

Kombinált teljesítményfokozó farmakológiai kezelések hatékonyságának vizsgálata neurokognitív zavarok különböző patkány modelljeiben

Doktori (PhD) értekezés

Bruszt Nóra



Témavezető: Prof. Dr. Hernádi István

egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Orvostudományi és Gyógyszerésztudományi Doktori és Habilitációs Tanács

Pécs, 2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	6
1.1. Kognitív változások az egészséges és a patológiás öregedés során.....	6
1.1.1. Az Alzheimer-kór kognitív tünetei és patológiás háttere	8
1.2. A neuroinflammáció szerepe az öregedéssel kapcsolatos kognitív hanyatlásban	10
1.3. Kolinerg neurotranszmisszió zavarai a normál és a patológiás öregedés során	11
1.4. A neurokognitív zavarok gyógyszeres kezelése	13
1.4.1. Az Alzheimer-kór terápiája.....	13
1.5. Az $\alpha 7$ -nAChR-ok, mint potenciális gyógyszer-célpontok a kognitív zavarokban	16
1.6. $\alpha 7$ -nAChR-okra ható agonisták és PAM vegyületek pro-kognitív hatásai	17
1.7. Kombinált terápiák	19
2. CÉLKITŰZÉSEK	22
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
3.1. A memantin és a PHA-543613 közötti interakció vizsgálata farmakológiai NCD- modellben.....	23
3.1.1. Epizodikus memória vizsgálata MWM paradigma alkalmazásával	23
3.1.1.1. Kísérleti állatok elhelyezése és tartása.....	23
3.1.1.2. Morris -féle vízi labirintus teszt (MWM).....	24
3.1.1.3. A kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete	24
3.1.1.4. Statisztikai analízis.....	25
3.1.2. Rövid-távú memória vizsgálata T-labirintus alkalmazásával.....	25
3.1.2.1. Kísérleti állatok elhelyezése és tartása.....	25
3.1.2.2. T-labirintus teszt.....	26
3.1.2.3. A kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete.....	27
3.1.2.4. Statisztikai analízis.....	27
3.2. A memantin és $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók vizsgálata idős patkányokban...	28
3.2.1. A kísérleti állatok elhelyezése és tartása	29
3.2.2. Új tárgy felismerési teszt (NOR).....	29
3.2.3. A kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete	30
3.2.4. Agyminták begyűjtése és előkészítése a biokémiai vizsgálatokhoz	31
3.2.5. RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű PCR.....	31
3.2.6. Fehérje izolálás és ELISA teszt	33
3.2.7. Statisztikai analízis	33
4. EREDMÉNYEK	34
4.1. A memantin és a PHA-543613 kombinált hatása patkányok tanulási és memória teljesítményére.....	34

4.1.1. Memantinnal és a PHA-543613-mal végzett monokezelések a szkopolaminnal szemben	34
4.1.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált alkalmazása.....	36
4.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált hatása patkányok spontán alternáló teljesítményére.....	41
4.2.1. A memantinnal végzett monokezelések a szkopolaminnal szemben.....	42
4.2.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált alkalmazása.....	42
4.3. A memantin és $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók vizsgálata idős patkányokban ..	43
4.3.1. Az öregedés hatása a patkányok hosszú-távú deklaratív memóriájára	43
4.3.2. Memantinnal, PHA-543613-mal és a PAM vegyülettel végzett monokezelések kognitív serkentő hatásai	44
4.3.3. Memantin és $\alpha 7$ -nAChR-okra ható ligandok kombinált alkalmazása	46
4.3.4. A neuroinflammációval összefüggésbe hozható mediátorok és az $\alpha 7$ -nAChR-ok mRNS expressziós vizsgálata fiatal és idős patkány agyban	47
4.3.5. A neuroinflammációval összefüggésbe hozható mediátorok és az $\alpha 7$ -nAChR-ok fehérje expressziós vizsgálata fiatal és idős patkány agyban	50
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	52
5.1. A memantin és a PHA-543613 kombinálása enyhítette a patkányok szkopolaminnal indukált memória romlását	52
5.2. A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok kombinálása enyhítette a patkányok öregedéssel összefüggő memória romlását	54
5.3. A kombinált kezelésekből származó eredményeink összevetése pre-klinikai adatokkal...55	
5.4. A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók hátterében álló lehetséges mechanizmusok	56
5.5. Öregedéssel összefüggő gyulladási markerek és az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziós változásai.....	58
5.6. Konklúzió	60
6. ÖSSZEFOGLALÁS	62
7. SUMMARY	64
8. FELHASZNÁLT IRODALOM	66
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK.....	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh-acetilcolin

AD-Alzheimer-kór

AI-memória defícites

APP-amiloid prekursor protein

ÁTET-Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács

AU-normál memória teljesítményű

A β -béta amiloid

BDNF-agyi eredetű növekedési faktor

cDNS-komplementer dezoxiribonukleinsav szál

ChE-acetilcolin észteráz enzim

ChEI-kolinészteráz inhibitor

CNTF-ciliáris neurotrofikus faktor

Cyca-ciklofilin A

DNY-délnyugat

ELISA-enzimhez kötött immunszorbens próba

FDA- Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal

GABA- γ -aminovajsav

IL-10-Interleukin-10

IL-1 β -Interleukin-1 béta

IL-4-Interleukin-4

IL-6-Interleukin-6

IP-intraperitoneális

LPS-lipopoliszacharid

LTP -hosszú távú potenciáció

MÁB-Munkahelyi Állatjóléti Bizottság

mAChR-muszkarinos acetilcolin receptor

MCP-1-monocita kemoattraktáns protein-1

MIP-1 α -makrofág gyulladássos protein-1 alfa

MIP-1 β -makrofág gyulladássos protein-1 béta

MIP-2-makrofág gyulladássos protein-2

MK-801-dizocilpin
MLA-metil-akonitin
mRNS-hírvivő (messenger) RNS
MWM teszt-Morris-féle vízi labirintus teszt
NCD-neurokognitív zavar
NFT-neurofibrilláris kötegek
NGF-idegi eredetű növekedési faktor
NMDAR-N-metil-D-aszpartát receptor
NOR teszt-új tárgy felismerési teszt
PAM-pozitív alloszterikus modulátor
PET-pozitronemissziós tomográfia
qRT-PCR- valós idejű reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
ROS-reaktív oxigén származékok
SC-szubkután
TNF- α -tumor nekrozis faktor alfa
 α 7-nAChR-alfa7 nikotinos acetilkolin receptor

1. BEVEZETÉS

Az öregedéssel összefüggésbe hozható neurokognitív zavarok (NCD-ok) nagyban hozzájárulnak az egyén önálló életvitelének, mindennapi cselekedeteinek és életminőségének korlátozásához, jelentős kihívás elé állítva az egészségügyet, a szociális ellátó rendszereket és a beteg hozzátartozóit. Becslések szerint jelenleg 700 millióra tehető a 65 évesek és 65 évnél idősebbek száma, mely 2050-re a duplájára fog nőni és elérheti az 1,5 milliárdot (UN-WPP 2019), növelve a NCD-ok kialakulásának valószínűségét (Hou et al. 2019). Azok a mechanizmusok, melyek neurodegenerációra hajlamosítják az idős agyat még nem teljesen tisztázottak, és nehéz meghatározni azt a határvonalat, mely elválasztja a normál és a patológiás öregedést. Fontos lenne tehát megérteni az öregedés alapvető mechanizmusait és azok szerepét a NCD-ok kialakulásában és progressziójában. Továbbá, a megfelelő terápiák hiányában szükség lenne új, hatékonyabb terápiás stratégiák kidolgozására.

1.1. Kognitív változások az egészséges és a patológiás öregedés során

Az öregedés során a kogníció kritikus fontosságú az egyén függetlensége szempontjából, beleértve a pénzügyek kezelését, a gyógyszerek helyes beszedését, vagy a biztonságos vezetést. Ezen kívül az ép kogníció elengedhetetlen a hatékony kommunikációhoz, beleértve az érzékszervi információk feldolgozását és integrálását, valamint a megfelelő reagálást másokra. Ebből kifolyólag kiemelt jelentőségű annak feltárása, hogy a normál öregedési folyamat velejárájaként milyen típusú változások várhatók a kogníciót tekintve, és milyen típusú változások utalhatnak a progresszív neurodegeneráció kialakulására és meglétére (Murman 2015).

Számos bizonyíték áll rendelkezésre a normál öregedés során fellépő kognitív változásokról. Általánosságban elmondható, hogy egyes kognitív funkciók viszonylag stabilak az életkor előrehaladtával (pl: verbális képességek, szókinccs, általános ismeretek), míg más kognitív funkciók esetén (pl: feldolgozási sebesség, figyelem, munkamemória, epizodikus memória, végrehajtó funkciók, vizuális térbeli képességek) fokozatos hanyatlás figyelhető meg. Az előbbieket az úgynevezett kristályosodott kognitív képességek, melyek az élettapasztalatokon alapuló információk összegyűjtésén alapszanak. Ebből kifolyólag a kristályosodott képességeket vizsgáló tesztekben az idősebb alanyok hajlamosabbak jobb teljesítményt nyújtani, mint a fiatalok. Az utóbbiak pedig az úgynevezett folyékony kognitív képességek

melyek megkövetelik, hogy az alany figyeljen a környezetére, és gyorsan dolgozzon fel új információkat a problémák megoldásához (Harada et al. 2013; Murman 2015; Gonzales et al. 2022).

Az idősök körében az egyik leggyakoribb kognitív változás a tanulási és memória képességek hanyatlása, ami összefügghet a csökkent feldolgozási sebességgel, az irreleváns információk figyelmen kívül hagyásának csökkent képességével, vagy a tanulási és memória fejlesztő stratégiák csökkent alkalmazásával (Harada et al. 2013). A memória két fő típusa a deklaratív (explicit) és a nem deklaratív (implicit) memória. A deklaratív memória tények, múltbéli események tudatos felidézését jelenti, mely magába foglalja a szemantikus és az epizodikus emlékezetet. A szemantikus emlékezet a szavak jelentésének ismeretét, és a gyakorlati tudást jelenti, míg az epizodikus memória egy adott időben és térben személyesen átélt események lefolyásának az emlékezte. A másik fő memóriatípus az ún. nem deklaratív memória, mely motoros és kognitív készségeket is magába foglal (pl: biciklizés, cipőfűző megkötése). A normál öregedés során, mind az epizodikus, mind a szemantikus emlékezet hanyatlásáról beszámoltak, azonban a nem deklaratív memória komponensek nem mutatnak jelentős öregedéssel összefüggő változást (Harada et al. 2013; Murman 2015).

A deklaratív memória kialakulása több szakaszra különíthető el, melyek különböző mértékben vannak kitéve az öregedés hatásainak. Az akvizíció az új információk kódolásának, tartós megőrzésre való előkészítésének képessége, mely az életkor előrehaladtával nagyfokú csökkenést mutat. Azonban a már korábban sikeresen kódolt információk megőrzése megmarad az egészséges idős felnőtteknél. Ezzel ellentétben hanyatlás mutatkozik a memória visszahívásban is, ami az újonnan tanult információk elérését jelenti a tartós tárból (Harada et al. 2013).

A demenciában szenvedő betegek számát az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 55 millióra becsülte világszerte. A betegek száma 2030-ra elérheti a 78 milliót, 2050-re pedig a 139 milliót. Ebből kifolyólag a neurokognitív zavarral küzdő betegek azonosítását és kezelését kiemelt közegészségügyi prioritásnak kell tekintenünk (Shin 2022).

A Mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyvének 4. kiadása (DSM-IV) alapján a demencia a kognitív funkciók fokozatosan kialakuló hanyatlása, amely zavart okoz a mindennapi életben és a munkában. Továbbá a memóriaproblémákon túl az alábbi tünetek közül legalább egynek jelen kell lennie: afázia (nyelvi zavar), apraxia (a motoros tevékenységek

zavara ép mozgási funkciók mellett), agnózia (a tárgyak felismerésének vagy azonosításának zavara ép szenzoros funkció ellenére), zavar az exekutív funkciókban (végrehajtó működések zavara) (McDonald 2017). A demencia lehetséges stigmatizáló hatására való tekintettel a nemrég felülvizsgált és jelenleg is használatos DSM-V kézikönyvben a demencia kifejezést felváltotta a neurokognitív zavar (NCD), amely minden olyan betegségtípusra kiterjed, melynek fő jellegzetessége a kognitív diszfunkció. Fontos továbbá, hogy a kognitív működés romlást mutat egy megelőző magasabb szintű állapothoz képest (Sachdev et al. 2014; Majer et al. 2019). A NCD-okon belül enyhe és súlyos („demencia”) kategóriák kerültek bevezetésre az új etiológia szerint (Majer et al. 2019). Az enyhe NCD-ban szenvedő betegek esetén a kognitív hanyatlás túlmutat a normál öregedés során megfigyelhető kognitív hanyatláson. Bár a kognitív diszfunkciók nem korlátozzák az önálló életképességet, a beteg szuboptimális szinten végzi mindennapi feladatait, mely nagyobb erőfeszítést, kompenzációs stratégiák alkalmazását veheti igénybe az önállóság megőrzése érdekében. (Sachdev et al. 2014). Az enyhe NCD növeli a demencia, különösen az Alzheimer-kór (AD) kialakulásának valószínűségét. Fontos azonban megjegyezni, hogy a legtöbb enyhe NCD-ban szenvedő betegnél 10 év után sem fejlődik ki feltétlenül a demencia (Mitchell and Shiri-Feshki 2009). A súlyos NCD-ok a kognitív képességek jelentős csökkenésével jellemezhetőek, amely az enyhe zavarokkal szemben korlátozza az egyén mindennapi cselekedeteivel kapcsolatos önállóságot, például a számlák befizetése, az öltözködés, vagy az étkezések esetén (Sachdev et al. 2014; McDonald 2017). A súlyos NCD-ok csoportjába tartozik az AD, a Lewy-testes demencia, a frontotemporális demenciák (FTD), a vaszkuláris demencia, a traumás agysérülés, a Parkinson-kór, a Huntington-kór, demencia a HIV megbetegedésben, valamint a prion betegség. Ezen demenciák mindegyikében lehetnek átfedések. A vaszkuláris megbetegedések például gyakoriak a 75 év felettiéknél, ezért gyakran előfordulnak más NCD-ban szenvedő idősebb betegeknél is. Azonban nehéz megállapítani, hogy a cerebrovaszkuláris betegségek mennyiben járulnak hozzá az egyéb, nem vaszkuláris eredetű demenciában szenvedő idős betegek kognitív tüneteinekhez (McDonald 2017).

1.1.1. Az Alzheimer-kór kognitív tünetei és patológiás háttere

A súlyos NCD-ok leggyakoribb típusa az AD, mely krónikus neurodegenerációval, a kognitív képességek progresszív elvesztésével, valamint viselkedésbeli változásokkal jellemezhető. Bár a nem-kognitív tünetek (afázia, végrehajtó funkciók zavara, apátia,

személyiség megváltozása) a betegség viszonylag korai stádiumában megnyilvánulhatnak, általában a memória romlását tekintik a fő tünetnek. A betegség korai szakaszában a közelmúlt epizodikus emlékei a leginkább érintettek, míg a távoli múlt emlékei általában megkíméltek. A betegség előrehaladtával azonban az epizodikus memória minden aspektusa érintetté válik. Az epizodikus memória hanyatlással ellentétben a munkamemória és a szemantikus memória diszfunkciója általában a később jelentkező tünetekhez sorolható (Apostolova 2016).

A nyelvi zavarok, különösen a szókeresési nehézségek gyakori tünetei az AD-nak. A betegség korai szakaszában a vizuális térbeli készségek finom hanyatlása is előfordul. A végrehajtott diszfunkciók viszont még korábban, a pre-demencia stádiumában kezdődnek és a többi kognitív doménhez hasonlóan folyamatosan súlyosbodnak a betegség lefolyása során (Apostolova 2016).

Az AD klinikai jellemzőinek és tüneteinek felismerése továbbra is elengedhetetlen a betegek diagnosztizálásához és a megfelelő kezelés kiválasztásához. A kognitív hanyatlás mértékének a meghatározására jellemzően a Mini Mentál Státusz tesztet alkalmazzák, melynél a beteg által elért pontszám jól korrelál az AD súlyosságával (Folstein et al. 1975; Swainson et al. 2001). Ezen kívül az AD mögött meghúzódó neuropatológiai elváltozásokat kimutató nem-invazív biomarker-tesztek, mint például az amiloid pozitronemissziós tomográfia (PET) is egyre inkább elérhető a betegellátás számára (Apostolova 2016) a korai poszt-mortem diagnosztikai módszerek mellett.

Az AD elsődleges patológiás markerei a szinaptikus és neuronális veszteségből eredő agyi atrófia (jellemzően a medialis temporalis lebenyben és a hippocampusban), az extracelluláris β -amiloid ($A\beta$) lerakódások neuritikus plakkok formájában, valamint a neuronokban felszaporodó hiperfoszforilált tau fehérjéből álló neurofibrilláris kötegek (NFT). A neuritikus plakkok az amiloid prekursor proteinek (APP) rendellenes hasítása révén képződnek. Az amiloid hipotézis szerint az APP-ből két enzim (a β -szekretáz és a γ -szekretáz) révén, különböző hosszúságú $A\beta$ peptidek generálódnak, köztük az $A\beta_{42}$, melyek hajlamosabbak az aggregációra és a plakk képződésre és erősen neurotoxikus hatásúak. A felhalmozódott $A\beta_{42}$ oligomerek többek között mitokondriális károsodást indukálva növelik a reaktív oxigén származékok (ROS) felhalmozódását, fokozzák a mikroglia gyulladással kapcsolatos citokin termelődését, továbbá különféle receptorokhoz (NMDAR és $\alpha 7$ -nAChR) hozzákötődve szinaptikus diszfunkciót is előidézhettek (Fan et al. 2020). Ezek mindegyikéről kimutatták, hogy közvetve, vagy közvetlenül hozzájárulnak pl. a hosszútávú potenciáció (LTP) gátlásához feltehetően ezzel is elősegítve a kognitív károsodás kialakulását (Bellinger et al. 1993; Yamin

2009; Beckhauser et al. 2016). Mivel számos bizonyíték támogatja azt az elképzelést, hogy a neuritikus plakkoknak elsődleges szerepük van az AD kialakulásában, a tanulmányok egy jelentős része a A β képződésére és metabolizmusára összpontosít (Haass and Selkoe 2022). Azonban egyes kutatások ellentmondanak az AD amiloid hipotézisének, arra hivatkozva, hogy az AD-ra jellemző idegsejt károsodás és pusztulás az A β plakkok lerakódásától függetlenül is megjelenhet (Morris et al. 2014), továbbá az A β plakkokat célzó terápiák sem bizonyulnak eredményesnek mindeddig. Ebből kifolyólag alternatív mechanizmusokat helyeznek fókuszba, mint az AD elsődleges kiváltóit. Az aktivált mikroglia potenciálisan részt vesz az alternatív mechanizmusokban és az amiloid kaskád szerves részét képezik (Haass and Selkoe 2022). Jelenlétük bár valószínűleg reaktív jelenség, alapja annak a hipotézisnek, hogy az AD az agyban korábban fellépő fokozott neuroinflammáció következménye (Castellani et al. 2010). Mára a kutatások jelentős része kimutatta, hogy az aktivált mikroglia által termelt gyulladási citokinek, mint például az interleukin-1 béta (IL-1 β), vagy a tumor nekrosis faktor (TNF- α), felelőssé tehető a neuronok elvesztéséért, ezen kívül elősegítik és súlyosbíthatják mind az A β , mind az NFT patológiát (Castellani et al. 2010; Kinney et al. 2018). A mikrogliahoz hasonlóan ma már jelentős adatok állnak rendelkezésre az asztrocita gyulladási mediátor szerepének alátámasztására is (Castellani et al. 2010).

1.2. A neuroinflammáció szerepe az öregedéssel kapcsolatos kognitív hanyatlásban

Ahogy a fentiekben is leírtuk az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás háttérében álló mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak, de számos tanulmány a megnövekedett neuroinflammáció központi szerepét feltételezi a neurodegeneráció és a kognitív diszfunkciók előidézésében (Porcher et al. 2021).

A megnövekedett gyulladási állapotot elsősorban a mikroglia sejtek öregedéssel kapcsolatos változásainak tulajdonítják. A mikroglia a központi idegrendszer rezidens immunsejtjei, melyek szerepet játszanak az idegszövet homeosztázisának fenntartásában, fagocitálják a patogéneket, sejtörmelégeket, továbbá hozzájárulnak a szinapszisok védelméhez, átalakításához (Heneka et al. 2015). Az öregedés hatására azonban olyan morfológiai és funkcionális átalakulások mennek keresztül, melyek egy túlzott, kontrollálatlan immunválasz kialakulását eredményezheti. Ebben az esetben fokozódik a pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-1 β , IL-6 és TNF- α) és kemokin ((makrofág gyulladási protein-1 alfa (MIP-1 α),

makrofág gyulladásoos protein-1 béta (MIP-1 β), makrofág gyulladásoos protein-2 (MIP-2), monocita kemoattraktáns protein 1 (MCP-1)) termelésük, míg számos anti-inflammatorikus citokin termelésben, beleértve az interleukin-10-et (IL-10), vagy interleukin-4-et (IL-4) csökkenés mutatkozik (Norden and Godbout 2014). A közelmúltban felmerült, hogy a hippocampus-függő tanulás és memória öregedéssel összefüggő hanyatlása részben a megemelkedett pro-inflammatorikus citokin expressziónak tudható be. Kimutatták, hogy az IL-1 β megemelkedett szintje rontotta az idős patkányok teljesítményét Morris-féle vízi labirintus (MWM) paradigmában, melyet neuronhálózati szinten az LTP csökkenése kísért (Bellinger et al. 1993; Oitzl et al. 1993; Ross et al. 2003; Lynch 2015). Ezt a megfigyelést későbbi, rágsálókon végzett kísérletek is megerősítették és kiterjesztették hasonló, specifikus károsodásokat mutatva a hippocampus-függő kontextuális feladatokban, az IL-1 β intraperitoneális, vagy intrahippocampális injektálását követően (Gibertini et al. 1995; Patterson 2015). Marciniak és munkatársai (2015) a MIP-1 α kemokin fokozott expressziójáról számoltak be idős rágsálók hippocampusában, mely a szinaptikus transzmisszióban okozott deficitet, modulálva a térbeli és hosszú távú memória folyamatokat.

A megnövekedett pro-inflammatorikus citokin és kemokin felszabadulás mellett az öregedéssel kapcsolatos neurotróf faktorok csökkenése ((pl. agyi eredetű növekedési faktor (BDNF), idegi eredetű növekedési faktor (NGF) és ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF)) is negatívan befolyásolja a kognitív funkciókat. A neurotróf faktoroknak fontos szerepük van a szinaptikus plaszticitásban, azáltal, hogy támogatják az idegsejtek túlélését és fejlődését, valamint elősegítik az idegsejtek közötti kapcsolat kialakulását (Mercado et al. 2018). Idős patkányok hippocampusában BDNF expresszió csökkenésről számoltak be mind mRNS mind fehérje szinten, továbbá a BDNF szint csökkenést MWM-ben mutatott kognitív teljesítményromlással is összefüggésbe hozták (Heldt et al. 2007).

Összeségében az agy megnövekedett gyulladásoos állapota és a neurotróf faktorok csökkenése egyaránt hozzájárulnak az LTP csökkenéséhez, és ezáltal a kognitív funkciók károsodásához.

1.3. Kolinerg neurotranszmisszió zavarai a normál és a patológiás öregedés során

Számos teória közül a kolinerg hipotézis volt az egyik legrégebbi, mellyel az AD patogenezisét magyarázták (Bartus et al. 1982). Már az 1980-as években leírták, hogy a

kolinerg aktivitás funkcionális zavarai egészséges idős embereknél és AD-ban szenvedő betegeknel egyaránt előfordulnak, és ezek a zavarok szerepet játszanak a memória károsodásában és egyéb kognitív tünetek kialakulásában (Dumas and Paul 2011). A kolinerg hipotézis eredetileg azon megfigyelésen alapszik, hogy fiatal felnőttek antikolinerg vegyületekkel történő kezelése hasonló memória károsodást idézett elő, mint amit idős embereknél és AD-ban szenvedő betegeknel egyaránt tapasztaltak. Ezt későbbi pre-klinikai tanulmányok is alátámasztották, melyben hasonló típusú farmakológiai kezeléseket végeztek el fiatal állatokon az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás előidézésére. Decker és munkatársai (1990) kimutatták, hogy az antimuszkarin hatású szerek (pl. szkopolamin) rontották a fiatal rágcsálók memória teljesítményét passzív elkerülés feladatban és a térbeli tanulást vizsgáló vízi labirintus paradigmában. Ezeket az eredményeket megerősítették szelektív muszkarin M1 receptor antagonistákkal (pl. pirenzepin) és nikotinos acetilkolin receptor antagonistákkal (pl. mekamilamin) végzett kutatások, melyekben mindkét típusú vegyület memória rontó hatásáról beszámoltak. Ezzel ellentétben idős, demenciában szenvedőknél kognitív javulás volt elérhető pro-kolinerg szerek alkalmazásával (Bartus et al. 1982; Terry and Buccafusco 2003).

Az AD betegekben megfigyelt bazális előagyi kolinerg neuronok patológiás változásai ugyancsak felhívták a figyelmet a kolinerg rendszer memória zavarokban betöltött lehetséges szerepére. A bazális előagyi kolinerg neuronok a mediális szeptumban, a Broca-féle diagonális kötegben és a Meynert magban lokalizálódnak. A mediális szeptum és a Broca-féle diagonális köteg kolinerg neuronjai a hippocampusba projiciálnak, a Meynert mag pedig az agykéreg és az amygdalát látja el bemenetekkel. A kolinerg magok jelentősen befolyásolják a limbikus és a kérgi aktivitást, ezáltal részt vesznek a tanulás és a memória kialakításában (Drever et al. 2011; Schliebs and Arendt 2011). A normális öregedés során a kolinerg neuronok mérsékelt degeneratív változásairól számoltak be, melyet a trofikus támogatás gyengülésével is összefüggésbe hoztak. Különösen az NGF-nek van kiemelt szerepe a bazális előagyi kolinerg neuronok védelmében és fenntartásában (Schliebs and Arendt 2011). Egyes tanulmányokban arról számoltak be, hogy idős rágcsálókban és majmokban egyaránt megfigyelt kolinerg atrófia az NGF intracerebroventricularis beadásával (Koliatsos et al. 1991; Tuszynski 2000), illetve ex vivo NGF gén bevitellel enyhíthető volt (Emerich et al. 1994; Markowska et al. 1994; Chen et al. 1995; Tuszynski 2000).

A korábbi nézetet, miszerint az öregedés során bekövetkező atrófia a kolinerg sejtek jelentős veszteségével hozható összefüggésbe, megkérdőjelezték. Neuronális sejt veszteséget túlnyomórészt a patológiás öregedés során (pl. AD) figyeltek meg, míg a normál öregedésre

jellemző atrofíát leginkább a neuronok dentritikus, axonális és szinaptikus degenerációjával hozták összefüggésbe. Bizonyos kutatások szerint az AD-ban az A β fehérjék akkumulációja válthatja ki, vagy járulhat hozzá a kolinerg sejtek pusztulásához. Az A β kolinerg diszfunkciót válthat ki az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptorokon ($\alpha 7$ -nAChR) keresztül, mivel befolyásolja az NGF jelátvitelt, mediálja a tau foszforilációt, illetve kölcsönhatásba léphet az acetilkolint a szinapszisokban lebontó kolin-észteráz enzimmel (ChE) (Schliebs and Arendt 2011). Azonban a pontos mechanizmus, mely során az A β bazális előagyi kolinerg idegsejtvesztést és kognitív károsodást indukál, még nem teljesen tisztázott.

Bár jelentős idegsejtpusztulás nem áll fenn egészséges idős embereknél, a kolin-acetiltransferáz (ChAT) és az ChE-aktivitásokban bekövetkező csökkenés, illetve a csökkent acetilkolin (ACh) felszabadulás mégis előidézhethet kolinerg hipofunkciót (Perry et al. 1992). Továbbá az előagyi mAChR-ok és nAChR-ok sűrűségében is megfigyeltek öregedéssel kapcsolatos változásokat, melyek ugyancsak hozzájárulhatnak a memória deficit kialakulásához (Schliebs and Arendt 2011).

1.4. A neurokognitív zavarok gyógyszeres kezelése

Jelenleg három törzskönyvezett kolinészteráz inhibitor (ChEI), a donepezil, a galantamin és a rivasztigmin, és egy NMDAR antagonistá vegyület, a memantin áll rendelkezésünkre a NCD-k gyógyszeres kezelésére (Yiannopoulou and Papageorgiou 2020). Azonban ezek a gyógyszerek csak mérsékelt előnyöket kínálnak a kognitív tünetek enyhítésében, továbbá az NCD-k progresszióját sem képesek megállítani (Deardorff et al. 2015; Deardorff and Grossberg 2016). Az egyszerűség kedvéért a továbbiakban az AD-ra helyezzük a hangsúlyt az NCD terápiák részletesebb tárgyalásakor.

1.4.1. Az Alzheimer-kór terápiája

A kolinerg hipotézis megalkotása óta számos kutatást végeztek a pro-kolinerg szerekkel kapcsolatban. Bár az általános klinikai hatásai korlátozottak, a kolinerg működések modulálására használt ChEI-okat továbbra is széles körben alkalmazzák az AD kezelésére. A ChEI-terápia optimális időtartalmát illetően kevés bizonyíték áll rendelkezésünkre, mivel a klinikai vizsgálatok többsége 6 hónapos megfigyelésre korlátozódik (Marucci et al. 2021), mindazonáltal jól tolerálhatóak és néhány éven keresztül fenntartják a kognitív funkciókra gyakorolt előnyös hatásukat (Joe and Ringman 2019). Az ChEI terápiákat az enyhe és

közepesen súlyos AD-ban szenvedő betegek kezelésére alkalmazzák. A gyógyszerek az ChE gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat, ezáltal megakadályozzák az ACh lebomlását és meghosszabítják a szinapszisban kifejtett hatását (Vaz and Silvestre 2020). Patkányokon végzett mikrodialízis vizsgálatokkal kimutatták az ACh extracelluláris szintjének növekedését akut és krónikus ChEI beadást követően, mely a fokozott kolinerg funkció közvetlen bizonyítékeként szolgált (Pepeu and Giovannini 2010). A ChE gátlást patkány és humán neocortexben hasonlították össze *in vitro* módszerekkel, ahol mindkét fajban hasonló IC50 értéket mértek a donepezillel, rivasztigminnel és galantaminnal való kezelést követően egyaránt (Jackisch et al. 2009). Továbbá a ChEI-kezelt AD betegekből származó cerebrospinális folyadékban (CSF) ChE gátlásról számoltak be (Nordberg 2001). Az állatkísérletes vizsgálatokkal való analógia arra enged következtetni, hogy a ChE gátlás emberekben is összefüggésbe hozható az ACh extracelluláris szintjének növekedésével (Pepeu and Giovannini 2010). A ChE aktivitás nemcsak a kolinerg transzmisszió modulálásában vesz részt az ACh hidrolízisével, hanem az A β plakkok felhalmozódását is serkenti. Ez alapján a ChEI-nak szerepe van az A β lerakódás csökkentésében is (Standridge 2004). Azonban hatásuk csak ideiglenes, a kognitív képességekben bekövetkező javulás a kezelés előrehaladtával mérséklődik. A ChEI hátrányai között szerepel még, hogy nagyobb dózisok alkalmazása során, olyan perifériás mellékhatások jelentkezhetnek egyes betegeknél, mint a szédülés, izomgörcs, hányás, hasmenés, vagy étvágytalanság (Mimica and Presečki 2009).

A memantin egy nem kompetitív NMDAR antagonist, ami feltehetően szelektíven blokkolja az abnormálisan megnövekedett glutamáterg transzmisszióhoz társítható excitotoxikus hatásokat, miközben biztosítja a normál sejtműködésekhez szükséges fiziológiai jelátvitelt. Klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a memantin egy mérsékelt hatékonyságú, jól tolerált kezelési lehetőség a súlyos, vagy közepesen súlyos AD-ban szenvedő betegek számára (Lancôt et al. 2009). Bebizonyosodott, hogy a memantin késlelteti a kognitív hanyatlást a Ca²⁺ ionoknak az aktivált NMDA csatornákon keresztül történő túlzott beáramlásának gátlásával, ezzel neuroprotektív hatást biztosítva (Dong et al. 2012). A memantin feltételezett hatásmechanizmusát a következőkben tárgyaljuk. Nyugalmi helyzetben az NMDA csatornák feszültség függő Mg²⁺ blokk alatt állnak. Azonban a posztszinaptikus membrán erős depolarizációját, valamint a glutamát NMDAR-okra kifejtett tranziens hatását követően a Mg²⁺ blokk megszűnik, így az NMDAR ioncsatornákon keresztül lehetővé válik a Ca²⁺ ionok beáramlása a sejtbe. Patológias körülmények között viszont az NMDAR-ok folyamatos alacsony szintű stimulációja és a posztszinaptikus membrán mérsékelt depolarizációja

felszabadítja az NMDAR-okat a Mg^{2+} blokk alól, növelve ezzel a kóros, tónusos Ca^{2+} beáramlást a posztszinaptikus neuronba. A memantin mérsékelt affinitással képes bekötődni az NMDAR-okhoz, és feszültségtől függően blokkolja azokat, illetve gyors csatorna blokkoló és feloldó kinetikával rendelkezik. Ez az egyedülálló kötési profil teszi alkalmassá a Mg^{2+} hatékony helyettesítésére (Parsons et al. 2013). Az NMDAR-ok enyhe, hosszan tartó stimulációja során, a memantin továbbra is gátolja az NMDAR ioncsatornákat, szemben a gyengébb kötési affinitással rendelkező Mg^{2+} ionokkal, azonban, ha a glutamát magas koncentrációban, tranziensen van jelen, azaz fiziológiai jel érkezik, a memantin disszociál a receptorokról, biztosítva ezzel a normál neurotranszmissziót. Az olyan antagonisták, melyek túl nagy affinitással kötődnek, illetve kis feszültség függéssel rendelkeznek, mint például az MK-801, vagy feniciklidin nem képesek időben elhagyni a csatornát, így mind a fiziológiai, mind a kóros jelátvitelt gátolják (Rammes et al. 2008). Wenk és munkatársai (1995) a memantin és az MK-801 mellékhatásait vizsgálták, valamint neuroprotektív hatékonyságukat is összehasonlították. Eredményeik azt mutatják, hogy patkányokban a nucleus basalis agyterületre injektált NMDA-val előidézett idegsejtvesztést, mindkét hatóanyag szignifikánsan csökkentette, bár a memantinál erőteljesebb neuroprotektív hatást tapasztaltak, és alacsony dózisban alkalmazva nem járt mellékhatásokkal.

A tanulmányok nagy része az NMDAR-ok antagonizmusával kapcsolja össze a memantin terápiás hatékonyságát. Azonban egyre több pre-klinikai kutatás demonstrálja, hogy a memantin az $\alpha 7$ -nAChR-okra is kifejti blokkoló hatását (Maskell et al. 2003). Bár Aracava és munkatársai (2005) negatív jelenséggént írták le a memantin $\alpha 7$ -nAChR-okra kifejtett antagonizmusát, egyes tanulmányok ennek ellenkezőjéről számoltak be (Pohanka 2012). Ferchmin és munkatársai (2003) által elvégzett kísérletben mind az $\alpha 7$ -nAChR agonisták, mind az antagonisták neuroprotektívnek bizonyultak az NMDA-val kiváltott excitotoxicitással szemben rágcsáló hippocampális szövetekben. Továbbá számos tanulmány kimutatta, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok olyan folyamatokat is mediálnak, melyeknek szerepük van az AD patofiziológiában. Például a $A\beta$ peptidek rontják a hippocampális jelátvitelt az $\alpha 7$ -nAChR-okon keresztül, mely fokozott Ca^{2+} beáramlást és a jelátviteli útvonalak kóros aktivációját eredményezi (Dineley et al. 2001, 2002; Banerjee et al. 2005). Ezen kívül az $\alpha 7$ -nAChR-ok mediálják a $A\beta$ által indukált hiperfoszforilációt, mely az $\alpha 7$ -nAChR antagonizmusával enyhíthető volt (Wang et al. 2003; Banerjee et al. 2005). Egy új, ex vivo patkány agy szeleteken végzett elektrofiziológiai tanulmány további bizonyítékokat szolgáltat azzal kapcsolatban, hogy a memantin által kiváltott $\alpha 7$ -nAChR aktivitás csökkentése hatékony lehet a kognitív zavarok kezelésében. Kimutatták, hogy az alacsony dózisban alkalmazott memantin neuroprotektív

hatása az $\alpha 7$ -nAChR-ok gátlásán keresztül valósult meg, míg magasabb dózisban alkalmazva, az NMDAR-ok antagonizmusával excitotoxicitást idézett elő (Ferrer-Acosta et al. 2022). Ezek alapján feltételezhető, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok gátlása a memantin által, szintén hozzájárulhat annak klinikai előnyeire (Banerjee et al. 2005).

1.5. Az $\alpha 7$ -nAChR-ok, mint potenciális gyógyszercélpontok a kognitív zavarokban

Az $\alpha 7$ -nAChR-ok tanulási és memória folyamatokban betöltött szerepe jelentős, így az elmúlt években a farmakológiai kutatások középpontjába kerültek, mint potenciális gyógyszercélpontok (targetek). Struktúrájukat tekintve az $\alpha 7$ -nAChR-ok öt $\alpha 7$ alegységből álló homopentamer, ligand-vezérelt receptorok, melyek nagy Ca^{2+} permeabilitással és gyors deszenzitizációs kinetikával jellemezhetők (Pohanka 2012; Lombardo and Maskos 2015). Egyes szelektív $\alpha 7$ -nAChR inhibitorok, mint például az metillicakonitin (MLA), vagy az α -bungarotoxin nagy affinitással kötődnek az $\alpha 7$ -nAChR-hoz, így alkalmasak ezen receptorok detektálására az agyban. Bár az $\alpha 7$ -nAChR-ok széles körben expresszálódnak a központi idegrendszerben, a radioaktívan jelölt α -bungarotoxin a kognitív funkciókért felelős agy területeken, beleértve a hippocampust (CA1, CA2 és gyrus dentatus) és a neocortexet (I. és VI. réteg), mutatott különösen magas $\alpha 7$ -nAChR expressziót. Ezen kívül a kéreg alatti marginális zónákban, valamint az agytörzsi magokban (ventrális tegmentum, substantia nigra) is megfigyelhető volt jelenlétük (Wallace and Porter 2011; Ma and Qian 2019). Az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziós mintázatát mRNS in situ hibridizációs módszerrel is vizsgálták, megerősítve a korábbi autoradiográfiás vizsgálatok eredményeit (Wallace and Porter 2011). A neuronális $\alpha 7$ -nAChR-ok mind pre-szinaptikusan mind poszt-szinaptikusan expresszálódnak, továbbá jelen vannak a peri-szinaptikus lókusokban is (Cheng and Yakel 2015). Funkciójukat tekintve az $\alpha 7$ -nAChR-ok Ca^{2+} -függő mechanizmusokon keresztül mediálják a szinaptikus transzmissziót, számos neurotranszmitter felszabadulását és a szinaptikus plaszticitást. A preszinaptikusan expresszálódó $\alpha 7$ -nAChR-ok a preszinaptikus terminálokból történő glutamát felszabadulás serkentésével növelik az LTP indukcióját (McKay et al. 2007; Cheng and Yakel 2015). Ezen kívül egyes kutatások bizonyították, hogy aktivációjuk elősegíti a GABA, a dopamin és a noradrenalin felszabadulását is (Turner 2004). A poszt-szinaptikusan expresszálódó nAChR-ok az NMDAR-okkal együtt az intracelluláris Ca^{2+} szintet szabályozva a másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválásával vesznek részt a szinaptikus plaszticitásban (McKay et al. 2007;

Lombardo and Maskos 2015). Azonban a kolinerg neurotranszmisszió nagyrészt nem-szinaptikus módon történik, ami összhangban van az ACh-nal történő receptor aktiváció parakrin módjával (Jones and Wonnacott 2004; Lendvai and Vizi 2008; Stone 2021). Az $\alpha 7$ -nAChR-okat nemcsak a neuronok, hanem a mikroglia, és az asztociták is expresszálják, melyeknek az immunválaszok modulálásában van kiemelt szerepe, ami ugyancsak összefüggésbe hozható a memória folyamatokkal (Egea et al. 2015).

1.6. $\alpha 7$ -nAChR-okra ható agonisták és PAM vegyületek pro-kognitív hatásai

Mivel az AD farmakoterápiája a mai napig nem megoldott új, hatékonyabb terápiás stratégiák kifejlesztésére van szükség. A pre-klinikai vizsgálatokban számos $\alpha 7$ -nAChR agonistáról (pl.: SEN12333 GTS-21, S24795, RG3487) kimutatták, hogy visszafordítják a szkopolaminnal, illetve MK-801-gyel előidéztet memória deficitet patkányban, új tárgy felismerési tesztben (NOR), de ezen kívül léziós patkány modellekkel, illetve öreg állatokkal végzett hippocampus függő, térbeli munkamemóriát vizsgáló navigációs tesztekben is előnyösnek bizonyultak (Wallace and Porter 2011). A jelen vizsgálatok szempontjából fontos, nagy szelektivitású PHA-543613 $\alpha 7$ -nAChR agonista korábban ugyancsak hatékonyan javította a patkányok kognitív teljesítményét T-labirintus spontán alternációs tesztben (Bali et al. 2015), MWM-ben (Sadigh-Eteghad et al. 2015), valamint NOR paradigmában is (Wishka et al. 2006). Az $\alpha 7$ -nAChR-ok az agonista bekötődését követően azonban, gyors deszenzitizációval jellemezhetők, ami nagy kihívást jelent a gyógyszerfejlesztések számára, beleértve a hatékony dózis kiválasztását. A pozitív alloszterikus modulátorok (PAM-ok) egy alternatív megközelítést kínálnak az $\alpha 7$ -nAChR-ok közvetlen modulálására. Előnyei közé tartozik, hogy az ACh, vagy a kolin jelenlétében fejtik ki hatásukat, fenntartva ezzel az endogén aktiváció jellemzőit, továbbá kevésbé hajlamosak az $\alpha 7$ -nAChR-ok hosszan tartó inaktivációját kiváltani a stimulációt követően (Wallace and Porter 2011; Yang et al. 2017). Nikiforuk és munkatársai (2015) kísérletükben három különböző PAM vegyület, az I-es típusú CCMI, a II-es típusú PNU-120596, és a ChEI-ként is működő galantamin kognitív serkentő hatását vizsgálták NOR paradigmában. Sikerült kimutatniuk, hogy ezek mindegyike enyhítette a patkányok NOR tesztben mutatott memória romlását. Azonban a specifikus $\alpha 7$ -nAChR antagonistá MLA (3 mg/kg) kezelés blokkolta a CCMI, a PNU-120596 és a galantamin hatását is, ami arra utal, hogy ezeknek a PAM vegyületeknek a pro-kognitív hatásai az $\alpha 7$ -nAChR-okhoz köthetők. Eredményeik megerősítik és kiterjesztik azt a megfigyelést, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok pozitív

alloszterikus modulációja javítja a memóriát és alátámasztja a PAM-ok hasznosságát a NCD-ok kezelésében.

Ahogy fentebb leírtuk a neuroimmun rendszert kolinerg hatások is befolyásolják (Maurer and Williams 2017). Az ezzel kapcsolatos tanulmányok főleg az $\alpha 7$ -nAChR-okra összpontosítanak, ugyanis stimulációjuk olyan jelátviteli-útvonalakat aktivál, melyek gyulladáscsökkentő, neuroprotektív hatásúak. Az $\alpha 7$ -nAChR-okat nemcsak a neuronok, hanem a mikroglia és az asztrociták is expresszálják, tehát bizonyos kolinerg hatások ezeken a nem neuronális sejteken keresztül következnek be (Maurer and Williams 2017). Számos bizonyíték áll rendelkezésünkre arról, hogy a kolinerg neurotranszmisszió serkentése javítja a memóriát, viszont a legújabb tanulmányokban azt is demonstrálják, hogy a $\alpha 7$ -nAChR-okon keresztül megvalósuló kolinerg anti-inflammatorikus útvonal is összekapcsolható a memória folyamatokkal (Egea et al. 2015; Maurer and Williams 2017). Ennek megfelelően azt feltételezik, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok-ra ható agonisták és PAM-ok képesek modulálni a glia sejtek aktivációját, növelve ezzel a terápiás hatékonyságukat. Foucault-Fruchard és munkatársai (2017) az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 gyulladáscsökkentő szerepét vizsgálták *in vivo* excitotoxikus patkány modellben. Sikerült kimutatniuk, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok PHA-543613-mal történő stimulációja csökkentette a mikroglia aktivációt és javította az idegsejtek túlélését a kinolinsav okozta excitotoxicitással szemben. Ezeket a megfigyeléseket az Alzarea és Rahman (2019) által végzett tanulmány is megerősítette, melyben egy $\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM vegyület hatását vizsgálták a lipopoliszacharid (LPS) által kiváltott kognitív deficitre és depresszió-szerű viselkedésre egerekben. A PNU120596 beadása előnyösnek bizonyult az LPS-sel kiváltott viselkedési diszfunkciók megelőzésében. Továbbá az LPS beadását követően a PNU120596 gátolta a mikroglia és asztrocita aktivációs markerek expresszióját, valamint a pro-inflammatorikus citokinek, például az IL1- β és a TNF- α fokozott felszabadulását a hippocampusban és a cortexben.

Összeségében a pre-klinikai tanulmányok eredményei azt mutatják, hogy az $\alpha 7$ -nAChR agonisták és PAM vegyületek előnyösnek bizonyulnak a kognitív zavarok kezelésében. Azonban a klasszikus nézet, miszerint az $\alpha 7$ -nAChR ligandok pro-kognitív hatása a vegyületek receptor-aktiváló tulajdonságával hozható összefüggésbe még további vizsgálatokat igényel, tekintettel arra a megfigyelésre, hogy az MLA, mint szelektív $\alpha 7$ -nAChR antagonistá szintén javította alacsony dózisokban a memória funkciókat különféle állatmodellekben és elősegítette az LTP indukcióját patkány hippocampus szeletekben (Hahn et al. 2011; Burke et al. 2014; Terry and Callahan 2020). Ezen kívül, ahogy fentebb leírtuk egyes kutatások a memantin

neuroprotektív hatását is az $\alpha 7$ -nAChR-okra kifejtett antagonizmusával hozzák összefüggésbe. A fent leírt törzskönyvezett és fejlesztés alatt álló kognitív serkentő vegyületeket az 1. táblázat foglalja össze.

Osztály	Vegyület	Használati javallat	Hatásmechanizmus
kolinészteráz inhibitorok	donepezil galantamin rivasztigmin	enyhe és közepesen súlyos AD-ban szenvedő betegek kezelésére	ChE gátlása->ACh lebomlás akadályozása kolinerg transzmisszió javítása
NMDA receptor antagonisták	memantin	közepesen súlyos és súlyos AD-ban szenvedő betegek kezelésére	Ca ²⁺ -ok túlzott beáramlásának gátlása az aktivált NMDA csatornákon keresztül->neuroprotekción, glutamáterg neurotranszmisszió jel-zaj arányának növelése
$\alpha 7$ -nAChR agonisták	PHA-543613 SEN12333 GTS-21	nincs, fejlesztés alatt álló vegyületek	kolinerg neurotranszmisszió javítása, gyors denszenzitizáló hatás, gyulladáscsökkentő, neuroprotektív hatás
$\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM vegyületek	PNU-120596 CCMI	nincs, fejlesztés alatt álló vegyületek	kolinerg neurotranszmisszió javítása, kevésbé okoznak receptor deszenzitizációt, gyulladáscsökkentő, neuroprotektív hatás

1.táblázat: Fontosabb törzskönyvezett és fejlesztés alatt álló pro-kognitív vegyületek

1.7. Kombinált terápiák

Egyre nagyobb érdeklődés övezi a kombinált terápiákat, a farmakológiai terápiák hatásosságának növelése érdekében. Mivel a kombinált terápiák a NCD-ok több patológias aspektusát is képesek megcélozni, szinergikus hatékonyság növekedést eredményezhetnek, továbbá alacsonyabb dózisok alkalmazását teszik lehetővé, elkerülve az esetleges mellékhatásokat (Parsons et al. 2013). Mivel a memantin és a ChEI-ok eltérő, de egymást kiegészítő hatásmechanizmussal rendelkeznek egy komplex kezelési lehetőséget kínálnak az AD betegek számára (Parsons et al. 2013). Bár a memantin-donepezil kombinációs kezelést az FDA jóváhagyta a közepesen súlyos és súlyos AD-ban szenvedő betegek kezelésére, a monoterápián túli további előnyeiről kevés bizonyíték áll rendelkezésünkre (Deardorff and Grossberg 2016; Knorz and Quante 2021). Például egy közelmúltban végzett 11 vizsgálatot elemző metaanalízis eredményei alapján a donepezil és a memantin kombinációja csak mérsékelt előnyöket kínált a kognitív tünetek enyhítésében a megfelelő monokezelésekhez képest (Chen et al. 2017). Továbbá egy másik 14 vizsgálatot magába foglaló metaanalízisben

is hasonló eredményekről számoltak be. Összesen 5019 közepesen súlyos vagy súlyos AD-ban szenvedő beteget vontak be a vizsgálatokba, akiket véletlenszerűen osztottak szét a különböző kezelési csoportok között. A kombinált kezelés előnyös hatásai csak a neuropszichiátriai tünetek és a viselkedési zavarok terén mutatkoztak meg, a kognitív funkciókat és a mindennapi tevékenységek elvégzését tekintve azonban nem figyeltek meg további előnyöket (Tsoi et al. 2016). Ezzel összhangban a pre-klinikai vizsgálatok is megerősítik, hogy a memantin-donepezil kombinációs kezelés mérsékelt hatékonyságú, vagy egyáltalán nem eredményez kognitív javulást a különféle viselkedési tesztekben. Wise and Lichtman (2007) által végzett kísérletben a szubeffektív dózisban alkalmazott memantin donepezillel való kombinálása nem javította a patkányok sugárlabirintusban nyújtott memória teljesítményét. Továbbá egy idős nyulakkal végzett kondicionált pislogás reflex (conditioned nictitating membrane reflex) feladatban a donepezil sem önmagában sem a memantinal való kombinálása során nem bizonyult hatékonynak a kontroll állatokhoz képest (Woodruff-Pak et al. 2007).

Ezzel szemben a pre-klinikai vizsgálatok eredményei ígéretesebbnek bizonyultak azokban az esetekben, amikor a memantint, olyan vegyületekkel kombinálták, melyek közvetlenül fejtik ki hatásukat az $\alpha 7$ -nAChR-okra (Koola et al. 2018). Busquet és munkatársai (2012) kísérletükben a galantamin és a memantin kombinált hatását vizsgálták szkopolaminnal előállított egér demencia modellben. Az állatok térbeli munkamemóriáját T-labirintusban, spontán alternációs paradigmában tesztelték. Legfőbb megállapításuk az volt, hogy az alacsony dózisban alkalmazott memantin és a galantamin önmagukban alkalmazva nem bizonyultak hatékonyaknak a szkopolaminnal szemben, a két anyag kombinált alkalmazása viszont visszafordította a szkopolamin memória rontó hatását. Nikiforuk és munkatársai (2016) által végzett kísérletben a memantint galantaminnal és még két további $\alpha 7$ -nAChR-okra ható szelektív PAM vegyülettel (CCMI or PNU-120596) kombinálták. Eredményeik azt mutatták, hogy mindhárom kombináció enyhítette a patkányok természetes felejtés okozta memória romlását, ezen felül a kombinált kezelések hatékonysága meghaladta a megfelelő monokezelések hatékonyságát. Ugyanebben a tanulmányban a kombinált kezelések pozitív hatása a szelektív $\alpha 7$ -nAChR antagonistá MLA alkalmazásával gátolható volt, ami azt sugallja, hogy a vegyületek közötti előnyös interakció alapját képező mechanizmusban kiemelt szerepük lehet az $\alpha 7$ -nAChR-oknak.

A fent leírt pre-klinikai tanulmányok az $\alpha 7$ -nAChR-ok kiemelt szerepét tükrözik a memantinnal és a szelektív $\alpha 7$ -nAChR ligandokkal végzett kombinációs kezelések pro-kognitív hatásaiban. Mivel egyre több tanulmány pozitív jelenséggént demonstrálja a memantin $\alpha 7$ -

nAChR-ra kifejtett antagonizmusát, feltételezhető, hogy a vegyület ezen hatása is hozzájárul a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti előnyös interakciókhoz. Jelen kísérleteinkben különböző hatásmechanizmusú $\alpha 7$ -nAChR ligandokat kombináltunk a memantinnal, és a NCD-ok farmakológiai, valamint természetesen idős patkány modelljében vizsgáltuk meg viselkedés szintjén a kétféle kombináció kognitív serkentő hatékonyságát. Ezen kívül biokémiai vizsgálatokat alkalmazva felmértük az idős patkányok gyulladós állapotát, valamint az $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedés okozta expressziós változásait.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Amint azt a bevezetésben is tárgyaltuk a memantin donepezillel való kombinálását már jóváhagyták az AD kezelésére, azonban a rendelkezésre álló bizonyítékok alapján továbbra sem világos, hogy a kombinációs terápia hatékonyabb-e a memóriazavarok kezelésében, mint bármely gyógyszer önmagában. Továbbá egyre több tanulmány demonstrálja, hogy egy másik ChEI, a galantamin, mely az $\alpha 7$ -nAChR-ok pozitív alloszterikus modulátora is egyben, sokkal jobb szinergikus hatást eredményez a memantinnal való együtt adása során, mint a donepezil-memantin kombinációs kezelés. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a két vegyület egyidejű hatékonysága az $\alpha 7$ -nAChR-ok modulációjára vezethető vissza, melyben feltételezhetően a memantin $\alpha 7$ -nAChR-ra kifejtett hatása is közrejátszik. Kísérleteinkben a memantin és szelektív $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciókra fókuszáltunk és az alábbi vizsgálati célokat tűztük ki:

- I. Az $\alpha 7$ -nAChR-okat célzó ligand kölcsönhatások vizsgálata NCD-ok szkopolaminnal indukált farmakológiai patkány modelljében Morris-féle vízi labirintus (MWM) és T-labirintus paradigma alkalmazásával:
 1. A memantin és a szelektív $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 dózis-hatás összefüggésének meghatározása.
 2. Szubeffektív dózisú memantin és szubeffektív dózisú PHA-543613 kombinált hatásának vizsgálata az epizódikus memória különböző komponenseire (térbeli navigáció, rövid-távú memória, hosszú-távú memória) összehasonlítva a megfelelő monokezelésekkel.
- II. Az $\alpha 7$ -nAChR-okat célzó ligand kölcsönhatások vizsgálata NCD-ok természetes idős patkány modelljében NOR paradigma alkalmazásával:
 1. A memantin, a szelektív $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 és egy szelektív $\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM vegyület dózis-hatás összefüggésének meghatározása.
 2. Szubeffektív dózisú memantin és szubeffektív dózisú $\alpha 7$ -nAChR ligandok (PHA-543613 és PAM) kombinált hatásának vizsgálata összehasonlítva a megfelelő monokezelésekkel.
- III. Idős állatoknál tapasztalható mRNS és fehérje expressziós változások vizsgálata két gyulladáshoz köthető mediátor (IL-1 β , MIP-1 α) a CNTF neurotróf faktor és az $\alpha 7$ -nAChR-ok tekintetében a memóriáért felelős agyterületeken (hippocampus, neocortex, striatum).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A memantin és a PHA-543613 közötti interakció vizsgálata farmakológiai NCD-modellben

Az első tanulmányban a szelektív $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 és a memantin kombinált hatását teszteltük NCD-ok szkopolaminnal indukált patkány modelljében. A vegyületek egyidejű hatékonyságát az epizodikus memória különböző doménjein (térbeli navigáció, rövid-távú memória és hosszú-távú memória) figyeltük meg MWM paradigmában. Továbbá a memantin-PHA-543613 kombinációs kezelés rövid-távú memóriára kifejtett farmakológiai hatásait T-labirintusban is megvizsgáltuk. A kísérletben alkalmazott technikákat és kísérleti protokollokat a következő fejezetekben tárgyaljuk részletesen.

3.1.1. Epizodikus memória vizsgálata MWM paradigma alkalmazásával

3.1.1.1. *Kísérleti állatok elhelyezése és tartása*

Kísérleteinkben 350-500 g tömegű, felnőtt (6-8 hónapos), hím Long Evans patkányokat alkalmaztunk. A memantin és a PHA-543613 dózis-hatás összefüggéseit összesen 72 patkányon vizsgáltuk, míg a kombinált kezelés hatékonyságát 65 másik állaton teszteltük. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpontjának állatházában tartottuk párosával, hozzávetőleg 150 cm² alapterületű ketrecekben elhelyezve. Az állatházban természetes fényhez közeli spektrumú megvilágítást biztosítottunk, ahol 12 órás sötét és 12 órás világos periódus automatikusan váltotta egymást. A világos szakasz reggel 7 órától este 19 óráig, a sötét szakasz este 19 órától reggel 7-ig tartott. Az állatházban klímaberendezéssel állandó hőmérsékletet (22 +/- 2°C) biztosítottunk. A patkányok naponta 17 g standard laboratóriumi patkánytápot (CRLT/N egységes rágesálótáp, Innovo KFT, Budapest) fogyasztottak. A kontrollált táplálékmenyiségre azért volt szükség, hogy biztosítsuk az állatok egészséges súlygyarapodását és megakadályozzuk elhízásukat és egyéb egészségügyi problémák kialakulását. Továbbá fontos volt, hogy állataink a kísérletek alatt kellő motivációval rendelkezzenek, ami alaposabb explorációt eredményez. Csapvízből korlátlan mennyiséget biztosítottunk.

A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MÁB) és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) hagyta jóvá, valamint a Baranya Megyei Kormányhivatal szakhatósága engedélyezte (engedélyszám: BA02/2000–25/2015).

3.1.1.2. Morris-féle vízi labirintus teszt (MWM)

A kísérletet egy 180 cm átmérőjű, 90 cm magas, kör alakú medencében végeztük, melyet 30 cm-ig vízzel töltöttünk fel. A vizet tejpörrel és kék ételfestékkel tettük átlátszatlaná. A labirintust négy kvadránsra osztottuk az égtájaknak megfelelően (ÉNY, DNY, ÉK, DK). A kísérleti protokoll négy tréning napból és egy próba napból állt. A tréning napok során egy platformot helyeztünk a DNY-i kvadránsba, a víz felszíne alá 1 cm-re. A patkányoknak a labirintus körül elhelyezett vizuális jelek segítségével kellett megtanulniuk a rejtett platform helyét. Az állatoknak tréning naponként négy próbát kellett teljesíteniük. Az egyes próbákban az állatokat különböző kvadránsokba helyeztük az óramutató járásának megfelelően. A start pontot is naponta változtattuk, szintén az óramutató járásának megfelelően. Egy állat számára két perc állt rendelkezésre, hogy megtalálja a platformot. A próbák során a platform keresésével töltött időt, valamint a platformig megtett útvonal hosszát mértük Ethovision XT10 szoftver (Noldus, Wageningen, Hollandia) segítségével. Ha az állat 2 percen belül nem találta meg a platformot, 10 mp-re az emelvényre helyeztük és a keresési időnek 2 percet jegyeztünk fel. Az állatok első tréning napon mutatott teljesítményét használtuk fel a rövid-távú memória értékelésére. Az ötödik napon az állatok csak egy próbát hajtottak végre. Eltávolítottuk az addig fix helyen lévő platformot és az állat célkvadránsban töltött idejét mértük két percen keresztül, melyből a hosszú-távú memóriára következtettünk.

3.1.1.3. A kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete

A szkopolamin hidrobromidot (Tocris), a PHA-543613 hidrokloridot (Tocris) és a memantin hidrokloridot (Tocris) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel 1ml/kg-os végtérfogatban. A tréning napokon a szkopolamint intraperitoneálisan (IP) injektáltuk 15 perccel a kísérleti ülések kezdete előtt, míg a PHA-543613-at és/vagy a memantint szubkután (SC) injektáltuk 45 perccel a kísérleti ülések kezdete előtt (tehát 30 perccel a szkopolamin beadása előtt).

Az első kísérletsorozatban a memantin és a PHA-543613 monokezelések hatékonyságát határoztuk meg. A memantint 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg és 1,0 mg/kg dózisokban (Mem0.1, Mem0.3, és Mem1.0), a PHA-543613-at 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg és 3,0 mg/kg (PHA0.3, PHA1.0 és PHA3.0) dózisokban alkalmaztuk, melyeket korábbi kísérleti eredményeinket alapul véve választottuk ki. A különböző monokezelések hatékonyságát a patkányok kognitív teljesítményére teszteltük szkopolaminnal indukált (0,1 mg/kg, Scop) tranziens amnézia modellben. A kísérleti procedúra második fázisában az adott kísérlet szempontjából

szubeffektív dózisú memantin (0,1 mg/kg) és szubeffektív dózisú PHA-543613 (0,3 mg/kg) farmakológiai kölcsönhatásait és a kombinált alkalmazásuk kognitív serkentő hatását teszteltük, összehasonlítva a monokezelések hatékonyságával. A kísérletnek alávetett patkányok a következő kezelésekben részesültek: vehikulum önmagában (VEH), szkopolamin önmagában (Scop), memantin monokezelés 0,1 mg/kg dózisban, szkopolamin beadást megelőzően (Mem0.1), PHA-543613 monokezelés 0,3 mg/kg dózisban, szkopolamin beadást megelőzően (PHA0.3), és kombinált kezelés, szkopolamin beadást megelőzően (Mem0.1&PHA0.3). A kísérleti elrendezést tekintve egymástól független kezelési csoportokat alakítottunk ki. Azokban a kezelésekben, ahol szkopolamin, memantin és/vagy PHA-543613 nem került beadásra a „hiányzó” vegyületet VEH-mal helyettesítettük, így minden állat ugyanannyi tűszúrásban részesült, kizárva az az egyes mérési csoportok között a tűszúrás okozta stresszbeli különbségeket.

3.1.1.4. Statisztikai analízis

A nyers adatokból kiszámolt átlagokat és standard hibákat (\pm SEM) vonal- és oszlopdiagramokon ábráztuk Microsoft Excel táblázatkezelő program segítségével. A statisztikai analíziseket IBM SPSS 20.0 statisztikai programmal végeztük. Az állatok teljesítményét a tréning fázisban többszemponos ismételt méréses ANOVA teszttel („mixed ANOVA”) elemeztük. Mivel a teljesítménybeli javulás a tréningfázis első két napján volt a legszembetűnőbb az első és a második tréning nap eredményeit tovább elemeztük a platform keresésével töltött idő és a megtett útvonalhossz szempontjából. Szignifikáns interakciók kimutatása esetén kontraszt elemzéseket is végeztünk bizonyos kezeléspárok és napok, vagy próbák között (pl. [Kontroll vs. Scop] \times [nap1 vs. nap2], [PHA0.3 vs. Scop] \times [nap3 vs. nap4]).

A próba napon mért eredmények közötti különbségek igazolására egyváltozós ANOVA tesztet alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során a szkopolamin kezeléshez hasonlítottuk az összes többi kezelést LSD teszt segítségével. A különbségeket $p < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

3.1.2. Rövid-távú memória vizsgálata T-labirintus alkalmazásával

3.1.2.1. Kísérleti állatok elhelyezése és tartása

Jelen tanulmányban 24 db, 350-500 g tömegű, felnőtt (7-12 hónapos) hím Long Evans patkányt használtunk fel. Az állatok tartásának feltételei megegyeztek a 3.1.1.1. fejezetben

leírtakkal. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MÁB) és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) hagyta jóvá, valamint a Baranya Megyei Kormányhivatal szakhatósága engedélyezte (engedélyszám. BA02/2000-25/2015).

3.1.2.2. T-labirintus teszt

Kísérleteink során az állatok rövid-távú memóriáját T-labirintusban teszteltük spontán alternációs paradigmával, ami a rágcsálók természetes explorációs magatartását használja ki. A rágcsálók ösztönös magatartásának egyik jellemzője, hogy az exploráció során egy adott helyről az aréna legrégebben látogatott pontját keresik fel. A patkányokat egyenként a labirintus Start karjába (50 × 16 × 30 cm) helyeztük, majd a guillotine ajtó felnyitását követően az állat a jobb és a bal célkar (külön-külön 50 × 10 × 30 cm) között választhatott. A választott oldal felfedezése után a patkány visszatért a Start helyre, ha ez 2 percen belül nem történt meg, az állatot enyhe lökéssel tessékeltük vissza. Az állat Start helyre való visszatérését követően az ajtót lezártuk és a memória vizsgálata érdekében 5 mp-es késleltetést alkalmaztunk 2 próba között. Egy állat számára 25 perc állt rendelkezésre, hogy teljesítse a kritériumot, ami minimum 8 szabad választást, azaz 9 próbát jelentett. Ha 15 próbát teljesített az állat 25 perc letelte előtt, akkor számára véget ért a kísérlet. A T-labirintust minden vizsgálat előtt 20%-os etanollal mostuk át, és padlójára a patkány saját almából vékony réteget szórtunk, hogy otthonosabb környezetet biztosítsunk, és az idegen szagokat elimináljuk. Kutatásunkat Noldus szoftver segítségével rögzítettük, és sötétített, szabályozott hőmérsékletű laborban végeztük enyhe megvilágítás mellett.

A kísérletek során feljegyeztük, hogy adott próbában az állat melyik célkart választotta. Akkor alternált, ha az ellenkező kart választotta, mint az azt megelőző próba során, míg hibának tekintettük, ha az azonos kart látogatta meg, mint az azt megelőző próba során. A választások alapján alternálási rátát számoltunk, úgy, hogy az alternálások számát elosztottuk a patkány által teljesített próbák számával, melyből egyet levontunk, ugyanis az első próbában még nincs alternálási lehetőség.

$$\text{Alternálási ráta} = \frac{\text{Alternáló választások száma}}{\text{Próbák száma} - 1}$$

3.1.2.3. *Kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete*

A T-labirintus kísérleteinkben használt farmakonokat, a szkopolamin hidrobromidot (Tocris), a PHA-543613 hidrokloridot (Tocris), valamint a memantin hidrokloridot (Tocris) fiziológiás sóoldatban (VEH) oldottuk fel, majd 1 ml-es fecskendő segítségével adtuk be az állatoknak 1 ml/kg-os végtérfogatban. A szkopolamint intraperitoneálisan (IP) injektáltuk 15 perccel a kísérleti ülések kezdete előtt, míg a PHA-543613-at és/vagy a memantint szubkután (SC) injektáltuk 45 perccel a kísérleti ülések kezdete előtt (tehát 30 perccel a szkopolamin beadása előtt).

Minden állattal a farmakológiai kísérletek előtt 4-6 habituációs és tréning mérést végeztünk, annak érdekében, hogy az állatok megszokják az új környezetet és az alternálási teljesítményük jelentős mértékben, stabilan haladjon meg az 50%-os véletlen szintet. Adott állat kontroll eredményének 4 kísérleti ülés alatt teljesített alternálási eredményeinek átlagát vettük.

A habituációs és tréning méréseket követően először a memantinnal végzett monokezelések hatékonyságát vizsgáltuk meg különböző dózisokban a patkányok spontán alternáló teljesítményére. Az alkalmazott dózisok a következők voltak: 0,001, 0,003, 0,01, 0,03 és 0,1 mg/kg. A PHA-543613 szubeffektív és effektív dózisait korábbi kísérleteinket alapul véve határoztuk meg (Bali et al. 2015). A kísérleti procedúra második fázisában az adott kísérlet szempontjából szubeffektív dózisu memantin és szubeffektív dózisu PHA-543613 kombinált alkalmazását teszteltük le a következő farmakológiai kezeléseket alkalmazva: szkopolamin önmagában (Scop), memantin monokezelés 0,003 mg/kg dózisban, szkopolamin beadást megelőzően (Mem0.003), PHA-543613 monokezelés 0,1 mg/kg dózisban, szkopolamin beadást megelőzően (PHA0.1), és kombinált kezelés, szkopolamin beadást megelőzően (Mem0.003&PHA0.1). Egy adott kísérletben a kezeléseket egyenletesen randomizált elrendezésben végeztük, tehát minden állatot minden kezelésnek alávetettünk. Azokban a kezeléseknél, ahol szkopolamin, memantin és/vagy PHA-543613 nem került beadásra a „hiányzó” vegyületet VEH-mal helyettesítettük, így minden állat ugyanannyi tűszúrásban részesült, kizárva a tűszúrás okozta stresszbeli különbségeket.

3.1.2.4. *Statisztikai analízis*

Adataink statisztikai kiértékelésénél csak azon állatok alternálási teljesítményét vettük figyelembe, melyek megfeleltek az általunk előzetesen meghatározott kritériumoknak,

miszerint egy állat kontroll helyzetben teljesített alternálási eredményeinek átlaga haladja meg a véletlen szintet (50%), a szkopolaminnal kezelték alternálási rátája alacsonyabb legyen, mint a kontroll érték (legalább 5 %-kal) és ne haladja meg a 60%-ot, továbbá egy állat adott ülés alatt 9 próbát teljesítsen.

Az állatok T-labirintusban mért alternálási rátájából számolt átlagokat és standard hibákat (\pm S.E.M.) oszlopdiagramokon ábrázoltuk, melyek Excel táblázatkezelő program segítségével készültek. A statisztikai analíziseket SPSS 20.0 (IBM, 2012) statisztikai programmal végeztük. A különböző kezelések során mért alternálási eredmények közötti különbségek igazolására egyutas ismétléses varianciaanalízist (repeated measures ANOVA, rANOVA) alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során a szkopolamin kezeléshez hasonlítottuk az összes többi kezelést (kontroll, Mem, PHA, Mem&PHA) LSD teszt segítségével. Az 50%-os véletlen szinttől való eltérést egymintás t-tesztel mutattuk ki egy-egy kezelés során. A különbségeket $p < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak, amit az ábrákon csillaggal, illetve kettőskereszttel jelöltünk. A p értékeket Holm-módszerrel korrigáltuk.

3.2. A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók vizsgálata idős patkányokban

A második tanulmányunkban a memantint két különböző hatásmechanizmusú $\alpha 7$ -nAChR-ra ható vegyülettel, a korábban már alkalmazott ortoszterikus agonista PHA-543613-mal és egy jelenleg fejlesztés alatt álló PAM-ral (CPDX) kombináltuk. A kombinált kezelések kognitív serkentő hatását idős patkányok hosszú-távú deklaratív memóriájára teszteltük NOR paradigmában. A magatartásfarmakológiai kísérleteket követően biokémiai vizsgálatokat (PCR, ELISA) is végeztünk az öregedéssel összefüggésbe hozható neuroinflammációs markerek azonosítására. Ezen kívül az $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedéssel kapcsolatos expressziós változásait is elemeztük. Az alábbiakban az alkalmazott technikák, kísérleti protokollok kerülnek bemutatásra.

3.2.1. A kísérleti állatok elhelyezése és tartása

A jelen tanulmányban összesen 65 (csoportonként 12-15 állat) idős (28 hónapos) és 12 fiatal (4 hónapos) hím Long Evans patkányt alkalmaztunk, melyek 350-500 g tömegűek voltak. Az állatok tartásának feltételei megegyeztek a 3.1.1.1. fejezetben leírtakkal. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MÁB) és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) hagyta jóvá, valamint a Baranya Megyei Kormányhivatal szakhatósága engedélyezte (engedélyszám.: BA02/2000–25/2015, BA02/2000–30/2021).

3.2.2. Új tárgy felismerési teszt (NOR)

Az állatok hosszú távú deklaratív memóriáját NOR teszttel vizsgáltuk. A kísérleteket egy 57,5x57,5 cm alapterületű, 39,5 cm peremmagasságú, szürke színű nyílt porond apparátusban végeztük. A tesztprotokoll két próbából állt. Az első próbában két egyforma tárgyat helyeztünk el az arénába, melyeket a patkányok 3 percig explorálhattak. Az első próbát követően, a 24 órás késleltetési időszakra az állatokat visszahelyeztük a lakóketrecükbe. A 24 óra lejárta után a második próba következett, mely során az új tárgy felismerését értékeltük. Az egyik tárgyat egy új tárgyra cseréltük, és a patkányok 3 percig ismét felfedezhették a tárgyakat. A kísérleti elrendezésben négy különböző tárgypárt alkalmaztunk, amelyeket véletlenszerűen osztottunk el az állatok és a kísérleti ülések között, kiegyensúlyozott latin-négyzet elrendezésben.

Az újdonság iránti preferencia a rágcsálók egy veleszületett sajátossága. Ennélfogva az ismerős tárgy felismerése feltételezhetően az új tárgy hosszabb ideig tartó felfedezésében nyilvánul meg, melyből az ép memóriefunkciókra következtethetünk. Ennek értékelésére a próbák alatt az ismerős (Ef) és az új tárgyakkal (En) töltött explorációs időt mértük, melyekből diszkriminációs indexet (DI) számoltunk az alábbi képlet alapján:

$$DI = (En - Ef) / (En + Ef)$$

A DI pozitív szám volt, ha a patkány több időt töltött az új tárgy vizsgálatával, mint a régivel, míg DI negatív szám volt az ismerős tárggyal töltött hosszabb idő esetén. Amennyiben a DI nulla vagy nulla körüli értéket vett fel az állatok azonos, vagy közel azonos ideig explorálták a tárgyakat. Azokat az állatokat, akik a két tárggyal együtt kevesebb időt töltöttek

el, mint 5 másodperc ($E_n + E_f < 5$ mp), vagy a két tárgy közül, csak az egyiket explorálták ($DI = \pm 1,00$) kizártuk adott kísérleti ülés statisztikai elemzéséből.

3.2.3. A kísérlet során alkalmazott farmakonok és a vizsgálat menete

A PHA-543613 hidrokloridot (Tocris) és a memantin hidrokloridot (Tocris) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és 1 ml/kg-os végtérfogatban alkalmaztuk. A PAM vegyületet (Richter Gedeon, Magyarország) 5%-os Tweenben oldottuk és 2 ml/kg végtérfogatban alkalmaztuk. Minden vegyületet SC injekcióztunk 45 perccel a kísérleti ülések kezdete előtt. A kombinált kezeléseknél a memantint és a PHA-543613-at, illetve a memantint és a PAM vegyületet két egymást követő szubkután injekcióban adtuk be az állatoknak. A monokezelések tesztelésekor a be nem adott vegyületet a megfelelő VEH-mal helyettesítettük.

A magatartásfarmakológiai kísérleteinkben először az idős és fiatal patkányok kognitív alapteljesítményét mértük fel. Miután sikeresen bizonyítottuk, hogy az idős patkányok nagyfokú kognitív hanyatlást mutatnak, a memantinnal, a PHA-val és a PAM vegyülettel történő monokezelések farmakológiai hatásait teszteltük le az öregedés okozta kognitív hanyatlással szemben. A memantinnal végzett monokezeléseket a következő dózisokban alkalmaztuk: 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg (Mem0.1, Mem0.3 és Mem1.0). A PHA-543613-at 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg és 3,0 mg/kg dózisokban (PHA0.3, PHA1.0 és PHA3.0), a PAM vegyületet szintén 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg és 3,0 mg/kg (CPDX0.3, CPDX1.0 és CPDX3.0) dózisokban adtuk be. Ezt követően az adott kísérlet szempontjából szubeffektív memantin és szubeffektív PHA-543613 dózisok együttes beadását teszteltük a megfelelő monokezelések hatásaival szemben. A kísérletben tehát a következő kezeléseknél részesültek az állatok: vehikulum önmagában (VEH), memantin monokezelés 0,01 mg/kg dózisban (Mem0.01), PHA-543613 monokezelés 0,1 mg/ttkg dózisban (PHA0.1) és a két vegyület kombinált alkalmazása (Mem0.01&PHA0.1). Ehhez hasonlóan a memantin és a PAM vegyület kombinációját is teszteltük egy különálló kísérletben, melyben a következő kezeléseket alkalmaztuk: vehikulum önmagában (VEH), memantin monokezelés 0,01 mg/kg dózisban (Mem0,01), monokezelés a PAM vegyülettel 0,1 mg/ttkg dózisban (CPDX0.1), és a két vegyület kombinált alkalmazása (Mem0.01&CPDX0.1). Kísérleteinkben a kezeléseket egyenletesen randomizált elrendezésben végeztük, így minden állat az adott kísérlet alatti összes kezelésben részesült. Azokban a kezeléseknél, ahol szkopolamin, memantin és/vagy PHA-543613/PAM nem került beadásra a „hiányzó” vegyületet VEH-mal helyettesítettük, így minden állat ugyanannyi tűszúrásban részesült, kizárva a tűszúrás okozta stresszbeli különbségeket.

3.2.4. Agyminták begyűjtése és előkészítése a biokémiai vizsgálatokhoz

Az idős és fiatal állatok egy csoportját IP úton alkalmazott pentobarbitállal altattuk majd fizioiógias sóoldattal transzkardiális úton perfundáltuk. Az agyakat kivétel után jobb és bal neocortexre, striatumra és hippocampusra disszekáltuk, melyeket azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és a felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

3.2.5. RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű PCR

Az agyminták RNS tartalmának extrakciója NucleoSpin RNS kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) alkalmazásával történt a gyártó utasításainak megfelelően. A kapott RNS-ek minőségét és koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőriztük 260 nm-en. A tiszta RNS mintákból cDNS-t készítettünk cDNS reverz transzkripció kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. A kapott cDNS-t -10 °C-on tároltuk. A kiválasztott célgének expresszióját kvantitatív valós idejű PCR-ral mértük Maxima SYBRGreen MasterMix (Applied Biosystems, Waltham, USA) alkalmazásával ABI Prism 7500 rendszeren (Applied Biosystems). A primereket a Primer Express szoftver (Thermo Fisher Scientific) segítségével terveztük, figyelembe véve az összes célgén exon-intron határait (2. táblázat). A target mRNS szinteket a housekeeping génként használt ciklofilin A-ra (Cyca) normalizáltuk. A reakció az alábbi hőprofilnak megfelelően alakult:

1. 95 °C 10 perc,
2. 95 °C 35 mp,
3. 60 °C 35 mp,
4. 72 °C 1 perc
5. 2-4 lépés ismétlés 40x

Target gén	GenBank Acc#	Primerek (5'-3') ^a	Amplikon mérete (bp)
Cyca	BC059141	GGA AGC CAT GGA GCG TTT T AAT GCC CGC AAG TCA AAG AA	100
$\alpha 7$ -nAChR	S53987	AGT GCT GCA AAG AGC CAT ACC ATG AGT ACA CAA GGG ATG AGC AGA T	100
CNTF	X17457	AGG CCC CGA GAG CAA AAT ACC ACC CAA TGC AAA CCA AA	90
MIP-1 α	NM_013025	AGC CGG GTG TCA TTT TCC T CCA GCT CAG TGA TGT ATT CTT GGA	90
IL-1 β	NM_031512	GAG TCT GCA CAG TTC CCC AA ATG TCC CGA CCA TTG CTG TT	100

^aA felső és az alsó szekvenciák a forward és a reverz primereket reprezentálják

2. táblázat: a qPCR-hez használt primer szekvenciák

3.2.6. Fehérje izolálás és ELISA teszt

A vizsgált agyi régiók teljes fehérjetartalmát RIPA lízispufferben izoláltuk (50 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1% SDS). A minták teljes fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL) segítségével mértük. Az IL-1 β , MIP-1 α , CNTF és α 7-nAChR mennyiségi meghatározását AbbeXa (Cambridge, UK) ELISA kitékkel végeztük el (katalógusszámok: abx155713, abx155822, abx155360, abx555). Az ELISA vizsgálatokat a gyártói protokollok szerint végeztük. Közvetlenül az assay végső színreakciója után az abszorbanciát 450 nm-en mértük iEMS Reader mikrolemez-leolvasóval (Thermo Fisher Scientific).

3.2.7. Statisztikai analízis

A NOR és a biokémiai tesztek eredményeiből számolt átlagot és standard hibát (\pm S.E.M) Excel táblázatkezelő program segítségével oszlopdiagramokon ábrázoltuk. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS 20.0 szoftverrel végeztük. A NOR tesztben az állatok ismerős és új tárgyak felfedezésével eltöltött idejét páros t-próbával hasonlítottuk össze, míg az idős és fiatal állatok DI értékei közötti különbséget független kétmintás t-próbával értékeltük. A magatartásfarmakológiai kísérletekben a kezelések DI-re gyakorolt főhatásait lineáris modellel (linear mixed-effect model) elemeztük. A szignifikáns főhatás kimutatását követően a vizsgált kezelések hatását a vehikulummal szemben post-hoc LSD teszttel hasonlítottuk össze.

Egyváltozós ANOVA és post-hoc LSD teszt segítségével elemeztük a fiatal, idős memória-deficités és nem deficités csoportok RNS és fehérje expressziós szintjeit. A különbségeket $p < 0,05$ esetén minden elemzésben statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

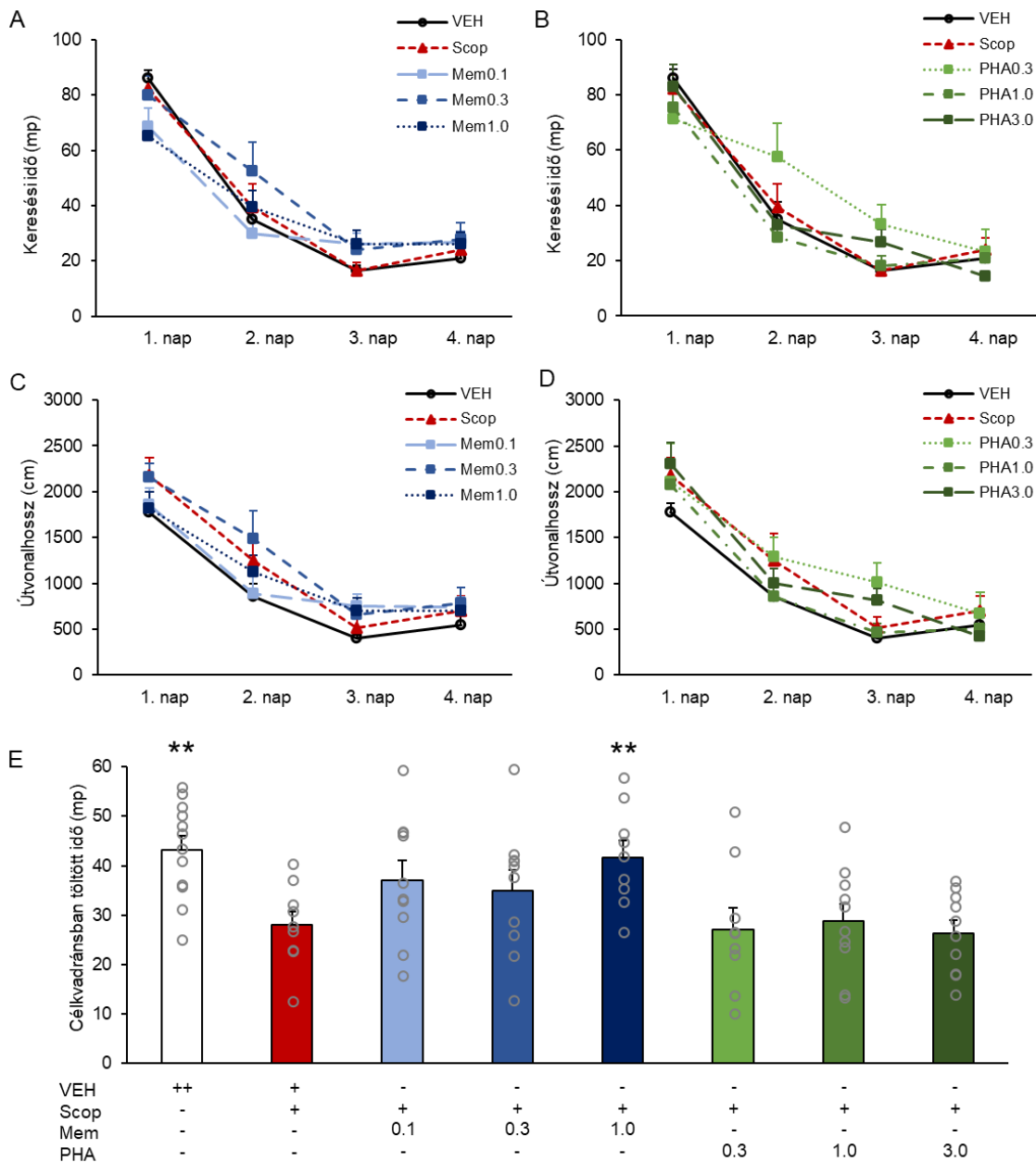
4.1. A memantin és a PHA-543613 kombinált hatása patkányok tanulási és memória teljesítményére

4.1.1. Memantinnal és a PHA-543613-mal végzett monokezelések a szkopolaminnal szemben

Először a memantinnal és a PHA-543613-mal végzett monokezeléseket teszteltük különböző dózisokban a szkopolaminnal indukált tanulási és memória deficittel szemben. A tréning fázisban (1–4. nap) az állatok átlagos keresési ideje jelentős mértékben csökkent (NAP: $F(3, 213) = 177,313, p < 0,001$) (1A–B. ábra). Ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség a vehikulummal, szkopolaminnal, memantinnal és a PHA-543613-mal kezelt csoportok között (KEZELÉS: $F(7, 71) = 0,845, p = 0,554$) a keresési időt tekintve. A KEZELÉS-ek és a NAP-ok között ($F(21, 213) = 1,918, p = 0,011$) szignifikáns interakciót figyeltünk meg, ami arra utal, hogy a különböző kezelési csoportok keresési ideje eltérően változott a tréning során. A kontrasztanalízis eredményei azt mutatják, hogy az 1. és a 2. tréningnap között a szkopolaminnal és a 0,3 mg/kg dózisú PHA-543613-mal kezelt csoportok között eltérés tapasztalható a keresési időt tekintve ($[PHA0.3 \text{ vs. Scop}] \times [nap1 \text{ vs. nap2}]$: $-29,0 \pm 13,4$ (kontrasztbecslés \pm SEM); $p = 0,034$) (1B ábra). Azonban az 1. és az utolsó (4.) tréningnap között ($[PHA0.3 \text{ vs. Scop}] \times [nap1 \text{ vs. nap4}]$: $-10,0 \pm 12,3; p = 0,421$) nem találtunk különbséget ugyanezen csoportok között, ami azt jelzi, hogy a keresési idő csökkenése összességében hasonló volt a két csoportban a teljes tréningfázis során (1B ábra).

Az állatok tanulási teljesítményét a platformig megtett útvonalhossz alapján is értékeltük, mely a tréning napok során jelentős csökkenést mutatott (NAP: $F(3, 213) = 153,072, p < 0,001$) (1C-D ábra). A kezeléseknél azonban nem volt szignifikáns hatása az állatok tanulási folyamataira (KEZELÉS: $F(7, 71) = 1,281, p = 0,272$), hasonlóan a keresési időn alapuló eredményekhez. Továbbá nem találtunk szignifikáns interakciót a KEZELÉS-ek és a NAP-ok között ($F(21, 213) = 1,172, p = 0,278$), ami arra utal, hogy a fent említett interakció a keresési idő tekintetében valószínűleg az úszási sebesség különbségeinek tudható be. A próba napon (1E. ábra) a célkvadránsban töltött időből a hosszú távú memóriára következtettünk. Ellentétben a tréningnapok eredményeivel, a próba napon a kezeléseknél szignifikáns főhatása volt kimutatható a célkvadránsban töltött időre (KEZELÉS: $F(7, 71) = 3,917, p = 0,001$). A szkopolaminnal kezelt állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a célkvadránsban, mint a vehikulummal kezelt csoport (kontroll vs. Scop: $43,2 \pm 2,8 \text{ s vs. } 28,0 \pm 2,8 \text{ s, } p = 0,02$). Bár a

memantin alacsonyabb dózisokban (0,1 mg/kg és 0,3 mg/kg) nem javította az állatok hosszú távú memóriáját a szkopolaminnal szemben, a legnagyobb memantin dózis (1,0 mg/kg) sikeresen visszafordította a szkopolaminnal kiváltott memóriadeficitet (Scop vs Mem1.0: $28,0 \pm 2,8$ s vs $41,7 \pm 3,3$ s, $p = 0,009$). A PHA-543613 azonban egyik alkalmazott dózisban sem bizonyult hatékonynak.



1. ábra: A memantinnal és a PHA-543613-mal végzett monokezelések hatása a patkányok tanulási és hosszú-távú memória teljesítményére MWM paradigmában. A csillagok a szkopolamin (Scop) hatásától való szignifikáns eltéréseket jelölik: $**p < 0,01$. Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis)

Az úszási sebességet szintén elemeztük, mint nem kognitív paramétert, az alkalmazott farmakonok lehetséges mellékhatásainak ellenőrzésére (4A-B ábra). A kezeléseknél szignifikáns főhatása volt az úszási sebességre (KEZELÉS: $F(7, 71) = 3,289$, $p = 0,004$). A post-hoc elemzés azt mutatta, hogy a szkopolamin növelte az úszási sebességet a kontrollcsoportéhoz képest (kontroll vs. Scop: $24,1 \pm 0,5$ cm/s vs. $27,7 \pm 0,7$ cm/s, $p = 0,001$), amelyet nem befolyásoltak a további, memantinnal, vagy PHA-543613-mal végzett kezelések (Mem0.1: $26,7 \pm 0,5$ cm/s; Mem0.3: $26,5 \pm 0,7$ cm/s; Mem.1.0: $25,8 \pm 0,4$ cm/s; PHA0.3: $27,9 \pm 0,5$ cm/s; PHA1.0: $25,8 \pm 0,5$ cm/s; PHA3.0: $28,3 \pm 0,5$ cm/s). A tréningnek szintén szignifikáns főhatása volt az állatok úszási sebességére (NAP: $F(3, 213) = 8,796$, $p < 0,001$). A KEZELÉS-ek és a NAP-ok között azonban nem figyeltünk meg szignifikáns interakciót ($F(21, 213) = 1,147$, $p = 0,302$), ami arra utal, hogy az állatok úszási sebessége a kezeléstől függetlenül is nőtt az ismételt tesztelés során (tanulási hatás).

4.1.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált alkalmazása

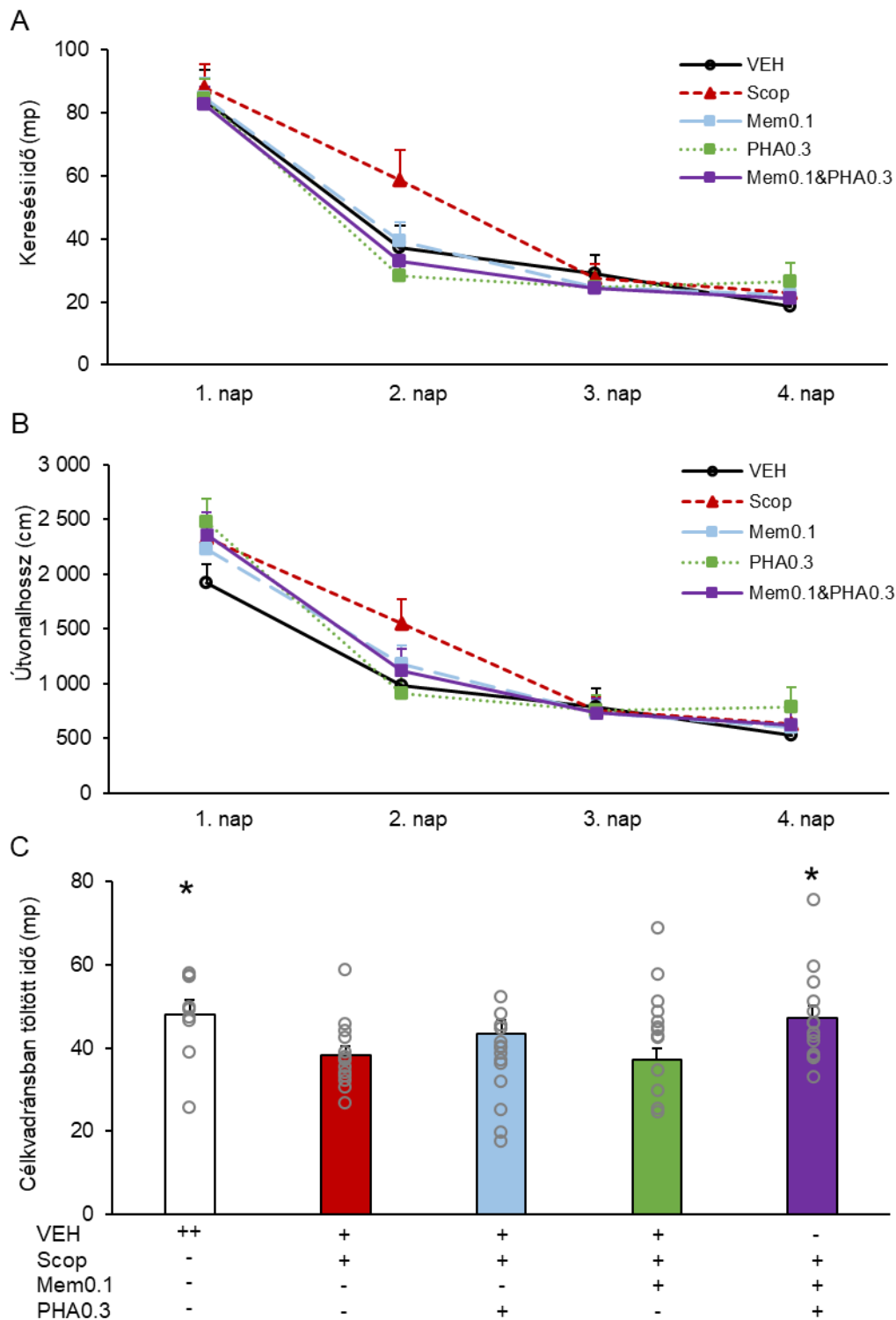
A következő kísérletünkben a memantint (0.1 mg/kg) és a PHA-543613-at (0.3 mg/kg) szubeffektív dózisokban kombináltuk és kognitív serkentő hatékonyságát teszteltük a monokezelésekkel összehasonlítva. A tanulási szakaszban (1–4. nap) a tréning jelentős főhatása volt megfigyelhető, mivel mind a keresési idő (2A ábra), mind a megtett útvonalhossz (2B ábra) szignifikánsan lecsökkent (NAP: keresési idő: $F(3, 180) = 133,533$, $p < 0,001$; megtett útvonalhossz: $F(3, 180) = 110,325$, $p < 0,001$). A korábbi kísérleteinkhez hasonlóan a kezelések nem gyakoroltak jelentős hatást sem a keresési időre (KEZELÉS: $F(4, 60) = 1,144$, $p = 0,345$), sem a megtett útvonal hosszára (KEZELÉS: $F(4,60) = 0,426$, $p = 0,789$). Továbbá a kezelések nem befolyásolták szignifikánsan a tréning teljesítményre gyakorolt hatását (KEZELÉS \times NAP: keresési idő: $F(12, 180) = 1,149$; $p = 0,323$; megtett útvonalhossz: $F(12, 180) = 1,246$; $p = 0,255$).

Az állatok rövid-távú memóriáját is elemeztük, melyhez az első tréningnapon nyújtott teljesítményüket vettük alapul (3A, B ábra). Szignifikáns interakciót sikerült kimutatnunk a kezelések és a próbák között, tehát kimondhatjuk, hogy a kezelések jelentősen befolyásolták a próbák alatti teljesítményt (KEZELÉS \times PRÓBA: keresési idő: $F(12, 180) = 1,952$, $p = 0,031$; útvonalhossz: $F(12, 177) = 2,305$, $p = 0,009$). Míg valamennyi csoport fokozatos javulást mutatott az első napon végzett próbák előrehaladtával, a csak szkopolaminnal kezelt állatok nem tudták megtanulni a rejtett platform helyét. Kontraszt elemzéseket is végeztünk a kezelések páronkénti összehasonlítása, valamint az első és a negyedik próba között. Az eredmények azt

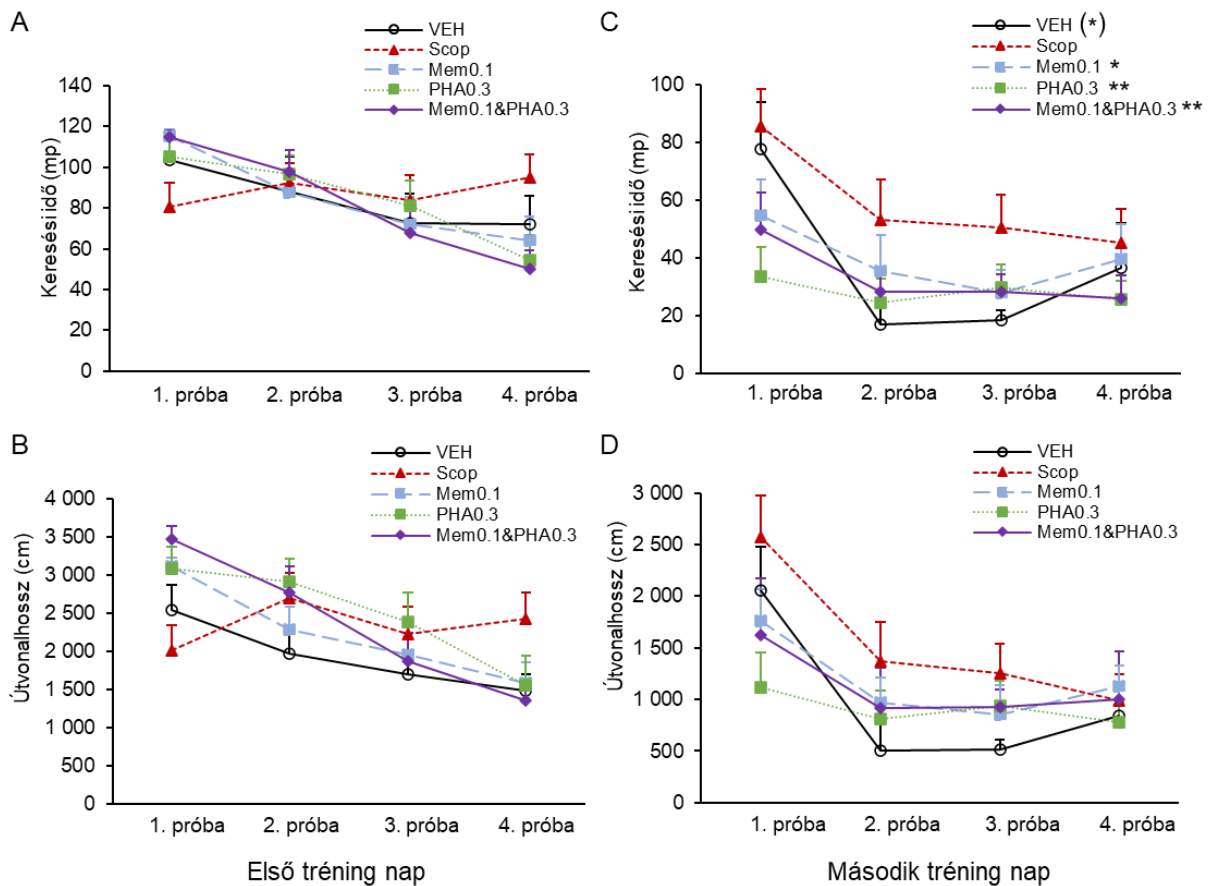
mutatják, hogy a szkopolaminnal kezelt csoportban nem tapasztalható javulás az első és a negyedik próba között, szemben a kontroll állatokkal, ami arra utal, hogy a szkopolamin nagy mértékben rontotta a rövid-távú memóriát ([Kontroll vs. Scop]×[t1 vs. t4]: keresési idő: $45,7 \pm 18,4$ (kontrasztbecslés \pm SEM), $p=0,016$; útvonalhossz: $1475,0 \pm 515,7$, $p=0,006$). Azonban a memantin és a PHA-543613 mind önmagában, mind kombinációban javította a szkopolaminnal kiváltott rövid-távú memória-zavart ([Scop vs. Mem0,1] × [próba1 vs. próba4]: keresési idő: $65,4 \pm 16,3$, $p < 0,001$; útvonalhossz: $1939,4 \pm 456,2$, $p < 0,001$; [Scop vs. PHA0,3] × [próba1 vs. próba4]: keresési idő: $65,3 \pm 16,3$, $p < 0,001$; útvonalhossz: $1884,0 \pm 464,9$, $p < 0,001$; [Scop vs. Mem0,1&PHA0,3] × [próba1 vs. próba4]: keresési idő: $79,0 \pm 16,3$; $p < 0,001$; útvonalhossz: $2524,0 \pm 456,2$, $p < 0,001$).

A második tréning napon a kezelések szignifikáns hatást gyakoroltak az állatok keresési idejére (KEZELÉS: $F(4, 60) = 2,932$, $p = 0,028$) a megtett útvonal hosszánál viszont nem mutattunk ki különbséget a csoportok között (KEZELÉS: $F(4, 60) = 1,661$, $p = 0,171$) (3C-D ábra). A páros összehasonlítások eredményei azt mutatják, hogy a szkopolaminnal kezelt állatok továbbra is rosszabbul teljesítettek a keresési idő tekintetében, szemben a kontroll állatokkal, illetve azokkal az állatokkal, akik alacsony dózisban kapták a memantint, a PHA-543613-at, vagy ezek kombinációját (kontroll vs. Scop: $37,4 \pm 6,7$ s vs. $58,6 \pm 9,4$ s, $p=0,054$; Scop vs. Mem0,1: $58,6 \pm 9,4$ s vs. $39,3 \pm 6,0$ s, $p=0,048$; Scop vs. PHA0,3: $58,6 \pm 9,4$ s vs. $28,3 \pm 6,2$ s, $p=0,002$; Scop vs. Mem0,1&PHA0,3: $58,6 \pm 9,4$ s vs. $33,0 \pm 5,5$ s, $p=0,009$). Azonban szignifikáns interakciót nem sikerült kimutatnunk a próbák és a kezelések között (KEZELÉS × PRÓBA: keresési idő: $F(12, 180) = 1,020$, $p = 0,432$; útvonalhossz: $F(12, 180) = 0,852$, $p = 0,597$), tehát a szkopolaminnal kezelt állatok teljesítménye is tendenciaszerű javulást mutatott a második tréning napon.

A próba napon (2C ábra) a farmakológiai kezelések szignifikáns főhatást mutattak a célkvadránsban töltött időre (KEZELÉS: $F(4, 60) = 2,805$, $p = 0,033$). A szkopolaminnal kezelt csoport szignifikánsan kevesebb időt töltött a célkvadránsban, mint a kontroll csoport (Kontroll vs. Scop: $47,9 \pm 3,5$ s vs. $38,3 \pm 2,1$ s, $p=0,035$). A memantin és a PHA-543613 monokezelés nem csökkentette a szkopolaminnal kiváltott amnéziát (Scop vs. Mem0,1: $38,3 \pm 2,1$ s vs. $37,1 \pm 2,8$ s, $p=0,766$; Scop vs. PHA0,3: $38,3 \pm 2,1$ s vs. $43,3 \pm 3,2$ s, $p=0,210$), azonban a kombinált alkalmazásuk sikeresen visszafordította a hosszú-távú memória romlást (Scop vs. Mem0,1&PHA0,3: $38,3 \pm 2,1$ s vs. $47,1 \pm 2,9$ s, $p=0,029$). Az eredmények a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 között létrejövő előnyös interakciót tükrözik.

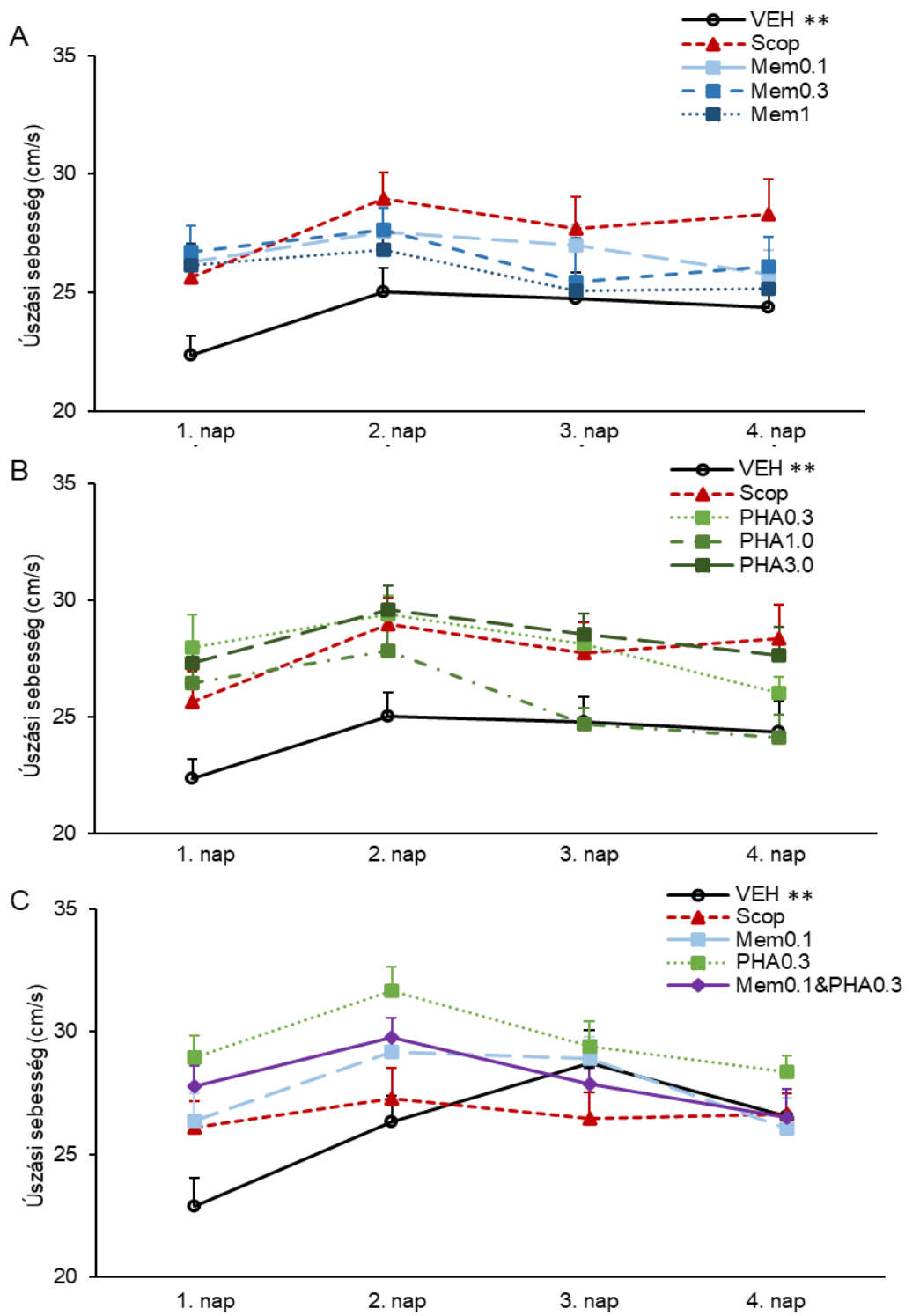


2. ábra: A memantinnal és a PHA-543613-mal végzett kombinált kezelés hatása a patkányok tanulási és hosszú-távú memória teljesítményére MWM paradigmában. A csillagok a szkopolamin hatásától való szignifikáns eltéréseket jelölik: * $p < 0,05$. Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis), kombinált kezelés-Mem(dózis)&PHA(dózis)



3. ábra: A memantinnal és a PHA-543613-mal végzett kombinált kezelés hatása a patkányok rövidtávú memória teljesítményére MWM paradigmában. A csillagok a szkopolamin hatásától való szignifikáns eltéréseket jelölik: (* $p < 0,054$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis), kombinált kezelés-Mem(dózis)&PHA(dózis)

Az állatok úszási sebességét szintén befolyásolták mind a kezelések (KEZELÉS: $F(4, 60) = 3,496$, $p = 0,012$), mind maga a tréning (NAP: $F(3, 180) = 10,093$, $p < 0,001$). Ezen kívül interakciót is kimutattunk a napok és a kezelések között (KEZELÉS \times NAP: $F(12, 180) = 1,951$, $p = 0,031$). A kontrasztanalízis eredményei azt mutatják, hogy a kontroll állatok úszási sebessége jelentős növekedést mutatott a 2. és a 3. tréning nap között, szemben a szkopolaminnal kezelt állatokkal [Kontroll vs. Scop] \times [nap2 vs. nap3]: $-3,2 \pm 1,7$; $p = 0,065$), melynek eredményeként az utolsó tréning napon (4. nap) a kontroll csoport is elérte a szkopolaminnal kezelt csoport úszási sebességét (4C ábra).

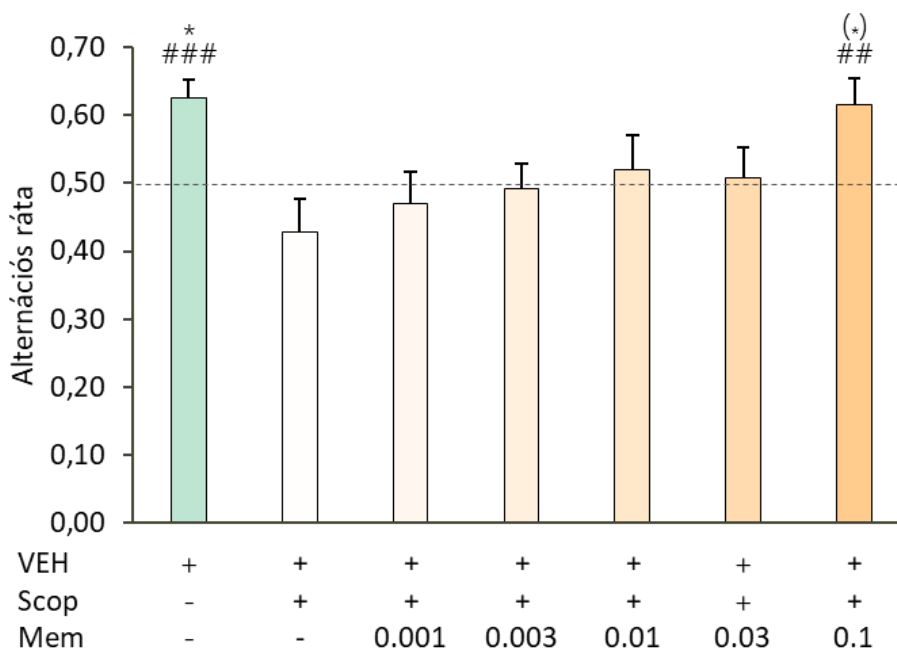


4. ábra: Különböző kezelések hatása a patkányok úszási sebességére MWM paradigmában. A csillagok a szkopolamin hatásától való szignifikáns eltéréseket jelölik: $**p < 0,00$. Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis), kombinált kezelés-Mem(dózis)&PHA(dózis)

4.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált hatása patkányok spontán alternáló teljesítményére

4.2.1. Memantinnal végzett monokezelések a szkopolaminnal szemben

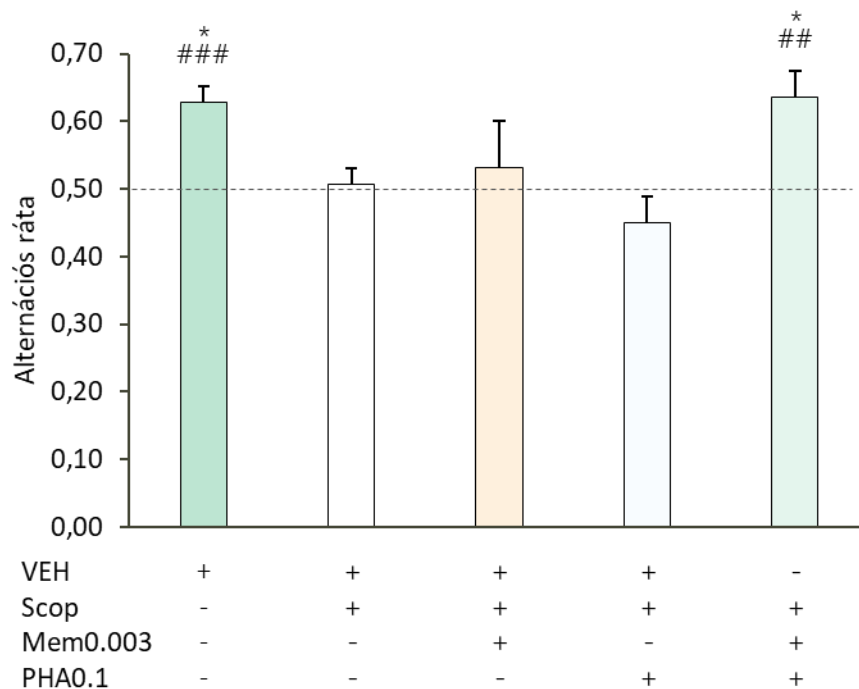
A memantin monokezelések szignifikáns főhatása volt megfigyelhető az állatok spontán alternáló teljesítményére ($F(3,2, 25,8) = 3,12, p = 0,040$). A patkányok kontroll helyzetben mutatott teljesítménye meghaladta az 50%-os véletlen szintet ($t = 4,745, p < 0,001$) és az alternálási ráta szignifikánsan magasabb volt, mint a szkopolamin kezelést követően [kontroll vs. Scop: $0,63 \pm 0,03$ (átlag \pm SEM) vs. $0,43 \pm 0,05, p = 0,047$]. Tehát a patkányok normális alternáló magatartást mutattak, mely azonban a szkopolamin hatására nagy mértékben leromlott. A memantin dóziszfüggően gyengítette a szkopolamin által kiváltott memóriazavart, és növelte a patkányok alternálási rátáját. Bár a memantin memória javító hatása 0,1 mg/kg dózisban csak marginálisan tekinthető szignifikánsnak a szkopolamin kezeléséhez képest (Mem0,1 vs. Scop: $0,62 \pm 0,04$ vs. $0,43 \pm 0,05, p = 0,073$), visszaállította az állatok normális alternáló teljesítményét ($t = 3,011, p = 0,008$). Ez alapján a memantin 0,1 mg/kg-os dózisát hatékony dózissnak tekintettük a rövid-távú memória javítására (5.ábra).



5.ábra: Memantinnal végzett monokezelések hatása a patkányok spontán alternáló teljesítményére. A csillag a szkopolamin hatásától való szignifikáns eltérést mutatja (* $p < 0,05$, (* $p = 0,073$). A kettőskereszt a véletlen szinttől való szignifikáns eltérést jelöli (## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem

4.2.2. A memantin és a PHA-543613 kombinált alkalmazása

Ebben az esetben is a farmakológiai kezelések szignifikáns főhatását figyeltük meg a patkányok spontán alternáló teljesítményére ($F(4, 32) = 3,910, p = 0,011$). A szkopolamin kezelést követően az állatok alternálási rátája szignifikánsan lecsökkent a kontroll állatokhoz képest (kontroll vs. Scop: $0,63 \pm 0,02$ vs. $0,51 \pm 0,02, p = 0,041$). A memantinnal és a PHA-543613-mal végzett kezelések önmagukban nem enyhítették a szkopolaminnal kiváltott memória deficitet (Mem0.003 vs. Scop: $0,53 \pm 0,07$ vs. $0,51 \pm 0,02; p > 0,1$; PHA0.1 vs. Scop: $0,45 \pm 0,04$ vs. $0,51 \pm 0,02; p > 0,1$). Továbbá az állatok alternálási teljesítménye sem haladta meg szignifikáns mértékben az 50%-os véletlen szintet a memantinnal és a PHA-543613-mal végzett monokezeléseket követően. Azonban a memantin és a PHA-543613 kombinációja szubeffektív dózisokban megnövelte az alternálási rátát (Mem0.003&PHA0.1 vs. Scop: $0,64 \pm 0,04$ vs. $0,51 \pm 0,02; p = 0,043$), és visszaállította az állatok normál memória teljesítményét ($t = 3,506, p = 0,004$) (6.ábra).

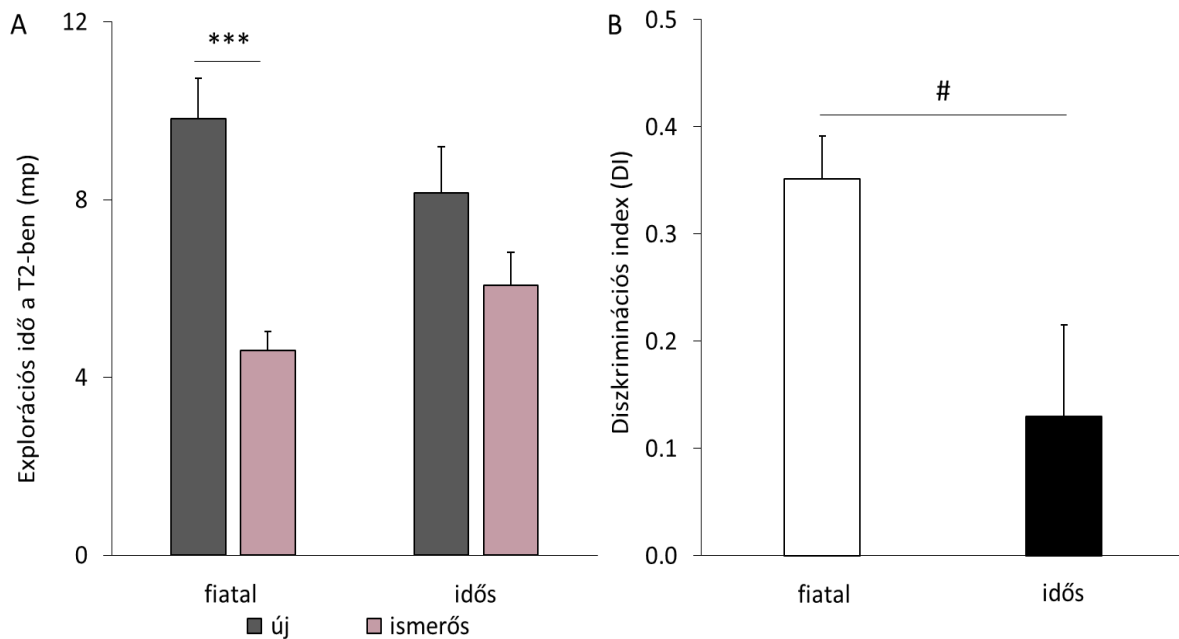


6.ábra: A memantinnal és a PHA-543613-mal végzett kombinált kezelés hatása a patkányok spontán alternáló teljesítményére. A csillag a szkopolamin hatásától való szignifikáns eltérést mutatja ($*p < 0,05$). A kettőskereszt a véletlen szinttől való szignifikáns eltérést jelöli ($##p < 0,01, ###p < 0,001$). Rövidítések: vehikulum-VEH, szkopolamin-Scop, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis)

4.3. A memantin és $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók vizsgálata idős patkányokban

4.3.1. Az öregedés hatása a patkányok hosszú-távú deklaratív memóriájára

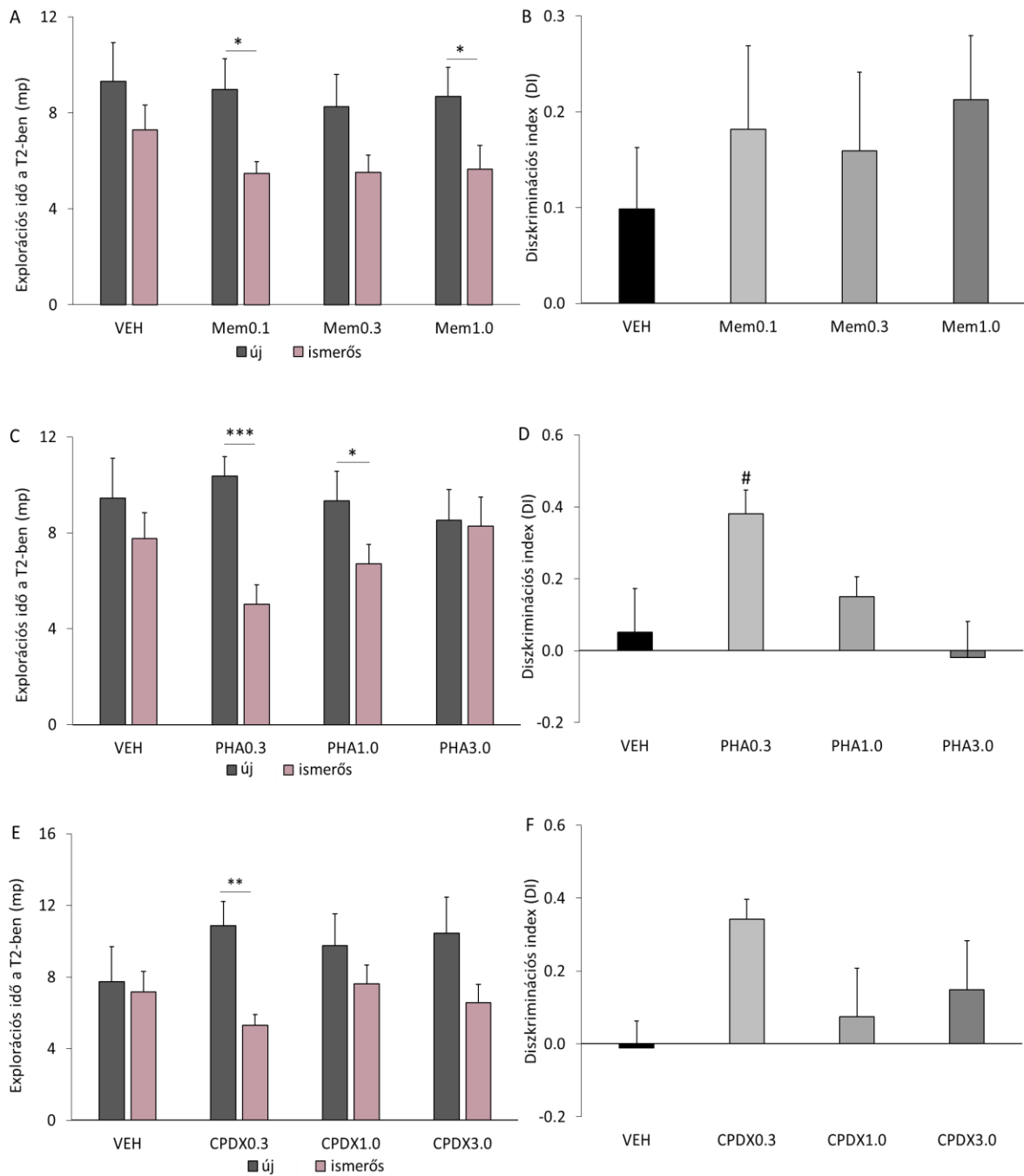
Az életkorral összefüggő kognitív károsodás meghatározására idős és fiatal patkányok NOR tesztben mutatott teljesítményét értékeltük és hasonlítottuk össze. A 24 órás retenciós időszakot követően, a 2. próbában a fiatal állatok szignifikánsan több időt töltöttek az új tárgy felfedezésével, mint az ismerőssel (az új és az ismerős tárgy felfedezésének ideje: $9,8 \pm 0,9$ vs. $4,6 \pm 0,4$, $t=6,666$, $df=11$, $p<0,001$). Ezzel ellentétben, az idős patkányok nem diszkrimináltak az ismerős és az új tárgyak között (új vs. ismerős: $8,1 \pm 1,0$ vs. $6,1 \pm 0,7$, $t=1,526$, $df=10$, $p=0,158$) (7A ábra). Ezen kívül az idős patkányok DI-e szignifikánsan alacsonyabb volt a fiatal patkányokéhoz képest (idős vs. fiatal: $0,130 \pm 0,085$ vs. $0,352 \pm 0,039$, $t=2,426$, $df=21$, $p=0,024$) (7B ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy az idős patkányok jelentős hanyatlást mutatnak a hosszú-távú deklaratív (felismerési) memóriát tekintve.



7.ábra: Idős és fiatal állatok összehasonlítása a NOR tesztben. A csillagok az új és az ismerős tárggyal töltött explorációs idők közötti szignifikáns különbséget jelölik: $***p < 0,001$. A kettőskereszt az idős és fiatal állatok DI-e közötti különbséget jelöli: $\#p < 0,05$.

4.3.2. Memantinnal, PHA-543613-mal és a PAM vegyülettel végzett monokezelések kognitív serkentő hatásai öreg patkányokban

A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandumok, a PHA-543613 és a PAM vegyület dózis-hatás összefüggéseit az öregedés okozta kognitív hanyatlással szemben teszteltük. A 0,1 és 1,0 mg/kg dózisú memantin beadását követően a patkányok szignifikánsan több időt fordítottak az új tárgyak felfedezésére, mint az ismerősre, a vehikulummal kezelt állatokkal ellentétben (új vs. ismerős: VEH: 9.3 ± 1.6 vs. 7.3 ± 1.1 , $t=1.489$, $df=10$, $p=0.167$; Mem0,1: 9.0 ± 1.3 vs. 5.5 ± 0.5 , $t=2.492$, $df=11$, $p=0.030$; Mem1,0: 8.7 ± 1.2 vs. 5.7 ± 1.0 , $t=2.737$, $df=10$, $p=0.021$) (8A ábra). Tehát a memantin 0.1 és 1.0 mg/kg dózisban alkalmazva hatékonyan bizonyult a patkányok időskori memória hanyatlásával szemben. A memantin monokezelések (0,1-1,0 mg/kg) jelentős főhatása azonban nem volt megfigyelhető a DI-re ($F(3, 32)=0.384$; $p=0.765$) (8B ábra). Az idős állatok, akik 0,3 mg/kg és 1,0 mg/kg dózisban alkalmazott PHA-543613 kezelésben részesültek, előnyben részesítették az új tárgyat (új vs. ismerős: PHA0,3: 10.4 ± 0.8 vs. 5.0 ± 0.8 , $t=6.354$, $df=12$, $p<0.001$; PHA1,0: 9.3 ± 1.2 vs. 6.7 ± 0.8 , $t=2.684$, $df=12$, $p=0.020$), míg a vehikulummal kezelt idős patkányok nem tudtak diszkriminálni a tárgyak között (új és ismerős: VEH: 9.4 ± 1.7 vs. 7.8 ± 1.1 , $t=0.799$, $df=10$, $p=0.443$) (8C ábra). Továbbá a PHA-543613 a legalacsonyabb dózisban (0,3 mg/kg) javította az idős állatok DI-ét a vehikulummal kezeltkéhez képest ($F(3, 34.7)=4.189$; $p=0.012$; PHA0,3 vs. VEH: 0.38 ± 0.07 vs. 0.05 ± 0.12 , $p=0.012$) (8D ábra). A PAM vegyület szintén javította a patkányok memória teljesítményét azáltal, hogy 0,3 mg/kg dózisban helyreállította az állatok új és az ismerős tárgyak közötti diszkrimináló képességét (új vs. ismerős: CPDX0,3: 10.9 ± 1.4 vs. 5.3 ± 0.6 , $t=5.245$, $df=9$, $p=0.001$) (8E. ábra). A PAM vegyülettel végzett monokezelések szignifikáns főhatása nem volt megfigyelhető a DI-re ($F(3, 26.6)=1.093$; $p=0.369$). Azonban, amint azt a 8F ábra mutatja, a PAM vegyület a legkisebb dózisban alkalmazva (0,3 mg/kg) növelte az átlagos DI-t a PHA-543613 legalacsonyabb dóziséhoz (0,3 mg/kg) hasonlóan.

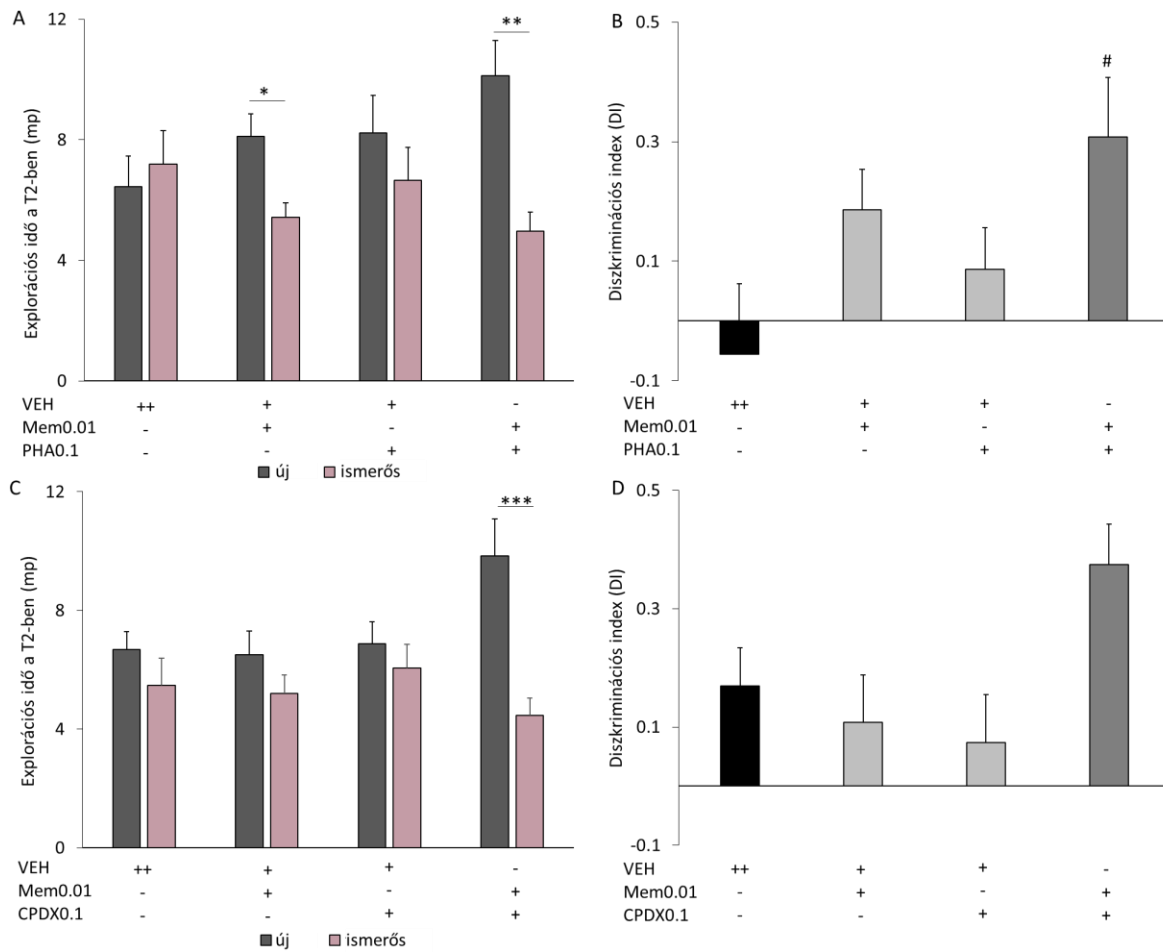


8. ábra: A memantinnal, a PHA-543613-mal és a PAM vegyülettel végzett mono kezelések hatása az idős patkányok NOR-tesztelésére. A csillagok az új és az ismerős tárgy töltött explorációs idők közötti szignifikáns különbséget jelölik: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. A kettőskereszt a DI jelentős javulását jelzi a vehikulummal kezelt csoporthoz képest: # $p < 0,05$. Rövidítések: vehikulum-VEH., memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis), PAM-CPDX(dózis)

4.3.3. Memantin és $\alpha 7$ -nAChR-okra ható ligandok kombinált alkalmazása

A következő kísérletsorozatban 0,01 mg/kg dózisú memantint 0,1 mg/kg dózisú PHA-543613-mal és 0,1 mg/kg dózisú PAM vegyülettel kombináltuk. Először a memantin-PHA-543613 kombinációs kezelés kognitív serkentő hatását hasonlítottuk össze a megfelelő monokezelések hatásaival. Az eredmények azt mutatják, hogy az alacsony dózisú memantin mind önmagában, mind az alacsony dózisú PHA-543613-mal való kombinálása során javította az idős állatok diszkriminációs képességét az új és az ismerős tárgyak között (új vs. ismerős: Mem0.01: $8,1 \pm 0,8$ vs. $5,4 \pm 0,5$, $t=2,549$, $df=10$, $p=0,029$; Mem0,01&PHA01: $10,1 \pm 1,2$ vs. $5,0 \pm 0,6$, $t=3,544$, $df=11$, $p=0,005$), ellentétben a vehikulummal (új vs. ismerős: VEH: $6,5 \pm 1,1$ vs. $7,2 \pm 1,1$, $t=-0,465$, $df=10$, $p=0,652$). A PHA-543613-mal végzett monokezelés azonban nem bizonyult hatékonynak (új vs. ismerős: PHA0.1: $8,2 \pm 1,3$ vs. $6,7 \pm 1,1$, $t=1,604$, $df=10$, $p=0,140$) (9A ábra). Az alkalmazott kezelések marginális hatást eredményeztek a DI-re ($F(3, 30)=2,727$; $p=0,062$). Ahogy az várható volt, a páronkénti összehasonlítások nem mutattak szignifikáns DI-emelkedést az alacsony dózisú memantinnal és PHA-543613-mal végzett monokezelések esetén a vehikulummal kezelt idős kontrollcsoportéhoz képest (Mem0,01 vs. VEH: $0,19 \pm 0,07$ vs. $-0,06 \pm 0,12$, $p=0,081$, PHA01 vs. VEH: $0,09 \pm 0,07$ vs. $-0,06 \pm 0,12$, $p=0,298$). Ezzel szemben a DI szignifikánsan megemelkedett a kombinált kezelés hatására (Mem0.01&PHA01 vs. VEH: $0,31 \pm 0,10$ vs. $-0,06 \pm 0,12$, $p=0,01$), ami azt jelzi, hogy sikeresen visszafordította az életkorral összefüggő deklaratív memória romlást (9B ábra). Ezt követően a memantin és a PAM vegyület együttes beadásának hatásait is teszteltük. Azok az állatok, amelyek kis dózisú memantinnal, vagy PAM vegyülettel végzett monokezelésekben részesültek, nem tettek különbséget az új és az ismerős tárgyak között (új vs. ismerős: Mem0,01: $6,5 \pm 0,8$ vs. $5,2 \pm 0,6$, $t=1,716$, $df=14$, $p=0,108$, CPDX0,1: $6,9 \pm 0,7$ vs. $6,1 \pm 0,8$, $t=0,965$, $df=13$, $p=0,352$). Míg a memantin és a PAM vegyület együttes alkalmazása visszafordította az életkorral összefüggő memóriazavart, mivel a patkányok a kombinációs kezelést követően szignifikánsan több időt töltöttek az új tárgy felfedezésével (új vs. ismerős: $9,8 \pm 1,2$ vs. $4,5 \pm 0,6$, $t=4,560$ $df=14$, $p<0,001$) (9C ábra). A kezelések szignifikáns főhatása volt megfigyelhető a DI-re ($F(3, 41,7)=3,281$; $p=0,030$). A DI életkorral összefüggő csökkenését nem enyhítette sem a memantin, sem PAM vegyülettel végzett monokezelés (Mem0,01 vs. VEH: $0,11 \pm 0,08$ vs. $0,17 \pm 0,06$, $p=0,565$; CPDX0,1 vs. VEH: $0,07 \pm 0,08$ vs. $0,17 \pm 0,06$, $p=0,378$). Az átlagos DI azonban látszólag (de nem

szignifikánsan) nőtt a kombinált kezelés hatására (Mem0,01&PHA01 vs. VEH: $0,37 \pm 0,07$ vs. $0,17 \pm 0,06$, $p=0,055$) (9D ábra).



9. ábra: A memantinnal és $\alpha 7$ -nAChR vegyületekkel végzett kombinációs kezelések hatása idős patkányok NOR teljesítményére. A csillagok az új és az ismerős tárgyval töltött explorációs idők közötti szignifikáns különbséget jelölik: $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$. A kettős kereszt a DI jelentős javulását jelzi a vehikulummal kezelt csoporthoz képest: $\#p < 0,05$. Rövidítések: vehikulum-VEH,, memantin-Mem(dózis), PHA-543613-PHA(dózis), PAM-CPDX(dózis)

4.3.4. A neuroinflammációval összefüggésbe hozható mediátorok és az $\alpha 7$ -nAChR-ok mRNS expressziós vizsgálata fiatal és idős patkány agyban

A további biokémiai vizsgálatokhoz 5 fiatal és 10 idős állatot használtunk fel. Az idős állatokat normál memória teljesítményű (AU) és memória deficitesek (AI) alcsoportokra osztottuk (5 állat/csoport) a NOR testben nyújtott kognitív alapteljesítményük szerint. Azokat az idős állatokat, akik a DI adatsor mediánja alatt teljesítettek memóriadeficiteseknek tekintettük

(DI tartomány: -0,66 - -0,01), míg a medián felett teljesítőket (DI tartomány: 0,17-0,68) ép memóriájú csoportként értékeltük.

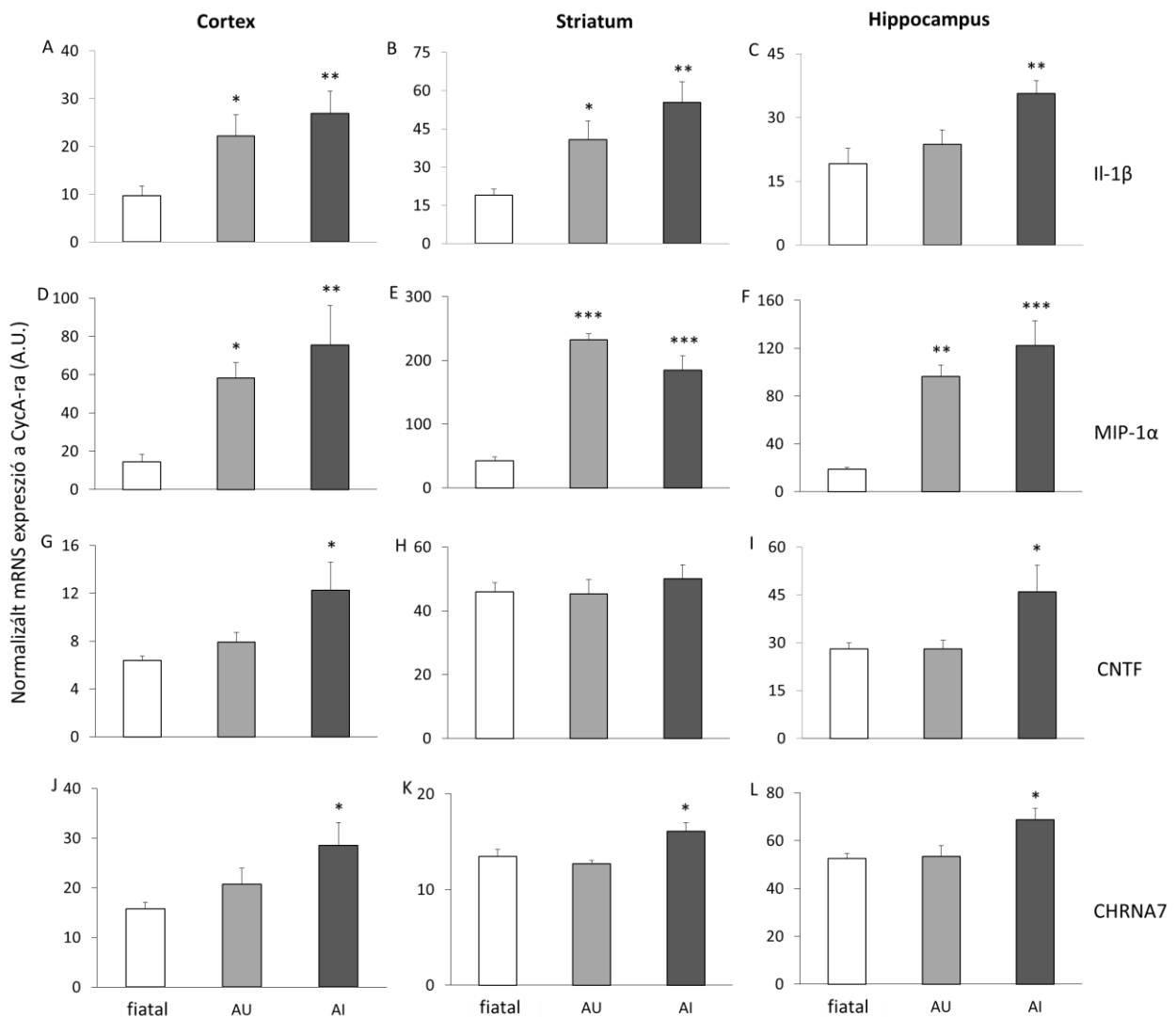
A fiatal, az idős AI és AU patkányok gyulladós állapotának meghatározásához különböző pro-inflammatorikus és neurotróf faktorok mRNA expressziós szintjeit mértük fel a neocortexben a striatumban és a hippocampusban. Ugyanezekben az agyi régiókban az $\alpha 7$ -nAChR-ok mRNA expressziós összehasonlítására is sor került a fiatal és a két idős csoport között.

A qRT-PCR analízis eredményei azt mutatják, hogy mind az AI, mind az AU állatok szignifikánsan magasabb IL-1 β mRNA szintet produkáltak a neocortexben és a striatumban a fiatal kontroll patkányokhoz képest (CTX: $F(2, 11)=5,631$, $p=0,021$; AI vs. fiatal: $26,9\pm 4,7$ vs. $9,7\pm 2,1$, $p=0,008$; AU vs. fiatal: $22,2\pm 4,5$ vs. $9,7\pm 2,1$, $p=0,047$; STR: $F(2, 11)=8,753$, $p=0,005$, AI vs. fiatal: $55,3\pm 8,3$ vs. $18,9\pm 2,4$, $p=0,002$; AU vs. fiatal: $40,8\pm 7,2$ vs. $18,9\pm 2,4$, $p=0,038$) (10A-B ábra). Azonban a hippocampusban csak az AI állatok mutattak szignifikáns emelkedést az IL-1 β mRNA mennyiségében a fiatal állatokhoz képest ($F(2, 12)=6,708$, $p=0,013$; AI vs. fiatal: $35,6\pm 3,1$ vs. $19,1\pm 3,6$, $p=0,005$), az AU és a fiatal csoport között nem találtunk különbséget (AU vs. fiatal: $23,7\pm 3,4$ vs. $19,1\pm 3,6$, $p=0,349$) (10C ábra).

A MIP-1 α mRNA expressziója mind az AI, mind az AU patkányokban az összes vizsgált agyterületen megnövekedett a fiatal állatokhoz képest (CTX: $F(2, 12)=5,860$, $p=0,017$; AI vs. fiatal: $75,6\pm 20,7$ vs. $14,5\pm 14,5\pm 3,8$, $p=0,006$; AU vs. fiatal: $58,3\pm 8,0$ vs. $14,5\pm 3,8$, $p=0,035$; STR: $F(2, 12)=45,5$, $p<0,001$; AI vs. fiatal: $184,8\pm 42,7$ vs. $\pm 5,8$, $p<0,001$; AU vs. fiatal: $232,1\pm 9,7$ vs. $42,6\pm 5,8$, $p<0,001$; HC: $F(2, 12)=16,121$, $p<0,001$; AI vs. fiatal: $122,1\pm 9,7$ vs. $18,8\pm 1,6$, $p>0,001$; AU vs. fiatalok: $96,2\pm 9,5$ vs. $18,8\pm 1,6$, $p=0,001$) (10D-F ábra). A neocortexben és a hippocampusban az AI csoport mutatta a legmagasabb átlagos MIP-1 α mRNA expressziót (10D, F ábra).

A CNTF mRNA expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett az AI csoportban a kéregben és a hippocampusban a fiatal állatokhoz képest (CTX: $F(2, 11)=4,167$, $p=0,045$; AI vs. fiatal: $12,2\pm 2,3$ vs. $6,4\pm 0,4$, $p=0,017$, HC: $F(2, 12)=4,099$, $p=0,044$, AI vs. fiatal: $46,0\pm 8,2$ vs. $28,1\pm 1,7$, $p=0,029$). Ezzel szemben a AU patkányok CNTF mRNA-szintjei nem növekedtek ugyanezekben az agyi régiókban (CTX: AU vs. fiatal: $7,9\pm 0,8$ vs. $6,4\pm 0,4$, $p=0,507$; HC: AU vs. fiatal: $28,0\pm 2,8$ vs. $28,1\pm 1,7$, $p=0,990$) (10G, I ábra). A striatumban a CNTF mRNA expressziója nem különbözött a csoportok között ($F(2, 12)=0,394$, $p=0,683$) (10H ábra).

Az AI patkányok a fiatal patkányokhoz képest nagymértékű $\alpha 7$ -nAChR mRNS upregulációt mutattak az összes vizsgált agyterületen, míg az AU csoport és a fiatal patkányok között nem találtunk különbséget (CTX: $F(2, 11)=3,739$, $p=0,058$; AI vs. fiatal: $28,6\pm 4,6$ vs. $15,8\pm 1,3$, $p=0,020$; AU vs. fiatal: $20,7\pm 3,2$ vs. $15,8\pm 1,3$, $p=0,350$; STR: $F(2, 11, p=5,635)$ $p=0,021$; AI vs. fiatal: $16,1\pm 0,9$ vs. $13,5\pm 0,7$, $p=0,027$; AU vs. fiatal: $12,7\pm 0,4$ vs. $13,5\pm 0,7$, $p=0,489$; HC: $F(2, 12,)=3,08$ $p=0,083$; AI vs. fiatal: $68,7\pm 3,0$ vs. $52,6\pm 5,4$, $p=0,047$; AU vs. fiatal: $53,4\pm 6,5$ vs. $52,6\pm 5,4$, $p=0,907$) (10J-L ábra).



10. ábra: Gyulladásos mediátorok (IL-1 β , MIP-1 α), a CNTF neurotróf faktor és az $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedéssel összefüggő mRNS expressziós változásai. A csillagok az AU és az AI állatok mRNS koncentráció különbségeit jelölik a fiatal állatokhoz képest: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Rövidítések: AU-normál memória teljesítményű idős csoport, AI-memória deficités idős csoport

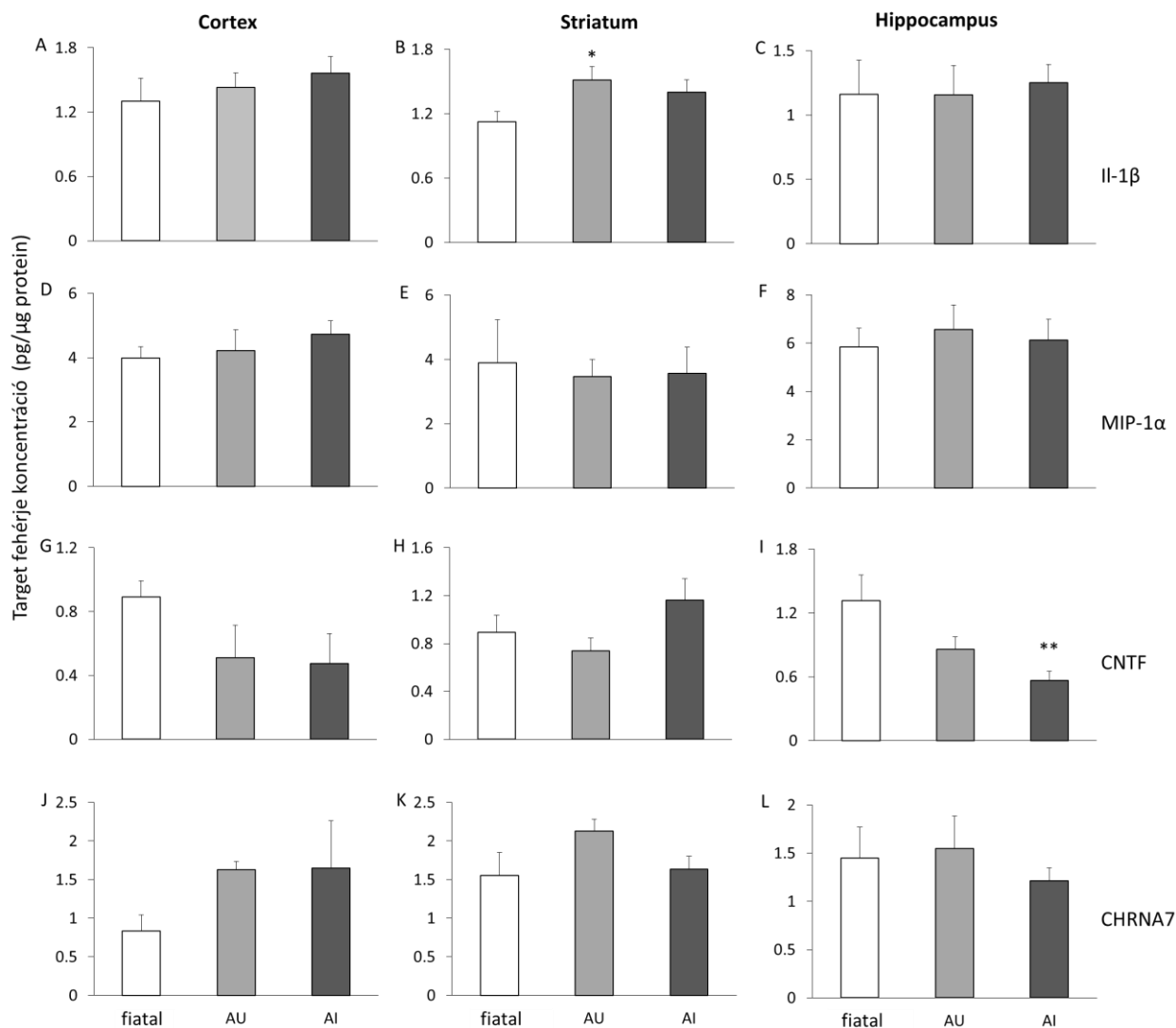
4.3.5. A neuroinflammációval összefüggésbe hozható mediátorok és az $\alpha 7$ -nAChR-ok fehérje expressziós vizsgálata fiatal és idős patkány agyban

Ezt követően az IL-1 β , CNTF, MIP-1 α és az $\alpha 7$ -nAChR-ok fehérje expressziós szintjeit elemeztük fiatal, idős AI és AU patkányok neocortexében, striatumában és hippocampusában. Az ELISA teszt eredményei azt mutatják, hogy az AI állatok striatumában szignifikáns megemelkedett az IL-1 β fehérjeszint a fiatal kontrollcsoporthoz képest, míg az AI és fiatal csoport között nem találtunk különbséget (F(2, 12)=3,127, p=0,081; AU vs. fiatal: 1,5 \pm 0,1 pg/ μ g vs. 1,1 \pm 0,1 pg/ μ g, p=0,032; AI vs. fiatal: 1,4 \pm 0,1 pg/ μ g vs. 1,1 \pm 0,1 pg/ μ g, p=0,110) (11B. ábra). A neocortexben és a hippocampusban az IL-1 β expressziója nem tért el a csoportok között (CTX: F(2, 7)=0,511, p=0,621; HC: F(2, 12)=0,061, p=0,941) (11A, C ábra).

Meglepő módon sem az AI, sem az AU csoport nem mutatott szignifikáns változást a MIP-1 α fehérje expresszióban egyik vizsgált agyi régióban sem (CTX: F(2, 7)=0,652, p=0,550; STR: F(2, 12) = 0,051, p = 0,950, HC: F(2, 12) = 0,173, p = 0,843) (11D-F ábra).

Az mRNS expressziós szintekkel ellentétben a hippocampalis CNTF fehérje szint szignifikánsan lecsökkent az AI csoportban a fiatal csoporthoz képest (F(2, 12)=5,386, p=0,021; AI vs. fiatal: 0,6 \pm 0,1 pg/ μ g vs. 1,3 \pm 0,2 pg/ μ g, p=0,007). Ezenkívül a CNTF fehérje expressziós szintje tendenciaszerű csökkenést (nem szignifikáns) mutatott az AU csoport hippocampusában a fiatal állatokhoz képest (AU vs. fiatal: 0,9 \pm 0,1 pg/ μ g vs. 1,3 \pm 0,2 pg/ μ g, p=0,070) (11I. ábra). A cortexben és a striatumban az öregedés jelentős főhatása nem volt megfigyelhető a patkányok CNTF fehérje expressziós szintjére (CTX: F(2, 7)=2,298, p=0,171; STR: F(2, 12)=2,167, p=0,151) (11G, H ábra).

Az $\alpha 7$ -nAChR fehérje expressziós szintjeinél ugyancsak nem tapasztaltunk szignifikáns, öregedéssel összefüggő változásokat (CTX: F(2, 7)=1,882, p=0,222; STR: F(2, 12)=2,120, p=0,163; HC: F(2, 12) = 0,383, p = 0,690) (11J-L ábra).



11. ábra: Gyulladásos mediátorok (IL-1 β , MIP-1 α), a CNTF neurotróf faktor és az α 7-nAChR-ok öregedéssel összefüggő fehérje expressziós változásai. A csillagok az AU és az AI állatok fehérje koncentráció különbségeit jelölik a fiatal állatokhoz képest: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Rövidítések: AU-normál memória teljesítményű idős csoport, AI-memória defícites idős csoport

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A fent leírt viselkedés tesztekben a memantint $\alpha 7$ -nAChR-okra ható szelektív ligandokkal kombináltuk és a kombinált kezelések kognitív serkentő hatékonyságát vizsgáltuk meg a megfelelő monokezelésekkel szemben a NCD-ok farmakológiai, illetve természetesen idős patkány modelljeiben. Ellentmondásosak a bizonyítékok azzal kapcsolatban, hogy a memantin ChEI-okkal való kombinált alkalmazása további terápiás előnyöket kínál a monokezelésekkel szemben. Azonban egyre több tanulmány hangsúlyozza a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR-okra ható ligandok közötti előnyös interakciókat, melyet jelen kísérleti eredményeink is megerősítenek.

5.1. A memantin és a PHA-543613 kombinálása enyhítette a patkányok szkopolaminnal indukált memória romlását

Az első kísérletsorozatban a memantinnal és a szelektív $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613-mal végzett kombinált kezelés hatását teszteltük le az epizodikus memória különböző komponenseire (térbeli navigáció, a rövid-távú memória és a hosszú-távú memória) MWM paradigmában. Az állatoknál szkopolaminnal idéztük elő a kognitív teljesítmény romlást, mely egy széles körben elterjedt, gyakran alkalmazott anti-muszkarinos szer gyógyszerjelölt vegyületek pre-klinikai tesztelésére. A tréning alatt mért átlagos keresési idő és a platformig megtett útvonalhossz alapján arra tudunk következtetni, hogy az alkalmazott kezelésektől függetlenül minden csoport javulást mutatott a térbeli tanulást tekintve, beleértve a szkopolaminnal kezelt csoportot is. A térbeli navigáció képessége a rágcsálók egy olyan veleszületett sajátsága, mely lehetővé teszi számukra a megváltozott környezethez való alkalmazkodást, ami kritikus lehet a túlélésük szempontjából. Hadar és munkatársai (2019) stressz által kiváltott depressziós epizódok hatását vizsgálták a patkányok kognitív teljesítményére. Sikerült kimutatniuk, hogy az averzív környezetnek kitett patkányok gyorsabban tanultak, mint a kontroll állatok, ami a stresszhelyzet jótékony hatását jelezte a megküzdésre való képesség meglétével. Ez alapján eredményeinkre magyarázatot adhat, hogy stresszhelyzetben (úszás a vízből való kimenekülés céljából) a patkányok térbeli navigációja meglehetősen ellenálló a kolinerg neurotranszmisszó szkopolaminnal kiváltott, viszonylag enyhe gátlásával szemben. A szkopolamin növelte az állatok lokomotoros aktivitását, amire a megnövekedett úszási sebességből következtettünk. Ebből kifolyólag a platformig megtett

útvonal hosszát is elemeztük, amely hasonló eredményeket mutatott, mint a keresési idő analízise.

Mindazonáltal a farmakológiai kezelések befolyásolták az állatok rövid-távú memória teljesítményét, melynek értékeléséhez az állatok első tréning napon nyújtott teljesítményét vettük alapul. A csak szkopolaminnal kezelt állatok teljesítménye nem javult a platform megtalálását tekintve a próbák előrehaladtával, tehát a szkopolamin nagy mértékben rontotta az állatok rövid-távú memória teljesítményét. A szkopolaminnal előidézett rövid-távú memória deficitet azonban hatékonyan visszafordították mind az alacsony dózisú memantinnal, vagy PHA-543613-mal végzett monokezelések, mind a memantin-PHA543613 kombinációs kezelés. Ezeket az eredmények megerősítik a T-labirintus tesztben mért eredményeink is, melyben a memantin-PHA543613 kombinációs kezelés ugyancsak enyhítette a patkányok szkopolaminnal előidézett rövid-távú memória teljesítményét. Ugyanakkor ebben az esetben az egyes monokezelések kognitív serkentő hatása nem mutatkozott meg, melyre a memantin (0.003 mg/kg) és a PHA543613 (0.1 mg/kg) rendkívül alacsony dózisokban történő alkalmazása adhat magyarázatot.

Az állatok próba napon (5. nap) mutatott teljesítményét – melyet a hosszú-távú memória visszahívásaként tartanak számon (Vorhees and Williams 2010) – szintén jelentősen rontotta a szkopolamin. A hosszú-távú memória deficitet a monokezelések közül egyedül a legmagasabb dózisban (1 mg/ttkg) alkalmazott memantin volt képes enyhíteni. A memantin és a PHA-543613 alacsony dózisainak kombinált alkalmazása ugyancsak javította az állatok hosszú-távú memória funkcióit, míg az azonos, alacsony dózisban alkalmazott monokezelések teljesen hatástalanok voltak. Tehát az utóbbi esetben a kombinált kezelés hatékonysága túlmutatott a megfelelő monokezelések hatásain, ami a memantin és a PHA-543613 közötti előnyös interakciót tükrözi.

Számos pre-klinikai tanulmány hangsúlyozza az $\alpha 7$ -nAChR-ok kiemelt szerepét a két vegyület közötti előnyös interakcióban. Azonban ezt a további fejezetekben fogjuk részletesebben kifejteni összevetve a második kísérletsorozatunkból nyert eredményekkel.

5.2. A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok kombinálása enyhítette a patkányok öregedéssel összefüggő memória romlását

A második kísérletsorozatban a NCD-ok természetesen idős patkány modelljében vizsgáltuk meg a memantin és két különböző hatásmechanizmusú szelektív $\alpha 7$ -nAChR ligand - az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 és egy $\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM vegyület – egyidejű hatékonyságát. Az állatok deklaratív memóriáját NOR paradigmában teszteltük.

Első lépésként bizonyítottuk, hogy az idős patkányok jelentős kognitív hanyatlást mutatnak a fiatal állatokhoz képest, mely összhangban van számos korábbi pre-klinikai vizsgálattal (Burger et al. 2007; Long et al. 2009). Eredményeink azt mutatják, hogy a memantinnal és az $\alpha 7$ -nAChR ligandokkal végzett monokezelések főleg alacsonyabb dózisok mellett enyhítették a patkányok életkorral összefüggő kognitív károsodását. Míg a memantin a legalacsonyabb (0,1 mg/ttkg) és a legmagasabb (1,0 mg/ttkg) dózisban is javította az idős patkányok memória teljesítményét, a PHA-543613 és a PAM a legalacsonyabb 0,3 mg/ttkg dózisban fejtette ki a maximális hatékonyságát. Bár az 5 mg/ttkg memantin a patkányok esetében terápiásan relevánsnak tekinthető (Parsons et al. 2007), egyre több bizonyíték áll rendelkezésre a memantin 1,0 mg/ttkg-os, vagy ettől alacsonyabb dózisban történő hatékonyságára vonatkozóan, nemkívánatos viselkedési mellékhatások nélkül. Például Wise and Lichtman (2007) kimutatta, hogy az 1,0 mg/ttkg-tól alacsonyabb dózisú memantin javítja a patkányok térbeli memóriáját nyolckarú radiális útvesztőben. Ezzel összhangban a fent leírt első kísérletsorozatunkban az 1,0 mg/ttkg dózisban alkalmazott memantin fejtette ki legnagyobb hatékonyságát a patkányok hosszú-távú térbeli memória teljesítményére. Sőt a rövid-távú memória tekintetében, már a meglehetősen alacsony, 0,1 mg/ttkg dózisban alkalmazott memantin is hatékonynak bizonyult. A korábban publikált adatok szerint a memantin 0,52 μ M-0,80 μ M-os IC50 értékkel gátolja az NMDA receptor mediált áramokat (Valis et al. 2019). Jelen kutatásunk nem terjedt ki annak vizsgálatára, hogy a memantin koncentrációja az agyban eléri-e az IC50 értéket, azonban a jövőben érdemesnek tartanám ilyen szempontból is megvizsgálni a vegyület hatékonyságát. A PHA-543613 az $\alpha 7$ -nAChR-ok potens, nagy affinitású agonistájának bizonyult ($K_i=8,8$ nM: $\alpha 7$ -5-HT3 kiméra EC50=65 nM), melynek kiváló *in vitro* profilja gyors agyi penetrációval és a magas biohasznosulással párosul. Ezen kívül többféle *in vivo* modellben bizonyult hatékonynak alacsony dózisok alkalmazása mellett: 0,3 mg/kg dózisban visszafordította az amfetamin által kiváltott ingerkapuzási deficitet, továbbá 1,0 mg/kg dózisban növelte a memóriát új tárgy felismerési tesztben (Toyohara and Hashimoto 2010). Egy, a kutatócsoportunk által korábban közölt tanulmányban a PHA-543613

3 mg/ttkg-ban fejtette ki maximális hatékonyságát (Bali et al. 2015). Meglepő módon, jelen kísérletünkben a PHA-543613 10-szer alacsonyabb dózisa (0,3 mg/kg) már sikeresen enyhítette az idős patkányok kognitív hanyatlását. A PHA-543613 optimális dózisa közötti különbség az alkalmazott NCD modellek különbségeinek tudható be, azonban relevánsabb pre-klinikai adatok nyerhetők az NCD-ok természetes modelljeivel, például a jelen tanulmányban is alkalmazott idős állatokkal.

A különböző dózisokban alkalmazott monokezelések hatékonysági vizsgálata után a memantin (0,01 mg/ttkg) és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok (0,1 mg/ttkg) szubeffektív dózisainak kombinált alkalmazását vizsgáltuk. A memantin és a szelektív $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 egyidejű alkalmazása az idős patkányok hosszú-távú memória teljesítményének jelentős javulását eredményezte. Továbbá a memantin PAM vegyülettel való kombinálása is figyelemre méltó hatékonyságot mutatott, míg az alacsony dózisú monokezelések nem javították az idős patkányok hosszú-távú memória teljesítményét. Összeségében a farmakológiai modellben már megfigyelt eredményeket jelen kutatás eredményei is megerősítik, mivel pozitív kölcsönhatást jeleznek a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR vegyületek között, azáltal, hogy nagy mértékben enyhítették a patkányok életkorból eredő kognitív hanyatlását, és meghaladták a monoterápiák kognitív viselkedésre gyakorolt hatásait. Ezek a megfigyelések tovább erősítik az $\alpha 7$ -nAChR-ok szerepét a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok között megfigyelt interakciókban.

5.3. A kombinált kezelésekből származó eredményeink összevetése pre-klinikai adatokkal

Eredményeink egybevágóak számos, rágszálókkal végzett pre-klinikai vizsgálat eredményeivel, melyek az $\alpha 7$ -nAChR-okat közvetlenül célzó kombinált terápiák jótékony hatásait demonstrálják. Busquet és munkatársai (2012) kimutatták, hogy az önmagában hatástalannak bizonyuló galantaminnal és memantinnal végzett kombinált kezelés a szinergikus hatásának köszönhetően szignifikánsan javította az egerek szkopolaminnal kiváltott kognitív teljesítményromlását. Egy másik pre-klinikai tanulmányban Nikiforuk és munkatársai (2016) megállapították, hogy a memantin és a galantamin között megfigyelt előnyös interakció nagy valószínűséggel a galantamin $\alpha 7$ -nAChR-okra kifejtett PAM aktivitásával hozható összefüggésbe, nem pedig a ChE-gátló tulajdonságával, arra hivatkozva, hogy a galantamin-memantin kombinációs kezelés kognitív serkentő hatása az $\alpha 7$ -nAChR antagonistá MLA-val

gátolható volt. Továbbá ugyanebben a vizsgálatban kimutatták, hogy a patkányok kognitív flexibilitása és felismerési memóriája javult azokban az esetekben, amikor a memantint galantaminnal, vagy szelektív $\alpha 7$ -nAChR PAM-okkal (CCMI vagy PNU-120596) kombinálták. Ezekkel az eredményekkel összhangban, egy újabb tanulmányukban, a szerzők megerősítették, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM-ok növelik a memantin pro-kognitív hatásait NOR memória tesztben (Potasiewicz et al. 2020). A megfigyelések fontosságát alátámasztja, hogy az AD elleni forgalomban lévő gyógyszerek használata korlátozott a káros mellékhatások miatt. Következésképpen az $\alpha 7$ -nAChR ligandok kiterjeszthetik a memantin terápiás dózistartományát az alacsonyabb dózisok felé haladva.

5.4. A memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti interakciók háttérben álló lehetséges mechanizmusok

Még nem teljesen tisztázott, pontosan milyen hatásmechanizmus állhat a memantinnal és az $\alpha 7$ -nAChR ligandokkal végzett kombinált kezeléseink háttérben. Az egyik lehetséges feltételezésünk a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok glutamáterg rendszerre kifejtett hatása. A memantin pro-kognitív hatása a klasszikus értelmezés szerint az extraszinaptikus NMDAR-ok kóros aktivációjának gátlásával hozható összefüggésbe, növelve ezáltal a glutamáterg neurotranszmisszió jel-zaj arányát. Míg a glutamáterg terminálisok preszinaptikus helyein expresszálandó $\alpha 7$ -nAChR-ok aktiválása fokozza a glutamát (Marchi and Grilli 2010; Gomez-Varela and Berg 2013), és elősegíti a hippocampus piramisejtjeinek NMDAR mediált válaszait (Bali et al. 2019). Zhao és munkatársai (2006) patkány hippocampális és cortikális neuronokon végeztek elektrofiziológiai és képalkotó vizsgálatokat, hogy alátámasszák feltételezésüket, miszerint a galantamin és a memantin együttes alkalmazása hatékonyabb javulást eredményez, mint az anyagok egyedüli alkalmazása. Megállapították, hogy a galantamin az $\alpha 7$ -nAChR-okra kifejtett hatásával a fokozott glutamát felszabaduláson keresztül növelte mind az extraszinaptikus, mind a szinaptikus NMDAR-ok által mediált válaszokat. A kombinált kezelés során azonban a memantin megakadályozta az extraszinaptikus NMDAR-okon keresztüli kóros, tónusos Ca^{2+} beáramlást, míg a szinaptikus NMDAR-ok fokozott aktivációját a galantamin továbbra is biztosította. Ez alapján a jelen kísérletünkben is hasonló hatásmechanizmust feltételezhetünk az önmagában hatástalan memantin és a szelektív $\alpha 7$ -nAChR ligandok kombinálásakor.

Egy másik lehetséges feltételezésünk az $\alpha 7$ -nAChR-okat, mint közös farmakológiai célpont helyezi fókuszba. Ahogy a bevezetőben is tárgyaltuk a memantin nemcsak az NMDAR-

okra, hanem az $\alpha 7$ -nAChR-okra is kifejti gátló hatását, melyet egyre több tanulmány pozitív jelenséggként tart számon az AD kezelésében. Bár az $\alpha 7$ -nAChR antagonisták nagy dózisairól kimutatták, hogy rontják a memóriát (Levin and Felix 1997), azonban az is felvetődhet, hogy a receptor deszenzitizálása, vagy blokkolása révén mérsékelten lecsökkent receptor-aktiválás nem rontja, hanem akár javíthatja is a memória funkciókat. Például Ferrer-Acosta és munkatársai (2022) által végzett kísérletben az alacsony dózisú memantin neuroprotektív hatását az $\alpha 7$ -nAChR-okra kifejttet antagonizmusával hozták összefüggésbe. Ezzel egyetértésben más $\alpha 7$ -nAChR antagonisták is meglepően pozitív hatásokat fejtettek ki alacsony dózisokban több modellrendszerben is. Goethem és munkatársai (2019) elektrofiziológiai vizsgálatukban arról számoltak be, hogy a szelektív $\alpha 7$ -nAChR antagonista MLA alacsony dózisban alkalmazva potenciózta az ACh-ra adott receptor-válaszokat $\alpha 7$ -nAChR-ral transzfektált *Xenopus* oocitákban, továbbá növelte az LTP-t patkány hippocampus szeletekben. Ugyanebben a tanulmányban az MLA javította a patkányok új tárggyal töltött explorációs idejét. Ezen kívül a nem szelektív $\alpha 7$ -nAChR antagonista mekamilamin (bizonyos esetekben) javító, azaz pro-kognitív hatást fejtett ki mind rágesálókban, mind majmokban munkamemória feladatokban, valamint a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavarban (ADHD) szenvedő embereknél is az ún. felismerési memória tesztben. Ezek a tanulmányok azt a feltételezést is erősítik, hogy az $\alpha 7$ -nAChR agonisták esetében megfigyelhető kognitív javulás inkább az aktiválást követő receptor deszenzitizációnak a következménye, mint magának az aktiválásnak. Egy, a kutatócsoportunk által korábban közölt elektrofiziológiai tanulmány is hangsúlyozza az $\alpha 7$ -nAChR agonisták deszenzitizáló hatását (Bali et al. 2019). A tanulmányban a PHA-543613 és két PAM vegyület (PNU-120596 és NS1738) lokális hatásait hasonlítottuk össze a spontán és az NMDA-val kiváltott tüzelési aktivitásra, *in vivo*. Az eredmények az $\alpha 7$ -nAChR agonista és a PAM jelentősen eltérő hatásait tükrözik. Míg a PNU-120596 és NS-1738 túlnyomórészt szignifikánsan növelte a neuronok mind spontán, mind NMDA által kiváltott tüzelési aktivitását, a PHA-543613 alkalmazása a facilitáló és gátló hatások szinte egyenlő eloszlását eredményezte. Összevetve a fenti adatokat a viselkedési eredményeinkkel, valószínűsíthetjük, hogy a PHA-543613 gátló hatása a receptor deszenzitizációból eredeztethető és pro-kognitív és/vagy neuroprotektív hatásként is manifesztálódhat. Banerjee és munkatársai (2005) közleményükben szintén utalnak az $\alpha 7$ -nAChR agonisták és antagonisták hasonló hatásaira és tovább támogatják azt az elképzelést, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok antagonizmusa, vagy deszenzitizálása kedvező élettani és kognitív hatásokat eredményezhet. Ez alapján elképzelhető, hogy a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok kognitív serkentő hatása ugyanazon receptorra kifejttet hatásukból eredeztethető.

5.5. Öregedéssel összefüggő gyulladási markerek és az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziós változásai

Az idős patkányok nemcsak jelentős memória romlást mutatnak az életkor előrehaladtával, hanem a NCD-okra jellemző patológiás változások bizonyos aspektusait (pl: neuroinflammáció, kolinerg neurotranszmisszió zavara) is képesek utánozni szemben a farmakológiailag indukált tranziens modellekkel. Továbbá új farmakológiai célpontok, biológiai markerek azonosítását is lehetővé teszik és nagy érzékenységet mutatnak gyógyszerjelölt vegyületek tesztelésére. Ez alapján a spontán idős patkányokat a NCD-ok megfelelő validitású, releváns pre-klinikai modelljeként tartják számon.

Jelen tanulmányban több immunológiai marker mRNS és fehérje expressziós szintjét is megvizsgáltuk, mivel az öregedő agy megemelkedett gyulladási állapotát az NCD-ok fő patológiás jellemzői között tartják számon (Ownby 2010; Ahmad et al. 2022). A normál és a patológiás öregedés közötti különbségek sejtszintű értékeléséhez normál és rossz memória teljesítményű idős patkányok gyulladási állapotát mértük fel. Számos tanulmány megerősíti az általunk választott pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek megemelkedett expresszióját AD-s betegek esetén. Az IL-1 β fokozott expresszióját először Griffin és munkatársai (1989) mutatták ki AD-ban szenvedő betegek post mortem agy mintáiból. Az A β plakkokat körülvevő reaktív mikrogliaiban megnövekedett IL-1 β expresszió jelezte, hogy az IL-1 β összefüggésbe hozható az AD patogenezisével. Egy újabb tanulmányban AD betegek és egészséges alanyok vérmintáiban vizsgálták az IL-1 családba tartozó pro-inflammatorikus citokinek és receptoraik expresszióját multiplex ELISA alkalmazásával (Italiani et al. 2018). Az AD betegekben nagy mértékben megemelkedett a pro-inflammatorikus citokinek, köztük az IL-1 β expressziós szintje az egészséges alanyokhoz képest. Egy IL-1 β antagonist (anakinra) alkalmazásával ugyancsak kimutatható volt az IL-1 szignalizációs útvonalak relevanciája az AD és egyéb neurodegeneratív betegségek patofiziológiájában (Casares et al. 2023). Az IL-1 receptorok anakinrával történő gátlása javította a kognitív funkciókat APP/PS1 AD egér modellben. Az AD betegek agyában, megemelkedett post mortem MIP-1 α szintről is beszámoltak. A fokozott MIP-1 α expresszió a vér-agy gáton keresztüli immunsejt infiltráció növelésével, továbbá a mikroglia aktiváció elősegítésével járul hozzá a neuroinflammáció, majd az AD kialakulásához (Meraz-Ríos et al. 2013). Ezek alapján az általunk vizsgált gyulladási markerek a jövőben az AD diagnosztikai markereként, vagy terápiás célpontjaként is szolgálhatnak (Wojcieszak et al. 2022).

Az IL-1 β és MIP-1 α mRNS expressziós szintjének hasonló mintázatát mutattuk ki szinte minden vizsgált agyterületen a csoportok között. Általánosan mind az AU, mind az AI csoport fokozott mRNS up-regulációt mutatott az IL-1 β és a MIP-1 α tekintetében. Azonban ezen gyulladásos markerek expressziója kifejezettebb volt a „patológiás” öregedés során, mely egy gyulladásos állapot felé történő eltolódásra utal az AI állatokban. Megnövekedett fehérje expresszió azonban csak az IL-1 β esetében mutatkozott meg az AU patkányok striatumában a fiatal patkányokhoz képest. Ezek az adatok összhangban vannak egy közelmúltban végzett tanulmány eredményeivel, melyben gyulladást elősegítő markerek széles skáláját vizsgálták meg fehérje szinten (Perkins et al. 2021), azonban bizonyítékot nem találtak a legtöbb általános gyulladást elősegítő citokin és kemokin megnövekedett expressziós szintjéről idős állatokban.

Az olyan neurotróf faktorok, mint a BDNF és a CNTF neuroprotektív hatással rendelkeznek, mivel képesek elősegíteni a szinaptikus plaszticitást és a neuronok túlélését (Hagg et al. 1992; Garcia et al. 2010; Askvig and Watt 2019; Wu et al. 2020). Vizsgálatunkban a CNTF fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az idős, AI állatok hippocampusában, a fiatal patkányokhoz képest, továbbá az AU patkányok cortexében is megfigyelhető volt egy tendenciaszerű változás az alacsonyabb fehérjeszint felé. Meglepő módon mRNS szinten ennek ellenkezője volt kimutatható, tehát a cortikális és a hippocampális CNTF mRNS szint nagy mértékben megemelkedett az AI állatokban a fiatal állatokhoz képest. Az mRNS és fehérje szint ellentétes irányú változása utalhat egy olyan transzkripciós szinten végbemenő mechanizmusra, melynek célja a neurotróf támogatásban bekövetkező deficit kompenzálása az öregedés során. Azonban azt, hogy a CNTF mRNS expressziójának megemelkedése miért nem mutatkozik meg a fehérje expresszióban is, további vizsgálatokat igényel. Mivel kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a CNTF transzkripciós és translációs szintű szabályozási mechanizmusairól, az ezzel kapcsolatos eredményeink interpretálása nagyrészt spekulatív jellegű. Bár Kirsch és Hofmann (1994) beszámoltak a CNTF mRNS és fehérje szintek ellentétes irányú változásairól patkányban RT-PCR és Western blot alkalmazásával, az expresszió pontos felderítéséhez részletesebb elemzések szükségességét említik további in situ hibridizációs, vagy immuncitokémiai módszerekkel.

Az idős állatok nemcsak a megnövekedett neuroinflammáció, hanem a NCD-okra jellemző kolinerg változások modellezésére is alkalmasak, mely ugyancsak összefüggésbe hozható a tanulási és memória folyamatokban bekövetkező zavarokkal. Ebből kifolyólag jelen tanulmányban a munkánk szempontjából fontos $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedéssel összefüggésbe hozható mRNS és fehérje expressziós változásait is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az

AI patkányok markáns mRNS up-regulációt mutattak az $\alpha 7$ -nAChR-okat tekintve az összes vizsgált agyi régióban, anélkül, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziójában jelentős változás történt volna fehérje szinten. Meg kell azonban jegyezni, hogy a neocortexben tendenciaszerű növekedés volt megfigyelhető az $\alpha 7$ -nAChR-ok fehérje expresszióját tekintve. Valószínűleg a kis mintaelemszám és az ELISA módszer kisebb érzékenysége az RT-PCR-hoz képest magyarázatot adhat arra, hogy miért nem lehetett statisztikailag megerősíteni a $\alpha 7$ -nAChR-ok fehérje szintű növekedését. A szakirodalomban ellentmondásosak a bizonyítékok az $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedéssel összefüggő expressziós változásaival kapcsolatban. Számos tanulmány kimutatta, hogy az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziója jelentősen csökkent az NCD-okban, főként a kognitív funkciókhoz társítható agyterületeken, például a frontális cortexben és a hippocampusban (Burghaus et al. 2000; Wevers et al. 2000; Hernandez et al. 2010; Ren et al. 2020). Ugyanakkor egyes tanulmányok az $\alpha 7$ -nAChR-ok up-regulációjáról számoltak be, különösen mRNS expressziós szinten, melyekkel jelenlegi megfigyeléseink is egybevágunk (Nordberg 2001; Kihara and Shimohama 2004; Conejero-Goldberg et al. 2008). Mindazonáltal az $\alpha 7$ -nAChR-ok feltételezett up-regulációja is magyarázatot adhat a szelektív $\alpha 7$ -nAChR ligandok meglehetősen alacsony dózisainak hatékonyságára idős patkányokban.

5.6. Konklúzió

Összefoglalva, jelen tanulmányban megerősítettük a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti előnyös interakciókat mind farmakológiailag indukált mind természetesen idős patkány modellekben. Ez utóbbiról bizonyítottuk, hogy a humán NCD-ok jó validitású modelljei, ugyanis transzlációs szempontból releváns kognitív hanyatlás figyelhető meg náluk. Továbbá az idős állatok jelentőségét tovább erősíti, hogy molekuláris szinten is képesek jellegzetes, patológiás öregedéssel összefüggő változásokat reprodukálni (pl. neuroinflammatorikus markerek megnövekedett szintje és a sejtek neurotróf támogatásának csökkenése). A memantin és a PHA-543613, valamint a memantin és a PAM vegyület kombinációja sikeresen enyhítette mind a farmakológiailag (szkopolaminnal) indukált, mind az életkorral összefüggő kognitív hanyatlást, ezenfelül mindkét kombináció hatékonysága jobb volt, mint a megfelelő monokezelések hatékonysága. Eredményeink tovább erősítik az $\alpha 7$ -nAChR-ok kiemelkedő szerepét a kombinált kezelések kognitív serkentő hatásaiban. Az $\alpha 7$ -nAChR-okat célzó kombinált kezelések terápiás potenciálját az is alátámasztja, hogy a

receptorok expressziója az öregedés során erősen up-regulálódott, jól hozzáférhető kötőhelyeket biztosítva farmakológiai modulációjukhoz.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A javuló életkörülmények miatt az élettartam növekedésével folyamatosan emelkedik a különféle NCD-okban szenvedő betegek száma. Az öregedéssel összefüggő NCD-ok a tanulási és memória képességek súlyos leépülésével jellemezhetők, melyek jelentős mértékben rontják a betegek önellátásra való képességét. A NCD-ok kezelésére jelenleg alkalmazott gyógyszerek elsősorban tüneti kezelést nyújtanak és ezeket tekintve is csak mérsékelt előnyöket kínálnak. Ennélfogva kiemelt fontosságú új, hatékonyabb terápiás stratégiák kifejlesztése, továbbá a pre-klinikai eredmények megfelelő transzlálhatósága érdekében, releváns, a NCD-okat jól utánzó állatmodellek beállítása. Az utóbbi időben számos tanulmány számolt be a kombinált terápiák hatékonyságáról, mivel a NCD-ok több patológiás aspektusát is képesek megcélolni és alacsonyabb dózisok alkalmazását teszik lehetővé a nemkívánatos mellékhatások elkerülésével.

A fenti célokat alapul véve jelen kutatásunkban egy, a NCD-ok kezelésére már jóváhagyott gyógyszer, a memantin és szelektív pro-kognitív hatású $\alpha 7$ -nAChR ligandok közötti kölcsönhatásokat teszteltünk le viselkedés szintjén a NCD-ok különféle patkány modelljeiben. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a szubeffektív dózisú $\alpha 7$ -nAChR ligandok (PHA-543613 vagy PAM) együtt adása a szubeffektív dózisú memantinnal erőteljesebb javulást eredményez-e a patkányok kognitív teljesítményében, mint a vegyületek önmagukban való alkalmazása. Első tanulmányunkban a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR agonista PHA-543613 közötti kölcsönhatást vizsgáltuk, melyhez szkopolaminnal indukált NCD patkány modellt alkalmaztunk. A kombinált kezelés kognitív serkentő hatását az epizodikus memória több komponensére is teszteltük MWM és T-labirintus alkalmazásával, beleértve a térbeli navigációt, a rövid-távú memóriát és a hosszú-távú memóriát. A második kísérletsorozatunkban idős patkányok NOR tesztben nyújtott diszkrimináló képességére vizsgáltuk a korábban már alkalmazott memantin-PHA-543613 kombinációs kezelést, valamint a memantin PAM vegyülettel való kombinálását. Végül PCR és ELISA teszt alkalmazásával vizsgáltuk a normál és a „patológiás” öregedéssel összefüggő, molekuláris szinten végbemenő expressziós változásokat patkányok memóriáért felelős agyterületein.

A magatartásfarmakológiai kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a memantin-PHA-543613 kombinációs kezelés sikeresen javította mind a patkányok rövid-távú mind a hosszú-távú memória funkcióit a szkopolaminnal szemben. A rövid-távú memóriát tekintve az egyes monokezelések szintén hatékonyak bizonyultak az MWM tesztben, azonban a szkopolamin okozta hosszú-távú memória deficitet kizárólag a kombinált kezelés volt képes

enyhíteni, meghaladva ezzel az egyes monokezelések hatásait. Második kísérletsorozatunkban az idős patkányok jelentős kognitív hanyatlásáról számoltunk be. Azonban a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR-okat serkentő vegyületek (PHA-543613, vagy PAM) kombinációi ebben az esetben is sikeresen enyhítették a patkányok öregedéssel összefüggő memóriaromlását, szemben a monokezelésekkel.

A post mortem vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az idős állatoknál patológiás jellegű változások is megfigyelhetők. Mind a normál memória teljesítményű mind a memória deficités idős állatok jelentős up-regulációt mutattak bizonyos gyulladási markereket tekintve (IL-1 β és a MIP-1 α). A neurotróf támogatást tekintve viszont nagy mértékű csökkenés volt megfigyelhető náluk, különösen a memória deficités idős állatoknál. Ezen kívül az $\alpha 7$ -nAChR-ok öregedéssel összefüggő expressziós változásairól is beszámoltunk.

Eredményeink pozitív kölcsönhatást jeleznek a memantin és az $\alpha 7$ -nAChR-okra ható agonisták és PAM vegyületek között, melyet a NCD-ok farmakológiai és természetesen idős patkánymodelljeiben is kimutattunk, megerősítve azt a hipotézist, miszerint az $\alpha 7$ -nAChR-ok kiemelkedő szerepet játszanak a kombinált kezelések jótékony hatásaiban. Továbbá bizonyítottuk, hogy az idős állatok nagy transzlációs potenciállal rendelkeznek, ugyanis a nagymértékű memória hanyatláson kívül a NCD-okra jellemző patológiás változásokat is képesek modellezni, beleértve az agy megnövekedett gyulladási állapotát, a neurotróf támogatás csökkenését, vagy az $\alpha 7$ -nAChR-ok expressziós változásait, releváns adatokat szolgáltatva ezzel az $\alpha 7$ -nAChR-okat célzó gyógyszer kölcsönhatásokról és kiindulási alapját képezhetik további pre-klinikai gyógyszerfejlesztési programoknak.

7. SUMMARY

Aging-related neurocognitive disorders (NCDs) poses a serious public health problem worldwide. These age-related disorders are characterized by progressive neuronal dysfunction and marked deterioration of cognitive abilities and daily living. Currently, the non-competitive NMDA receptor antagonist memantine and different cholinesterase inhibitors (e.g., donepezil) can be offered as therapeutic options for patients with NCDs, however, several clinical observations indicate that these medications may provide only moderate and transient symptomatic benefits with very limited or no disease-modifying potential. Therefore, development of new treatment strategies is still an unmet medical need and the discovery of new avenues for the treatment of NCDs would be crucial in the field. Combination therapies may be highly promising novel approaches in the treatment of age-related NCDs, since the co-application of pharmacological agents with different mechanisms of action may result in a superadditive (synergistic) increase in efficacy and/or enables the use of lower doses, while achieving the same effectiveness with less possible side-effects.

In the present series of experiments, we tested the interactions between memantine, an already approved drug for the treatment of NCDs and selective $\alpha 7$ -nAChR ligands at behavioral level in different rat models of NCDs. In our first study, we investigated the interaction between memantine and the $\alpha 7$ -nAChR agonist PHA-543613 in a scopolamine-induced NCD rat model. We tested the cognitive enhancer effect of the combined treatment on several components of episodic memory (including spatial navigation, short-term memory, and long-term memory) using MWM and T-mazes spontaneous paradigm. In the second study, we examined the previously used memantine-PHA-543613 combination treatment, as well as the combination of memantine with the PAM compound on discriminating ability of aged rats using the NOR paradigm. Finally, we investigated the expression of various inflammatory markers at molecular level related to normal and "pathological" aging in the brain areas responsible for memory functions. The results of our behavioral experiments show that the memantine-PHA-543613 combination treatment successfully improved both the short-term and long-term memory functions of rats compared to scopolamine. The mono-treatments also proved to be effective in terms of short-term memory in the MWM test. However, the long-term memory deficit caused by scopolamine was only alleviated by the combined treatment by exceeding the null effects of the corresponding subtherapeutic levels of monotreatments. In the second study we reported a significant cognitive decline in old rats. However, combinations of memantine and $\alpha 7$ -nAChR compounds (PHA-543613, or PAM) successfully alleviated aging-related

memory impairment in rats, compared to monotreatments. The results of post-mortem examinations showed that pathological changes can also be observed in old animals. Both memory impaired and unimpaired aged animals showed a significant up-regulation of certain inflammatory markers (IL-1 β and MIP-1 α). The opposite direction of change was observed in terms of neurotrophic support during aging. In addition, we also reported the aging-related expression changes of α 7-nAChRs.

In conclusion, in the present study, we confirmed the beneficial interaction between memantine and α 7 nAChR acting agents in both pharmacological induced and naturally aged rat models. Aged rats demonstrating a translationally more relevant cognitive improvement that might be a target for future procognitive therapy. The relevance of naturally aged rats for modeling human NCDs was also demonstrated by the animals showing characteristic neuropathological changes also at the molecular level, such as elevated levels of neuroinflammatory markers and decreased levels of neurotrophic support to the cells. Combination treatment with memantine and PHA-543613 or memantine and CompoundX successfully alleviated the age-related cognitive decline, moreover efficacy of both combinations was superior over the corresponding monotreatments. Based on our results, we further hypothesize a prominent role of α 7 nAChR in the cognitive enhancer effects of the combination treatments in clinical conditions with cognitive decline in older ages. Therapeutic potential of combination treatments that are based on pharmacological interactions on the α 7 nAChRs is also supported by the finding that expression of the receptors may become highly upregulated in aging, thus, providing well-accessible binding sites for their pharmacological modulation.

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Ahmad MA, Kareem O, Khushtar M, et al (2022) Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia. *Int J Mol Sci* 23:. <https://doi.org/10.3390/ijms23020616>
- Alzarea S, Rahman S (2019) Alpha-7 nicotinic receptor allosteric modulator PNU120596 prevents lipopolysaccharide-induced anxiety, cognitive deficit and depression-like behaviors in mice. *Behav Brain Res* 366:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.019>
- Apostolova GL (2016) Alzheimer-disease. *Continuum* 22:419–434. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000307>
- Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX (2005) Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1195–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.077172>
- Askvig JM, Watt JA (2019) Absence of axonal sprouting following unilateral lesion in 125-day-old rat supraoptic nucleus may be due to age-dependent decrease in protein levels of ciliary neurotrophic factor receptor alpha. *J Comp Neurol* 527:2291–2301. <https://doi.org/10.1002/cne.24675>
- Bali ZK, Inkeller J, Csurgyók R, et al (2015) Differential effects of α 7 nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav Brain Res* 278:404–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.030>
- Bali ZK, Nagy LV, Budai D, Hernádi I (2019) Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo. *Sci Rep* 9:9324. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45796-7>
- Banerjee P, Samoriski G, Gupta S (2005) Comments on “Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons.” *Exp, J Pharmacol* 313:928–929. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.081976.activation>
- Bartus RT, 3rd DR, B B, AS. L (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* (80-.). 217:408–417
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R (2016) Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. *J Exp Neurosci* 10(Suppl 1:23–48. <https://doi.org/10.4137/JEN.S39887>
- Bellinger FP, Madamba S, Siggins R (1993) Interleukin 1beta inhibits synaptic strength and LTP in the rat CA1 hippocampus. *Brain Res* 628:227–234. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90959-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90959-Q)
- Burger C, Cecilia López M, Feller JA, et al (2007) Changes in transcription within the CA1 field of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Learn Mem* 87:21–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.05.003>
- Burghaus L, Schütz U, Krempel U, et al (2000) Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Mol Brain*

Res 76:385–388. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00031-0)

- Burke DA, Heshmati P, Ehsan K, Edward LD (2014) Decreasing nicotinic receptor activity and the spatial learning impairment caused by the NMDA glutamate antagonist dizocilpine in rats. *Eur J Pharmacol* 741:132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.030>.
- Busquet P, Capurro V, Cavalli A, et al (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>
- Casares N, Alfaro M, Cuadrado-Tejedor M, et al (2023) Improvement of cognitive function in wild-type and Alzheimer's disease mouse models by the immunomodulatory properties of menthol inhalation or by depletion of T regulatory cells. *Front Immunol* 14:1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1130044>
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Disease-a-Month* 56:484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
- Chen KS, Masliah E, Mallory M, Gage FH (1995) Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience* 68:19–27. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00099-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00099-5)
- Chen R, Chan PT, Chu H, et al (2017) Treatment effects between monotherapy of donepezil versus combination with memantine for Alzheimer disease: A meta-analysis. *PLoS One* 12:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183586>
- Cheng Q, Yakel JL (2015) The effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochem Pharmacol* 97:439–444. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.015>
- Conejero-Goldberg C, Davies P, Ulloa L (2008) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: A link between inflammation and neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev* 32:693–706. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.10.007>
- Deardorff WJ, Feen E, Grossberg GT (2015) The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. *Drugs and Aging* 32:537–547. <https://doi.org/10.1007/s40266-015-0273-x>
- Deardorff WJ, Grossberg GT (2016) A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther* 10:3267–3279. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>.
- Decker MW, Gill TM, McGaugh JL (1990) Concurrent muscarinic and β -adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance. *Brain Res* 513:81–85. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91091-T](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91091-T)
- Dineley K, Westerman M, Bui D, et al (2001) β -amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 21:4125–4133. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04125.2001>
- Dineley KT, Xia X, Bui D, et al (2002) Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem* 277:22768–22780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200164200>

- Dong J, Zhou M, Wu X, et al (2012) Memantine combined with environmental enrichment improves spatial memory and alleviates Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated prone-8 (SAMP8) mice. *J Biomed Res* 26:439–447. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120053>
- Drever BD, Riedel G, Platt B (2011) The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 221:505–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.037>
- Dumas AJ, Paul NA (2011) The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacol Biochem Res* 99:254–261. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.02.022>.
- Egea J, Buendia I, Parada E, et al (2015) Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol* 97:463–472. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.032>
- Emerich DF, Winn SR, Harper J, et al (1994) Implants of polymer-encapsulated human NGF-secreting cells in the nonhuman primate: Rescue and sprouting of degenerating cholinergic basal forebrain neurons. *J Comp Neurol* 349:148–164. <https://doi.org/10.1002/cne.903490110>
- Fan L, Mao C, Hu X, et al (2020) New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Neurol* 10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01312>
- Ferchmin PA, Perez D, Eterovic VA, de Vellis J (2003) Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1071–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.048173>
- Ferrer-Acosta Y, Rodriguez-Massó S, Pérez D, et al (2022) Memantine has a nicotinic neuroprotective pathway in acute hippocampal slices after an NMDA insult. *Toxicol Vitr* 84:105453. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105453>
- Folstein FM, Folstein SE, McHugh RP (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Psychiatr Res* 12:189–198. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
- Foucault-Fruchard L, Doméné A, Page G, et al (2017) Neuroprotective effect of the $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model. *Neuroscience* 356:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.019>
- Garcia P, Youssef I, Utvik JK, et al (2010) Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:7516–7527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4182-09.2010>
- Gibertini M, Newton C, Friedman H, Klein T (1995) Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain Behav Immun* 9:113–128. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1012>
- Gomez-Varela D, Berg DK (2013) Lateral mobility of presynaptic $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors and its relevance for glutamate release. *J Neurosci* 33:17062–17071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1482-13.2013>
- Gonzales MM, Garbarino VR, Pollet E, et al (2022) Biological aging processes underlying cognitive decline and neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 132:1–10. <https://doi.org/10.1172/JCI158453>

- Griffin WST, Stanley LC, Ling C, et al (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7611–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7611>
- Haass C, Selkoe D (2022) If amyloid drives Alzheimer disease, why have anti-amyloid therapies not yet slowed cognitive decline? *PLoS Biol* 20:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001694>
- Hadar R, Edemann-Callesen H, Hlusicka EB, et al (2019) Recurrent stress across life may improve cognitive performance in individual rats, suggesting the induction of resilience. *Transl Psychiatry* 9:185. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0523-5>
- Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8:145–158. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90116-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90116-U)
- Hahn B, Shoaib M, Stolerman IP (2011) Selective nicotinic receptor antagonists: Effects on attention and nicotine-induced attentional enhancement. *Psychopharmacology (Berl)* 217:75–82. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2258-8>
- Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL (2013) Normal cognitive aging. *Clin Geriatr Med* 29:737–752. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.002>
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656–670. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001957>
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Lancet Neurol* 14:388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hernandez CM, Kaye R, Zheng H, et al (2010) Loss of $\alpha 7$ nicotinic receptors enhances β -amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer’s disease. *J Neurosci* 30:2442–2453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5038-09.2010>
- Hou Y, Dan X, Babbar M, et al (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15:565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Italiani P, Puxeddu I, Napoletano S, et al (2018) Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer’s disease: New markers of disease progression? *J Neuroinflammation* 15:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1376-1>
- Jackisch R, Förster S, Kammerer M, et al (2009) Inhibitory potency of choline esterase inhibitors on acetylcholine release and choline esterase activity in fresh specimens of human and rat neocortex. *J Alzheimer’s Dis* 16:635–647. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1008>
- Joe E, Ringman JM (2019) Cognitive symptoms of Alzheimer’s disease: Clinical management and prevention. *BMJ* 367:1–14. <https://doi.org/10.1136/bmj.l6217>
- Jones IW, Wonnacott S (2004) Precise localization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 24:11244–11252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004>
- Kihara T, Shimohama S (2004) Alzheimer’s disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:99–105

- Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, et al (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* 4:575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kirsch M, Hofmann H (1994) Expression of ciliary neurotrophic factor receptor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. *Neurosci Lett* 180:163–166. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90512-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90512-6)
- Knorz AL, Quante A (2021) Alzheimer's Disease: efficacy of mono- and combination therapy. A systematic review. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 35:475–486. <https://doi.org/10.1177/08919887211044746>
- Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Nauta HJW, et al (1991) Human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates. *Ann Neurol* 30:831–840. <https://doi.org/10.1002/ana.410300613>
- Koola MM, Nikiforuk A, Pillai A, Parsaik AK (2018) Galantamine-memantine combination superior to donepezil- memantine combination in Alzheimer ' s disease : critical dissection with an emphasis on kynurenic acid and mismatch negativity. *J Geriatr Care Res* 5:57–67
- Lanctôt KL, Rajaram RD, Herrmann N (2009) Therapy for Alzheimer's disease: How effective are current treatments? *Ther Adv Neurol Disord* 2:163–180. <https://doi.org/10.1177/1756285609102724>
- Lendvai B, Vizi ES (2008) Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol Rev* 88:333–349. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2006>
- Levin ED, Felix R (1997) Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience* 81:1009–1017. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00224-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00224-8)
- Lombardo S, Maskos U (2015) Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* 96:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.018>
- Long LH, Liu RL, Wang F, et al (2009) Age-related synaptic changes in the ca1 stratum radiatum and spatial learning impairment in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:675–681. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05132.x>
- Lynch MA (2015) Neuroinflammatory changes negatively impact on LTP: A focus on IL-1 β . *Brain Res* 1621:197–204. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.040>
- Ma KG, Qian YH (2019) Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 73:96–106. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.12.003>
- Majer R, Simon V, Csiba L, et al (2019) Behavioural and psychological symptoms in neurocognitive disorders: Specific patterns in dementia subtypes. *Open Med* 14:307–316. <https://doi.org/10.1515/med-2019-0028>
- Marchi M, Grilli M (2010) Presynaptic nicotinic receptors modulating neurotransmitter release in the Central Nervous System: Functional interactions with other coexisting receptors. *Prog Neurobiol* 92:105–111. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.06.004>

- Marciniak E, Faivre E, Dutar P, et al (2015) The Chemokine MIP-1 α /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory. *Sci Rep* 5:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15862>
- Markowska A, Koliatsos V, Breckler S, et al (1994) Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not in young rats. *J Neuroscience* 14:4815–4824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04815.1994>
- Marucci G, Buccioni M, Ben DD, et al (2021) Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 190:108352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>
- Maskell PD, Speder P, Newberry NR, Bermudez I (2003) Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by open channel blockers of N-methyl-D-aspartate receptors. *Br J Pharmacol* 140:1313–1319. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705559>
- Maurer S V., Williams CL (2017) The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. *Front Immunol* 8:1489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>
- McDonald WM (2017) Overview of neurocognitive disorders. *Focus (Madison)* 15:4–12. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.20160030>
- McKay BE, Placzek AN, Dani JA (2007) Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74:1120–1133. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.001>
- Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, et al (2013) Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci* 7:1–15. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>
- Mercado NM, Collier TJ, Sortwell CE, Steece-Collier K (2018) BDNF in the aged brain: translational implications for Parkinson's Disease. *Physiol Behav* 176:1570–1573. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>
- Mimica N, Presečki P (2009) Side effects of approved antidementives. *Psychiatr Danub* 21(1):108–13. PMID: 19270633.
- Mitchell AJ, Shiri-Feshki M (2009) Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia - Meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatr Scand* 119:252–265. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2008.01326.x>
- Morris GP, Clark IA, Vissel B (2014) Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun* 2:1–21. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0135-5>
- Murman DL (2015) The impact of age on cognition. *Semin Hear* 36:111–121. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555115>
- Nikiforuk A, Kos T, Potasiewicz A, Popik P (2015) Positive allosteric modulation of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors enhances recognition memory and cognitive flexibility in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:1300–1313. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.04.018>
- Nikiforuk A, Potasiewicz A, Kos T, Popik P (2016) The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the $\alpha 7$ nicotinic

- acetylcholine and NMDA receptors. *Behav Brain Res* 313:214–218.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.023>
- Nordberg A (2001) Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's Disease: Therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 49:200–210. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01125-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01125-2)
- Norden DM, Godbout JP (2014) Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *NeuroPathol Appl Neurobiol* 39:19–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>.Microglia
- Oitzl MS, van Oers H, Schöbitz B, Ron de Kloet E (1993) Interleukin-1 β , but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Res* 613:160–163.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90468-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90468-3)
- Ownby RL (2010) Neuroinflammation and cognitive aging. *Curr Psychiatry Rep* 12:39–45.
<https://doi.org/10.1007/s11920-009-0082-1>
- Parsons CG, 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>
- Parsons CG, Sto A, Danysz W (2007) Memantine : a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad , too much is even worse. *Neuropharmacology* 53:699–723.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>
- Patterson SL (2015) Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 96:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.020>
- Pepeu G, Giovannini MG (2010) Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact* 187:403–408. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.018>
- Perkins AE, Piazza MK, Vore AS, et al (2021) Assessment of neuroinflammation in the aging hippocampus using large-molecule microdialysis: Sex differences and role of purinergic receptors. *Brain Behav Immun* 91:546–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.013>
- Perry EK, Johnson M, Kerwin JM, et al (1992) Convergent cholinergic activities in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13:393–400. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90113-C](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90113-C)
- Pohanka M (2012) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int J Mol Sci* 13:2219–2238
- Porcher L, Bruckmeier S, Burbano SD, et al (2021) Aging triggers an upregulation of a multitude of cytokines in the male and especially the female rodent hippocampus but more discrete changes in other brain regions. *J Neuroinflammation* 18:1–19.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02252-6>
- Potasiewicz A, Krawczyk M, Gzielo K, et al (2020) Positive allosteric modulators of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors enhance procognitive effects of conventional anti-Alzheimer drugs in scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res* 385:112547.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112547>
- Rammes G, Parsons C, Danysz W (2008) Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr*

- Neuropharmacol 6:55–78. <https://doi.org/10.2174/157015908783769671>
- Ren JM, Zhang SL, Wang XL, et al (2020) Expression levels of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in the brains of patients with Alzheimer's disease and their effect on synaptic proteins in SH-SY5Y cells. *Mol Med Rep* 22:2063–2075. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11253>
- Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, Verkhratsky A (2003) A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol* 144:61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.030>
- Sachdev PS, Blacker D, Blazer DG, et al (2014) Classifying neurocognitive disorders: The DSM-5 approach. *Nat Rev Neurol* 10:634–642. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.181>
- Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Mahmoudi J, et al (2015) Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by PHA-543613 improves A β 25-35-mediated cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 298:81–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.017>
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Standridge JB (2004) Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther* 26:615–630. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(04\)90064-1](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(04)90064-1)
- Stone TW (2021) Relationships and interactions between ionotropic glutamate receptors and nicotinic receptors in the CNS. *Neuroscience* 468:321–365. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.007>
- Swainson R, Hodges J, Galton C, et al (2001) Early detection and differential diagnosis of Alzheimer's Disease and depression with neuropsychological tasks. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12:265–280. <https://doi.org/10.1159/000051269>
- Terry AV, Buccafusco JJ (2003) The Cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's Disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug Development. *J Pharmacol Exp Ther* 306:821–827. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>
- Terry A V., Callahan PM (2020) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets in schizophrenia: Update on animal and clinical studies and strategies for the future. *Neuropharmacology* 170:108053. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108053>
- Toyohara J, Hashimoto K (2010) $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists: potential therapeutic drugs for treatment of cognitive impairments in Schizophrenia and Alzheimer's Disease~!2009-10-15~!2009-10-30~!2010-05-27~! *Open Med Chem J* 4:37–56. <https://doi.org/10.2174/1874104501004020037>
- Tsoi KKF, Chan JYC, Leung NWY, et al (2016) Combination therapy showed limited superiority over monotherapy for Alzheimer Disease: a meta-analysis of 14 randomized trials. *J Am Med Dir Assoc* 17:863.e1-863.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.05.015>
- Turner TJ (2004) Nicotine enhancement of dopamine release by a calcium-dependent increase in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci* 24:11328–11336. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1559-04.2004>

- Tuszynski MH (2000) Intraparenchymal NGF infusions rescue degenerating cholinergic neurons. *Cell Transplant* 9:629–636. <https://doi.org/10.1177/096368970000900508>
- UN-WPP (2019) World population prospects 2019
https://population.un.org/wpp/publications/files/wpp2019_highlights.pdf
- van Goethem NP, Paes D, Puzzo D, et al (2019) Antagonizing $\alpha 7$ nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition. *Cell Signal* 62:109338. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.003>
- Valis M, Herman D, Vanova N, et al (2019) The concentration of memantine in the cerebrospinal fluid of Alzheimer’s disease patients and its consequence to oxidative stress biomarkers. *Front Pharmacol* 10:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00943>
- Vaz M, Silvestre S (2020) Alzheimer’s disease: Recent treatment strategies. *Eur J Pharmacol* 887:173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Vorhees CV, Williams MT (2010) 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>
- Wallace TL, Porter RHP (2011) Targeting the nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. In: *Biochemical Pharmacology*. pp 891–903
- Wang HY, Li W, Benedetti NJ, Lee DHS (2003) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors mediate B-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 278:31547–31553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212532200>
- Wenk GL, Danysz W, Mobley SL (1995) MK-801, memantine and amantadine show neuroprotective activity in the nucleus basalis magnocellularis. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol* 293:267–270. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)00028-3)
- Wevers A, Burghaus L, Moser N, et al (2000) Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer’s disease: Postmortem investigations and experimental approaches. *Behav Brain Res* 113:207–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00215-1)
- Wise LE, Lichtman AH (2007) The uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial arm maze memory task. *Eur J Pharmacol* 575:98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.059>
- Wishka D, Walker D, Yates K, Reitz S (2006) Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure–activity relationsh. *J Med Chem* 49:4425. <https://doi.org/10.1021/jm0602413>
- Wojcieszak J, Kuczyńska K, Zawilska JB (2022) Role of chemokines in the development and progression of Alzheimer’s Disease. *J Mol Neurosci* 72:1929–1951.
<https://doi.org/10.1007/s12031-022-02047-1>
- Woodruff-Pak DS, Tobia MJ, Jiao X, et al (2007) Preclinical investigation of the functional effects of memantine and memantine combined with galantamine or donepezil. *Neuropsychopharmacology* 32:1284–1294. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301259>
- Wu SY, Pan BS, Tsai SF, et al (2020) BDNF reverses aging-related microglial activation. *J Neuroinflammation* 17:1–18. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01887-1>
- Yamin G (2009) NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid β -

protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 87:1729–1736.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21998>

Yang T, Xiao T, Sun Q, Wang K (2017) The current agonists and positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharm Sin B* 7:611–622. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.001>

Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG (2020) Current and future treatments in Alzheimer Disease: an update. *J Cent Nerv Syst Dis* 12:1–12.
<https://doi.org/10.1177/1179573520907397>

Zhao X, Marszalec W, Toth PT, et al (2006) In vitro galantamine-memantine co-application: Mechanism of beneficial action. *Neuropharmacology* 51:1181–1191.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.08.007>

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Hernádi Istvánnak, aki a PhD éveim alatt végig támogatta szakmai fejlődésemet, továbbá hasznos tanácsaival járult hozzá a kutatómunkám előremeneteléhez.

Köszönet illeti Dr. Bali Zsolt Kristófot a statisztikai analízisekben, eredményeim publikálásában nyújtott segítségéért, valamint a rengeteg szakmai támogatásáért.

Továbbá köszönettel tartozom a Transzlációs Idegtudományi Kutatócsoport valamennyi munkatársának, akik valamilyen módon hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat létrejöhessen. Szeretném kiemelni a kutatócsoportunk tagjai közül barátnőmet Dr. Nagy Lili Veronikát, akinek végtelenül hálás vagyok a kísérleteim lebonyolításában nyújtott rengeteg segítségéért, továbbá a sok lelki támogatásáért, amit az évek során kaptam tőle.

Köszönet illeti még az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársait, Dr. Engelmann Pétert és Bodó Kornéliát, akik a biokémiai vizsgálatokban voltak segítségünkre.

Köszönöm Deák Gergőnek és Schmelczer Kittinek, akik nagy odafigyeléssel és precizitással gondozták állatainkat, lehetővé téve ezáltal a kísérleteink eredményes lebonyolítását.

Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Nyrt.-nek, hogy kutatásainkhoz biztosította az általuk fejlesztett $\alpha 7$ -nAChR-okra ható PAM vegyületet.

Továbbá köszönet illeti a Richter Gedeon Nyrt. által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítványt (székhely: 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.), mert a PhD dolgozat és annak keretében ismertetett tudományos eredményeink részben a Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával, „Richter Gedeon kiválósági PhD Ösztöndíj” keretében készültek.

Nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak a tanulmányaimhoz adott támogatásukért.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

Bruszt, N., Bali, Zs. K., Nagy, L. V., Bodó, K., Engelmann, P., Némethy, Zs., Lendvai B., Hernádi, I. Combination of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation exerts superior efficacy over monotreatments to improve cognitive performance of aged rats (Benyújtás alatt)

Bruszt, N., Bali, Z. K., Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2021). Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer's disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task. *Psychopharmacology*, 238(11), 3273–3281. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05942-4> **Q1, IF: 3,4**

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Csurgyók, R., Nagy, L. V., Tompa, M., Hernádi, I. (2019). Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 73. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00073> **Q1, IF:5,988**

Értekezéshez kapcsolódó konferencia közlemények:

Bruszt, N., Bali, Z. K., Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Kolozsvári, Á., Engelmann, P., Bodó, K., Hernádi, I. (2023). Combinations of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligands exert superior efficacy over monotreatments in the improvement of cognitive performance of aged rats. Joint Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT) - Austrian Neuroscience Association (ANA), Budapest, Magyarország

Bruszt, N., Bali, Z. K., Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2022). Combined application of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 improves novel object recognition memory in aged rats. International Neuroscience Meeting, Budapest, Magyarország

Bruszt, N., Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2019). Combination of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 improves spatial long term memory in scopolamine induced amnesia in rats. 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Prága, Csehország

Egyéb publikációk:

Bali, Z. K., Nagy, L. V., **Bruszt, N.**, Bodó, K., Engelmann, P., Hernádi, Zs., Göntér, K., Tadepalli, S. A., Hernádi, I., Increased brain cytokine level associated impairment of vigilance and memory in aged rats can be improved by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment (2023) *Geroscience*, Nov 23. doi: 10.1007/s11357-023-01019-6 **Q1, IF: 5,6**

Bali, Z.K., **Bruszt, N.**, Kőszegi, Z., Nagy, L.V., Atlasz, T., Kovács, P., Csupor, D., Csupor-Löffler, B., Hernádi, I. *Aconitum* Alkaloid Songorine Exerts Potent Gamma-Aminobutyric Acid-A Receptor Agonist Action In Vivo and Effectively Decreases Anxiety without Adverse Sedative or Psychomotor Effects in the Rat. (2022) *Pharmaceutics*. Sep 28;14(10):2067. doi: 10.3390/pharmaceutics14102067 **Q1, IF: 5,8**

Tadepalli, S.A., Bali, Z.K., **Bruszt, N.**, Nagy, L.V., Amrein, K., Fazekas, B., Büki, A., Czeiter, E., Hernádi, I. Long-term cognitive impairment without diffuse axonal injury following repetitive mild traumatic brain injury in rats. (2020) *Behav Brain Res*. Jan 27;378:112268. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112268 **Q1, IF: 2,95**

Nagy, S.A., Vranesics, A., Varga Zs., Csabai, D., **Bruszt, N.**, Bali, Z. K., Perlaki, G., Hernadi, I., Berente, Z., Miseta, A., Doczi, T., Czeh, B. (2020). Stress-induced microstructural alterations correlate with the cognitive performance of rats: A longitudinal in vivo diffusion tensor imaging study. *Frontiers in Neuroscience*, doi: 10.3389/fnins.2020.00474 **Q1, IF: 4,3**

Bali, Z.K., Inkeller, J., Csurgyók, R., **Bruszt, N.**, Horváth, H., Hernádi, I. (2015) Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav Brain Res* 278:404-10. doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.030 **Q1, IF: 2,95**

Egyéb konferencia közlemények:

Kolozsvári, Á., Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Fazekas, B., Amrein, K., Czeiter, E., Büki, A., Hernádi, I. (2023): Alleviation of longterm cognitive impairment with memantine combined with alfa7 nicotinic receptor ligand after repetitive mild traumatic brain injury in rats. Joint Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT) - Austrian Neuroscience Association (ANA), Budapest, Magyarország

Kolozsvári, Á., Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Fazekas, B., Amrein, K., Czeiter, E., Büki, A., Hernádi, I. (2022). Kognitív teljesítményfokozó farmakonok hosszútávú hatásai ismétlődő enyhe koponyatraumával kiváltott kognitív zavarban. Gyógyszerkutatás, Innováció és Farmakokinetika Konferencia - Annual Congress of Pharmacology Research and Innovation, Mátrafüred, Magyarország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Kolozsvári, Á., Fazekas, B., Nagy, L. V., Tadepalli, S. A., Amrein, K., Czeiter, E., Büki, A., Hernádi, I. (2022). Cognitive enhancer effects of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in a rat model of repetitive mild traumatic brain injury during acute and subchronic treatment regimes. International Neuroscience Meeting, Budapest, Magyarország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Tadepalli, S. A., Amrein, K., Fazekas, B., Czeiter, E., Büki, A., Tölgyesi, V., Bodó, K., Hernádi, I. (2020). Translational Potential of Two Etiologically Relevant Rat Models of Neurocognitive Disorders: Behavioral, Histopathological and Molecular Aspects. *Advances in Alzheimer's and Parkinson's Therapies - an AAT-AD/PD Focus Meeting*, Bécs, Ausztria

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Göntér, K., Nagy, L. V., Hernádi, Z., Hernádi I. (2019). Pszichomotoros vigilancia teszt patkányokban: egy nagy transzlációs potenciállal rendelkező magatartási paradigma öregedéssel járó kognitív hanyatlás és farmakológiai kezelések vizsgálatára. Magyar Kísérleti és Klinikai Farmakológiai Társaság III. Gyógyszer Innovációs Kongresszusa, Gárdony, Magyarország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Bodó, K., Engelmann, P., Göntér, K., Hernádi, Z., Hernádi I. (2019). The Psychomotor Vigilance Task (PVT) Provides a Highly Translational Behavioral Paradigm for Testing Cognitive Impairment and Cholinergic Pharmacological Interventions In Young and Aged Rats. FENS Regional Meeting, Belgrád, Szerbia

Bruszt, N., Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2019). Kognitív teljesítményfokozó farmakológiai kezelések kombinált alkalmazásának lehetőségei preklinikai kísérleti környezetben patkányokban. Magyar Kísérleti és Klinikai Farmakológiai Társaság III. Gyógyszer Innovációs Kongresszusa, Gárdony, Magyarország

Bruszt, N., Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., Göntér, K., Strijk, M., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2019). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 improves long-term memory and attention in aged rats. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, Magyarország

Tadepalli, S. A., **Bruszt, N.**, Bali, Z. K., Nagy, L. V., Czeiter, E., Amrein, K., Fazekas, B., Büki, A., Hernádi, I. (2019). Repetitive mild traumatic brain injury causes long-term cognitive impairment in rats. 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Prága, Csehország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Tompa, M., Csurgyók, R., Klepe, A., Hernádi, I. (2018). Cognitive enhancer effects of NMDA antagonist memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in a scopolamine-induced dementia model in rats. Alzheimer's Research UK Conference, London, Egyesült Királyság

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Hernádi, I. (2018). Idős patkányok tárgyfelismerési és térbeli memóriazavarának enyhítése alfa7 nikotinos receptor agonista alkalmazásával. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) Gyógyszer Innovációs Konferenciája, Velence, Magyarország

Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Czeiter, E., Amrein, K., Fazekas, B., Büki, A., Hernádi, I. (2018). Repetitive mild traumatic brain injury causes long-term cognitive impairment in rats. 23rd Annual EMN Congress (Euroacademia Multidisciplinaria Neurotraumatologica), Pécs, Magyarország

Tadepalli, S. A., Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Nagy, L. V., Czeiter, E., Amrein, K., Berente, Z., Büki, A., Hernádi, I. (2017). Evaluation of cognitive and memory dysfunction following mild traumatic brain injury in rats. 5th FENS Regional Meeting, Pécs, Magyarország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Tompa, M., Csurgyók, R., Klepe, A., Hernádi, I. (2017). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 improves novel object recognition memory and reverses age-related impairments in rats. 5th FENS Regional Meeting, Pécs, Magyarország

Bali, Z. K., **Bruszt, N.**, Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Tompa, M., Csurgyók, R., Klepe, A., Hernádi, I. (2017). Az alfa7 nikotinos acetilkolin-receptor agonista PHA-543613 kognitív teljesítményfokozó hatása patkányok új tárgy felismerési tesztjében. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Gyógyszerinnovációs Kongresszusa, Velence, Magyarország

Bruszt, N., Bali, Z. K., Tadepalli, S. A., Nagy, L. V., Tompa, M., Csurgyók, R., Klepe, A., Hernádi, I. (2017). Pro-cognitive effects of memantine are potentiated with alpha7-nAChR agonist PHA-543613 in a scopolamine-induced transient amnesia model in rats. 5th FENS Regional Meeting 2017 Pécs, Magyarország

Bruszt, N., Bali, Z. K., Nagy, L. V., Tadepalli, S. A., Tompa, M., Csurgyók, R., Balikó, V., Szántó, B., Hernádi, I. (2017). A memantin prokognitív hatása potencírozható alfa7 nikotinos acetilkolin-receptor agonista PHA-543613-mal szkopolaminnal létrehozott tranziens demencia modellben patkányban. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Gyógyszerinnovációs Kongresszusa, Velence, Magyarország

Bruszt, N., Bali, Z. K., Szántó, B., Munz, C., Nagy, L. V., Csurgyók, R., Balikó, V., Tompa, M., Hernádi, I. (2016). Memantin és PHA-543613 kombinált hatásának vizsgálata szkopolaminnal indukált patkány demencia modellben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája (FAMÉ), Pécs, Magyarország

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat				
Bruszt Nóra adatai (2024.03.02)				
Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások 1	
Tudományos közlemények	Összes	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	7	---	---	---
külföldi kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	7	58	72
külföldi kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként ²	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---

idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	<u>9</u>	---	---	---
idegen nyelvű	---	<u>4</u>	0	0
magyar nyelvű	---	<u>5</u>	0	0
Közlemények összesen (I.-IV.)	<u>16</u>	---	<u>58</u>	<u>72</u>
Absztrakt ³	<u>23</u>	---	0	0
Kutatási adat	0		0	0
További tudományos művek ⁴	<u>1</u>	---	0	0
Összes tudományos közlemény	<u>40</u>	---	<u>58</u>	<u>72</u>
Hirsch index ⁵	<u>5</u>	---	---	---
Oktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási tankönyv idegen nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
Oktatási anyag	0	---	0	0
Oltalmi formák	0	---	0	0
Alkotás	0	---	0	0

Ismeretterjesztő művek	0	---	---	---
Folyóiratcikk		0	0	0
Könyvek	---	0	0	0
További ismeretterjesztő művek	---	0	0	0
Közérdekű vagy nem besorolt művek ⁶	0	---	0	0
További közlemények ⁷	0		0	0
Egyéb szerzőség ⁸	0	---	0	0
Idézők szerkesztett művekre	---	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	---	---	<u>6</u>	<u>6</u>
Összes közlemény és összes idézők	<u>40</u>	---	<u>64</u>	<u>78</u>
Megjegyzések				
A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.				
--- : Nem kitölthető cella				
¹ A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb típusú idézők összesítve a táblázat végén található.				
² Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből				
³ Csak a tudományos jellegű absztraktok.				
⁴ Minden további még el nem számolt tudományos mű (kivéve alkotás vagy oltalmi forma), ahol a szerző: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.				
⁵ A disszertációk és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A sor értéke az "Összes tudományos közlemény" sor idézettségi adatait veszi alapul.				
⁶ Minden Közérdekű, Nem besorolt jellegű közlemény, ahol a szerző nem egyéb szerzőségű szerző.				
⁷ Ide értve minden olyan művet, mely a táblázat más, nevesített soraiban nem került összeszámlálásra.				
⁸ Minden olyan egyéb szerzőségű mű, ahol a szerző nem: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.				



Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats

Zsolt Kristóf Bali^{1,2,3}, Nóra Bruszt^{2,3}, Sai Ambika Tadepalli^{1,2}, Roland Csurgyók^{1,2}, Lili Veronika Nagy^{1,2}, Márton Tompa^{1,2} and István Hernádi^{1,2,3*}

¹ Department of Experimental Zoology and Neurobiology, Faculty of Sciences, University of Pécs, Pécs, Hungary, ² János Szentágothai Research Center, Center for Neuroscience, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³ Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Paul Newhouse,
Vanderbilt University, United States

Reviewed by:

Agneta Nordberg,
Karolinska Institute (KI), Sweden
Styliani Vlachou,
Dublin City University, Ireland
Jerri M. Rook,
Vanderbilt University, United States

*Correspondence:

István Hernádi
hernadi@ttk.pte.hu

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 07 August 2018

Accepted: 21 January 2019

Published: 05 February 2019

Citation:

Bali ZK, Bruszt N, Tadepalli SA, Csurgyók R, Nagy LV, Tompa M and Hernádi I (2019) Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. *Front. Pharmacol.* 10:73. doi: 10.3389/fphar.2019.00073

Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) play an important role in learning and memory and are promising targets for pharmacological cognitive enhancement. Memantine, an approved substance for Alzheimer's disease treatment, is an antagonist of the N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) and also acts as an alpha7 nAChR antagonist. Here, we tested the interaction between an alpha7 nAChR agonist (PHA-543613) and memantine. Efficacy of memantine, PHA-543613, and their co-administration were investigated on the spatial working memory of rats using the spontaneous alternation paradigm in T-maze. Scopolamine-induced transient amnesia was used to model cognitive impairment. First, the dose-response relationship was assessed for memantine, and its lowest effective dose was found to be 0.1 mg/kg. Then, co-administration treatments with subeffective doses of the alpha7 nAChR agonist PHA-543613 and different doses of memantine were tested. The co-administration of subeffective drug doses significantly improved memory performance of the rats and reversed scopolamine-induced deficits. Interestingly, a higher than effective (0.3 mg/kg) dose of memantine did not increase performance in monotreatment, only in co-administration with PHA-543613. However, the co-administration of PHA-543613 did not further increase the efficacy of the previously effective monotreatment doses of memantine. Thus, the efficacy of memantine monotreatment and its co-administration with PHA-543613 converged to create a common ceiling effect, with an additive interaction found in the behavioral effects. These results suggest that memantine and PHA-543613 may exert their cognitive enhancer effects on the same target, possibly on the alpha7 nAChRs. Results also suggest possible benefits of a combination therapy with memantine and alpha7 nAChR agonists.

Keywords: combination drug therapy, alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, memantine, spatial memory, scopolamine, behavior

INTRODUCTION

Globally, 24.3 million people suffer from dementia, with approximately 4.6 million new cases every year (Ferri et al., 2005). This has led to an increased global need in studying dementia, or cognitive impairment, and its underlying mechanisms. A major area of concern is development of effective pharmacological treatments that produce minimal or no adverse side effects.

Memantine, an uncompetitive antagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), is an approved drug in the treatment of Alzheimer's disease (AD). Memantine has also been found effective in enhancing memory performance in various animal models of dementia and different behavioral paradigms (Wise and Lichtman, 2007; Busquet et al., 2012; Schneider et al., 2013). Memantine is thought to block overstimulation of the NMDARs caused by amyloid-beta ($A\beta$) oligomers implicated in the pathogenesis of AD (Danysz and Parsons, 2012) without affecting physiological glutamatergic activity necessary for synaptic plasticity (Parsons et al., 1999). However, it was also observed to act on alpha7 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) as an antagonist, perhaps more potently than on NMDARs (Aracava et al., 2005).

Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists are another class of drugs that are emerging as potent treatments for neurocognitive disorders. A substantial body of evidence indicates the role of alpha7 nAChRs in cognitive performance and memory (Dani and Bertrand, 2007). Thus, they provide a suitable target for the treatment of AD and other neurocognitive disorders (Toyohara and Hashimoto, 2010). PHA-543613 is a selective alpha7 nAChR agonist, which reportedly alleviates amphetamine-induced auditory gating deficit and improves object recognition memory in rats (Wishka et al., 2006). It also appears to be effective in treating $A\beta_{25-35}$ -mediated cognitive deficits in mice (Sadigh-Eteghad et al., 2015). In addition, it ameliorates spatial working memory deficits induced by the muscarinic AChR antagonist scopolamine in rats (Bali et al., 2015).

While most of the therapeutic treatments available today involve a single cognitive enhancer agent, there is an increasing interest in developing combined treatments that involve two or more cognitive enhancers in otherwise subeffective or inactive doses. A fixed-dose combination of memantine and acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) donepezil has already been approved by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States. However, the same therapy has not been approved by the European Medicines Agency because of limited clinical evidence of its benefits over monotherapies with AChEIs or memantine (Deardorff and Grossberg, 2016). Combinations of memantine and donepezil also showed limited efficacy in preclinical animal models (Wise and Lichtman, 2007; Woodruff-Pak et al., 2007). However, galantamine, another AChEI also possessing affinity for an allosteric site of the alpha7 nAChR, exerted far better synergistic effects in co-administration with memantine in alleviating scopolamine-induced cognitive deficits in mice (Busquet et al., 2012). It has also been reported that alpha7 nAChR activity enhances glutamatergic signaling via NMDARs (Yang et al., 2013; Bali et al., 2017).

Based on the above findings, we hypothesized that various pharmacological interactions might occur between memantine and alpha7 nAChR agonists. Such interactions could also potentially result in an increased efficacy of combinational treatments on cognitive performance. Therefore, in the present study, our aim was to test the efficacy of co-administration treatments with the selective alpha7 nAChR agonist PHA-543613 and memantine on spatial working memory performance in the scopolamine-induced transient amnesia model in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twenty-four 7- to 12-month old male Long Evans (LE) rats (weighing 380–520 g) and eleven 4- to 7-month old male Wistar (W) rats (weighing 350–450 g) were used in the present study. Animals were obtained from Charles River Laboratories and were housed in pairs in individually ventilated cages under controlled conditions in the animal house of the Szentágotthai Research Centre, University of Pécs (12/12 h light/dark cycle, with controlled temperature and humidity). Rats were fed daily with 17 g of laboratory chow per animal per day (on experimental days only after they had been tested) throughout the experiments to ensure sufficient motivation for exploration in the testing apparatus. Water was available ad libitum. This study was carried out in accordance with the recommendations of Decree No. 40/2013. (II. 14.) of the Hungarian Government and EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs (Licence No. BA02/2000-25/2015).

T-maze Apparatus and Spontaneous Alternation Test Procedure

The T-maze apparatus was constructed according to Deacon and Rawlins (2006), and the dimensions were described in our previous study (Bali et al., 2015). The applied experimental protocol was based on the study of Spowart-Manning and van der Staay (2004) with some modifications made in our laboratory (Bali et al., 2015). The rat was placed in the start arm and after the opening of the guillotine door, he had to make a choice between the right and left goal arms. After exploring the goal arm and returning to the start arm, the rat was confined in the start arm for 10 s between two trials. Then, the trial was repeated. Each session lasted for a maximum of 25 min or a maximum of 15 consecutive trials. A session was considered invalid if fewer than nine trials were completed. Because of the within-subject statistical design, animals that had any invalid sessions, were excluded from the analysis of the entire experiment.

In each trial, we primarily recorded which goal arm was chosen by the rat. If the rat entered the opposite arm compared to the previous trial, the choice was considered a correct choice (alternation). Otherwise, it was considered an erroneous choice. Alternation rate was determined as the proportion of correct arm choices (alternations) and the total number of trials offered for alternation (a maximum of 14 if all 15 trials were run).

In addition, as secondary endpoints, average trial duration (time elapsed from door opening until returning to the starting position) and average choice latency (time elapsed from door opening until entering one of the goal arms) were determined to control for side effects of the pharmacological treatments not related to memory.

Drugs and Routes of Administration

Scopolamine hydrobromide (Tocris), PHA-543613 hydrochloride (Tocris), and memantine hydrochloride (Tocris) were dissolved in physiological saline to create a final injection volume of 1 ml/kg. Scopolamine was injected intraperitoneally (i.p.) 10 min before experimental sessions, and PHA-543613 and memantine were injected subcutaneously (s.c.) 40 min before experiments (30 min before scopolamine administration). In treatments, where scopolamine, memantine and/or PHA-543613 were not administered, compounds were replaced with saline (vehicle, VEH) injected through the corresponding route of administration. In co-administration treatments, memantine and PHA-543613 were administered consecutively in two separate subcutaneous injections performed on the opposite sides of the body.

Experimental Design

Experiments were designed to investigate possible pharmacological interactions between memantine and the alpha7 nAChR agonist PHA-543613 in their effect on spatial working memory. Therefore, subeffective, effective, and higher than effective doses of memantine were co-administered with subeffective doses of PHA-543613. The efficacy of the co-administration treatments was compared with that of monotreatments with memantine and PHA-543613. Efficacy of cognitive enhancer treatments were tested against transient amnesia induced by scopolamine (0.5 mg/kg).

The study consisted of two phases: (1) an experiment for the determination of subeffective and effective doses of memantine; and (2) a set of experiments testing the interactive effects of memantine and PHA-543613 at different doses.

The doses applied in the memantine efficacy test were chosen on the basis of preceding pilot experiments and were the following: 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, and 0.1 mg/kg. Subeffective doses of PHA-543613 were determined according to our previous study (Bali et al., 2015). Each experiment was preceded by 3–6 sessions for habituation and training without pharmacological treatment until rats achieved stable control performance in the spontaneous alternation task.

In the experiments testing co-administration of memantine and PHA-543613 (*Experiments 1–4*, **Table 1**), the following pharmacological treatments were applied: scopolamine alone (further referred to as Scop), memantine monotreatment in different doses followed by scopolamine (Mem[dose]), PHA monotreatment in subeffective doses followed by scopolamine (PHA[dose]), and co-administration treatment with memantine and PHA followed by scopolamine (Mem[dose]+PHA[dose]). All animals in a given experiment were subjected to each treatment. The treatments were applied in a counterbalanced (Latin square) design to achieve a fully randomized sequence of different treatments. The rat strains and doses applied in the experiments are listed in **Table 1**.

Data Analysis and Statistics

The control performance of every animal was determined as its average alternation rate during training sessions. In the analysis of experiments with pharmacological treatments, data of animals that performed above the predetermined 0.6 alternation rate after Scop treatment (i.e., showing no considerable memory impairment), were excluded from all treatments. Thus, the effects of memantine, PHA-543613 and their co-administration were only tested on animals with confirmed sensitivity to scopolamine. Statistical analyses were performed using the IBM SPSS 20.0 statistical program and MS Excel. Alternation rate, average trial duration, and average choice latency data were analyzed with repeated measures ANOVA. Following significant main effects of treatments, different treatments (Control, Mem, PHA, Mem+PHA) were compared with the scopolamine treatment using *post hoc* LSD test. Then, the *p*-values were corrected with Holm's method for multiple comparisons (Holm, 1979). Alternation rate after a given treatment was also compared to the chance level (0.5) using one-sample *t*-test with a one-tailed null hypothesis. An alternation rate significantly higher than the chance level indicated that rats showed normal alternating behavior and good memory performance after a given treatment. Effect size of treatments was estimated using eta squared (η^2) in ANOVA models, and Cohen's *d* for correlated samples (d_{rm}) in pairwise comparisons as calculated according to Lakens (2013).

Since initial data showed a marked difference between animals in their responsiveness to memantine (i.e., optimal dose varied), which also affected the effectiveness of co-administration treatments, we performed an additional pooled analysis of cases when memantine was not effective in monotreatment. Thus, subjects from all the experiments with an alternation performance of less than 0.6 after memantine monotreatment were included in the pooled analysis. With the pooled data, we

TABLE 1 | Summary of the rat strains and the doses of pharmacological compounds used in experiments performed for the evaluation of combined treatments with memantine and PHA-543613.

	Strain	Vehicle	Memantine (mg/kg)	PHA-543613 (mg/kg)	Scopolamine (mg/kg)
Experiment 1	Long Evans	Saline	0.003	0.1	0.5
Experiment 2	Long Evans	Saline	0.03	0.1	0.5
Experiment 3	Wistar	Saline	0.1	0.3	0.5
Experiment 4	Wistar	Saline	0.3	0.3	0.5

also performed an analysis to test whether memantine and PHA-543613 interacted in an additive or superadditive (synergistic) manner when used in co-administration (Bali et al., 2017). We calculated the sum of the memory enhancer effect of memantine and PHA-543613 monotreatments in comparison to the scopolamine alone treatment ([Mem]-[Scop] and [PHA]-[Scop], respectively) and compared it to the effect of their co-administration ([Mem+PHA]-[Scop]) using the paired samples *t*-test. In all statistical analyses, the level of significance was $p < 0.05$. All data used in the statistical analysis are available on Mendeley Data (Bali et al., 2018).

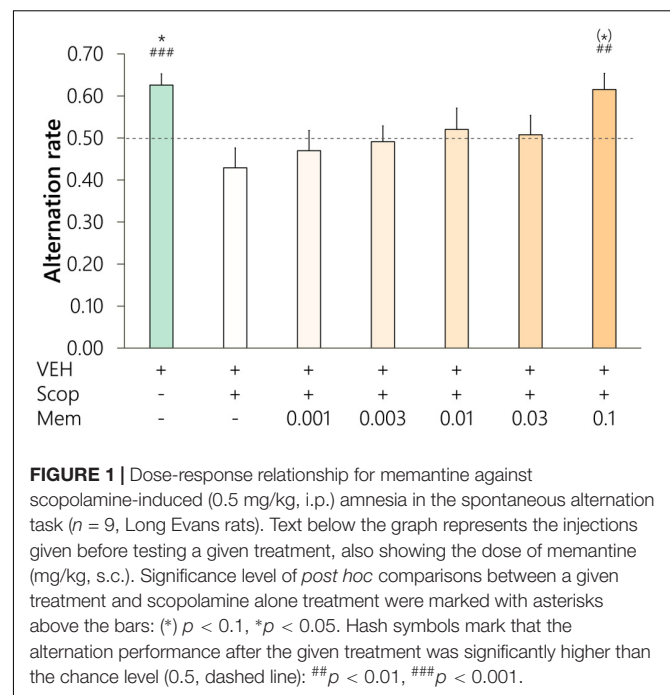
RESULTS

Dose–Effect Relationship of Memantine

Experiments were performed to determine the relationship between the dose of memantine and its cognitive enhancer effect against scopolamine (Figure 1). Out of the initial 13 LE rats, two animals were excluded from the statistical analysis because of invalid sessions, and another two were excluded because of the lack of effects of Scop on memory performance. A significant main effect of pharmacological treatments was found on the alternation rate of rats in the T-maze [$n = 9$, $F(3.2, 25.8) = 3.12$, $p = 0.040$, $\eta^2 = 0.239$]. Control performance of rats was above the chance level (one-sample $t = 4.745$, $p < 0.001$) and was significantly higher than after scopolamine treatment [Control vs. Scop: 0.63 ± 0.03 (mean \pm SEM) vs. 0.43 ± 0.05 , $p = 0.047$, $d_{rm} = 1.721$] indicating that rats showed good control memory performance and alternating behavior. Memantine dose-dependently attenuated scopolamine-induced memory impairment and increased the average alternation rate of rats. Although the memory enhancing effect of memantine in the dose of 0.1 mg/kg was only marginally significant compared with the scopolamine alone treatment according to the corrected *p*-value (Mem0.1 vs. Scop: 0.62 ± 0.04 vs. 0.43 ± 0.05 , $p = 0.073$, $d_{rm} = 1.444$), Mem0.1 treatment restored normal alternating behavior of animals (one-sample $t = 3.011$, $p = 0.008$). Therefore, 0.1 mg/kg dose of memantine was considered as an effective dose for cognitive enhancement.

Experiment 1: Memantine and PHA-543613 in Subeffective Doses

In *Experiment 1* (Figure 2A), the subeffective 0.003 mg/kg dose of memantine was tested in co-administration with the subeffective 0.1 mg/kg dose of PHA-543613 against scopolamine-induced amnesia of rats. Experiments were performed on altogether 12 LE rats. One animal was excluded because of invalid sessions, and another two animals were excluded because of the lack of memory impairment after Scop treatment. Following the significant main effect of the pharmacological treatments [$n = 9$, $F(4, 32) = 3.910$, $p = 0.011$, $\eta^2 = 0.266$], the significant difference between the alternation rate after VEH and Scop treatments validated the model for cognitive impairment (Control vs. Scop: 0.63 ± 0.02 vs. 0.51 ± 0.02 , $p = 0.041$, $d_{rm} = 1.723$). Monotreatments with memantine or PHA-543613 were not effective enough to attenuate the scopolamine-induced memory

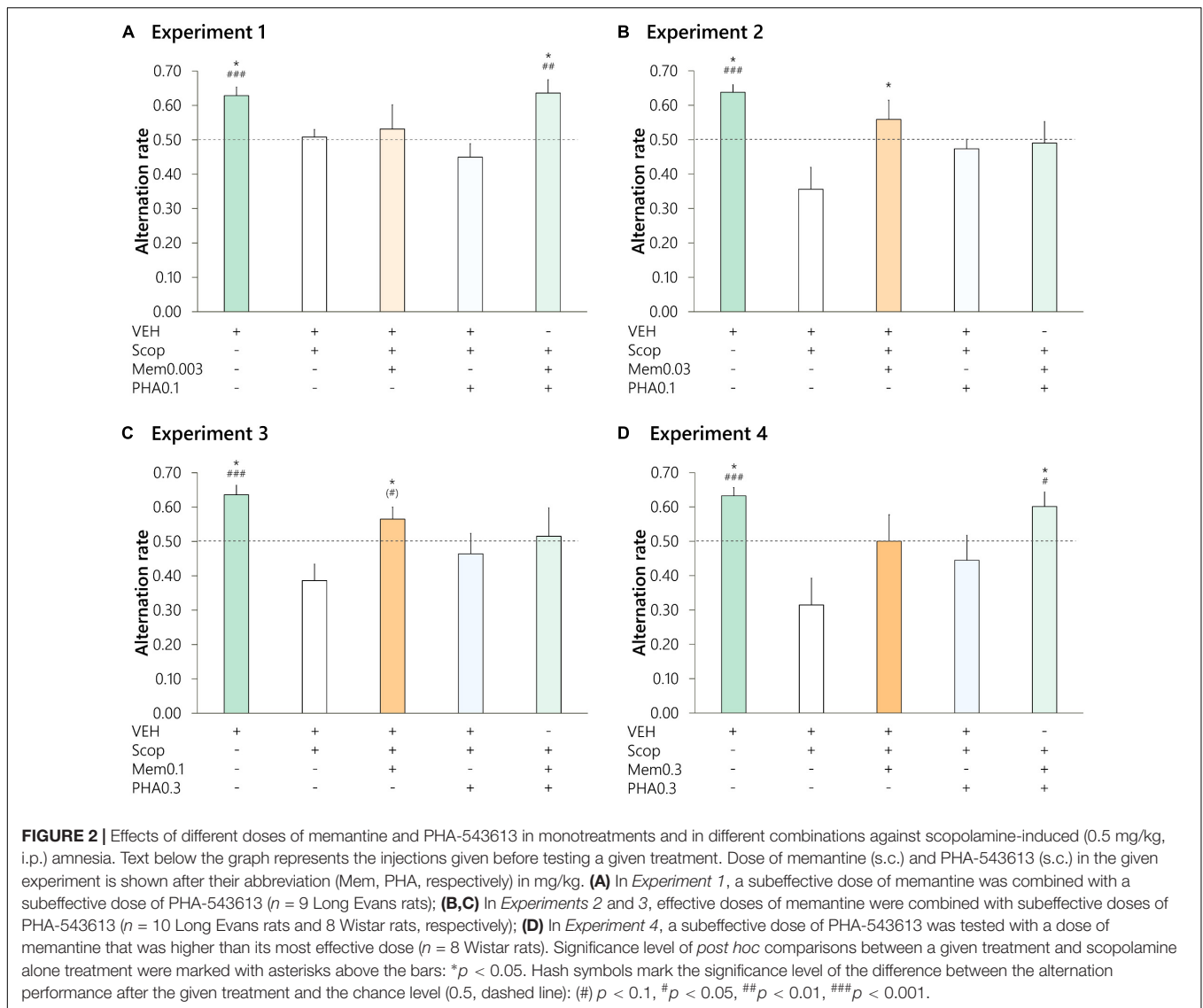


deficit (0.53 ± 0.07 and 0.45 ± 0.04 , respectively; Mem0.003 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.162$; PHA0.1 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = -0.617$), and alternation performance did not significantly exceed the chance level neither after Mem0.003 nor after PHA0.1 treatment.

However, the co-administration of these subeffective doses of memantine and PHA-543613 resulted in a significant increase in the alternation rate (Mem0.003+PHA0.1: 0.64 ± 0.04 ; Mem0.003+PHA0.1 vs. Scop: $p = 0.043$, $d_{rm} = 1.338$), and it restored the normal memory performance of the animals (one-sample $t = 3.506$, $p = 0.004$). Thus, in *Experiment 1* an interaction between subeffective doses of memantine and PHA-543613 was found to be beneficial for the enhancement of cognitive performance of LE rats.

Experiment 2: An Effective Dose of Memantine and a Subeffective Dose of PHA-543613

In *Experiment 2* (Figure 2B), the subeffective dose of PHA-543613 (0.1 mg/kg) was co-administered with 0.03 mg/kg memantine, a dose that was considered initially as subeffective according to the dose–response curve of memantine (see section Dose–effect Relationship of Memantine). Two of the initial 12 animals were excluded because of the lack of memory impairment after Scop. Surprisingly, in *Experiment 2*, scopolamine-induced memory impairment of LE rats [$n = 10$; $F(4, 36) = 5.190$, $p = 0.002$, $\eta^2 = 0.284$; Control vs. Scop: 0.64 ± 0.02 vs. 0.36 ± 0.06 , $p = 0.006$, $d_{rm} = 1.778$] was attenuated by Mem0.03 treatment (Mem0.03: 0.56 ± 0.06 ; Mem0.03 vs. Scop: $p = 0.035$, $d_{rm} = 1.070$). However, this enhancement of the memory performance was not sufficient to increase the alternation rate above the chance level and to restore



normal alternating behavior (one-sample $t = 1.057$, $p > 0.1$). The co-administration of Mem0.03 and PHA0.1 treatments was not at all effective against the scopolamine-induced deficit, as the alternation performance after the co-administration treatment was not significantly higher than the scopolamine alone treatment, and the alternation rate was close to the chance level (Mem0.03+PHA0.1: 0.49 ± 0.06 ; Mem0.03+PHA0.1 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.671$). Thus, the addition of PHA-543613 to an effective dose of memantine did not improve but rather attenuated its memory enhancing effect.

Experiment 3: An Effective Dose of Memantine and a Subeffective Dose of PHA-543613

In *Experiment 3* (Figure 2C), we investigated the effects of 0.1 mg/kg memantine alone and in co-administration with PHA-543613 (0.3 mg/kg) in W rats. Earlier, the dose

of memantine was found to be an effective dose in LE rats. Twelve rats were tested in the experiments, and two animals were excluded because of invalid sessions, while another two were excluded because of the lack of memory impairment after Scop. Pharmacological treatments produced a significant main effect [$n = 8$, $F(4, 28) = 2.957$, $p = 0.037$, $\eta^2 = 0.262$], and scopolamine induced a decrease of the performance sufficient for modeling cognitive impairment (Control vs. Scop: 0.64 ± 0.03 vs. 0.39 ± 0.05 , $p = 0.026$, $d_{rm} = 2.300$). As in LE rats, Mem0.1 treatment increased the alternation rate of W rats compared with the performance observed after scopolamine alone treatment (Mem0.1: 0.56 ± 0.03 ; Mem0.1 vs. Scop: $p = 0.048$, $d_{rm} = 1.505$). Moreover, Mem0.1 treatment restored normal memory performance, resulting in an alternation rate marginally significantly higher than the chance level (one-sample $t = 1.859$, $p = 0.053$). The 0.3 mg/kg dose of PHA-543613 was not effective against scopolamine-induced memory impairment (PHA0.3: 0.46 ± 0.06 , PHA0.3 vs.

Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.513$). A co-administration treatment with an effective dose of memantine and a subeffective dose of PHA-543613 (Mem0.1+PHA0.3: 0.52 ± 0.08) only slightly attenuated the scopolamine-induced deficit on average. The effect was not significant compared with that of the scopolamine alone treatment (Mem0.1+PHA0.3 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.696$), and it did not restore normal alternation behavior (one-sample $t = 0.182$, $p > 0.1$). Again, satisfactory efficacy of memantine could not be further potentiated with the addition of PHA-543613.

Experiment 4: Memantine in a Higher Than Effective Dose

In *Experiment 4* (Figure 2D), the behavioral pharmacology of memantine was investigated in W rats at a dose of 0.3 mg/kg, which was not tested in monotreatment earlier but was higher than the lowest effective dose in LE rats. The dose of PHA-543613 was also 0.3 mg/kg, which was similar to *Experiment 3*. Three of the initial 11 animals were excluded because of invalid sessions, and all rats showed memory impairment after Scop. Treatments in *Experiment 4* resulted in a significant main effect [$n = 8$, $F(4, 28) = 3.693$, $p = 0.015$, $\eta^2 = 0.322$], and scopolamine effectively impaired the performance of rats (Control vs. Scop: 0.63 ± 0.02 vs. 0.31 ± 0.08 , $p = 0.024$, $d_{rm} = 1.958$). Although memantine treatment slightly improved the alternation rate on average, the resulting performance (Mem0.3: 0.50 ± 0.08) was not significantly higher either compared with scopolamine treatment (Mem0.3 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.848$) or to the chance level (one-sample $t = 0.002$, $p > 0.1$). As in *Experiment 3*, 0.3 mg/kg dose of PHA-543613 was found to be subeffective for the memory impairment induced by scopolamine in W rats (PHA0.3: 0.44 ± 0.07 ; PHA0.3 vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.613$). However, the co-administration of the ineffective doses of memantine and PHA-543613 resulted in a significant improvement of alternation performance of rats compared with scopolamine alone treatment (Mem0.3+PHA0.3: 0.60 ± 0.04 ; Mem0.3+PHA0.3 vs. Scop:

$p = 0.040$, $d_{rm} = 1.611$). The co-administration treatment also restored normal memory performance and resulted in an average alternation rate significantly higher than the chance level (one-sample $t = 2.391$, $p = 0.024$). Thus, PHA-543613 positively influenced the efficacy of memantine also at higher than effective doses of memantine.

Comparison of Effect Sizes as a Function of the Dose of Memantine

For the purpose of standardized comparison of efficacy of treatments in different experiments, we compared effect sizes for memantine (Mem vs. Scop) in monotreatments and in co-administration with PHA-543613 (Mem+PHA vs. Scop) as a function of the memantine dose (Figure 3A). The effect size of memantine monotreatment showed an inverted U-shaped relation with the dose, as the effect size increased in the 0.003 mg/kg to 0.1 mg/kg dose range, while a higher dose (0.3 mg/kg) resulted in the decrease of the effect size. Effect sizes of co-administration treatments (Mem+PHA) changed conversely as a result of increasing memantine doses. Mem+PHA treatment exerted a substantial cognitive enhancing effect when memantine was applied in a lower (0.003 mg/kg) or in a higher (0.3 mg/kg) dose, while at intermediate memantine doses, co-administration treatment exerted a smaller effect (from 0.03 to 0.1 mg/kg).

Pooled Analysis of Cases With Ineffective Memantine Doses

To test the hypothesis that PHA-543613 potentiates ineffective doses of memantine, we performed a pooled analysis of data from animals that were not positively affected by the applied dose of memantine monotreatment. Results (Figure 3B) showed significant main effect of the treatments [$n = 26$; $F(3.03, 75.8) = 10.774$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.301$]. Scopolamine-induced decrease of the alternation performance (Control vs. Scop: 0.63 ± 0.01 vs. 0.38 ± 0.04 , $p < 0.001$, $d_{rm} = 1.781$) was

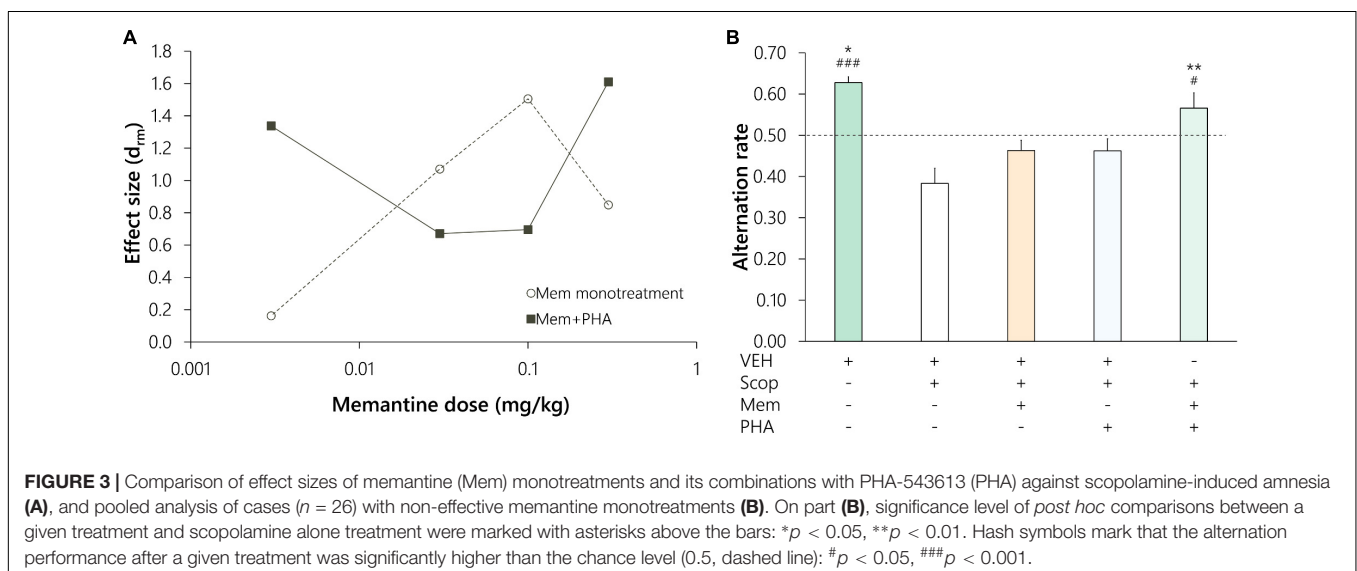


TABLE 2 | Effects of scopolamine (Scop, 0.5 mg/kg, i.p.) and memantine (Mem followed by the dose in mg/kg, s.c.) on the average choice latency and the average trial time data (mean \pm SEM, $n = 9$).

	Control	Scop	Mem0.001	Mem0.003	Mem0.01	Mem0.03	Mem0.1
Average choice latency	27.1 s ± 2.4 s	18.2 s ± 5.4 s	27.0 s ± 8.8 s	7.7 s ± 2.0 s	15.7 s ± 4.6 s	11.7 s ± 2.0 s	16.8 s ± 4.0 s
Average trial time	71.1 s ± 5.3 s	58.4 s ± 13.1 s	75.6 s ± 14.6 s	61.3 s ± 11.0 s	61.4 s ± 8.3 s	67.0 s ± 11.3 s	66.2 s ± 9.0 s

TABLE 3 | Means and standard errors of average choice latency and average trial time data after different treatments in Experiments 1–4.

		Control	Scop	Mem	PHA	Mem+PHA
Average choice latency	Experiment 1	32.0 s	21.6 s	42.7 s	22.6 s	30.4 s
		± 3.9 s	± 6.6 s	± 14.1 s	± 6.4 s	± 9.9 s
	Experiment 2	34.7 s	17.9 s	24.2 s	19.0 s	23.5 s
		± 3.7 s	± 6.1 s	± 7.5 s	± 5.5 s	± 6.7 s
	Experiment 3	17.0 s	14.0 s	10.9 s	22.8 s	24.8 s
		± 2.0 s	± 3.1 s	± 1.6 s	± 9.1 s	± 10.3 s
	Experiment 4	29.4 s	25.7 s	19.7 s	39.7 s	21.3 s
		± 3.6 s	± 9.6 s	± 4.9 s	± 4.9 s	± 5.2 s
Average trial time	Experiment 1	73.6 s	58.2 s	77.2 s	51.7 s	69.8 s
		± 5.1 s	± 6.3 s	± 16.8 s	± 11.5 s	± 11.2 s
	Experiment 2	79.3 s	66.5 s	64.5 s	65.2 s	76.5 s
		± 6.8 s	± 12.3 s	± 13.6 s	± 9.2 s	± 11.5 s
	Experiment 3	94.6 s	81.9 s	64.9 s	89.1 s	87.3 s
		± 8.1 s	± 9.4 s	± 9.2 s	± 15.6 s	± 11.6 s
	Experiment 4	71.1 s	79.0 s	68.1 s	85.3 s	73.2 s
		± 6.4 s	± 6.9 s	± 9.6 s	± 9.2 s	± 12.5 s

Sample sizes in Experiments 1–4 were 9, 10, 8, and 8, respectively.

not significantly attenuated by either memantine or PHA-543613 monotreatment (Mem: 0.46 ± 0.02 , Mem vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.501$; PHA: 0.46 ± 0.03 , PHA vs. Scop: $p > 0.1$, $d_{rm} = 0.468$). However, co-administration treatment with memantine and PHA-543613 significantly enhanced memory performance of the animals compared with the scopolamine alone treatment (Mem+PHA: 0.57 ± 0.04 , Mem+PHA vs. Scop: $p = 0.003$, $d_{rm} = 0.969$), and significantly increased the alternation rate above the chance level ($t = 1.773$, $p = 0.044$).

Furthermore, we assessed the nature of the interaction between behavioral effects of memantine and PHA-543613. We found that the effect of memantine and PHA-543613 in co-administration (0.18 ± 0.05) was not significantly higher than the sum of monotreatment effects (0.16 ± 0.09 ; $t = 0.324$, $p = 0.748$). Hence, pooled analysis revealed that the co-administration of memantine and PHA-543613 provide a beneficial additive effect when memantine is used at an ineffective dose.

Lack of Effects on Time Variables

No significant main effect of pharmacological treatments was found on the measured time variables in most experiments, neither in the experiment determining effective doses of memantine [choice latency: $F(2.2, 17.3) = 2.620$, $p = 0.098$; trial time: $F(6, 48) = 0.367$, $p = 0.897$], nor in most experiments with co-administration treatments (data are summarized in **Tables 2, 3**). One exception was *Experiment 4*, where a significant main effect [$F(4, 28) = 2.733$, $p = 0.049$] of pharmacological treatments was found on the average choice latency of the

animals. However, in *post hoc* comparisons of time variables, neither monotreatments nor the co-administration treatment were significantly different from control sessions (29.4 ± 3.6 , n.s.) or the scopolamine alone treatment (25.7 ± 9.6 , n.s.). We can conclude that the applied pharmacological treatments did not generally affect the speed of animals in performing the task.

DISCUSSION

The present study investigated interactions between memantine and the alpha7 nAChR agonist PHA-543613 in their cognitive effects on rats testing the hypothesis that a combinational treatment would lead to increased efficacy in ameliorating cognitive deficits. The dose–effect relationship of low memantine doses was assessed, and the maximum efficacy of memantine was found at the 0.1 mg/kg dose, while higher doses (in *Experiment 4*) exerted no memory enhancement. Such an inverted U-shaped dose–response relationship of pharmacological cognitive enhancement is typical (Harada et al., 2012; Gould et al., 2013) as it has also been reported previously with memantine (Woodruff-Pak et al., 2007; Barber et al., 2010; Schneider et al., 2013). Although much higher doses of memantine were frequently used in rodent behavioral experiments (up to 30 mg/kg), 5 mg/kg is the maximum therapeutically relevant acute dose of memantine in rats, because it results in plasma levels that correspond to the well-tolerated upper limit in human patients (Parsons et al., 2007; Rammes et al., 2008).

Conversely, high memantine doses supposedly result in non-selective receptor binding and induce side-effects similarly to other NMDAR antagonists like MK-801 (Parsons et al., 1999). In fact, such non-selective physiological changes and adverse effects on behavior were reported already at higher than 1 mg/kg memantine doses (Wise and Lichtman, 2007; Ihalaenen et al., 2011; Kotermanski et al., 2013; Schneider et al., 2013). Similar to the present findings, earlier results also support the effectiveness of memantine in low doses below 1.0 mg/kg (Wise and Lichtman, 2007). Thus, using low doses of memantine in our experiments was relevant for the purpose of testing the effects of memantine in co-administration treatments and non-specific (e.g., increase of ACh level) and adverse effects were presumably also avoided. According to the results in the secondary measurements (choice latency, trial time), no adverse effects of the memantine treatments were found, indicating that memantine did not influence the speed of animals while performing the task.

According to the established memantine dose-effect curve, we tested co-administration treatments of effective and ineffective doses of memantine with subeffective doses of alpha7 nAChR agonist PHA-543613. Results showed that the co-administration treatment produced a more beneficial effect than monotreatments when memantine was applied in ineffective doses, regardless of whether the dose was lower (0.003 mg/kg) or higher (0.3 mg/kg) than the effective dose. Pooled analysis of ineffective memantine monotreatments revealed that the cognitive enhancer effects of memantine and PHA-543613 are additive when the agents are used in co-administration. However, PHA-543613 failed to further potentiate effective doses of memantine (0.03 and 0.1 mg/kg), as these co-administration treatments did not significantly increase memory performance compared with scopolamine alone treatments. These results might raise a possible interpretation that an antagonistic relationship was found between memantine and PHA-543613 with effective memantine monotreatments, although the performance after the co-administration treatment was not significantly worse than that after the monotreatment with memantine in the same experiment. Effect size comparisons of memantine monotreatments and co-administration treatments in all four experiments implied that the maximum effect of memantine monotreatment and its co-administration with PHA-543613 converged to a common ceiling effect. Thus, the addition of an alpha7 nAChR agonist might help to reach maximum efficacy of memantine in a wider dose range. However, it cannot increase the efficacy of memantine beyond that of an optimal monotreatment dose. Note that the limitation of such interpretations is that the animals used in the present study were not inherently impaired in cognition, and the scopolamine-induced amnesia model mimics only the targeted neurochemical aspect (i.e., cholinergic deficit) of cognitive impairment.

Previously, different kinds of pharmacological agents were tested in combination with memantine in preclinical behavioral models of cognitive impairment. Most frequently, memantine was combined with FDA-approved AChEI compounds, such as donepezil and galantamine. The combination of donepezil and memantine exerted no superior effect over monotreatments in preclinical animal experiments (Wise and Lichtman, 2007;

Woodruff-Pak et al., 2007; Ihalaenen et al., 2011). However, only one dose of donepezil was typically applied in these studies raising the possibility that negative results arose from the combinations of inappropriate doses. Moreover, meta-analyses of clinical studies in humans concluded that adjunctive memantine treatment showed no or only small benefits over AChEI monotherapies (Farrimond et al., 2012; Tsoi et al., 2016). Conversely, galantamine, an AChEI also acting as a positive allosteric modulator (PAM) on alpha7 nAChRs, influenced the efficacy of memantine in some preclinical animal models. Busquet et al. (2012) found a superior combinational effect of 0.1 mg/kg galantamine and 0.5 mg/kg memantine over monotreatments in spontaneous alternation and novel object recognition (NOR) paradigms of mice, using the scopolamine-induced amnesia model. Nikiforuk et al. (2016) reported similar results in rats using attentional set shifting and NOR tests, and further demonstrated that the interaction of galantamine (0.3–1.0 mg/kg) and memantine (1 mg/kg) in their cognitive effect was dependent on alpha7 nAChRs. Interestingly, Schneider et al. (2013) found that the addition of memantine (0.5 mg/kg) counteracted the cognitive enhancer effect of an effective dose of galantamine (0.3 mg/kg) in a delayed matching-to-sample (DMTS) working memory task in rhesus monkeys. This showed an antagonistic interaction similar to the one we observed in rats in the present study when PHA-543613 was co-administered with an effective dose of memantine.

Interactions between galantamine and memantine in combined treatments were mainly explained by the alpha7 nAChR PAM activity of galantamine, while it was also demonstrated that other alpha7 PAMs can also enhance the efficacy of memantine (Nikiforuk et al., 2016). Since the mechanisms of alpha7 nAChR activation by PAMs and agonists are substantially different (Lendvai et al., 2013), our present results may extend earlier findings by revealing that a selective agonist of the alpha7 nAChR also shows different types of interactions with memantine (enhancement, but perhaps also antagonism) affecting its efficacy in ameliorating cognitive impairment.

Pharmacological interactions between memantine and alpha7 nAChR ligands are not surprising, since memantine also acts as an antagonist for alpha7 nAChRs. Moreover, the affinity of memantine for alpha7 nAChRs was found to be higher than its affinity for NMDARs in the mouse brain *in vitro* (Aracava et al., 2005). Accordingly, as it has been suggested, the action of memantine on alpha7 nAChRs might also contribute to its cognitive effects (Banerjee et al., 2005), especially in low doses. However, it has not been clarified yet whether the affinity of memantine to alpha7 nAChR is beneficial or disadvantageous regarding its cognitive enhancer efficacy.

Finally, we propose possible mechanistic explanations for the observed interactive effects of memantine and PHA-543613. One possible explanation involves the effects of memantine and PHA-543613 on glutamatergic signaling. According to the classic interpretation of the cognitive enhancer effects of memantine, it is suggested that memantine weakly antagonizes NMDARs and blocks their pathologic overactivation at extrasynaptic sites, thus, increasing the signal-to-noise ratio of glutamatergic

transmission (Xia et al., 2010; Collingridge et al., 2013). Furthermore, activation of alpha7 nAChRs on presynaptic sites of glutamatergic terminals increases glutamate release (Marchi et al., 2002; Gomez-Varela and Berg, 2013), and facilitates NMDA-dependent glutamatergic responses of hippocampal pyramidal neurons (Bali et al., 2017). It is hypothesized that the blockage of pathologic NMDAR activation and the concurrent cholinergic facilitation of synaptic glutamate release may even synergistically improve the physiological glutamatergic signaling.

Another explanation for the interaction between memantine and PHA-543613 involves alpha7 nAChRs as the same target of both compounds. Taking into account that memantine is also an antagonist of the alpha7 nAChR while PHA-543613 is an agonist of the same receptor, their additive effects might be explained by the agonist-induced desensitization effect (Quick and Lester, 2002). In their commentary, Banerjee et al. (2005) also refer to similar effects of alpha7 nAChR agonists and antagonists, and imply that antagonism or desensitization of the alpha7 nAChR may result in beneficial physiological and cognitive effects. According to this hypothesis, subeffective doses of memantine may not inactivate a sufficient number of alpha7 nAChRs to exert behavioral effects. Here, desensitization of further alpha7 nAChRs by PHA-543613 may have potentiated memantine-induced effects by increasing the number of inactivated receptors to exceed the threshold for cognitive effects.

The present results do not allow us to choose one or the other from the above discussed explanations. However, the additive relationship between memantine and PHA-543613 in the present study, and the finding that the maximum efficacy of memantine was not further increased by the addition of PHA-543613, together may suggest that the cognitive enhancer effects of the two compounds arose from their possible action on the same receptor target. As such, the common target of memantine and PHA-543613 may most likely be the alpha7 nAChR. Thus, our results further support the presumption that alpha7 nAChRs may play an important role in the cognitive enhancer effects of memantine. However, as a limitation, the present results do not provide direct evidence on the receptor-level interaction of memantine and PHA-543613.

CONCLUSION

Here, we firstly reported the additive interaction between a selective alpha7 nAChR agonist and memantine in their effects on cognition in rats. Ineffective memantine treatments

were successfully improved by the addition of PHA-543613, although the co-administration of the alpha7 nAChR agonist and memantine did not exceed the maximum efficacy of memantine monotreatments. Thus, the preclinical relevance of our results is that applied doses of memantine might be decreased by addition of low doses of alpha7 nAChR agonists, while also providing the beneficial cognitive enhancer effects. Furthermore, the addition of alpha7 nAChR ligands to memantine treatment may extend the therapeutic dose range of memantine by providing stable efficacy in a wider dose range. As a possible explanation of our results we hypothesize that the cognitive enhancer effects of the two compounds and their co-administration treatment may originate from their effect on the alpha7 nAChR. However, this presumption requires further investigation on the cellular level.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The experimental data are freely available on Mendeley Data (doi: 10.17632/szzm8d5chy.1).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ZB and IH designed the study. ZB, NB, ST, RC, LN, and MT performed the experiments and processed experimental data. ZB and NB performed the statistical analyses. ZB, NB, ST and IH wrote the first draft of the manuscript. All authors have approved the final manuscript.

FUNDING

The work was supported by the Hungarian National Brain Research Program of the National Research, Development and Innovation Office of the Hungarian Government (Grant No. 2017-1.2.1-NKP-2017-00002) and by the National Research, Development and Innovation Fund of the Hungarian Government (Grant No. K 129247). The article processing charge was supported by EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Clara Munz, Klára Lencse, Viktória Balikó, Brigitta Szántó, Dóra Gajcsi, and Adrián Klepe for their valuable technical assistance.

REFERENCES

- Aracava, Y., Pereira, E. F. R., Maelicke, A., and Albuquerque, E. X. (2005). Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1195–1205. doi: 10.1124/jpet.104.077172
- Bali, Z. K., Bruszt, N., Tadeipalli, S. A., Csurgó, R., Nagy, L. V., Tompa, M., et al. (2018). Data for Cognitive enhancer effects of low memantine doses are facilitated by an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist in scopolamine-induced amnesia in rats. *Mendeley Data*. doi: 10.17632/szzm8d5chy.1
- Bali, Z. K., Inkeller, J., Csurgó, R., Bruszt, N., Horváth, H., and Hernádi, I. (2015). Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav. Brain Res.* 278, 404–410. doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.030
- Bali, Z. K., Nagy, L. V., and Hernádi, I. (2017). Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Play a Predominant Role in the Cholinergic Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Evoked Firing Responses of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 11:271. doi: 10.3389/fncel.2017.00271
- Banerjee, P., Samoriski, G., and Gupta, S. (2005). Comments on “Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than

- N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 928–929. doi: 10.1124/jpet.104.081976
- Barber, T. A., Meyers, R. A., and McGettigan, B. F. (2010). Memantine improves memory for taste-avoidance learning in day-old chicks exposed to isolation stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 203–208. doi: 10.1016/j.pbb.2010.01.006
- Busquet, P., Capurro, V., Cavalli, A., Piomelli, D., Reggiani, A., and Bertorelli, R. (2012). Synergistic effects of galantamine and memantine in attenuating scopolamine-induced amnesia in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 305–309. doi: 10.1254/jphs.12166SC
- Collingridge, G. L., Volianskis, A., Bannister, N., France, G., Hanna, L., Mercier, M., et al. (2013). The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* 64, 13–26. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.051
- Dani, J. A., and Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214
- Danysz, W., and Parsons, C. G. G. (2012). Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine—searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* 167, 324–352. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x
- Deacon, R. M. J., and Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7–12. doi: 10.1038/nprot.2006.2
- Deardorff, W. J., and Grossberg, G. T. (2016). A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe alzheimer's disease. *Drug Des. Dev. Ther.* 10, 3267–3279. doi: 10.2147/DDDT.S86463
- Farrimond, L. E., Roberts, E., and McShane, R. (2012). Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for alzheimer's disease: a systematic review. *BMJ Open* 2, e000917–e000917. doi: 10.1136/bmjopen-2012-000917
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0
- Gomez-Varela, D., and Berg, D. K. (2013). Lateral mobility of presynaptic $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors and its relevance for glutamate release. *J. Neurosci.* 33, 17062–17071. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1482-13.2013
- Gould, R. W., Garg, P. K., Garg, S., and Nader, M. A. (2013). Effects of nicotinic acetylcholine receptor agonists on cognition in rhesus monkeys with a chronic cocaine self-administration history. *Neuropharmacology* 64, 479–488. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.004
- Harada, K., Nakato, K., Yarimizu, J., Yamazaki, M., Morita, M., Takahashi, S., et al. (2012). A novel glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitor, ASP2535 (4-[3-isopropyl-5-(6-phenyl-3-pyridyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]-2,1,3-benzoxadiazole), improves cognition in animal models of cognitive impairment in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 685, 59–69. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.04.013
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6, 65–70. doi: 10.2307/4615733
- Ihalainen, J., Sarajärvi, T., Rasmusson, D., Kemppainen, S., Keski-Rahkonen, P., Lehtonen, M., et al. (2011). Effects of memantine and donepezil on cortical and hippocampal acetylcholine levels and object recognition memory in rats. *Neuropharmacology* 61, 891–899. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.06.008
- Kotermanski, S. E., Johnson, J. W., and Thiels, E. (2013). Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 109, 67–76. doi: 10.1016/j.pbb.2013.05.005
- Lakens, D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for *t*-tests and ANOVAs. *Front. Psychol.* 4:863. doi: 10.3389/fpsyg.2013.00863
- Lendvai, B., Kassai, F., Szájlí, A., and Némethy, Z. (2013). A7 nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res. Bull.* 93, 86–96. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.11.003
- Marchi, M., Risso, F., Viola, C., Cavazzani, P., and Raiteri, M. (2002). Direct evidence that release-stimulating alpha7* nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J. Neurochem.* 80, 1071–1078. doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00805.x
- Nikiforuk, A., Potasiewicz, A., Kos, T., and Popik, P. (2016). The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: the synergistic role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav. Brain Res.* 313, 214–218. doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.023
- Parsons, C. G., Danysz, W., and Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist - A review of preclinical data. *Neuropharmacology* 38, 735–767. doi: 10.1016/S0028-3908(99)00019-2
- Parsons, C. G., Stöffler, A., and Danysz, W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53, 699–723. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.07.013
- Quick, M. W., and Lester, R. A. J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 53, 457–478. doi: 10.1002/neu.10109
- Rammes, G., Danysz, W., and Parsons, C. G. (2008). Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 55–78. doi: 10.2174/157015908783769671
- Sadigh-Eteghad, S., Talebi, M., Mahmoudi, J., Babri, S., and Shanebandi, D. (2015). Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by PHA-543613 improves A β 25–35-mediated cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 298, 81–93. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.017
- Schneider, J. S., Pioli, E. Y., Jianzhong, Y., Li, Q., and Bezard, E. (2013). Effects of memantine and galantamine on cognitive performance in aged rhesus macaques. *Neurobiol. Aging* 34, 1126–1132. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.020
- Spowart-Manning, L., and van der Staay, F. J. (2004). The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behav. Brain Res.* 151, 37–46. doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.004
- Toyohara, J., and Hashimoto, K. (2010). $\alpha 7$ Nicotinic receptor agonists: potential therapeutic drugs for treatment of cognitive impairments in schizophrenia and alzheimer's disease. *Open Med. Chem. J.* 4, 37–56. doi: 10.2174/1874104501004010037
- Tsoi, K. K. F., Chan, J. Y. C., Leung, N. W. Y., Hirai, H. W., Wong, S. Y. S., and Kwok, T. C. Y. (2016). Combination therapy showed limited superiority over monotherapy for alzheimer disease: a meta-analysis of 14 randomized trials. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 17, 863.e1–8. doi: 10.1016/j.jamda.2016.05.015
- Wise, L. E., and Lichtman, A. H. (2007). The uncompetitive N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial-arm maze memory task. *Eur. J. Pharmacol.* 575, 98–102. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.07.059
- Wishka, D. G., Walker, D. P., Yates, K. M., Reitz, S. C., Jia, S., Myers, J. K., et al. (2006). Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure-activity relationsh. *J. Med. Chem.* 49, 4425–4436. doi: 10.1021/jm0602413
- Woodruff-Pak, D. S., Tobia, M. J., Jiao, X., Beck, K. D., and Servatius, R. J. (2007). Preclinical investigation of the functional effects of memantine and memantine combined with galantamine or donepezil. *Neuropsychopharmacology* 32, 1284–1294. doi: 10.1038/sj.npp.1301259
- Xia, P., Chen, H. V., Zhang, D., and Lipton, S. A. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J. Neurosci.* 30, 11246–11250. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2488-10.2010
- Yang, Y., Paspalas, C. D., Jin, L. E., Picciotto, M. R., Arnsten, A. F. T., and Wang, M. (2013). Nicotinic $\alpha 7$ receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12078–12083. doi: 10.1073/pnas.1307849110

Conflict of Interest Statement: ZB, LN, and IH received occasional research funding from Gedeon Richter Pharmaceutical Plc. (Budapest, Hungary) for projects that are not related to the research reported in the manuscript.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Bali, Bruszt, Tadepalli, Csurgyók, Nagy, Tompa and Hernádi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Potential of cognitive enhancer effects of Alzheimer's disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task

Nóra Bruszt^{1,2} · Zsolt Kristóf Bali^{1,2,3} · Sai Ambika Tadepalli^{1,4} · Lili Veronika Nagy^{1,4} · István Hernádi^{1,2,3,4}

Received: 20 January 2021 / Accepted: 20 July 2021 / Published online: 13 August 2021
© The Author(s) 2021, corrected publication 2022

Abstract

Rationale There are controversial pieces of evidence whether combination therapies using memantine and cholinesterase inhibitors are beneficial over their monotreatments. However, results of preclinical studies are promising when memantine is combined with agonists and allosteric modulators of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR).

Objectives Here, we tested the hypothesis that cognitive enhancer effects of memantine can be potentiated through modulating alpha7 nAChRs in a scopolamine-induced amnesia model.

Methods Monotreatments, as well as co-administrations of selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 and memantine were tested in the Morris water maze task in rats. The efficacy of the co-administration treatment was observed on different domains of spatial episodic memory.

Results Low dose of memantine (0.1 mg/kg) and PHA-543613 (0.3 mg/kg) successfully reversed scopolamine-induced short-term memory deficits both in monotreatments and in co-administration. When recall of information from long-term memory was tested, pharmacological effects caused by co-administration of subeffective doses of memantine and PHA-543613 exceeded that of their monotreatments.

Conclusion Our results further support the evidence of beneficial interactions between memantine and alpha7 nAChR ligands and suggest a prominent role of alpha7 nAChRs in the procognitive effects of memantine.

Keywords Spatial learning · Long-term memory · Dementia · Scopolamine · Combined treatment · Behavior

✉ Zsolt Kristóf Bali
bali.zsolt.k@gmail.com

Nóra Bruszt
brusztkori91@gmail.com

Sai Ambika Tadepalli
tsaia0310@gmail.com

Lili Veronika Nagy
nagy.lili.veronika@gmail.com

István Hernádi
hernadi@gamma.ttk.pte.hu

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
ANOVA	Analysis of variance
LSD	Least significant difference
MLA	Methyllycaconitine
MWM	Morris water maze
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by irreversible cognitive decline, which affects millions of people over the age of 65 years worldwide (Gaugler et al. 2016). The currently approved medications for the treatment of AD (acetylcholinesterase inhibitors such as donepezil and galantamine, and the non-competitive NMDA receptor antagonist memantine) provide statistically significant but clinically limited improvements in symptoms associated with behavior, cognition, and global

¹ János Szentágothai Research Center, Center for Neuroscience, University of Pécs, 20 Ifjúság str, 7624 Pécs, Hungary

² Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, 12 Szigeti str, 7624 Pécs, Hungary

³ Grastyán Endre Translational Research Center, University of Pécs, 6 Ifjúság str, 7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Experimental Zoology and Neurobiology, Faculty of Sciences, University of Pécs, 6 Ifjúság str, 7624 Pécs, Hungary

mental function (Dou et al., 2018; Raina et al., 2008; Tsoi et al., 2016). Therefore, the development of novel treatment strategies is crucial in the field. There is an increasing interest in combination therapies which target different signaling pathways involved in learning and memory and in the progression of AD (Parsons et al. 2013). Although a fixed-dose combination of donepezil and memantine has already been licensed and marketed for AD, there is still a lack of clear clinical evidence of additional benefits of the donepezil-memantine combination treatment over the corresponding monotherapies (Deardorff & Grossberg, 2016; Farrimond et al., 2012; Molino et al., 2013; Tsoi et al., 2016; Tsoi et al., 2016). In line with this, some preclinical studies have also found poor efficacy of donepezil-memantine co-administration in different rodent models. For example, donepezil-memantine combination treatment failed to enhance memory performance of rats in the radial arm maze task (Wise and Lichtman 2007), as well as in an associative learning task in aged rabbits (Woodruff-Pak et al. 2007). However, a greater efficacy has been observed in the same study when memantine was simultaneously administered with galantamine instead of donepezil (Woodruff-Pak et al. 2007). Superiority of galantamine-memantine combination over donepezil-memantine combination seems to be related to the additional action of galantamine on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) besides its cholinesterase inhibitor effect (Koola et al. 2018). Consequently, $\alpha 7$ nAChRs may be of predominant importance in the potentiation of the effects of memantine.

In a previous study from our laboratory, we tested whether pharmacological interaction between a selective $\alpha 7$ nAChR agonist PHA-543613 and memantine may have beneficial effects on working memory performance of rats in the spontaneous alternation task over their monotreatments (Bali et al. 2019a). Our previous results indicate a clear additive interaction in the behavioral effects of the two compounds suggesting a potential novel preclinical experimental approach for the treatment of AD. In the present study we further tested the interactions between PHA-543613 and memantine on cognitive functions, including spatial learning, short-term and long-term memory in the Morris water maze task using the scopolamine-induced transient amnesia model in rats.

Materials and Methods

Animals

Adult male Long Evans rats (Charles River Laboratories, Calco, Italy), 6–8 months old, and weighing 350–500 g were applied in the current study. Dose–response curves for memantine and PHA-543613 were assessed in altogether 72

rats, whereas 65 other rats were used in the investigation of the effectiveness of co-administration treatments. Animals were pair-housed under 12/12 h light/dark cycle with controlled temperature and humidity in the animal house of the Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Hungary. In the animal house, the lights were ON from 7 a.m. to 7 p.m., and the animals were tested in the light period. Rats were fed daily with 17 g/animal of laboratory chow to prevent obesity and related health problems (e.g., cardiovascular and renal diseases). Water was available ad libitum. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs, and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation (ÁTET) at the Ministry of Agriculture (license no.: BA02/2000–25/2015). All procedures fully complied with the Decree No. 40/2013. (II. 14.) of the Hungarian Government and the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Morris water maze paradigm for assessing spatial long-term memory

The protocol of the Morris water maze (MWM) navigation task was the same as described in a previous paper from our laboratory by Tadepalli et al. (2019). Experiments were carried out in a blue circular pool with 180 cm in diameter and 90 cm in height, filled to the depth of 30 cm of blue painted, blurred water (mixing 500 g milk-powder and 30 ml blue food coloring). The area of the pool was divided into four virtual quadrants (NW, SW, SE, NE). The experimental protocol consisted of four training days and an additional probe trial day. During the training days a platform was placed in the center of the SW quadrant (submerged 1 cm below the surface), and the rats had to learn the location of the hidden platform with the help of visual cues placed around the maze. All animals had to perform four trials per training day. In each trial, the rats were placed into different quadrants changed clockwise, and were allowed to search for the hidden platform for 2 min. During the trials, the escape latency (the time until the platform was found), the swimming path length to the platform and the swimming speed of the animals were measured and analyzed using Ethovision XT10 software (Noldus, Wageningen, Netherlands). If the platform was not found during the trial, rats were put on the platform for 10 s, and 2 min was recorded as escape latency. The performance of the animals on the first training day was used to evaluate their short term memory performance. On the fifth day, a single probe trial was performed for testing the recall of long-term memory. The platform was removed from the pool and the animals were allowed to search the pool for 2 min. During the probe trial, the time spent in the target quadrant (the quadrant of the missing platform) was measured as an index of long-term memory recall.

Drugs and routes of administration

Scopolamine hydrobromide (Cat. No. 1414, Tocris), PHA-543613 hydrochloride (Cat. No. 3092, Tocris), and memantine hydrochloride (Cat. No. 0773, Tocris) were dissolved in physiological saline (vehicle) to create a final injection volume of 1 ml/kg. On each training day, scopolamine was injected intraperitoneally (IP) 15 min before the experimental sessions, while PHA-543613 and/or memantine were injected subcutaneously (SC) 45 min before the sessions (i.e., 30 min before scopolamine administration). When mono-treatments were tested, drugs that were not administered were replaced with the vehicle. On the fifth day (probe trial day), pharmacological treatments were not applied.

Experimental design

The first series of experiments were established for the determination of the dose–response relationships for memantine and PHA-543613. Memantine was administered in the doses of 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg and 1.0 mg/kg (Mem0.1, Mem0.3, and Mem1.0, respectively). PHA-543613 was administered in the doses of 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg and 3.0 mg/kg (PHA0.3, PHA1.0, and PHA3.0, respectively). Efficacy of the applied drugs in different doses was tested on cognitive performance of the rats using the scopolamine-induced (0.1 mg/kg, Scop) transient amnesia model. The monotreatments with different doses of memantine and PHA-543613 were compared to the same vehicle-treated and scopolamine-treated groups. In the second series of experiments, pharmacological interactions between subeffective doses of memantine (0.1 mg/kg) and PHA-543613 (0.3 mg/kg) and the cognitive enhancer effects of their co-administration were tested and were compared with the effects of monotreatments. Animals received the following treatments: vehicle alone (VEH), scopolamine alone (Scop), memantine monotreatment in 0.1 mg/kg dose followed by scopolamine (Mem0.1), PHA-543613 monotreatment in 0.3 mg/kg dose followed by scopolamine (PHA0.3), and co-administration treatment followed by scopolamine (Mem0.1&PHA0.3). Treatments were applied in a between-subject design (different treatments were given to different groups of subjects).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the IBM SPSS 20.0 software. The performance of the animals during the training phase was analyzed by mixed-ANOVA with DAYS and TREATMENTS as factors. Since improvement in task performance was most obvious in the first two days of the training, the changes of escape latency and swimming path length were further analyzed trial-wise within the first

and the second training days. When significant interactions were found, interaction contrasts were tested between specific pairs of treatments and specific pairs of training sessions (i.e. days or trials). The interaction contrasts tested the effects of a given treatment (in reference to the scopolamine-only treatment) on the change of performance sequentially from one session to the next and from the 1st to the last (4th) session (e.g. [Control vs. Scop] \times [day1 vs. day2], [PHA0.3 vs. Scop] \times [trial3 vs trial4], etc.).

For analyzing probe trial data, univariate ANOVA test was applied followed by post-hoc LSD-test. In all statistical analyses, $p < 0.05$ was considered significant.

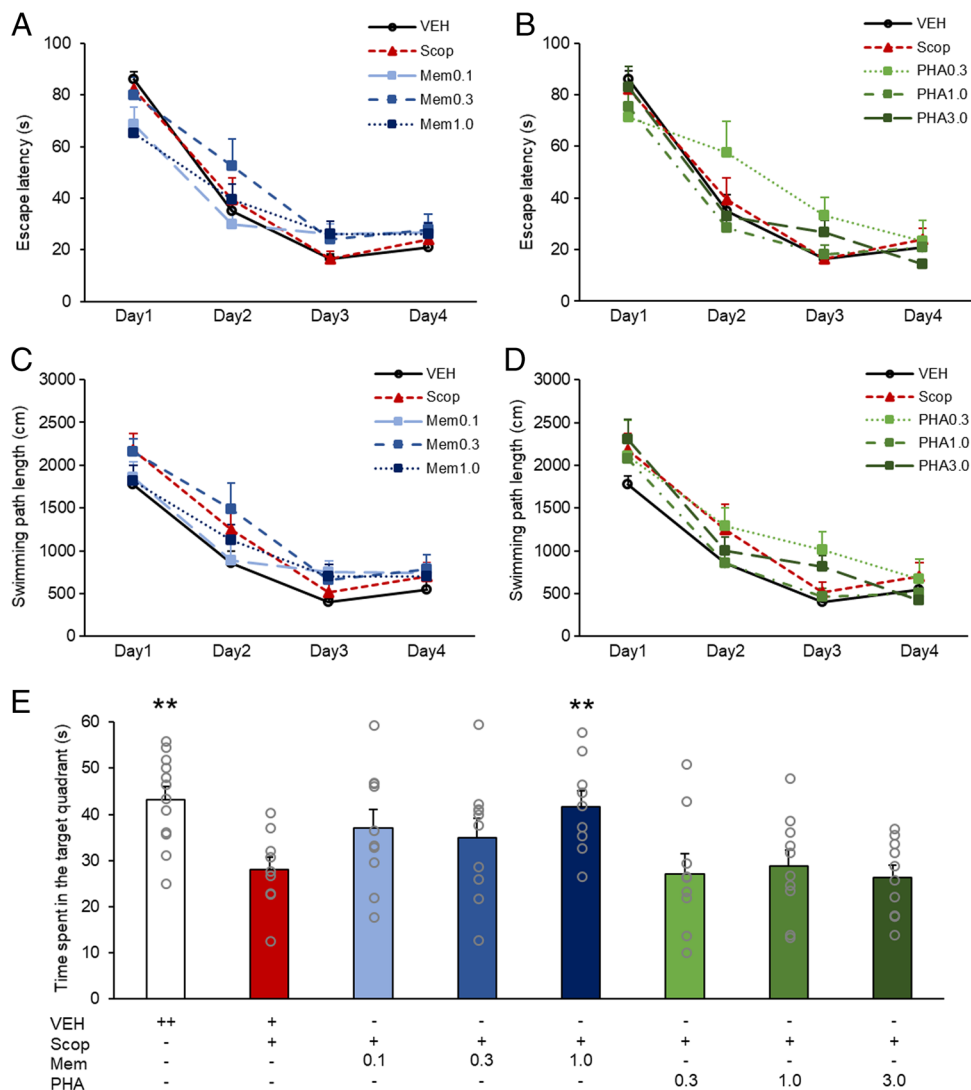
Results

Monotreatments with memantine and PHA-543613 in different doses

First, the dose–effect relationships of memantine and PHA-543613 monotreatments were analyzed. During the training phase (days 1–4), the mean escape latency of the animals significantly decreased (DAY: $F(3, 213) = 177.313$, $p < 0.001$) (Fig. 1A–B). There was no significant difference in the overall escape latency between vehicle, scopolamine, memantine (0.1–1.0 mg/kg) and PHA-543613-treated groups (TREATMENT: $F(7, 71) = 0.845$, $p = 0.554$). However, a significant interaction was found between TREATMENT and DAY ($F(21, 213) = 1.918$, $p = 0.011$), indicating that escape latency differentially changed in the different treatment groups over the course of the training. Contrast analysis of the interaction revealed significant differences between Scop and PHA0.3 treatment groups in the change of escape latency from the 1st to the 2nd training day ([PHA0.3 vs. Scop] \times [day1 vs. day2]: -29.0 ± 13.4 (contrast estimate \pm SEM); $p = 0.034$). Nevertheless, no significant difference was found between the effect of Scop and PHA0.3 on the change of escape latency between the 1st and the last (4th) training days ([PHA0.3 vs. Scop] \times [day1 vs. day4]: -10.0 ± 12.3 ; $p = 0.421$) indicating that decrease of escape latency was overall similar in the two groups over the course of the whole training procedure.

Learning performance of the animals was analyzed also in terms of swimming path length which showed a profound decrease over the training days (DAY: $F(3, 213) = 153.072$, $p < 0.001$) (Fig. 1C–D), and significant effect of treatments on the learning progress was not revealed (TREATMENT: $F(7, 71) = 1.281$, $p = 0.272$) similarly to results based on escape latency. Furthermore, no significant interaction was found between TREATMENT and DAY ($F(21, 213) = 1.172$, $p = 0.278$) indicating that the above reported interaction in escape latency could probably be accounted to swimming speed differences. In the probe trial (Fig. 1E), the time spent

Fig. 1 Dose–response relationship for the effects of memantine and PHA-543613 on spatial learning and recall of long-term memory in the water maze task. Overall escape latency (A–B) and swimming path length (C–D) during the training days (days 1–4) showed no effect of the treatments. Time spent in the target quadrant in the probe trial (day 5) showed significant main effect of the treatments (E). Data are expressed as mean + SEM. Grey circles on the bar chart represent individual data points. Significant differences between a given treatment and the scopolamine-only treatment were marked with asterisks: $**p < 0.01$



in the target quadrant represented long-term memory. In contrast with the results on the training days, in the probe trial, a significant main effect of pharmacological treatments was detected (TREATMENT: $F(7, 71) = 3.917$, $p = 0.001$). Results showed that scopolamine-treated animals spent significantly less time in the target quadrant than the vehicle-treated group (Control vs. Scop: 43.2 ± 2.8 s vs. 28.0 ± 2.8 s, $p = 0.002$). Although memantine in lower doses (0.1 mg/kg and 0.3 mg/kg) did not improve long-term memory against scopolamine, the highest memantine dose (1.0 mg/kg) successfully reversed the memory deteriorating effect of scopolamine (Scop vs Mem1.0: 28.0 ± 2.8 s vs 41.7 ± 3.3 s, $p = 0.009$). However, PHA-543613 did not alleviate scopolamine-induced memory deficits in the applied doses.

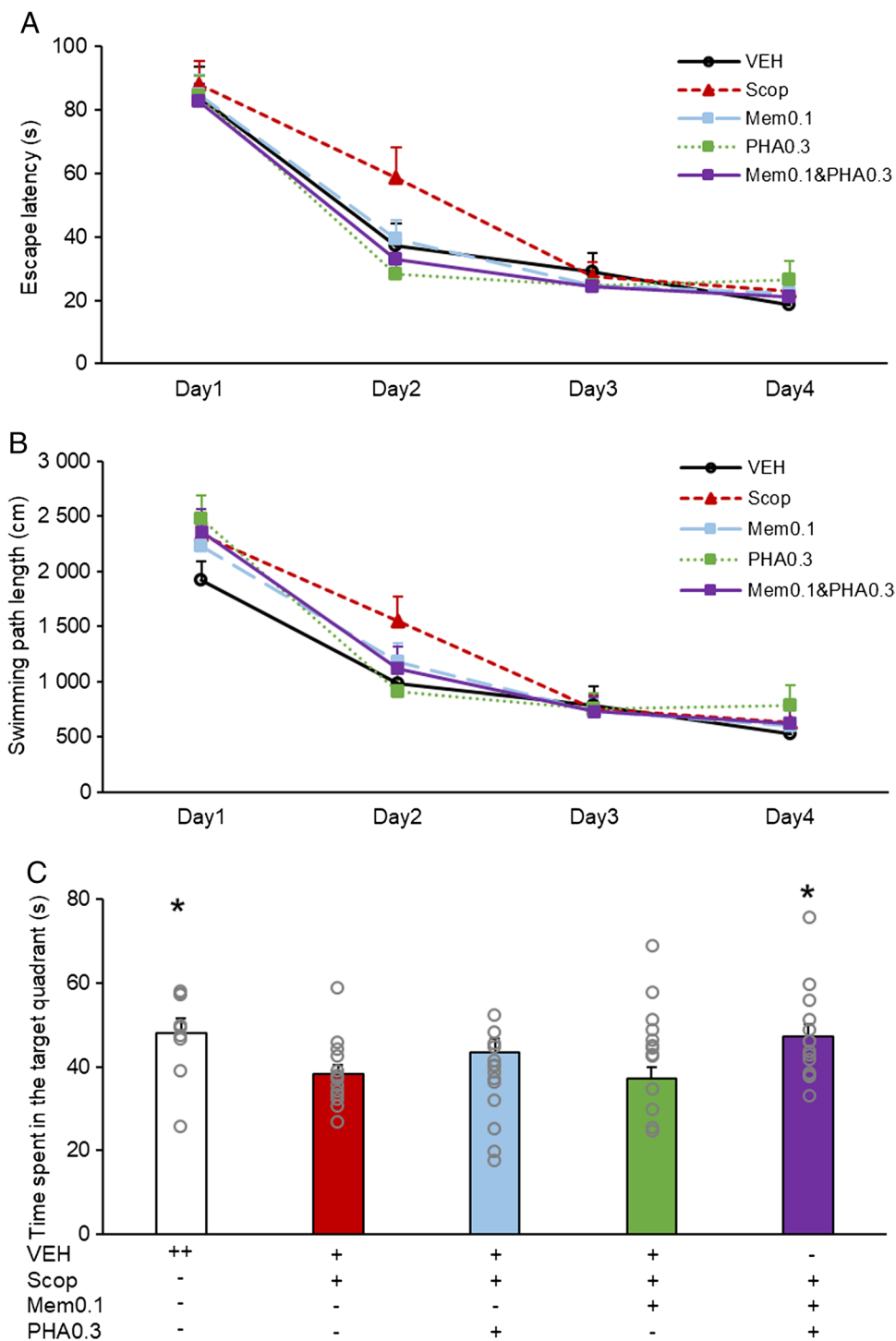
Swimming speed was also considered as a non-cognitive measure (Singh et al. 2016) to control the possible side-effects of pharmacological treatments (Fig. S1A and B). A significant main effect of treatments was found on the swimming speed (TREATMENT: $F(7, 71) = 3.289$, $p = 0.004$). Post-hoc

analysis showed that scopolamine increased the swimming speed in all treatment groups compared to animals in the control group reflecting that scopolamine alone increased the swimming speed of the animals (Control vs. Scop: 24.1 ± 0.5 cm/s vs. 27.7 ± 0.7 cm/s, $p = 0.001$), which was not further affected by treatments with memantine or PHA-543613 (Mem0.1: 26.7 ± 0.5 cm/s; Mem0.3: 26.5 ± 0.7 cm/s; Mem1.0: 25.8 ± 0.4 cm/s; PHA0.3: 27.9 ± 0.5 cm/s; PHA1.0: 25.8 ± 0.5 cm/s; PHA3.0: 28.3 ± 0.5 cm/s). Significant main effect of training (DAY: $F(3, 213) = 8.796$, $p < 0.001$) was also found without an interaction between TREATMENT and DAY ($F(21, 213) = 1.147$, $p = 0.302$), which suggests that the swimming speed of the animals increased independently from treatment during repeated testing.

Co-administration of memantine and PHA-543613

In the next experiment, a subeffective dose of memantine (0.1 mg/kg) was co-administered with a subeffective dose

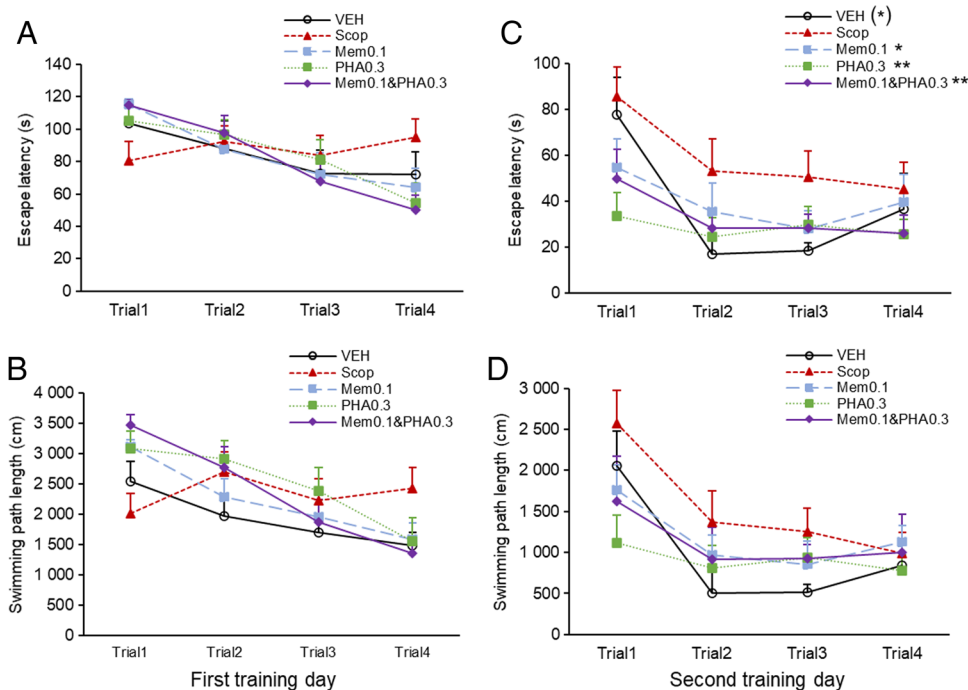
Fig. 2 Effects of co-administration of subeffective dose of memantine and PHA-543613 on spatial learning and recall of long-term memory. Overall escape latency (A) and swimming path length (B) during the training days (days 1–4) showed no effect of the treatments. Time spent in the target quadrant in the probe trial (day 5) (C) showed significant main effect of the treatments. Data are expressed as mean + SEM. Grey circles on the bar chart represent individual data points. Significant differences between a given treatment and the scopolamine-only treatment were marked with asterisks: * $p < 0.05$



of PHA-543613 (0.3 mg/kg). Doses were chosen on the basis of the probe trial in the dose–response experiments. The memory enhancer effect of the co-treatment was compared with the monotreatments using the same doses of PHA-543613 and memantine. In the learning phase (days 1–4), a significant main effect of training was found, as both the escape latency (Fig. 2A) and the swimming path length (Fig. 2B) significantly decreased during the four days

(DAY: escape latency: $F(3, 180) = 133.533, p < 0.001$; swimming path length: $F(3, 180) = 110.325, p < 0.001$). Neither monotreatments, nor co-administration of PHA-543613 and memantine exerted a significant main effect on escape latency (TREATMENT: $F(4, 60) = 1.144, p = 0.345$) or swimming path length (TREATMENT: $F(4, 60) = 0.426, p = 0.789$) similarly to the previous experiments with different memantine and PHA-543613 doses. Furthermore, the

Fig. 3 Effects of co-administration of subeffective dose of memantine and PHA-543613 on short-term memory. Escape latency (A) and swimming path length (B) on the first training day showed interaction between consecutive trials and treatments. Improvement between the first and fourth trials was significantly larger in all treatment groups compared to the scopolamine-only group. On the second training day, treatments exerted significant effects on escape latency (C). Swimming path length (D) on the second training day showed no effects of treatments. Data are expressed as mean \pm SEM. Significant differences between a given treatment and the scopolamine-only treatment were marked with asterisks: (*) $p=0.054$, (* $p<0.05$), (** $p<0.01$)



treatments did not significantly affect the effect of training on performance (TREATMENT \times DAY: escape latency: $F(12, 180) = 1.149$; $p = 0.323$; swimming path length: $F(12, 180) = 1.246$; $p = 0.255$).

Short-term memory of the animals was also analyzed which was based on the performance of the animals on the first training day (Fig. 3A, B). Results showed a significant interaction between treatments and trials on the first training day, thus treatments significantly affected the performance during training (TREATMENT \times TRIAL: escape latency: $F(12, 180) = 1.952$, $p = 0.031$; swimming path length: $F(12, 177) = 2.305$, $p = 0.009$). While almost all experimental groups showed gradual improvement during the four training trials on the first day, animals treated with scopolamine-only did not learn the location of the platform.

Contrasts between pairs of treatment groups and the first and last trials (trial1 vs. trial4) on the first day were also analyzed, and results showed that changes in escape latency and swimming path length were significantly different in the group treated with scopolamine only compared to the control group ([Control vs. Scop] \times [trial1 vs. trial4]: escape latency: 45.7 ± 18.4 (contrast estimate \pm SEM), $p = 0.016$; swimming path length: 1475.0 ± 515.7 , $p = 0.006$). These results indicate that scopolamine predominantly impaired the short-term component of spatial episodic learning. Furthermore, the scopolamine-induced learning deficit was significantly improved by memantine and PHA-543613 both in monotreatments and in co-administration of the same doses ([Scop vs. Mem0.1] \times [trial1

vs. trial4]: escape latency: 65.4 ± 16.3 , $p < 0.001$; swimming path length: 1939.4 ± 456.2 , $p < 0.001$; [Scop vs. PHA0.3] \times [trial1 vs. trial4]: escape latency: 65.3 ± 16.3 , $p < 0.001$; swimming path length: 1884.0 ± 464.9 , $p < 0.001$; [Scop vs. Mem0.1&PHA0.3] \times [trial1 vs. trial4]: escape latency: 79.0 ± 16.3 ; $p < 0.001$; swimming path length: 2524.0 ± 456.2 , $p < 0.001$).

Consequently, rats treated only with scopolamine still showed poor performance on the second training day (Fig. 3C, D). Here, a significant main effect of pharmacological treatments was found on escape latency on the second training day (TREATMENT: $F(4, 60) = 2.932$, $p = 0.028$) but not on path length (TREATMENT: $F(4, 60) = 1.661$, $p = 0.171$). Pairwise comparisons of escape latency data showed that control animals and animals who received the low memantine dose and low PHA-543613 dose in monotreatments or in co-administration performed better than rats treated with scopolamine only (control vs. Scop: 37.4 ± 6.7 s vs. 58.6 ± 9.4 s, $p = 0.054$; Scop vs. Mem0.1: 58.6 ± 9.4 s vs. 39.3 ± 6.0 s, $p = 0.048$; Scop vs. PHA0.3: 58.6 ± 9.4 s vs. 28.3 ± 6.2 s, $p = 0.002$; Scop vs. Mem0.1&PHA0.3: 58.6 ± 9.4 s vs. 33.0 ± 5.5 s, $p = 0.009$). Here, no significant interaction was found between groups and trials (TREATMENT \times TRIAL: escape latency: $F(12, 180) = 1.020$, $p = 0.432$; swimming path length: $F(12, 180) = 0.852$, $p = 0.597$), indicating that scopolamine-treated animals started to show a tendency of learning the platform location on the second training day.

In the probe trial (Fig. 2C), pharmacological treatments revealed a significant main effect on the time spent in the

target quadrant (TREATMENT: $F(4, 60) = 2.805, p = 0.033$). According to post-hoc analysis, the scopolamine-treated group spent less time in the target quadrant compared to the vehicle-treated control group (Control vs. Scop: 47.9 ± 3.5 s vs. 38.3 ± 2.1 s, $p = 0.035$) and subeffective doses of memantine and PHA-543613 in monotreatments did not attenuate scopolamine-induced amnesia (Scop vs Mem0.1: 38.3 ± 2.1 s vs 37.1 ± 2.8 s, $p = 0.766$; Scop vs PHA0.3: 38.3 ± 2.1 s vs. 43.3 ± 3.2 s, $p = 0.210$). However, the co-administration treatment with memantine and PHA-543613 effectively reversed the scopolamine-induced long-term memory deficit (Scop vs. Mem0.1&PHA0.3: 38.3 ± 2.1 s vs. 47.1 ± 2.9 s, $p = 0.029$), suggesting a beneficial interaction between memantine and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613.

Swimming speed was also affected in the co-administration study by both the training (DAY: $F(3, 180) = 10.093, p < 0.001$) and the treatments (TREATMENT: $F(4, 60) = 3.496, p = 0.012$). Furthermore, the treatments significantly affected the change in swimming speed over the course of the training (TREATMENT \times DAY: $F(12, 180) = 1.951, p = 0.031$). Contrast analysis revealed that the change of swimming speed from the 2nd to the 3rd training days was marginally significantly larger in the Control group than in the scopolamine-only treated group [Control vs. Scop] \times [day2 vs. day3]: $-3.2 \pm 1.7; p = 0.065$). As a result, the swimming speed of rats in the Control group on the last training day was similar to the groups treated with scopolamine (Fig. S1C).

Discussion

Here, we tested the hypothesis whether the co-administration of a selective alpha7 nAChR agonist PHA-543613 increases the cognitive enhancer effects of the NMDA-receptor antagonist memantine on spatial learning and short- and long-term memory performance in the Morris water maze task.

First, average escape latency and swimming path length data over the whole training period (days 1–4) showed that all groups – irrespective of the applied treatments – improved in finding the platform, suggesting the acquisition of sufficient spatial learning by the end of the training period even in the scopolamine-only treated group. It is reasonable to conclude that spatial navigation in a stressful situation (i.e., swimming for escaping the water) is such an immanent ability of rats that is fairly resistant to the relatively weak blockade of cholinergic neurotransmission. On the first training day, scopolamine increased the locomotor activity of the animals which was assessed by the increase of their swimming speed. Therefore, we also analyzed the length of the swimming path which measure yielded similar results as the analysis of escape latency.

Nevertheless, pharmacological treatments affected spatial short-term memory performance of task-naïve animals assessed on the very first MWM training day. Animals treated with scopolamine alone consequently failed to improve in finding the platform in the subsequent trials of the first training day. This learning impairment was effectively reversed by both the monotreatments and the co-administration of subeffective doses of memantine and PHA-543613 showing significant cognitive enhancement in both conditions. In addition, the 5th day probe trial performance – which is considered as a measure of the recall of long-term memory information (Vorhees and Williams 2006) – was also significantly impaired by scopolamine, and was only enhanced by the co-administration of memantine and PHA-543613, while the monotreatments with the same low doses were completely ineffective. Thus, the effects of the co-administration treatment were superior over the monotreatments in the enhancement of the recall of spatial long-term memory indicating a beneficial interaction between memantine and alpha7 nAChR agonist PHA-543613.

Although there are contradictory pieces of evidence about the beneficial effects of combination therapies using memantine and acetylcholinesterase enzyme inhibitors over their corresponding monotherapies (Alzheimer's Association 2016), recent preclinical findings using the combinations of memantine and alpha7 nAChR ligands seem to converge to more promising results in terms of cognitive enhancer effects. For example, in a previous research, combination treatment with low doses of galantamine and memantine significantly enhanced the performance of mice in the spontaneous alternation and object recognition tasks (Busquet et al. 2012). In a different study by Nikiforuk et al. (2016), the observed interaction of galantamine with memantine was more likely dependent on the alpha7 nAChR PAM activity of galantamine than on its acetylcholinesterase blocking activity, as the observed memory-enhancing effects of galantamine-memantine co-administration were blocked by the alpha7 nAChRs antagonist methyllycaconitine. Furthermore, in the same study, it was also demonstrated that cognitive flexibility and recognition memory were enhanced in rats when memantine was combined with galantamine or selective alpha7 nAChR PAMs (CCMI or PNU-120596) (Nikiforuk et al. 2016). In agreement with these results, in a more recent study from the same laboratory, the authors confirmed that alpha7 nAChR PAMs increase pro-cognitive effects of memantine in an object recognition memory task (Potasiewicz et al. 2020). In addition, in our previous study we also reported the improvement of spatial working memory of rats by the co-administration of memantine and the alpha7 nAChR agonist PHA-543613 in the spontaneous alternation (spatial working memory) task (Bali et al. 2019a). The above findings convergently suggest that the observed combination effects may well involve alpha7 nAChRs as common targets of memantine and PHA-543613.

The mechanisms underlying the interaction between alpha7 nAChR compounds and memantine are not yet clarified. It is well documented that memantine blocks tonic (potentially harmful) influx of Ca^{2+} ions through the NMDA receptor channel by the non-competitive antagonism of the NMDA receptor (Parsons et al. 2007). However, in an in vitro study it was demonstrated that memantine has an additional antagonist effect on alpha7 nAChRs, and that the affinity of memantine is actually higher for alpha7 nAChRs than for NMDA receptors (Aracava et al. 2005). Although the alpha7 nAChR antagonist effect of memantine seems to be difficult to relate to cognitive enhancement, recent pieces of evidence suggest that the inhibition of alpha7 nAChR-mediated activity may provide beneficial effects on neuronal function and cognition (Aracava et al. 2005). In addition, Ferchmin et al. 2003 demonstrated that the alpha7 nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA) – similarly to nicotine – ameliorates NMDA-induced neurotoxicity in hippocampal slices. Elsewhere, it was shown that MLA was also protective against beta-amyloid-induced neurotoxicity (Martin et al. 2004). Van Goethem et al. (2019) recently reported that low doses of MLA improved the cognitive function of rats in an object recognition task, and MLA caused potentiation rather than inhibition of the activity of the endogenous agonist acetylcholine at the alpha7 nAChR. PHA-543613 is a potent and selective agonist of alpha7 nAChRs that has been characterized by rapid brain penetration and has been found effective in both auditory sensory gating and novel object recognition memory in rats (Wishka et al. 2006). Bali et al. (2019b) reported that PHA-543613 also exerts inhibitory effects on the firing activity of neurons similar to MLA which effect was explained by the rapid desensitization of nAChRs. According to the above pieces of evidence, in certain circumstances agonists and antagonists of the alpha7 nAChRs may have a similar net effect on neuronal function and/or cognition, which may provide a possible explanation for the currently observed interaction between memantine and PHA-543613 (Banerjee et al. 2005; Buccafusco et al. 2009).

In conclusion, our present results confirm that there is a beneficial pharmacological interaction between memantine and alpha7 nAChR ligands in terms of cognitive enhancement, both in the short-term and in the long-term memory domains. Also, our study provides further experimental evidence supporting the novel hypothesis on the role of the alpha7 nAChR in the mechanism of action of memantine. In the present report we also provided a detailed analysis of the pharmacological effects on different aspects of cognitive function, and showed that scopolamine, PHA-543613, and memantine differently affect spatial learning, short-term spatial memory and the recall of long-term memory in rats. The present findings may facilitate the understanding of cognitive enhancer effects of memantine, a known

therapeutic agent as well as aid the development of more potent combinational therapeutic approaches against cognitive impairment.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05942-4>.

Acknowledgements The authors thank Klára Lencse for valuable technical assistance in animal care.

Author contribution NB—Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing, Visualization; ZKB—Conceptualization, Methodology, Supervision, Formal analysis, Data curation, Writing; SAT—Investigation, Data curation; LVN: Investigation; IH—Conceptualization, Methodology, Supervision, Resources, Funding acquisition, Writing.

Funding Open access funding provided by University of Pécs. This research was funded by the Hungarian National Brain Research Programme of the National Research, Development and Innovation Office of the Hungarian Government (Grant No. ‘2017–1.2.1-NKP-2017–00002’); by the National Research, Development and Innovation Fund of the Hungarian Government (Grant No. ‘K 129247’). The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Data Availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Alzheimer's Association, (2016) 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 12:459–509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX (2005) Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1195–1205. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.077172>
- Bali ZK, Bruszt N, Tadepalli SA et al (2019a) Cognitive enhancer effects of low memantine doses are facilitated by an alpha7

- nicotinic acetylcholine receptor agonist in scopolamine-induced amnesia in rats. *Front Pharmacol* 10:73. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00073>
- Bali ZK, Nagy LV, Budai D, Hernádi I (2019b) Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo. *Sci Rep* 9:9324. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45796-7>
- Banerjee P, Samoriski G, Gupta S (2005) Comments on “Memantine blocks $\alpha 7^*$ nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons.” *J Pharmacol Exp Ther* 313:928–929. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.081976>
- Buccafusco JJ, Beach JW, Terry AV (2009) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 328:364–370. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145292>
- Busquet P, Capurro V, Cavalli A et al (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>
- Deardorff WJ, Grossberg GT (2016) A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer’s disease. *Drug Des Devel Ther* 10:3267–3279. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>
- Dou K-X, Tan M-S, Tan C-C et al (2018) Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer’s disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimers Res Ther* 10:126. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0457-9>
- Farrimond LE, Roberts E, McShane R (2012) Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer’s disease: a systematic review. *BMJ Open* 2:1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000917>
- Ferchmin PA, Perez D, Eterovic VA, de Vellis J (2003) Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1071–1078. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.048173>
- Gaugler J, James B, Johnson T et al (2016) Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement* 12:459–509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- Koola MM, Nikiforuk A, Pillai A, Parsaik AK (2018) Galantamine-memantine combination superior to donepezil-memantine combination in Alzheimer’s disease: critical dissection with an emphasis on kynurenic acid and mismatch negativity. *J Geriatr Care Res* 5:57–67
- Martin SE, de Fiebre NEC, de Fiebre CM (2004) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-selective antagonist, methyllycaconitine, partially protects against beta-amyloid1-42 toxicity in primary neuron-enriched cultures. *Brain Res* 1022:254–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.016>
- Molino I, Colucci L, Fasanaro AM et al (2013) Efficacy of memantine, donepezil, or their association in moderate-severe Alzheimer’s disease: a review of clinical trials. *ScientificWorldJournal* 2013:925702. <https://doi.org/10.1155/2013/925702>
- Nikiforuk A, Potasiewicz A, Kos T, Popik P (2016) The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav Brain Res* 313:214–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.023>
- Parsons CG, Stöffler A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53:699–723. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>
- Parsons CG, 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>
- Potasiewicz A, Krawczyk M, Gzielo K et al (2020) Positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors enhance procognitive effects of conventional anti-Alzheimer drugs in scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res* 385:112547. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112547>
- Raina P, Santaguida P, Ismaila A et al (2008) Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 148:379–397. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-5-200803040-00009>
- Singh S, Kaur H, Sandhir R (2016) Fractal dimensions: A new paradigm to assess spatial memory and learning using Morris water maze. *Behav Brain Res* 299:141–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.023>
- Tadepalli SA, Kristóf Bali Z, Bruszt N et al (2019) Long-term cognitive impairment without diffuse axonal injury following repetitive mild traumatic brain injury in rats. *Behav Brain Res* 378:112268. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112268>
- Tsoi KKF, Chan JYC, Leung NWY et al (2016) Combination therapy showed limited superiority over monotherapy for Alzheimer disease: a meta-analysis of 14 randomized trials. *J Am Med Dir Assoc* 17:863.e1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.05.015>
- van Goethem NP, Paes D, Puzzo D et al (2019) Antagonizing $\alpha 7$ nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition. *Cell Signal* 62:109338. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.003>
- Vorhees CV, Williams MT (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>
- Wise LE, Lichtman AH (2007) The uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial-arm maze memory task. *Eur J Pharmacol* 575:98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.059>
- Wishka DG, Walker DP, Yates KM et al (2006) Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: Synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem* 49:4425–4436. <https://doi.org/10.1021/jm0602413>
- Woodruff-Pak DS, Tobia MJ, Jiao X et al (2007) Preclinical investigation of the functional effects of memantine and memantine combined with galantamine or donepezil. *Neuropsychopharmacology* 32:1284–1294. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301259>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Combination of memantine and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligands exerts superior efficacy over monotreatments to improve cognitive performance of aged rats

Nóra Bruszt^{1,2,3}, Zsolt Kristóf Bali^{1,3*}, Lili Veronika Nagy^{1,4}, Kornélia Bodó⁵, Péter Engelmann⁵, István Ledneczki⁶, Zsolt Némethy⁷, Balázs Lendvai^{7,8}, István Hernádi^{1,2,3,4}

¹Translational Neuroscience Research Group, Centre for Neuroscience, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 20 Ifjúság str., H-7624 Pécs, HUNGARY

²Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, 12 Szigeti str., H-7624 Pécs, HUNGARY

³Grastyán Endre Translational Research Centre, University of Pécs, 6 Ifjúság str., H-7624 Pécs, HUNGARY

⁴Department of Neurobiology, Institute of Biology, University of Pécs, 6 Ifjúság str., H-7624 Pécs, HUNGARY

⁵Institute of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pécs, 12 Szigeti str., H-7624 Pécs, HUNGARY

⁶Department of Chemistry, Gedeon Richter Plc., 19-21 Gyömrői str., H-1103 Budapest, HUNGARY

⁷Pharmacology and Drug Safety Research, Gedeon Richter Plc., 19-21 Gyömrői str., H-1103 Budapest, HUNGARY

⁸Department of Richter, Semmelweis University, 26 Üllői str. H1085 Budapest, HUNGARY.

***Corresponding author:**

Zsolt K. Bali, PhD
Grastyán Endre Translational Research Centre
University of Pécs
6 Ifjúság str.
H-7624 Pécs, HUNGARY
bali.zsolt.k@gmail.com

Abstract

Combination treatments based on pharmacological interactions at $\alpha 7$ nAChRs are promising therapeutic approaches for neurocognitive disorders (NCDs). Memantine, an already approved medication in some NCDs, may not only act as an antagonist of the glutamatergic NMDA receptors (NMDAR) but also serve as an antagonist of the cholinergic $\alpha 7$ nAChRs. Here we set out to utilize a combination treatment regime with an $\alpha 7$ nAChR-selective agonist (PHA-543613) and a novel proprietary $\alpha 7$ nAChR ligand with marked positive allosteric modulator (PAM) activity (CompoundX). The cognitive efficacy of combination treatments was tested in a naturally aged rat model. Naturally aged rats showed marked cognitive decline in the novel object recognition (NOR) test, and they displayed pathological changes at the molecular level in terms of various inflammatory markers. In addition, aged rats also exhibited cholinergic changes such as mRNA upregulation of $\alpha 7$ nAChRs. Memantine-PHA-543613 and memantine-CompoundX combination treatments successfully alleviated the age-related decline of recognition memory of rats by exceeding the null-effects of the corresponding subtherapeutic levels of monotreatments. Results indicate a positive interaction between memantine and $\alpha 7$ -nAChR agonists and PAMs, which reflects a prominent role of $\alpha 7$ nAChRs in the cognitive enhancement of combination treatments especially in age-related cognitive decline. Moreover, the putative direct action of memantine on $\alpha 7$ nAChRs may also contribute to the observed synergistic interaction between memantine and other selective $\alpha 7$ nAChR compounds.

1. Introduction

Aging is generally associated with emerging neurocognitive disorders (NCDs), that pose serious public health challenges worldwide (Hou et al. 2019; Llaurador-Coll et al. 2023). These age-related disorders are characterized by progressive neuronal dysfunction and deterioration of cognitive abilities and activities of daily living. Multiple cellular and molecular changes can be associated with age-related cognitive decline in humans and in preclinical animal models, and neuroinflammation is a general process underlying these pathological changes (Ownby 2010; Simen et al. 2011; Shobin et al. 2017; Angelova and Brown 2019; Thadathil et al. 2021). Thus, promising future treatment strategies should address neuroinflammatory mechanisms underlying the neurophysiological dysfunctions of the aging brain.

Currently, the non-competitive NMDA receptor antagonist memantine and different cholinesterase inhibitors (e.g., donepezil) can be offered as therapeutic options for patients with NCDs, however, several clinical observations indicate that these medications may provide only moderate and transient symptomatic benefits with very limited or no disease-modifying potential (Raina et al. 2008; Tsoi et al. 2016; Balázs et al. 2022). Therefore, development of new treatment strategies is still an unmet medical need and the discovery of new avenues for the treatment of NCDs would be crucial in the field (Sharma et al. 2019). The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) is considered a promising target to treat NCDs because it is primarily involved in learning and memory processes (Wallace and Bertrand 2015; Corradi and Bouzat 2016) and also plays a role in immune regulation (Zdanowski et al. 2015). It is well known that signaling through $\alpha 7$ nAChRs enhances both cholinergic and glutamatergic transmission contributing to memory improvement in preclinical disease models (Bali et al. 2015, 2017, 2019b). In addition, in recent years, stimulation of $\alpha 7$ nAChRs expressed by glial cells has been shown to reduce neuroinflammation by activating the cholinergic anti-inflammatory pathway (Conejero-Goldberg et al. 2008; Egea et al. 2015; Corradi and Bouzat 2016; Maurer and Williams 2017; Mizrachi et al. 2021) and, thus, also contributing to the reported therapeutic efficacy of $\alpha 7$ nAChRs in preclinical models of NCD (Echeverria et al. 2016; Foucault-Fruchard et al. 2017).

Combination therapies may be highly promising novel approaches in the treatment of age-related NCDs, since the co-application of pharmacological agents with different mechanisms of action may result in a superadditive (synergistic) increase in efficacy and/or enables the use of lower doses, while achieving the same effectiveness with less possible side-effects. Furthermore, combination treatments may offer a complex influence on the dysfunction of

signaling pathways and pathological processes involved in NCDs (Parsons et al. 2013), which may add up in beneficial disease-modifying pharmacological effects. Although the combination of acetylcholine esterase inhibitor (AChEI) donepezil with glutamatergic antagonist memantine is already in use in the treatment of Alzheimer's disease, clinical evidence is ambiguous about its superior cognitive outcomes over the corresponding monotherapies (Deardorff and Grossberg 2016; Knorz and Quante 2021). Consistent with this, preclinical studies also confirmed that combination treatment with AChEIs and memantine provides little or no beneficial outcome in different behavioral tests (e.g. radial arm maze, classical eyeblink conditioning) in animal models (Wise and Lichtman 2007; Woodruff-Pak et al. 2007). In contrast, available results suggest a more promising outcome in cases when memantine is combined with compounds acting directly on the $\alpha 7$ nAChRs (Koola et al. 2018). For example, co-administration of memantine with galantamine (which acts not only as an AChEI but also as a positive allosteric modulator (PAM) of $\alpha 7$ nAChRs) alleviates scopolamine-induced memory deficits in mice (Busquet et al. 2012) and delays natural forgetting in rats (Nikiforuk et al. 2016) with higher efficacy compared to the corresponding monotreatments. These findings are further supported by two recent studies from our laboratory, in which the combined effect of memantine and the selective $\alpha 7$ nAChR agonist PHA-543613 was tested on different cognitive functions in a scopolamine-induced transient amnesia model. First, we reported, that rats receiving memantine-PHA-543613 treatment showed better working memory performance in the spontaneous alternation task compared to rats receiving monotreatments (Bali et al. 2019a). Furthermore, our most recent findings indicate that the same treatment combination improved both short-term memory and recall of long-term memory of rats in the Morris water maze test (Bruszt et al. 2021). Based on the above findings, we previously suggested a potential pharmacodynamic interaction between $\alpha 7$ nAChR ligands and memantine, which was also supported by previous studies that reported higher affinity of memantine to $\alpha 7$ nAChRs than to NMDA receptors (Aracava et al. 2005a; Banerjee et al. 2005).

Taken together, the aim of the current study was to further investigate the behavioral level interaction between memantine and two different $\alpha 7$ nAChR agents (the orthosteric agonist PHA-543613 and a novel compound with PAM characteristics: CompoundX, a proprietary compound of Gedeon Richter Plc., Hungary, described in the patent WO 2020/012423 A1) in a preclinical animal model of age-related cognitive deficit. In the present study, naturally aged rats were used as they show age-related cognitive impairment and certain emerging pathological processes including neuroinflammation and apoptotic cell death, posing as one of the most relevant models of spontaneous, age-related cognitive decline in humans (Maher et al. 2005;

Frank et al. 2006). Since aging is not a uniform process neither in rodents nor in humans, individuals of the same age may exhibit varying cognitive performance in behavioral tasks which may mask smaller drug-induced effects. To tackle the above problem of the model, our further aim was to assess key molecular-level indicators of pathological and healthy aging animals by investigating the mRNA and protein expression of inflammatory biomarkers (IL-1 β , MIP-1 α), ciliary neurotrophic factor (CNTF), and α 7 nAChR in both memory-impaired and unimpaired animals.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Altogether 65 (comprising of 12-15 subjects/group) naturally aged (28 months old) and 12 young (4 months old) male Long Evans rats (Charles River Laboratories, Calco, Italy) weighing 350–500 g were applied in the current study. Animals were pair-housed under 12/12 h daily light/dark cycle with controlled temperature and humidity in the animal house of the Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Hungary. In the animal house, the lights were ON from 7 a.m. to 7 p.m., and the animals were tested in the light period. Rats were fed daily with controlled amount of food (17 g/animal laboratory chow) to prevent the development of obesity and other related health problems. Water was available ad libitum. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs, and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation (ÁTET) at the Ministry of Agriculture (license no.: BA02/2000–25/2015, BA02/2000-30/2021). All procedures fully complied with the Decree No. 40/2013. (II. 14.) of the Hungarian Government and the EU Directive 2010/63/EU on the Protection of animals used for scientific purposes.

2.2. Behavioural assessment

2.2.1. Novel object recognition test

Long-term declarative memory of the animals was evaluated with the NOR test paradigm. The experiments were carried out in an open field box which was made of grey-colored plywood, in size of 57.5 x 57.5 cm (length x width) surrounded by 39.5 cm high walls. The test protocol consisted of two trials: an acquisition trial followed by a test trial after 24 hours retention interval. In the acquisition trial, two identical objects were placed near the left and right corners of the box, and the rats were allowed to explore the environment and the objects for 3 min. For

the retention interval, animals were returned to their home cages and were transferred to the animal house. After 24 hours, novel object recognition was assessed in the test trial. One of the identical objects was changed with a novel one and rats were allowed to explore the objects for 3 min. In a within-subject experimental arrangement, four different object pairs were used that were distributed randomly between animals and experimental sessions in a counterbalanced Latin-square design.

Because of the innate novelty-seeking behavior of rats, successful recognition of the familiar object (normal memory function) is supposed to be manifested in the preference to explore the novel object. Thus, the time spent with familiar (Ef) and novel (En) objects was recorded, and a discrimination index (DI) was calculated based on the following formula:

$$DI = (En - Ef) / (En + Ef)$$

The DI appeared to be a positive number if the subject explored the novel object for a longer duration compared to the familiar object, the DI was negative if the familiar object was observed longer, and the DI was around zero if the two objects were observed for an almost equally long duration. Rats who did not observe the two objects together for at least 5 sec or observed only one of the objects (i.e., $DI = \pm 1.00$) were excluded from the analysis of the given session.

2.2.2. Drugs and routes of administration

PHA-543613 hydrochloride (Cat. No. 3092, Tocris), and memantine hydrochloride (Cat. No. 0773, Tocris) were dissolved in physiological saline and were applied in a final injection volume of 1 ml/kg. CompoundX (a proprietary compound of Gedeon Richter Plc., Hungary, described in the patent WO 2020/012423 A1, synthesized by Gedeon Richter Plc.) was dissolved in 5% Tween (in PBS) and was applied in a final injection volume of 2 ml/kg. All compounds were injected subcutaneously (SC) 45 min before the acquisition trial. In co-administration treatments, memantine and PHA-543613 or memantine and CompoundX were administered consecutively in two separate subcutaneous injections. When mono-treatments were tested, drugs that were not administered were replaced with the corresponding vehicle.

2.2.3. Experimental design

In the first part of the study, cognitive behavior of the animals was measured using the NOR paradigm. First, the baseline performance of aged and young rats was compared. After the successful demonstration of cognitive impairment in aged rats, pharmacological effects of

monotreatments with memantine, PHA-543613, or CompoundX, as well as co-administrations of memantine and one of the cholinergic agents, were tested in aged animals. In the pharmacological experiments, treatments were applied in a counterbalanced, within-subject design to achieve a fully randomized sequence of different treatments. Monotreatments with memantine were applied in the following doses: 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, and 1.0 mg/kg (Mem0.1, Mem0.3, and Mem1.0, respectively). PHA-543613 was administered in doses of 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, and 3.0 mg/kg (PHA0.3, PHA1.0, and PHA3.0, respectively) and CompoundX was administered in the doses of 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, and 3.0 mg/kg (CPDX0.3, CPDX1.0, and CPDX3.0, respectively). Then, co-administration of subeffective memantine and PHA-543613 doses were tested against the effects of the corresponding monotreatments by applying the following treatments in a counterbalanced Latin-square design: vehicle alone (VEH), memantine monotreatment in 0.01 mg/kg dose (Mem0.01), PHA-543613 monotreatment in 0.1 mg/kg dose (PHA0.1), and co-administration treatment (Mem0.01&PHA0.1). Similarly, the efficacy of memantine-CompoundX co-administration in comparison to the monotreatments was tested in a separate experiment using the following treatments: vehicle alone (VEH), memantine monotreatment in 0.01 mg/kg dose (Mem0.01), CompoundX monotreatment in 0.1 mg/kg dose (CPDX0.1), and co-administration treatment (Mem0.01&CPDX0.1).

2.3. Brain tissue collection and preparation

After completing the behavioral experiments, animals were anesthetized with an overdose of pentobarbital and were transcardially perfused. A subgroup of young and aged rats was perfused with 0.9% saline, their brains were rapidly removed and dissected into left and right neocortex (CTX), striatum (STR), and hippocampus (HC). The brain samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80 °C until biochemical analyses were performed.

2.4. RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR

The total RNA of the brain samples was extracted according to the manufacturer's protocol by applying the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The quality and quantity of RNA were assessed at 260 nm using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The cDNA was constructed from total RNA with High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) in 20 µl reactions using random hexamers following the manufacturer's protocol. The resulting cDNA was stored at

-20 °C. Target gene expressions were measured using real-time PCR using Maxima SYBRGreen MasterMix (Applied Biosystems, Waltham, USA) with an ABI Prism 7500 instrument (Applied Biosystems). The cDNAs were applied as a template for the amplification reactions. All samples were tested in duplicates. Primers were designed by Primer Express software (Thermo Fisher Scientific) considering the exon-intron boundaries for all target genes (Table 1). Cyclophilin A (CycA) was used as a housekeeping gene for the quantification of RNA. The thermal profile started at 95 °C for 10 min, 40 cycles of 35 sec at 95 °C, 35 sec at 60 °C, and 1 min at 72 °C.

Table 1. Primer sequences applied for qPCR

Target gene	GenBank Acc#	Primers (5'-3') ^a	Amplicon size (bp)
Cyclophilin A	BC059141	GGA AGC CAT GGA GCG TTT T AAT GCC CGC AAG TCA AAG AA	100
Nicotinic receptor $\alpha 7$	S53987	AGT GCT GCA AAG AGC CAT ACC ATG AGT ACA CAA GGG ATG AGC AGA T	100
CNTF	X17457	AGG CCC CGA GAG CAA AAT ACC ACC CAA TGC AAA CCA AA	90
MIP1alpha	NM_013025	AGC CGG GTG TCA TTT TCC T CCA GCT CAG TGA TGT ATT CTT GGA	90
IL-1 beta	NM_031512	GAG TCT GCA CAG TTC CCC AA ATG TCC CGA CCA TTG CTG TT	100

^aUpper and lower sequences represent forward and reverse primers, respectively.

2.5. Protein isolation and ELISA test

Total protein from the different brain regions was isolated in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1% SDS). The total protein concentrations of the samples were measured using BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL). Quantification of IL-1 β , MIP-1 α , CNTF, and $\alpha 7$ nAChR was carried out using Abxbexa (Cambridge, UK) ELISA kits with the following catalog numbers, respectively: abx155713, abx155822, abx155360, abx556026. ELISAs were performed

according to the manufacturer's protocols. Immediately after developing the final color-reaction of the assay, the absorbance was measured at 450 nm with an iEMS Reader microplate reader (Thermo Fisher Scientific).

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the IBM SPSS 20.0 software. In the NOR test, the time spent exploring the familiar and novel objects was compared using paired samples T-test to assess whether rats after a given treatment show normal recognition memory performance. The DIs of aged and young animals were compared using independent samples T-test. In pharmacological experiments, the main effects of treatments on DI were analyzed using linear mixed-effect model. Following a significant main effect, effects of the tested treatments were compared with the effect of the vehicle using post-hoc LSD test. RNA and protein expression levels of young, memory impaired, and unimpaired aged groups were compared using univariate ANOVA and post-hoc LSD test.

3. Results

3.1. Effects of aging on long-term recognition memory performance

To determine age-related cognitive impairment, novel object recognition memory of aged and young animals was assessed and compared. In the test trial after 24 hours retention interval, young animals spent significantly more time exploring the novel object than the familiar one (exploration time of the novel vs. familiar object: 9.8 ± 0.9 vs. 4.6 ± 0.4 , $t = 6.666$, $df = 11$, $p < 0.001$). As expected, no discrimination between the familiar and the novel objects was observed in the case of aged rats (novel vs. familiar: 8.1 ± 1.0 vs. 6.1 ± 0.7 , $t = 1.526$, $df = 10$, $p = 0.158$) (Fig. 1A). In addition, the DI of aged rats was significantly lower compared to young rats (aged vs. young: 0.130 ± 0.085 vs. 0.352 ± 0.039 , $t = 2.426$, $df = 21$, $p = 0.024$) (Fig. 1B). Results indicate that aged rats show remarkable deficits in the long-term declarative (recognition) memory.

3.2. Effects of monotreatments with cognitive enhancers memantine, PHA-543613, and CompoundX

The dose-response relationship of procognitive effects of memantine and the $\alpha 7$ nAChR ligands PHA-543613 and CompoundX was studied as the modulation of natural memory decline caused by aging. Unlike vehicle treatment, the administration of memantine (0.1 and 1.0 mg/kg) significantly increased the time spent with the exploration of the novel object as compared to the familiar object (time spent observing the novel vs. familiar: VEH: 9.3 ± 1.6 vs. 7.3 ± 1.1 , $t=1.489$, $df=10$, $p=0.167$; Mem0.1: 9.0 ± 1.3 vs. 5.5 ± 0.5 , $t=2.492$, $df=11$, $p=0.030$; Mem1.0: 8.7 ± 1.2 vs. 5.7 ± 1.0 , $t=2.737$, $df=10$, $p=0.021$). Thus, 0.1 and 1.0 mg doses of memantine reversed the age-related recognition memory deficit in rats. However, the effect on DI was not significant after any of the memantine monotreatments (0.1-1.0 mg/kg; $F(3, 32)=0.384$; $p=0.765$) (Fig. 2B).

Aged animals receiving PHA-543613 in 0.3 mg/kg and 1.0 mg/kg doses showed a preference towards the novel object (novel vs. familiar: PHA0.3: 10.4 ± 0.8 vs. 5.0 ± 0.8 , $t=6.354$, $df=12$, $p<0.001$; PHA1.0: 9.3 ± 1.2 vs. 6.7 ± 0.8 , $t=2.684$, $df=12$, $p=0.020$), while vehicle treated aged rats did not discriminate between the objects (novel vs. familiar: VEH: 9.4 ± 1.7 vs. 7.8 ± 1.1 , $t=0.799$, $df=10$, $p=0.443$) (Fig. 2C). Furthermore, PHA-543613 at the lowest dose (0.3 mg/kg) improved the DI of the aged animals compared to the vehicle-treatment ($F(3, 34.7)=4.189$; $p=0.012$; PHA0.3 vs. VEH: 0.38 ± 0.07 vs. 0.05 ± 0.12 , $p=0.012$) (Fig. 2D). CompoundX also enhanced memory performance of rats by restoring their ability to discriminate between the novel and familiar objects at 0.3 mg/kg dose (novel vs. familiar: CPDX0.3: 10.9 ± 1.4 vs. 5.3 ± 0.6 , $t=5.245$, $df=9$, $p=0.001$) (Fig. 2E). Significant main effect of CompoundX monotreatments was not observed on the DI ($F(3, 26.6)=1.093$; $p=0.369$). However, as Fig. 2F shows, the lowest dose of CompoundX (0.3 mg/kg) increased the mean DI similar to the lowest dose of PHA-543613 (0.3 mg/kg).

3.3 Co-administration of memantine with $\alpha 7$ nAChR compounds

In the next series of experiments, a subeffective dose of memantine (0.01 mg/kg) was co-administered with subeffective doses of $\alpha 7$ nAChR compounds PHA-543613 (0.1 mg/kg) or CompoundX (0.1 mg/kg). First, the cognitive enhancing effect of memantine-PHA-543613 combination was compared to the effects of the corresponding monotreatments. Results showed that rats after the treatment with memantine alone and in combination with PHA-543613 spent more time exploring the novel object than the familiar object (novel vs. familiar: Mem0.01:

8.1±0.8 vs. 5.4±0.5, $t=2.549$, $df=10$, $p=0.029$; Mem0.01&PHA01: 10.1±1.2 vs. 5.0±0.6, $t=3.544$, $df=11$, $p=0.005$) in contrast with vehicle treatment (novel vs. familiar: VEH: 6.5±1.0 vs. 7.2±1.1, $t=-0.465$, $df=10$, $p=0.652$). However, the monotreatment with PHA-543613 was not found effective (novel vs. familiar: PHA0.1: 8.2±1.3 vs. 6.7±1.1, $t=1.604$, $df=10$, $p=0.140$) (Fig. 3A). The applied treatments resulted in a marginal effect on DI ($F(3, 30)=2.727$; $p=0.062$). As expected, pairwise comparisons did not show any significant increase of DI by the low-dose monotreatments with memantine and PHA-543613 compared to the vehicle-treated aged control group (Mem0.01 vs. VEH: 0.19±0.07 vs. -0.06±0.12, $p=0.081$; PHA01 vs. VEH: 0.09±0.07 vs. -0.06±0.12, $p=0.298$). In contrast, DI was significantly increased by the combination treatment (Mem0.01&PHA01 vs. VEH: 0.31±0.10 vs. -0.06±0.12, $p=0.01$) indicating that the combination of the two distinct mechanisms passed a threshold to successfully reverse age-related recognition memory decline (Fig. 3B).

Similarly, the effects of the co-administration of memantine and CompoundX were also tested. As expected, animals who received low-dose memantine or CompoundX in monotreatments did not discriminate between the novel and the familiar objects (novel vs. familiar: Mem0.01: 6.5±0.8 vs. 5.2±0.6, $t=1.716$, $df=14$, $p=0.108$; CPDX0.1: 6.9±0.7 vs. 6.1±0.8, $t=0.965$, $df=13$, $p=0.352$). However, co-administration of memantine and CompoundX reversed age-related memory deficit as rats spent significantly more time with the exploration of the novel object after the combination treatment (novel vs. familiar: 9.8±1.2 vs. 4.5±0.6, $t=4.560$, $df=14$, $p<0.001$) (Fig. 3C). In addition, the combination of memantine and CompoundX also reached a significant effect on DI ($F(3, 41.7)=3.281$; $p=0.030$). Regarding monotherapies, age-related decrease of DI was not significantly attenuated by either memantine or CompoundX monotreatments (Mem0.01 vs. VEH: 0.11±0.08 vs. 0.17±0.06, $p=0.565$; CPDX0.1 vs. VEH: 0.07±0.08 vs. 0.17±0.06, $p=0.378$). However, the mean DI was marginally significantly increased by memantine-CompoundX co-administration (Mem0.01&PHA01 vs. VEH: 0.37±0.07 vs. 0.17±0.06, $p=0.055$) (Fig. 3D).

3.4. Effects of aging on mRNA expression levels of inflammatory factors and $\alpha 7$ nAChR in the brain

For further biochemical investigations, 5 young and 10 aged animals were sacrificed. Aged animals were further divided into memory-impaired (AI) and unimpaired (AU) aged groups, with 5 animals in each group, depending on their baseline cognitive performance. Rats who performed above the median DI were considered AU (DI range: 0.17 - 0.68), while rats with a DI lower than the median were considered AI rats (DI range: -0.66 - -0.01).

To evaluate the inflammatory profile and cholinergic aging, mRNA expression levels of various cytokines and $\alpha 7$ nAChR were assessed in neocortical, striatal, and hippocampal brain tissue samples of young, AI and AU rats.

Results of qRT-PCR analysis revealed that both AI and AU animals showed significantly higher IL-1 β mRNA levels in the neocortex and the striatum compared to young control rats (CTX: $F(2, 11)=5.631$, $p=0.021$; AI vs. young: 26.9 ± 4.7 vs. 9.7 ± 2.1 , $p=0.008$; AU vs. young: 22.2 ± 4.5 vs. 9.7 ± 2.1 , $p=0.047$; STR: $F(2, 11)=8.753$, $p=0.005$, AI vs. young: 55.3 ± 8.3 vs. 18.9 ± 2.4 , $p=0.002$; AU vs. young: 40.8 ± 7.2 vs. 18.9 ± 2.4 , $p=0.038$) (Fig. 4A-B). On the contrary, only AI animals exhibited a significant increase of IL-1 β mRNA in the hippocampus compared to young animals ($F(2, 12)=6.708$, $p=0.013$; AI vs. young: 35.6 ± 3.1 vs. 19.1 ± 3.6 , $p=0.005$), and a difference between AU and young groups was not found (AU vs. Young: 23.7 ± 3.4 vs. 19.1 ± 3.6 , $p=0.349$) (Fig. 4C).

MIP-1 α mRNA expression was upregulated in both AI and AU rats in all selected brain areas compared to young animals (CTX: $F(2, 12)=5.860$, $p=0.017$; AI vs. young: 75.6 ± 20.7 vs. 14.5 ± 3.8 , $p=0.006$; AU vs. young: 58.3 ± 8.0 vs. 14.5 ± 3.8 , $p=0.035$; STR: $F(2, 12)=45.5$, $p<0.001$; AI vs. young: 184.8 ± 22.7 vs. 42.6 ± 5.8 , $p<0.001$; AU vs. young: 232.1 ± 9.7 vs. 42.6 ± 5.8 , $p<0.001$; HC: $F(2, 12)=16.121$, $p<0.001$; AI vs. young: 122.1 ± 21.1 vs. 18.8 ± 1.6 , $p>0.001$; AU vs. young: 96.2 ± 9.5 vs. 18.8 ± 1.6 , $p=0.001$) (Fig. 4D-F). In the neocortex and the hippocampus the AI group showed the highest mean expression of MIP-1 α mRNA (Fig. 4D,F). CNTF mRNA expression levels were significantly increased in the AI group in the cortex and hippocampus compared to young animals (CTX: $F(2, 11)=4.167$, $p=0.045$; AI vs. young: 12.2 ± 2.3 vs. 6.4 ± 0.4 , $p=0.017$; HC: $F(2, 12)=4.099$, $p=0.044$; AI vs. young: 46.0 ± 8.2 vs. 28.1 ± 1.7 , $p=0.029$). In contrast, AU rats did not express increased mRNA levels of CNTF in these brain regions (CTX: AU vs. young: 7.9 ± 0.8 vs. 6.4 ± 0.4 , $p=0.507$; HC: AU vs. young: 28.0 ± 2.8 vs. 28.1 ± 1.7 , $p=0.990$) (Fig. 4G,I). CNTF mRNA expression in the striatum did not differ between the groups ($F(2, 12)=0.394$, $p=0.683$) (Fig. 4H).

AI rats also showed upregulated $\alpha 7$ nAChR mRNA levels in the examined brain areas compared to the young group, while the AU group expressed $\alpha 7$ nAChR mRNA levels similar to the young rats (CTX: $F(2, 11)=3.739$, $p=0.058$; AI vs. young: 28.6 ± 4.6 vs. 15.8 ± 1.3 , $p=0.020$; AU vs. young: 20.7 ± 3.2 vs. 15.8 ± 1.3 , $p=0.350$; STR: $F(2, 11)=5.635$, $p=0.021$; AI vs. young: 16.1 ± 0.9 vs. 13.5 ± 0.7 , $p=0.027$; AU vs. young: 12.7 ± 0.4 vs. 13.5 ± 0.7 , $p=0.489$; HC: $F(2, 12)=3.085$, $p=0.083$; AI vs. young: 68.7 ± 3.0 vs. 52.6 ± 5.4 , $p=0.047$; AU vs. young: 53.4 ± 6.5 vs. 52.6 ± 5.4 , $p=0.907$) (Fig. 4J-L).

3.5. Effects of aging on protein expression levels of inflammatory factors and $\alpha 7$ nAChR in the brain

Next, we analyzed the protein expression levels of IL-1 β , CNTF, MIP-1 α , and $\alpha 7$ nAChR in the neocortex, striatum, and hippocampus of young, AI, and AU rats.

Results of ELISA analysis revealed a significant increase of IL-1 β protein level in the striatum of AU but not of AI animals compared to the young control group (F(2, 12)=3.127, p=0.081; AU vs. young: 1.5 \pm 0.1 pg/ μ g vs. 1.1 \pm 0.1 pg/ μ g, p=0.032; AI vs. young: 1.4 \pm 0.1 pg/ μ g vs. 1.1 \pm 0.1 pg/ μ g, p=0.110) (Fig. 5B). In the neocortex and hippocampus no differences in IL-1 β expression were found between the groups (CTX: F(2, 7)=0.511, p=0.621; HC: F(2, 12)=0.061, p=0.941) (Fig. 5A,C).

Surprisingly, neither the AI nor AU groups showed a significant change in the expression of MIP-1 α protein in any of the tested brain regions (CTX: F(2, 7)=0.652, p=0.550; STR: F(2, 12)=0.051, p=0.950; HC: F(2, 12)=0.173, p=0.843) (Fig. 5D-F).

In contrast with mRNA expression levels, protein levels of hippocampal CNTF were significantly downregulated in the AI group compared to the young group (F(2, 12)=5.386, p=0.021; AI vs. young: 0.6 \pm 0.1 pg/ μ g vs. 1.3 \pm 0.2 pg/ μ g, p=0.007). In addition, there was a (non-significant) tendency to decreased CNTF protein expression level in the hippocampus of the AU group compared to young animals (AU vs. young: 0.9 \pm 0.1 pg/ μ g vs. 1.3 \pm 0.2 pg/ μ g, p=0.070) (Fig. 5I). In the cortex and the striatum, no significant main effect of aging could be observed on CNTF protein levels of rats (CTX: F(2, 7)=2.298, p=0.171; STR: F(2, 12)=2.167, p=0.151) (Fig. 5G,H).

There was no significant main effect on the protein expression level of $\alpha 7$ nAChR (CTX: F(2, 7)=1.882, p=0.222; STR: F(2, 12)=2.120, p=0.163; HC: F(2, 12)=0.383, p=0.690) (Fig. J-L). However, in the striatum, a (non-significant) tendency of upregulation of $\alpha 7$ nAChR was detected in the AU group compared to the young group (AU vs. Young: 2.1 \pm 0.1 pg/ μ g vs. 1.6 \pm 0.2 pg/ μ g, p=0.081) (Fig. 5K).

4. Discussion

The present study provides evidence for the beneficial procognitive effects of combination treatments by co-targeting glutamatergic and cholinergic neurotransmission in the brain using memantine and two $\alpha 7$ nAChR-selective agents in naturally aged rats. We confirmed that aged rats display substantial cognitive impairment compared to young rats which is in line with

several earlier preclinical studies (Burger et al. 2007; Long et al. 2009; Santín-Márquez et al. 2021). Monotreatments with memantine or two $\alpha 7$ nAChR ligands could alleviate the age-related cognitive impairment of rats at certain doses. Results showed that memantine at both the lowest (0.1 mg/kg) and highest (1.0 mg/kg) doses was able to improve recognition memory performance of aged rats, while both PHA-543613 and CompoundX exerted their maximum efficacy at the lowest 0.3 mg/kg dose following the usually observed pattern of cholinergic modulation which resembles an inverted U-shaped function (Bentley et al. 2011). Although 5 mg/kg memantine dose can be considered therapeutically relevant for rats (Parsons et al. 2007), there is supporting evidence for the effectiveness of memantine at 1.0 mg/kg or lower doses without undesirable behavioral side-effects. For example, Wise and Lichtman (2007) demonstrated that memantine below the 1.0 mg/kg dose improves the spatial memory of rats in the radial arm maze. In line with that, our latest study also confirmed the effectiveness of memantine at 1.0 mg/kg dose on the long-term spatial memory performance of rats in the Morris water maze task (Bruszt et al. 2021). Moreover, we have earlier reported that memantine, administered in a fairly low dose (0.1 mg/kg) also effectively reversed scopolamine-induced transient short-term memory deficit of rats in the spontaneous alternation task (Bali et al. 2019a). In the same experiment, we found the effective dose of PHA-543613 at 3 mg/kg (Bali et al. 2015). Surprisingly, in the present experiments a 10-fold lower dose of PHA-543613 (0.3 mg/kg) already successfully ameliorated the natural cognitive deficits of aged rats. The difference between the optimal doses of PHA-543613 in the different studies may be explained by the differences in the applied cognitive impairment model, and it suggests that more relevant preclinical data might be acquired using natural models of cognitive impairment such as aged animals in the present study. Other selective $\alpha 7$ nAChR agonists, e.g., AZD0328, were also reported as effective in improving NOR performance of mice at ultra-low doses (0.00178-1.78 mg/kg) (Sydserff et al. 2009; Werkheiser et al. 2011).

Next, we aimed to investigate the effects of co-administration of subeffective doses of memantine (0.01 mg/kg) and PHA-543613 (0.1 mg/kg), or memantine (0.01 mg/kg) and CompoundX (0.1 mg/kg). We found that the long-term recognition memory impairment in aged rats was effectively reserved by memantine-PHA-543613 combination treatment showing a superior cognitive enhancement effect over the corresponding monotreatments. In line with this, the memantine-CompoundX combination treatment also showed remarkable effectiveness, while low-dose monotreatments failed to enhance the recognition memory performance of aged rats. Taken together, the present results indicate a positive interaction between memantine and

$\alpha 7$ nAChR compounds, as they reversed age-derived cognitive decline in rats and exceeded the cognitive behavioral effect of the monotherapies. These findings suggest the role of $\alpha 7$ nAChRs in the observed interaction between memantine and $\alpha 7$ nAChR compounds which has been previously corroborated by several preclinical studies. For example, Nikiforuk et al. (2016) demonstrated that higher cognitive flexibility and enhanced recognition memory were observed in rats when memantine was combined with galantamine or selective $\alpha 7$ nAChR PAMs (CCMI or PNU-120596). In the same study, the effects of combination treatments were successfully blocked by the $\alpha 7$ nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA), indicating that cognitive enhancement by combination treatment was an $\alpha 7$ nAChR-dependent process. These results are further supported by the study of Busquet et al. (2012), showing that spontaneous alternation and object recognition of mice were facilitated by combining subeffective doses of galantamine and memantine. In addition, we have previously demonstrated that improvement of spatial short-term (working) and long-term memory may also be achieved with combination treatments using the $\alpha 7$ nAChR agonist PHA-543613 and memantine (Bali et al. 2019a; Bruszt et al. 2021).

The exact mechanism underlying the beneficial interaction between $\alpha 7$ nAChR compounds and memantine has not been clarified, yet. In general, according to our present knowledge, exogenous agonists induce the direct, but transient activation of $\alpha 7$ nAChRs, while PAMs rather potentiate the effect of the endogenous ligand (acetylcholine) through positive allosteric modulation of the receptor in addition to reduce its desensitization (Wallace and Bertrand 2015). Positive allosteric modulators seem to be viable therapeutic approaches in NCDs, and $\alpha 7$ nAChR-related mechanisms were determined beneficial in combination treatments as they could similarly facilitate the efficacy of memantine as a cognitive enhancer. An in vitro study in mice brain slices showed that memantine exerts an antagonistic effect on $\alpha 7$ nAChRs and that it shows higher affinity to $\alpha 7$ nAChRs than to NMDA receptors (Aracava et al. 2005). In addition, $\alpha 7$ nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA) has been proven to improve memory acquisition in rats at low doses, suggesting a final cognitive effect similar to that of the agonists of the $\alpha 7$ nAChR (van Goethem et al. 2019). Accordingly, it can be concluded that the action of memantine on $\alpha 7$ nAChRs may also be involved in the pro-cognitive effects of the combination treatments, especially at low doses, thus $\alpha 7$ nAChRs may serve as the common targets of memantine and PHA-543613 or CompoundX. Our results clearly demonstrated that two distinct mechanisms of action – activation of nAChRs and memantine-induced multiple cellular effects on different neurotransmitter receptors – can result in a synergistic action to alleviate the observed age-related decline in cognitive performance.

Furthermore, in our current study, mRNA and protein expression levels of multiple immunological markers have been investigated, because increased state of neuroinflammation in the aging brain can be considered main pathological hallmark of NCDs (Ownby 2010; Ahmad et al. 2022). To evaluate the differences between normal and pathological aging on the cellular level, the neuroinflammatory state of aged rats with normal and impaired memory performance was compared. We demonstrated a similar pattern of mRNA expression levels of IL-1 β and MIP-1 α in almost all examined brain areas between the groups. Results indicate that both AU and AI groups exhibited an elevated mRNA upregulation of IL-1 β and MIP-1 α , which was generally more pronounced during ‘pathological’ aging suggesting a shift toward a pro-inflammatory state of the brain of AI animals. However, the increased mRNA expression was manifested in higher protein levels only in the case of IL-1 β in the striatum of AU rats compared to young rats. These data are in agreement with a recent study assessing the protein expression of a wide range of pro-inflammatory markers (Perkins et al. 2021). They found no evidence of elevated expression of most basal cytokines and chemokines using total tissue content analysis in aged animals.

Neurotrophic factors such as BDNF and CNTF are known to be neuroprotective since they can promote synaptic plasticity and neuronal survival (Hagg et al. 1992; Garcia et al. 2010; Askvig and Watt 2019; Wu et al. 2020). Indeed, in our study, CNTF protein expression was significantly lower in the hippocampus of aged animals with memory impairment compared to young rats, and a tendency was also observed towards lower protein levels in the cortex of aged rats. Surprisingly, the cortical and hippocampal CNTF mRNA was upregulated in AI groups. The opposite direction of change in the mRNA and protein levels might be explained by a mechanism that aims at the compensation of lower neurotrophic support at the transcriptional level during aging. However, the reason why the upregulation of CNTF mRNA expression may not be manifested in increased protein expression levels will be investigated by future studies. Aged animals may serve as useful models of NCDs not just because of the elevated neuroinflammation in the brain but also the cholinergic deficits in NCDs, that are accounted for contributing to the decline of learning and memory processes. Therefore, the expression of $\alpha 7$ nAChR mRNA and protein was also investigated in AI and AU rats. We found that AI rats exhibited a robust upregulation of $\alpha 7$ nAChR mRNA in all examined brain regions with no significant changes in the $\alpha 7$ nAChR expression at the protein level. However, it must be noted that a tendency toward increased mean protein expression of $\alpha 7$ nAChR was observed in the neocortex. Probably, underestimated sample sizes and the low sensitivity of the ELISA method compared to RT-PCR may explain why no systematic increase in protein levels could be

statistically confirmed as a result of the upregulation of $\alpha 7$ nAChR mRNA in the brain of aged rats. Previous body of evidence in the literature is also ambiguous on the change of $\alpha 7$ nAChR expression in the brain during aging. Several studies found that expression of $\alpha 7$ nAChRs markedly decreased in NCDs, mainly in brain areas related to cognitive functions such as the frontal cortex and hippocampus (Burghaus et al. 2000; Wevers et al. 2000; Hernandez et al. 2010; Ren et al. 2020). However, opposite findings were also reported for age-related upregulation of $\alpha 7$ nAChRs, particularly on the mRNA level, which was also confirmed by our current observations (Nordberg 2001; Kihara and Shimohama 2004; Conejero-Goldberg et al. 2008). Nevertheless, a supposed upregulation of $\alpha 7$ nAChRs may also explain the fairly low effective doses of selective $\alpha 7$ nAChR agents in aged rats, namely that PHA-543613 ameliorated the cognitive deficit of aged rats in a 10-fold lower dose in the present study compared to that in scopolamine-treated young rats in our earlier studies (Bali et al., 2015, 2019a).

In conclusion, in the present study, we confirmed the beneficial interaction between memantine and $\alpha 7$ nAChR acting agents in naturally aged rats demonstrating a translationally more relevant cognitive improvement that might be a target for future procognitive therapy. The relevance of naturally aged rats for modeling human NCDs was also demonstrated by the animals showing characteristic neuropathological changes also at the molecular level, such as elevated levels of neuroinflammatory markers and decreased levels of neurotrophic support to the cells. Combination treatment with memantine and PHA-543613 or memantine and CompoundX successfully alleviated the age-related cognitive decline, moreover efficacy of both combinations was superior over the corresponding monotreatments. Based on our results, we further hypothesize a prominent role of $\alpha 7$ nAChR in the cognitive enhancer effects of the combination treatments in clinical conditions with cognitive decline in older ages. Therapeutic potential of combination treatments that are based on pharmacological interactions on the $\alpha 7$ nAChRs is also supported by the finding that expression of the receptors may become highly upregulated in aging, thus, providing well-accessible binding sites for their pharmacological modulation.

5. Acknowledgements

Behavioral experiments were performed in collaboration with the Animal Facility at the Szentágothai Research Centre of the University of Pécs. We are grateful to Kitti Schmeltzer for animal care.

The scientific work/research and/or results disclosed in this article were reached with the sponsorship of the Gedeon Richter Talentum Foundation in the framework of the Gedeon Richter Excellence PhD Scholarship of Gedeon Richter Plc.

6. Funding

This study was supported by the UNKP-22-3 new National Excellence Program of the Ministry for Culture and Innovation from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (NB) and by the National Research, Development and Innovation Office of the Hungarian Government (grant no. ‘K 129247’, IH). The funders had no role in the design of the study, in the collection, analysis, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

7. Author Contributions:

NB: Methodology, Investigation, Visualization, Formal analysis, Data curation, Writing; ZKB: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing; LVN: Methodology, Investigation, Data curation, Writing; IL: Conceptualization, Writing; LB: Conceptualization, Writing; ZN: Conceptualization, Writing; IH: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing, Resources, Funding acquisition.

8. Data Availability Statement

Data is available on request from the authors.

9. Conflicts of Interest

IL, ZN, and BL are employees of Gedeon Richter Plc. This does not alter the authors’ adherence to journal policies on sharing data and materials. The remaining authors are academic researchers and declare that the research was conducted in the absence of any commercial, non-financial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

10. References

- Ahmad MA, Kareem O, Khushtar M, et al (2022) Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia. *Int J Mol Sci* 23:.. <https://doi.org/10.3390/ijms23020616>
- Angelova DM, Brown DR (2019) Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J Neurochem* 151:676–688. <https://doi.org/10.1111/jnc.14860>

- Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX (2005a) Memantine blocks $\alpha 7^*$ nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1195–205.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.077172>
- Aracava Y, Pereira EFR, Maelicke A, Albuquerque EX (2005b) Memantine Blocks $\alpha 7^*$ Nicotinic Acetylcholine Receptors More Potently Than N -Methyl- D -aspartate Receptors in Rat Hippocampal Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1195–1205.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.077172.with>
- Askvig JM, Watt JA (2019) Absence of axonal sprouting following unilateral lesion in 125-day-old rat supraoptic nucleus may be due to age-dependent decrease in protein levels of ciliary neurotrophic factor receptor alpha. *J Comp Neurol* 527:2291–2301.
<https://doi.org/10.1002/cne.24675>
- Balázs N, Bereczki D, Ajtay A, et al (2022) Cholinesterase inhibitors for the treatment of dementia: real-life data in Hungary. *GeroScience* 44:253–263.
<https://doi.org/10.1007/s11357-021-00470-7>
- Bali ZK, Bruszt N, Tadeplali SA, et al (2019a) Cognitive Enhancer Effects of Low Memantine Doses Are Facilitated by an $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. *Front Pharmacol* 10:73.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00073>
- Bali ZK, Inkeller J, Csurgyók R, et al (2015) Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav Brain Res* 278:404–10.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.030>
- Bali ZK, Nagy LV, Budai D, Hernádi I (2019b) Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo. *Sci Rep* 9:9324.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45796-7>
- Bali ZK, Nagy LV, Hernádi I (2017) $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Play a Predominant Role in the Cholinergic Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Evoked Firing Responses of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *Front Cell Neurosci* 11:271.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00271>
- Banerjee P, Samoriski G, Gupta S (2005) Comments on “Memantine blocks $\alpha 7^*$ nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons”. *J Pharmacol Exp Ther* 313:928–9; author reply 930–3.

<https://doi.org/10.1124/jpet.104.081976>

- Bentley P, Driver J, Dolan RJ (2011) Cholinergic modulation of cognition: Insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Prog Neurobiol* 94:360–388.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.002>
- Bruszt N, Bali ZK, Tadepalli SA, et al (2021) Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer’s disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task. *Psychopharmacology (Berl)*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-021-05942-4>
- Burger C, Cecilia López M, Feller JA, et al (2007) Changes in transcription within the CA1 field of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Learn Mem* 87:21–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.05.003>
- Burghaus L, Schütz U, Krempel U, et al (2000) Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Mol Brain Res* 76:385–388. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00031-0)
- Busquet P, Capurro V, Cavalli A, et al (2012) Synergistic effects of galantamine and memantine in attenuating scopolamine-induced amnesia in mice. *J Pharmacol Sci* 120:305–9. <https://doi.org/10.1254/jphs.12166SC>
- Conejero-Goldberg C, Davies P, Ulloa L (2008) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: A link between inflammation and neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev* 32:693–706.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.10.007>
- Corradi J, Bouzat C (2016) Understanding the Bases of Function and Modulation of 7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* 90:288–299.
<https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>
- Deardorff WJ, Grossberg GT (2016) A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer’s disease. *Drug Des Devel Ther* 10:3267–3279. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>
- Echeverria V, Yarkov A, Aliev G (2016) Positive modulators of the $\alpha 7$ nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer’s disease. *Prog Neurobiol* 144:142–157. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.002>
- Egea J, Buendia I, Parada E, et al (2015) Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol* 97:463–472.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.032>
- Foucault-Fruchard L, Doméné A, Page G, et al (2017) Neuroprotective effect of the alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model.

- Neuroscience 356:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.019>
- Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, et al (2006) mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging* 27:717–722. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.013>
- Garcia P, Youssef I, Utvik JK, et al (2010) Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:7516–7527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4182-09.2010>
- Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8:145–158. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90116-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90116-U)
- Hernandez CM, Kaye R, Zheng H, et al (2010) Loss of $\alpha 7$ nicotinic receptors enhances β -amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:2442–2453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5038-09.2010>
- Hou Y, Dan X, Babbar M, et al (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15:565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Kihara T, Shimohama S (2004) Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:99–105
- Knorz AL, Quante A (2021) Alzheimer's Disease: Efficacy of Mono- and Combination Therapy. A Systematic Review. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 35:475–486. <https://doi.org/10.1177/08919887211044746>
- Koola MM, Nikiforuk A, Pillai A, Parsaik AK (2018) Galantamine-memantine combination superior to donepezil- memantine combination in Alzheimer ' s disease : critical dissection with an emphasis on kynurenic acid and mismatch negativity. *J Geriatr Care Res* 5:57–67
- Lecca D, Jung YJ, Scerba MT, et al (2022) Role of chronic neuroinflammation in neuroplasticity and cognitive function: A hypothesis. *Alzheimer's Dement* 1–14. <https://doi.org/10.1002/alz.12610>
- Llaurador-Coll M, Rios S, García-Gavilán JF, et al (2023) Plasma levels of neurology-related proteins are associated with cognitive performance in an older population with overweight/obesity and metabolic syndrome. *GeroScience*. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00764-y>
- Long LH, Liu RL, Wang F, et al (2009) Age-related synaptic changes in the ca1 stratum radiatum and spatial learning impairment in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:675–

681. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05132.x>

- Maher FO, Nolan Y, Lynch MA (2005) Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging* 26:717–728. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.002>
- Maurer S V., Williams CL (2017) The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. *Front Immunol* 8:1489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>
- Mizrachi T, Vaknin-Dembinsky A, Brenner T, Treinin M (2021) Neuroinflammation modulation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and its chaperone, ric-3. *Molecules* 26:1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules26206139>
- Nikiforuk A, Potasiewicz A, Kos T, Popik P (2016) The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav Brain Res* 313:214–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.023>
- Nordberg A (2001) Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 49:200–210. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01125-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01125-2)
- Ownby RL (2010) Neuroinflammation and cognitive aging. *Curr Psychiatry Rep* 12:39–45. <https://doi.org/10.1007/s11920-009-0082-1>
- Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I (2013) Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 24:358–69. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9398-z>
- Parsons CG, Stöffler A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53:699–723. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>
- Perkins AE, Piazza MK, Vore AS, et al (2021) Assessment of neuroinflammation in the aging hippocampus using large-molecule microdialysis: Sex differences and role of purinergic receptors. *Brain Behav Immun* 91:546–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.013>
- Raina P, Santaguida P, Ismaila A, et al (2008) Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 148:379–97. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-5-200803040-00009>
- Ren JM, Zhang SL, Wang XL, et al (2020) Expression levels of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in the brains of patients with alzheimer's disease and their effect on synaptic

proteins in SH-SY5Y cells. *Mol Med Rep* 22:2063–2075.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11253>

Santín-Márquez R, Ramírez-Cordero B, Toledo-Pérez R, et al (2021) Sensory and memory processing in old female and male Wistar rat brain, and its relationship with the cortical and hippocampal redox state. *GeroScience* 43:1899–1920.

<https://doi.org/10.1007/s11357-021-00353-x>

Sharma P, Srivastava P, Seth A, et al (2019) Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 174:53–89. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.006>

Shobin E, Bowley MP, Estrada LI, et al (2017) Microglia activation and phagocytosis: relationship with aging and cognitive impairment in the rhesus monkey. *GeroScience* 39:199–220. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9965-y>

Simen AA, Bordner KA, Martin MP, et al (2011) Cognitive dysfunction with aging and the role of inflammation. *Ther Adv Chronic Dis* 2:175–195.

<https://doi.org/10.1177/2040622311399145>

Sydserrff S, Sutton EJ, Song D, et al (2009) Selective $\alpha 7$ nicotinic receptor activation by AZD0328 enhances cortical dopamine release and improves learning and attentional processes. *Biochem Pharmacol* 78:880–888. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.005>

Thadathil N, Nicklas EH, Mohammed S, et al (2021) Necroptosis increases with age in the brain and contributes to age-related neuroinflammation. *GeroScience* 43:2345–2361.

<https://doi.org/10.1007/s11357-021-00448-5>

Tsoi KKF, Chan JYC, Leung NWY, et al (2016) Combination Therapy Showed Limited Superiority Over Monotherapy for Alzheimer Disease: A Meta-analysis of 14 Randomized Trials. *J Am Med Dir Assoc* 17:863.e1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.05.015>

van Goethem NP, Paes D, Puzzo D, et al (2019) Antagonizing $\alpha 7$ nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition. *Cell Signal* 62:109338. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.003>

Wallace TL, Bertrand D (2015) Neuronal $\alpha 7$ Nicotinic Receptors as a Target for the Treatment of Schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 124:79–111.

<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.08.003>

Werkheiser JL, Sydserrff S, Hubbs SJ, et al (2011) Ultra-low exposure to α -7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonists elicits an improvement in cognition that corresponds with an increase in α -7 receptor expression in rodents: implications for low

dose clinical efficacy. *Neuroscience* 186:76–87.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.033>

Wevers A, Burghaus L, Moser N, et al (2000) Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: Postmortem investigations and experimental approaches. *Behav Brain Res* 113:207–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00215-1)

Wise LE, Lichtman AH (2007) The uncompetitive N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial-arm maze memory task. *Eur J Pharmacol* 575:98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.059>

Woodruff-Pak DS, Tobia MJ, Jiao X, et al (2007) Preclinical investigation of the functional effects of memantine and memantine combined with galantamine or donepezil. *Neuropsychopharmacology* 32:1284–94. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301259>

Wu SY, Pan BS, Tsai SF, et al (2020) BDNF reverses aging-related microglial activation. *J Neuroinflammation* 17:1–18. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01887-1>

Zdanowski R, Krzyzowska M, Ujazdowska D, et al (2015) Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. *Cent Eur J Immunol* 40:373–379. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.54602>

Figures

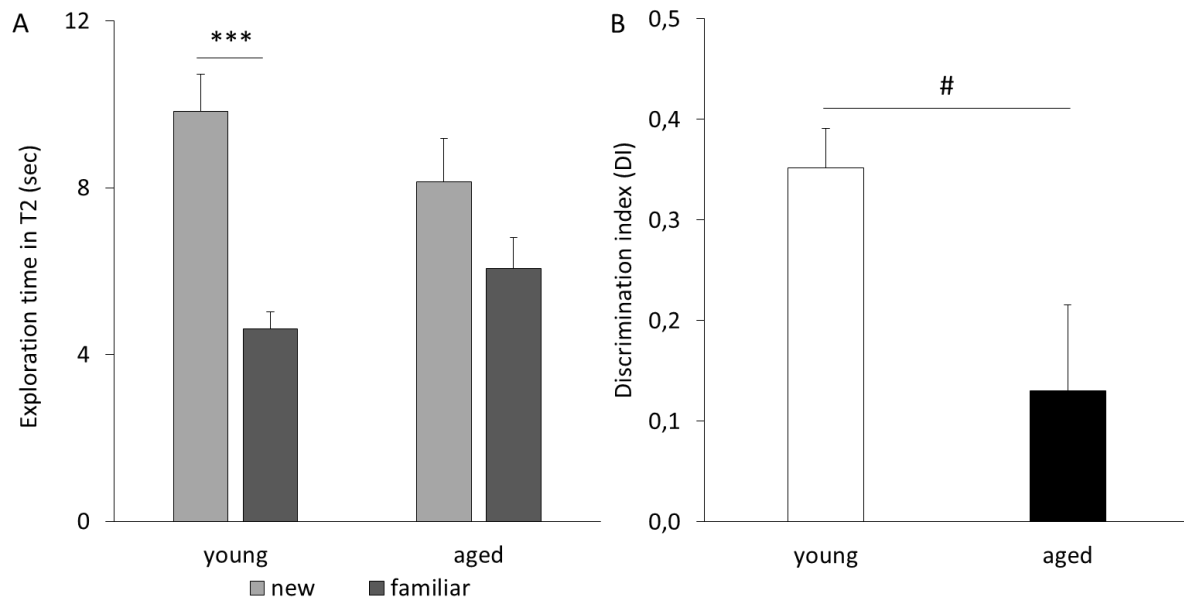


Figure 1. Comparison of aged and young animals in the NOR test. A: Young rats spent significantly more time exploring the novel object compared to the familiar one, while aged rats did not discriminate between the novel and the familiar objects. B: DI of aged rats was significantly lower compared to young rats. Asterisks mark significant difference in the time spent with the exploration of the novel and the familiar objects: *** $p < 0.001$ (paired samples T-test). Hash indicates significant difference between the DI of aged and young animals: # $p < 0.05$ (independent samples T-test).

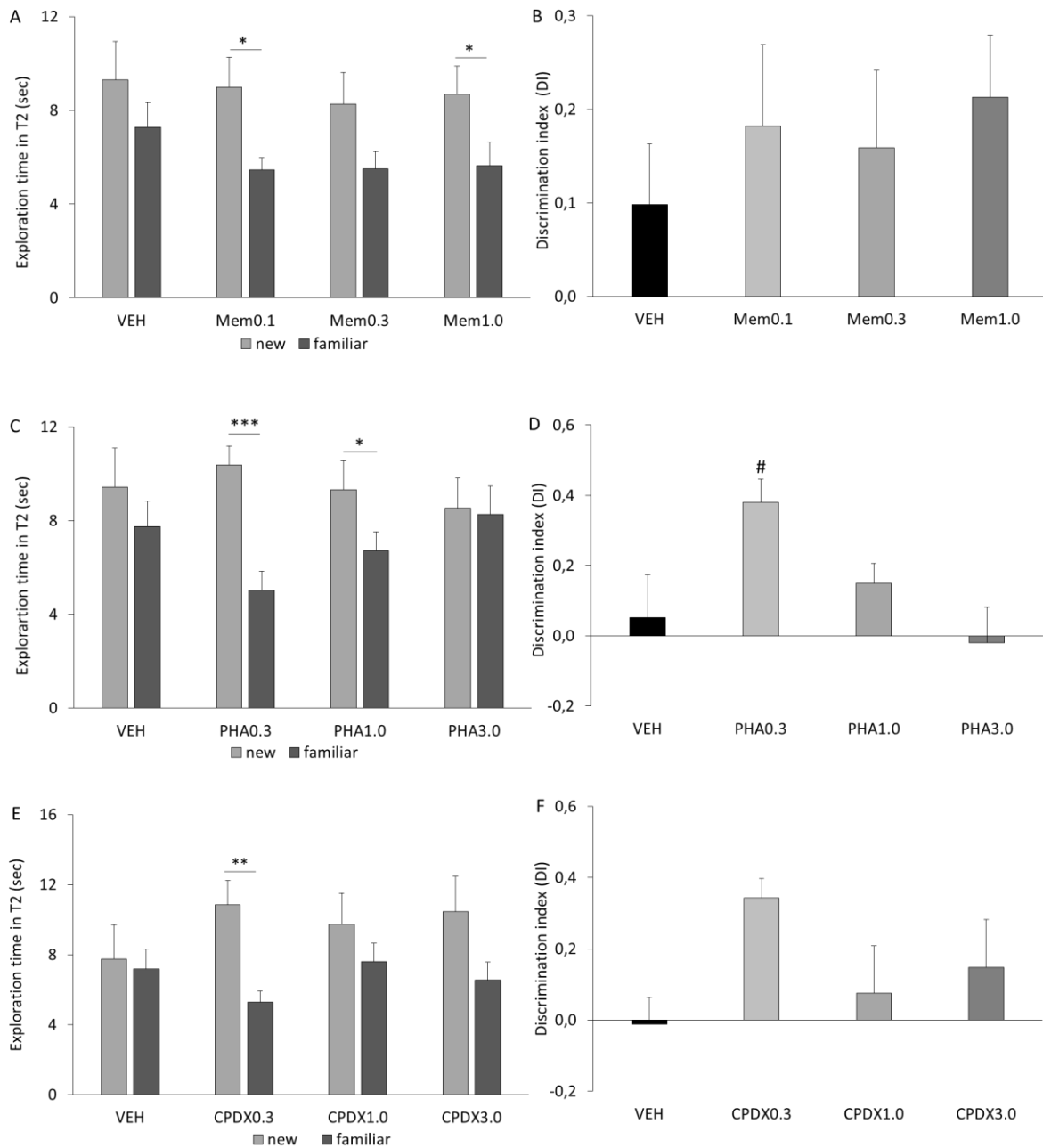


Figure 2. Effects of monotreatments with memantine, PHA-543613 and CompoundX on NOR performance of aged rats. A: Animals received memantine in the lowest (0.1 mg/kg) and in the highest (1.0 mg/kg) dose showed preference towards the exploration of the novel object compared to the familiar one. B: However, DI was not significantly increased by memantine. C: Aged rats that received PHA-543613 in 0.3 mg/kg and 1.0 mg/kg dose explored the novel object for significantly longer time compared to the exploration of the familiar one. D: PHA-543613 in the lowest dose (0.3 mg/kg) improved the DI of aged rats compared to the corresponding vehicle treatment. E: Aged rats that received CompoundX in the lowest dose (0.3 mg/kg) discriminated between the novel and the familiar objects. F: Discrimination index

was not significantly increased by CompoundX. Asterisks mark significant difference in the time spent with the exploration of the novel and the familiar objects: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (paired samples T-test). Hash indicates significantly different DI compared to the corresponding vehicle treatment: # $p < 0.05$ (linear mixed-effect model+post-hoc LSD) .

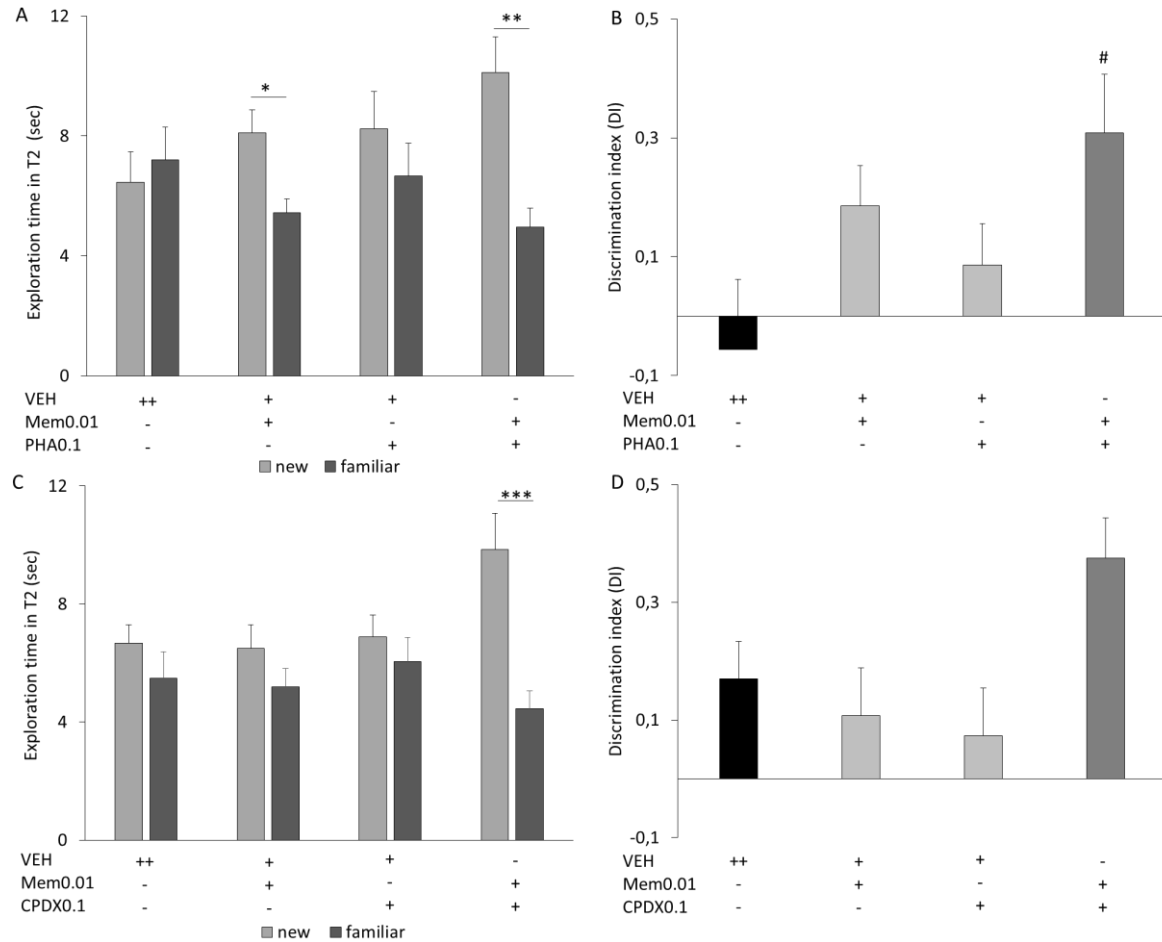


Figure 3. Effects of combination treatments with memantine and $\alpha 7$ -nAChR compounds on NOR performance of aged rats. A: Aged rats received memantine alone and in combination with PHA-543613 spent more time exploring the novel object than the familiar one. B: Memantine+PHA-543613 combination treatment significantly improved the DI of aged rats compared to the vehicle-treated group. C: Aged rats that received memantine+CompoundX combination treatment discriminated between the novel and the familiar objects. D: Memantine+CompoundX combination treatment significantly increased the DI of aged rats compared to the vehicle treatment. Asterisks mark significant difference between exploration time of the novel and the familiar objects: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (paired samples T-test). Hash indicates significantly different DI compared to the corresponding vehicle treatment: # $p < 0.05$ (linear mixed-effect model+post hoc LSD) .

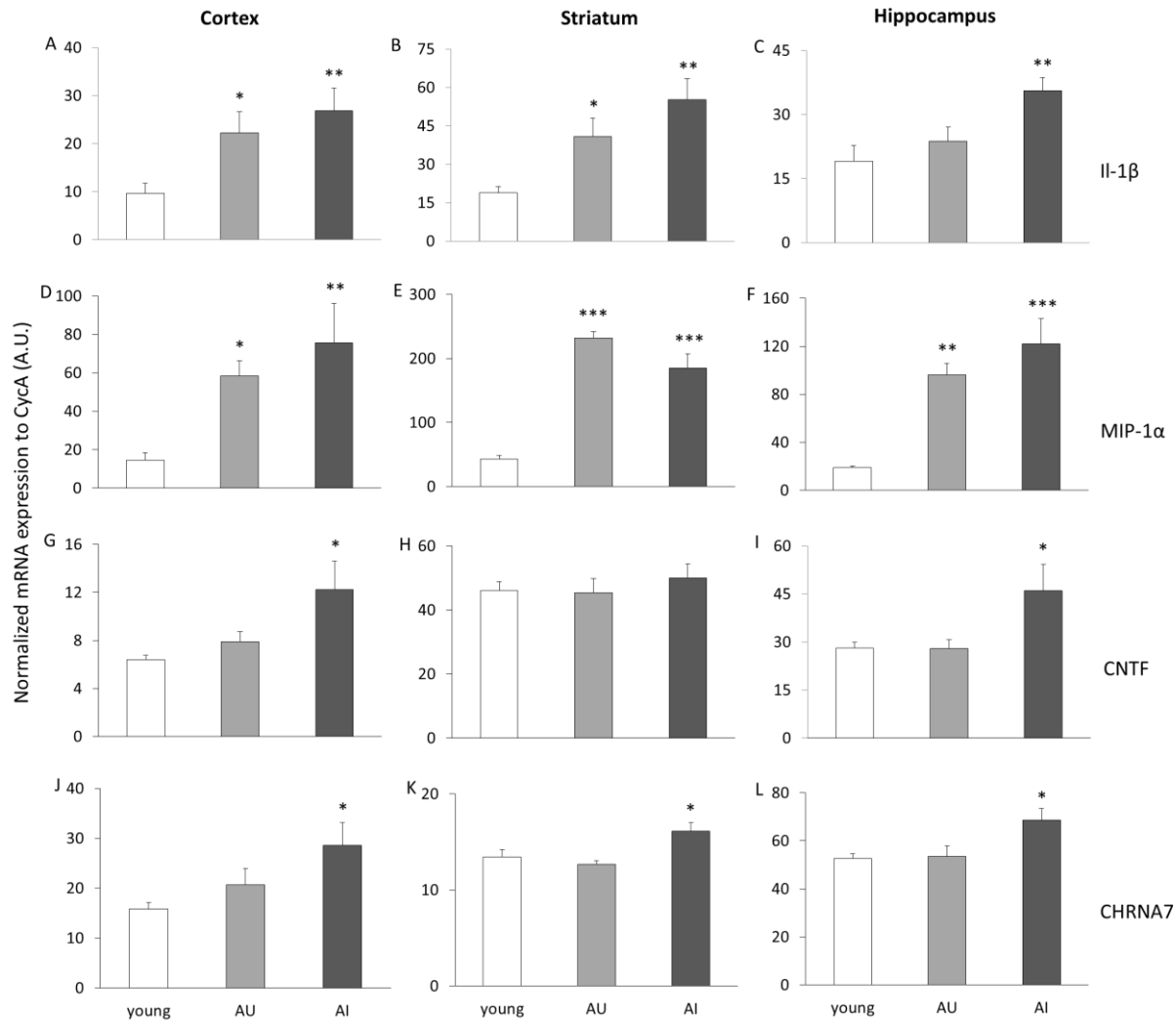


Figure 4. Brain mRNA expression levels of inflammatory markers, CNTF and $\alpha 7$ -nAChRs in young, aged cognitively unimpaired (AU) and aged impaired (AI) rats. A-C: Cortical and striatal IL-1 β mRNA level significantly increased in both AU and AI groups compared to the young group, while in the hippocampus, only the AI group showed elevated IL-1 β mRNA expression. D-F: Significant MIP-1 α mRNA upregulation was observed in both AU and AI groups compared to young group in all examined brain areas. G-I: Cortical and hippocampal CNTF mRNA level significantly increased in AI group compared to the young group. J-L: AI animals exhibited $\alpha 7$ -nAChR mRNA upregulation in all examined brain areas. Asterisks mark significant changes in mRNA expression levels compared to young animals: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (univariate ANOVA+post-hoc LSD)

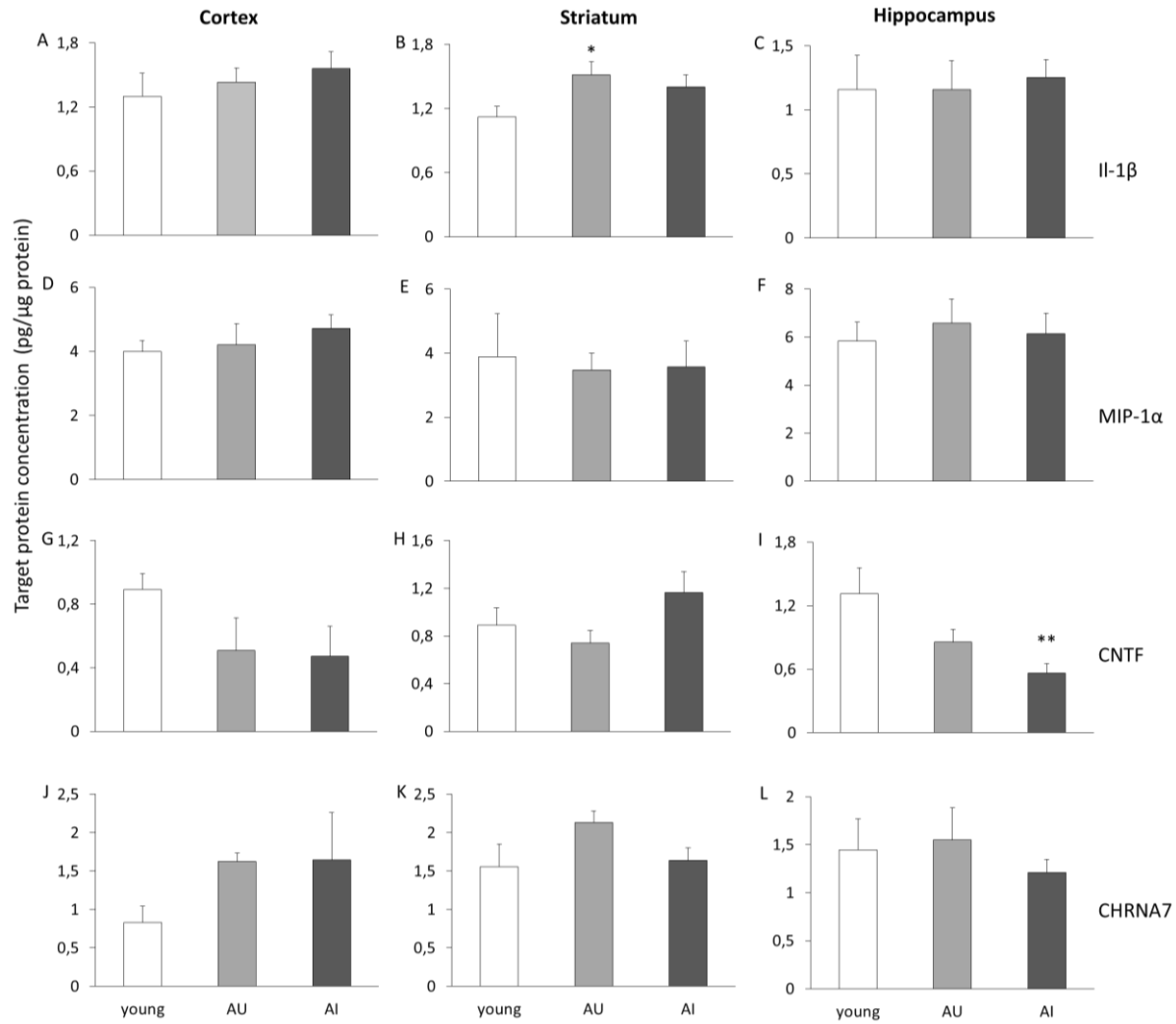


Figure 5. Brain protein expression levels (pg/μg protein) of inflammatory markers, CNTF and $\alpha 7$ -nAChRs in young, aged cognitively unimpaired (AU) and aged impaired (AI) rats. A-C: Striatal IL-1 β protein level significantly increased in AU group compared to the young group. D-F: MIP-1 α protein expression was not different between the groups in any of the tested brain regions. G-I: Hippocampal CNTF protein levels significantly decreased in the AI group compared to the young group. J-L: $\alpha 7$ -nAChR protein expression levels were not different between the groups in any of the examined brain areas. Asterisks mark significant changes in protein expression levels compared to young animals: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (univariate ANOVA+post-hoc LSD).