

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jovana J. Arandelović

**Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora
u eksperimentalnom modelu Alchajmerove
bolesti**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Jovana J. Arandelović

**Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora
u eksperimentalnom modelu Alchajmerove
bolesti**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Jovana J. Arandelović

**Bimodal modulation of alpha5 GABA_A
receptors in an experimental model of
Alzheimer's disease**

Doctoral dissertation

Beograd, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Delovi eksperimentalne studije sprovedeni su u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu.

MENTOR

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Bojan Batinić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Lidija Todorović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Laboratorija za radiobiologiju i
molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja
za Republiku
Srbiju

Dr Aleksandar Trbović, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se svima koji su pomogli u realizaciji studije.

Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora u eksperimentalnom modelu Alchajmerove bolesti

SAŽETAK:

Ciljevi: Postoje dokazi da je GABA_A modulacija uključena u kognitivne procese značajno promjenjena kod Alchajmerove bolesti (AD). U široko korišćenom 5xFAD modelu AD, želeli smo da procenimo da li negativni i pozitivni alosterični modulatori α5 GABA_A receptora (NAM i PAM, respektivno) utiču na socijalnu interakciju, socijalnu, objektnu i prostornu memoriju, senzomotornu funkciju, emocionalnost, motivaciju, ekspresiju subjedinica GABA_A receptora i neuroinflamaciju.

Metode: Posle produžene primene PAM, NAM ili rastvarača, 6 meseci stari transgeni i netransgeni 5xFAD miševi podvrgnuti su testiranju u bihevioralnoj bateriji. Ekspresije gena za *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra5*, *Il1b*, *Il-6*, *Tnfa*, *Gfap* i *Iba1* određene su u hipokampusu i prefrontalnom korteksu pomoću qPCR metode.

Rezultati: PAM tretman narušio je prostorno učenje kod transgenih ženki, socijalno prepoznavanje kod transgenih i netransgenih mužjaka i motornu funkciju kod transgenih mužjaka. NAM tretman je smanjio socijalnu interakciju kod transgenih i netransgenih mužjaka i emocionalnost kod transgenih mužjaka. NAM je imao povoljan efekat na kognitivnu fleksibilnost kod netransgenih mužjaka. U hipokampusu, oba tretmana su vratila na normalne nivoe recipročne promene u ekspresiji *Gabra2* i *Gabra3* kod transgenih ženki. U prefrontalnom korteksu, PAM je smanjio *Gabra5* kod oba pola, dok je NAM povećao *Gabra2* kod transgenih mužjaka. Transgene životinje nisu u potpunosti razvile kognitivne simptome, ali je potvrđena neuroinflamacija. NAM je smanjio ekspresiju proinflamatornih gena kod transgenih ženki i astroglioze kod transgenih mužjaka.

Zaključak: PAM i NAM nisu uspeli da ispolje konzistentno povoljne bihevioralne efekte kod transgenih životinja. Supresija neuroinflamacije dobijena NAM-om zahteva više studija sa GABA_A ligandima u amiloidnim beta- i/ili tau-zavisnim modelima sa izraženom neuroinflamacijom.

Ključne reči: modulacija α5 GABA_A receptora, 5xFAD, kognicija, neuroinflamacija, Alchajmerova bolest

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Bimodal modulation of alpha5 GABA_A receptors in an experimental model of Alzheimer's disease

ABSTRACT:

Aims: GABAergic modulation involved in cognitive processing appears to be substantially changed in Alzheimer's disease (AD). In a widely used 5xFAD model of AD, we aimed to assess if negative and positive allosteric modulators of $\alpha 5$ GABA_A receptors (NAM and PAM, respectively) would affect social interaction, social, object and spatial memory, sensorimotor function, emotionality, motivation, expression of GABA_A receptor subunits and neuroinflammation.

Methods: After protracted treatment with PAM, NAM or solvent, 6-month-old transgenic and non-transgenic 5xFAD mice underwent testing in a behavioral battery. Gene expressions of *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra5*, *Il1b*, *Il-6*, *Tnfa*, *Gfap* and *Iba1* were determined in hippocampus and prefrontal cortex by qPCR analysis.

Results: PAM treatment impaired spatial learning in transgenic females, and social recognition and motor function in both transgenic and non-transgenic males and in transgenic males, respectively. NAM treatment declined social interaction and emotionality in both transgenic and non-transgenic males and transgenic males, respectively. NAM had a beneficial effect on cognitive flexibility in non-transgenic males. In hippocampus, both treatments reversed reciprocal *Gabra2* and *Gabra3* changes in transgenic females. In prefrontal cortex, PAM decreased *Gabra5* in both genders, while NAM increased *Gabra2* in transgenic males. Transgenic animals have not fully displayed cognitive symptoms, while neuroinflammation was confirmed. NAM reduced proinflammatory gene expressions in transgenic females and astrogliosis in transgenic males.

Conclusion: PAM and NAM failed to exert consistently favorable behavioral effects in transgenic animals. Suppression of neuroinflammation obtained with NAM calls for more studies with GABAergic ligands in amyloid beta- and/or tau-dependent models with prominent neuroinflammation.

Keywords: $\alpha 5$ GABA_A receptor modulation, 5xFAD, cognition, neuroinflammation, Alzheimer's disease

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmacology

Sadržaj

| | |
|--|----|
| Uvod..... | 1 |
| Patogeneza Alchajmerove bolesti (<i>Alzheimer's disease, AD</i>) | 1 |
| Terapija AD..... | 2 |
| Animalni modeli AD..... | 3 |
| Značaj uloge hipokampusa i prefrontalnog korteksa za AD..... | 4 |
| Modulacija GABA _A receptora u AD | 4 |
| Modulacija $\alpha 5$ GABA _A receptora u kogniciji..... | 6 |
| Modulacija $\alpha 5$ GABA _A receptora u socijalnosti..... | 8 |
| Modulacija $\alpha 5$ GABA _A receptora u ostalim nekognitivnim domenima | 8 |
| Neuroinflamacija u AD..... | 9 |
| Supstance od interesa za testiranje modulacije $\alpha 5$ GABA _A receptora u 5xFAD modelu. | 10 |
| Ciljevi studije..... | 12 |
| Metodologija..... | 13 |
| Supstance | 13 |
| Životinje i eksperimentalni dizajn..... | 13 |
| Farmakokinetička studija | 14 |
| Bihevioralni testovi..... | 15 |
| Testovi za procenu senzornomotorne funkcije..... | 15 |
| Refleks uspravljanja | 15 |
| Pina refleks (<i>Pinna reflex</i>)..... | 15 |
| Refleks rožnjače (<i>Corneal reflex</i>) | 15 |
| Refleks hvatanja (<i>Clasping reflex</i>)..... | 15 |
| Test na korpi (<i>Basket test</i>) | 15 |
| Test hodanja po gredi (<i>Beam-walking test</i>) | 16 |
| Rotarod test..... | 16 |
| Test lokalizacije hrane (<i>Food localized test</i>)..... | 16 |
| Uzdignuti plus lavirint (<i>elevated plus maze, EPM</i>) | 16 |
| Test otvorenog polja (<i>Open field, OF</i>)..... | 16 |
| Test prepoznavanja novih objekata (NORT)..... | 17 |
| Test sa tri komore (3ct)..... | 17 |

| | |
|--|----|
| Morisov vodeni lavirint (MVM) | 17 |
| Izolacija RNK, reverzna transkripcija i qPCR..... | 18 |
| Eksperiment za merenje iRNK za $\alpha 2$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ subjedinice GABA _A receptora (<i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> i <i>Gabra5</i> , redom)..... | 19 |
| Eksperiment za merenje genske ekspresije parametara neuroinflamacije..... | 19 |
| Statistička analiza | 20 |
| Parametarska statistika | 20 |
| Z-skorovi | 20 |
| Neparametarska statistika..... | 21 |
| Veličina uzorka..... | 21 |
| Rezultati | 24 |
| Testovi za procenu senzorno-motorne funkcije | 25 |
| Ukupan z-skor za motorne sposobnosti (z-motorni) | 26 |
| Test otvorenog polja (OF) | 29 |
| Rezultati u uzidgnutom plus lavirintu (EPM)..... | 29 |
| Ukupan z-skor za emocionalnu reaktivnost (z-emocionalnost) | 30 |
| Ukupan z-skor za motivaciju (z-motivacija) | 32 |
| Rezultati za objektnu memoriju..... | 34 |
| Socijalna interakcija i socijalno prepoznavanje | 35 |
| Morisov vodeni lavirint (MVM) | 38 |
| PCR rezultati | 44 |
| QPCR rezultati za ekspresiju iRNK <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> i <i>Gabra5</i> | 44 |
| QPCR rezultati za neuroinflamaciju..... | 47 |
| Rezultati neparametarske statistike SRT, MVM i qPCR (za gensku ekspresiju parametara neuroinflamacije)..... | 49 |
| Diskusija | 52 |
| Farmakokinetički profil korišćenih PAM i NAM..... | 52 |
| PAM i NAM efekti na objektnu memoriju | 53 |
| PAM i NAM efekti na socijalnu interakciju i socijalnu memoriju | 53 |
| PAM i NAM efekti na prostornu memoriju..... | 54 |
| PAM i NAM efekti na nekognitivne domene (emocionalnost, motivaciju, motornu funkciju)..... | 55 |
| PAM i NAM efekti na ekspresiju <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> i <i>Gabra5</i> | 56 |

| | |
|---|----|
| PAM i NAM efekti na neuroinflamaciju..... | 57 |
| Da li se očekuju suprotni efekti selektivnih PAM i NAM? | 58 |
| Zaključak | 60 |
| Literatura..... | 61 |

Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora u eksperimentalnom modelu Alchajmerove bolesti

Uvod

Patogeneza Alchajmerove bolesti (*Alzheimer's disease, AD*)

Alchajmerova bolest, kao vodeći uzrok demencije u svetu, predstavlja neurodegenerativno oboljenje koje ugrožava stariju populaciju. Epidemiološki podaci upućuju da 10% starijih od 65 godina boluje od AD, za čije lečenje i negu se izdvaja 244 milijarde dolara godišnje samo u SAD (Anonimno, 2020). Procenjuje se da je u manje od 5% slučajeva zastupljena familijarna forma bolesti, dok ostatak pacijenata boluje od stečene forme AD (Cao i sar., 2020). Osim progresivne, teške kliničke slike koja prati pacijenta, negativan uticaj ove bolesti se ogleda i u psiho-fizičkim tegobama ljudi koji vode brigu o bolesnicima (Andreakou i sar., 2016), što su najčešće bliski srodnici. Terapijski potencijal trenutno registrovanih lekova za ovu indikaciju je ograničen, i svodi se samo na simptomatsku terapiju (Anonimno, 2020), te stoga postoji potreba za otkrivanjem novih lekova.

Mehanizmi nastanka demencije u AD su i dalje enigmatični. Ključni postulati su da bolest nastaje kao posledica neuroinflamacije i neurodegeneracije usled nakupljanja amiloida beta (Abeta) koji se formira nakon enzimskih reakcija kojima podleže amiloidni prekusorni protein (APP). APP je membranski glikoprotein koji reguliše stvaranje sinapsi i njihovu popravku, kao i anterogradni transport u neuronima. APP se podvrgava dejstvu enzima alfa ili beta sekretaza (beta sekretaza je povezana sa patološkim procesom nastanka Abeta), nastaju solubilne forme, koje dalje skraćuje gama sekretaza formirajući, u najvećoj meri, Abeta40 ili Abeta42. Gama sekretaza je tetramerni kompleks subjednica: presenilin, nikastrin, pojačivač presinilina 2 i anteriorni farinks-defektiv 1 (*presenilin, nicastrin, presenilin enhancer 2 and anterior pharynxdefective 1*). Mutacije gena koji kodiraju neke od navedenih proteina povezane su sa familijarnom (naslednom) formom AD (Chen i sar., 2017). U AD, dolazi do hiperfosforilacije tau proteina i smatra se da je ovaj događaj bliži trenutku nastajanja neurodegeneracije, dok se agregacija Abeta smatra ranim događajem, ali je važno istaći njihov sinergizam u nastanku AD (He i sar., 2015). Lokalizacija ovih proteina je dominantno ekstracelularna za Abeta, odnosno intracelularna za hiperfosforilisani tau, i njihova toksičnost se ispoljava kroz disfunkciju i destabilizaciju neurona, što dovodi do propadanja sinapsi. Zaštitna uloga glijalnih ćelija je kompromitovana, i one su preterano aktivirane (astrocitoza i mikroglia), luče se proinflamatorni medijatori, i ugrožen je klirens Abeta i tau proteina koji se nakupljaju u sinapsi, dolazi do sinaptičke fagocitoze, i oštećenja krvno-moždane barijere (Henstridge i sar., 2019).

Pored amiloidne i tau hipoteze za nastanak AD, važno je navesti disbalans neurotransmitera acetilholina u mozgu koji je važan za kognitivne procese (Ferreira-Vieira i sar., 2016). Prema holinergičkoj hipotezi, smatra se da je u osnovi AD smanjena količina acetilholina

koja nastaje verovatno zbog njegove smanjene biosinteze, i ovaj pristup je ujedno rezultirao najvećim brojem lekova za ublažavanje simptoma kod AD (Breijyeh i Karaman, 2020). Takođe je važna normalna funkcija glavnog ekscitatornog neurotransmitera glutamata i preterana aktivacija glutamatergičkih receptora je prisutna u AD i smatra se da doprinosi smanjenju kognicije (Matsunaga i sar., 2018). U nastavku, biće navedeni lekovi koji deluju posredstvom ovih mehanizama, ali i poremećaji GABAergičke transmisije koji se sve više istražuju i potencijal lekova posredovan njenom modulacijom.

Smanjena kognitivna sposobnost kod AD pacijenata, kao ključna odrednica bolesti, praćena je neurološkim ispadima, anksioznošću, agitiranošću, psihijatrijskim poremećajima, oslabljenom olfakcijom, promenama ličnosti i socijalnim deficitima (Winblad i sar., 2016).

Uticaj patogeneze AD na pogoršanje kognicije kod starijih ljudi dovodi do invaliditeta (Kumar i sar., 2021, Cao i sar., 2020). Pored opadanja pamćenja i drugih kognitivnih sposobnosti, stanje je isprepletano sa nizom dodatnih patoloških promena, uključujući ugroženu emocionalnu reaktivnost (Sturm i sar., 2013), nepovoljne promene u motivaciji (Forstmeier i sar., 2015) i motornu disfunkciju (Albers i sar., 2015). Stoga je od vitalnog značaja za svaki program otkrivanja lekova da temeljno razmotri uticaje potencijalnog tretmana na ove nekognitivne domene.

Terapija AD

Razvoj terapijskih opcija za lečenje AD nije mnogo napredovao u proteklih dvadeset godina, verovatno zato što još uvek nije razjašnjen mehanizam nastanka i progresije patologije, i razvoj lekova je bio fokusiran na ulogu amiloidnih plakova u bolesti (Vaz i Silvestre, 2020). Kao što je prikazano u Tabeli 1, u upotrebi su simptomatska terapija za ublažavanje kognitivnih oštećenja (Breijyeh i Karaman, 2020) i terapija usmerena ka smanjenju amiloidnih plakova čija efikasnost na ublažavanje kliničke slike nedostaje ili nije konzistentna (Walsh i sar. 2021). Trenutno je dostupno više terapijskih opcija za lečenje kognitivnih simptoma Alchajmerove bolesti: memantin (Matsunaga i sar., 2018), tri inhibitora holinesteraze (donepezil (Rong i sar., 2021, Seltzer, 2007), galantamin (Lilienfeld, 2002, Razay i Wilcock, 2008) i rivastigmin (Birks i Grimley Evans, 2015)), i kombinovani tretmani sa memantinom i jednim inhibitorom holinesteraze (Matsunaga i sar., 2018).

Lekovi inhibitori acetilholinesteraze blokiraju funkciju enzima acetilholinesteraze (AChE) i butirilholinesteraze (BuChE), što doprinosi povećanju nivoa acetilholina u sinapsi (Breijyeh i Karaman, 2020). Memantin je nisko-afinitetni nekompetativni antagonist otvorenih kanala NMDA receptora koji prvenstveno brzo deluje u jonskom kanalu kada je preterano otvoren, tako da se ne akumulira u kanalu da bi ometao normalan sinaptički prenos (Lipton, 2005). Pored ovoga, utiče na smanjenje glutamatergičke ekscitotoksičnosti (Lipton, 2005). Veću efikasnost od monoterapije u AD pokazala je primena kombinovanog tretmana sa memantinom i jednim inhibitorom holinesteraze od kojih je najviše u upotrebi donepezil (Matsunaga i sar., 2018).

U poslednjih deset godina počeo je razvoj imunoterapija za AD, iz koga je proisteklo monoklonsko antitelo adukamumab koje nije pokazalo efikasnost u lečenju kognitivnih simptoma (Knopman i sar., 2019), ali većina ostalih lekova nisu uspešno prošli kliničke studije (Vaz i Silvestre, 2020).

Tabela 1. Lekovi koji se koriste u terapiji AD za usporeenje napretka bolesti ili kao simptomatska terapija koji su odobreni od strane Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration – FDA*).

| Lek | Stadijum AD | Cilj terapije | Mehanizam |
|-------------|---------------------------------------|--|--|
| Adukanumab | AD | Potencijalno odlaže pogoršanje bolesti | Monoklonsko antitelo koje neutralise amiloidne plakove |
| donepezil | Blaga do teška forma demencije kod AD | Lečenje kognitivnih simptoma | Reverzibilni inhibitor acetilholin esteraze |
| galantamin | Blaga do umerena demencija kod AD | Lečenje kognitivnih simptoma | Reverzibilni inhibitor acetilholin esteraze |
| rivastigmin | Blaga do umerena demencija kod AD | Lečenje kognitivnih simptoma | Pseudo-reverzibilni inhibitor acetilholin esteraze, blokator nikotinskih acetilholinskih receptora |
| memantin | Umerena do teška forma bolesti | Lečenje kognitivnih simptoma | antagonista N-metil d-aspartat (NMDA) receptora |

Animalni modeli AD

Važno oruđe za ispitivanje ove patologije jesu animalni modeli (Sasaguri i sar., 2017). Pre svega su pravljene transgeni i knock-in mišji modeli, u manjoj meri su razvijani modeli kod pacova, te je model potrebno birati prema tipu istraživanja, budući da svaki od njih simulira određene aspekte bolesti. Sa nemogućnošću da se modeluju svi simptomi koji su karakteristični za AD umanjen je potencijal translacije rezultata na humanu populaciju (Veening-Griffioen i sar., 2019). Uprkos ovome, svaki transgeni model može pružiti uvid u oštećenje kognicije slično onome koje se javlja u AD (Mullane i sar., 2019). Široko korišćen model AD jeste 5xFAD mišji transgeni model koji sadrži autozomno dominantne mutacije u genima koji kodiraju za APP i presenilin (APP Swe + Flo + Lon *and* PS1 M146 L + L286 V) (Oakley i sar., 2006). Korišćen je u preko 10% studija koje se bave modelima AD i mogao bi se koristiti kao referentni model (Forner i sar., 2021). Prednost ovog modela jeste u ranom nastanku amiloidne patologije, gubitku neurona i sinapsi (Jankowsky i

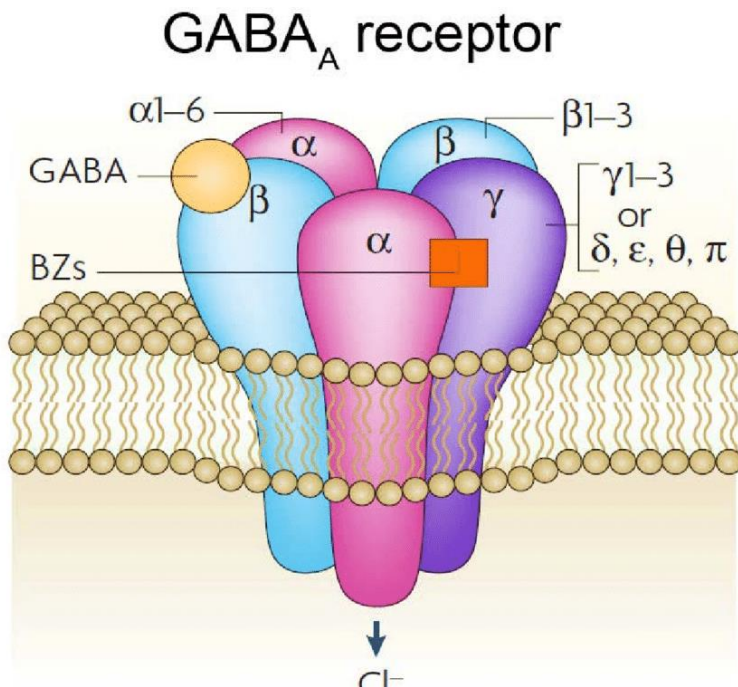
Zheng, 2017). 5xFAD transgene životinje razvijaju amiloidne plakove od 2. do 4. meseca starosti, koji pre svega nastaju unutar subikuluma, pa se šire ka hipokampusu i korteksu. Robustna amiloidna patologija potencira mikrogliozu, postojanje reaktivnih astrocita i neuroinflamaciju (Forner i sar., 2021). Navedeni patološki procesi kod 5xFAD životinja rezultiraju oštećenjem memorije koje je prisutno u AD (Oakley i sar., 2006). Nedostaci njegove primene su nefiziološka kombinacija mutacija za modelovanje familijarne forme bolesti, kao i smanjen nivo hiperfosforilisanog tau proteina (Jankowsky i Zheng, 2017). Pokazane su polne razlike u ovom modelu, tako da ženke brže razvijaju patologiju (Forner i sar., 2021). U ovoj studiji korišćen je transgeni 5xFAD model AD.

Značaj uloge hipokampusa i prefrontalnog korteksa za AD

Hipokampus (HC) i prefrontalni korteks (PFC) izdvajaju se kao dve regije od značaja za regulaciju kognitivnih funkcija (Bast i sar., 2017). Ove strukture su odgovorne za kognitivnu fleksibilnost, emocionalnost i socijalno ponašanje (Lisman i sar., 2017). HC, kao jedna od struktura limbičkog sistema, ima ulogu u epizodnoj memoriji, navigaciji i prostornom učenju (Rubin i sar., 2014), dok je PFC važan za aktivnu kratkoročnu memoriju, pažnju i procesuiranje senzornih nadražaja (Funahashi, 2017).

Modulacija GABA_A receptora u AD

Intenzivno je istraživana uloga velikog broja neurotransmitera i drugih medijatora u razvoju AD. Među njima, posebno je intrigantna i nedovoljno razjašnjena uloga inhibitornog neurotransmitera, γ -aminobuterne kiseline (GABA) (Sigel i sar., 2012). Glavnu inhibitornu neurotransmisiju u mozgu obezbeđuje GABA_A sistem (Farrant i sar. 2005), čija uloga u AD tek treba da bude detaljno utvrđena (Solas i sar., 2015, Li i sar., 2016, Calvo-Flores Guzmán i sar., 2018). U AD, GABA_A sistem je prepoznat kao važan u patogenezi kognitivnog oštećenja (Calvo-Flores Guzman i sar., 2018).



Slika 1. Prikaz GABA_A receptora i potencijalnih subjednica koje učestvuju u njegovoj izgradnji. Preuzeta iz Sigel i Steinmann, 2012 (Sigel i Steinmann, 2012).

GABA_Aergički sistem se sve više razmatra kao važan supstrat za terapiju AD (Calvo-Flores Guzmán i sar., 2018), uglavnom na osnovu nalaza da su GABA receptori tipa A (GABA_A receptori, Slika 1) u različitim regionima mozga ozbiljno pogođeni u AD (Kwakowsky i sar., 2018, Limon i sar., 2012, Rissman i sar., 2011, Govindpani i sar., 2017). Postoje oprečni rezultati o promeni koncentracije GABA u mozgu i likvoru, koji zavise od regiona i stadijuma bolesti. Generalno, primena benzodiazepina, kao potencijatora GABA_Aergičke transmisije, izgleda da povećava rizik od nastanka demencije (He i sar., 2018), dok kod AD pacijenata može podstaknuti propadanje kognicije, ali se uprkos tome ovi lekovi koriste za suprimiranje agitiranosti i anksioznosti koji prate AD (Defrancesco i sar., 2015).

GABA_A receptori koji sadrže α5 subjednicu su eksprimirani u hipokampalnim piramidalnim ćelijama i dendritima piramidalnih ćelija sloja 5 (Soh i sar., 2015), i nisu prisutni u svim regijama mozga. Njihova uloga je u ekscitabilnosti neurona, sinaptičkoj plastičnosti, neurogenezi i kogniciji, posredovanim kako putem sinaptičke, tako i tonične inhibicije (Xu i sar., 2020, Soh i sar., 2015). Pored hipokampusa, α5 GABA_A receptori su prisutni i u olfaktornom bulbusu, a ima ih i u prefrontalnom korteksu (Rissman i Mobley, 2011). Sve više dokaza podržava uključenost α5GABA_A receptora u patologiji AD u različitim subregionima mozga, pre svega u hipokampusu i cerebralnom korteksu (Kwakowski i sar., 2018). Podaci o nivoima ekspresije α5 GABA_A receptora u hipokampusu u AD se razlikuju, ali se smatra da je smanjenje nivoa ekspresije u korelaciji sa razvojem bolesti (Mohamad i Has, 2019). *Gabra5* ekspresija se smatra robustnim parametrom procene starenja kod miševa, jer su prilično dobro očuvani u HC (Palpagama i sar., 2019)

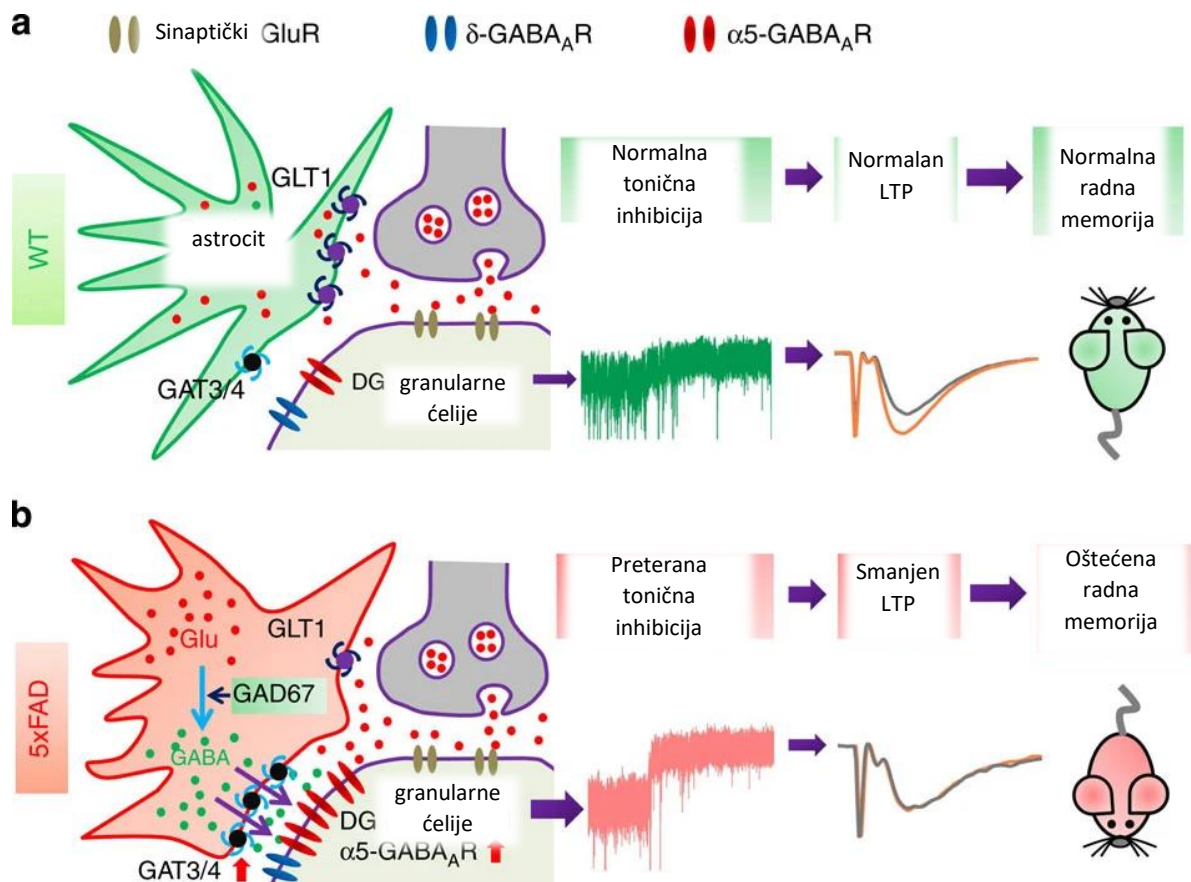
Naizgled paradoksalno, i pozitivna i negativna modulacija ovih receptora, posredstvom primene kako pozitivnih (PAM), tako i negativnih alosternih modulatora (NAM) $\alpha 5$ GABA_A receptora, predložena je kao legitiman pristup za razvoj pretpostavljenih strategija lečenja AD (Jacob, 2019). Neki od ovih liganada su ušli i u klinička istraživanja (Maramai i sar., 2020).

U ovoj studiji, imali smo za cilj da istražimo uticaj MP-III-022 (Stamenić i sar., 2016) i PWZ-029 (Savić i sar., 2008), kao pozitivnog, odnosno negativnog selektivnog modulatora $\alpha 5$ GABA_A receptora, na kognitivne i nekognitivne domene ponašanja i ekspresiju gena kod 5xFAD miševa.

PWZ-029 ima 30-60 puta veći afinitet vezivanja za $\alpha 5$ u odnosu na $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ GABA_A receptore. Pokazano je da je poboljšao učenje kod pacova u testu pasivnog, ali ne i aktivnog izbegavanja (Savić i sar., 2008). Takođe, pokazao je efikasnost kod rezus majmuna u testu pronalaženja predmeta (Maramai i sar., 2020). MP-III-022 je široko korišćeni eksperimentalni ligand, i pokazao je pozitivne efekte na kogniciju u modelu autizma kod pacova (Santrač i sar., 2022b).

Modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora u kogniciji

Ekscitatorna/inhibicijska neravnoteža, primećena kod pacijenata sa AD, takođe je prisutna u mišjim transgenim modelima AD sa akumulacijom amiloida beta (Ab), i utiče na smanjenje kognicije (Xu i sar., 2020). Jedan takav model je 5xFAD mišji model, koji se karakteriše ranim početkom taloženja amiloidnih plakova u kortikalnim i hipokampalnim regionima mozga (Oakley i sar., 2006). Sugerisano je da je prekomerna glutamatergička stimulacija u ranoj fazi bolesti u 5xFAD modelu verovatno kompenzovana višim strujama GABA-e (Wu i sar., 2014). Pretpostavljeno je da je uloga $\alpha 5$ GABA_A receptora potencijalno u stvaranju tonične inhibicije na nivou HC kod AD. Naime, u istraživanju koje su sprovedli Wu i saradnici došlo se do pretpostavki da je na nivou dentatnog girusa uticaj GABA posredovan $\alpha 5$ GABA_A receptorima, sa ciljem da se suzbije glutamatergička ekscitotoksičnost usled preterane/produžene stimulacije piramidalnih neurona. U ovoj regiji su značajne nakupine Abeta, koji je mogući uzročnik hiperreaktivnosti astrocita, u kojima se akumulira GABA. Pridružena neuroinflamacija i oksidativni stres kompromituju neurone i ulogu GABA-e da smanji preteranu stimulaciju neurona, hronično dovodeći do negativnog uticaja i oštećenja memorije (Wu i sar., 2014). Indukovana produžena tonična inhibicija može dovesti do oštećenja pamćenja, koje je obnovljeno akutnom primenom negativnog alosternog modulatora $\alpha 5$ GABA_A receptora (L-655,708) ili sa SNAP-5114, koji blokira oslobađanje astrocitnog GABA preko GAT3/4 (Wu i sar., 2014). Shodno ovome, inhibicija $\alpha 5$ GABA_A receptora primenom NAM ima potencijal da doprinese reverziji tonične inhibicije, sa povoljnim uticajima na kognitivne procese.



Slika 2. Prikaz normalne (a) i oštećene (b) tonične inhibicije posredovane $\alpha 5$ GABA_A receptorima kod zdravih i kod AD model životinja. Slika je preuzeta i prilagođena iz Wu i sar., 2014 (Wu i sar., 2014).

S druge strane, PAM su takođe prepoznati kao ligandi koji bi mogli poboljšati kogniciju, budući da kod AD dolazi do smanjenja nivoa ekspresije $\alpha 5$ GABA_A receptora u HC i gubitka neurona (Jacob, 2019). U mišjem modelu AD pokazalo se da i aktivacija i inhibicija GABA_A receptora (muscimolom, odnosno bikukulinom), mogu poboljšati prostornu memoriju (Fu i sar., 2019). U eksperimentu oštećenja memorije primenom anestetika, pokazano je da su NAM oštetili kogniciju kod starijih, ali ne i mlađih miševa (Gao i sar., 2019). Ovo je u skladu sa rezultatima da primena PAM pokazuje efikasnost u HC-zavisnim testovima kod starijih glodara (Mcquail i sar., 2015). Smatra se da PAM mogu smanjiti hiperaktivnost u HC koja nastaje kod starenja, kao i u neuropsihijatrijskim poremećajima koji su praćeni kognitivnim smetnjama (Maramai i sar., 2020).

Nakupine amiloida beta u hipokampusu kompromituju prostornu memoriju u AD (Vyas i sar., 2020), tako da bi bilo značajno ustanoviti da li PAM i NAM mogu ublažiti efekat patologije u pronalaženju platforme u Morisovom vodenom lavirintu. Osim ovoga, ispitala bi se kognitivna fleksibilnost i adaptivnost na novi kontekst u reverznoj fazi testa (Vorhees i Williams, 2014). U različitim testovima kognicije na životinjama koji ne modeluju AD, pokazano je da su i PAM (Santrač i sar., 2022, Koh i sar., 2013) i NAM (Milić i sar., 2013,

Hipp i sar., 2021) imali potencijal da podstaknu objektu i prostornu memoriju, pri čemu se PAM favorizuje u kontekstu starenja (Koh i sar., 2013).

Modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora u socijalnosti

Kod miševa, aktivnost interneurona pozitivnih na parvalbumin (PV) u medijalnom prefrontalnom korteksu (PFC) izazvana stimulacijom niskim gama frekvencijama, kao i tretmanom muscimolom u dorzomedijalnom PFC-u, rezultirala je prosocijalnim efektom koji je doveo do povećane socijalne interakcije (Liu i sar., 2020). Studija ekspresije gena u PFC pokazala je postojanje $\alpha 5$ podjedinice na piramidalnim neuronima (39,7% ćelija pozitivnih na $\alpha 5$ GABA_A receptor kod ljudi i 54,14% kod miševa) i na PV interneuronima (20% kod ljudi i 16,33% kod miševa) (Hu i sar., 2019). Pozitivna alosterna modulacija posredstvom $\alpha 5$ GABA_A receptora pokazala je poboljšanu socijalnu interakciju u modelu autizma kod pacova (Santrač et al, 2022b). Suprotno, i farmakogenetička inhibicija PV neurona (Liu i sar., 2020) i stereotaksična primena bikukulina u PFC (Paine i sar., 2017) smanjili su socijalnu interakciju. Iako primena selektivnog NAM $\alpha 5$ GABA_A receptora nije uspjela da smanji socijalnu interakciju kod zdravih pacova (Paine i sar., 2020), tretman sa FG 7142, koji je neselektivni inverzni agonista koji deluje i na $\alpha 5$ GABA_A receptore (Atack i sar., 2005), smanjio je socijalnu interakciju (Paine i sar., 2020). $\alpha 5$ knock-out miševi pokazuju socijalne deficite (Möhler i Rudolph, 2017), potencijalno preko preterane stimulacije piramidalnih neurona u PFC, pre nego hiperaktivacije inhibitornih neurona (Hu i sar., 2019). Stoga bi se moglo pretpostaviti da PAM i NAM $\alpha 5$ GABA_A receptora mogu ublažiti, odnosno dodatno pogoršati oštećenje socijalne interakcije u AD.

Modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora u ostalim nekognitivnim domenima

PFC je jedna od ključnih struktura vezanih za motivisano ponašanje i njegove promene su povezane sa apatijom u AD (van Dyck i sar., 2021), dok je HC uključen u regulaciju brojnih ponašanja, uključujući kognitivnu fleksibilnost sa dinamičkim i adaptivnim potencijalom (Bast i sar., 2017). Štaviše, ove strukture doprinose neuronskim krugovima koji su uključeni u anksioznost (Park i Moghaddam, 2017) i uopštenije u procesuiranje emocija (Salzman i Fusi, 2010, Philippi i sar., 2015), kao i motornu regulaciju (Suzuki i sar., 2004, Burman, 2019).

Većina istraživanja $\alpha 5$ GABA_A modulacije u AD do sada se bavila procesima učenja i pamćenja (Maramai i sar., 2020), dok su drugi aspekti ponašanja, iako su podložni modulaciji i preko $\alpha 5$ GABA_A receptora (Soh i sar., 2015), uglavnom ostali neispitani u odgovarajućim AD modelima. Konkretno, u modelima stresa, prijavljen je potencijal $\alpha 5$ -selektivnih PAM da smanje emocionalnost (Piantadosi i sar., 2016, Fee i sar., 2021), i $\alpha 5$ -selektivnih NAM da smanje anhedoniju i ispolje brze efekte slične antidepressivima (Zanos i sar., 2017). Smanjena anksioznost zabeležena kod transgenih 5xFAD miševa povezuje se sa agitiranošću i dezinhibicijom kod pacijenata obolelih od AD (Jawhar i sar., 2012). Nivo lokomocije nakon primene tretmana direktno upućuje na efekte supstanci na aktivnost životinja, odnosno inhibiciju i motivaciju u modelu AD. U ovoj studiji praćen je uticaj liganada na neurološke reflekse, motornu sposobnost i motorno učenje, budući da su $\alpha 5$

GABA_A receptori prisutni, pored HC, i u kičmenoj moždini (Bravo-Hernández i sar., 2016). S druge strane, u ovoj studiji je odabran repertoar genske ekspresije subjedinica GABA_A receptora (*Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5*) koji igra ulogu u kontroli emocija i/ili raspoloženja sa potencijalom za terapijsku manipulaciju (Rudolph i Knoflach, 2011, Engin i sar., 2018). U tom smislu, značajno je bilo proveriti moguće promene ekspresije navedenih gena tokom modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora u AD modelu, što može ukazati na niz željenih i neželjenih efekata tretmana zasnovanih pri takvoj modulaciji.

MP-III-022 i PWZ-029, kao PAM odnosno NAM $\alpha 5$ GABA_A receptora, nisu imali uticaj na anksioznost kod Wistar pacova (Savić i sar., 2008, Stamenić i sar., 2016), ali se ne može predvideti kakav bi bio uticaj ovih liganada na nivo anksioznosti u 5xFAD modelu, tako da je bilo važno da bude ispitan. Efekti produžene primene navedenih supstanci na lokomotornu aktivnost nisu prethodno publikovani, pa je bilo potrebno proceniti da li one imaju uticaj u ovom modelu, budući da akutna primena MP-III-022 dovodi do blage hiperlokomocije (Stamenić i sar., 2016).

Neki $\alpha 5$ GABA_A ligandi povučeni su iz programa razvoja zbog neželjenih dejstva (Maramai i sar., 2020) poput povećane anksioznosti (Xu i sar., 2018), i stoga je u ovoj prekliničkoj studiji od značaja bilo sprovesti kompletan skrining uticaja na ponašanje. Dodatno, budući da su ove supstance mogle imati povoljne efekte na druge simptome bolesti, važno je bilo selektovati ih u proširenoj bihevioralnoj bateriji. Zato su pored efekata na kogniciju, praćeni efekti PAM i NAM na neurološku funkciju, lokomociju, motorno učenje i sposobnost, emocionalnost i motivaciju kod 5xFAD miševa.

Neuroinflamacija u AD

GABA je prepoznata kao imunomodulator (Jin i sar., 2013) i GABA_A receptori su prisutni na glijalnim ćelijama (Pocock i Kettenmann, 2007). Ipak, uticaj GABA_A receptora na imunski sistem nije istražen u dovoljnoj meri. Osim direktnog uticaja, aktivacija inhibitornih neurona smanjuje oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera i posledično je smanjena aktivacija glijalnih ćelija, što predstavlja neuroprotektivan efekat (Lee i sar., 2011). Sa druge strane, pokazano je da inflamacija može dovesti do povećanja aktivnosti $\alpha 5$ GABA_A receptora, i potencirati toničnu inhibiciju koja bi dalje vodila ka oštećenju memorije. GABA koja se preterano oslobađa iz astrocita u ovom slučaju vodi ka neurotoksičnosti (Wang i sar., 2012).

Iako se čini da su akumulacije Ab i tau konzistentno obeležje AD, čak ni najnaprednije farmakološke strategije usmerene na smanjenje opterećenja Ab do sada nisu uspele da pokažu dosledna kognitivna poboljšanja kod pacijenata sa AD (uporediti sa Knopman i sar., 2021). Stoga se fokus istraživanja pomera na druge mehanizme koji doprinose patologiji, kao što je neuroinflamacija (Leng i Edison, 2021). Preovlađujući proinflamatorni fenotip primećen je kod mikroglije izložene Ab u *in vitro* AD modelu (Plescher i sar., 2018), kao i tokom faze pre plaka kod mišjih AD modela (Boza-Serrano i sar., 2018). Takav proinflamatorni mikroglijalni fenotip je takođe primećen kod ljudi sa blagim kognitivnim oštećenjem bez nakupljanja Ab (Hamelin i sar., 2016), što može da ukaže na njegovu zaštitnu/kompenzatornu ulogu na početku bolesti, i patološku ulogu kada AD napreduje (Leng i Edison, 2021). Aktivirana mikroglija luči proinflamatorne citokine i može dalje da

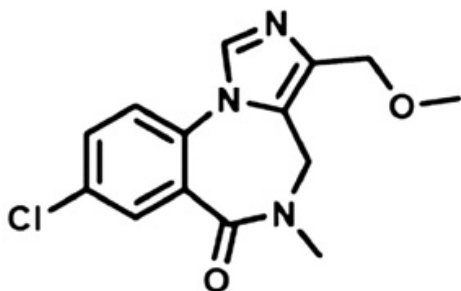
izazove astrocitni pomak (*shift*) na proinflamatorni fenotip (Xie i sar., 2020). Neurotoksični reaktivni astrociti su otkriveni u postmortalnom moždanom tkivu, a oko 30–60% astrocita u hipokampusu i PFC kod pacijenata sa AD imalo je proinflamatorni fenotip (Liddelov i sar., 2017). Štaviše, proinflamatorni astrociti mogu izazvati prekomerno oslobađanje GABA-e koje utiče na pamćenje u AD modelima (Jo i sar., 2014), a takođe dovode do smrti neurona i oligodendrocita (Leng i Edison, 2021).

Do sada nije ispitan uticaj liganada koji deluju na $\alpha 5$ GABA_A receptore na nivoe ekspresije proinflamatornih citokina kod zdravih/kontrolnih i bolesnih/model 5xFAD miševa.

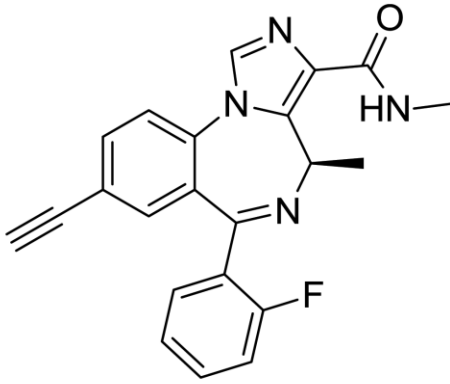
Na osnovu navedenih činjenica, želeli smo da procenimo uticaj produžene bimodalne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora kod transgenih i netransgenih 5xFAD miševa oba pola starih 6 meseci na neuroimunski profil u hipokampusu i PFC, okarakterisan kroz ekspresiju gena proinflamatornih citokina *Il1b*, *Il-6* i *Tnfa*, kao i markera mikrogljalne aktivacije (jonizovani kalcijum vezujući adapter molekul-1 [*ionized calcium binding adaptor molecule-1*, *Iba1*]) i astroglioze/oštećenja astrocita (glijalni fibrilarni kiseli protein [*glial fibrillary acidic protein*, *Gfap*]).

Supstance od interesa za testiranje modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora u 5xFAD modelu

U ovoj studiji, imali smo za cilj da istražimo uticaj MP-III-022 (Stamenić i sar., 2016) i PWZ-029 (Milić i sar., 2013), kao pozitivnog i negativnog selektivnog modulatora $\alpha 5$ GABA_A receptora, na kognitivne i nekognitivne domene ponašanja i ekspresiju GABA_A subjedinica i markera neuroinflamacije kod 5xFAD miševa.



Slika 3. Strukturna formula PWZ-029 ((metil(8-hloro-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5- α][1,4]benzodiazepin-3-il) metil etar)) (Savić i sar., 2008).



Slika 4. Strukturna formula MP-III-022 ((R)-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-N,4-dimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid), kao PAM $\alpha 5$ GABA_A receptora (Stamenić i sar., 2016).

5xFAD je mišji transgeni model zasnovan na prenosu mutacije ljudskih gena za prekursor amiloid-b proteina (APP) i presenilin 1 (PSE1) (Oakley i sar., 2006). Prihvatajući nemogućnost modelovanja svih simptoma relevantnih za AD (Veening-Griffioen i sar., 2019), korišćen je 5xFAD model AD čije se prednosti odražavaju na rani početak amiloidne patologije, gubitak sinapsi i potvrdu kognitivnih oštećenja (Sasaguri i sar., 2017). Studija je osmišljena tako da proceni mogući zaštitni ili pogoršavajući uticaj produžene modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora kod šestomesečnih 5xFAD miševa, kada su zabeležene prve dosledne promene ponašanja i biohemijske promene koje su slične AD patologiji kod ljudi (Gao i sar., 2013).

Na osnovu navedenih činjenica i povezanosti, želeli smo da procenimo uticaj produžene bimodalne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora na različite kognitivne domene i socijalnost transgenih i netransgenih 5xFAD miševa oba pola starih 6 meseci. Pored ispitivanja pozitivnih efekata supstanci na kogniciju, praćen je bio uticaj na ostale domene ponašanja poput neurološke funkcije, anksioznosti, lokomocije, motorne funkcije, emocionalnosti i motivacije koji su esencijalni za dalji razvoj eksperimentalnih supstanci kao potencijalnih lekova. Studija je sproveden na oba pola zbog postojanja polnih razlika u 5xFAD modelu.

Ciljevi studije

1. Profilisanje kinetičkog ponašanja odabranog PAM i NAM u uslovima produžene primene, sa ciljem određivanja doze za dalje eksperimente
2. Bihevioralna karakterizacija 5xFAD miševa oba pola kao modela AD
3. Praćenje efekata nakon produžene primene PAM i NAM kod transgenih i netransgenih (kontrolnih) 5xFAD miševa oba pola u bihevioralnoj bateriji sa ciljem da se ispituju sledeći domeni ponašanja: neurološki, senzornomotorna sposobnost, anksioznost, lokomotorna aktivnost, memorija kod oba pola
4. Određivanje nivoa ekspresije iRNK markera inflamacije, mikroglioze, astrocitoze i GABAeričke transmisije u modelu AD u regionima mozga odgovornim za kogniciju (PFC i HC) kod oba pola
5. Određivanje uticaja primene liganada na nivoe ekspresije iRNK markera inflamacije, mikroglioze, astrocitoze i GABAeričke transmisije u modelu AD u regionima mozga odgovornim za kogniciju (PFC i HC) kod oba pola

Metodologija

Supstance

U ovoj studiji korišćeni su PWZ-029 ((metil(8-hloro-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5- α][1,4]benzodiazepin-3-il) metil etar)), kao NAM α 5 GABA_A receptora (Savić i sar., 2008), i MP-III-022 ((R)-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-N,4-dimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid), kao PAM α 5 GABA_A receptora (Stamenić i sar., 2016). Odabrane supstance, sintetizovane na Katedri za hemiju i biohemiju Univerziteta Viskonsin—Milvoki, SAD, rastvorene su u rastvaraču (SOL) pripremljenom od 85% destilovane vode, 14% propilen glikola i 1% Tween 80. Ligandi su primenjivani u dozi od 5 mg/kg jednom dnevno tokom 10 dana transgenim i netransgenim životinja, dok su kontrolne životinje dobijale SOL.

Životinje i eksperimentalni dizajn

Transgeni 5xFAD miševi koji nose humane gene APP i PSEN1 sa sledećim mutacionim promenama: švedskom (K670N/M671L), floridskom (I716V) i londonskom (V717I) mutacijom u transgenu APP, i mutacijama M146L i L286V u transgenu PSEN1, kao i njihovi netransgeni srodnici iz legla, čuvani su zajedno u kavezima od pleksiglasa u grupama od 4 do 6 po kavezu, sa hranom i vodom *ad libitum*, u ciklusu svetlo-tama 12:12 (svetlo se uključuje u 06:00 h). Koloniju je ljubazno obezbedio Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija, a životinje su rođene i odgajane u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija. Zbog agresivnosti mužjaka miševa u svaki kavez je uveden kratki plastični tunel. Miševi su intenzivno privikavani na eksperimentatora tokom 7 dana pre početka bihejvioralnih testova, dok su fizičko posmatranje i merenje telesne mase vršeni tokom studije.

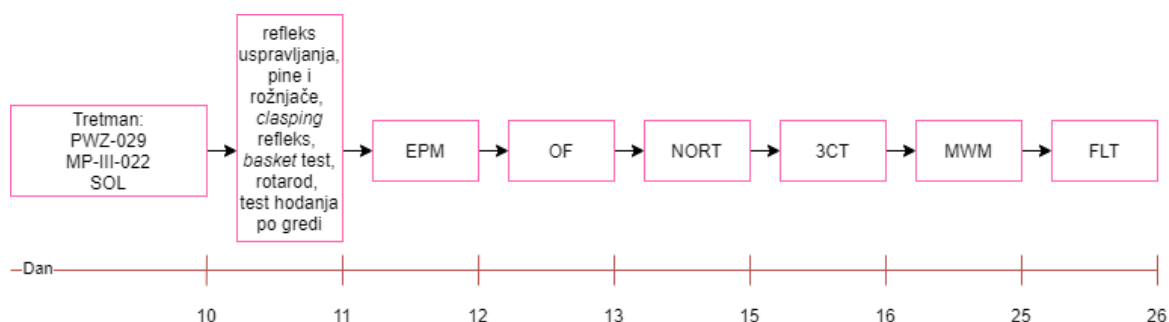
U farmakokinetičkoj studiji, C57BL/6 miševi su korišćeni za određivanje koncentracija PWZ-029 i MP-III-022 u mozgu.

Bihejvioralni eksperimenti su sprovedeni u svetloj fazi (od 07.00 do 17.00 časova). Studija je realizovana u okviru projekta čija je etičnost odobrena od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije.

5xFAD transgene i netransgene životinje oba pola, uzgajane i testirane u tri vremenski odvojene kohorte, randomno su tretirane i.p. sa MP-III-022, PWZ-029 ili SOL tokom 10 dana u starosnoj dobi od 6 meseci \pm 2 nedelje.

Tretman je trajao 10 dana, što bi aproksimirano na humanu populaciju bilo oko godinu dana kod odraslih, i bio je započet nakon 6 meseci starosti životinja, kada se završi faza života zrelih adulta („*mature adults*“). Tada se pretpostavljalo da postoje promene u ponašanju, tako da se ovaj period smatra ranim početkom bolesti. Na osnovu pilot eksperimenata i prethodnih studija, utvrđeno je da se patologija kod 5xFAD modela rapidno razvija, te da je životni vek ovih životinja kraći u odnosu na standardni C57BL/6 soj (Rae i Brown, 2015). Nastaju promene sa razvojem patologije i sa starenjem koje se manifestuju u izgledu spoljašnjeg stanja organizma, što se odnosi pre svega na mužjake (promene krzna, u ano-genitalnoj regiji i drugim regijama kože).

Nakon završetka protokola za primenu tretmana, svaka kohorta životinja je podvrgnuta bihevioralnoj bateriji koja se sastojala od testova za procenu senzornih i motornih sposobnosti, uzvišenog plus lavirinta, testa otvorenog polja (rezultati objavljeni u Arandelović i sar., 2021), testa prepoznavanja novih objekata, testa sa tri komore i Morisovog vodenog lavirinta (publikovano u Arandelović i sar., 2022). Nakon bihevioralnog testiranja, životinje su terminalno anestezirane ketaminom (100 mg/kg, i.p.), PFC i HC su sakupljeni i brzo zamrznuti u tečnom azotu. Uzorci tkiva su čuvani na -80°C do izolacije RNK (ribonuklinska kiselina), koja je korišćena za analizu ekspresije gena od interesa. Vremenski okvir kada su se sprovodili eksperimenti u ovoj studiji prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Vremenski okvir bihevioralne baterije sprovedene na svakoj 5xFAD životinjskoj subkohorti tretiranoj sa MP-III-022, PWZ-029 ili rastvaračem. Navedeni su eksperimenti koji su analizirani i razmatrani u ovoj tezi. EPM – uzdignuti plus lavirint, OF – test otvorenog polja, NORT – test za prepoznavanje novih objekata, 3CT – test tri komore, MVM – Morris vodeni lavirint, FLT – (test lokalizacije hrane, *food localization test*).

Farmakokinetička studija

Neophodno je bilo utvrditi dozu koja bi zadržala selektivnost na $\alpha 5$ GABA_A receptore, budući da se pri primeni liganada u većim dozama potencijalno javljaju PAM efekti preko $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ GABA_A receptora (Stamenić i sar., 2016, Milić i sar., 2013, Timić Stamenić i sar., 2015). Supstance koje su korišćene prethodno su farmakokinetički okarakterisane, ali je bilo potrebno uraditi skrining koncentracija u mozgu nakon uspostavljanja stanja ravnoteže („steady state“).

C57BL/6 miševi su korišćeni za određivanje koncentracija PWZ-029 i MP-III-022 u mozgu. Obe supstance su davane i.p. u dozama od 1 mg/kg/dan i 5 mg/kg/dan, a uzorci su sakupljeni u četiri vremenske tačke: 20 min i 24 h nakon pojedinačne doze i 20 min nakon treće doze, za oba liganda, dok su uzorci od 24 h nakon treće doze dobijeni samo za MP-III-022.

Svaka vremenska tačka je sadržala 3 životinje. Životinje su terminalno eutanazirane ketaminom (Ketamidol, Richter Pharma AG, Vels, Austrija), ceo mozak je sakupljen i pomešan sa 1300 μ l metanola za dalju homogenizaciju u ultrazvučnom homogenizatoru (dva puta po 20 s, puls 1,2, amplituda 70%, sa periodom između u trajanju od 0,5 s). Homogenati mozga su centrifugirani na 3500 rcf tokom 20 minuta, nakon čega je

supernatant podvrgnut ekstrakciji čvrste faze (*solid phase extraction*, SPE; *Oasis HLB cartridges* – *Waters Corporation*, Milford, Massachusetts) i koncentracija liganda je određena tačnom ultravisokoeфикаsnom hromatografijom spregnutom sa tandem masenom spektrometrijom (*ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, UPLC–MS/MS).

Bihevioralni testovi

Protokol se sastojao od uzastopnih testova za procenu refleksnih odgovora, motorne i lokomotorne aktivnosti, i anksioznosti, redosledom kao što je navedeno u nastavku.

Refleksi uspravljanja, pine, rožnjače i stezanja procenjuju neurološke i senzornomotorne deficite. Pored toga, za procenu motornog učenja i sposobnosti korišćeni su rotarod test i test hodanja po gredi, dok je test na korpi procenjivao samo motornu sposobnost životinja. Test lokalizacije hrane je korišćen za procenu olfakcije.

Testovi za procenu senzornomotorne funkcije

Refleks uspravljanja

Refleks uspravljanja se definiše kao sposobnost životinje da se pomeri u stojeći položaj nakon okretanja metalne rešetke na kojoj je životinja prethodno stajala, kada leđima dodirne tlo. Skorovi su bili: 1 za očuvan refleks uspravljanja, odnosno 0 za nedostatak refleksa uspravljanja.

Pina refleks (*Pinna reflex*)

Pina refleks predstavlja pomeranje uha kada ga nežno dodirnete pamučnim štapićem sa aplikatorom. Odgovor miša može biti nedostatak pokreta uha, pokretanje uha ili pokretanje glave i uha, koji se boduju sa 0, 1 ili 2, redom.

Refleks rožnjače (*Corneal reflex*)

Refleks rožnjače je urođeno zatvaranje oka nakon njegove taktilne stimulacije pamučnim štapićem sa aplikatorom. Bodovanje je slično kao kod refleksa pine (0 bez odgovora, 1 zatvaranje oka, 2 pokretanje glave i zatvaranje oka).

Refleks hvatanja (*Clasping reflex*)

Refleks hvatanja pokazuje normalan odgovor širenja zadnjih udova ka spolja kada se životinja drži za rep. U testu se mogu primetiti četiri ishoda: 4 – savijeni zadnji udovi; 3 – uski položaj zadnjih udova malo okrenutih ka spolja, savijenih u kolenima; 2 – otvoreniji položaj zadnjih udova u poređenju sa 3, ali manje od 1; 1 normalan odgovor zadnjih udova koji se šire ka spolja.

Test na korpi (*Basket test*)

Basket test je postupak u kome se životinja postavlja na rešetkasto dno plastične kutije. Mreža se okreće naopačke, a miš drži težinu sopstvenog tela naopako. Produženo

zadržavanje na mreži mereno štopericom je u korelaciji sa motornom sposobnošću, a takođe je i pod uticajem anksioznosti.

Test hodanja po gredi (*Beam-walking test*)

Test hodanja po gredi (*Beam-walking test*) procenjuje sposobnost motorne koordinacije životinje da pređe gredu od pleksiglasa (850 x 8 mm) i dođe do ciljnog – bezbednog kaveza. Bela svetlost (60 W) koja osvetljava početnu platformu je averzivni stimulans za miša da se približi gredi. Svaka životinja je pre testiranja obučena da pređe gredu. U treningu koji se sastojao od 4 uzastopna pokušaja, životinja je puštana sa $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ i $3,5/4$ udaljenosti grede od kaveza (Jawhar i sar., 2012). Sva testiranja su bila snimana i analizirana od strane iskusnog istraživača.

Rotarod test

Rotarod test je standardna procedura za procenu motorne koordinacije, ravnoteže i umora. Svaka životinja je obučena u 2-4 uzastopna pokušaja da balansira na rotirajućem točku, nakon čega je testirana. Vreme provedeno na rotirajućoj šipki je mereno štopericom.

Test lokalizacije hrane (*Food localized test*)

Testom lokalizacije hrane se procenjuje olfakcija kao što je prethodno opisano (Luo i sar., 2002). Ukratko, kolačić je dodat u 16:00 časova u svaki kavez gde su čuvane životinje (dva kolačića po mišu dnevno) dva uzastopna dana pre testiranja. Pored toga, dan pre testa, u 16:00 časova sva dostupna hrana osim kolačića je izmeštena kako bi se omogućila deprivacija hrane. Ispitivanje je sprovedeno u novim kavezima od pleksiglasa u kojima se čuvaju životinje sa šuškom koja je pokrivala dno u visini od 4 cm i kavezi su zatvarani poklopcima od čelične žice. Kolačić je zakopan u centru samog vrha kaveza. Miš je stavljen u centar kaveza i ostavljen je da istraži kavez 15 minuta. Istraživači su merili vreme koje protekne dok miš ne pronade kolačić sa štopericom.

Uzdignuti plus lavirint (*elevated plus maze, EPM*)

Uzdignuti plus lavirint (EPM) je standardni test za procenu anksioznosti kod glodara (Flanigan i sar., 2014). Aparat se sastoji od dva otvorena (40 × 8 cm) i dva zatvorena kraka (40 × 8 × 30 cm), odvojena centralnom zonom (5 x 5 cm). Test životinja se postavlja u centralnu zonu i ostavlja da istražuje lavirint 5 minuta. Svaki test se snima i analizira u Animaze (Stoelting, Vood Dale, IL) softveru za praćenje.

Test otvorenog polja (*Open field, OF*)

Test otvorenog polja (OF), kao test eksploratorne i lokomotorne aktivnosti, izveden je u pravougaonj areni od pleksiglasa (40 × 30 cm) (Zhang i sar., 2012). Ponašanje životinja tokom 15 minuta, bez prethodnog navikavanja, praćeno je i analizirano u Animaze softveru.

Test prepoznavanja novih objekata (NORT)

U kutiji od pleksiglasa ($40 \times 30 \times 30$ cm), ogledne životinje su tokom 10 minuta bile izložene paru dva identična predmeta smeštena 10 cm jedan od drugog (plastična rubikova kocka ili stakleni cilindar, nasumično raspoređeni po grupama), prema protokolu preuzetom i modifikovanom od Colie i saradnika (Colie i sar., 2017). Posle 45 minuta, jedan od objekata je zamenjen preostalim novim objektom i test životinji je dozvoljeno da ih slobodno istražuje 10 minuta (NORT za procenu kratkoročnog pamćenja; NORT kratkoročno). 24 sata kasnije, životinje su ponovo uvedene u istu arenu na 10 minuta, ali je stari predmet zamenjen novim (plastična piramida) (NORT za procenu dugoročne memorije; NORT dugoročno).

Ponašanje životinja tokom eksperimenata je praćeno softverom Animaze.

Test sa tri komore (3ct)

Aparat od netransparentnog pleksiglasa za 3ct sastojao se od tri dela: središnje komore i dve identične bočne komore, kao što je prethodno opisano (Gilbert i sar., 2020). Test se sastojao od tri uzastopne faze: habituacije, testa socijalne interakcije (SIT) i testa socijalnog prepoznavanja (SRT). Prva faza je trajala 5 minuta, a test mišu je bilo dozvoljeno da istražuje samo središnju zonu, sa zatvorenim ulazima u bočne komore. U SIT fazi, test miš je postavljen u središnju komoru, dok su prolazi u bočne komore bili blokirani. U jednu od bočnih komora stavljen je jedan nepoznati miš ispod žičanog kaveza, dok je žičani kavez u drugoj komori ostao prazan. Nakon otvaranja bočnih vrata počinje SIT faza, i test miš je mogao slobodno da se kreće unutar aparata 10 minuta. Test miš je zatim vraćen u središnju komoru, vrata se zatvaraju, a novi nepoznati miš se zatvara u prethodno prazan žičani kavez u drugoj bočnoj komori. SRT faza počinje otvaranjem kliznih vrata i test mišu je dozvoljeno da se slobodno kreće unutar aparata još 10 minuta. U statističkoj analizi korišćeno je vreme koje test životinje provode u istraživanju u uskoj zoni oko kaveza u kome se nalazi (ili ne nalazi) životinja.

Ponašanje životinja tokom eksperimenata je praćeno softverom Animaze.

Morisov vodeni lavirint (MVM)

Morisov vodeni lavirint je široko korišćeni test za procenu prostorne memorije kod glodara. Životinja se spušta u bazen i Anymaze softverom se prati koju putanju bira da bi pronašla skrivenu platformu. Životinje su testirane u velikom bazenu (prečnika 170 cm), a protokol se sastojao od dve glavne faze: regularne i reverzne faze (Tang i sar., 2016, Vorhees i Williams, 2014).

Regularna faza je počela prvim danom treninga u kome je svaka životinja trebalo da nađe platformu ispod površine vode, na kojoj se, kao orijentir iznad površine vode, nalazila piramida (*qued training*). Životinje su imale 4 uzastopna pokušaja (svaki u trajanju od 2 min) da nađu platformu sa piramidom nakon puštanja u bazen sa različitim pozicija. Od 2. do 5. dana (*training days*), životinje su obučavane da pronađu skrivenu platformu i svakog dana su puštane u bazen sa pseudorandomno raspoređenih pozicija u 4 uzastopna pokušaja, a svaki pokušaj je trajao 2 min. Šestog dana, u test danu (*probe test*), platforma je uklonjena, a životinje su plivale samo jednom u trajanju od 1 min nakon puštanja u bazen sa pozicije koja je bila najudaljenija od zone gde je prethodno bila smeštena platforma.

Prvog dana reverzne faze (*qued reversal training*), nova platforma je pozicionirana u suprotnom kvadrantu bazena u odnosu na staru platformu i na njoj je stajala piramida. Životinje su puštane sa pseudorandomnih pozicija u bazen, i u toku 4 uzastopna pokušaja u trajanju od po 2 min tražile su platformu. Sledećeg dana u reverznom treningu (*reversal training day*), platforma je bila skrivena. U 1-minutnom ispitivanju u reverznom testiranju (*reversal probe day*), životinjama je omogućeno da istražuju vodeni lavirint nakon puštanja sa najudaljenije pozicije u odnosu na lokaciju prethodno uklonjene nove platforme.

Ako životinja nije bila u mogućnosti da pronade platformu u toku celog protokola kada je platforma bila postavljena u bazenu, ona je vođena do platforme i ostavljena na njoj oko 25 s. Prosečna vrednost parametara za 4 uzastopna pokušaja po danu u toku regularne faze MVM protokola je izračunata i korišćena za statističku analizu. U danima reverznog treninga (*qued reversal training* i *reversal training*), latencije za pronalaženje nove platforme u prva dva pokušaja u svakom od 2 dana, označene kao pokušaj 1 i pokušaj 2 (*qued reversal training*), odnosno pokušaj 3 i pokušaj 4 (*reversal training*), analizirane su slično kao u radu Hu i saradnika (Hu i sar., 2020).

Za statističku analizu korišćeni su latencija i/ili broj ulazaka u zonu platforme (regularna faza MVM protokola), odnosno latencija i/ili broj ulazaka u zonu stare i nove platforme (reverzna faza).

Ponašanje životinja tokom eksperimenata je praćeno softverom Anymaze.

Izolacija RNK, reverzna transkripcija i qPCR

Izolacija ukupne RNK sprovedena je korišćenjem komercijalnog reagensa *TRI Reagent Solution* (Ambion, Foster City, CA) i hloroforma, prema uputstvima proizvođača. Kvantifikacija RNK je urađena na BioSpec Nano spektrofotometru (Shimadzu, Japan).

Nakon merenja koncentracije RNK, 1 µg RNK preveden je u komplementarnu DNK (cDNK) pomoću kompleta za reverznu transkripciju visokog kapaciteta (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*, Foster City, CA). Dobijeni produkti cDNK čuvani su na -20°C do analize ekspresije gena. Za analizu ekspresije gena od interesa korišćena je metoda lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (*real time polymerase chain reaction – real time PCR*) ili kvantitativni PCR (qPCR) Singh C, Roy-(Chowdhuri i sar., 2016). PCR reakcije izvedene su na aparatu ABI 7500 (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems*, Foster City, CA). Zapremina PCR reakcija bila je 10 µl i sadržala je 5 µl specifičnog reagensa (*Power SYBR® Green PCR Master Mix*, Life Technologies, Warrington, UK), 300 nM svakog prajmera i količinu cDNK ekvivalentnu 10 ng ukupne RNK. Uslovi PCR reakcije bili su : 10 min na 95°C, 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Sekvence prajmera za amplifikaciju cDNK ciljnih gena date su u nastavku teksta. Specifičnost prajmera potvrđena je generisanjem krive topljenja (melting curve) nakon PCR amplifikacije za svaki produkt PCR reakcije. Ct vrednosti su izračunate korišćenjem SDS softvera *Applied Biosystems 7500* sistema. Obzirom da unos ukupne RNK kao i efikasnost reverzne transkripcije mogu da variraju od uzorka do uzorka, u svakom uzorku je istovremeno amplifikovan i produkt referentnog – stabilno eksprimiranog gena – beta aktina (*Actb*). Stoga su za svaki uzorak izračunate vrednosti dCt koje predstavljaju razliku između Ct vrednosti ciljnog amplikona i Ct vrednosti referentnog amplikona.

Vrednosti dCt su dalje korišćene u statističkoj analizi nivoa ekspresije gena od interesa (Biasin i sar., 2017).

Ekperiment za merenje iRNK za $\alpha 2$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ subjedinice GABA_A receptora (*Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5*, redom)

Prajmeri za *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra5* i *Actb* su odabrani iz literature (F: TTACAGTCCAAGCCGAATGTCC i R: ACTTCTGAGGTTGTGTAAGCGTAGC (Tan i sar., 2011), F: CAAGCACCACCTTCAACATAG i R: AGGTCTTGGTCTCAGCAGGA (Larson i sar., 2020), F: CCCTCCTTGTCTTCTGTATTCC i R: TGATGTTGTCATTGGTCTCGTCT (Tan i sar., 2011), F: GACCTCTATGCCAACACAGT i R: AGTACTTGCGCTCAGGAGGA (Wei i sar., 2014), redom). Ct vrednosti su izračunate korišćenjem *Applied Biosystems 7500* sistema SDS softvera. dCt je izračunat kao razlika između Ct(*Gabra5*) i Ct(*Actb*) za svaki uzorak i bio je obrnuto proporcionalan ekspresiji iRNK.

Ekperiment za merenje genske ekspresije parametara neuroinflamacije

Prajmeri za *Il1b*, *Il-6*, *Tnfa*, *Iba1*, *Gfap* i *Actb* kao kontrolni gen (*housekeeping gene*) su odabrani iz literature (F: GAAATGCCACCTTTTTGACAGT i R: CTGGATGCTCTCATCAGGACA (Sayed i sar., 2021), F: TAGCCATCCTTCCT R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC (Mathur i sar., 2017.), F: CTGAACTTCGGGGTGATCGG i R: GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA (Takano i sar., 2016.); F: GGATTTGCAGGGAGGAAAAG and R: TGGGATCATCGAGGAATTG (Kang i sar., 2018) i F: GGCGCTCAATGCTGGCTTCA and R: TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT (Chandra i sar., 2017), F: GACCTCTATGCCAACACAGT i R: AGTACTTGCGCTCAGGAGGA (Wang i sar., 2019), redom).

Tabela 2. Pregled prajmera korišćenih za qPCR.

| Prajmer i za gene | <i>forward</i> | <i>reverse</i> |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>Gabra2</i> | TTACAGTCCAAGCCGAATGTCC C | ACTTCTGAGGTTGTGTAAGCGTAG C |
| <i>Gabra3</i> | CAAGCACCACCTTCAACATAG | AGGTCTTGGTCTCAGCAGGA |
| <i>Gabra5</i> | CCCTCCTTGTCTTCTGTATTCC | TGATGTTGTCATTGGTCTCGTCT |
| <i>Il1b</i> | GAAATGCCACCTTTTTGACAGT | CTGGATGCTCTCATCAGGACA |
| <i>Il-6</i> | TAGCCATCCTTCCT | TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC |
| <i>Tnfa</i> | CTGAACTTCGGGGTGATCGG | GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA |
| <i>Iba1</i> | GGATTTGCAGGGAGGAAAAG | TGGGATCATCGAGGAATTG |
| <i>Gfap</i> | GGCGCTCAATGCTGGCTTCA | TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT |
| <i>Actb</i> | GACCTCTATGCCAACACAGT | AGTACTTGCGCTCAGGAGGA |

Statistička analiza

Parametarska statistika

Bihevioralni podaci iz testova procene senzornomotorne funkcije, EPM, OF, NORT-a, 3ct i trening dana u regularnoj fazi MVM-a analizirani su trofaktorskom ANOVA-om sa ponovljenim merenjima (fiksni faktori: pol, genotip, tretman, i faktori u okviru subjekata: objekat, miš ili dan, redom), praćenom poređenjima u paru sa Sidak post hoc testom. Za ANOVA-u sa ponovljenim merenjima, primenjena je *Greenhouse-Geisser* korekcija. Ostali bihevioralni podaci i qPCR rezultati za neuroinflamaciju podvrgnuti su trofaktorskoj ANOVA (za faktore pol, genotip i tretman) sa Sidak post hoc testom. Podaci za ekspresiju subjedinica GABA_A receptora su pratili normalnu distribuciju, proverenu Shapiro–Wilk testom, a ekspresija gena je analizirana za svaki pol dvofaktorskom ANOVA-om (faktori: genotip i tretman) da bi se utvrdile razlike između grupa (Biasin i sar., 2017). Statistička analiza je obavljena u softveru IBM SPSS Statistics 25, a grafikoni su crtani u GraphPad Prism 9.

Z-skorovi

Z-skor je definisan kao što su prethodno objavili Guilloux i saradnici (Guilloux i sar., 2011). Prvo, z-skor za svaki parametar ponašanja u okviru jednog testa za svaku životinju se izračunava prema formuli: $z = (x - \mu) / \sigma$, gde je μ srednja vrednost za netransgenu grupu tretiranu rastvaračem, σ je standardna devijacija za rastvaračem tretiranu netransgenu grupu i x je vrednost dobijena u testu za izabrani bihevioralni parametar. Ako je parametar bio obrnuto proporcionalan domenu ponašanja, znak minus je dodat ispred vrednosti σ koja je u formuli. Dalje, ako se više od jednog parametra koristi iz jednog testa, njihova srednja z vrednost se uzima kao test z-skor za dalju analizu. U suprotnom, z-skor za parametar je test z-skor. Ukupan z-skor za svaku životinju za domen ponašanja se izračunava kao zbir test z-skor-ova za životinju koji doprinose izabranom domenu, podeljen sa brojem test z-skor-ova za svaku životinju. Ukupni z-skor-ovi su podvrgnuti dvofaktorskoj ANOVA-i nakon čega sledi Sidak post hoc. Parametri uključeni u ukupan z-skor bili su: trajanje prelaska grede i broj proklizavanja u testu hodanja po gredi za motorni *z-skor*, vreme provedeno u otvorenim kracima u EPM-u i procenat perifernog puta tokom prvih 10 minuta u OF za *z-skor* za emocionalnost, i broj ulazaka u zatvorene krake u EPM testu i ukupna distanca tokom poslednjih 5 minuta u OF za *z-skor* za motivaciju. Reprezentativni parametri u EPM i OF odabrani su na sličan način kao što je prethodno objavljeno (Guilloux i sar., 2011).

Parametri mereni u qPCR eksperimentima za gensku ekspresiju subjedinica alfa 2, alfa 3 i alfa 5 GABA_A receptora analizirani su dvofaktorskom ANOVA-om (faktori: genotip i tretman) u različitim strukturama mozga za svaki pol.

Statistička značajnost je prikazana na grafikonima kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$. Statistički trend je označen kao ~ za $0,05 < p < 0,1$. Ukoliko su bili značajni, ukupni efekti su prikazivani na svakom grafikonu u gornjem levom uglu.

Neparameterska statistika

Normalna raspodela podataka iz NORT-a, SIT-a, SRT-a, MVM-a i qPCR-a za markere neuroinflamacije testirana je pomoću Shapiro-Wilk testa, ali neke grupe nisu prošle kriterijum za normalnu distribuciju. Pošto je veličina uzorka po grupi bila relativno mala, transformacija podataka nije mogla da promeni distribuciju podataka. Pokazano je da ANOVA daje značajnu robusnost kada se primeni na podatke bez normalne distribucije (Blanca i sar., 2017). Štaviše, kako ne postoji neparameterski ekvivalent za trofaktorsku ANOVA-u, koristili smo ovaj test za analizu, ali za grupe koje nisu pratile normalnu distribuciju, korišćen je neparameterski Mann-Whitney U test da bi se potvrdile razlike između grupa, gde najmanje jedna od grupa nije pratila normalnu distribuciju, koje su dobijene nakon Sidak *post hoc* testa (uporediti sa Ganguli et al., 2019). Od 19 razlika za analizirane parametre koje su otkrivene između dve grupe gde bar jedna od njih nije pratila normalnu distribuciju, neparametersko testiranje je potvrdilo značajne razlike u 14 slučajeva, u 4 slučaja razlika je bila na nivou statističkog trenda ($0,05 < p < 0,1$), a samo u 1 slučaju je značajna razlika nestala. Shodno tome, odlučili smo da predstavimo i prodiskutujemo sve promene otkrivene ANOVA testiranjem, sa jednim izuzetkom u slučaju kada neparameterska analiza nije uspela da pokaže čak ni razliku na nivou trenda.

Veličina uzorka

Tabela 3. Prikazan je broj životinja po grupama u različitim eksperimentima za ispitivanje socijalne interakcije, kognicije i neuroinflamacije. Nejednaka veličina uzorka u različitim testovima unutar svake grupe bila je posledica ograničenog broja tehničkih propusta tokom praćenja životinje softverom Anymaze. Pored toga, životinje svetlog krzna u prve dve kohorte nisu analizirane u MVM proceduri zbog tehničkih poteškoća. S – rastvarač, M – MP-III-022, P – PWZ-029

| Broj životinja po grupi | Netransgeni mužjaci (Ntgm) | | | Transgeni mužjaci (Tgm) | | | Netransгене ženke (Ntgž) | | | Transgene ženke (Tgž) | | |
|---|----------------------------|----|----|-------------------------|----|----|--------------------------|----|----|-----------------------|----|----|
| | S | M | P | S | M | P | S | M | P | S | M | P |
| NORT kratkoročno | 9 | 10 | 9 | 10 | 10 | 13 | 14 | 12 | 15 | 10 | 9 | 9 |
| NORT dugoročno | 7 | 12 | 12 | 9 | 13 | 12 | 16 | 13 | 17 | 12 | 11 | 10 |
| SIT | 9 | 12 | 10 | 12 | 11 | 12 | 16 | 14 | 15 | 11 | 11 | 12 |
| SRT | 9 | 12 | 10 | 12 | 11 | 12 | 16 | 14 | 15 | 11 | 11 | 12 |
| MVM regularni trening i <i>probe</i> test | 6 | 10 | 8 | 9 | 10 | 10 | 14 | 12 | 13 | 8 | 10 | 10 |
| MVM reverzni trening dan 1 | 6 | 10 | 9 | 9 | 10 | 10 | 14 | 12 | 13 | 8 | 10 | 10 |
| MVM reverzni <i>probe</i> test | 6 | 10 | 9 | 9 | 10 | 10 | 13 | 11 | 13 | 8 | 10 | 10 |
| <i>Gfap</i> HC | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| <i>Gfap</i> PFC | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Iba1</i> HC | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 3 | 4 |
| <i>Iba1</i> PFC | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Il1b</i> HC | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 6 | 4 | 3 | 4 |
| <i>Il1b</i> PFC | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 3 |
| <i>Il-6</i> HC | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 3 | 5 |
| <i>Il-6</i> PFC | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 |
| <i>Tnfa</i> HC | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 3 | 5 |
| <i>Tnfa</i> PFC | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 5 | 4 |

Tri iste uzastopno evaluirane subkohorte su podvrgnute bihejvioralnim testovima.

Tabela 4: Veličina uzorka koja je korišćena po grupi za eksperimente za nekognitivne parametre, z-skorove i merenja ekspresije iRNK za *Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5* subjedinice GABA_A receptora. M – mušjaci; Ž – ženke.

| Veličina uzorka | MP-III-022 | | | | PWZ-029 | | | | Rastvarač | | | |
|--|-------------|----|-----------|----|-------------|----|-----------|----|-------------|----|-----------|----|
| | Netransgeni | | Transgeni | | Netransgeni | | Transgeni | | Netransgeni | | Transgeni | |
| | M | Ž | M | Ž | M | Ž | M | Ž | M | Ž | M | Ž |
| Ukupan broj po grupi | 12 | 15 | 11 | 10 | 10 | 15 | 12 | 12 | 9 | 16 | 12 | 11 |
| <i>Beam walking</i> test ili z-motorni | 12 | 14 | 11 | 7 | 10 | 13 | 11 | 10 | 7 | 14 | 9 | 9 |
| EPM | 11 | 15 | 11 | 10 | 9 | 15 | 11 | 12 | 9 | 16 | 10 | 11 |
| OF | 11 | 15 | 11 | 10 | 10 | 14 | 12 | 12 | 9 | 15 | 11 | 11 |
| z-emocionalnost ili z-motivacija | 10 | 15 | 11 | 10 | 9 | 14 | 11 | 12 | 9 | 15 | 10 | 11 |
| <i>Gabra2</i> HC | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| <i>Gabra2</i> PFC | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Gabra3</i> HC | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| <i>Gabra3</i> PFC | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Gabra5</i> HC | 6 | 5 | 6 | 5 | 6 | 6 | 5 | 5 | 5 | 6 | 5 | 5 |
| <i>Gabra5</i> PFC | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 4 | 4 | 5 | 6 | 3 |

Nejednak broj po grupi predstavlja jedno od ograničenja studije. Životinje iz subkohorti su randomno primale neki od tretmana (PAM, NAM ili SOL) i prošle su bihejvioralnu bateriju. Ukupno tri nezavisne eksperimentalne subkohorte su bile podvrgnute po jednoj od tri uzastopne bihejvioralne baterije. Dakle, jednak broj životinja po grupi nije mogao da se obezbedi zbog neizvesnosti koliko će leglo biti veliko, ali je minimalna predviđena veličina uzorka bila 9. S druge strane, jedan netransgeni mužjak tretiran sa MP-III-022 je podlegao povredama i/ili bolesti nakon OF eksperimenta. Za qPCR analizu, broj uzoraka je varirao, ali nikada nije bio manji od 3 uzorka po grupi.

Dalje, zbog tehničkih poteškoća, rezultate nekih životinja nije bilo moguće izmeriti u testu hodanja po gredi (ukupno: 11). Pored toga, rezultati za parametre: vreme potrebno da se pređe greda iznad 50s i/ili broj proklizavanja veći od 24 isključeni su iz statističke analize kao ekstremne vrednosti (*outliers*) (ukupno: 2 TgS muškarca, 2 TgM žene, 1 NtgP žena, 2 NtgS žene). Tri rezultata iz EPM-a su isključena iz statističke analize jer životinje ne ulaze na otvorene krake. Slično tome, tri rezultata iz OF su takođe isključena zbog nekretanja životinja u areni. Nejednaka veličina uzorka u različitim testovima socijalnosti i kognicije unutar svake grupe bila je posledica određenog broja grešaka tokom praćenja životinja softverom Anymaze.

Rezultati

Farmakokinetička studija

Farmakokinetička studija je utvrdila da bi doza od 5 mg/kg bila bliska optimalnoj za produženi tretman sa oba liganda, PWZ-029 i MP-III-022, kako bi se u bihejvioralnim eksperimentima postigla selektivnost za $\alpha 5$ GABA_A receptore praćena znatnom pozitivnom ili negativnom modulacijom ovih receptora.

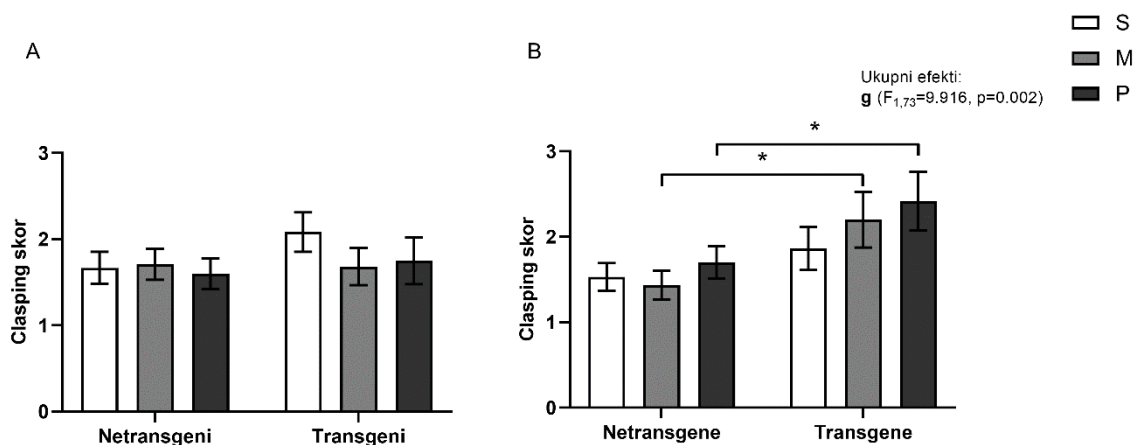
Tabela 5: U farmakokinetičkoj studiji na C57BL soju miševa utvrđene su ukupna koncentracija i slobodna frakcija liganda u mozgu za MP-III-022 i PWZ-029. Srednje vrednosti \pm SEM su prikazane za ukupnu koncentraciju u mozgu, a slobodna koncentracija je izračunata kao 6,6% (StameniĆ i sar., 2016) i 7,91% (Timić StameniĆ i sar., 2015) od ukupne koncentracije u mozgu za MP-III-022, odnosno PWZ-029. C_{total} je ukupna koncentracija u mozgu, a C_{free} je preraćunata slobodna koncentracija.

| Vremenska taćka | MP-III-022 | | | |
|-------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | 1mg/kg | | 5mg/kg | |
| | C_{total} (nmol/l) | C_{free} (nmol/l) | C_{total} (nmol/l) | C_{free} (nmol/l) |
| 20 min posle prve doze | 91,78 \pm 3,75 | 6,06 | 629,55 \pm 57,98 | 41,55 |
| 24 h posle prve doze | 38,11 \pm 0,22 | 2,52 | 37,82 \pm 1,29 | 2,50 |
| 20 min posle treće doze | 101,57 \pm 5,67 | 6,70 | 428,13 \pm 45,83 | 28,26 |
| 24 h posle treće doze | 49,19 \pm 8,74 | 3,25 | 40,60 \pm 1,19 | 2,68 |
| | PWZ-029 | | | |
| | 1mg/kg | | 5mg/kg | |
| | C_{total} (nmol/l) | C_{free} (nmol/l) | C_{total} (nmol/l) | C_{free} (nmol/l) |
| 20 min posle prve doze | 169,37 \pm 20,67 | 13,40 | 1279,47 \pm 132,38 | 101,21 |
| 24 h posle prve doze | 76,34 \pm 21,41 | 6,04 | 58,53 \pm 2,09 | 4,63 |
| 20 min posle treće doze | 690,56 \pm 462,56 | 54,62 | 1605,43 \pm 544,94 | 126,99 |
| 24 h posle treće doze | Nema rezultata | | Nema rezultata | |

Na osnovu sadržaja Tabele 5, kao i odgovarajućih krivih koncentracija-odgovor za MP-III-022 i PWZ-029 na $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - i $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ GABA_A receptorima, sa procenjenim elektrofiziološkim odgovorima slobodne koncentracije liganada primenjenih u testiranom opsegu doze (Stamenić i sar., 2016, Stamenić i sar., 2015), izvršena je selekcija doze. Za MP-III-022 koji je dat u dozi od 5 mg/kg, slobodna koncentracija u mozgu 20 minuta nakon treće doze, za koju se pretpostavlja da je relevantna za postizanje stanja ravnoteže, približno je iznosila 28,26 nmol/l. Ova koncentracija bi mogla biti dovoljna da izazove $\alpha 5$ GABA_A posredovan odgovor, kao što je diskutovano ranije (Stamenić i sar., 2016). Slično, procenjuje se da je 20 minuta nakon treće doze PWZ-029 slobodna koncentracija u mozgu bila 126,99 nmol/l, što bi potencijalno moglo da izazove selektivan efekat preko $\alpha 5$ GABA_A receptora, kao što je ilustrovano ranije (Stamenić i sar., 2015). Ove doze liganda su odabrane kao najniže koje mogu da pruže pouzdane elektrofiziološke i posledično bihevioralne efekte, obezbeđujući selektivnost na $\alpha 5$ GABA_A receptorima.

Testovi za procenu senzorno-motorne funkcije

Rezultati za *claspings* refleks kod mužjaka i ženki prikazani su na Slici 6. Kod transgenih ženki su detektovani viši rezultati za *claspings* refleks nakon tretmana PWZ-029 u poređenju sa isto tretiranim netransgenim ženkama ($p=0,020$), kao i kod transgenih ženki tretiranih MP-III-022 u poređenju sa grupom netransgenih ženki tretiranih MP-III-022 ($p=0,019$).



Slika 6: Prikazani su rezultati *claspings* skora 5xFAD životinja nakon tretmana sa PWZ-029 (P), MP-III-022 (M) i rastvaračem (S) (za mužjake (A) i ženke (B)). Statističke razlike između grupa $0,01 < p < 0,05$, prikazane su kao *. Ukupni efekti genotipa (g) ili tretmana (t) sumirani su u gornjem desnom uglu, ako su značajni.

U *basket* testu prikazan je ukupan efekat pola ($F_{1,134}=27,342, p < 0,001$). MP-III-022 tretirani transgeni i netransgeni mužjaci proveli su manje vremena na korpi u poređenju sa transgenim ženkama tretiranim MP-III-022 ($p=0,025$) i netransgenim ženkama tretiranim MP-III-022 ($p=0,022$), redom. Transgeni i netransgeni mužjaci tretirani rastvaračem proveli su manje vremena na korpi u poređenju sa rastvaračem tretiranim transgenim ($p=0,008$) i

netransgenim ($p=0,012$) ženkama, redom. Netransgeni mužjaci tretirani PWZ-029 su provodili manje vremena na korpi u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim PWZ-029 ($p=0,011$).

U rotarod testu, transgeni mužjaci tretirani MP-III-022 provodili su više vremena na rotarodu u poređenju sa transgenim ženkama tretiranim MP-III-022 ($p=0,02$).

Nije primećena statistička razlika između grupa za refleks rožnjače i refleks uspravljanja, kao ni za test lokalizacije hrane.

U testu lokalizacije hrane, deskriptivna statistika je pokazala da 11,94% transgenih i 10,45% netransgenih mužjaka (od ukupnog broja mužjaka), nije moglo da pronađe kolačić u roku od 15 minuta. Procenat neuspešnih transgenih i netransgenih ženki da otkriju kolačić bio je 8,97% i 6,41% od svih ispitanih ženki, redom. Procenti neuspešnih mužjaka da proneđu kolačić bili su: TgP 33,33%, TgM 0%, TgS 20%, NtgP 20%, NtgM 20%, NtgS 6,67%. Za ženke, procenti životinja koje nisu mogle da pronađu kolačić po grupama bili su: TgP 25%, TgM 16,67%, TgS 16,67%, NtgP 16,67%, NtgM 16,67%, NtgS 8,33%.

Svi rezultati testa hodanja po gredi prikazani su na Slici 7. Post hoc test je otkrio statističku razliku u vremenu provedenom u prelasku grede između transgenih mužjaka tretiranih PWZ-029 i MP-III-022; transgeni mužjaci tretirani PWZ-029 su imali niže vrednosti ($p=0,038$). Štaviše, transgeni mužjaci tretirani MP-III-022 su zahtevali duže vreme za prelazak preko grede nego transgeni mužjaci koji su primili rastvarač ($p=0,038$). Slično, transgene ženke tretirane rastvaračem su pokazale produženi prelazak preko grede u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim rastvaračem ($p=0,005$). Transgena grupa koja je primila rastvarač je pokazala trend povećanja broja proklizavanja (*slips*) u poređenju sa netransgenom grupom tretiranom rastvaračem i kod mužjaka i kod ženki ($p=0,098$ i $p=0,069$, respektivno). Transgeni mužjaci tretirani rastvaračem su pokazali efekat trenda u vremenu potrebnom za prelazak preko grede u poređenju sa transgenim ženkama tretiranim rastvaračem, i proveli su manje vremena na gredi (trend, $p=0,062$). Transgenim mužjacima tretiranim PWZ-029 je takođe bilo potrebno manje vremena da pređu gredu u poređenju sa transgenim ženkama tretiranim PWZ-029 ($p=0,011$).

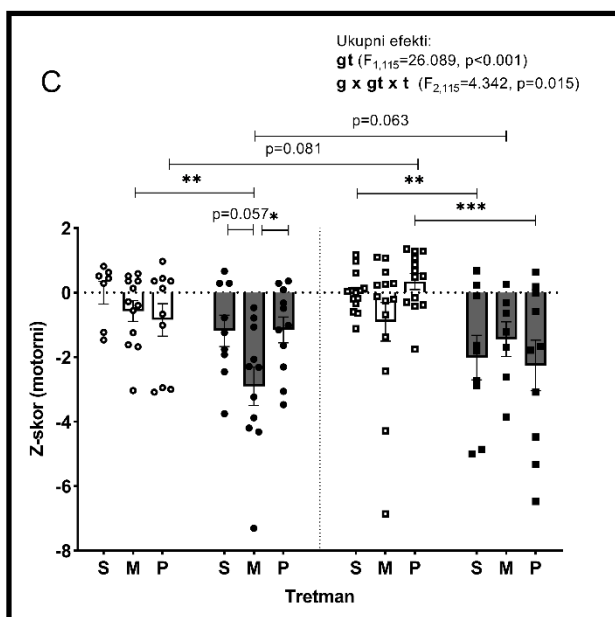
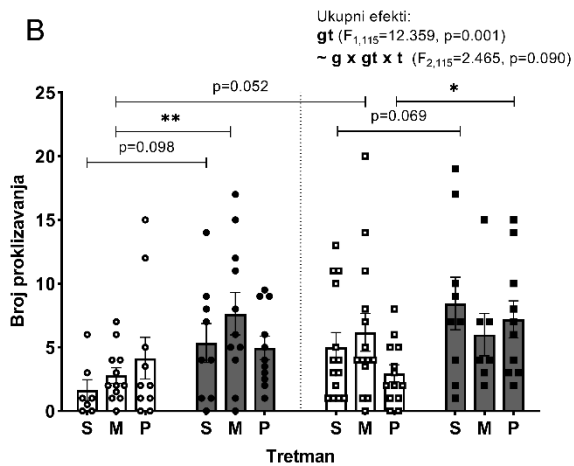
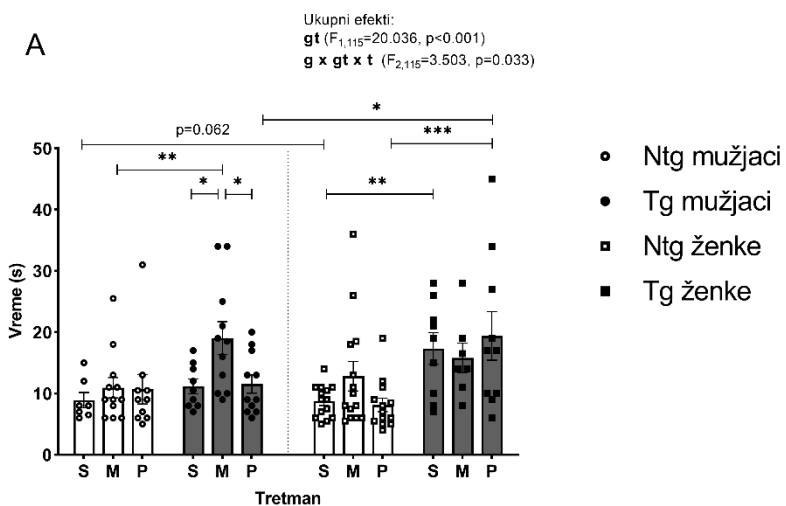
Netransgeni mužjaci tretirani MP-III-022 su pokazali manji broj proklizavanja (*slips*) u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim MP-III-029 (trend, $p=0,052$).

Ukupan z-skor za motorne sposobnosti (z-motorni)

Ukupni z-skor za motornu funkciju kod oba pola, zajedno sa značajnim ukupnim efektima genotipa, tretmana ili interakcije genotip x tretman, prikazan je na Slici 7. Tretman MP-III-022 je smanjio z-motor kod transgenih mužjaka u poređenju sa transgenim mužjacima tretiranim PWZ-029 ($p=0,037$). Dalje, tretman MP-III-022 pokazao je efekat trenda na smanjenje z-motora kod transgenih mužjaka u poređenju sa transgenim mužjacima tretiranim rastvaračem (trend, $p=0,057$). Kod ženki, transgene ženke tretirane rastvaračem su pokazale niži z-motor u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim rastvaračem ($p=0,004$), a isto važi i za transgene ženke tretirane PWZ-029 u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim PWZ-029 ($p<0,001$). Pokazan je efekat trenda usled polnih razlika za

dve grupe, mužjaci su pokazivali niže vrednosti od ženki u grupama transgenih životinja tretiranih MP-III-022 ($p=0,063$) i netransgenih životinja tretiranih PWZ-029 ($p=0,081$).

Motorna funkcija



Slika 7: Motorna funkcija – Rezultati dobijeni u testu hodanja po gredi za mužjake i ženke – prikazani su vreme potrebno za prelazak grede (A) i broj proklizavanja (B) za 5xFAD životinje nakon tretmana sa PWZ-029 (P), MP-III-022 (M) i rastvaračem (S). Kompozitni parametar za procenu motorne funkcije (ukupni z-skor za motornu funkciju) u ovom AD modelu nakon prethodno pomenutog tretmana je označen pravougaonikom (C). Statističke razlike između grupa: $0,01 < p < 0,05$, $0,001 < p < 0,01$ bile su prisutne kao *, **, redom. Efekti trenda ($0,05 < p < 0,1$) su označeni kao ~ ili je napisana vrednost p. Efekat polnog trenda za odabranu eksperimentalnu grupu je označen sa ^ i upisana je vrednost p. Sve trake grešaka predstavljaju SEM. Ukupni efekti genotipa (gt), tretmana (t) ili pola (g) su sumirani u gornjem desnom uglu svakog grafikona, ako su značajni.

Test otvorenog polja (OF)

Značajni ukupni efekti u testu otvorenog polja kod 5xFAD miševa su predstavljeni na Slici 8 i Slici 9. Kod mužjaka, post hoc poređenja su pokazala da je procenat perifernog puta u prvih 10 minuta (% perifernog puta) smanjen u grupi netransgenih životinja tretiranih PWZ-029 kao i u grupi netransgenih tretiranih MP-III-022 u poređenju sa grupom netransgenih tretiranih rastvaračem ($p=0,002$ i $p=0,001$, redom). Međutim, kod ženki, % perifernog puta je povećan kod transgenih životinja tretiranih MP-III-022 u poređenju sa grupom transgenih ženki tretiranih rastvaračem ($p=0,035$). Kod mužjaka, % perifernog puta je smanjen kod transgenih životinja koje su primile rastvarač u poređenju sa netransgenim životinjama tretiranim na isti način ($p=0,044$). Grupe transgenih i netransgenih životinja koje su primile rastvarač su se razlikovale po parametru % perifernog puta kod mužjaka u poređenju sa ženkama, i grupe mužjaka su bile sa višim vrednostima ($p=0,047$ i $p=0,004$, redom).

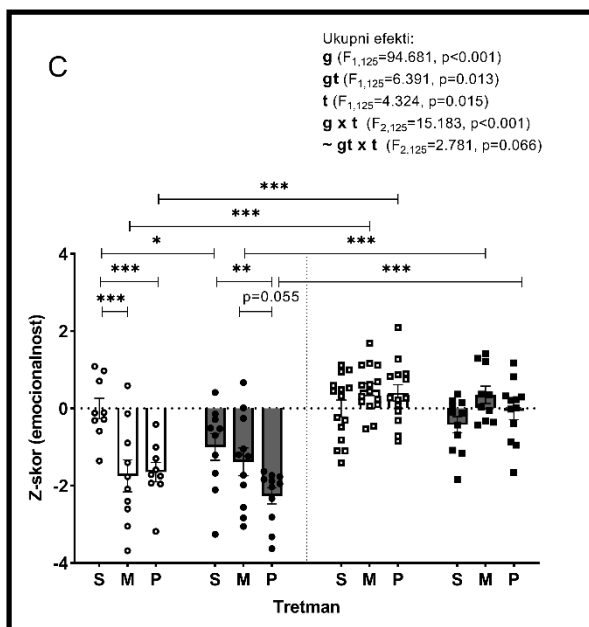
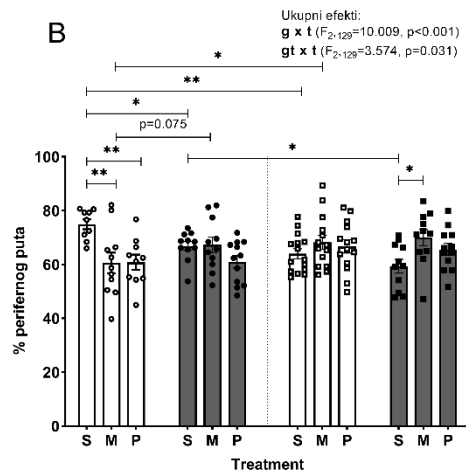
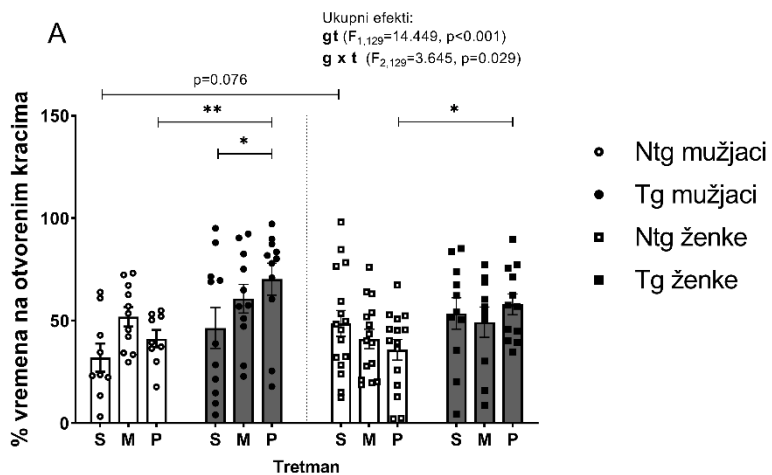
Rezultati u uzidnutom plus lavirintu (EPM)

Za rezultate iz EPM-a, značajni ukupni efekti interakcije genotipa, tretmana ili genotip x tretman prikazani su na Slici 8 i Slici 9. Kod ženki, netransgena grupa tretirana MP-III-022 je imala povećani broj ulazaka u zatvorene krake u poređenju sa netransgenom grupom tretiranom rastvaračem ($p=0,031$). Grupa transgenih životinja tretirana PWZ-029 imala je povećani broj ulazaka u zatvorene krake kod mužjaka u poređenju sa ženkama ($p=0,035$). Efekat trenda je prikazan za broj ulazaka u zatvorene krake između netransgenih mužjaka i ženki tretiranih MP-III-022, gde su netransgeni mužjaci imali niže vrednosti nakon tretmana ($p=0,051$). Kod mužjaka, transgene životinje tretirane PWZ-029 imale su povećani procenat vremena na otvorenim kracima u poređenju sa transgenim miševima tretiranim rastvaračem ($p=0,041$). Otkrivena je razlika na nivou trenda između netransgenih mužjaka i ženki tretiranih rastvaračem u procentu vremena provedenog na otvorenim kracima, pri čemu su mužjaci imali niže vrednosti (trend, $p=0,076$).

Ukupan z-skor za emocionalnu reaktivnost (z-emocionalnost)

Ukupan z-skor za emocionalnost kod oba pola prikazan je na Slici 8. Nadalje, ukupni efekti interakcije genotipa, tretmana ili genotip x tretman, ako su značajni, takođe su prikazani na Slici 8. Tretman PWZ-029 je smanjio z-emocionalnost kod transgenih mužjaka u poređenju sa transgenim tretiranim rastvaračem ($p=0,003$). Kod mužjaka, transgene životinje tretirane rastvaračem imale su niže vrednosti za z-emocionalnost od netransgenih miševa tretiranih rastvaračem ($p=0,014$). Slično smanjenje z-emocionalnosti je takođe bilo prisutno u NtgP grupi netransgenih mužjaka tretiranih PWZ-029 u poređenju sa netransgenim mužjacima tretiranim rastvaračem ($p<0,001$), kao i u grupi netransgenih mužjaka tretiranih MP-III-022 u poređenju sa netransgenim mužjacima koje su primili rastvarač ($p<0,001$). Pored toga, PWZ-029 tretman je pokazao efekat na nivou trenda na z-emocionalnost u grupi transgenih mužjaka u poređenju sa transgenim mužjacima tretiranim MP-III-022, pri čemu su transgeni mužjaci tretirani PWZ-029 imali smanjene vrednosti ($p=0,055$). Primećen je efekat pola, za transgene životinje tretirane MP-III-022 ($p<0,001$) i PWZ-029 ($p<0,001$), kao i za netransgene životinje tretirane MP-III-022 ($p<0,001$) i PWZ-029 ($p<0,001$), pri čemu su mužjaci imali niže vrednosti od ženki.

Emocionalnost



Slika 8: Emocionalnost – Rezultati dobijeni kod 5xFAD miševa tretiranih sa PWZ-029 (P), MP-III-022 (M) ili rastvaračem (S) prikazuju emocionalnost kod transgenih i netransgenih 5xFAD mužjaka i ženki. Procenat vremena na otvorenim kracima (A) dobijen je u EPM. Procenat perifernog puta u prvih 10 minuta (B) izabran je kao OF parametar za anksioznost u pravougaonj areni. Ukupan z-skor za merenje emocionalne reaktivnosti označen je pravougaonikom (C). Statističke razlike između grupa: $0,01 < p < 0,05$, $0,001 < p < 0,01$, $p < 0,001$ prikazane su kao *, **, ***, redom. Efekti trenda ($0,05 < p < 0,1$) su označeni kao ~ ili je napisana p vrednost. Efekat pola za odabranu eksperimentalnu grupu je označen kao ### za $p < 0,001$. Sve greške merenja predstavljaju SEM. Ukupni efekti genotipa (gt), tretmana (t), pola (g) ili njihove interakcije, kroz njihove F i p vrednosti, sumirani su u gornjem desnom uglu svakog grafikona, ako su značajni.

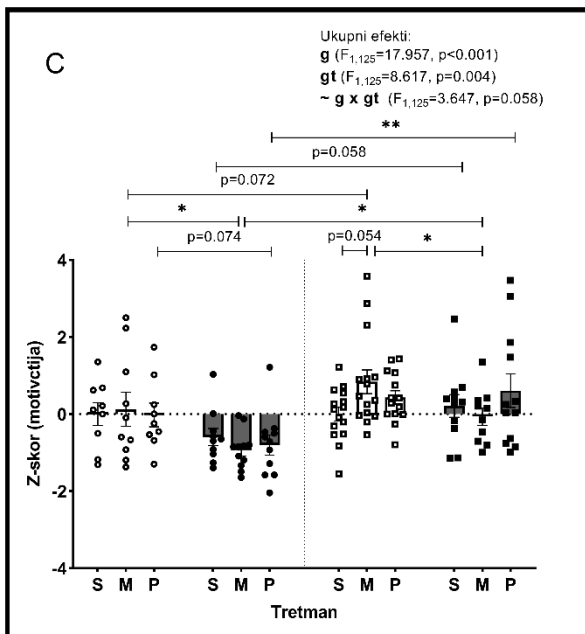
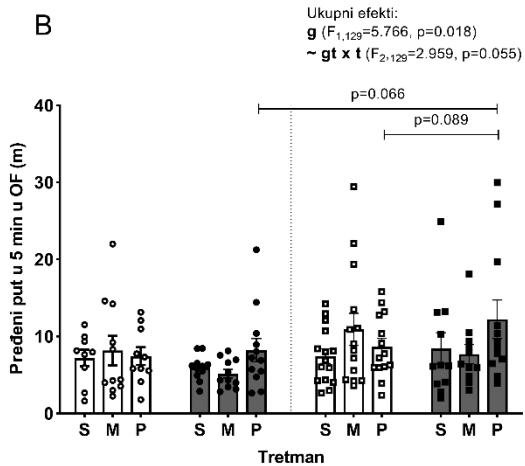
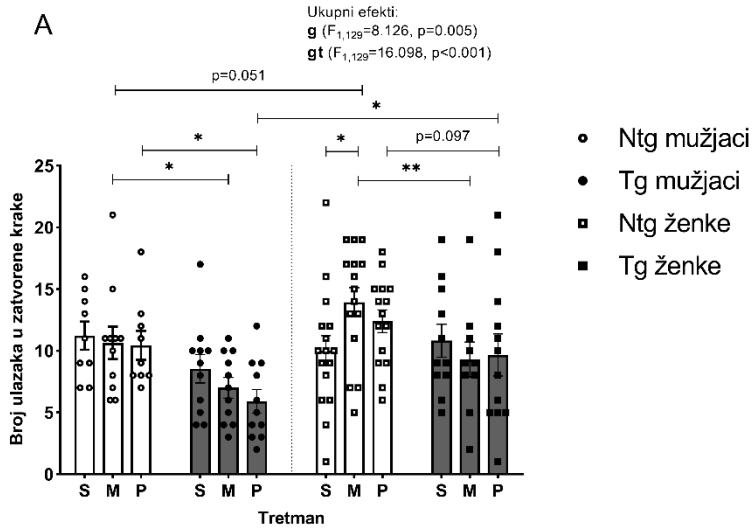
Ukupan z-skor za motivaciju (z-motivacija)

Ukupan z-skor za motivaciju za oba pola prikazan je na Slici 9. Ukupni efekti genotipa, tretmana ili interakcije genotip x tretman, ako su značajni, takođe su prikazani na istoj Slici.

Tretman MP-III-022 smanjio je z-motivaciju kod transgenih mužjaka, kao i kod transgenih ženki u poređenju sa njihovim odgovarajućim netransgenim grupama tretiranim MP-III-022 ($p=0,013$ i $p=0,023$, redom). Primena PWZ-029 pokazala je trend smanjenja parametra z-motivacija kod transgenih mužjaka u poređenju sa netransgenim mužjacima tretiranim PWZ-028 ($p=0,074$). Tretman MP-III-022 pokazao je trend povećanja z-motivacije kod netransgenih ženki u poređenju sa netrasgenim ženkama tretiranim rastvaračem ($p=0,054$).

Primećen je efekat pola, pri čemu mužjaci pokazuju niže vrednosti od ženki, za transgene životinje tretirane MP-III-022 ($p=0,042$), PWZ-029 ($p < 0,001$) i na nivou trenda za transgene životinje tretirane rastvaračem ($p=0,058$).

Motivacija

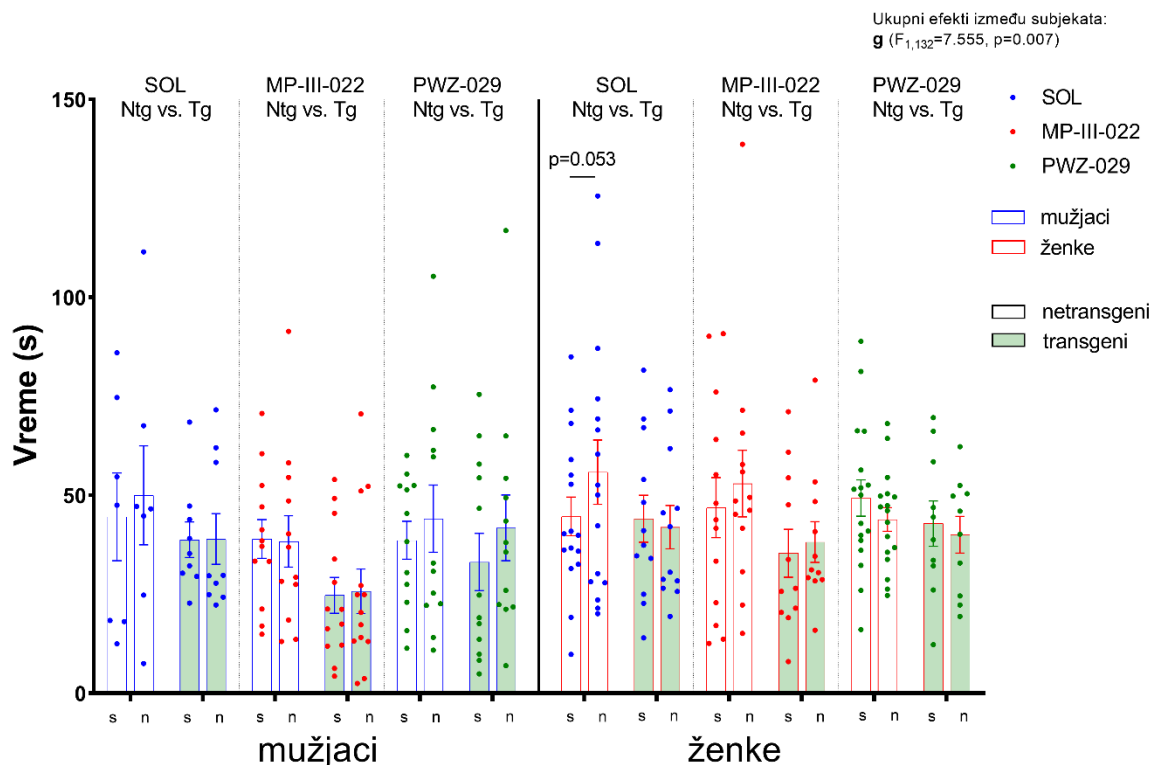


Slika 9: Motivacija – Prikazani su rezultati vezani za motivaciju kod 5xFAD miševa tretiranih PWZ-029 (P), MP-III-022 (M) ili rastvaračem (S). Ulasci u zatvorene krake (A) korišćeni su za opisivanje lokomotorne aktivnosti životinja u EPM. Pređeni put u poslednjih 5 minuta (B) je meren u OF kako bi se izbegao bilo kakav akutni anksiogeni uticaj. Ukupan z-skor za merenje motivacije naznačen je pravougaonikom (C). Statističke razlike između grupa: $0,01 < p < 0,05$, $0,001 < p < 0,01$, $p < 0,001$ prikazane su kao *, **, ***, redom. Efekti trenda ($0,05 < p < 0,1$) su označeni kao ~ ili je napisana p vrednost. Efekat pola za odabranu eksperimentalnu grupu je označen kao #, ### za $0,01 < p < 0,05$, $p < 0,001$, redom. Efekat trenda za pol za odabranu eksperimentalnu grupu je označen ^ i upisana je p vrednost. Sve greške merenja predstavljaju SEM. Ukupni efekti genotipa (gt), tretmana (t), pola (g) ili njihove interakcije, kroz njihove F i p vrednosti, sumirani su u gornjem desnom uglu svakog grafika, ako su značajni.

Rezultati za objektnu memoriju

Rezultati i značajni ukupni efekti faktora genotip, tretman, pol ili objekat ili njihova interakcija u NORT-u, prikazani su na Slici 10 i Slici 11.

U NORT-u za procenu kratkoročnog pamćenja, netransgene, ali ne i transgene ženke tretirane rastvaračem, provele su više vremena sa novim u poređenju sa starim objektom ($p=0,045$ i $p=0,985$, redom). Kod mužjaka, ni netransgene ni transgene životinje tretirane rastvaračem nisu razlikovale novi i stari objekat ($p=0,186$ i $p=0,251$, redom). Međutim, nakon primene PWZ-029, netransgeni mužjaci su preferencijalno istraživali novi u poređenju sa starim objektom ($p=0,022$). Ni PAM ni NAM tretman nije imao nikakav efekat na transgene životinje u NORT ($p=0,325$ za mužjake i $p=0,560$ za ženke, i $p=0,416$ za mužjake i $p=0,379$ za ženke). U NORT-u za procenu dugoročne memorije, samo netransgene kontrolne ženke pokazale su trend u korist provođenja više vremena sa novim objektom, u poređenju sa starim ($p=0,053$, Slika 10).



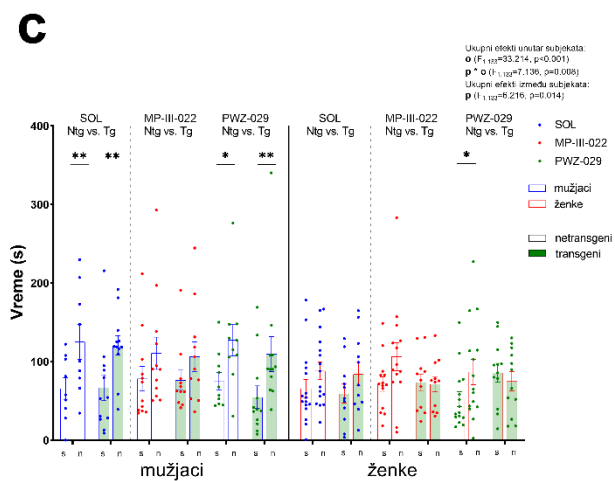
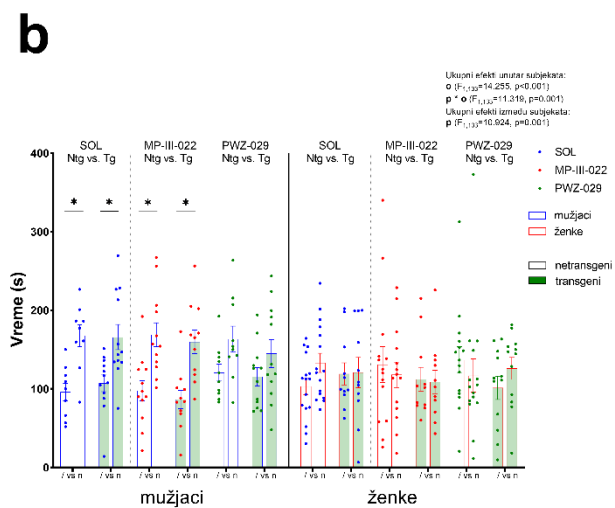
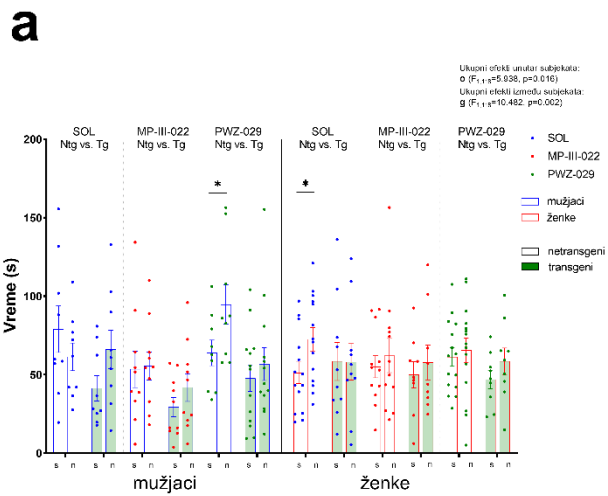
Slika 10. Prikazani su rezultati testa prepoznavanja novog objekata (NORT) za dugoročno pamćenje za transgene i netransgene 5xFAD životinje oba pola tretirane PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Vreme provedeno sa novim (n) i starim (s) objektom u NORT-u za dugoročno pamćenje je podvrgnuto trofaktorskoj ANOVA sa ponavljanim merenjima praćenim Sidak *post hoc* testom. Statistička značajnost je prikazana na grafcima kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$ ako je primenljivo. Naveden je statistički trend koji nije statistički značajan ($0,05 < p < 0,1$). Ukupni efekti, ako su značajni, dati su u gornjem desnom uglu. Korišćene skraćenice su: g, p, t i o za genotip, pol, tretman i objekat, redom.

Socijalna interakcija i socijalno prepoznavanje

Za 3ct, rezultati i ukupni efekti faktora genotip, tretman, pol ili komora ili njihova interakcija su prikazani na Slici 11.

U SIT i SRT, i transgeni i netransgeni mužjaci tretirani rastvaračem proveli su više vremena u komori koja je sadržala jednu nepoznatu životinju, odnosno novu životinju, u poređenju sa komorom sa praznim kavezom, odnosno starom životinjom ($p=0,036$ i $p=0,028$, redom). MP-III-022 tretirani transgeni i netransgeni mužjaci istraživali su više kavez sa konspicifikom u poređenju sa praznim kavezom u SIT-u ($p=0,013$ i $p=0,012$, redom). S druge strane, PWZ-029 tretirani transgeni i netransgeni mužjaci su više istraživali komoru sa novim konspicifikom, u poređenju sa starim u SRT-u ($p=0,005$ i $p=0,015$, redom). U SRT-u, PWZ-029 tretirane netransgene ženke su više istraživale

komoru sa novim konspecifikom u poređenju sa komorom sa starim konspecifikom (p=0,046).



Slika 11. Rezultati testa prepoznavanja novog objekata za kratkoročnu memoriju (NORT za kratkoročno pamćenje), testa socijalne interakcije (SIT) i testa socijalnog prepoznavanja (SRT) prikazani su za transgene i netransgene 5xFAD životinje oba pola tretirane sa PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Analizirano je vreme provedeno sa novim u poređenju sa vremenom provedenim sa starim objektom za NORT za kratkoročnu memoriju, vreme provedeno sa praznim kavezom u odnosu na kavez sa životinjom u SIT, i vreme provedeno pored kaveza sa novim u poređenju sa starim mišem u SRT (a, b i c, redom). Statistička značajnost je prikazana na graficima kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$. Trofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjima i *post hoc* Sidak test sprovedeni su za svaki skup eksperimentalnih rezultata. Ukupni efekti, ako su značajni, dati su u gornjem desnom uglu. Korišćene skraćenice su: g, p, t i o za genotip, pol, tretman i objekat (nesocijalni i/ili socijalni).

Morisov vodeni lavirint (MVM)

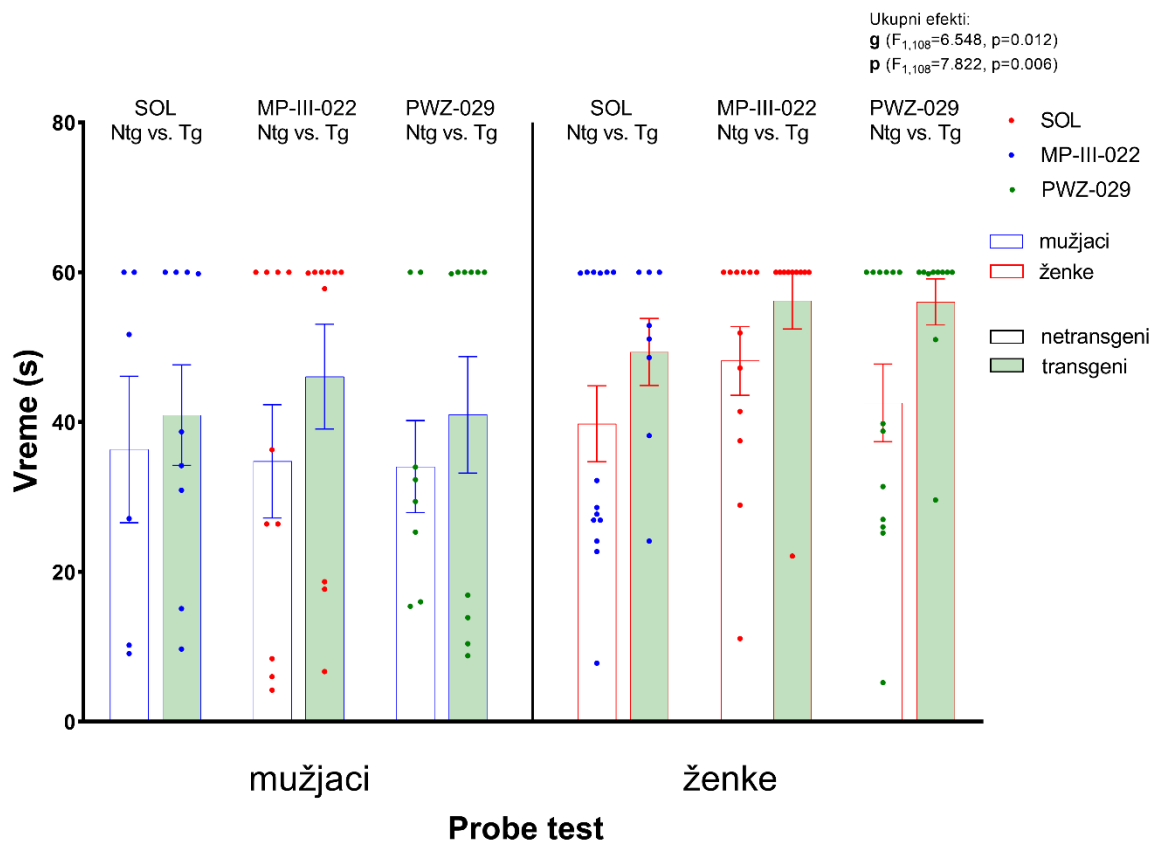
Rezultati dobijeni u MVM-u, zajedno sa ukupnim efektima faktora genotip, tretman, pol ili dan (gde postoji značajnost) ili njihova interakcija, ilustrovani su u Tabeli 6 (regularni trening), Slici 12 (*probe test*) i Slici 13 (*probe testa* i reverzna faza MVM-a).

Transgene ženke tretirane sa MP-III-022 imale su veću latenciju da pronađu platformu u poređenju sa transgenim ženka tretiranim rastvaračem ($p=0,024$) 3. dana u regularnom MVM treningu, što je prikazano u Tabeli 6. Nije otkrivena značajna razlika između latencije bilo koje druge transgene i netransgene eksperimentalne grupe tokom trening dana u regularnom MVM.

| Pol | Genotip | Tretman | Srednja vrednost latence (s) | Standardna greška | p vrednost (za sva poređenja (<i>pairwise comparisons</i>)) |
|---------|---------|------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Mužjaci | Ntg | SOL | 67,385 | 12,606 | n.s. |
| | | MP-III-022 | 49,902 | 9,765 | n.s. |
| | | PWZ-029 | 53,711 | 10,917 | n.s. |
| | Tg | SOL | 49,603 | 10,293 | n.s. |
| | | MP-III-022 | 59,683 | 9,765 | n.s. |
| | | PWZ-029 | 48,461 | 9,765 | n.s. |
| Ženke | Ntg | SOL | 66,955 | 8,253 | n.s. |
| | | MP-III-022 | 72,423 | 8,914 | n.s. |
| | | PWZ-029 | 71,899 | 8,564 | n.s. |
| | Tg | SOL | 52,234 (za dan 3: 44,438) | 10,917 (za dan 3: 12,823) | Tg ženke tretirane sa MP-III-022 vs SOL (ukupni efekat) p=0,025 * |
| | | MP-III-022 | 85,544 (za dan 3: 90,955) | 9,765 (za dan 3: 11,469) | |
| | | PWZ-029 | 71,714 | 9,765 | (Tg ženke tretirane sa MP-III-022 vs SOL za dan 3: p=0,024 *) n.s. |

Tabela 6: Prikazane su srednja vrednost i standardna greška za prosečne latencije za pronalaženje platforme tokom regularnog treninga u Morisovom vodenom lavirintu (MVM) za svaku grupu. Značajni rezultati MVM-a tokom cele procedure treninga su navedeni za transgene i netransgene 5xFAD životinje oba pola tretirane PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Pored toga, uvrštena je značajna razlika utvrđena na svakom pojedinačnom danu treninga. Dakle, samo transgene ženke tretirane sa MP-III-022 ili SOL pokazale su razliku u svim danima treninga i na dan treninga 3, tako da su srednja vrednost i standardna greška merenja za odabrane latencije stavljene u tabelu. Korišćena je trofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjima praćena Sidak *post hoc* testom. Statistička značajnost je prikazana u tabeli kao * za $0,01 < p < 0,05$, a ukoliko nema razlike navedeno je n.s.

Nije pronađena značajna razlika u latenciji za pronalaženje zone platforme između grupa u test danu (*probe test*) (Slika 12).



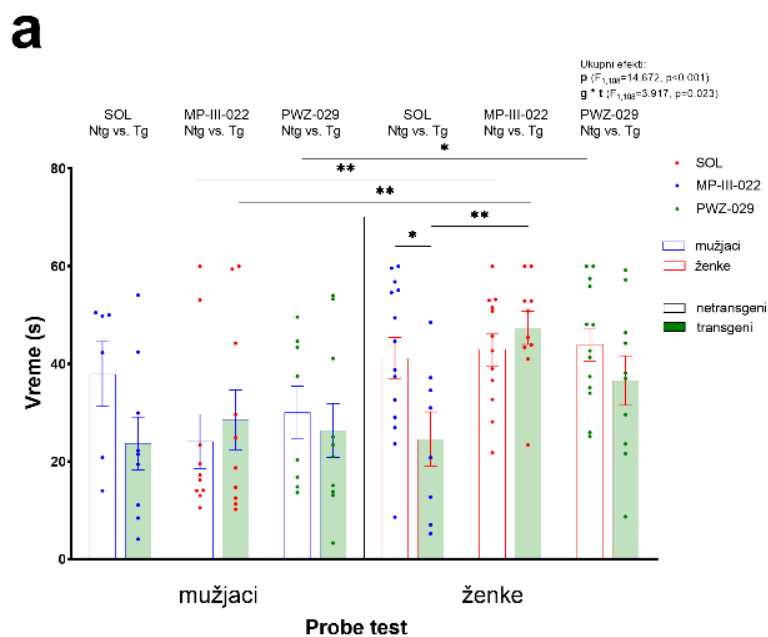
Slika 12. Prikazani su rezultati *probe* testa u protokolu za Morisov vodeni lavirint (MVM) test za prostornu memoriju za transgene i netransgene 5xFAD životinje oba pola tretirane sa PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Rezultati latencija za pronalaženje zone platforme analizirani su trofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanim merenjima praćenom Sidak *post hoc* testom. Statistička značajnost je prikazana na grafiku kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$. Ukupni efekti, ako su značajni, dati su u gornjem levom uglu. Korišćene skraćenice su: g, p i t za genotip, pol i tretman, redom.

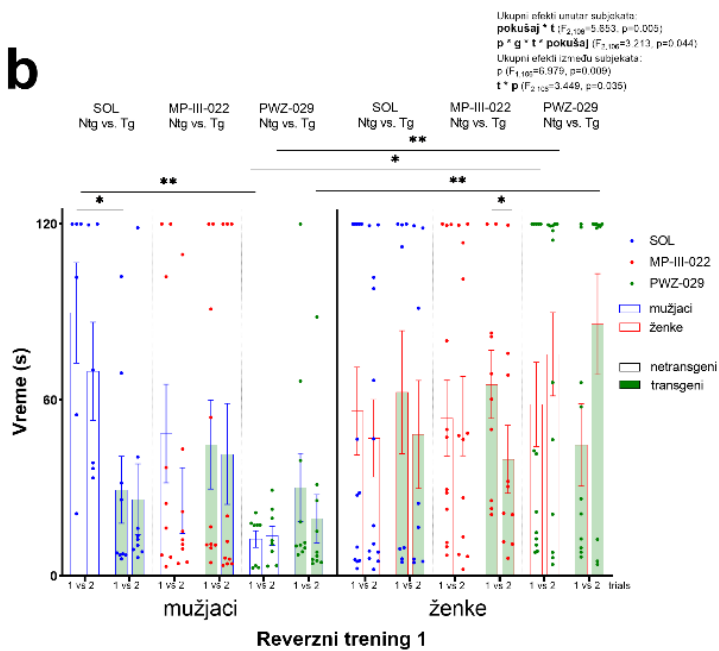
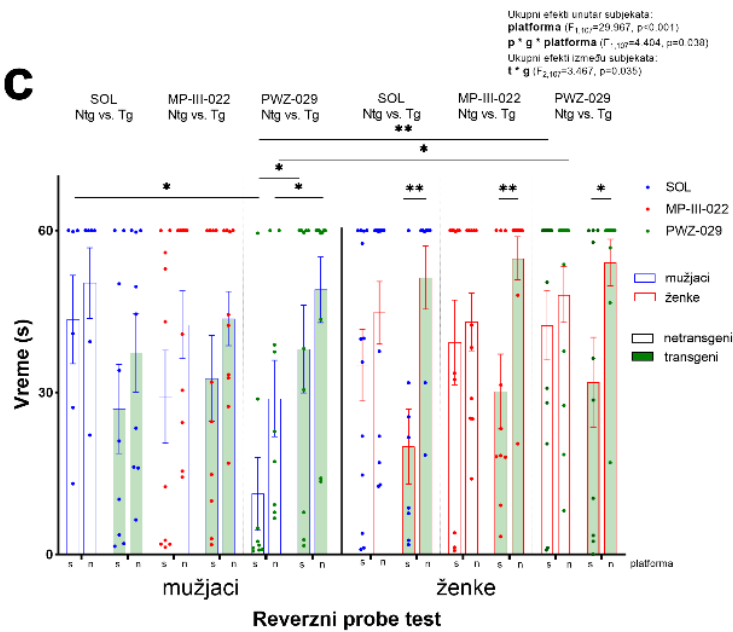
U *probe* testu (na Slici 12), transgene kontrolne ženke provele su manje vremena na periferiji u poređenju sa netransgenim kontrolnim ženkama ($p=0,016$). Transgene ženke tretirane MP-III-022 provele su više vremena u perifernoj zoni u poređenju sa transgenim ženkama koje su tretirane rastvaračem ($p=0,007$).

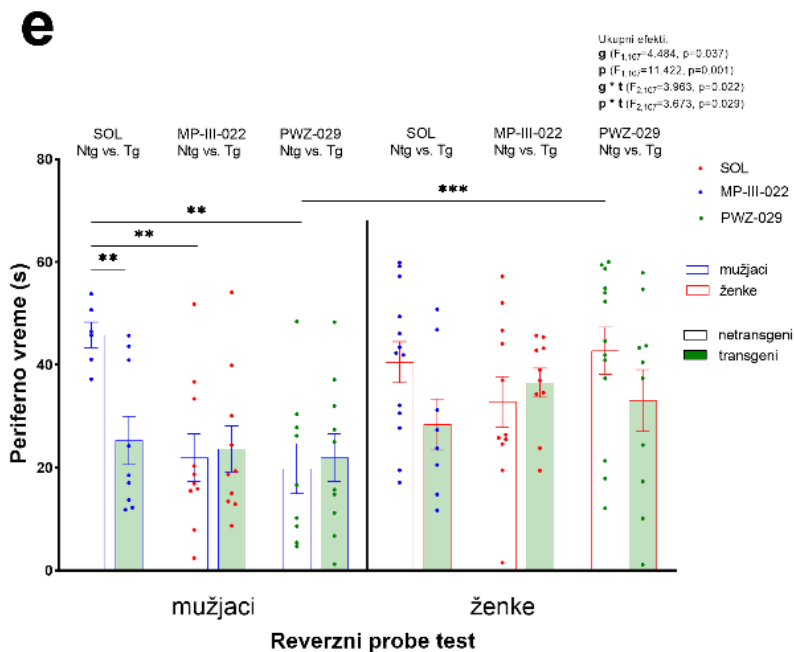
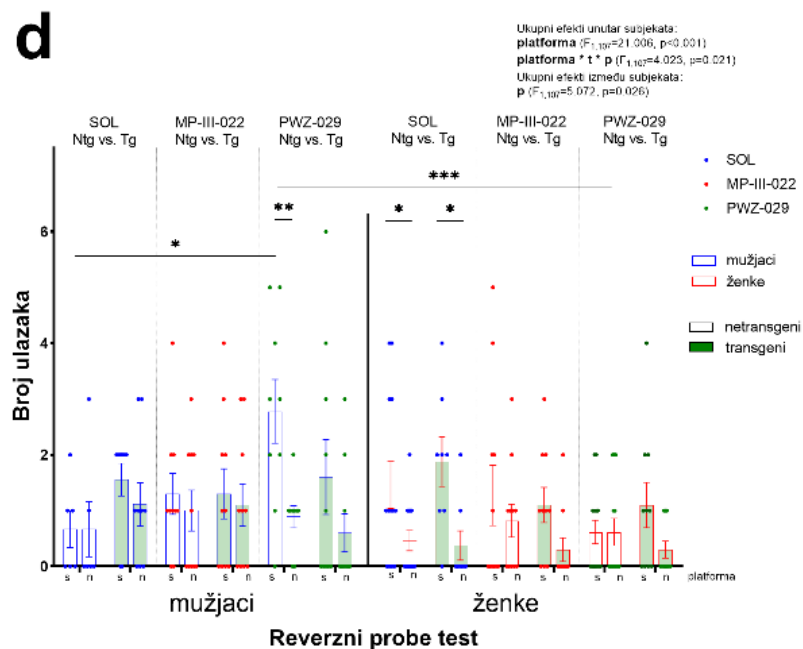
U reverznom danu treninga sa označenom platformom (*reversal cued day*, Slika 13), transgene ženke tretirane sa MP-III-022 imale su niže latencije da pronađu novu platformu u pokušaju 2 u poređenju sa pokušajem 1 ($p=0,031$), dok su transgene ženke tretirane PWZ-029 pokazale veće latencije za pronalaženje nove platforme u pokušaju 2 u poređenju sa pokušajem 1 ($p=0,001$). Dalje, transgeni kontrolni mužjaci pokazale su manju latenciju za pronalaženje nove platforme u pokušaju 1 u poređenju sa kontrolnim netransgenim muškim miševima ($p=0,013$). Netransgeni muški miševi tretirani PWZ-029 imali su manju

latenciju da pronađu novu platformu u pokušaju 1 u poređenju sa kontrolnim netransgenim mužjacima ($p=0,006$).

U reverznom *probe* testu (*reversal probe*, Slika 13), transgene ženke tretirane sa MP-III-022, PWZ-029 i rastvaračem imale su veće latencije da pronađu zonu nove platforme u poređenju sa zonom stare platforme ($p=0,005$, $p=0,012$ i $p=0,002$, respektivno). Štaviše, netransgeni mužjaci tretirani PWZ-029 imali su manju latenciju da pronađu zonu stare platforme u poređenju sa netransgenim mužjacima tretiranim rastvaračem ($p=0,036$). I transgene i netransgene ženke tretirane rastvaračem imale su manji broj ulazaka u zonu nove platforme u poređenju sa starom ($p=0,011$ i $p=0,029$, respektivno). Slično, netransgeni mužjaci tretirani PWZ-029 pokazali su veći broj ulazaka u zonu stare u odnosu na zonu nove platforme ($p=0,001$), kao i u poređenju sa netransgenim mužjacima tretiranim rastvaračem ($p=0,014$). Štaviše, transgeni mužjaci tretirani rastvaračem provodili su manje vremena na periferiji u poređenju sa netransgenim mužjacima.



b**c**



Slika 13. Rezultati iz Morisovog vodenog lavirinta (MVM) su odabrani za transgene i netransgene 5xFAD životinje oba pola tretirane sa PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Vreme provedeno u perifernoj zoni (a) je mereno u *probe* testu. Analizirane su latence za pronalaženje nove platforme u pokušajima 1 u odnosu na pokušaj 2 (1 vs 2) u reverznom

trening danu kada je na novoj platformi bio predmet (b). U reverznom *probe* testu, prikazane su latencije za pronalaženje zone nove platforme u odnosu na zonu stare platforme (c), broj ulazaka u zonu nove u odnosu na staru platformu (d) i vreme provedeno u perifernoj zoni (e). Korišćena je trofaktorska ANOVA sa (b, c, d) ili bez (a, e) ponavljanih merenja praćena Sidak *post hoc* testom. Statistička značajnost je prikazana na graficima kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$. Ukupni efekti, ako su značajni, dati su u gornjem desnom uglu. Korišćene skraćenice su: g, p, t i platforma za genotip, pol, tretman i platformu, redom.

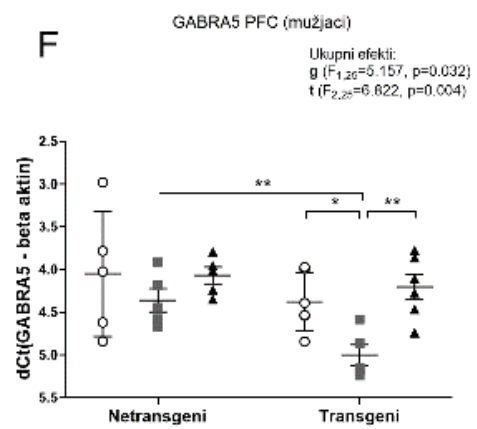
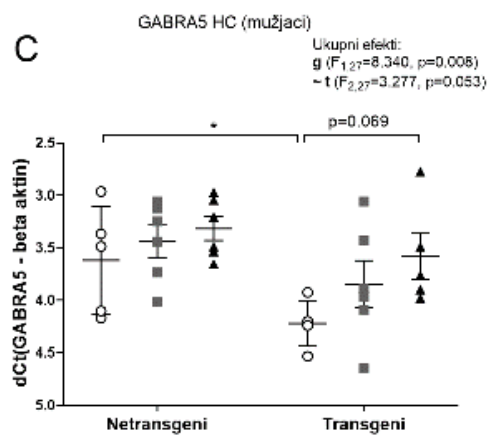
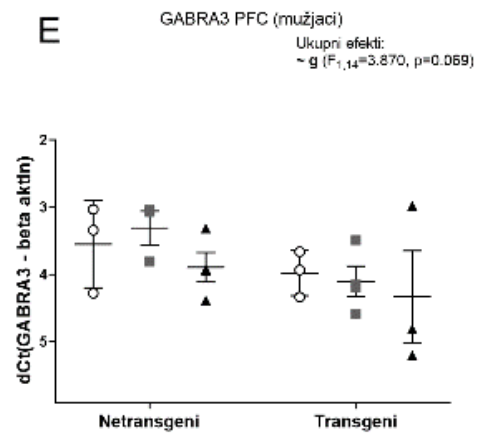
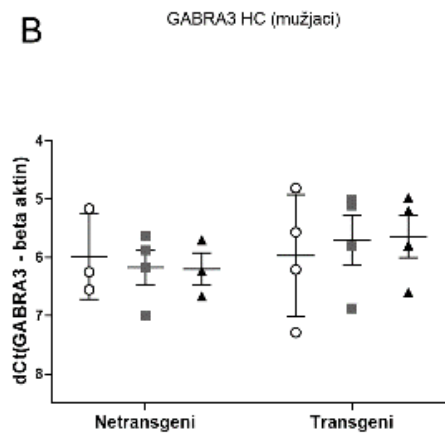
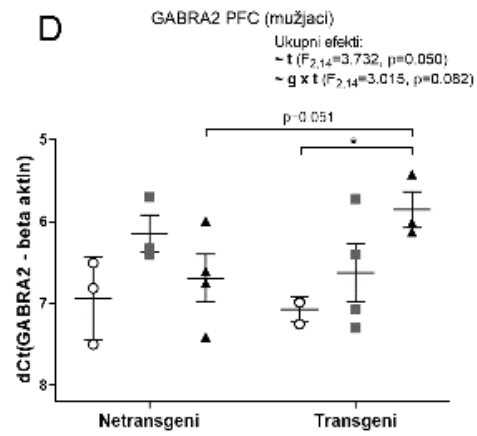
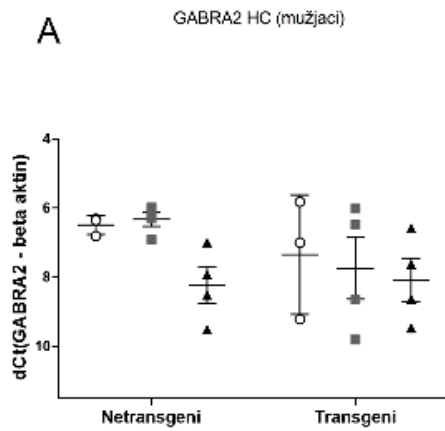
PCR rezultati

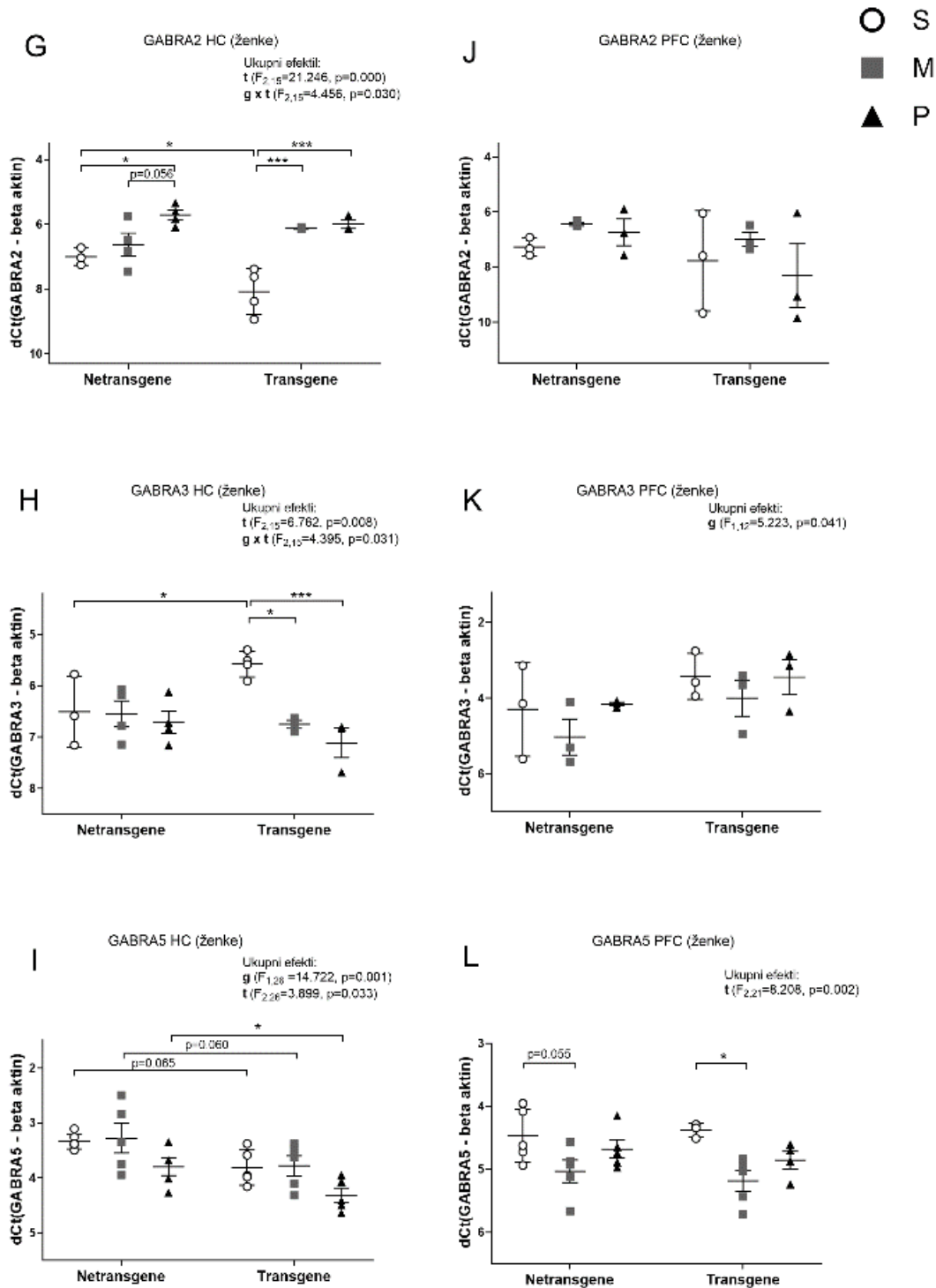
QPCR rezultati za ekspresiju iRNK *Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5*

QPCR rezultati za ekspresiju iRNK *Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5* u HC i PFC za mužjake i ženke ilustrovani su na Slici 14.

U HC mužjaka, transgena grupa tretirana rastvaračem imala je više vrednosti dCt za *Gabra5* u poređenju sa netransgenom grupom tretiranom rastvaračem ($p=0,032$). Post hoc testovi su pokazali da je *Gabra5* dCt u HC bio niži (na nivou trenda) u grupi transgenih životinja tretiranih PWZ-029 u poređenju sa netransgenim životinjama tretiranim rastvaračem ($p=0,069$). Kod HC ženki, transgene životinje tretirane rastvaračem pokazale su smanjenu ekspresiju *Gabra2* i *Gabra5* (na nivou trenda) i povećanu ekspresiju iRNK *Gabra3* u poređenju sa netransgenim životinjama tretiranim rastvaračem ($p=0,011$, $p=0,065$ i $p=0,016$, redom). Tretmani sa MP-III-022 i PWZ-029 kod transgenih ženki, u poređenju sa transgenim životinjama tretiranim rastvaračem, povećali su nivoe ekspresije *Gabra2* u HC ($p < 0,001$ i $p < 0,001$, redom), dok je ekspresija *Gabra3* bila smanjena ($p=0,011$ i $p=0,001$, redom). Pored toga, PWZ-029 indukovao je veću ekspresiju iRNK *Gabra2* u HC kod netransgenih ženki u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim rastvaračem ($p=0,011$).

Kod mužjaka, vrednosti *Gabra5* dCt u PFC su bile značajno veće u grupi transgenih miševa tretiranih MP-III-022 u poređenju sa grupom transgenih životinja tretiranih PWZ-029 ($p=0,002$) ili rastvaračem ($p=0,016$). Dalje, povećani nivoi *Gabra2* su pronađeni u grupi transgenih mužjaka tretiranih PWZ-029 u poređenju sa grupom transgenih mužjaka tretiranih rastvaračem u PFC ($p=0,034$). Tretman transgenih životinja sa MP-III-022 pokazao je veće vrednosti za *Gabra5* dCt u PFC u poređenju sa netransgenim životinjama tretiranim rastvaračem kod oba pola ($p=0,016$ za mužjake i $p=0,015$ za ženke). Kod PFC ženki otkriven je trend viših vrednosti *Gabra5* za netransgene životinje tretirane MP-III-022 u poređenju sa netransgenim životinjama tretiranim rastvaračem ($p=0,055$).





Slika 14: Rezultati dobijeni qPCR-om su predstavljeni kao dCt vrednosti koje su obrnuto proporcionalne nivoima *Gabra2*, *Gabra3* ili *Gabra5* iRNK. Ekspresije iRNK *Gabra2*, *Gabra3* ili *Gabra5* određene su u hipokampusu mužjaka (A, B ili C, redom) i ženki (G, H ili I, redom), kao i u prefrontalnom korteksu mužjaka (D, E ili F, redom) i ženki (J, K ili L, redom). Statističke razlike između grupa: $0,01 < p < 0,05$, $0,001 < p < 0,01$, $p < 0,001$ označene

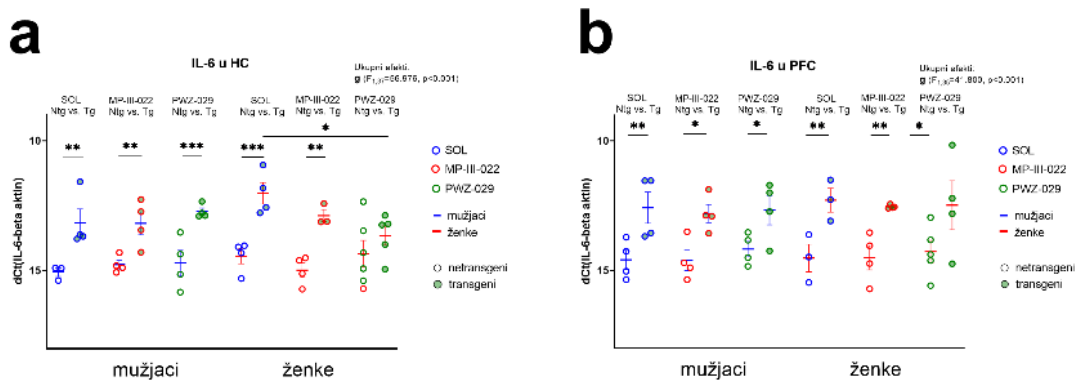
su kao *, ** i ***, redom. Efekat trenda ($0,05 < p < 0,1$) je označen kao ~ ili je napisana p vrednost. Sve greške merenja predstavljaju SEM. Ukupni efekti genotipa (g) ili tretmana (t), kroz njihove F i p vrednosti, sumirani su u gornjem desnom uglu svakog grafika, ako su značajni.

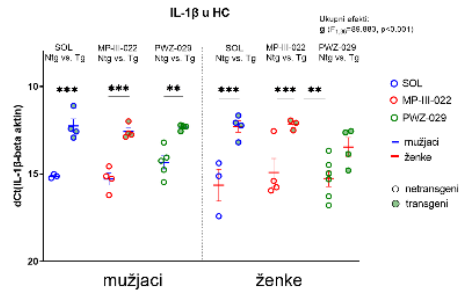
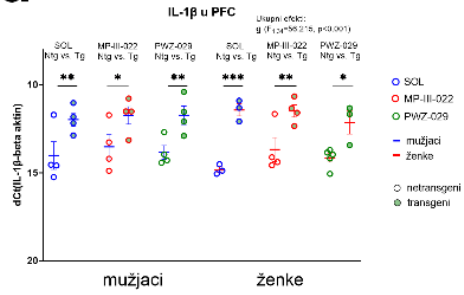
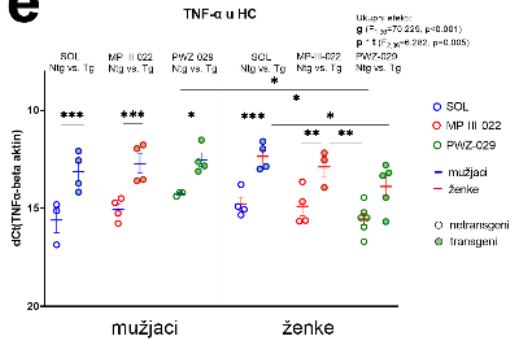
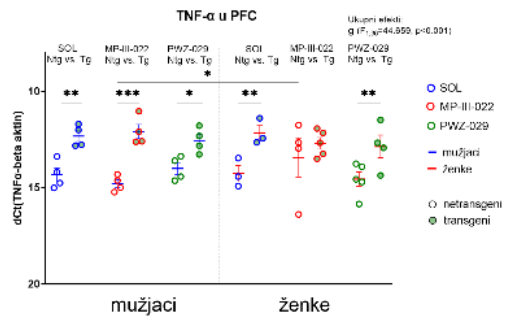
QPCR rezultati za neuroinflamaciju

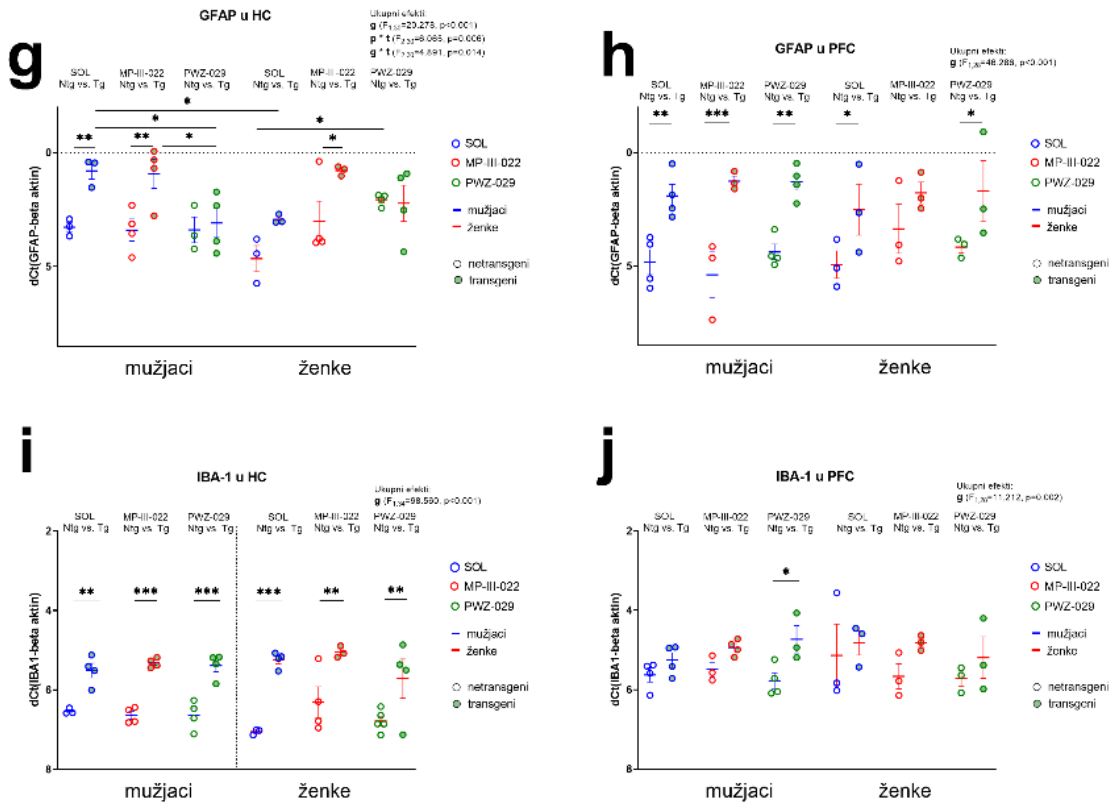
Rezultati qPCR eksperimenta i ukupni efekti faktora genotip, tretman i pol ili njihove interakcije prikazani su na Slici 15.

U HC i PFC, nivoi *Il-6*, *Il1b* i *Tnfa* bili su veći kod transgenih mužjaka, odnosno ženki tretiranih rastvaračem u poređenju sa kontrolnim netransgenim mužjacima, odnosno ženkama: za *Il-6*, $p=0,004$ i $p<0,001$, redom u HC, i $p=0,007$ i $p=0,009$, redom u PFC; za *Il1b*, $p<0,001$ i $p<0,001$ redom u HC, i $p=0,007$ i $p<0,001$ redom u PFC; za *Tnfa*, $p=0,001$ i $p<0,001$ redom u HC, i $p=0,004$ i $p=0,008$ redom u PFC. U HC, transgene ženke tretirane sa PWZ-029 pokazale su smanjene nivoe transkripta za *Il-6* ($p=0,015$) i *Tnfa* ($p=0,033$) u poređenju sa transgenim ženkama tretiranim rastvaračem.

Nivoi *Gfap* u HC kod transgenih kontrolnih mužjaka bili su viši u poređenju sa netransgenim kontrolnim mužjacima ($p=0,008$), dok su transgene kontrolne ženke pokazale trend ka povećanju nivoa *Gfap* u HC u poređenju sa netransgenim kontrolnim ženkama ($p=0,058$). Pored toga, transgeni mužjaci koji su primali rastvarač imali su više nivoe *Gfap* u poređenju sa kontrolnim transgenim ženkama u HC ($p=0,021$). U HC, PWZ-029 tretirani transgeni mužjaci i netransgene ženke su pokazale niže, odnosno više nivoe *Gfap* u poređenju sa transgenim mužjacima ($p=0,026$), odnosno netransgenim ženkama ($p=0,011$) tretiranim rastvaračem. U PFC, transgeni mužjaci i ženke tretirane rastvaračem su imale više nivoe *Gfap* u poređenju sa netransgenim kontrolnim mužjacima ($p=0,003$) i ženkama ($p=0,027$), redom. U HC, nivoi *Iba1* bili su viši kod transgenih mužjaka i ženki tretiranih rastvaračem u poređenju sa netransgenim kontrolnim mužjacima ($p=0,004$) i ženkama ($p<0,001$), redom. Nije nađena statistička razlika između grupa za nivoe *Iba1* u PFC.



c**d****e****f**



Slika 15. qPCR rezultati transgenih i netransgenih 5xFAD životinja oba pola tretiranih sa PWZ-029, MP-III-022 ili rastvaračem. Prikazane su ekspresije gena za *Il-6*, *Il1b* i *Tnfa* kao proinflamatornih citokina u hipokampusu (HC) i prefrontalnom korteksu (PFC) (a-f, redom). Ekspresija gena *Gfap* i *Iba1* kao markera astroglioze, odnosno mikroglieze, određena je u HC i PFC (g-j, redom). Statistička značajnost otkrivena je trofaktorskom ANOVA-om praćenom Sidak *post hoc* testom i prikazana je na graficima kao * za $0,01 < p < 0,05$, ** za $0,001 < p < 0,01$, *** za $p < 0,001$. Ukupni efekti, ako su značajni, dati su u gornjem desnom uglu. Korišćene skraćenice su: g, p i t za genotip, pol i tretman, respektivno.

Rezultati neparametarske statistike SRT, MVM i qPCR (za gensku ekspresiju parametara neuroinflamacije)

Rezultati generisani Mann-Whitney testom potvrdili su rezultate dobijene nakon Sidak *post hoc* testa. Od 19 razlika za analizirane parametre koje su otkrivene između dve grupe gde bar jedna od njih nije pratila normalnu distribuciju, neparametarsko testiranje je u 14 slučajeva pokazalo značajnu razliku, u 4 slučaja razlika je bila na nivou statističkog trenda ($0,05 < p < 0,1$), a samo u 1 slučaju je značajna razlika nestala; p vrednosti su date u Tabeli 6 u nastavku.

Tabela 7: Rezultati neparametarske statistike za SRT, MVM i qPCR (za parametre neuroinflamacije). Prikazane su p vrednosti dobijene nakon parametarskog i neparametarskog testiranja za odabrane parametre za određene grupe, gde najmanje jedan od parametara za konkretnu grupu nije pratio normalnu distribuciju. Za parametarsku statističku analizu sprovedena je trofaktorska ANOVA sa ili bez ponavljanih merenja praćena Sidak *post hoc* testom, gde je bilo primenljivo, dok je neparametarska statistička analiza izvršena Mann Whitney testom. Značajne p vrednosti su prijavljene bez ikakve oznake ($p < 0,05$), statistički neznačajni trendovi su podvučeni ($0,1 > p > 0,05$), a p vrednosti koje nisu bile značajne su označene sa \wedge ($p > 0,1$).

| Eksperiment | Parametar | Tretirane grupe | p vrednost (posle parametarske statistike) | p vrednost (posle neparametarske statistike) |
|-----------------------------------|--|---|---|---|
| SRT | Vreme sa novom vs starom životinjom | Ntg mužjaci SOL | 0,028 | p=0,0029 |
| SRT | Vreme sa novom vs starom životinjom | Tg mužjaci PWZ-029 | p=0,005 | p=0,0083 |
| SRT | Vreme sa novom vs starom životinjom | Ntg ženke PWZ-029 | p=0,046 | <u>p=0,0613</u> |
| MVM trening | Latenca za dan 3 | Tg ženke tretirane sa MP-III-022 vs SOL | p=0,024 | P=0,0115 |
| MVM reverzni trening dan 1 | Latenca da se pronađe nova platforma u pokušaju 1 vs 2 | Tg ženke MP-III-022 | p=0,031 | <u>p=0,0785</u> |
| MVM reverzni trening dan 1 | Latenca da se pronađe nova platforma u pokušaju 1 vs 2 | Tg ženke PWZ-029 | p=0,001 | p=0,2241 \wedge |
| MVM reverzni trening dan 1 | Latenca da se pronađe nova platforma u pokušaju 1 vs 2 | Tg mužjaci SOL | p=0,013 | p=0,0164 |

| | | | | |
|---|---|--|---------|-----------------|
| MVM reverzni trening dan 1 | Latenca da se pronađe stara platforma u pokušaju 1 | Ntg mužjaci tretirani sa PWZ- 029 vs SOL | p=0,006 | p=0,001 |
| MVM reverzni probe test | Latenca da se pronađe nova vs stara platforma | Tg ženke MP-III- 022 | p=0,005 | p=0,0126 |
| MVM reverzni probe test | Latenca da se pronađe nova vs stara platforma | Tg ženke PWZ- 029 | p=0,012 | p=0,0409 |
| MVM reverzni probe test | Latenca da se pronađe nova vs stara platforma | Tg ženke SOL | p=0,002 | p=0,0118 |
| MVM reverzni probe test | Latenca da se pronađe nova vs stara platforma | Ntg mužjaci PWZ-029 | p=0,036 | p=0,0074 |
| MVM reverzni probe test | Broj ulazaka u zonu nove vs stare platforme | Tg ženke SOL | p=0,011 | p=0,0177 |
| MVM reverzni probe test | Broj ulazaka u zonu nove vs stare platforme | Ntg ženke SOL | p=0,029 | <u>p=0,0656</u> |
| MVM reverzni probe test | Broj ulazaka u zonu nove vs stare platforme | Ntg mužjaci PWZ-029 | p=0,001 | p=0,0125 |
| MVM reverzni probe test | Broj ulazaka u zonu stare platforme | Ntg mužjaci PWZ-029 vs SOL | p=0,014 | p=0,0214 |
| MVM reverzni probe test | Periferno vreme (%) | Tg mužjaci SOL vs Ntg mužjaci SOL | p=0,009 | p=0,0082 |
| qPCR | Genska ekspresija <i>Il-6</i> u hipokampusu | Tg mužjaci SOL vs Ntg mužjaci SOL | p=0,004 | <u>p=0,0571</u> |
| qPCR | Genska ekspresija <i>Il-6</i> u prefrontalnom korteksu | Tg mužjaci SOL vs Ntg mužjaci SOL | p=0,007 | p=0,0286 |

Diskusija

Razvoj selektivnih liganda za određene podtipove GABA_A receptora se očekuje da će rezultovati novom generacijom klinički efikasnih lekova, sa mogućom primenom kod različitih neuropsihijatrijskih poremećaja (Sieghart i Savić, 2018). GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 5$ subjedinicu su posebno obećavajuća meta (Clayton i sar., 2015, Soh i Lynch, 2015); među $\alpha 5$ GABA_A receptor-selektivnim ligandima, negativni modulator PWZ-029 (Savić i sar., 2008) i pozitivni modulator MP-III-022 (Stamenić i sar., 2016) uvedeni su u istraživanja kao uspešno eksperimentalna sredstva (videti analizu prikazanu u Sieghart i Savić, 2018). S druge strane, 5xFAD model se pokazao kao predikcijski vredan i validan AD model koji se široko koristi (Oakley i sar, 2006). Literaturni podaci o efektima pozitivnih i negativnih modulatora $\alpha 5$ GABA_A receptora u ovom modelu ograničeni (Wu i sar., 2014).

Postoje naizgled paradoksalni dokazi koji sugerišu da bi oba tipa modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora mogla biti korisna u modelima Alchajmerove bolesti (Calvo-Flores Guzmán i sar., 2018). Ova studija na 5xFAD miševima imala je za cilj da modeluje rane promene nalik na AD u različitim kognitivnim domenima i socijalnosti, ali i nekognitivnim domenima poput motorne funkcije, emocionalnosti i motivacije. Procenjujane su posledice produžene pozitivne ili negativne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora, izazvane selektivnim ligandima $\alpha 5$ GABA_A receptora MP-III-022 (Stamenić i sar., 2016), odnosno PWZ-029 (Savić i sar., 2008), u ovom modelu AD. Pretpostavljalo se da ni pozitivna ni negativna modulacija ovih receptora neće imati štetan uticaj na opšte/nekognitivno ponašanje, što je od značaja za dalji razvoj lekova u ovoj oblasti istraživanja. Pored promena u navedenim bihevioralnim domenima analizirani su nivoi ekspresije iRNK *Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5*, kao i markera inflamacije u hipokampusu i prefrontalnom korteksu kod zdravih i kod model životinja koje su bile podvrgnute tretmanima.

Farmakokinetički profil korišćenih PAM i NAM

Farmakokinetička studija, sprovedena pre bihevioralnih testova sa ciljem da se postigne selektivna modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora, sugeriše da PWZ-029 i MP-III-022 mogu da ispolje zanemarljivu aktivnost na $\alpha 1$, $\alpha 2$ ili $\alpha 3$ GABA_A receptore kada su primenjivane izabrane doze. Naime, oba liganda su neutralni ligandi, ili blagi PAM na GABA_A receptorima koji sadrže $\alpha 1$, $\alpha 2$ ili $\alpha 3$ subjedinice, ali samo pri visokim koncentracijama koje ne mogu biti postignute pri primeni odabranih doza (uporediti Sieghart i Savić, 2018).

Kao posebno važan aspekt translacijskih istraživanja vezanih za hronična patološka stanja, da bi se izbegli akutni efekti, testovi ponašanja su sprovedeni nakon završetka 10-dnevnog tretmana. Sa takvim protokolom, posledice modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora u pretkličičkom modelu AD mogu se tumačiti u kontekstu pretpostavljenih efekata kod odraslih ljudi koji bi bili izloženi primanju takvih liganada u trajanju od približno 1 godine (uporediti Rae i Brown, 2015).

PAM i NAM efekti na objektnu memoriju

Performanse ženki u testu prepoznavanja novog objekata za procenu kratkoročne objektno memorije bile su oslabljene u grupi transgenih, u poređenju sa netransgenim 6-mesečnim ženkama, pružajući dokaz da je model uspeo da oponaša smanjenje objektno memorije, kao što je ranije objavljeno (Creighton et. al., 2019). MP-III-022 nije uspeo da pokaže poboljšanje objektno memorije kod transgenih ženki i suprimirao je ovu vrstu memorije kod netransgenih ženki. Ovi podaci su usklađeni sa rezultatima dobijenim kod pacova, gde je MP-III-022 potisnuo dugoročnu memoriju za prepoznavanje objekata kada se primenio u dozi od 10 mg/kg 24 sata pre testa (Santrač i sar., 2022a).

S druge strane, kontrolni transgeni i netransgeni mužjaci nisu pravili razliku između novih i starih objekata, što bi moglo biti rezultat polno zavisnih razlika u prepoznavanju objekata, pri čemu se očekivalo da ženke miševa budu superiornije ako je novi objekat bio sličan prethodno naučenom (Bettis i Jacobs, 2012). MP-III-022 i PWZ-029 tretmani nisu imali nikakav uticaj na objektnu memoriju kod transgenih mužjaka. U skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da NAM može poboljšati objektnu memoriju (npr. Milić i sar., 2013), primena PWZ-029 je poboljšala objektnu memoriju kod netransgenih mužjaka, što implicira kognitivni efekat zavisan od pola.

PAM i NAM efekti na socijalnu interakciju i socijalnu memoriju

Kortikalni GABA_A receptori imaju ulogu u regulaciji socijalnosti (Paine i sar., 2017), i stoga smo želeli da istražimo da li modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora može uticati na socijalnu interakciju i/ili socijalno prepoznavanje. Pokazano je da je socijalna interakcija procenjena u modelima transgenih životinja u vezi sa amiloidnim i tau patologijama smanjena (za pregled videti Kosel i sar., 2020). U skladu sa tim, životinje iz 5xFAD modela koje su u starijoj dobi, pokazuju socijalno povlačenje povezano sa progresivnom patologijom povezanom sa AD (Kosel i sar., 2020). Kao što se i očekivalo (Kosel i sar., 2021), u našoj studiji, gde su životinje bile u manje poodmakloj dobi koja odgovara ranim (inicijalnim) promenama u ponašanju, i transgeni i netransgeni mužjaci su i dalje preferirali socijalnu interakciju u odnosu na istraživanje praznog kaveza. PWZ-029 koji je primenjen narušio je socijalnu interakciju i kod transgenih i netransgenih mužjaka. Ovi rezultati su u delimičnom neskladu sa nalazima da selektivni inverzni ili parcijalni agonisti $\alpha 5$ GABA_A receptora nisu uticali na socijalnost kod Sprague-Dawley pacova, dok je FG7142, neselektivni inverzni agonista GABA_A receptora, smanjio socijalnu interakciju (Paine i sar., 2020). S druge strane, iako su prosocijalni efekti pokazani nakon stereotaksične primene muscimola, kao agoniste GABA_A receptora kod pacova (Xu i sar., 2019), MP-III-022 nije imao nikakav uticaj na socijalnu interakciju transgenih i netransgenih mužjaka u ovoj studiji.

Kao što se i očekivalo (Kosel i sar., 2021), socijalna memorija je očuvana kod transgenih i netransgenih kontrolnih mužjaka, dok je MP-III-022 tretman indukovao oštećenje socijalne memorije kod mužjaka oba genotipa. Skorije publikovani rezultati pokazuju smanjenu socijalnu diskriminaciju izazvanu MP-III-022 tretmanom kod pacova Wistar soja (Santrač i sar., 2022a). PWZ-029 nije imao nikakav uticaj, što je u skladu sa istraživanjem Paine i saradnika (Paine et al 2020).

Transgene i netransgene ženke nisu uspele da pokažu normalnu socijalnu interakciju i socijalno pamćenje u korišćenom testu. Nakon PWZ-029 tretmana, netransgene ženke su mogle da razlikuju novog i starog miša u komorama. Da bi se izbeglo bilo kakvo kršenje unapred određenog vremenskog okvira protokola za sprovođenje bihevioralnih testova, faza estrusnog ciklusa kod ženki nije određena, što bi mogao biti mogući razlog za nedostatak normalne socijalne interakcije kod kontrolnih ženki (Chari i sar., 2020). Drugi faktor koji doprinosi može biti činjenica da ženke glodara teže da istražuju okolinu više od mužjaka, što može biti povezano sa relativnim smanjenjem socijalne interakcije (Cox i sar., 2011).

PAM i NAM efekti na prostornu memoriju

Kontrolne transgene i netransgene životinje pokazale su podjednako očuvanu memoriju tokom treninga u MVM-u, kao i tokom probnog testa, kao što je ranije objavljeno (Ardestani i sar., 2017). Nalaz bi mogao proizaći iz suboptimalnih sposobnosti učenja testiranih miševa koje bi mogle biti posledica gena za degeneraciju mrežnjače nasleđenog iz SJL soja, kao što je prethodno opisano (Grant et al., 2018). To znači da bi netransgene životinje već imale određeno ograničenje u sticanju prostorne memorije, što ograničava ispoljavanje eventualnih oštećujućih efekata genetske manipulacije (eng. *flooring effect*).

Primena MP-III-022 kod transgenih ženki pokazala se štetnom za učenje u fazi treninga MVM-a, što se moglo očekivati za pozitivnu modulaciju $\alpha 5$ GABA_A receptora (Savić i sar., 2009). U prvom danu faze reverznog učenja, transgene ženke tretirane sa MP-III-022 uspevale su da pronađu novu platformu. Netransgeni mužjaci koji su tretirani sa PWZ-029 imali su najkraću latenciju za pronalaženje nove platforme u prvom danu reverznog treninga u odnosu na netransgene mužjake tretirane rastvaračem, što ukazuje na uspešno učenje i savladavanje testa kao korisne posledice negativne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora.

U reverznom *probe* testu, transgene ženke, nezavisno od tretmana, pokazale su veće latencije za pronalaženje nove platforme u poređenju sa starom, što bi moglo ukazivati na polno zavisnu poremećenu kognitivnu fleksibilnost, kao što je prijavljeno u različitim protokolima za reverzni *probe* test kod 3-mesečnih 5xFAD mužjaka (Kim et al., 2021) i 3-15 meseci starih 5xFAD životinje oba pola (O'Leary et al., 2022). PWZ-029 tretirani netransgeni mužjaci u odnosu na kontrolne netransgene mužjake pokazali su povećano istraživanje stare platforme, koje se ogledalo u broju ulazaka u zonu stare platforme i većoj latenciji da se pronađe stara platforma, što bi moglo biti pokazatelj kognitivne istrajnosti (eng. *cognitive perseverance*) (Sakata et. al., 2013).

Iako su netransgeni mužjaci tretirani PWZ-029 pokazali sličan obrazac u broju ulazaka u zone stare i nove platforme kao transgene i netransgene ženke tretirane rastvaračem, postojale su razlike u sposobnosti životinja da pronađu novu platformu u navedenoj grupi mužjaka. Iako bi ukupna veća preferencija za staru platformu mogla biti posledica dizajna protokola (pošto je reverzno učenje bilo kraće od regularnog učenja, i verovatno ekstinkcija memorije nije mogla da se postigne), pretpostavlja se da je došlo do konsolidacije memorije. Na osnovu ove hipoteze, reverzni *probe* test bi se mogao smatrati uspešnim ako bi životinja plivala u zonama obe platforme.

Kod transgenih ženki, MP-III-022 tretman je doveo do povećanja perifernog vremena u *probe* testu, i stoga je verovatno imao negativan uticaj na proceduralnu komponentu akvizicije, kao što se i očekivalo za pozitivnu modulaciju $\alpha 5$ GABA_A receptora (Savić i sar., 2009). S druge strane, kontrolni transgeni mužjaci i ženke, u skladu sa svojim ponašanjem u uzdignutom plus lavirintu i testu otvorenog polja, imali su smanjenu emocionalnu reaktivnost, što se manifestovalo kao manje vremena provedeno u zoni tigmotaksije u poređenju sa zdravim kontrolama u reverznom, kao i u regularnom *probe* testu. Međutim, oba tretmana, u poređenju sa rastvaračem, očigledno su povezana sa smanjenom anksioznošću u reverznom *probe* testu kod netransgenih mužjaka, što se odražava u kraćem vremenu provedenom na periferiji.

PAM i NAM efekti na nekognitivne domene (emocionalnost, motivaciju, motornu funkciju)

Generalno, uočene promene u ponašanju zavisile su od genetskog statusa, tretmana i pola, ali su retko bile recipročne kada se poredi uticaj negativne i pozitivne modulacije, što bi se, u idealizovanim relacijama, očekivalo sa farmakološke tačke gledišta. Kod transgenih mužjaka, PWZ-029 tretman je dodatno smanjio emocionalnost, dok je MP-III-022 indukovao smanjenje motorne funkcije u poređenju sa transgenom kontrolom. Suprotno, kod ženki miševa nisu primećeni nikakvi neželjeni efekti na nekognitivno ponašanje, što bi transgene ženke činilo pogodnijim za buduća istraživanja kognitivnih efekata selektivnih PAM i NAM na $\alpha 5$ GABA_A receptorima u 5xFAD modelu.

Emocionalno procesuiranje pozitivno i negativno valentnih stimulusa može biti relativno očuvano u AD (Guzmán-Vélez i sar., 2014, Broster i sar., 2012), iako su mnoge kliničke studije otkrile oštećenu emocionalnost (Hamann i sar., 2000, Kensinger i sar., 2002). Takve razlike u prethodnim studijama mogu odražavati različite obrasce osnovne neuropatologije i simptoma bolesti. S druge strane, motivisano ponašanje je konzistentno afektovano u AD, pri čemu apatija kao kvantitativno smanjenje aktivnosti usmerene ka cilju pogađa do 70% pacijenata sa AD. Zaista, predloženo je da je smanjena motivacija kod pacijenata sa AD relevantna meta za moguću terapijsku intervenciju (van Dyck i sar., 2021). Konačno, neurološki deficiti i oštećena motorna funkcija su standardni deo ukupne simptomatologije AD i mogu se ispoljiti i tokom pretkliničke faze razvoja bolesti (van Dyck i sar., 2021, Lee i sar., 2020, Burman, 2019). U tom smislu, pružanje adekvatnog uvida u moguću aktivnost supstanci na nivou nekognitivnih domena AD predstavlja važan aspekt razvoja lekova u ovoj oblasti.

U pretkliničkoj AD, prihvaćeno je da je oštećenje motorne funkcije u korelaciji sa kognitivnim pogoršanjem (Buchman i Bennett, 2011). U našoj studiji, došlo je do očigledne motorne slabosti kod kontrolnih transgenih ženki, verovatno zbog bržeg razvoja patologije kod transgenih ženki u odnosu na transgene mužjake (Oakley i sar., 2006). Tretman MP-III-022 je ubrzao motornu disfunkciju kod transgenih mužjaka u poređenju sa transgenom kontrolom. Pošto MP-III-022 tretman nije dodatno pogoršao motornu funkciju kod transgenih ženki u poređenju sa patološkom kontrolnom grupom, moglo bi se pretpostaviti da pozitivna modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora može imati ulogu u motornoj disfunkciji pri napredovanju bolesti na način koji zavisi od pola. S druge strane, primena PWZ-029 nije

uticala na motornu funkciju u poređenju sa odgovarajućim transgenim ili netransgenim životinjama tretiranim rastvaračem. Poslednji nalaz je u skladu sa nedostatkom motornih efekata kada je testiran drugi NAM $\alpha 5$ GABA_A receptora (Zanos i sar., 2017).

Ustanovljeni bihejvioralni testovi za merenje emocionalnih odgovora kod glodara, kao što su test otvorenog polja (OF) (Seibenhener i Wooten, 2015) i uzdignuti plus lavirint (EPM) (Bailey i Crawley, 2009) zasnivaju se na izazivanju anksioznosti kao negativne emocije. Ljudi koji pate od AD obično doživljavaju komorbidnu anksioznost, ponekad udruženu sa agitacijom (Kwak i sar., 2017). U našoj studiji, došlo je do smanjenja emocionalne reaktivnosti kod kontrolnih transgenih mužjaka u poređenju sa zdravom kontrolom. Iako je naizgled paradoksalan, ovaj nalaz bi se mogao tumačiti u kontekstu smanjene anksioznosti koja korespondira sa dezinhbitornim tendencijama uočenim kod pacijenata sa AD (uporediti Jawhar i sar., 2012). Kod transgenih mužjaka, skor emocionalnosti je dodatno smanjen nakon primene PWZ-029 u poređenju sa transgenim kontrolnim mužjacima, dok su oba liganda rezultovala smanjenom emocionalnošću kod netransgenih životinja. Efekat sličan PWZ-029 na emocionalnost je ranije primećen nakon još jedne primene NAM kod mišjeg modela AD sa patološkim nakupljanjem tau proteina (Xu i sar., 2018). S druge strane, PAM tretman nije uticao na emocionalnost kod transgenih mužjaka u poređenju sa njihovom patološkom kontrolom, dok je kod transgenih ženki MP-III-022 pokazao neočekivanu tendenciju povećanja emocionalnosti u poređenju sa transgenom kontrolom, barem u pogledu parametra procentat perifernog puta. Ovaj nalaz bi se delimično mogao tumačiti uticajima pozitivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora na povećanje tigmotaksije, kao što je primećeno u Morisovom vodenom lavirintu (Savić i sar., 2009).

U poređenju sa motivacijom usmerenom ka cilju, koja bi se mogla proceniti izvršenjem zadatka, motivacija pobuđenosti (eng. *arousal motivation*) je merljiva pomoću parametara lokomocije (Ward, 2016). Faktorska analiza je rasvetlila različite vektorske orijentacije parametara broj ulazaka u zatvorene krake u poređenju sa procentom vremena i ulazaka na otvorenim krakima u EPM, kao i ukupni pređeni put u poređenju sa aktivnošću u centralnoj zoni u OF (Frohlich i sar., 2002). Komponenta pobuđenosti u motivaciji nije bila pogođena kod kontrolnih transgenih životinja u poređenju sa njihovom zdravom kontrolom, dok su oba tipa modulacije doprinela efektu genotipa da se smanji motivacija kod transgenih mužjaka, sa značajnim razlikama u poređenju sa analogno tretiranim netransgenim mužjacima. Sličan supresivni uticaj na motivaciju je primećen kada su transgeni mužjaci bili poređeni sa analogno tretiranim ženkama, pri čemu su kontrolni transgeni mužjaci pokazali samo trend smanjenja pobuđenosti u poređenju sa kontrolnim transgenim ženkama. Takav jednosmerni uticaj PAM i NAM na motivaciju kod transgenih mužjaka mogao bi biti mehanizam uključen u progresiju bolesti. Važno je napomenuti da je MP-III-022 pokazao trend povećanja skora pobuđenosti kao aspekta motivacije, na osnovu značajnog efekta na broj ulazaka u zatvorene krake u EPM, kod netransgenih ženki u poređenju sa zdravom kontrolom, što bi moglo biti povoljno za raspoloženje, i u skladu je sa predloženim antidepresivnim efektima PAM-a (Engin i sar., 2018).

PAM i NAM efekti na ekspresiju *Gabra2*, *Gabra3* i *Gabra5*

Smanjenje *Gabra5* u HC dokumentovano je kod pacijenata sa AD (Rissman i Mobley, 2011). Iako literatura nije dosledna, čini se da težina simptoma AD korelira sa smanjenjem

$\alpha 5$ GABA_A receptora u ovom regionu (pregled u Mohamad i Has, 2019). Ekspresija *Gabra5* je robustan parametar za starenje kod miševa pošto je dobro očuvana u HC (Palpagama i sar., 2019). Već je objavljen niži nivo *Gabra5* u HC kod transgenih u poređenju sa netransgenim 5xFAD mužjacima (Neuner i sar., 2017). Naši rezultati su pokazali da su transgene životinje oba pola tretirane rastvaračem imale niže nivoe *Gabra5* u poređenju sa zdravim kontrolama. Dalje, produženi tretman sa PWZ-029 pokazao je trend povećanja *Gabra5* iRNK u celom HC-u kod transgenih mužjaka, ali ne i kod ženki miševa, što bi moglo biti od značaja za kogniciju.

Promene u prefrontalnom nivou *Gabra5* kod pacijenata sa AD, u poređenju sa kontrolom, nisu otkrivene (Limon i sar., 2012). Ekspresija *Gabra5* iRNK u PFC-u je bila nepromenjena između transgenih i netransgenih životinja oba pola tretiranih rastvaračem. Dok PWZ-029 nije delovao, MP-III-022 je smanjio *Gabra5* kod netransgenih ženki u poređenju sa netransgenim ženkama tretiranim rastvaračem. Ovi podaci se razlikuju od rezultata dobijenih kod C57BL6 ženki miševa hronično tretiranih $\alpha 5$ -PAM, a koji su bili podvrgnuti hroničnom blagom nepredvidivom stresu (Piantadosi i sar., 2016), što bi mogla biti posledica značajnih razlika u ovim modelima.

Prijavljena je nishodna regulacija *Gabra2* u mozgu kod AD (Limon i sar., 2012), tačnije u entorinalnom korteksu (Grubman i sar., 2019). S druge strane, izgleda da je ekspresija *Gabra3* u AD veća u poređenju sa kontrolom (Antonell i sar., 2013), ali su možda $\alpha 3$ GABA_A receptori disfunkcionalni (Berggaard i sar., 2019). Naši rezultati su pokazali takav divergentni obrazac ekspresije *Gabra2* i *Gabra3* samo u HC kod kontrolnih transgenih ženki, što upućuje na efekte zavisne od regiona i pola. Smanjena anksioznost ili dezinhibicija kod kontrolnih transgenih mužjaka može se delimično objasniti potencijalnim promenama u ekspresiji iRNK *Gabra2* i *Gabra3* u drugim moždanim strukturama povezanim sa anksioznošću koje nisu bile deo ove studije. MP-III-22 i PWZ-029 vratili su nivoe ekspresije *Gabra2* i *Gabra3* kod transgenih ženki na nivoe zdrave kontrole. Iako je farmakokinetička validacija režima doziranja osigurala da su direktni efekti liganda posredovani $\alpha 5$ GABA_A receptorima, indirektni uticaj supstanci na nivo ekspresije *Gabra2* i *Gabra3* bi mogao biti prisutan u hipokampusu kod ženki. Pored toga, PWZ-029 indukovao je veću ekspresiju *Gabra2* u PFC kod transgenih mužjaka, kao i u HC kod netransgenih ženki. Pošto $\alpha 2$ GABA_A receptori dominantno posreduju u kontroli anksioznosti (Atack, 2010), otkrivene promene ekspresije mogu biti relevantne za smanjenu anksioznost u EPM posle tretmana PWZ-029 kod transgenih mužjaka.

PAM i NAM efekti na neuroinflamaciju

Nedavna meta-analiza nije potvrdila bilo kakvo povećanje proinflamatornih citokina u krvi pacijenata sa AD bez simptoma depresije (Ng i sar., 2018), ali se to ne odnosi na moguću lokalnu neuroinflamaciju. Ushodna regulacija *Gfap* iRNK u PFC i HC, uočena kod transgenih u poređenju sa netransgenim miševima, upućuje na povećanu astrogliozu, i u skladu je sa povećanom ekspresijom GFAP proteina u korteksu i hipokampusu 5xFAD miševa (Creighton i sar., 2019). Intrigantno, nivoi *Gfap* kod kontrolnih transgenih mužjaka bili su viši u poređenju sa kontrolnim transgenim ženkama. Nivoi *Gfap* kod transgenih mužjaka nakon primene PWZ-029 su bili smanjeni u poređenju sa transgenim mužjacima

tretiranim rastvaračem u HC, dok su nivoi *Gfap* kod netransgenih ženki bili povećani u poređenju sa onima tretiranim rastvaračem.

U 5xFAD transgenom modelu, pronađen je patološki mikrogljalni fenotip, a rezultati su translacijski povezani sa nalazima sa ljudskom mikrogljom u AD (Rangaraju i sar., 2018). U našoj studiji, mikrogljoza je pokazana kroz povećanje ekspresije *Iba1* u HC kod transgenih životinja tretiranih rastvaračem, u poređenju sa netransgenim životinjama, bez obzira na uticaj pola; u PFC, takva razlika nije otkrivena uprkos ukupnom efektu genotipa.

Interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i faktor nekroze tumora α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) proizvode uglavnom imunske ćelije, ali takođe mogu da potiču iz neurona (Besedovsky i del Rey, 2008; del Rei i sar., 2013). U našoj studiji, svi transkripti proinflamatornih citokina bili su povećani kod transgenih životinja u poređenju sa netransgenim životinjama, bez obzira na pol. IL-1 bi mogao da doprinese gubitku sinapsi, a TNF- α bi mogao da izazove ćelijsku smrt (Leng i Edison, 2021), što ukazuje na njihovu značajnu interakciju u hroničnim inflamatornim procesima kao što je AD. Primena antitela koji su funkcionalni antagonisti IL-1 receptora u modelu AD miša suzbila je kognitivne deficite primećene u Morisovom vodenom lavirintu i smanjila neuroinflamaciju (Kitazawa i sar., 2011). IL-6 je bio (ili je u najmanju ruku imao tendenciju da bude) povećan u PFC i HC pacijenata sa AD (Lyra E Silva i sar., 2021, Akiyama i sar., 2000). U modelu AD kod pacova, IL-1 β , IL-6 i TNF- α su bili povećani u hipokampusu (Kitazawa i sar., 2011, Zang i sar., 2013).

Nedavno je GABA privukla pažnju kao važan signalni medijator u koordinaciji inflamacije. Otkriveno je da GABA iz B limfocita, kao dominantan efekat, može da inhibira odgovor CD8+ T ćelija, a blokada proizvodnje GABA u B limfocitima dovodi do većeg antitumorskog odgovora (Zhang i sar., 2021). U ovoj studiji je otkriveno da NAM može uticati na neuroinflamaciju u hipokampusu, pošto je prethodna primena PWZ-029 smanjila zapaljenje u hipokampusu kod transgenih ženki u poređenju sa njihovom transgenskom kontrolom. Štaviše, NAM je smanjio *Gfap* kod transgenih mužjaka i povećao *Gfap* kod netransgenih ženki u poređenju sa njihovim kontrolama u HC. Ovi paradoksalno suprotni efekti ukazuju na zavisnost negativne alosterne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora od pola i genotipa. Relevantnost ovih efekata na bihevioralne domene se ne može proceniti na osnovu rezultata u ovoj studiji, i potrebna su dalja istraživanja.

Da li se očekuju suprotni efekti selektivnih PAM i NAM?

Generalno bi se moglo pretpostaviti da bi dvosmerna farmakološka modulacija pojedinih ciljnih mesta/receptora, za koje se pretpostavlja da su uključeni u inicijaciju i/ili razvoj određenog patološkog procesa, trebalo da rezultuje suprotnim efektima dva testirana liganda. Ako bi ekspresija izabranog ciljnog mesta patološki bila smanjena ili potisnuta, očekivalo bi se da njegovo farmakološko potenciranje (tj. pozitivna modulacija) i dalja inhibicija (tj. negativna modulacija) normalizuju, odnosno pogoršavaju procenjeni biološki parametar. Međutim, postoje dva glavna faktora koji ograničavaju potvrđivanje takvih teorijskih pretpostavki putem eksperimenata, posebno za bihevioralne parametre. Prvo, trebalo bi prevazići izazov postojanja efekta niskih i visokih vrednosti praćenog bihevioralnog parametra (eng. *the flooring and ceiling effect*), koji ne samo da inherentno

zavise od nivoa težine i zahtevnosti testa, već mogu biti prisutni kada se paralelno testiraju životinje sa oštećenom i normalnom funkcijom (Hånell i Marklund, 2014). Drugo, postojanje fenomena složenosti i „degenerativnosti“ neuronskih puteva (eng. *the complexity and degeneracy of neural pathways*) koji kontrolišu neurofiziologiju i ponašanje (Edelman i Gally, 2001), što bi značilo da dobijeni stepen aktivnosti jednog, visoko specifičnog ciljnog mesta, koji utiče na različite aspekte neuralne plastičnosti, ne mora nužno da se merljivo manifestuje, odnosno da promeni biološke i bihejvioralne ishode. Zaista, verovatnije bi bilo da će se suprotni efekti otkriti ako je uključeno više ciljnih mesta, npr. korišćenjem neselektivnih pozitivnih i negativnih alosternih modulatora, kao što su klobazam i DMCM. U tom smislu, pojedinačna niska doza klobazama je poboljšala smanjenu socijalnu interakciju kod BTBR miševa kao modela autizma, dok je DMCM smanjio normalno ponašanje u socijalnoj interakciji kod C57BL/6J i 129SvJ miševa (Han i sar., 2014). Bez obzira na to, primetno je da različiti podtipovi GABA_A receptora mogu imati suprotne uloge u socijalnom ponašanju, pri čemu aktivacija GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 2$ ili $\alpha 3$ subjedinice favorizuje socijalnu interakciju, dok aktivacija $\alpha 1$ GABA_A receptora smanjuje socijalnu interakciju (Han i sar., 2014). Interesantno, čak i jednosmerna neselektivna modulacija GABA_A receptora može rezultovati suprotnim efektom u zavisnosti od soja/zdravstvenog stanja korišćenih životinja: tako je neselektivna pozitivna modulacija sa klonazepamom značajno poboljšala performanse prostornog učenja kod BTBR miševa, dok je pogoršala performanse kontrolnih miševa C57BL/6J (Han i sar., 2014). Konačno, literatura nudi dokaze da slični rezultati ponašanja, povezani sa smanjenim nociceptivnim ponašanjem kod pacovskog modela zapaljenjskog ili neuropatskog bola, mogu biti indukovani primenom PAM-a koji deluje na aktivnost GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$, $\alpha 3$ i $\alpha 2$ subjedinice, ali takođe i NAM-a koji deluju na $\alpha 5$ GABA_A receptore, ili su čak neselektivni u svojoj aktivnosti (Munro i sar., 2011).

Svi navedeni dokazi ukazuju na to da je nedostatak jasnih suprotnih efekata odabranih PAM i NAM testiranih u ovoj studiji bio daleko od neočekivanog. Štaviše, PAM i NAM efekti su bili snažno zavisni od testirane eksperimentalne grupe i mogli su biti slični, suprotni ili neutralni. Pored toga, u skladu sa našim rezultatima, postoje dokazi iz eksperimenata sa modulatorima GABA_A receptora da, pored genetske osnove (uporediti Han i sar., 2014), pol takođe utiče na efekte liganda na određene molekularne i bihejvioralne domene (uporediti Piantadosi et al. 2016, Auta i sar., 2022). Ukupno posmatrano, PAM tretman u našoj studiji imao je štetan uticaj na socijalno prepoznavanje kod transgenih i netransgenih mužjaka i na prostorno učenje kod transgenih ženki. Suprotno, potencirao je kognitivnu fleksibilnost kod transgenih ženki. NAM tretman nije mogao da ublaži oštećenje kognicije kod transgenih životinja, ali je pojačao socijalno prepoznavanje i prostornu memoriju u reverznoj fazi prostornog učenja kod netransgenih ženki i netransgenih mužjaka, redom. NAM tretman je takođe doveo do smanjenja socijalne interakcije kod transgenih i netransgenih mužjaka. Konačno, NAM je smanjio inflamaciju u hipokampusu kod transgenih ženki i astrogliozu u hipokampusu kod transgenih mužjaka.

Zaključak

Na osnovu svega navedenog, kod šestomesečnih miševa 5xFAD kao AD modela, identifikovali smo smanjenje objektivne memorije i neuroinflamaciju kod oba pola, i kognitivnu nefleksibilnost kod ženki.

PAM je poboljšao fleksibilnost memorije, dok je NAM smanjio neuroinflamaciju. Međutim, PAM i NAM su pogoršali patologiju u prostornoj i socijalnoj memoriji, odnosno socijalnosti, redom. Rezultati dobijeni u prethodnim istraživanjima, koji se odnose na korisno dejstvo PAM i NAM na oštećenja različitih vrsta memorije koje je izazvano kod zdravih životinja, trebalo bi da se tumače s oprezom u kontekstu AD, budući da je AD složena multifaktorska patologija koja uključuje hroničnu neuroinflamaciju.

U zavisnosti od bihevioralnog domena koji se ispituje i pola, farmakološki suprotna modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora može izazvati određene neželjene efekte kod 5xFAD miševa. Hipotetička klinička implikacija bi bila da produžena primena PAM u prodromalnim fazama AD ima potencijal da dovede do štetnih posledica na motornu funkciju kod muškaraca, dok NAM može imati potencijal da smanji emocionalnu reaktivnost kod muškaraca. Kako bi nepovoljan dinamički raspon ponašanja mogao nepovoljno da utiče na istraživanje kognicije, ženke bi se mogle izdvojiti kao prikladniji model za razvoj PAM i NAM liganda u AD.

Potrebne su dalje studije za bolje razumevanje funkcije $\alpha 5$ GABA_A receptora u AD, a obe vrste modulacije bi trebalo ispitati i u kasnijim fazama eksperimentalno modelovane bolesti, kada bi se ispoljili potencijalni palijativni efekti terapije.

Literatura

1. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421. doi: 10.1016/s0197-4580(00)00124-x.
2. Albers MW, Gilmore GC, Kaye J, Murphy C, Wingfield A, Bennett DA, Boxer AL, Buchman AS, Cruickshanks KJ, Devanand DP, Duffy CJ, Gall CM, Gates GA, Granholm AC, Hensch T, Holtzer R, Hyman BT, Lin FR, McKee AC, Morris JC, Petersen RC, Silbert LC, Struble RG, Trojanowski JQ, Verghese J, Wilson DA, Xu S, Zhang LI. At the interface of sensory and motor dysfunctions and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015;11(1):70-98. doi: 10.1016/j.jalz.2014.04.514.
3. Andreakou MI, Papadopoulos AA, Panagiotakos DB, Niakas D. Assessment of Health-Related Quality of Life for Caregivers of Alzheimer's Disease Patients. *Int J Alzheimers Dis*. 2016;2016:9213968. doi: 10.1155/2016/9213968.
4. Anonimno. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020. doi: 10.1002/alz.12068.
5. Antonell A, Lladó A, Altirriba J, Botta-Orfila T, Balasa M, Fernández M, Ferrer I, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(7):1772-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.026.
6. Arandjelović J, Santrač A, Batinić B, Todorović L, Ahmed Khan MZ, Rashid F, Poe MM, Obradović A, Cook JM, Savić MM. Positive and Negative Selective Allosteric Modulators of $\alpha 5$ GABAA Receptors: Effects on Emotionality, Motivation, and Motor Function in the 5xFAD Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;84(3):1291-1302. doi: 10.3233/JAD-215079.
7. Ardestani PM, Evans AK, Yi B, Nguyen T, Coutellier L, Shamloo M. Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology*. 2017;116:371-386. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.010. Epub 2017 Jan 13.
8. Attack JR, Hutson PH, Collinson N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, Cook SM, Collins I, Wafford K, McKernan RM, Dawson GR. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA A receptors. *Br J Pharmacol*. 2005;144(3):357-66. doi: 10.1038/sj.bjp.0706056.
9. Attack JR. GABAA receptor alpha2/alpha3 subtype-selective modulators as potential nonsedating anxiolytics. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;2:331-60. doi: 10.1007/7854_2009_30.
10. Auta J, Locci A, Guidotti A, Davis JM, Dong H. Sex-dependent sensitivity to positive allosteric modulation of GABA action in an APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease: Potential epigenetic regulation. *CRNEUR*. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100025>.

11. Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5.
12. Bast T, Pezze M, McGarrity S. Cognitive deficits caused by prefrontal cortical and hippocampal neural disinhibition. *Br J Pharmacol*. 2017;174(19):3211-3225. doi: 10.1111/bph.13850.
13. Berggaard N, Witter MP, van der Want JJJ. GABAA Receptor Subunit $\alpha 3$ in Network Dynamics in the Medial Entorhinal Cortex. *Front Syst Neurosci*. 2019;13:10. doi: 10.3389/fnsys.2019.00010.
14. Besedovsky H, delRey A. Brain cytokines as integrators of the immunoneuroendocrine network. In: Lajtha A. (Ed.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, third ed. Springer, 2008;pp. 1–17. doi: 10.1007/978-0-387-30398-7_1
15. Bettis T, Jacobs LF. Sex differences in object recognition are modulated by object similarity. *Behav Brain Res*. 2012;233(2):288-92. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.028.
16. Biasin V, Wygrecka M, Marsh LM, Becker-Pauly C, Brcic L, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G. Meprin β contributes to collagen deposition in lung fibrosis. *Sci Rep*. 2017;7:39969. doi: 10.1038/srep39969.
17. Birks JS, Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):CD001191. doi: 10.1002/14651858.CD001191.pub3.
18. Blanca MJ, Alarcón R, Arnau J, Bono R, Bendayan R. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*. 2017;29(4):552-557. doi: 10.7334/psicothema2016.383.
19. Bodden C, von Kortzfleisch VT, Karwinkel F, Kaiser S, Sachser N, Richter SH. Heterogenising study samples across testing time improves reproducibility of behavioural data. *Sci Rep*. 2019;9(1):8247. doi: 10.1038/s41598-019-44705-2.
20. Boza-Serrano A, Yang Y, Paulus A, Deierborg T. Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Sci Rep*. 2018;8(1):1550. doi: 10.1038/s41598-018-19699-y.
21. Bravo-Hernández M, Corleto JA, Barragán-Iglesias P, González-Ramírez R, Pineda-Farias JB, Felix R, Calcutt NA, Delgado-Lezama R, Marsala M, Granados-Soto V. The $\alpha 5$ subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain*. 2016;157(3):613-626. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000410.
22. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
23. Broster LS, Blonder LX, Jiang Y. Does emotional memory enhancement assist the memory-impaired? *Front Aging Neurosci*. 2012;4:2. doi: 10.3389/fnagi.2012.00002.
24. Buchman AS, Bennett DA. Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2011;11(5):665-76. doi: 10.1586/ern.11.57.
25. Burman DD. Hippocampal connectivity with sensorimotor cortex during volitional finger movements: Laterality and relationship to motor learning. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222064. doi: 10.1371/journal.pone.0222064.

26. Calvo-Flores Guzmán B, Vinnakota C, Govindpani K, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2018;146(6):649-669. doi: 10.1111/jnc.14345.
27. Cao Q, Tan CC, Xu W, Hu H, Cao XP, Dong Q, Tan L, Yu JT. The Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 2020;73(3):1157-1166. doi: 10.3233/JAD-191092.
28. Chandra G, Roy A, Rangasamy SB, Pahan K. Induction of Adaptive Immunity Leads to Nigrostriatal Disease Progression in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Immunol.* 2017;198(11):4312-4326. doi: 10.4049/jimmunol.1700149.
29. Chari T, Griswold S, Andrews NA, Fagiolini M. The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior. *Front Behav Neurosci.* 2020;14:113. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00113.
30. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(9):1205-1235. doi: 10.1038/aps.2017.28.
31. Clayton T, Poe MM, Rallapalli S, Biawat P, Savić MM, Rowlett JK, Gallos G, Emala CW, Kaczorowski CC, Stafford DC, Arnold LA, Cook JM. A Review of the Updated Pharmacophore for the Alpha 5 GABA(A) Benzodiazepine Receptor Model. *Int J Med Chem.* 2015;2015:430248. doi: 10.1155/2015/430248.
32. Colié S, Sarroca S, Palenzuela R, Garcia I, Matheu A, Corpas R, Dotti CG, Esteban JA, Sanfeliu C, Nebreda AR. Neuronal p38 α mediates synaptic and cognitive dysfunction in an Alzheimer's mouse model by controlling β -amyloid production. *Sci Rep.* 2017;7:45306. doi: 10.1038/srep45306.
33. Cox KH, Rissman EF. Sex differences in juvenile mouse social behavior are influenced by sex chromosomes and social context. *Genes Brain Behav.* 2011;10(4):465-72. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00688.x.
34. Creighton SD, Mendell AL, Palmer D, Kalisch BE, MacLusky NJ, Prado VF, Prado MAM, Winters BD. Dissociable cognitive impairments in two strains of transgenic Alzheimer's disease mice revealed by a battery of object-based tests. *Sci Rep.* 2019;9(1):57. doi: 10.1038/s41598-018-37312-0.
35. Defrancesco M, Marksteiner J, Fleischhacker WW, Blasko I. Use of Benzodiazepines in Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Literature. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015;18(10):pyv055. doi: 10.1093/ijnp/pyv055.
36. del Rey A, Balschun D, Wetzel W, Randolph A, Besedovsky HO. A cytokine network involving brain-borne IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF α operates during long-term potentiation and learning. *Brain Behav Immun.* 2013;33:15-23. doi: 10.1016/j.bbi.2013.05.011.
37. Deyts C, Clutter M, Pierce N, Chakrabarty P, Ladd TB, Goddi A, Rosario AM, Cruz P, Vetrivel K, Wagner SL, Thinakaran G, Golde TE, Parent AT. APP-Mediated Signaling Prevents Memory Decline in Alzheimer's Disease Mouse Model. *Cell Rep.* 2019;27(5):1345-1355.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.087.
38. Edelman GM, Gally JA. Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13763-8. doi: 10.1073/pnas.231499798.
39. Engin E, Benham RS, Rudolph U. An Emerging Circuit Pharmacology of GABAA Receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(8):710-732. doi: 10.1016/j.tips.2018.04.003.

40. Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(3):215-29. doi: 10.1038/nrn1625.
41. Fee C, Prevot TD, Misquitta K, Knutson DE, Li G, Mondal P, Cook JM, Banasr M, Sibille E. Behavioral Deficits Induced by Somatostatin-Positive GABA Neuron Silencing Are Rescued by Alpha 5 GABA-A Receptor Potentiation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2021;24(6):505-518. doi: 10.1093/ijnp/pyab002.
42. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(1):101-15. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
43. Flanigan TJ, Xue Y, Kishan Rao S, Dhanushkodi A, McDonald MP. Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5xFAD transgenics. *Genes Brain Behav.* 2014;13(5):488-500. doi: 10.1111/gbb.12133.
44. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutierrez G, Kramár EA, Matheos DP, Phan J, Javonillo DI, Tran KM, Hingco E, da Cunha C, Rezaie N, Alcantara JA, Baglietto-Vargas D, Jansen C, Neumann J, Wood MA, MacGregor GR, Mortazavi A, Tenner AJ, LaFerla FM, Green KN. Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data.* 2021;8(1):270. doi: 10.1038/s41597-021-01054-y.
45. Forstmeier S, Maercker A. Motivational processes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: results from the Motivational Reserve in Alzheimer's (MoReA) study. *BMC Psychiatry.* 2015;15:293. doi: 10.1186/s12888-015-0666-8.
46. Frohlich J, Morgan M, Ogawa S, Burton L, Pfaff D. Statistical analysis of hormonal influences on arousal measures in ovariectomized female mice. *Horm Behav.* 2002;42(4):414-23. doi: 10.1006/hbeh.2002.1832.
47. Fu Y, Li L, Wang Y, Chu G, Kong X, Wang J. Role of GABAA receptors in EEG activity and spatial recognition memory in aged APP and PS1 double transgenic mice. *Neurochem Int.* 2019;131:104542. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104542.
48. Funahashi S. Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sci.* 2017;7(5):49. doi: 10.3390/brainsci7050049.
49. Ganguly P, Honeycutt JA, Rowe JR, Demaestri C, Brenhouse HC. Effects of early life stress on cocaine conditioning and AMPA receptor composition are sex-specific and driven by TNF. *Brain Behav Immun.* 2019;78:41-51. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.006.
50. Gao T, Liu Y, Zhao Z, Luo Y, Wang L, Wang Y, Yin Y. L-655,708 Does not Prevent Isoflurane-induced Memory Deficits in Old Mice. *Transl Neurosci.* 2019;10:180-186. doi: 10.1515/tnsci-2019-0032.
51. Gilbert J, O'Connor M, Templet S, Moghaddam M, Di Via Ioschpe A, Sinclair A, Zhu LQ, Xu W, Man HY. NEXMIF/KIDLIA Knock-out Mouse Demonstrates Autism-Like Behaviors, Memory Deficits, and Impairments in Synapse Formation and Function. *J Neurosci.* 2020;40(1):237-254. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0222-19.2019.

52. Govindpani K, Calvo-Flores Guzmán B, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A. Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1813. doi: 10.3390/ijms18081813.
53. Grant RA, Wong AA, Fertan E, Brown RE. Whisker exploration behaviours in the 5xFAD mouse are affected by sex and retinal degeneration. *Genes Brain Behav.* 2020;19(3):e12532. doi: 10.1111/gbb.12532.
54. Grubman A, Chew G, Ouyang JF, Sun G, Choo XY, McLean C, Simmons RK, Buckberry S, Vargas-Landin DB, Poppe D, Pflueger J, Lister R, Rackham OJL, Petretto E, Polo JM. A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat Neurosci.* 2019;22(12):2087-2097. doi: 10.1038/s41593-019-0539-4.
55. Guilloux JP, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods.* 2011;197(1):21-31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.019.
56. Guzmán-Vélez E, Feinstein JS, Tranel D. Feelings without memory in Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol.* 2014;27(3):117-29. doi: 10.1097/WNN.0000000000000020.
57. Hamann SB, Monarch ES, Goldstein FC. Memory enhancement for emotional stimuli is impaired in early Alzheimer's disease. *Neuropsychology.* 2000;14(1):82-92.
58. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA, de Souza LC, Corne H, Dauphinot L, Bertoux M, Dubois B, Gervais P, Colliot O, Potier MC, Bottlaender M, Sarazin M; Clinical IMABio3 team. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain.* 2016;139(Pt 4):1252-64. doi: 10.1093/brain/aww017.
59. Han S, Tai C, Jones CJ, Scheuer T, Catterall WA. Enhancement of inhibitory neurotransmission by GABAA receptors having $\alpha 2,3$ -subunits ameliorates behavioral deficits in a mouse model of autism. *Neuron.* 2014;81(6):1282-1289. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.016.
60. Hånell A, Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:252. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00252.
61. He Q, Chen X, Wu T, Li L, Fei X. Risk of Dementia in Long-Term Benzodiazepine Users: Evidence from a Meta-Analysis of Observational Studies. *J Clin Neurol.* 2019;15(1):9-19. doi: 10.3988/jcn.2019.15.1.9.
62. He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, Zhang B, Gathagan RJ, Yue C, Dengler C, Stieber A, Nitla M, Coulter DA, Abel T, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med.* 2018;24(1):29-38. doi: 10.1038/nm.4443.
63. Henstridge CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Beyond the neuron-cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(2):94-108. doi: 10.1038/s41583-018-0113-1.
64. Hipp JF, Knoflach F, Comley R, Ballard TM, Honer M, Trube G, Gasser R, Prinssen E, Wallace TL, Rothfuss A, Knust H, Lennon-Chrimes S, Derks M, Bentley D, Squassante L, Nave S, Nöldeke J, Wandel C, Thomas AW, Hernandez

- MC. Basmisanil, a highly selective GABAA- α 5 negative allosteric modulator: preclinical pharmacology and demonstration of functional target engagement in man. *Sci Rep.* 2021;11(1):7700. doi: 10.1038/s41598-021-87307-7.
65. Hu JH, Malloy C, Tabor GT, Gutzmann JJ, Liu Y, Abebe D, Karlsson RM, Durell S, Cameron HA, Hoffman DA. Activity-dependent isomerization of Kv4.2 by Pin1 regulates cognitive flexibility. *Nat Commun.* 2020;11(1):1567. doi: 10.1038/s41467-020-15390-x.
 66. Hu X, Rocco BR, Fee C, Sibille E. Cell Type-Specific Gene Expression of Alpha 5 Subunit-Containing Gamma-Aminobutyric Acid Subtype A Receptors in Human and Mouse Frontal Cortex. *Mol Neuropsychiatry.* 2019;4(4):204-215. doi: 10.1159/000495840.
 67. Jacob TC. Neurobiology and Therapeutic Potential of α 5-GABA Type A Receptors. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:179. doi: 10.3389/fnmol.2019.00179.
 68. Jankowsky JL, Zheng H. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):89. doi: 10.1186/s13024-017-0231-7.
 69. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012;33(1):196.e29-40. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027.
 70. Jin Z, Mendu SK, Birnir B. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids.* 2013;45(1):87-94. doi: 10.1007/s00726-011-1193-7.
 71. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH, Bae JY, Kim T, Lee J, Chun H, Park HJ, Lee DY, Hong J, Kim HY, Oh SJ, Park SJ, Lee H, Yoon BE, Kim Y, Jeong Y, Shim I, Bae YC, Cho J, Kowall NW, Ryu H, Hwang E, Kim D, Lee CJ. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2014;20(8):886-96. doi: 10.1038/nm.3639.
 72. Kang SS, Kurti A, Baker KE, Liu CC, Colonna M, Ulrich JD, Holtzman DM, Bu G, Fryer JD. Behavioral and transcriptomic analysis of Trem2-null mice: not all knockout mice are created equal. *Hum Mol Genet.* 2018;27(2):211-223. doi: 10.1093/hmg/ddx366.
 73. Kensinger EA, Brierley B, Medford N, Growdon JH, Corkin S. Effects of normal aging and Alzheimer's disease on emotional memory. *Emotion.* 2002;2(2):118-34. doi: 10.1037/1528-3542.2.2.118.
 74. Kim MS, Bang J, Kim BY, Jeon WK. Impaired Cognitive Flexibility Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in the 5XFAD Transgenic Mouse Model of Mixed Dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76(7):1169-1178. doi: 10.1093/gerona/glab075.
 75. Kim YS, Jung HM, Yoon BE. Exploring glia to better understand Alzheimer's disease. *Anim Cells Syst (Seoul).* 2018;22(4):213-218. doi: 10.1080/19768354.2018.1508498.
 76. Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal β -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol.* 2011;187(12):6539-49. doi: 10.4049/jimmunol.1100620.

77. Knopman DS, Jones DT, Greicius MD. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimers Dement.* 2021;17(4):696-701. doi: 10.1002/alz.12213.
78. Koh MT, Rosenzweig-Lipson S, Gallagher M. Selective GABA(A) α 5 positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology.* 2013;64(1):145-52. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.023.
79. Kosel F, Hamilton JS, Harrison SL, Godin V, Franklin TB. Reduced social investigation and increased injurious behavior in transgenic 5xFAD mice. *J Neurosci Res.* 2021;99(1):209-222. doi: 10.1002/jnr.24578.
80. Kosel F, Pelley JMS, Franklin TB. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;112:634-647. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.02.012.
81. Kosel F, Torres Munoz P, Yang JR, Wong AA, Franklin TB. Age-related changes in social behaviours in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2019;362:160-172. doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.029.
82. Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW. Alzheimer Disease. 2021 Aug 11. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
83. Kwak YT, Yang Y, Koo MS. Anxiety in Dementia. *Dement Neurocogn Disord.* 2017;16(2):33-39. doi: 10.12779/dnd.2017.16.2.33.
84. Kwakowsky A, Calvo-Flores Guzmán B, Pandya M, Turner C, Waldvogel HJ, Faull RL. GABAA receptor subunit expression changes in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus. *J Neurochem.* 2018;145(5):374-392. doi: 10.1111/jnc.14325.
85. Larson EA, Accardi MV, Wang Y, D'Antoni M, Karimi B, Siddiqui TJ, Bowie D. Nitric Oxide Signaling Strengthens Inhibitory Synapses of Cerebellar Molecular Layer Interneurons through a GABARAP-Dependent Mechanism. *J Neurosci.* 2020;40(17):3348-3359. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2211-19.2020.
86. Lee BC, Choi J, Martin BJ. Roles of the prefrontal cortex in learning to time the onset of pre-existing motor programs. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241562. doi: 10.1371/journal.pone.0241562.
87. Lee M, Schwab C, McGeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia.* 2011;59(1):152-65. doi: 10.1002/glia.21087.
88. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021;17(3):157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.
89. Li Y, Sun H, Chen Z, Xu H, Bu G, Zheng H. Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2016;8:31. doi: 10.3389/fnagi.2016.00031.
90. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029.

91. Lilienfeld S. Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 2002;8(2):159-76. doi: 10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x.
92. Limon A, Reyes-Ruiz JM, Mileti R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):10071-6. doi: 10.1073/pnas.1204606109.
93. Lipton SA. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res.* 2005;2(2):155-65. doi: 10.2174/1567205053585846.
94. Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci.* 2017;20(11):1434-1447. doi: 10.1038/nn.4661.
95. Liu L, Xu H, Wang J, Li J, Tian Y, Zheng J, He M, Xu TL, Wu ZY, Li XM, Duan SM, Xu H. Cell type-differential modulation of prefrontal cortical GABAergic interneurons on low gamma rhythm and social interaction. *Sci Adv.* 2020;6(30):eaay4073. doi: 10.1126/sciadv.aay4073.
96. Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenberg JG, Anholt RR. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res.* 2002;941(1-2):62-71. doi: 10.1016/s0006-8993(02)02566-0.
97. Lyra E Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende EPF, Vieira ELM, Teixeira AL, de Souza LC, Peny JA, Fortuna JTS, Furigo IC, Hashiguchi D, Miya-Coreixas VS, Clarke JR, Abisambra JF, Longo BM, Donato J Jr, Fraser PE, Rosa-Neto P, Caramelli P, Ferreira ST, De Felice FG. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):251. doi: 10.1038/s41398-021-01349-z.
98. Manji Z, Rojas A, Wang W, Dingleline R, Varvel NH, Ganesh T. 5xFAD Mice Display Sex-Dependent Inflammatory Gene Induction During the Prodromal Stage of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;70(4):1259-1274. doi: 10.3233/JAD-180678.
99. Maramai S, Benchekroun M, Ward SE, Atack JR. Subtype Selective γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR) Modulators Acting at the Benzodiazepine Binding Site: An Update. *J Med Chem.* 2020;63(7):3425-3446. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01312.
100. Mathur V, Burai R, Vest RT, Bonanno LN, Lehallier B, Zardeneta ME, Mistry KN, Do D, Marsh SE, Abud EM, Blurton-Jones M, Li L, Lashuel HA, Wyss-Coray T. Activation of the STING-Dependent Type I Interferon Response Reduces Microglial Reactivity and Neuroinflammation. *Neuron.* 2017;96(6):1290-1302.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.11.032.
101. Matsunaga S, Kishi T, Nomura I, Sakuma K, Okuya M, Ikuta T, Iwata N. The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Saf.* 2018;17(10):1053-1061. doi: 10.1080/14740338.2018.1524870.
102. McQuail JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. *Trends Mol Med.* 2015;21(7):450-60. doi: 10.1016/j.molmed.2015.05.002.

103. Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for α 5 GABAA receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res.* 2013;241:206-13. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.016.
104. Mohamad FH, Has ATC. The α 5-Containing GABAA Receptors-a Brief Summary. *J Mol Neurosci.* 2019;67(2):343-351. doi: 10.1007/s12031-018-1246-4.
105. Möhler H, Rudolph U. Disinhibition, an emerging pharmacology of learning and memory. *F1000Res.* 2017;6:F1000 Faculty Rev-101. doi: 10.12688/f1000research.9947.1.
106. Mullane K, Williams M. Preclinical Models of Alzheimer's Disease: Relevance and Translational Validity. *Curr Protoc Pharmacol.* 2019;84(1):e57. doi: 10.1002/cpph.57.
107. Neuner SM, Wilmott LA, Hoffmann BR, Mozhui K, Kaczorowski CC. Hippocampal proteomics defines pathways associated with memory decline and resilience in normal aging and Alzheimer's disease mouse models. *Behav Brain Res.* 2017;322(Pt B):288-298. doi: 10.1016/j.bbr.2016.06.002.
108. Ng A, Tam WW, Zhang MW, Ho CS, Husain SF, McIntyre RS, Ho RC. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2018;8(1):12050. doi: 10.1038/s41598-018-30487-6.
109. Nilsson SR, Alsiö J, Somerville EM, Clifton PG. The rat's not for turning: Dissociating the psychological components of cognitive inflexibility. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;56:1-14. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.015.
110. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;26(40):10129-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
111. O'Leary TP, Brown RE. Visuo-spatial learning and memory impairments in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Effects of age, sex, albinism, and motor impairments. *Genes Brain Behav.* 2022:e12794. doi: 10.1111/gbb.12794.
112. Paine TA, Chang S, Poyle R. Contribution of GABAA receptor subunits to attention and social behavior. *Behav Brain Res.* 2020;378:112261. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112261.
113. Paine TA, Swedlow N, Swetschinski L. Decreasing GABA function within the medial prefrontal cortex or basolateral amygdala decreases sociability. *Behav Brain Res.* 2017;317:542-552. doi: 10.1016/j.bbr.2016.10.012.
114. Palpagama TH, Sagniez M, Kim S, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A. GABAA Receptors Are Well Preserved in the Hippocampus of Aged Mice. *eNeuro.* 2019;6(4):ENEURO.0496-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0496-18.2019.
115. Park J, Moghaddam B. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. *Neuroscience.* 2017;345:193-202. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.013.
116. Philippi N, Botzung A, Noblet V, Rousseau F, Després O, Cretin B, Kremer S, Blanc F, Manning L. Impaired emotional autobiographical memory associated

- with right amygdalar-hippocampal atrophy in Alzheimer's disease patients. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:21. doi: 10.3389/fnagi.2015.00021.
117. Piantadosi SC, French BJ, Poe MM, Timić T, Marković BD, Pabba M, Seney ML, Oh H, Orser BA, Savić MM, Cook JM, Sibille E. Sex-Dependent Anti-Stress Effect of an $\alpha 5$ Subunit Containing GABAA Receptor Positive Allosteric Modulator. *Front Pharmacol.* 2016;7:446. doi: 10.3389/fphar.2016.00446.
 118. Plescher M, Seifert G, Hansen JN, Bedner P, Steinhäuser C, Halle A. Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia.* 2018;66(7):1464-1480. doi: 10.1002/glia.23318.
 119. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 2007;30(10):527-35. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007.
 120. Rae EA, Brown RE. The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;57:238-51. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.09.002.
 121. Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, Rathakrishnan P, Xiao H, Gao T, Duong DM, Pennington MW, Lah JJ, Seyfried NT, Levey AI. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2018;13(1):24. doi: 10.1186/s13024-018-0254-8.
 122. Razay G, Wilcock GK. Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2008;8(1):9-17. doi: 10.1586/14737175.8.1.9.
 123. Rissman RA, Mobley WC. Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2011;117(4):613-22. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07237.x.
 124. Rong X, Jiang L, Qu M, Hassan SSU, Liu Z. Enhancing Therapeutic Efficacy of Donepezil by Combined Therapy: A Comprehensive Review. *Curr Pharm Des.* 2021;27(3):332-344. doi: 10.2174/1381612826666201023144836.
 125. Rubin RD, Watson PD, Duff MC, Cohen NJ. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Front Hum Neurosci.* 2014;8:742. doi: 10.3389/fnhum.2014.00742.
 126. Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):685-97. doi: 10.1038/nrd3502.
 127. Sakata K, Martinowich K, Woo NH, Schloesser RJ, Jimenez DV, Ji Y, Shen L, Lu B. Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(37):15103-8. doi: 10.1073/pnas.1222872110.
 128. Salzman CD, Fusi S. Emotion, cognition, and mental state representation in amygdala and prefrontal cortex. *Annu Rev Neurosci.* 2010;33:173-202. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135256.
 129. Santrač A, Batinić B, Stamenić TT, Arandelović J, Sharmin D, Knutson DE, Cook JM, Savić MM. Positive modulation of $\alpha 5$ GABAA receptors leads to dichotomous effects in rats on memory pattern and GABRA5 expression in prefrontal cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 2022a;416:113578. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113578.

130. Santrač A, Bijelić D, Stevanović V, Banićević M, Arandelović J, Batinić B, Sharmin D, Cook JM, Savić MM. Postweaning positive modulation of α 5GABAA receptors improves autism-like features in prenatal valproate rat model in a sex-specific manner. *Autism Res.* 2022b. doi: 10.1002/aur.2699.
131. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 2017;36(17):2473-2487. doi: 10.15252/embj.201797397.
132. Savić MM, Clayton T, Furtmüller R, Gavrilović I, Samardžić J, Savić S, Huck S, Sieghart W, Cook JM. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA(A) receptors containing alpha5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. *Brain Res.* 2008;1208:150-9. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.020.
133. Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12(9):1179-93. doi: 10.1017/S1461145709000108.
134. Sayed IM, Ibeawuchi SR, Lie D, Anandachar MS, Pranadinata R, Raffatellu M, Das S. The interaction of enteric bacterial effectors with the host engulfment pathway control innate immune responses. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1991776. doi: 10.1080/19490976.2021.1991776.
135. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015;(96):e52434. doi: 10.3791/52434.
136. Seltzer B. Donepezil: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2007;8(7):1011-23. doi: 10.1517/14656566.8.7.1011.
137. Sieghart W, Savić MM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABAA Receptor Subtype- and Function-selective Ligands: Key Issues in Translation to Humans. *Pharmacol Rev.* 2018;70(4):836-878. doi: 10.1124/pr.117.014449.
138. Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40224-31. doi: 10.1074/jbc.R112.386664.
139. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol.* 2016;1392:161-76. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_15.
140. Soh MS, Lynch JW. Selective Modulators of α 5-Containing GABAA Receptors and their Therapeutic Significance. *Curr Drug Targets.* 2015;16(7):735-46. doi: 10.2174/1389450116666150309120235.
141. Solas M, Puerta E, Ramirez MJ. Treatment Options in Alzheimer's Disease: The GABA Story. *Curr Pharm Des.* 2015;21(34):4960-71. doi: 10.2174/1381612821666150914121149.
142. Son G, Yoo SJ, Kang S, Rasheed A, Jung DH, Park H, Cho B, Steinbusch HWM, Chang KA, Suh YH, Moon C. Region-specific amyloid- β accumulation in the olfactory system influences olfactory sensory neuronal dysfunction in 5xFAD mice. *Alzheimers Res Ther.* 2021;13(1):4. doi: 10.1186/s13195-020-00730-2.

143. Stamenić TT, Poe MM, Rehman S, Santrač A, Divović B, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:433-443. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.016.
144. Sturm VE, Yokoyama JS, Seeley WW, Kramer JH, Miller BL, Rankin KP. Heightened emotional contagion in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease is associated with temporal lobe degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9944-9. doi: 10.1073/pnas.1301119110.
145. Suzuki M, Miyai I, Ono T, Oda I, Konishi I, Kochiyama T, Kubota K. Prefrontal and premotor cortices are involved in adapting walking and running speed on the treadmill: an optical imaging study. *Neuroimage.* 2004;23(3):1020-6. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.07.002.
146. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Fujimaki H, Aikawa J, Iwase D, Minatani A, Iwabuchi K, Takaso M. Nerve Growth Factor Regulation by TNF- α and IL-1 β in Synovial Macrophages and Fibroblasts in Osteoarthritic Mice. *J Immunol Res.* 2016;2016:5706359. doi: 10.1155/2016/5706359.
147. Tan S, Rudd JA, Yew DT. Gene expression changes in GABA(A) receptors and cognition following chronic ketamine administration in mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e21328. doi: 10.1371/journal.pone.0021328.
148. Tang X, Wu D, Gu LH, Nie BB, Qi XY, Wang YJ, Wu FF, Li XL, Bai F, Chen XC, Xu L, Ren QG, Zhang ZJ. Spatial learning and memory impairments are associated with increased neuronal activity in 5XFAD mouse as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Oncotarget.* 2016;7(36):57556-57570. doi: 10.18632/oncotarget.11353.
149. Timić Stamenić T, Joksimović S, Biawat P, Stanković T, Marković B, Cook JM, Savić MM. Negative modulation of $\alpha 5$ GABAA receptors in rats may partially prevent memory impairment induced by MK-801, but not amphetamine- or MK-801-elicited hyperlocomotion. *J Psychopharmacol.* 2015;29(9):1013-24. doi: 10.1177/0269881115590601.
150. van Dyck CH, Arnsten AFT, Padala PR, Brawman-Mintzer O, Lerner AJ, Porsteinsson AP, Scherer RW, Levey AI, Herrmann N, Jamil N, Mintzer JE, Lanctôt KL, Rosenberg PB. Neurobiologic Rationale for Treatment of Apathy in Alzheimer's Disease With Methylphenidate. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2021;29(1):51-62. doi: 10.1016/j.jagp.2020.04.026.
151. Vaz M, Silvestre S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *Eur J Pharmacol.* 2020;887:173554. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173554.
152. Veening-Griffioen DH, Ferreira GS, van Meer PJK, Boon WPC, Gispen-de Wied CC, Moors EHM, Schellekens H. Are some animal models more equal than others? A case study on the translational value of animal models of efficacy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2019;859:172524. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172524.
153. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 2014;55(2):310-32. doi: 10.1093/ilar/ilu013.
154. Vyas Y, Montgomery JM, Cheyne JE. Hippocampal Deficits in Amyloid- β -Related Rodent Models of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2020;14:266. doi: 10.3389/fnins.2020.00266.

155. Walsh S, Merrick R, Milne R, Brayne C. Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ*. 2021;374:n1682. doi: 10.1136/bmj.n1682.
156. Wang DS, Zurek AA, Lecker I, Yu J, Abramian AM, Avramescu S, Davies PA, Moss SJ, Lu WY, Orser BA. Memory deficits induced by inflammation are regulated by α 5-subunit-containing GABAA receptors. *Cell Rep*. 2012;2(3):488-96. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.022.
157. Wang H, Cui J, Yang C, Rosenblum JS, Zhang Q, Song Q, Pang Y, Fang F, Sun M, Dmitriev P, Gilbert MR, Eisenhofer G, Pacak K, Zhuang Z. A Transgenic Mouse Model of Pacak-Zhuang Syndrome with An *Epas1* Gain-of-Function Mutation. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):667. doi: 10.3390/cancers11050667.
158. Ward RD. Methods for Dissecting Motivation and Related Psychological Processes in Rodents. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016;27:451-70. doi: 10.1007/7854_2015_380.
159. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through *Gprc6a*. *Diabetes*. 2014;63(3):1021-31. doi: 10.2337/db13-0887.
160. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jönsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol*. 2016;15(5):455-532. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00062-4.
161. Wu Z, Guo Z, Gearing M, Chen G. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's [corrected] disease model. *Nat Commun*. 2014;5:4159. doi: 10.1038/ncomms5159.
162. Xie L, Zhang N, Zhang Q, Li C, Sandhu AF, Iii GW, Lin S, Lv P, Liu Y, Wu Q, Yu S. Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(22):22538-22549. doi: 10.18632/aging.103663.
163. Xu H, Liu L, Tian Y, Wang J, Li J, Zheng J, Zhao H, He M, Xu TL, Duan S, Xu H. A Disinhibitory Microcircuit Mediates Conditioned Social Fear in the Prefrontal Cortex. *Neuron*. 2019;102(3):668-682.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.02.026.
164. Xu NZ, Ernst M, Treven M, Cerne R, Wakulchik M, Li X, Jones TM, Gleason SD, Morrow D, Schkeryantz JM, Rahman MT, Li G, Poe MM, Cook JM, Witkin JM. Negative allosteric modulation of alpha 5-containing GABAA receptors engenders antidepressant-like effects and selectively prevents age-associated hyperactivity in tau-depositing mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018;235(4):1151-1161. doi: 10.1007/s00213-018-4832-9.
165. Xu Y, Zhao M, Han Y, Zhang H. GABAergic Inhibitory Interneuron Deficits in Alzheimer's Disease: Implications for Treatment. *Front Neurosci*. 2020;14:660. doi: 10.3389/fnins.2020.00660.
166. Zanos P, Nelson ME, Highland JN, Krimmel SR, Georgiou P, Gould TD, Thompson SM. A Negative Allosteric Modulator for α 5 Subunit-Containing GABA Receptors Exerts a Rapid and Persistent Antidepressant-Like Action without the

- Side Effects of the NMDA Receptor Antagonist Ketamine in Mice. *eNeuro*. 2017;4(1):ENEURO.0285-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0285-16.2017.
167. Zhang B, Vogelzang A, Miyajima M, Sugiura Y, Wu Y, Chamoto K, Nakano R, Hatae R, Menzies RJ, Sonomura K, Hojo N, Ogawa T, Kobayashi W, Tsutsui Y, Yamamoto S, Maruya M, Narushima S, Suzuki K, Sugiya H, Murakami K, Hashimoto M, Ueno H, Kobayashi T, Ito K, Hirano T, Shiroguchi K, Matsuda F, Suematsu M, Honjo T, Fagarasan S. B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity. *Nature*. 2021;599(7885):471-476. doi: 10.1038/s41586-021-04082-1.
168. Zhang R, Xue G, Wang S, Zhang L, Shi C, Xie X. Novel object recognition as a facile behavior test for evaluating drug effects in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(4):801-12. doi: 10.3233/JAD-2012-120151.
169. Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, Li XH. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2013;8:103-10. doi: 10.2147/CIA.S40405.

Biografija

Jovana Arandelović je rođena 02.05.1992. godine u Beogradu. Pohađala je IX gimnazije „Mihailo Petrović Alas“, prirodno-matematički smer i bila je aktivni član Istraživačke stanice „Petnica“ tokom tri godine (smerovi: molekularna biomedicina i hemija). Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer farmacija-medicinska biohemija upisala je 2011. godine i završila ga 2016. godine sa prosečnom ocenom 9.78. Tema završnog rada bila je „Efekti ponavljane primene supstance koja deluje na $\alpha 6$ GABAA receptore u modelu trigeminalnog neuropatskog bola kod pacova” na Katedri za Farmakologiju pod mentorstvom profesora Miroslava Savića. Upisala je doktorske akademske studije 2016. godine na Farmaceutskom fakultetu, modul Farmakologija. Završila je pripravnički staž u „Aqualab Plus“ laboratoriji i položila stručni ispit za magistre farmacije – medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije 2017. godine. Završila je program za bioinformatiku na Računarskom fakultetu u Beogradu 2021. godine.

Bila je stipendista Fonda za mlade talente Srbije – Dositeja i stipendista Ministarstva za prosvetu i sport Republike Srbije.

Za vreme integrisanih akademskih studija učestvovala je u izradi 4 studentska istraživačka rada na Katedri za fiziologiju, medicinsku biohemiju i farmakologiju („Uticaj magnezijuma i oksitocina na nivo kortikosterona pacova u Porsoltovom testu”, „Procena parametara nutritivnog statusa, oksidativnog statusa i inflamacije kod pacijenata sa hroničnom renalnom insuficijencijom”, „Procena parametara oksidativnog statusa kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom”, „Uticaj deuteracije i specifičnosti formulacije na farmakokinetiku supstance koja deluje na $\alpha 6$ GABA a receptore kod pacova”).

Pohađala je Internacionalnu CEEPUS letnju školu o kanceru u Ljubljani, Slovenija (2016.) za koju je dobila stipendiju i bila je na plaćenju praksi na Katedri za toksikologiju na Medicinskom univerzitetu u Lođu, Poljska (2016.). Kao stipendista DAAD, pohađala je InterDAF intenzivni kurs nemačkog jezika u Lajpcigu, Nemačka (2017.). Od 2018. je zaposlena kao istraživač pripravnik, a od 2021 kao istraživač saradnik na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. Bila je zaposlena kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakologiju 2019. godine. Od 2019. je kao istraživač angažovana na projektu NeuroDeRisk u okviru H2020 – Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (IMI2-JU). Kao stipendista Erasmus+, bila je na letnjoj naučnoj školi „Linearna algebra za neuronaučnike“ na Univerzitetu u Radbaudu, Holandija. Pohađala je napredni Cajal trening program „Kognicija kod starenja“ na Univerzitetu u Bordou, Francuska, 2021. Učestvovala je u ECNP *workshop*-u 2022. godine, kao jedna od 100 najboljih neuronaučnika na početku karijere (*early career scientists*) u Nici, Francuska. U okviru Horizon projekta, 2022. godine, učestvovala je u realizaciji bioinformatičke analize za rezultate RNK sekvenciranja u kompaniji Sanofi u Monpeljeu, Francuska. Završila je više online kurseva u oblasti programiranja.

Član je Srpskog društva za neuronauke i Federacije evropskih društava za neuronauke (Federation of European Neuroscience Societies, FENS).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jovana Arandelović

Broj indeksa 2/2016

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora u eksperimentalnom modelu Alchajmerove bolesti”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Beograd, 04.07.2022.

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jovana Arandelović

Broj indeksa 2/2016

Studijski program Doktorske akademske studije, modul Farmakologija

Naslov rada „Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora u eksperimentalnom modelu Alchajmerove bolesti”

Mentor prof. dr Miroslav Savić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja **u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 04.07.2022.

Potpis autora

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Bimodalna modulacija alfa5 GABA_A receptora u eksperimentalnom modelu Alchajmerove bolesti”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA) (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Beograd, 04.07.2022.

Potpis autora

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.