.3390/molecules24030587>
- Rashid, H., Ahmed, T., 2019. Muscarinic activity in hippocampus and entorhinal cortex is

- crucial for spatial and fear memory retrieval. *Pharmacol. Reports* 71, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.02.004>
- Reid, G.A., Darvesh, S., 2015. Butyrylcholinesterase-knockout reduces brain deposition of fibrillar  $\beta$ -amyloid in an Alzheimer mouse model. *Neuroscience* 298, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.039>
- Reyes, A.E., Chacón, M.A., Dinamarca, M.C., Cerpa, W., Morgan, C., Inestrosa, N.C., 2004. Acetylcholinesterase- $A\beta$  complexes are more toxic than  $A\beta$  fibrils in rat hippocampus: Effect on rat  $\beta$ -amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am. J. Pathol.* 164, 2163–2174. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63774-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63774-1)
- Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., Mucke, L., 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 316, 750–754. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>
- Robertson, D.G., Gray, R.H., de la Iglesia, F.A., 1987. Quantitative assessment of trimethyltin induced pathology of the hippocampus. *Toxicol Pathol* 15, 7–17. <https://doi.org/10.1177/019262338701500102>
- Robinson, S., Chapman, K., Hudson, S., Sparrow, S., Spencer-Briggs, D., Danks, A., Hill, R., Everett, D., Mulier, B., Old, S., Bruce, C., 2009. Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. <https://norecopa.no/3r-guide/guidance-on-dose-level-selection-for-regulatory-general-toxicology-studies-for-pharmaceuticals>.
- Sadot, E., Gurwitz, D., Barg, J., Behar, L., Ginzburg, I., Fisher, A., 1996. Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates  $\tau$  phosphorylation in transfected PC12 cells. *J. Neurochem.* 66, 877–880. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020877.x>
- Saucier, D., Hargreaves, E.L., Boon, F., Vanderwolf, C.H., Cain, D.P., 1996. Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: Nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behav. Neurosci.* 110, 103–116. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.1.103>
- Scallet, A.C., Pothuluri, N., Rountree, R.L., Matthews, J.C., 2000. Quantitating silver-stained neurodegeneration: the neurotoxicity of trimethyltin (TMT) in aged rats. *J Neurosci Methods* 98, 69–76. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00191-6)
- Schauwecker, P.E., 2010. Neuroprotection by glutamate receptor antagonists against seizure-induced excitotoxic cell death in the aging brain. *Exp. Neurol.* 224, 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.013>
- Scherzer-Attali, R., Pellarin, R., Convertino, M., Frydman-Marom, A., Egoz-Matia, N., Peled, S., Levy-Sakin, M., Shalev, D.E., Caflisch, A., Gazit, E., Segal, D., 2010. Complete phenotypic recovery of an Alzheimer's disease model by a quinone-tryptophan hybrid aggregation inhibitor. *PLoS One* 5, e1110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011101>
- Schmued, L.C., Albertson, C., Slikker, W., 1997. Fluoro-Jade: A novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*

751, 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01387-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01387-X)

- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000a. Fluoro-Jade B: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874, 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02513-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02513-0)
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000b. Fluoro-Jade: Novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol. Pathol.* 28, 91–99. <https://doi.org/10.1177/019262330002800111>
- Schneider, L.S., Dagerman, K.S., Higgins, J.P.T., McShane, R., 2011. Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 68, 991–998. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.69>
- Schuff, N., Woerner, N., Boreta, L., Kornfield, T., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Thompson, P.M., Jack, C.R., Weiner, M.W., 2009. MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimers disease in relation to ApoE genotype and biomarkers. *Brain* 132, 1067–1077. <https://doi.org/10.1093/brain/awp007>
- Shakarjian, M.P., Ali, M.S., Veliskova, J., Stanton, P.K., Heck, D.E., Velisek, L., 2015. Combined diazepam and MK-801 therapy provides synergistic protection from tetramethylenedisulfotetramine-induced tonic-clonic seizures and lethality in mice. *Neurotoxicology* 48, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.03.007>
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid  $\beta$ -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat Med* 14, 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
- 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. <https://doi.org/10.1093/bja/ael192>
- Shinoe, T., Matsui, M., Taketo, M.M., Manabe, T., 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 11194–11200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2338-05.2005>
- 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. <https://doi.org/10.1254/jphs.08211fp>
- Sipos, M.L., Burchnell, V., Galbicka, G., 1999. Dose-response curves and time-course effects of selected anticholinergics on locomotor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 147, 250–256. <https://doi.org/10.1007/s002130051164>
- Soukup, O., Winder, M., Killi, U.K., Wsol, V., Jun, D., Kuca, K., Tobin, G., 2016. Acetylcholinesterase Inhibitors and Drugs Acting on Muscarinic Receptors- Potential Crosstalk of Cholinergic Mechanisms During Pharmacological Treatment. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 637–653. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160607212615>
- Stelzmann, R.A., Norman Schnitzlein, H., Reed Murtagh, F., 1995. An English translation

- of Alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin. Anat.* 8, 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Summers, W.K., Majovski, L.V., Marsh, G.M., Tachiki, K., Kling, A., 1986. Oral Tetrahydroaminoacridine in Long-Term Treatment of Senile Dementia, Alzheimer Type. *N. Engl. J. Med.* 315, 1241–1245. <https://doi.org/10.1056/nejm198611133152001>
- Tagliavini, F., Tiraboschi, P., Federico, A., 2021. Alzheimer's disease: the controversial approval of Aducanumab. *Neurol. Sci.* 42, 3069–3070. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05497-4>
- Takahashi, H., 2004. Automated measurement of freezing time to contextual and auditory cues in fear conditioning as a simple screening method to assess learning and memory abilities in rats. *J. Toxicol. Sci.* 29, 53–61. <https://doi.org/10.2131/jts.29.53>
- Tarawneh, R., Holtzman, D.M., 2012. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006148. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006148>
- Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I., 2004. Memantine Treatment in Patients with Moderate to Severe Alzheimer Disease Already Receiving Donepezil: A Randomized Controlled Trial. *J. Am. Med. Assoc.* 291, 317–324. <https://doi.org/10.1001/jama.291.3.317>
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thompson, T.A., Lewis, J.M., Dejneka, N.S., Severs, W.B., Polavarapu, R., Billingsley, M.L., 1996. Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: Neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 1201–1215.
- Umegaki, H., Khookhor, O., 2013. The response of the autonomic nervous system to the cholinesterase inhibitor, donepezil. *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 383–387.
- Upadhyay, P., Sadhu, A., Singh, P.K., Agrawal, A., Ilango, K., Purohit, S., Dubey, G.P., 2018. Revalidation of the neuroprotective effects of a United States patented polyherbal formulation on scopolamine induced learning and memory impairment in rats. *Biomed. Pharmacother.* 97, 1046–1052. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.008>
- Vales, K., Stuchlik, A., 2005. Central muscarinic blockade interferes with retrieval and reacquisition of active allothetic place avoidance despite spatial pretraining. *Behav. Brain Res.* 161, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.012>
- Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M.I., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., Mucke, L., Palop, J.J., 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.046>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.038>

- Vorhees, C. V., Williams, M.T., 2014. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 55, 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
- Vorhees, C. V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1, 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L., 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.* 63, S191–203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: A critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>
- Wang, H., Carlier, P.R., Ho, W.L., Lee, N.T.K., Pang, Y.P., Han, Y.F., 1999a. Attenuation of scopolamine-induced deficits in navigational memory performance in rats by bis(7)-tacrine, a novel dimeric AChE inhibitor. *Acta Pharmacol. Sin.* 20, 211–217.
- Wang, H., Carlier, P.R., Ho, W.L., Wu, D.C., Lee, N.T.K., Li, C.P.L., Pang, Y.P., Han, Y.F., 1999b. Effects of bis(7)-tacrine, a novel anti-Alzheimer's agent, on rat brain AChE. *Neuroreport* 10, 789–793. <https://doi.org/10.1097/00001756-199903170-00023>
- Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 1999. The levels of soluble versus insoluble brain  $\text{a}\beta$  distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* 158, 328–337. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7085>
- Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., Lewis, K.W., 1994. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 271, 992–998. <https://doi.org/10.1001/jama.1994.03510370044030>
- Wattmo, C., Wallin, Å.K., Londos, E., Minthon, L., 2011. Predictors of long-term cognitive outcome in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* 3, 23. <https://doi.org/10.1186/alzrt85>
- Weinstock, M., 1999. Selectivity of cholinesterase inhibition: Clinical implications for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 12, 307–323. <https://doi.org/10.2165/00023210-199912040-00005>
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310411>
- Wetherell, J.L., Jeste, D. V., 2003. Diagnostic decision tree in dementia. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 44–47. <https://doi.org/10.31887/dcns.2003.5.1/jloebachwetherell>
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain.



Science. 215, 1237–1239. <https://doi.org/10.1126/science.7058341>

- Whiting, M.D., Kokiko-Cochran, O.N., 2016. Assessment of cognitive function in the water maze task: Maximizing data collection and analysis in animal models of brain injury, in: Kobeissy, F., et al. (Eds.), *Injury Models of the Central Nervous System: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1462. Springer Science+Business Media, New York, USA, 553–571. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3816-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3816-2_30)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(89\)90081-0](https://doi.org/10.1016/0892-0362(89)90081-0)
- Wierońska, J.M., Szewczyk, B., Pałucha, A., Brański, P., Śmiałowska, M., 2003. Involvement of CRF but not NPY in the anxiety regulation via NMDA receptors. *Pol. J. Pharmacol.* 55, 1119–1124.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00506-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00506-4)
- Wilkinson, D., Andersen, H.F., 2007. Analysis of the effect of memantine in reducing the worsening of clinical symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 24, 138–145. <https://doi.org/10.1159/000105162>
- Wilkinson, D.G., Passmore, A.P., Bullock, R., Hopker, S.W., Smith, R., Potocnik, F.C. V, Maud, C.M., Engelbrecht, I., Hock, C., Ieni, J.R., Bahra, R.S., 2002. A multinational, randomised, 12-week, comparative study of donepezil and rivastigmine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Int. J. Clin. Pract.* 56, 441–6.
- Wiltgen, B.J., Sanders, M.J., Anagnostaras, S.G., Sage, J.R., Fanselow, M.S., 2006. Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 5484–5491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2685-05.2006>
- Wu, W.Y., Dai, Y.C., Li, N.G., Dong, Z.X., Gu, T., Shi, Z.H., Xue, X., Tang, Y.P., Duan, J.A., 2017. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 572–587. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1210139>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90628-U](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90628-U)
- Zhang, H.T., O'Donnell, J.M., 2000. Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 150, 311–316. <https://doi.org/10.1007/s002130000414>
- Zhang, Z., Simpkins, J.W., 2010. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. *Brain Res.* 1359, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.077>
- Zimmer, L., Woolley, D., Chang, L., 1985. Does phenobarbital protect against trimethyltin-induced neuropathology of limbic structures? *Life Sci* 36, 851–858. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90209-7)

## 10 SEZNAM PUBLIKACÍ

### Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce:

**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. **IF<sub>2020</sub> = 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. **IF<sub>2020</sub> = 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., Hrabínova, 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. **IF<sub>2019</sub> = 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. **IF<sub>2020</sub> = 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. **IF<sub>2020</sub> = 6,514.**

### Původní vědecké práce, 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. **IF<sub>2016</sub> = 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. **IF<sub>2020</sub> = 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. **IF<sub>2020</sub> = 4,879**.

## 11 PŘÍLOHY