

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Neurobiologie



Bc. Tereza Klausová

**Behaviorální fenotyp alzheimerovského modelu
APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myši a úloha parvalbuminových
interneuronů**

*Behavioral phenotype of APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice model of Alzheimer's disease and a role
of parvalbumin interneurons*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Svoboda, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.4.2024

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Janu Svobodovi za vedení a nepřekonatelnou podporu při sepisování práce. Dále děkuji Mgr. Karolíně Hružové za provedení operací a zasvěcení do nových laboratorních metod, a Mgr. Daniele Černotové za vypracování precizních harmonogramů a nedocenitelnou pomoc v boji se softwarem Ethovision. Díky patří též Bc. Lence Kuchyňkové za udržování duševní pohody v průběhu práce. V neposlední řadě (poněkud netradičně, avšak zaslouženě) děkuji všem pokusným zvířatům, jejichž oběť přináší pokrok lidskému vědění a bez kterých bychom neměli úžasné medicínské pokroky posledních dekad.

Podpořeno projektem Národní ústav pro neurologický výzkum onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5107) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

ABSTRAKT

Alzheimerova choroba představuje sociální a ekonomickou zátěž pro celou společnost. Její etiologie stále zůstává neznámá, známe však některé mechanismy patogeneze, které nám umožňují vytvářet zvířecí modely (zejména myši). V této práci zkoumáme behaviorální fenotyp často používaného modelu APP^{swe}/PSEN1. Zjistili jsme, že ani šestiměsíční, ani desetiměsíční zvířata nevykazují v testech anxiety (otevřené pole a vyvýšené křížové bludiště) ani v testech sociálního chování (sociální interakce a tříkomorový test) zhoršení oproti kontrolní skupině. Test prepulzní inhibice však odhalil, že PPI u alzheimerovských myši zcela mizí, což ukazuje na významnou aberaci v senzomotorickém gatingu.

Druhá část práce je zaměřena na chemogenetickou studii úlohy parvalbuminových interneuronů v Alzheimerově chorobě a vlivu jejich excitace na sociabilitu, sociální paměť a senzomotorický gating. Využíváme zde výše zmíněný model křížený s PV-Cre myšmi, což nám umožnilo zavedení Cre dependentních DREADDs. U této skupiny zvířat jsme zkoumali sociální chování a přítomnost narušení v senzomotorickém gatingu. Získané výsledky však nepřinesly žádný důkaz vlivu excitace parvalbuminových interneuronů na chování zvířat a bude potřeba provést více experimentů s větším počtem zvířat.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, chování, parvalbuminové interneurony

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a notable burden to the contemporary society concerning not only healthcare but also economy. Its aetiology remains unknown, but we know the mechanisms of pathogenesis, which allow us to create animal models (especially mice). In this thesis, we investigate the behavioral phenotype of the frequently used APP^{swe}/PSEN1 murine model. We find that neither six-month-old nor ten-month-old animals show impairment in anxiety (open field test and elevated plus maze) or social behavior tests (three chamber test and social interaction test) compared to controls. However, the prepulse inhibition test revealed that PPI completely disappear in Alzheimer mice, indicating a significant aberration in sensorimotoric gating.

The second part of this thesis focuses on a chemogenetic study of the role of parvalbumin interneurons in Alzheimer's disease and the effect of their excitation on sociability, social memory and sensorimotor gating. Here we use the aforementioned model crossed with Pv-Cre mice, which allowed us to introduce Cre-dependent DREADDs and in this group of animals we investigated social behaviour and the presence of disturbances in sensorimotor gating. However, the results obtained so far do not provide any evidence for an effect of parvalbumin interneuron excitation on animal behaviour, and further experiments with larger numbers of animals will be needed.

Keywords: Alzheimer's disease, behavior, parvalbumin interneurons

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
ÚVOD.....	8
LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
1 ALZHEIMEROVA CHOROBA A PROBLEMATIKA MYŠÍCH MODELŮ.....	10
1.1. <i>Etiologie a patogeneze AD</i>	<i>10</i>
1.1.1 Charakteristická histopatologie AD.....	11
1.1.2 Padesát let výzkumu AD a dosud publikované teorie	13
1.2. <i>Typy Alzheimerovy choroby a stručný klinický obraz.....</i>	<i>14</i>
1.2.1 Familiární forma.....	14
1.2.2 Sporadická forma.....	15
1.2.3 Klinická stádia AD.....	16
1.3. <i>Myší modely AD – stručný přehled.....</i>	<i>17</i>
1.3.1 Modely tauopatie.....	18
1.3.2 Amyloidové modely.....	18
1.3.3 Kombinované modely.....	19
1.4. <i>Charakteristika APP^{swE}/PSEN1dE9 modelu</i>	<i>19</i>
1.5. <i>O myších a lidech: Omezení myších modelů.....</i>	<i>21</i>
2 PARVALBUMINOVÉ INTERNEURONY	23
2.1. <i>Význam parvalbuminových interneuronů.....</i>	<i>24</i>
2.2. <i>Chemogenetika.....</i>	<i>25</i>
2.3. <i>Parvalbuminové interneurony a Alzheimerova choroba.....</i>	<i>27</i>
CÍLE PRÁCE A VÝZKUMNÉ OTÁZKY	30
PRAKTICKÁ ČÁST.....	31
3 VÝZKUMNÝ VZOREK	32
4 METODY	33
4.1. <i>Behaviorální testy.....</i>	<i>33</i>
4.1.1 Test otevřeného pole (open field - OF)	33
4.1.1 Vyskyšené křížové bludiště (Elevated plus maze – EPM)	34
4.1.2 Sociální interakce (SIT).....	34
4.1.3 Test tří komor (Three chamber test)	35
4.1.4 Prepulzní inhibice (PPI).....	36
4.2. <i>Chemogenetický experiment</i>	<i>37</i>
4.3. <i>Usmrcení a histologie.....</i>	<i>40</i>
5 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	41
5.1. <i>Behaviorální fenotyp APP^{swE}/PSEN1dE9</i>	<i>41</i>

5.1.1	Otevřené pole	41
5.1.2	Vyvýšené křížové bludiště	42
5.1.3	Sociální interakce	42
5.1.1	Tříkomorový test	43
5.1.2	Prepulzní inhibice	45
5.2.	<i>Úloha parvalbuminových interneuronů v AD</i>	46
5.2.1	Histologická analýza dat	46
5.2.2	Tříkomorový test	46
5.2.1	Prepulzní inhibice	47
6	DISKUSE VÝSLEDKŮ	49
6.1.	<i>Diskuse: Behaviorální fenotyp APP^{Swe}/PSEN1^{dE9}</i>	49
6.1.1	Alzheimerovské myši nevykazují změněnou míru anxiety	49
6.1.2	Nepodařilo se prokázat abnormální sociální chování	51
6.1.3	Míra prepulzní inhibice je u APP ^{Swe} /PSEN1 ^{dE9} myši nulová	52
	<i>Diskuse: Úloha parvalbuminových interneuronů v Alzheimerově chorobě</i>	52
6.1.4	Chemogenetická aktivace PVI nehraje roli v sociální paměti	53
6.1.5	Míra prepulzní inhibice není ovlivněna aktivací PVI	54
	ZÁVĚR	55
	CITOVANÁ LITERATURA	56

SEZNAM ZKRATEK

Acetylcholin	<i>acetylcholine</i>	acetylcholin
AD	<i>Alzheimer's disease</i>	Alzheimerova choroba
→ FAD	<i>Familial AD</i>	familiální forma AD
→ SAD	<i>Sporadic AD</i>	sporadická forma AD
APP	<i>amyloid-precursor protein</i>	amyloidový prekurzorový protein
CNS	<i>central nervous system</i>	centrální nervový systém
CNO	<i>clozapine N-oxide</i>	klozapin N-oxid
DREADDs	<i>designer receptors activated by designer drugs</i>	uměle vytvořené receptory
EPM	<i>elevated plus maze</i>	vyvýšené plus bludiště
GABA	<i>gamma-amino-butyric acid</i>	kyselina γ -amino-máselná
MAPT	<i>microtubule associated protein Tau</i>	τ -protein
MWM	<i>Morris water maze</i>	Morrisovo vodní bludiště
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>	neurofibrilární klubka
OF	<i>open field</i>	otevřená aréna
PPI	<i>prepulse inhibition</i>	prepulzní inhibice
PV	<i>parvalbumin</i>	parvalbumin
PVI	<i>parvalbumin interneuron</i>	parvalbuminový interneuron

ÚVOD

Vážení čtenáři, dostává se vám do rukou má diplomová práce. Spolu s kolegy z oddělení neurofyziologie paměti působícím na Fyziologickém ústavu AVČR jsme se zaměřili na preklinický výzkum vlivu změny funkce parvalbuminových interneuronů na model familiární Alzheimerovy choroby. Toto onemocnění je a bude celospolečenským problémem, jehož závažnost roste mimo jiné také vlivem celkového stárnutí populace. Stejně tak roste tlak na výzkum a vývoj potenciálních léčiv.

V současné době máme k dispozici pouze možnost průběh choroby zpomalit. Vyléčit ji stále nelze, jelikož dosud neznáme přesnou etiologii tohoto onemocnění. I proto je v současnosti důležitý preklinický výzkum na animálních modelech, který vede k porozumění problematice, a snad, jedn oho dne, povede také k odhalení skutečné příčiny této letální neurodegenerace.

V této práci se věnuji APP^{swe}/PSEN^{dE9} modelu Alzheimerovy demence a sleduji behaviorální fenotyp těchto zvířat, ve snaze vytvořit jistý standard chování tohoto modelu pro laboratoře FGÚ pomocí baterie behaviorálních testů. Zaměřuji se především na anxieta a sociální chování – zejména proto, že se tomu dosud provedené studie příliš nevěnují. Ve druhé části práce se věnuji úloze parvalbuminových interneuronů v kontextu Alzheimerovy choroby. Zde sleduji, jak tyto myši ovlivní chemogenetická aktivace parvalbuminových interneuronů ve ventrálním hipokampu v sociabilitě a sociální paměti.

Na závěr už stačí jen dodat, že pokrýt celou problematiku této jediné skupiny neuronů rozsah této diplomové práce bohužel nedokáže – pro mě osobně je to důkazem komplexnosti celé problematiky a toho, že k porozumění takto komplikované patologii je potřeba práce celé řady týmů, z nichž každý odhaluje kousek této pomyslné skládačky.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1 ALZHEIMEROVA CHOROBA A PROBLEMATIKA MYŠÍCH MODELŮ

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, onemocnění, představující v současnosti nejčastější příčinu demence a zároveň výraznou ekonomickou i sociální zátěž pro celou společnost. V roce 2020 jsme evidovali 50 milionů případů AD, a podle dostupných dat webu Alzheimer's Disease International se počet případů během každých dalších dvaceti let zdvojnásobí (Guerchet et al., 2020, více: „2023 Alzheimer's disease facts and figures“, 2023).

V současné době existuje pouze symptomatická léčba inhibitory acetylcholinesterázy (donepezil, rivastigmin, galantamin) nebo antagonisty NMDA receptorů (memantin), jejichž účinky jsou poněkud omezené a dokážou pouze zmírnit kognitivní deficit. Novinkou je léčivo Lequemi (lecanemab) schválené ve Spojených státech v lednu 2023. Jedná se o imunoterapii, která odbourává amyloidové plaky a zpomaluje tak postup nemoci. I tak jde o poměrně drahou léčbu, vyžadující pravidelné infuze a MRI skeny z důvodu častých vedlejších účinků v podobě krvácení do mozku, které v několika případech vedlo ke smrti pacienta (Alzforum, 24. 1. 2024). I přes značný pokrok tak zůstává prognóza AD nepříznivá.

I přes intenzivní výzkum neznáme přesnou etiologii a patogenezi nemoci. Neméně důležitou část výzkumu této choroby tak představují pokusy s různými zvířecími modely, které nám umožňují hlubší poznání mechanismů Alzheimerovy choroby. Mezi ty nejpoužívanější patří myši, kterými se tato práce zabývá.

1.1. Etiologie a patogeneze AD

Tuto kapitolu bude provázet jistá míra nejistoty a může vyznívat poněkud pesimisticky – bohužel ani po více než sto let od objevení existence choroby nemůžeme zcela přesně objasnit její etiologii. Proto si shrneme, co zatím o degenerativním působení AD víme, a ukážeme si, jak se naše obzory v průběhu stovky let od pojmenování choroby doktorem Alzheimerem rozšířily.

Nezávisle na sobě Alois Alzheimer a Oskar Fischer popsali plaky a neurofibrilární klubka u pacientů, kteří vykazovali známky této choroby (i přestože měl Fischer bezpochyby větší výzkumný vzorek, bohužel jeho židovský původ vedl k tomu, že dnes nese choroba jméno jeho konkurenta – více v Alzforum, 2009). Neurofibrilární klubka se podařilo izolovat a identifikovat jako zkroucené mikrotubuly (Iqbal et al., 1974), o dvanáct let později byla prokázána přítomnost Tau proteinu v těchto strukturách (Grundke-Iqbal, 1986).

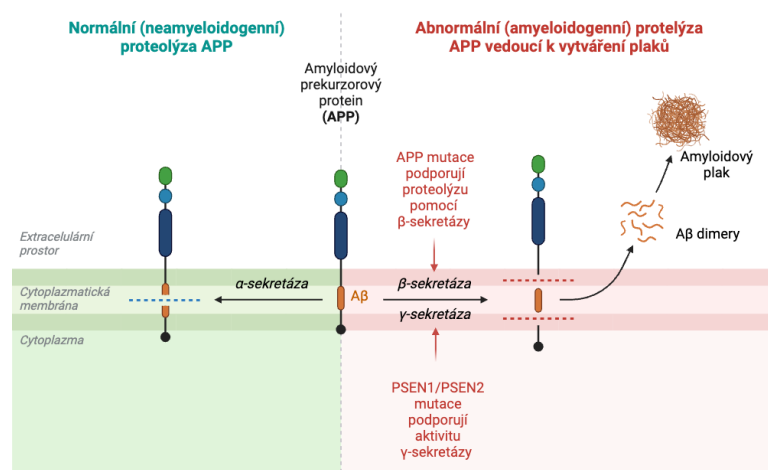
1.1.1 Charakteristická histopatologie AD

Amyloidové plaky jsou učebnicovým znakem Alzheimerovy choroby, a dle některých teorií (viz dále v této kapitole) se jedná o možnou příčinu choroby. Na počátku stojí amyloidový prekurzorový protein (APP). Jedná se o transmembránový protein vyskytující se v nervových buňkách. Hraje roli v neurogenezi a neuroregeneraci a knock-out APP se projevil u myši jako letální a vedoucí k výrazným neuroanatomickým defektům (Chen et al., 2006). Svou roli v etiologii AD začíná hrát až po proteolýze.

Nacházíme dvě cesty proteolýzy APP (obr. 1):

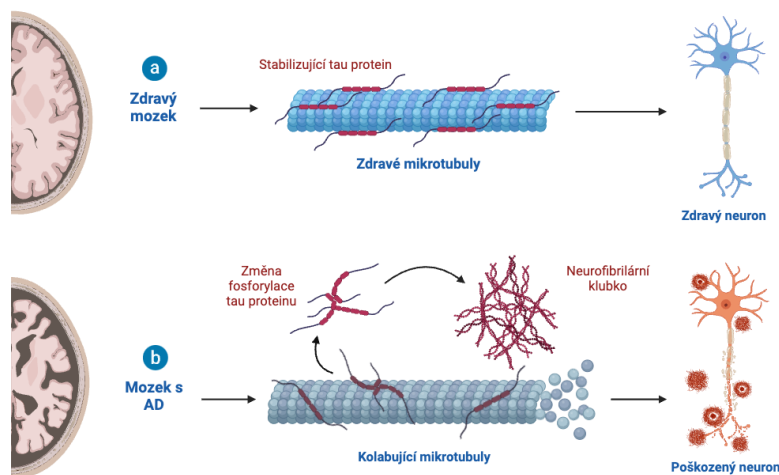
- **Neamyloidogenní cesta**, kdy je APP štěpen α -sekretázou. Vzniká solubilní APP (N-terminální fragment), který má neuroprotektivní účinky a C-terminální fragment α , který zůstává v membráně a následně reaguje s γ -sekretázou s presenilinem, což vede k formaci amyloidové intracelulární domény a peptidu p3. Tuto cestu považujeme za fyziologickou (Hijazi, 2021).
- **Amyloidní cesta**, kdy je APP štěpen β -sekretázou. Kromě solubilního APP vzniká C-terminální fragment β , který je následně γ -sekretázou rozštěpen amyloidovou intracelulární doménu a na **β -amyloid**, který následně dimerizuje (Hijazi, 2021).

Takto vzniklý amyloid začíná vytvářet dimery, oligomery (právě solubilní oligomery se ukázaly jako zdaleka nejvíce neurotoxické - Tolar et al., 2021) a ty následně formují amyloidový plak. Vznikají tak agregáty, ve kterých kromě amyloidu nacházíme také atrofované neurity napadených buněk (Hardy & Allsop, 1991).



Obr. 1: Proteolýza APP. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

Dalším charakteristickým histopatologickým znakem AD je formace **neurofibrilárních klubek** (NFT). Hlavním „viníkem“ je zde protein asociovaný s mikrotubuly, který označujeme jako τ -protein (či tau protein, angl. „*microtubule associated protein tau*“ - MAPT). V normálním stavu jde o peptid zodpovědný za udržení tvaru mikrotubul. Jeho abnormální fosforylace však vede ke ztrátě jeho funkce (Grundke-Iqbal et al., 1986b) a kolapsu celého neuritu (viz obr. 2).



Obr. 2: Tauopatie u Alzheimerovy choroby. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

Tyto změny můžeme pozorovat u pacientů i celé dekady před úplným vypuknutím nemoci (Price et al., 2009). Samotná tauopatie není příznakem pouze AD, je spojená např.

s frontotemporální demencí (př. Poorkaj et al.,1998). Jsou tyto histopatologické změny příčinou či následkem?

1.1.2 Padesát let výzkumu AD a dosud publikované teorie

V průběhu let se vyskytly mnohé hypotézy s cílem popsat patogenezi AD. Jako první se představila **cholinergní hypotéza** (Davies, 1976), která spojovala chorobu se sníženou aktivitou enzymu cholin acetyltransferázy, potažmo acetylcholinové neurotransmise a byla označena za průlomovou. Koneckonců, první dostupná léčba cílila právě na Ach, konkrétně na inhibitory acetylcholinesterázy (Davies, 1976; Perry et al., 1977). Jako nedostatek teorie se ukázalo, že AD ovlivňuje více neurotransmiterů než pouze Ach a léčiva zacílená na cholinergní systém nepředstavovala žádný větší průlom jako spíše pouze symptomatické léčivo na podporu paměti (Selkoe, 1991).

Jako skutečný průlom se ukázala **amyloidová hypotéza** (Hardy et al., 1991), která má v odborných kruzích zvuk do dnešní doby a zmiňuje ji většina moderních učebnic. Pozornost se zde upírá na charakteristickou histopatologii v podobě výše zmíněných beta amyloidových plaků. Právě v nich hledají zastánci této hypotézy příčinu onemocnění, dle kritiků jde však pouze o popis mechanismu – nikoliv příčin (např. Vojtěchová et al., 2022).

V devadesátých letech minulého století přichází další hypotéza, zdůrazňující roli **imunitního systému**. Histopatologické projevy AD nachází odezvu u imunitního systému, který reaguje mobilizací mikroglíí a komplementu. Agresivní reakce vede k chronickému zánětu, který vede k poškození a následnému zahubení nervových buněk. McGeer a Rogers (1992) proto vyzývají farmakology, aby se další výzkumné úsilí zaměřilo na zastavení zánětu. I v současné době je vztah imunitní reakce a AD v centru zájmu mnoha pracovišť a debatuje se o její roli – je negativní, pozitivní či jde pouze o důsledek, nikoliv o příčinu (Skokowa et al., 2006; podrobněji př. Heneka et al.,2015)?

Nové milénium přináší **neurovaskulární hypotézu** (2004/2005). Zlokovic (2005) upozorňuje na skutečnost, že dosavadní studie poukázaly na přítomnost β -amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek i v případech, kdy pacient trpěl pouze hypertenzí (Bailey et al., 2004 in Zlokovic, 2005) a považuje převažující amyloidovou hypotézu za nedostačující. Odkazuje na souvislost vaskulárních onemocnění s Alzheimerovou chorobou. Jako příčinu neurodegenerace uvádí abnormální kapilární prokrvení mozku, které způsobuje hypoxii

a hromadění neurotoxických produktů vedoucích ke vzniku lézí. Tato hypotéza bere v potaz také výše zmíněnou imunitní reakci (Zlokovic, 2005).

Poněkud neotřelý pohled nabízí **teorie infekce mikroorganismy**. Zastánci této teorie se opírají o myšlenku, že je nadprodukce β -amyloidu reakcí na infekci mozku – funguje tedy jako antimikrobiální peptid (Vojtěchová et al., 2022). Nejedná se tu však o specifický „alzheimerovský bacil“, kterým se může nakazit každý, ale spíše o obecnou obrannou reakci objevující se u starších lidí, která v konečném důsledku (jako koneckonců mnoho imunitních odpovědí) představuje zátěž a nakonec patologii.

Jak vidíme, existuje celá řada teorií, z nichž každá má své limity. Je degenerace způsobena patologickou proteolýzou APP? Jedná se o vaskulární problém? Máme ji snad brát jako získané autoimunitní onemocnění? Ani v současné době nemáme dostatek informací, abychom na tuto otázku mohli odpovědět.

1.2. Typy Alzheimerovy choroby a stručný klinický obraz

V klinické praxi se setkáváme s různou klasifikací typů AD. Diagnostický manuál MKN-10 (2023) používaný v evropských zemích rozlišuje demenci podle věku pacienta na AD s časným nástupem – presenilní (do 65 let) a pozdním nástupem – senilní (65+). Pro účely našeho výzkumu je výhodnější dělení dle pravděpodobné etiologie na **familiární formu a sporadickou formu**.

1.2.1 *Familiární forma*

FAD je vzácnější forma AD, potvrzená u 5-10 % všech případů Alzheimerovy choroby (Jiráček & Koukolík, 2002; in Bártová et al., 2011). První příznaky se v postižených rodinách objevují v relativně nižším věku. V průběhu let byla objevena spojitost FAD s celou řadou mutací v genech kódujících APP, ale především v těch kódujících presenilin-1 (vůbec nejčastější mutace) a presenilin-2 (Sherrington et al., 1995; Strobel, n.d.).

Jelikož se práce věnuje myšlímu modelu APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, považujeme za důležité se pár slovy zmínit o tzv. **švédské mutaci**. V roce 1992 byla u dvou početných švédských rodin v genu kódujícím APP objevena dvojitá substituce aminokyselin v exonu 16 -

asparagin místo lysinu v kodonu 670 a leucin místo methioninu v kodonu 671 (Mullan et al., 1992 in Lannfelt et al., 1994). Švédská mutace APP činí protein přitažlivějším substrátem pro β -sekretázu. Ta způsobí jeho proteolýzu vedoucí ke vzniku patologického β -amyloidu (Zetterberg & Mattson, 2014).

Podobně byla popsána mutace v genu pro presenilin-1, označovaná jako PSEN1dE9. Charakterizuje ji delece exonu 9 v genu kódujícím presenilin-1- katalytickou podjednotku gama sekretázy, která se podílí na amyloidogenní proteolýze APP (obr. 1). Typické pro tuto formu byly prvotní příznaky v podobě paraparézy a specifický tvar β -amyloidových plaků připomínající klubka vlny (Crook et al., 1998). Podobných mutací evidujeme v současnosti celou řadu. Přesná povaha jednotlivých mutací však přesahuje rámec této práce (shrnutí nabízí např. Tanzi et al, 1996).

V postižených rodinách se FAD dědí autozomálně dominantně – potomek nemocného člověka má 50% šanci, že se choroba vyskytne též u něj. FAD nastupuje často již před šedesátým rokem života (Scheltens et al., 2021; Sherrington et al., 1995), či mnohem dříve – familiální AD může v závislosti na mutaci zasáhnout člověka v produktivním věku (Bártová et al., 2011; Strobel, n.d.).

1.2.2 Sporadická forma

Všechny ostatní případy označujeme jako tzv. *sporadickou demenci Alzheimerova typu*. První příznaky se obvykle objevují po až po 65. roce života a jedná se o drtivou většinu případů Alzheimerovy choroby.

I zde je pravděpodobně příčinou řada mutací, z nichž některé jsou podobné jako u FAD. Nejčastější je však mutace v genu pro apolipoprotein-E, figurující např. v transportu cholesterolu a jiných lipidů, ale také regeneraci či degeneraci v CNS. Tento gen se vyskytuje ve třech různých alelách – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$ (Tsai et al., 1994). Právě alela $\epsilon 4$ zvyšuje riziko vypuknutí nemoci o 30 % u populace ve věku 75 let, po deseti letech však riziko stoupá až na 50 % (Genin et al., 2011).

V případě sporadické AD nepovažujeme za příčinu hereditární zátěž, ale vystavení rizikovým faktorům. Mezi ty řadíme vysoký věk, nedostatečné vzdělání („neaktivní mozky“), vysoký cholesterol, obezita, úraz hlavy, oxidativní stres a řada dalších („2023 Alzheimer's disease facts and figures“, 2023; Lahiri et al., 2007). I proto existuje tlak na

vytváření preventivních programů, které kromě kognitivního tréninku zahrnují také fyzické aktivity či úpravu výživy, výraznější úspěchy však tyto studie nezaznamenaly (Andrieu et al., 2015).

Specifickým případem je Alzheimerova choroba v případě **Downova syndromu**, způsobeného trizomií 21. chromozomu. Právě tento chromozom obsahuje kód amyloidového prekurzorového proteinu (APP), jehož nesprávná proteolýza vede k vytváření charakteristických senilních plaků. U lidí postižených trizomií 21 dochází k nadměrné expresi APP, a tudíž narůstá i pravděpodobnost vypuknutí AD u těchto pacientů po dosažení vyššího věku (Elangovan et al., 2023).

1.2.3 *Klinická stádia AD*

Choroba začíná nenápadně a často zcela nepozorovaně – a bez využití laboratorních metod je prakticky nediodagnostikovatelná. Proto je toto stádium cílem mnoha studií – pokud bychom zastavili chorobu před jejím vypuknutím či v prodromálním stádiu, výrazně bychom ulevili pacientům, jejich rodinám i sociálnímu systému. Zaměřujeme se tedy na biomarkery – například množství τ -proteinu v cerebrospinálním moku (Blennow et al., 2010). Moderní výzkumy na myších ukazují, že biomarkerem (zatím alespoň pro účely výzkumu) může být i porucha zpracování zvukové informace (Liu et al., 2019). Nyní se zaměříme na jednotlivá stádia choroby z hlediska klinické praxe.

Rané stádium nemoci je stále poměrně nenápadné, avšak již diiodagnostikovatelné pomocí psychodiagnostických metod (nejpoužívanější je MMSE). Pacient má problém vybavit si nedávné události – co měl na oběd? Obvykle odpoví zcela bez váhání, ale často pozorujeme konfabulace. Dosud běžné činnosti jako nákup, objednání si v restauraci, nebo správa domácích financí se stávají náročnými. Pacient si uvědomuje své nedostatky a snaží se je skrývat, často je odtažitý a podrážděný (Reisberg & Franssen, 1999).

Střední stádium už představuje konec samostatnosti pacienta, který není schopen vykonávat běžné denní činnosti. Nedokáže se obléct adekvátně k počasí, nevybaví si některé znalosti (Kdo je prezidentem? Kde jsem studoval/a?). Tyto příznaky se prohlubují, a nakonec si pacient není schopen vybavit kde bydlí, plete si členy vlastní rodiny a není schopen zvládnout osobní hygienu. Náladu charakterizuje zoufalství, paranoia či agrese (Reisberg & Franssen, 1999).

Pacienti v **těžkém stadiu AD** již ztrácí schopnost mluvit, a často vydávají pouze neartikulované zvuky. Postupně ztrácejí kontrolu nad vlastním tělem, nejprve ztrácí schopnost chůze, poté se nedokážou posadit. V konečném stadiu nemohou ani udržet hlavu ve vzpřímené poloze. Ztrácí se také schopnost polykat, pacient tak nemůže přijímat potravu. Pouze intenzivní péče rodiny či personálu specializovaného zařízení je udržuje při životě, který však v průběhu těžkého stadia AD končí. Častou příčinou smrti jsou pneumonie, záněty způsobené dekubity, ale také cévní mozkové příhody či infarkt a další nemoci spojené se stářím (Reisberg & Franssen, 1999).

1.3. Myší modely AD – stručný přehled

Myš domácí (*Mus musculus*) je výborný model pro výzkum v neurovědách. Výhodou je jejich rychlá reprodukce, nízká náročnost péče, ale také rozvinuté sociální chování, učení a vrozená zvědavost, které nám umožňují provádět široký repertoár behaviorálních testů. A právě myš byla prvním modelovým organismem ve výzkumu Alzheimerovy choroby. U myši se AD přirozeně nevyskytuje, a proto vznikl v roce 1991 první transgenní myší model.

Jednalo se o transgenní myši, označené **NSE-APP751**, nadměrně exprimující lidskou izoformu APP751, kódujícího APP (Quon et al., 1991). Tato genetická modifikace má za následek výskyt amyloidových plaků difuzního charakteru, které připomínaly spíše pre-amyloidové plaky charakteristické pro mladé pacienty s Downovým syndromem. Nepodařilo se zde najít klasická neurofibrilární klubka (Higgins, 1994). V současné době tento model považujeme za překonaný (Alzforum, n.d.).

V současnosti (duben 2024) web Alzforum.org uvádí 204 myších modelů, což je obrovské množství. V této části si pro představu ukážeme pár zástupců těch nejpoužívanějších.

1.3.1 Modely tauopatie

Modely využívající abnormální fosforylaci τ -proteinu a vznik NFT

- **Tau P301 L:** Neurofibrilární klubka lze pozorovat od 6 měsíců věku zvířete. Postupně se objevují problémy s motorikou a kognitivní deficity. Většina zvířat se nedožije 13. měsíce z důvodů rozšíření tauopatie do oblasti středního mozku a prodloužené míchy (Dutschmann et al., 2010).
- **rTgTauEC:** Tento model odpovídá raným histopatologickým změnám pozorovaných u pacientů s AD v entorhinálním kortexu a postupující do oblastí, které s ním mají funkční propojení. První patologické změny u těchto myší pozorujeme již ve třech měsících. Až ve 21 měsících jsou pozorovatelné ztráty neuronů, o tři měsíce později lze pozorovat pokles množství neuronů v entorhinální kůře o 42 %, pozorujeme také namnožení glií (glióza) a degeneraci axonů (De Calignon et al., 2012).

1.3.2 Amyloidové modely

Tyto modely jsou založené na mutacích v APP či presenilinu a jejich účelem je vytvoření amyloidových plaků.

- **5xFAD (B6SJL):** V tomto modelu je přítomno hned pět různých mutací familiární AD, které se týkají APP či presenilinu. Důsledkem je vznik amyloidových plaků již ve dvou měsících věku zvířat. Ty se poměrně agresivně šíří dál a způsobují výrazné motorické a kognitivní deficity. Ztrátu neuronů zde pozorujeme již u šestiměsíčních zvířat. Přítomná je také glióza (Oakley et al., 2006)
- **APP NL-G-F Knock-in:** Mnohé myší modely jsou založené na zvýšené expresi APP. Saito a kolegové (2014) tento přístup kritizují, protože kromě β -amyloidu nalézáme v mozku těchto myší také velké množství jiných produktů. Proto uvádí vlastní model, ve kterém se podařilo zvýšit produkci β -amyloidu, aniž by se zvýšilo množství APP v mozku. Model vykazuje výskyt amyloidových plaků již od 2. měsíce života, průkazné zhoršení kognitivních funkcí lze pozorovat již u šestiměsíčních zvířat (Saito et al., 2014).

- **APPswDI x NOS2 Knock-out** – Model vznikl křížením dvou různých kmenů – kromě přítomnosti tří různých mutací Alzheimerovy choroby je tento model charakteristický také nepřítomností syntázy oxidu dusnatého (NOS2). Důsledkem je fenotyp obsahující kromě přítomnosti senilních plaků také přítomnost neurofibrilárních klubek a ztráta neuronů. Také kognitivní deficity jsou výraznější než v případě obou rodičovských kmenů

1.3.3 *Kombinované modely*

Modely, které *kombinují* více typů mutací.

- **Tg2576/Tau(P301L)**: Tento model byl představen roku 2001. Vznikl křížením modelů JNPL3 (exprimující mutantní τ -protein) a Tg2576 (exprimující mutantní APP). Cílem bylo vytvoření myšího modelu, kde se objevují jak tak plaky β -amyloidu, tak i neurofibrilární klubka a ztráta neuronů. Umožňuje nám zkoumat souvislost mezi přítomností senilních plaků a vytvořením neurofibrilárních klubek (Lewis et al., 2001). U modelu je možné pozorovat zánětlivé procesy, ale s postupem času také výraznou změnu v chování – změna vokalizace, nahrbená chůze a ztráta zájmu o péči o srst, která je jindy pro myši charakteristická. Model je využíván dodnes (Alzforum, n.d.).
- **3xTg**: I zde nacházíme kombinovanou histopatologii zahrnující senilní plaky i NFT. Za svůj název vděčí hned třem mutacím, z nichž jedna se týká APP, druhá presenilinu a třetí MAPT. Fenotyp je charakterizován progresivní neuropatií, kognitivní deficity se začínají objevovat ve čtyřech měsících a postupně se prohlubují (Stover et al., 2015).

1.4. Charakteristika APP^{swe}/PSEN1^{dE9} modelu

Dostáváme se k popisu myší, které využíváme v experimentální části této diplomové práce. Jedná se o populární amyloidový model Alzheimerovy choroby, komerčně dostupný v Jackson Laboratories v USA. Tyto myši exprimují chimérní lidsko-myší gen APP označovaný Mo/HuAPP695swe (konkrétně již zmíněná švédská mutace – proto APP^{swe})

současně s lidským PSEN1 postrádajícím exon 9, a to pod myším prionovým promotorem, díky kterému se mutace může kontinuálně exprimovat v neuronech CNS (The Jackson Laboratory, n.d.). V této práci bude pro zjednodušení označován jako APP/PSEN1 model.

Tato zvířata jsou hemizygotní, což znamená, že oba vnesené geny jsou lokalizované pouze na jednom z chromozomů v páru. V důsledku toho se po křížení s kontrolní myší bez mutací zhruba polovina zvířat z vrhu rodí s genotypem obsahující tyto geny a polovina odpovídá divokému typu. Model je koncipovaný tak, aby se v důsledku křížení geny nerozdělily, nemůžeme tedy získat myš s APP_{swe} mutací bez mutace PSEN1_{dE9} (The Jackson Laboratory, n.d.).

Tentýž model vybudovaný na odlišném genetickém pozadí (konkrétně C57BL/6J-kongenické pozadí) vykazoval vysokou četnost spontánních epileptických záchvatů – ve věku mezi 3. až 4. měsícem prodělalo 65 % jedinců alespoň jeden záchvat, z toho 48 % prodělalo záchvatů několik a ve čtvrtině případů šlo o generalizovaný záchvat. Ve stejném věku docházelo také k častým úmrtím jedinců (Minkeviciene et al., 2009). U námi využívaného modelu s kongenickým pozadím C57BL/6;C3H se žádné epileptické záchvaty neprojevují.

Název:	<i>APP_{swe}/PSEN1_{dE9} (C57BL6)</i>
Druh:	Myš (<i>m.musculus</i>)
Modifikace:	<i>Transgenní APP, PSEN1</i>
Název linie:	<i>B6.Cg-Tg(APP_{swe},PSEN1_{dE9}) 85Dbo/Mmjax</i>
Onemocnění:	Alzheimerova demence

Tab.1: Základní charakteristika použitého modelu (Alzforum, n.d)

První amyloidové plaky se objevují v kortexu již od 4. měsíce, více rozšířené jsou v 6. měsíci, což je v životě myši období u lidí odpovídající věku mezi 20-40 lety – tedy době, kdy se u některých mohou objevit první známky lehké kognitivní poruchy. Distribuce plaků je nerovnoměrná a nejvíce jich najdeme v oblasti kortexu (Jackson et al., 2013). V důsledku toho se u modelu objevuje astroglióza a mikroglióza a dystrofie neuritů. (Alzforum, n.d.). Amyloidové plaky bychom objevili také v sítnicích těchto myší, kde vedou k angiopatii

a drobným krvácením – autoři studie však poukazují na skutečnost, že projev retinopatie spíše zdůrazňuje omezenou transferabilitu výsledků získaných z tohoto modelu na lidské pacienty (Chintapaludi et al., 2020).

Tyto patologické změny se zcela očekávatelně odráží na behaviorálním fenotypu zvířat. Spolu s histopatologickými změnami lze pozorovat ve 4 měsících již první narušení prostorové paměti v Morrisově vodním bludišti (angl. *Morris water maze* – MWM) (Jardanhazi-Kurutz et al., 2010). Ve věku okolo 10 měsíců jsou patrné deficity jak v dlouhodobé, tak krátkodobé paměti (Su et al., 2023; Zhang et al., 2016, León, 2023). Podobné výsledky poskytuje také analogický test bludiště Barnesové (León et al., 2023).

Zhoršení dlouhodobé paměti u modelu APP^{swe}/PSEN1^{dE9} potvrzuje také test spontánního rozeznání nového objektu, kde se deficit projevil ve věku 10 měsíců (Su et al., 2023) a 12 měsíců (Jardanhazi-Kurutz et al., 2010). Většina dosud provedených studií byla zaměřena právě na paměťové úlohy spíše než na testy úzkostnosti či explorační.

1.5. O myších a lidech: Omezení myších modelů

Myší modely jsou mocným nástrojem pro výzkum v oblasti medicíny a biologických věd. Rychle a dobře se množí, jsou nenáročné na péči a vykazují chování, které můžeme s trochou představivosti pozorovat u lidí – jde o savce vykazující sociabilitu, zvědavost, hravost. Mezi těmito druhy však panují také výrazné rozdíly, které v textu této povahy není třeba rozebírat. A tyto rozdíly mohou být odpovědí na otázku, proč se na poli léčby AD setkáváme jen s velmi omezenými úspěchy, přestože výsledky testů využívajících zvířecí modely vypadají nanejvýš nadějně (Drummond et al., 2016).

Ačkoliv se prezentované modely liší v původu a genetických modifikacích, jedná se z drtivé většiny o modely familiální Alzheimerovy choroby založené na mutaci v genech pro APP či PSEN – tedy formě, která představuje podle většiny zdrojů pouze 5-10 % diagnostikovaných případů (Bártová et al., 2011). Což znamená, že máme k dispozici desítky myších a jiných animálních modelů, které ovšem nemohou zcela vysvětlit více než 90 % případů představujících sporadickou formu AD.

Dalším zásadním omezením je komplexnost patologie lidské AD, kterou jsme již zdůraznili v předchozích kapitolách. Významná část modelů (viz Kapitola 1.3.) však pracuje

pouze s jedním či dvěma mechanismy patogeneze, a tudíž nemůžeme říci, že modelové organismy „mají Alzheimerovu nemoc“ (více v Drummond et al., 2016).

Kapitolu však zakončíme o něco pozitivněji – tato omezení nebereme na lehkou váhu a pokračuje snaha o vytvoření opravdu komplexního zvířecího modelu který by lépe odpovídal realitě. Zároveň nemůžeme popřít, že vyjmenované modely a celá řada těch, na které v rámci této diplomové práce nezbývá prostor, významně přispěly k pochopení patologie Alzheimerovy demence, a není tedy třeba je zcela zatracovat.

2 PARVALBUMINOVÉ INTERNEURONY

V předchozí kapitole jsme si nastínili průběh a potenciální příčiny Alzheimerovy choroby, která stále představuje terminální diagnózu a obrovskou zátěž pro společnost. Abychom se jednoho dne mohli konečně dobrat léku, musíme nejdříve chorobu pochopit – jak postupuje? Jak souvisí chování pacienta s patogenetickými mechanismy? Jak ovlivňuje jednotlivé skupiny neuronů? Cílem mé diplomové práce je prozkoumat úlohu **parvalbuminových interneuronů (PVI)**.

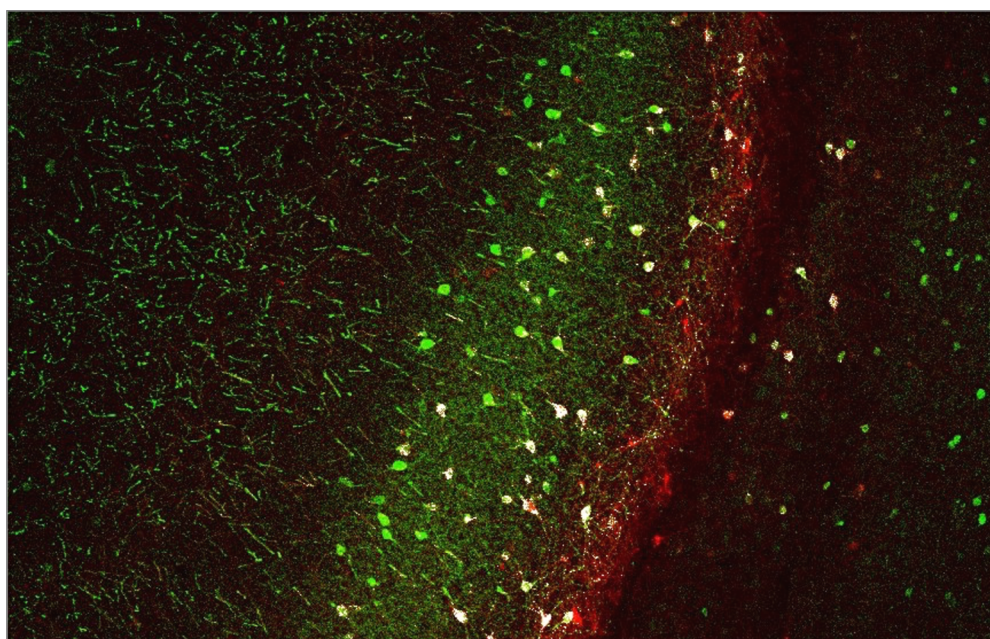
Parvalbumin patří, podobně jako kalbindin, kalretinin či troponin-c mezi proteiny schopné vázat vápník, a kromě CNS bychom jej našli také ve svalech (Celio & Heizmann, 1981). V PV knock-outových myších modelech pozorujeme výrazné odchylky v chování – zhoršenou sociabilitu a schopnost komunikovat s ostatními jedinci, a zároveň určitou rigiditu v řešení úloh a repetitivní chování, což koresponduje s chováním typickým pro autismus (Wöhr et al., 2015).

Z hlediska klasifikace dle neurotransmiterů jsou všechny PV interneurony GABAergní a tedy inhibiční, ve všech GABAergních interneuronech však PV exprimován není (Cowan et al., 1990 in Klausová, 2022). Dělíme je na dva typy, které rozlišujeme podle lokalizace jimi vytvářených synapsí (Lewis et al., 2012):

- **Svícnové buňky (chandelier cells)** – vytváří axo-axonální synapse s iniciálními segmenty pyramidových buněk
- **Košíčkové buňky (basket cells)** – inervují těla a proximální dendrity pyramidových neuronů

Pro účely této diplomové práce však není morfologické členění PV interneuronů zcela podstatné a více se mu tedy věnovat nebudeme.

Co je však naprosto nezbytné zmínit, je výjimečná rychlost série akčních potenciálů, kterou u těchto neuronů pozorujeme. Vděčí za to mnohým adaptacím umožňujícím rychlý a precizní výlev GABA – jmenujme například velmi malou vzdálenost presynaptických vápníkových kanálů a senzorů vápníku (Bucurenciu et al., 2008). PVI jsou na rozdíl od ostatních interneuronů částečně myelinizovány a demyelinizace vede k zhoršení kvality signálu (Dubey et al., 2022). PV interneurony také jako jediný typ interneuronů formují autapse (synapse sám se sebou). Jejich účelem je zřejmě výrazná modulace aktivity celé dané neuronové sítě (Deleuze et al., 2019)



Obr. 3: Snímek z histologické analýzy našich vzorků zobrazující obarvené PVI ventrálního hipokampu (mCherry a Invitrogen A32731, konfokální mikroskop Leica SP8). Červená barva značí přítomnost viru nesoucího DREADDs, zelená PVI. Překrytí těchto barev značí úspěšnou expresi DREADDs v parvalbuminových interneuronech (viz kapitola 2.2 a 4.2).

2.1. Význam parvalbuminových interneuronů

Zmíněná unikátní morfologie spolu se schopností produkce série velmi rychlých akčních potenciálů činí z PVI významné koordinující buňky. Jejich dendrity prostupují více neuronálními vrstvami (viz obr. 3) – v hipokampu může jeden PV interneuron navázat synapse až s 1100 pyramidovými buňkami (Booker et al., 2018). Jednou z důležitých funkcí PVI je udržování rovnováhy mezi excitací a inhibicí a změna jejich funkce narušuje vznik dlouhodobé potenciace – jevu, který je zcela zásadní pro učení a paměť (Nanou et al., 2018).

Nejvýraznějším projevem synchronizační aktivity PVI jsou tzv. gama oscilace o frekvenci 30-120 Hz, které můžeme pozorovat na EEG zejména, provozuje-li pacient či zvíře kognitivně náročnější aktivitu (př. Howard, 2003). Jestliže PVI ovlivníme např. pomocí optogenetiky, můžeme tyto oscilace významně modifikovat (Cardin, 2009; Sohal, 2009). Narušené gama oscilace však nejsou pouze laboratorní záležitostí, ale provázejí i některá duševní onemocnění; typickým případem je schizofrenie (Lewis et al. 2012).

Připomeňme si, že mezi obecně nejznámější projevy schizofrenie patří bludy a halucinace, které nazýváme pozitivními příznaky (které zpravidla dokáže vyřešit medikace). Jako negativní příznaky označujeme emoční oploštělost, hypoaktivitu a ve vzácných případech až katatonii. Další příznaky zahrnují zejména kognitivní deficit a změny v sociálním chování. Zejména negativní a kognitivní příznaky komerčně dostupná léčba spolehlivě potlačit stále nedokáže (Klausová, 2022).

Kromě gama oscilací se PVI podílejí také na vzniku theta oscilací a také tzv. „ripples“, které se na EEG projevují jako krátké úseky o podstatně vyšší frekvenci. Jedná se o projev komunikace hipokampu a kortexu, zcela nezbytný pro konsolidaci paměti (Xia et al., 2017). Zajímavým pokusem byla chemogenetická inhibice PVI po behaviorálním testu se strachovým podmiňováním. Tento zásah způsobil narušení této komunikace a ke konsolidaci vzpomínky nedošlo. Po konsolidaci, nebo během vybavení vzpomínky již neměla inhibice PV interneuronů na chování zvířete žádný vliv (Xia et al., 2017).

Deng a kolegové (2019) přináší důkaz, že PVI hrají významnou roli také v sociálním chování – konkrétně interneurony ventrálního hipokampu jsou zřejmě zodpovědné za rozpoznání neznámých lidí (či myší) od těch, které již známe. Zde jejich úloha spočívá zřejmě ve vybavení informace ze sociální paměti.

2.2. Chemogenetika

V neurovědách, stejně jako ve fyziologii, je obvyklým postupem zkoumání významu nějaké struktury či genu tím, že je vyřadíme z funkce a sledujeme vliv na organismus. Pro účely výzkumu v neurovědách však potřebujeme precizní zacílení – třeba výhradně na určitou populaci neuronů. To nám umožňují právě **chemogenetické metody**, které kombinují poznatky z molekulární biologie a chemie. Zde se setkáváme se dvěma zkratkami: **RASSL a DREADD**.

RASSL (angl. *Receptor activated solely by synthetic ligand*) volně překládáme jako receptory aktivované pouze syntetickým ligandem, jsou v podstatě předchůdcem DREADDs. Coward a kolegové (1998) se pokusili o syntézu těchto receptorů modifikací extracelulárních úseků opioidního receptoru spřaženého s G-proteinem. Tato modifikace zabránila aktivaci receptoru pomocí peptidových ligandů, malé molekuly však mohly signalizovat dále. Tyto ligandy však vykazovaly afinitu i k jiným typům nativních receptorů, což je činí prakticky nepoužitelnými pro *in vivo* studie.

DREADD (množné číslo DREADDs) – „designer receptors activated by designer drugs“ – jsou umělé receptory aktivované umělou látkou. Jde o receptory, které zavádíme do nervových buněk. Zásadní je, aby takový receptor nereagoval s žádným z endogenních ligandů, ale pouze s námi vybranou látkou, která ovšem také nesmí reagovat s žádnými jinými receptory. Pro tyto účely využíváme mutované lidské hM3Dq (excitační) and hM4Di (inhibiční) muskarinové receptory spřažené s G proteinem. Místo nativního acetylcholinu se začal využívat klozapin N-oxid (CNO) (Gomez et al., 2017).

Mechanismus funkce DREADDů nějakou dobu nebyl známý, zejména také proto, že specifická vazba radioligandem značeného CNO k DREADD je prakticky nulová. Gomez a jeho tým (2017) se proto zaměřili také na specifickou vazbu značeného klozapinu, který se k umělým receptorům vázal velice ochotně, a to v různých typech tkáně. Ukázalo se, že inertní klozapin n-oxid se *in vivo* vlivem metabolických procesů konvertuje právě na klozapin, který funguje jako ligand k DREADDům (McLaren, 2016). Jelikož však samotný klozapin má vazbu i na jiné receptory v mozku, preferuje se v současné době látka Compound 21 (C21), která má obdobné účinky na DREADDs jako CNO, ovšem je mnohem specifičtější (Thompson et al., 2018).

Následuje další krok – zavedení těchto umělých receptorů do cílových buněk. K dosažení *in vivo* exprese využíváme injekci adeno-asociovaných virů přímo do zvolené oblasti mozku zvířete za použití stereotaxické chirurgie. Možné je využití transgenních modelů, u kterých jsou DREADDs již exprimované (Addgene, n.d.).

2.3. Parvalbuminové interneurony a Alzheimerova choroba

Jak nám předchozí podkapitoly ukázaly, PV interneurony hrají výraznou roli v integračních a kognitivních procesech, jelikož jejich unikátní vlastnosti jim umožňují koordinaci neuronových sítí v mozku a udržování rovnováhy mezi excitací a inhibicí. Není proto překvapením, že u pacientů s AD je jejich funkce narušena, což se projevuje mimo jiné i charakteristickým kognitivním deficitem.

V předchozích kapitolách jsme zdůraznili důležitost rovnováhy excitace a inhibice v CNS. Ta je však u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou výrazně narušena a dochází k destabilizaci neuronových sítí. Ta vede u myších modelů až k hypersynchronizaci a epileptoformní aktivitě (Verret et al., 2012).

Jednu z dalších pozorovatelných změn najdeme na EEG záznamu, a to zesílení aktivity v pásmu gama (Wang et al., 2017) i theta (Czigler et al., 2008). Změny pozorujeme také ve frekvencích alfa, beta a delta (Buchan et al., 1997); Goutagny a Krantic (2013) navrhuje, že by tyto odchylky v oscilacích mohly patřit mezi rané biomarkery AD. Změna funkce neuronových sítí a synchronní aktivity neuronů CNS se prokazatelně objevuje jak u lidských pacientů, tak u zvířecích modelů (Hijazi et al., 2020).

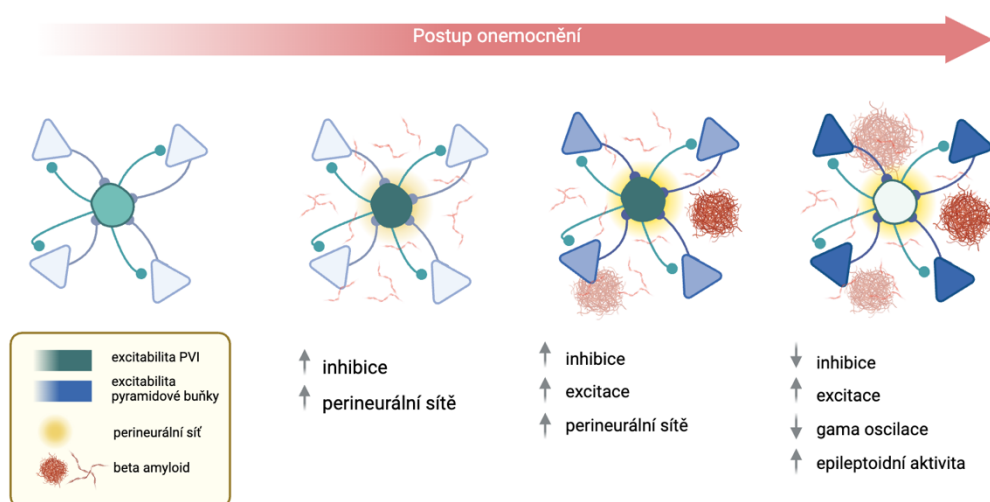
Jak funguje mechanismus poškození PVI v Alzheimerově chorobě?

Sara Hijazi a kolegové (2020) využili APP/PSEN1 myší model. První kognitivní deficity (testováno v Morrisově vodním bludišti) se objevují u těchto zvířat v 16 týdnech (tedy cca 4 měsících), kdy jsou pozorovatelné také amyloidové plaky. Výsledky jednoznačně ukazují na zvýšenou excitabilitu PVI, což se projevilo deficitem v prostorové paměti zvířat. Následný chemogenetický zásah za účelem inhibice PVI vedl k výraznému zlepšení výkonu zvířat.

S postupem onemocnění se však poměry excitace a inhibice postupně mění (obr. 4). U šestiměsíčních zvířat se rovnováha vychyluje ve prospěch excitace, kdy aktivita parvalbuminových interneuronů klesá, což se opět projevilo zhoršením paměti v MWM. Tentokrát to byla chemogenetická excitace PVI, která výkon zvířat výrazně zlepšila, což napovídá významné roli nepoměru excitace a inhibice v kognitivním deficitu spojeném

s Alzheimerovou chorobou. Zajímavé je, že tento výkyv rovnováhy excitace a inhibice se odehrává v průběhu pár týdnů (Hijazi et al., 2020).

Zde se v této práci objevuje nový pojem – perineurální síť. Jedná se o speciální typ extracelulární matrix přítomný v CNS, obklopující určité druhy neuronů včetně PVI. Jedná se o dlouho podceňovanou strukturu, ale ukázalo se, že hrají důležitou roli například při uzavírání kritických period vývoje mozku. Jedním z důsledků jejich formace je však pokles neuroplasticity, což má důsledky pro paměť (více v Klausová, 2022). Jestliže se v mozku začíná objevovat β -amyloid, hustota perineurálních sítí okolo PVI narůstá. Jejich narušením je možné deficity v paměti v rané fázi patologie zmírnit (Végh et al., 2014). Některé studie naopak pracují s myšlenkou, že perineurální síť neurony před β -amyloidem chrání (Miyata et al., 2007; Brückner et al., 1999, citováno v Klausová, 2022).



Obr.4: Změny v excitabilitě parvalbuminových a pyramidových neuronů v průběhu AD. Vytvořeno v softwaru Biorender.com, adaptováno z Hijazi et al. (2020)

Úlohu hyperexcitability hipokampálních PVI v patologii AD potvrzuje výzkum provedený na myších divokého typu. Chemogenetickou aktivací výzkumníci uměle navýšili excitabilitu parvalbuminových interneuronů, což i zde vedlo k narušení prostorové paměti. Tento deficit postupně mizí, jelikož narůstá excitabilita pyramidových neuronů. Ukázalo se však, že v tomto po injekci β -amyloidu dojde k výraznému poškození obou typů buněk. To

vede k návratu paměťových deficitů. Je tedy prokázáno, že hyperexcitabilita vede k významnému nárůstu zranitelnosti parvalbuminových interneuronů (Hijazi et al., 2020).

Je zřejmé, že parvalbuminové interneurony představují významnou populaci, která se podílí na koordinaci kognitivních procesů. Důkladné zkoumání změn jejich funkce související s touto patologií je rozhodně na místě – třeba právě zacílení PVI při léčbě Alzheimerovy choroby bude významným milníkem v historii lékařství.

CÍLE PRÁCE A VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Tato práce se zabývá dvěma výzkumnými problémy:

1. **Behaviorální fenotyp APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myši** – naším cílem je pomocí baterie standardizovaných behaviorálních protokolů popsat chování těchto zvířat a porovnat s jedinci divokého typu (respektive jedinci s AD negativním fenotypem). Sledujeme zejména míru anxiety a potenciální změny v sociálním chování těchto myši. Testujeme také míru prepulzní inhibice, abychom odhalili případné změny v senzomotorickém gatingu. Výsledky z těchto testů poslouží jako standard pro laboratoř Oddělení neurofyziologie paměti při FGÚ AVČR.
2. **Úloha parvalbuminových interneuronů v AD** – provádíme chemogenetický experiment s potomky APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myši a PV-Cre myši a pomocí behaviorálních testů sledujeme sociální chování a změny v senzomotorickém gatingu. Pomocí adeno-asociovaných virů zavádíme DREADDs do oblasti ventrálního hipokampu (který je zcela zásadní pro sociální paměť – viz Deng et al., 2019), kde se díky Cre rekombináze následně exprimují pouze v PVI, které pomocí nich můžeme aktivovat. Části myši aplikujeme C21 a kontrolní skupině aplikujeme fyziologický roztok. V každé ze skupin jsou zastoupena zvířata s AD⁺ genotypem i divoký typ.

Celá experimentální studie proběhla se souhlasem resortní komise Akademie věd ČR a v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Tato směrnice přikazuje minimalizaci utrpení zvířat, prosazení použití alternativní metody k testu na zvířatech (je-li to možné), etické usmrcení zvířat, použití co nejmenšího počtu zvířat atd. (viz “Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU).

PRAKTICKÁ ČÁST

V následující části se věnujeme samotnému získávání dat a práci s nimi. Pro přehlednost uvádíme vysvětlení některých označení, se kterými budeme pracovat.

- **APP/PSEN1 – APP^{swe}/PSEN1^{dE9}**, kmen Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo
- **AD⁺** - *APP/PSEN1* myš pozitivní na AD, obsahuje oba vnesené geny APP^{swe} a PSEN1^{dE9}, jsou přítomny amyloidové plaky
- **AD⁻** - *APP/PSEN1* myš bez přítomnosti projevů AD, odpovídá divokému typu, kontrola
- **PVcre-AD⁺** - *APP/PSEN1* myš exprimující Cre rekombinázu pozitivní na AD, obsahuje oba vnesené geny APP^{swe} a PSEN1^{dE9}, jsou přítomny amyloidové plaky
- **AD⁻** - *APP/PSEN1* myš exprimující Cre rekombinázu bez přítomnosti projevů AD, odpovídá divokému typu, kontrola
- **PV-cre myš** - myš exprimující pouze Cre rekombinázu, jiná linie, není objektem této studie

3 VÝZKUMNÝ VZOREK

- **Model APP^{swe}/PSEN1dE9** – využíváme dvě skupiny, tedy myši s AD (označujeme AD⁺) a bez AD (AD⁻). Při množení tohoto modelu zhruba v polovině případů vznikají potomci nesoucí oba mutantní geny spojené s patologií AD, u druhé poloviny se však tyto geny nevyskytují, a tudíž mohou posloužit jako kontrolní skupina.

Věk	Pohlaví	<i>n</i> (AD ⁺)	<i>n</i> (AD ⁻)
6 měsíců	♂	9	10
	♀	11	9
10 měsíců	♂	7	7

Tab. 2: výzkumný soubor pro výzkum behaviorálního fenotypu APP^{swe}/PSEN1dE9

- **Kříženci APP^{swe}/PSEN1dE9 x PVcre** – Tyto myši exprimují Cre rekombinázu v PVI. Používáme opět dvě skupiny, přirozeně vznikající křížením. Tyto skupiny ještě dělíme podle aplikované látky (Tab. 3). Všechna zvířata byla desetiměsíční.

Pohlaví	Genotyp	<i>n</i> (C21)	<i>n</i> (NaCl)
♂	PVcre-AD ⁺	14	10
	Pvcre-AD ⁻	11	15
♀	PVcre-AD ⁺	7	5
	PVcre-AD ⁻	7	6

Tab. 3: Výzkumný soubor pro chemogenetický experiment s APP^{swe}/PSEN1dE9 x Pv-cre.

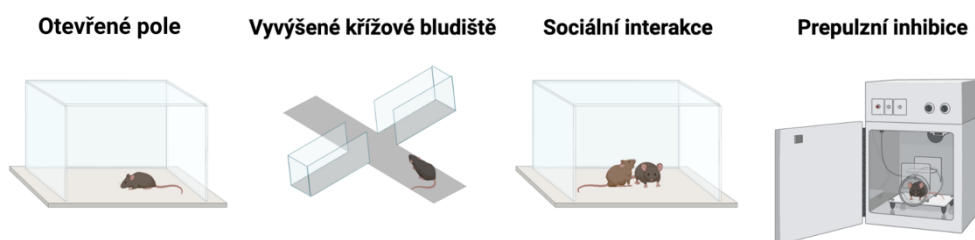
Všechna zvířata byla chována v akreditované místnosti se stálou teplotou (23 ± 2°C) s neomezeným přístupem k vodě a potravě s udržovaným cirkadiánním rytmem (12h/12h světlo/tma). V místnosti byla udržována stálá vlhkost vzduchu. Všechny experimenty probíhaly ve světlé fázi dne.

4 METODY

4.1. Behaviorální testy

U APP/PSEN1 skupiny jsme prováděli baterii behaviorálních testů skládající se z testu otevřeného pole (angl. *open field test*), vyvýšeného křížového bludiště, testu sociálních interakcí a základní variantu testů sociability a sociální diskriminace.

Chování zvířat jsme zaznamenávali prostřednictvím kamery (Logitech, rozlišení 1920x1080) umístěné nad experimentální aparaturou. Záznamy byly ukládány ve formátu mp4 a analyzovány později. K hodnocení záznamů jsme využili software Noldus Ethovision XT-17, umožňující automatizovanou detekci pohybu zvířete v aréně a vyhodnocení základních lokomočních parametrů.



Obr. 5: Schematické vyobrazení aparatur využíváných v behaviorálních testech s modelem APP^{swc}/PSEN1^{dE9}. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

4.1.1 Test otevřeného pole (*open field* - OF)

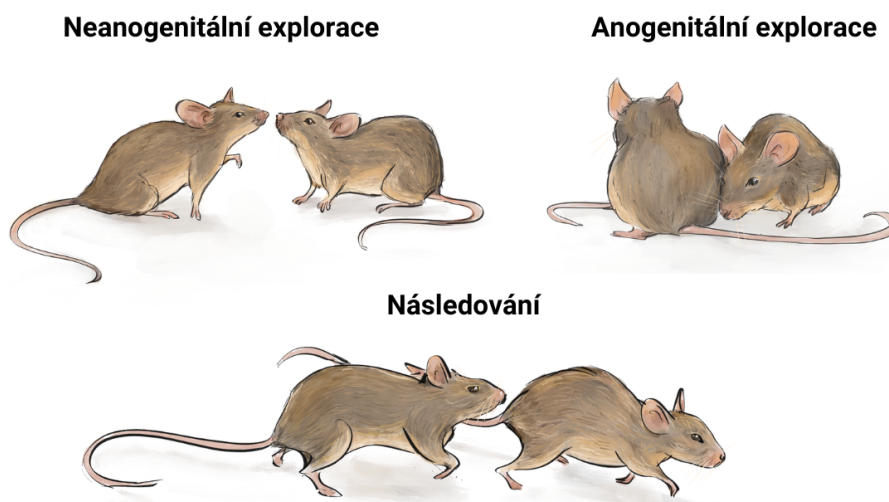
Tento běžně užívaný typ testu nám umožňuje zkoumat míru explorační a úzkostnosti zvířat na základě sledování jejich pohybu v otevřené prázdné pokusné aréně, v našem případě ve tvaru čtverce. Méně explorativní zvířata nachodí menší vzdálenost, úzkostnější zvířata se navíc vyhýbají středové oblasti a tráví v ní méně času. Test trvá 5 minut a využili jsme arénu o rozměrech 49x49 cm a výšce 30 cm, aréna je vyrobena z bílého neprůhledného plastu.

4.1.1 Vyvýšené křížové bludiště (Elevated plus maze – EPM)

Tento test dokáže ještě lépe detekovat úzkostnost, neboť staví do kontrastu „bezpečná“, uzavřená ramena s rameny otevřenými, tedy exponovanými vůči potenciálnímu nebezpečí, z nichž myš může navíc vidět, že se nachází poměrně vysoko nad zemí. Úzkostnější myš bude po delší dobu schovaná v uzavřeném rameni, zatímco „odvážnější“ myš se po bludišti pohybuje s podstatně vyšší sebejistotou a „riskuje“ i vstup do otevřených ramen bludiště. Test probíhal 10 minut. Průměr bludiště je 65 cm, výška nad zemí 44 cm, výška stěn uzavřených ramen je 16,5 cm, šířka ramen 8 cm, vyrobeno je z šedého neprůhledného plastu.

4.1.2 Sociální interakce (SIT)

Využíváme stejnou arénu jako k testu otevřeného pole, avšak vložíme k testované myši jinou myš (se kterou se nikdy dříve nesečkala). Arénu snímáme po dobu deseti minut a následně hodnotíme čas, který myši tráví anogenitálním a nenanogenitálním čicháním a následováním druhého jedince (Obr. 6). Hodnoceno ručně pomocí freewaru BORIS v7.10.5.



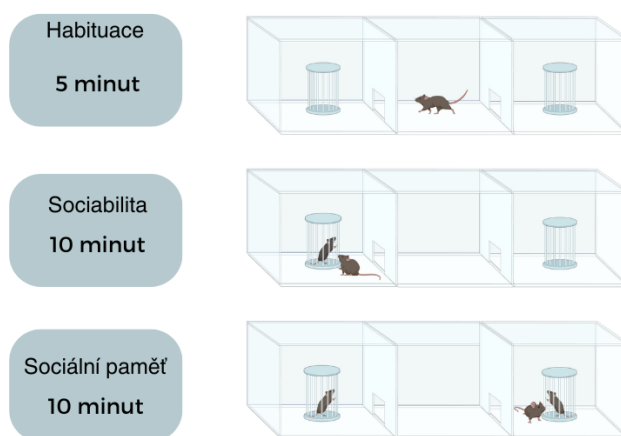
Obr. 6: Hodnocené chování v SIT. Vlastní ilustrace.

4.1.3 Test tří komor (*Three chamber test*)

Tento test provádíme v aréně přehrazené dvěma ručně ovládanými přepážkami, které tak vytváří tři komůrky (viz obr. 7). Rozměry arény jsou 53x33x20 cm, vyrobena je z bílého neprůhledného plastu. Do krajních komor umístíme kovové klíčky o průměru 8 cm s neprůhlednými víčky, do kterých můžeme vložit jinou myš. Komůrky můžeme libovolně uzavírat a otevírat. Test je poměrně variabilní, a proto jsme využili několik obměn:

- **Test sociability** – Do jedné z krajních komor umístíme klíčku s neznámou myší, do druhé komůrky prázdnou klec. Sledujeme, zda se testovaná myš zajímá o jiného jedince více než o neživý objekt.
- **Test sociální paměti** (angl. *social novelty*) – Tentokrát využíváme myš z testu sociability, ale do druhé klíčky přidáme po uplynutí námi zvolené doby (pro účely této práce 10 minut a 24 hodin) novou, dosud neznámou. Sledujeme, zda myš preferuje neznámého jedince před již familiárním – předpokládáme, že vlivem přirozené zvědavosti myši bude testovaný jedinec preferovat neznámou myš před již známou. V případě chybějící preference se může jednat o projev deficitu v sociální paměti.

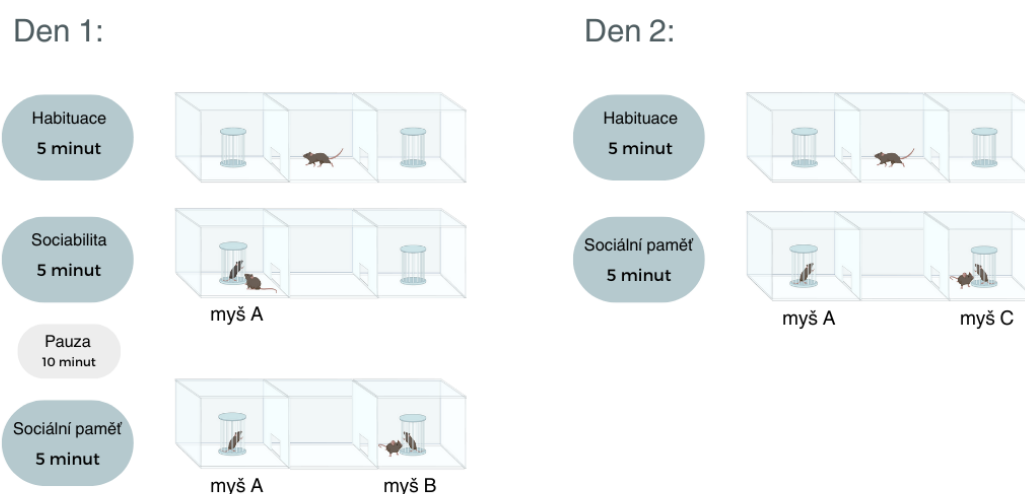
Design 1: APPswe/PSEN1dE9



Obr. 7: Schéma základní varianty tříkomorového testu vyzkoušeného u APPswe/PSEN1dE9. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

Ukázalo se, že pro naše účely nebyla základní varianta testu (obr. 7) zcela dostačující, jelikož testovala sociální paměť bezprostředně po fázi sociability, a nikoliv po uplynutí nějakého časového úseku. Rozhodli jsme se tedy test obměnit a rozšířit tak, abychom mohli testovat nejen krátkodobou, ale i dlouhodobou paměť – zkoumáme, zda je testovaná myš schopná rozeznat familiární myš z předchozího dne od zcela neznámé myši. Schéma této úpravy experimentu rozvádí obr. 8.

Design 2: Úprava pro chemogenetický experiment



Obr. 8: Schéma rozšířené dvoudenní varianty tříkomorového testu. Oproti základní variantě je zde navíc druhý testovací den se zcela novou myší, umožňující nám zkoumat dlouhodobou sociální paměť. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

4.1.4 Prepulzní inhibice (PPI)

Prepulzní inhibicí rozumíme jev, kdy slabší stimulus (zvaný prepulz) tlumí následnou úlekovou reakci po prezentaci „startlového“ podnětu – česky bychom mohli říci podnětu působícího úlekovou reakci. Jde o zcela přirozený jev a jeho narušení značí možnou patologii v tzv. senzomotorickém gatingu – schopnosti mozku filtrovat irelevantní sensorické stimuly a zaměřit se pouze na ty významné. Typickým příkladem narušené prepulzní inhibice jsou zejména pacienti se schizofrenií, ale také například lidé trpící obsedantně-kompulzivní poruchou (Kohl et al., 2013).

Využíváme aparaturu od firmy Med Associates Inc. a software Startle Reflex vyvinutý stejnou firmou na míru použité aparatuře. Využili jsme doporučený standardní krátký protokol trvající 6 minut, zahrnující sérii akustických úlekových podnětů s prepulzou i bez nich. Jako prepulzou jsme využili čisté tóny o frekvencích 4 kHz, 12 kHz a 20 kHz a o délce trvání (10 ms). Jako úlekový podnět sloužil krátký pulz (10 ms) bílého šumu o intenzitě 100 dB. Prepulzní podnět byl aplikován vždy 100 ms před samotným úlekovým podnětem. Každé sezení začalo 60 s dlouhou habituací bez jakékoliv zvukové stimulace. Následovalo 55 jednotlivých pokusů oddělených náhodně dlouhým intervalem v rozmezí 3-8 s. Pokusy byly rozděleny do dvou bloků. V prvním byly náhodně kombinovány expozice pouze úlekovému podnětu (celkově 16x) a úlekovému podnětu s prepulzou – buď 4 kHz, 8 kHz nebo 20 kHz (každá frekvence 8x). V druhém bloku byla zvířata exponována pouze úlekovému podnětu, a to v náhodné posloupnosti intenzit – 70 dB, 80 dB, 90 dB (každá intenzita 5x). Tato část sloužila k ověření závislosti úlekové reakce na intenzitě podnětu. Následně hodnotíme procento útlumu reakce na *startle* způsobené prezentací prepulzou. Výslednou hodnotu počítáme v procentech dle vzorce:

$$\% PPI = \frac{1 - (\text{reakce s prepulzou} - \text{reakce bez prepulzou})}{\text{reakce bez prepulzou}} \times 100$$

4.2. Chemogenetický experiment

Pro účely této práce využíváme křížence APP^{swe}/PSEN1^{dE9} x B6;129P2-*Pvalb*^{tm1(cre)Arbr/J} – Tato zvířata kromě genů APP^{swe} a PSEN1^{dE9} exprimují také Cre rekombinázu lokalizovanou v PVI, neboť její exprese je ovládána promotorem pro parvalbumin. Po dosažení věku 9 měsíců jsme provedli stereotaktickou operaci (viz obrázek 9) za účelem zavedení DREADDs pomocí virového vektoru AAV.

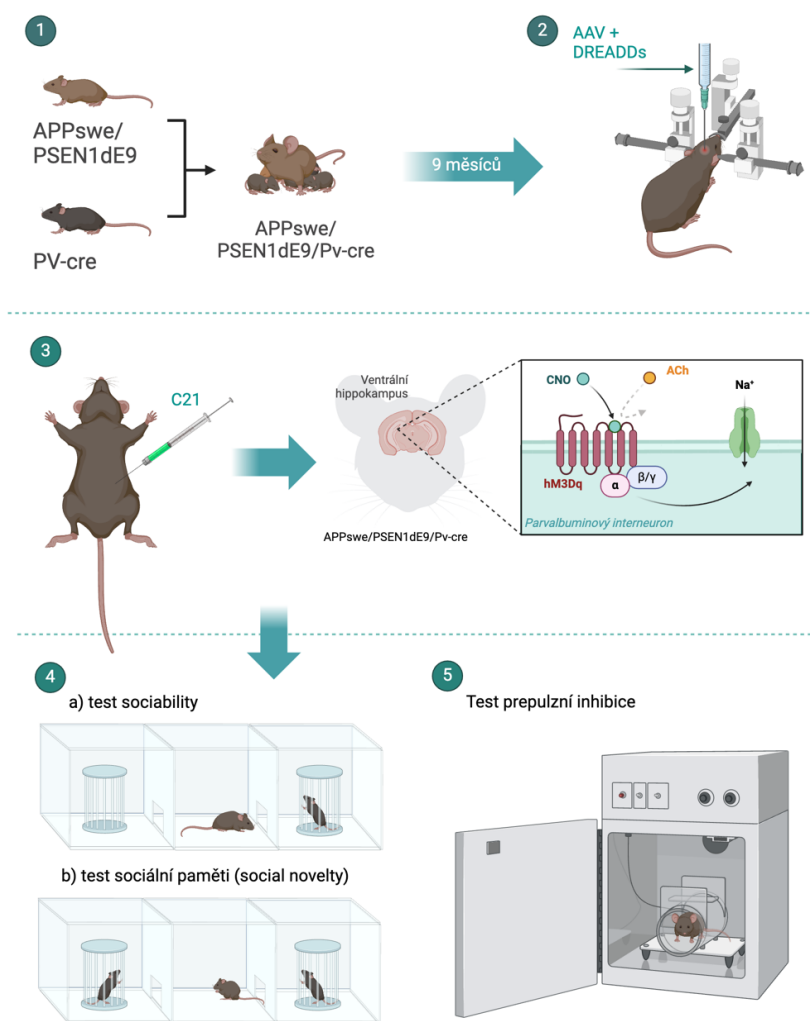
Zvířata byla uspána izofluranem (5 %) a udržována v této anestezii po celou dobu operace (1-2 %). Oči jsme ošetřili Vidisicem a přikryli buničinou, což sloužilo jako prevence potenciálního poškození světlem. Operační pole bylo oholeno a vydezinfikováno Betadinem. Místo incize bylo ošetřeno též Betadinem a bylo aplikováno lokální anestetikum

Mezokain (1 %). Do lebky byly nad úrovní ventrálního hipokampu bilaterálně vyvrtány otvory o průměru 1,5 mm.

Skrz kraniotomii jsme pomocí mikrostříkačky s tenkou jehlou (32 ga; Hamilton Inc.) ovládané mikropumpou UMP3 (WPI Inc.) injikovali do CA1 oblasti ventrálního hipokampu (stereotaktické souřadnice vzhledem k Bregmě: AP = -3,3, ML = ±3,2, DV = 4,3 mm) 300 nl AAV v koncentraci 10^{12} vg/ml obsahující Cre-dependentní DREADDS (Addgene, pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry) při rychlosti aplikace 20 nl/s. Oblast kraniotomie jsme ošetřili lokálním anestetikem (Mesocain, 10 mg/ml) a po zákroku zašili vstřebatelnými stehy. Okolí švu bylo ošetřeno znovu lokálním anestetikem a očištěno dezinfekcí.

Během operace jsme zvířatům podali 0,1-0,2 ml sterilního fyziologického roztoku a dle váhy zvířete analgetikum Rimadyl (50 mg/kg). Použitím tohoto analgetika se snížila míra bolesti zvířete, dokud zvíře nebylo schopné přijímat analgetikum podávané v pitné vodě (Nurofen - 100 mg/l). Následně jsme 5-6 týdnů vyčkali na zhojení ran a na dostatečnou expresi DREADDS. Bohužel, následkem operace čtyři zvířata uhynula.

U APP^{swe}/PSEN1^{dE9}/Pv-cre myši s exprimovanými DREADDs nás zajímal vliv aktivace PV interneuronů na sociabilitu a sociální paměť. Po předběžné analýze dat z experimentů s APP/PSEN1 myši, a na základě literatury poukazující na úlohu ventrálního, hipokampu ve zpracování PPI a důležitost PVI (Nguyen et al., 2014) jsme se rozhodli experiment rozšířit o test prepulzní inhibice (viz kapitola 4.1.4). Každému behaviorálnímu testu předcházela intraperitoneální aplikace injekčního roztoku (C21 nebo fyziologický roztok) 35 minut před začátkem experimentu.



Obr. 9: Schéma chemogenetického experimentu s APP^{swe}/PSEN1^{dE9}/Pv-cre. Vytvořeno v softwaru Biorender.com

4.3. Usmrcení a histologie

Po ukončení experimentu jsme myši uvedli do hluboké isofluranové anestezie a transkardiálně perfundovali 0,1 M roztokem PB a následně 4% roztokem paraformaldehydu. Vyjmuté mozky jsme skladovali v 30% roztoku sacharózy v 0,1 M PB. Po 4-5 dnech v této lázni byly mozky zmraženy pomocí suchého ledu a následně nakrájeny na koronální řezy o tloušťce 40 μm za použití přístroje Leica Cryostat. Takto připravené řezy jsme skladovali v kryoprotektivním roztoku o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Následně jsme provedli histologickou analýzu vzorku pro ověření, že se DREADDs exprimovaly podle plánu v oblasti ventrálního hipokampu. Samotné receptory jsou označeny barvivem mCherry a měly by být detekovatelné pomocí fluorescenční mikroskopie, ale při použité koncentraci byl signál slabý, a tudíž jsme jej museli zesílit.

Využili jsme imunohistochemických metod. Jako primární protilátku jsme využili Abcam ab62341 (králičí polyklonální anti-RFP, 1:1000) a inkubovali přes noc při $7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato protilátka se navázala na mCherry označující DREADDs. Druhý den jsme 3 hodiny inkubovali se sekundární protilátkou Invitrogen A32731 (anti-králičí Alexa Fluor Plus 488, 1:1000), který se jakožto sekundární protilátka navázal na primární protilátku a při excitaci modrým světlem fluoreskuje zeleně. K vyhodnocení jsme využívali mikroskop Olympus BX53 a konfokální mikroskop Leica SP8.

K následné statistické analýze využíváme pouze zvířata s takto histologicky potvrzenou bilaterální expresí DREADDs.

5 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

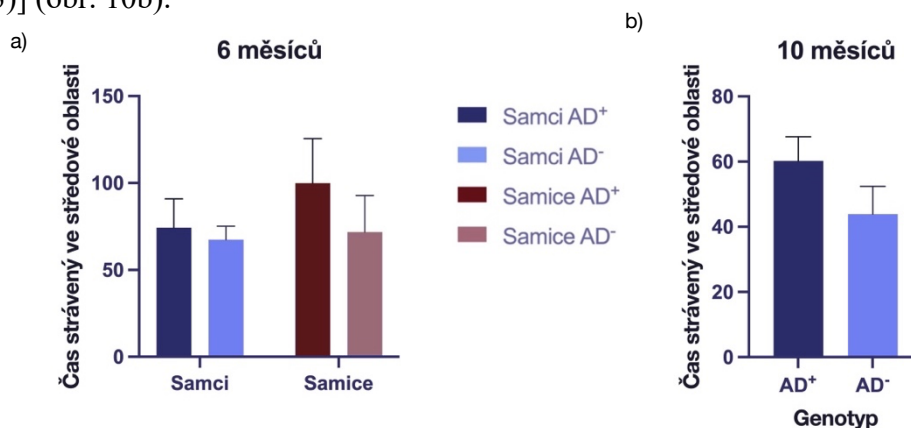
Pro přehlednost dělíme následující kapitoly do podkapitol odpovídajících jednotlivým částem studie. Není-li uvedeno jinak, k analýze dat byla využita dvoucestná ANOVA. Grafy zobrazují průměr a střední chybu průměru.

K vyhodnocení dat využíváme software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software LLC).

5.1. Behaviorální fenotyp APP^{swe}/PSEN1^{dE9}

5.1.1 Otevřené pole

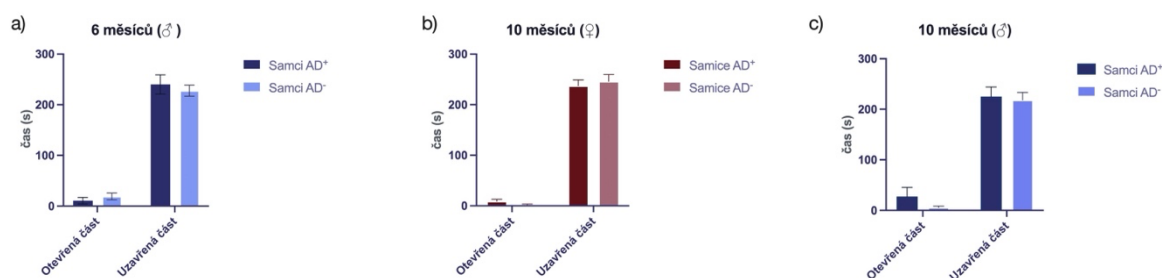
V OF sledujeme dobu strávenou ve středové oblasti arény. Statistická analýza ukázala, že mezi šestiměsíčními AD⁺ a AD⁻ nepozorujeme žádné rozdíly [F (1, 35) = 0,01495; p = 0,9034], ani vliv pohlaví [F (1, 35) = 0,01502; p = 0,9032] (obr 10a), vliv nemá ani interakce těchto faktorů [F (1, 35) = 0,2189, p = 0,6428]. Signifikantní rozdíly nepozorujeme mezi AD⁺ a AD⁻ ani u desetiměsíčních samců [nepárový t-test; t = 1,862; p = 0,0873] (obr. 10b).



Obr. 10: a) graf porovnávající čas strávený ve středové oblasti arény u šestiměsíčních zvířat. Nepozorujeme žádný výrazný rozdíl mezi genotypy u samců [n(AD⁺) = 9; n(AD⁻) = 10] ani u samic [n(AD⁺) = 11; n(AD⁻) = 9]. b) Graf porovnávající dobu strávenou ve středové oblasti u desetiměsíčních samců, kde pozorujeme slabý rozdíl mezi AD⁺ (n = 7) a AD⁻ (n=7) samci (p = 0,0873)

5.1.2 Vyvýšené křížové bludiště

V EPM hodnotíme čas strávený v otevřených ramenech a uzavřených částech bludiště. U šestiměsíčních zvířat statistická analýza (trojcestná ANOVA) neprokázala žádný vliv pohlaví [$F(1, 35) = 0,01429$; $p = 0,9055$], hodnotili jsme tedy každé pohlaví zvlášť pomocí dvoucestné ANOVY. U šestiměsíčních samců (obr. 11a) pozorujeme vysoce signifikantní preferenci uzavřené oblasti EPM [$F(1, 17) = 218,5$; $p < 0,0001$], avšak žádný rozdíl vlivem genotypu [$F(1, 17) = 0,09444$; $p = 0,7623$] ani interakce [$F(1, 17) = 0,4934$; $p = 0,4919$]. Výsledky testu u šestiměsíčních samic (obr. 11b) pak opět ukazují výraznou preferenci uzavřených ramen [$F(1, 18) = 534,3$; $p < 0,0001$] bez vlivu genotypu [$F(1, 18) = 0,02087$; $p = 0,8867$] ani interakce faktorů [$F(1, 18) = 0,5833$; $p = 0,4549$]. Vliv lokace v bludišti (otevřené/uzavřené rameno) v bludišti je z dat patrný, avšak pro experiment zcela irrelevantní. Žádné signifikantní výsledky nepotvrdila ani analýza dat od desetiměsíčních samců (nepárový t-test; $t = 0,09836$; $p = 0,9234$) (obr. 11c).

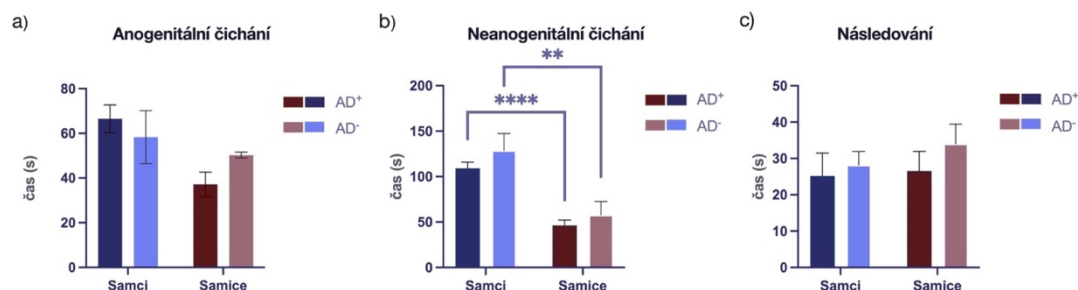


Obr. 11: Graf výsledků z vyvýšeného křížového bludiště – sledujeme čas strávený v otevřených ramenu a uzavřených ramenu bludiště **a)** u šestiměsíčních samců [$n(AD^+) = 8$; $n(AD^-) = 11$]; **b)** šestiměsíčních samic [$n(AD^+) = 11$; $n(AD^-) = 9$]; **c)** u desetiměsíčních samců [$n(AD^+) = 6$, $n(AD^-) = 7$]. Grafy v obou případech ukazují výraznou preferenci pobytu v uzavřených ramenech bez ohledu na genotyp či pohlaví.

5.1.3 Sociální interakce

Tento test jsme prováděli pouze u šestiměsíčních zvířat a sledovali jsme čas strávený následujícími aktivitami: anogenitální čichání, neanogenitální čichání a následování. Nepozorujeme vliv genotypu [$F(1, 23) = 0,05734$; $p = 0,8129$] ani pohlaví [$F(1, 23) = 3,321$; $p = 0,0814$], ani interakce obou faktorů [$F(1, 23) = 1,080$; $p = 0,3094$] u anogenitální explorace. Analýza neanogenitální explorace neprokázala vliv genotypu [$F(1, 23) = 1,174$; $p = 0,2899$] ani interakce [$F(1, 23) = 0,1000$; $p = 0,7547$], avšak významný vliv pohlaví [$F(1, 23) = 36,98$; ($**** p < 0,0001$)]. Posledním sledovaným parametrem byl čas strávený

následováním, kde nepozorujeme žádný vliv genotypu [$F(1, 23) = 0,7579$; $p = 0,3930$], ani pohlaví [$F(1, 23) = 0,3648$; $p = 0,5518$], ani interakce faktorů [$F(1, 23) = 0,1374$; $p = 0,7142$].



Obr. 12: Data získaná analýzou sociálních interakcí [samci: $n(AD^+) = 8$, $n(AD^-) = 9$; samice: $n(AD^+) = 7$, $n(AD^-) = 3$]: **a)** anogenitální čichání, kde nepozorujeme statisticky významné rozdíly ani vlivem pohlaví, ani vlivem genotypu; **b)** neanogenitální čichání, kde jak AD^+ samci tak AD^- samci čichali významně více (Post-hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl; ***** $p < 0,0001$); **c)** následování (following), kde nepozorujeme žádné rozdíly mezi skupinami.

5.1.1 Tříkomorový test

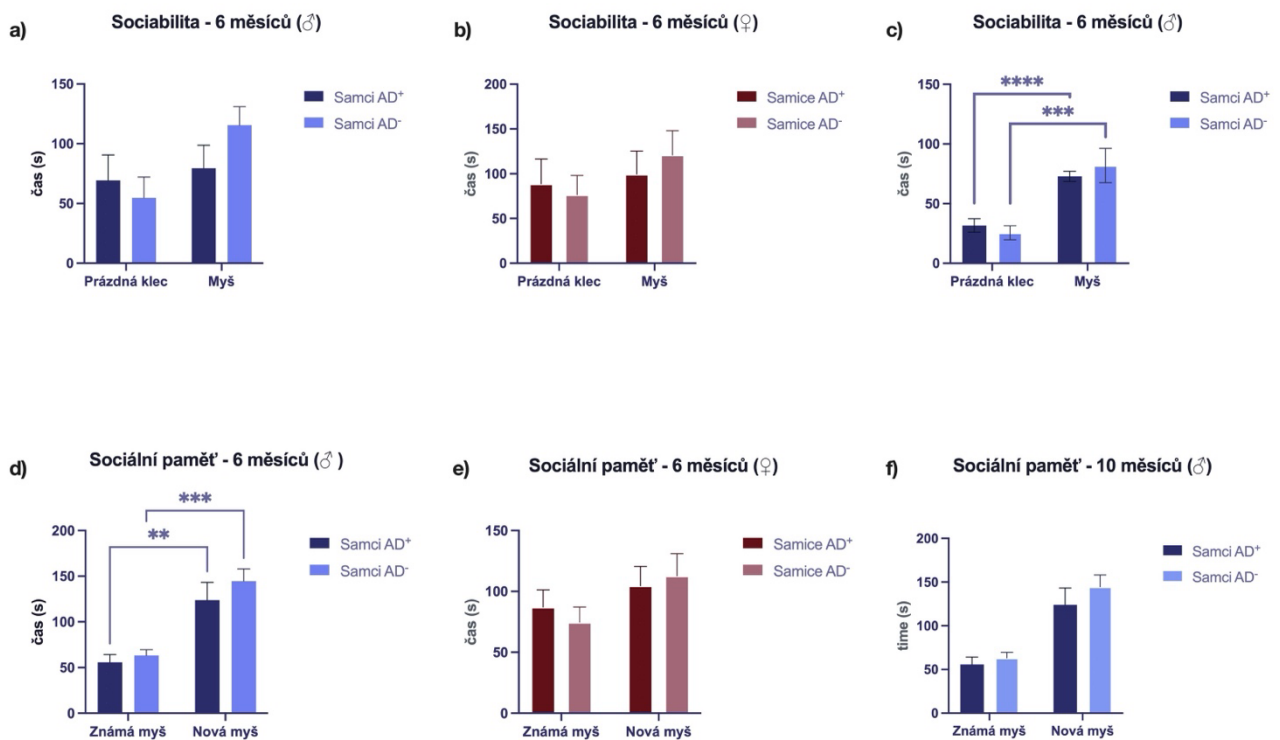
V designu pro APPswe/PSEN1dE9 myši (viz obr. 7) hodnotíme sociabilitu (čas strávený s jinou myší oproti času strávenému s prázdnou klecí) a sociální paměť (porovnáváme čas strávený s familiární myší oproti času strávenému s dosud neznámým jedincem).

Sociabilita: U šestiměsíčních zvířat jsme opět provedli trojitou ANOVU a zjistili nesignifikantní vliv pohlaví [$F(1, 28) = 3,160$; $p = 0,0863$], hodnotíme tedy samce a samice zvlášť. U šestiměsíčních samců (obr. 13a) nepozorujeme žádný vliv genotypu [$F(1, 14) = 0,5409$; $p = 0,4742$] ani rozdíly v preferenci myši a prázdné klíčky [$F(1, 14) = 2,364$; $p = 0,1464$], ani vliv interakce těchto faktorů [$F(1, 14) = 1,206$; $p = 0,2906$]. Výsledky šestiměsíčních samic (obr. 13b) jsou obdobné, kde nepozorujeme ani vliv genotypu [$F(1, 14) = 0,1495$; $p = 0,7048$], preferenci [$F(1, 14) = 0,6455$; $p = 0,4352$] ani vliv interakce [$F(1, 14) = 0,2406$; $p = 0,6314$].

U desetiměsíčních samců (obr. 13c) pozorujeme výraznou preferenci jiné myši oproti prázdné kleci [$F(1, 21) = 49,34$, ***** $p < 0,0001$], ale žádný prokazatelný vliv genotypu [$F(1, 21) = 0,1199$, $p = 0,7326$] ani interakce těchto faktorů [$F(1, 21) = 0,01615$; $p = 0,9001$].

Sociální paměť: U šestiměsíčních zvířat jsme opět provedli trojcestnou ANOVU a nepozorujeme vliv pohlaví [$F(1, 28) = 0,04032$; $p = 0,8423$], tedy opět hodnotíme samce a samice zvlášť. U šestiměsíčních samců (obr. 13d) významnou míru preference mezi myši v klíčkách [$F(1, 14) = 34,93$; $p < 0,0001$] bez vlivu genotypu [$F(1, 14) = 0,9042$; $p = 0,3578$] či interakce faktorů [$F(1, 14) = 0,2694$; $p = 0,6118$]. U šestiměsíčních samic (obr. 13e) žádnou preferenci nepozorujeme [$F(1, 14) = 2,832$; $p = 0,1146$], vliv nemá ani genotyp [$F(1, 14) = 0,02443$; $p = 0,8780$] či interakce faktorů [$F(1, 14) = 0,3931$; $p = 0,5408$].

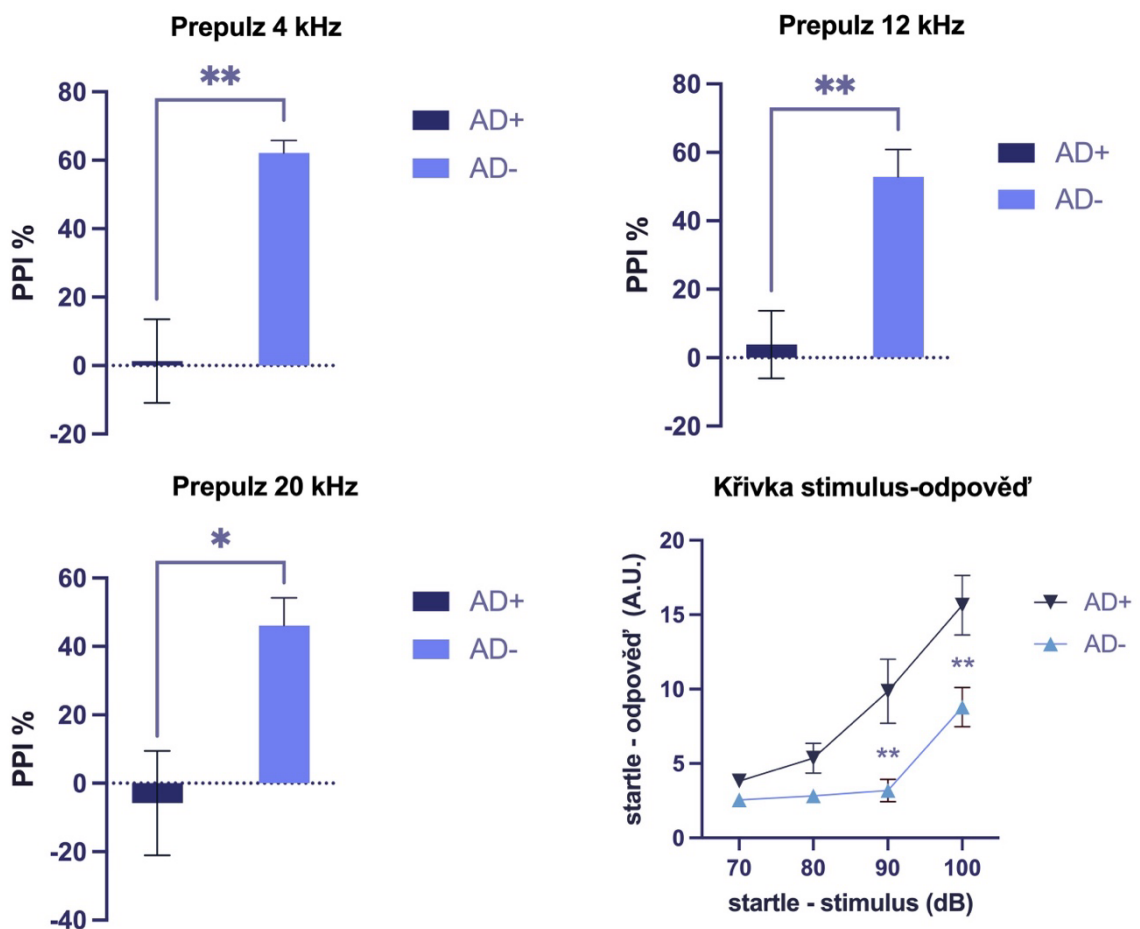
U desetiměsíčních samců se pak neprojevuje ani preference nového jedince [$F(1, 22) = 3,528$, $p = 0,0737$], ani významný rozdíl u jednotlivých genotypů [$F(1, 22) = 0,02215$, $p = 0,8831$] či interakce [$F(1, 22) = 0,3386$; $p = 0,5666$].



Obr. 13: **a)** sociabilita u šestiměsíčních samců [$n(AD^+) = 9$, $n(AD^-) = 7$] **b)** sociabilita u šestiměsíčních samic [$n(AD^+) = 8$, $n(AD^-) = 8$], **c)** sociabilita u desetiměsíčních samců [$n(AD^+) = 7$, $n(AD^-) = 7$], kde pozorujeme sociabilní chování u AD⁺ myši (Post-hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl; **** $p < 0,0001$) i AD⁻ (Post-hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl; *** $p = 0,0001$); **d)** sociální paměť u šestiměsíčních samců (n stejná jako v 13a), kde novou oproti známé myši preferují AD⁺ myši (Post-hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl; ** $p = 0,006$) i AD⁻ myši (Post-hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl; *** $p = 0,001$); **e)** sociální paměť u šestiměsíčních samic (n stejná jako v 13b), **f)** sociální paměť u desetiměsíčních samců, kde nepozorujeme žádný rozdíl mezi genotypy

5.1.2 Prepulzní inhibice

Test PPI jsme prováděli pouze u desetiměsíčních samců a k analýze jsme využili Welchův test a objevili jsme rozdíly mezi AD⁺ a AD⁻ skupinami u prepulzu o frekvenci 4 kHz [t = 4,753, **p = 0,0020], 12 kHz [t = 3,858, **p = 0,0025] a 20 kHz [t = 3,005, *p = 0,0145]. Následně jsme analyzovali křivku stimulus-odpověď pomocí dvoucestné analýzy rozptylu. Ta potvrzuje vliv genotypu [F (1, 12) = 10,20, **p = 0,0077] i intenzity úlekového podnětu [F (3, 36) = 40,09, ****p < 0,0001]. Post-hoc test odhalil signifikantní rozdíly mezi samci při intenzitě úlekového podnětu 90 dB (**p = 0,0016) a 100 dB (**p = 0,0012).



Obr. 14: Grafy srovnávající míru prepulzní inhibice u desetiměsíčních samců [n(AD⁺) = 6, n(AD⁻) = 7]. Pozorujeme signifikantní pokles PPI u AD⁺ zvířat v případě všech frekvencí prepulzu. Křivka stimulus-odpověď' pak ukazuje, že tato zvířata mají daleko intenzivnější úlekové reakce (vynesená data byla naměřena v jeden den, při stejné kalibraci aparatury).

5.2. Úloha parvalbuminových interneuronů v AD

5.2.1 Histologická analýza dat

Ačkoliv byla histologie provedena až nakonec, předcházela statistické analýze dat (vysvětlení nabízí kapitola 4.3.). Kvůli nedostatečné expresi jsme museli vyřadit všechny samice, jelikož zbývající počet nebyl dostatečný (v některých skupinách zůstaly pouze dvě).

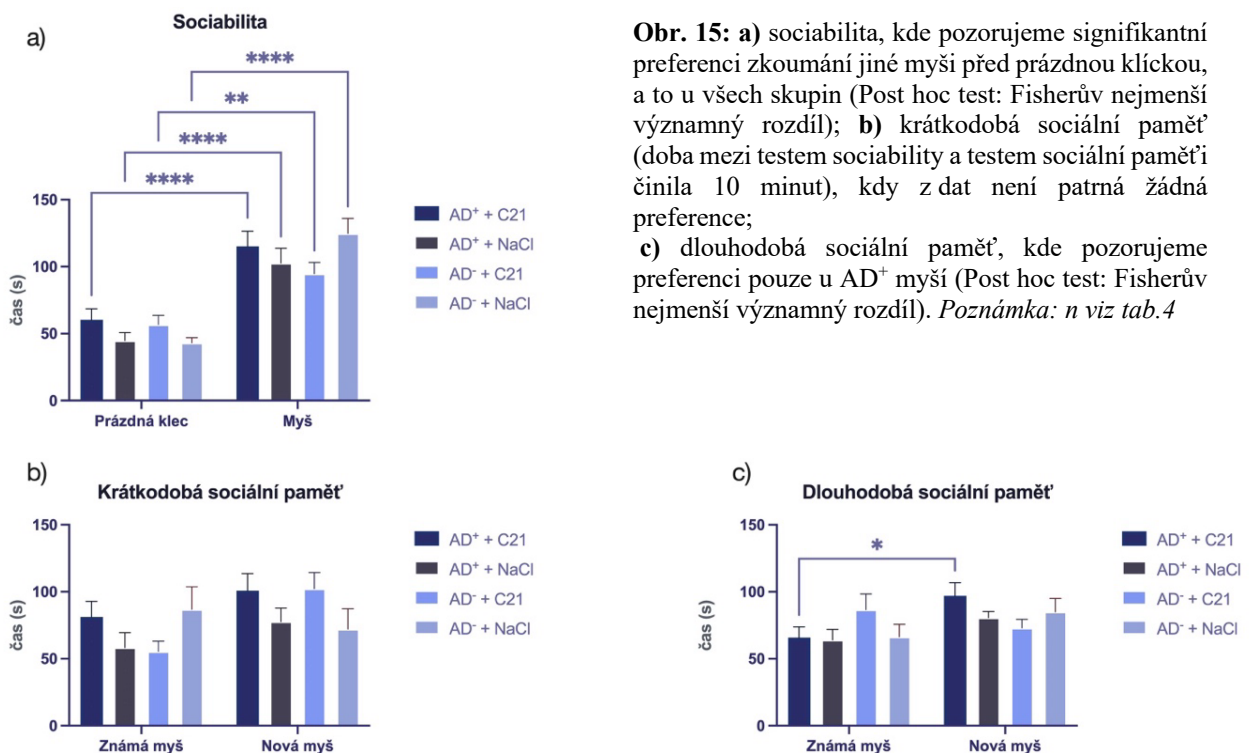
Zbývají nám tak tedy pouze desetiměsíční samci (aktualizovaný počet ukazuje tab. 4)

Genotyp	<i>n</i> (C21)	<i>n</i> (NaCl)
PVcre-AD ⁺	10	8
PVcre-AD ⁻	10	13

Tab. 4: Počty zvířat v jednotlivých skupinách po provedení histologické analýzy a vyřazení zvířat bez exprese DREADDs. Ve všech případech se jedná o desetiměsíční samce. Dva samci byli vyřazení z důvodu abnormálního chování v testu sociability (1 ze skupiny AD⁺-C2, 1 ze skupiny AD⁻ NaCl)

5.2.2 Tříkomorový test

Využili jsme variantu testu z obr. 8, kde hodnotíme sociabilitu, krátkodobou sociální paměť a dlouhodobou sociální paměť. Výsledky zobrazuje obr. 15.



Obr. 15: **a)** sociabilita, kde pozorujeme signifikantní preferenci zkoumání jiné myši před prázdnou klíčkou, a to u všech skupin (Post hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl); **b)** krátkodobá sociální paměť (doba mezi testem sociability a testem sociální paměti činila 10 minut), kdy z dat není patrná žádná preference; **c)** dlouhodobá sociální paměť, kde pozorujeme preferenci pouze u AD⁺ myši (Post hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl). *Poznámka:* *n* viz tab.4

Sociabilita: Nepozorujeme žádný vliv genotypu a treatmentu [$F(3, 74) = 1,061$; $p = 0,3708$] ani interakce faktorů [$F(3, 74) = 2,230$, $p = 0,0918$]. Sledujeme statisticky významnou preferenci myši před neživým objektem [$F(1, 74) = 83,71$; $p < 0,0001$].

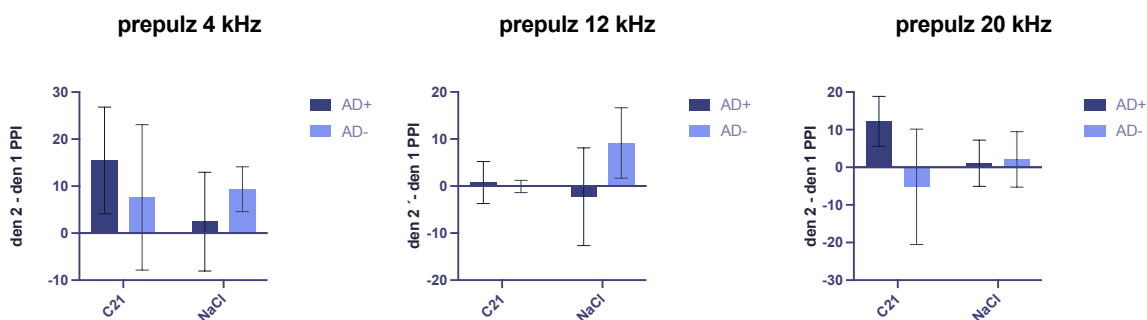
Sociální paměť, krátkodobá: Nepozorujeme žádný vliv genotypu a treatmentu [$F(3, 74) = 1,047$; $p = 0,3768$], ani preferenci mezi známou a neznámou myší [$F(1, 74) = 2,562$; $p = 0,1137$]. Vliv nemá ani interakce těchto faktorů [$F(3, 74) = 2,314$; $p = 0,0829$].

Sociální paměť dlouhodobá: Ani u těchto výsledků nepozorujeme žádný vliv genotypu a treatmentu [$F(3, 72) = 0,4670$; $p = 0,7062$] a interakce faktorů [$F(3, 72) = 1,790$; $p = 0,1567$]. Pozorujeme však preferenci neznámé myši před známou [$F(1, 72) = 6,030$, $p = 0,0165$].

5.2.1 Prepulzní inhibice

Zde opět používáme jako prepulzy čisté tóny o stejných frekvencích jako v části 5.1.2. Žádné statisticky signifikantní rozdíly se nám podařilo zjistit při využití prepulzu o frekvenci 4 kHz a zjistili jsme, že zde nehraje roli aplikace C21 [$F(1, 21) = 0,05776$; $p = 0,8124$], genotyp zvířat [$F(1, 21) = 0,9279$; $p = 0,3464$] ani interakce těchto dvou faktorů [$F(1, 21) = 0,005558$; $p = 0,9413$].

Vliv interakce faktorů [$F(1, 21) = 0,9278$; $p = 0,3464$] ani aplikace C21 [$F(1, 21) = 0,3753$; $p = 0,5467$] nepozorujeme ani u frekvence 12 kHz, pozorujeme zde však vliv genotypu [$F(1, 21) = 7,115$; $p = 0,0144$].



Obr. 16: Prepulzní inhibice u desetiměsíčních samců, kříženců APP/PSEN1 x PvCre při jednotlivých frekvencích. Rozdíly mezi skupinami jsou patrné pouze při frekvenci prepulzu 12 kHz, kde pozorujeme sníženou míru PPI pro AD⁺ skupinu s aplikovanou C21 ($p < 0,05$, Post hoc test: Fisherův nejmenší významný rozdíl).

Podobně je tomu tak při využití prepulzu o frekvenci 20 kHz, kde výsledky neovlivňuje ani aplikace C21 [$F(1, 21) = 0,01723$; $p = 0,8968$], genotyp [$F(1, 21) = 0,9279$; $p = 0,3464$] ani interakce faktorů [$F(1, 21) = 0,5526$; $p = 0,4655$].

6 DISKUSE VÝSLEDKŮ

6.1. Diskuse: Behaviorální fenotyp APP^{swe}/PSEN1dE9

V literárním úvodu jsme věnovali pozornost zejména paměťovým deficitům u modelu APP/PSEN1, na které se zaměřuje drtivá většina provedených studií. My jsme se vydali jiným směrem a literárních zdrojů je tedy k dispozici podstatně méně – sledujeme změny míry úzkostnosti alzheimerovských zvířat a případné deficity v sociálním chování.

6.1.1 Alzheimerovské myši nevykazují změněnou míru anxiety

V testu otevřeného pole se u šestiměsíčních zvířat **nepodařilo odhalit žádný významný rozdíl v chování AD⁺ zvířat oproti kontrolám**, a to ani u jednoho pohlaví. Test jsme provedli také na skupině desetiměsíčních samců – pohled na graf na obrázku 10b však **naznačuje určitý trend** ($p = 0,0873$), kde AD⁺ myši tráví ve středové části arény o něco více času.

Dostupná literatura popisující kmen APP/PSEN1 v případě testu otevřeného pole podává převážně rozporuplné výsledky. Su a kolegové (2023) poukazují na signifikantně menší dráhu uraženou ve středové oblasti arény u AD⁺ zvířat oproti kontrolám (věk taktéž 10 měsíců), což napovídá zvýšené anxiozitě. Podobná data uvádí Huang a kolegové (2016) u dvouletých myší. Trend, který jsme pozorovali u našich alzheimerovských myší, se zdá opačný.

Desetiměsíčních samců jsme však měli k dispozici pouze 14 (7 AD⁺ a 7 AD⁻ kontrol), a tudíž by bylo potřeba tento trend potvrdit s větším počtem zvířat. V takovém případě bychom museli výzkumný vzorek rozšířit taktéž o desetiměsíční samice, které jsme neměli k dispozici vlivem situace v chovu. Jiné laboratoře udávají v testu otevřeného pole negativní výsledky u čtyřměsíčních, ročních (Jardanhazi-Kurutz et al., 2010), devítiměsíčních (Hulshof et al., 2022) i šestnáctiměsíčních zvířat obou pohlaví (León, 2023), Webster a kolegové (2013) nepozorovali žádné odchylky ani u dvouletých zvířat.

Dalším provedeným testem bylo vyvýšené křížové bludiště, opět zaměřené na anxiózní chování. Kuriózní je naprostá neochota myší vstupovat do otevřených ramen bludiště, a to jako u šestiměsíčních, tak i desetiměsíčních zvířat (obr. 11), **kde jsme**

nepozorovali prakticky žádný rozdíl mezi AD a kontrolní skupinou bez ohledu na pohlaví či věk zvířat. Tento test provedli ve své baterii také již zmíněný Huang a kolegové (2016), kteří se zabývali behaviorálním fenotypem APP/PSEN1 zvířat ve věku 24 měsíců. U těchto dvouletých myší se ukázalo, že v otevřených ramenou bludiště tráví významně méně času než kontroly (* $p < 0,05$).

Su a kolegové (2023) použili k hodnocení anxiety desetiměsíčních APP/PSEN1 myší analogický test k EPM zvaný kruhové bludiště. Jedná se taktéž o vyvýšenou arénu, kde je část dráhy uzavřená, a tedy pro zvířata „bezpečná“, část je otevřená a způsobuje tak určitý stres. Výsledky této studie však rozdíl v chování zvířat nepotvrdil. Ve prospěch našich dat mluví také Locci a kolegové (2021), kteří porovnávali chování desetiměsíčních zvířat modelu 5xFAD (viz kapitola 1.3.1) a APP/PSEN1dE9 se stejným genetickým pozadím jako model používaný námi v rámci FgÚ AVČR. Tato studie odhalila statisticky významný nárůst anxiety u 5xFAD myší, avšak u APP^{swe}/PSEN1dE9 myší nikoliv.

Je možné, že se změny v anxiózním chování u alzheimerovského modelu objevují až v pozdějším věku, na rozdíl od paměťových deficitů, které někteří uvádí již u čtyřměsíčních zvířat (Jardanhazi-Kurutz et al., 2010) – šest a deset měsíců může být ještě příliš nízký věk k tomu, aby se deficity v těchto oblastech projevíly. Oelsen a kolegové (2016) provedli komplexní analýzu behaviorálního fenotypu modelu APP/PSEN1 na samcích (s odlišným genetickým pozadím, náchylným k epileptickým záchvatům), kde sledovali tyto myši ve věku 9, 12, 15 a 18 měsíců a jejich výsledky poukazují na postupný nárůst míry anxiózního chování (studie hodnotí exploraci, vegetativní projevy stresu, lokomoci a míru anxiety) se stárnutím zvířat.

Nemůžeme však opomenout skutečnost, že do otevřených ramen nevstupovala ani AD zvířata – tedy kontroly, které by dle předpokladů měly odpovídat divokému typu, a tedy měly vykazovat nějakou míru explorační aktivity. Kromě možného vlivu věku jsme vzali v úvahu stresující vliv prostředí. Šestiměsíční zvířata jsme testovali v září 2022 a lednu 2023, desetiměsíční zvířata pak v září 2023. Využívali jsme stejnou testovací místnost, avšak vzhledem k velkým časovým intervalům uplynulým mezi jednotlivými testy je více než pravděpodobné, že se v místnosti něco změnilo – osvětlení, pach, vybavení. Žádná z těchto malých, ale možných významných změn na výsledky neměla vliv a naprostá nečinnost zvířat v testu EPM tak zůstává překvapivým výsledkem.

6.1.2 *Nepodařilo se prokázat abnormální sociální chování*

Sociální chování APP/PSEN1 myši často není předmětem zájmu studií, a proto jsme se na něj zaměřili. Výsledky získané z testu sociálních interakcí (obr. 12) však neodhalují žádný významný vliv genotypu zvířete na jeho interakce s jiným jedincem. Tento test však vyžaduje ruční vyhodnocení a ideálně dva nezávislé pozorovatele, což v našich podmínkách nebylo možné zařídit, a proto jsme test provedli pouze u šestiměsíčních myši a ve značně sníženém počtu.

Zahraniční studie používají pro výzkum sociálního chování zejména tříkomorový test, který jsme proto zařadili do baterie provedených testů (design na obr. 7). Jedná se o praktický test, jelikož jej lze různě obměňovat a na rozdíl od testu sociálních interakcí je poměrně snadný na automatizované hodnocení v softwaru EthoVision.

Test sociability nám říká, jak moc testovaná myš preferovala zkoumání jiné myši oproti prázdné klícce. Jak vidíme na grafu na obr. 13a, šestiměsíční zvířata žádnou preferenci nevykazují, a to zcela bez vlivu genotypu. Obr. 13b představuje výsledky z téhož testu, ale u desetiměsíčních samců. Je zde patrná výrazná preference další myši před neživým objektem, což je přirozené chování těchto společenských hlodavců. Avšak ani zde se vliv Alzheimerovského genotypu nepotvrdil. **Test sociální paměti** využívá myš, se kterou se testovaný jedinec setkal již v testu sociability. Do dosud prázdné klíčky jsme vložili další myš, se kterou se testovaný jedinec neměl šanci dříve setkat. Jestliže je myš schopná rozeznat známou myš od této nové, očekává se, že bude trávit více času u neznámé myši. Naše data potvrzují, že tímto způsobem test skutečně funguje (obr. 13c), ale opět bez jakéhokoliv rozdílu daného vlivem genotypu.

Podobné výsledky však přinesla již výše zmíněná srovnávací studie provedená na desetiměsíčních myších (Locci et al., 2021), která uvádí sníženou sociabilitu a sociální paměť u modelu 5xFAD (viz kapitola 1.3.2.), ne však u APP/PSEN1 myši. Právě opačný výsledek pro tento model přináší studie Zhanga a kolegů (2021), kteří prováděli tříkomorový test a zjistili signifikantní deficit v sociální paměti (**p < 0,01) již u tříměsíčních APP/PSEN1 myši. Tyto deficity se projevují také u APP/PSEN1 myši s odlišným genetickým pozadím (Filali et al., 2021; Selles et al., 2023). Podobně jako u testu otevřeného pole, i zde se výsledky značně liší mezi jednotlivými studiemi.

6.1.3 Míra prepulzní inhibice je u APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myši nulová

Během průběhu studie naše laboratoř získala aparaturu pro PPI, a proto jsme se rozhodli pro dodatečné zařazení tohoto testu. **Tento behaviorální test odhalil významný pokles PPI u desetiměsíčních alzheimerovských zvířat prakticky na nulu**, bez ohledu na frekvenci použitého prepulsu (obr. 14). Stejnou aberaci potvrzují u APP/PSEN1 myši Wang a kolegové (2012), kteří však použili myši s odlišným genetickým pozadím. **To odhaluje významnou poruchu senzomotorického gatingu u tohoto modelu a představuje patrně nejdůležitější zjištění v této diplomové práci.** Toto narušení reportuje i Lu a jeho tým (2022) u třináctiměsíčních zvířat obou pohlaví. Zajímavé je, že ve věku deseti měsíců nebylo u myši použitých v této studii statisticky významné zhoršení patrné (Lu et al., 2022).

Odhlédneme-li od zvířecích modelů AD, zjistíme, že výsledky u lidských pacientů nejsou jednoznačné – některé studie nedokázaly potvrdit změny v PPI (Hejl et al., 2004), jiné studie uvádí, že míra prepulzní inhibice přirozeně klesá s přibývajícím věkem (Le Duc et al., 2016) a přítomnost Alzheimerovy choroby tento pokles prohlubuje (Jafari et al., 2020, Ueki et al., 2006).

Omezením našeho výzkumu je, že jsme aparaturu získali až příliš pozdě, a proto jsme nemohli test provést s početnější skupinou šestiměsíčních zvířat, která obsahovala i samice. V budoucnu je tedy potřeba test zopakovat s více věkovými skupinami obou pohlaví, abychom zjistili, kdy se deficit začíná projevovat. Dále zvažujeme modifikaci protokolu experimentu; zatím jsme použili pouze výchozí šestiminutový protokol s prepulzy v podobě čistých tónů, ale v plánu je vytvoření delších protokolů s různými typy prepulzů (např. gap PPI).

Diskuse: Úloha parvalbuminových interneuronů

v Alzheimerově chorobě

Druhou část naší studie jsme věnovali chemogenetickému experimentu, kdy bylo cílem zjistit, zda aktivace PVI povede ke zlepšení výkonu zvířat v prováděných behaviorálních testech. Studii jsme provedli na základě dřívějších pilotních výsledků, které naznačovaly jisté zlepšení výkonu alzheimerovských zvířat v behaviorálních testech.

Z výsledků z první části je patrné, že jsme žádné významné zhoršení (vyjma testu PPI) u Alzheimerových myší oproti kontrolám nepozorovali, a tudíž už na začátku zřejmě nebylo co zlepšovat.

Jelikož jsme museli vnést DREADDs, které byly Cre dependentní, museli jsme pro experiment využít křížence našeho modelu s myšmi exprimujícími Cre rekombinázu pod parvalbuminovým promotorem. Proto bylo potřeba sledovat, zda se tyto kříženci v chování neliší od čistých APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myší.

6.1.4 Chemogenetická aktivace PVI nehraje roli v sociální paměti

V tuto chvíli již není třeba zdůrazňovat zásadní význam parvalbuminových interneuronů (viz kapitola 2.). Hijazi a kolegové (2020) provedli chemogenetickou studii, kde pomocí DREADDs excitovali či naopak tlumili PVI u APP/PSEN1 myší a dokázali tak zvrátit kognitivní deficity v prostorové paměti zvířat.

Je však známo, že PVI ventrálního hipokampu hrají roli také v sociálním chování (Deng et al., 2019). Proto jsme se rozhodli na výše zmíněnou studii navázat a zaměřit se právě na sociální paměť a zacílit DREADDs na oblast ventrálního hipokampu. Post mortem histologická analýza však ukázala, že **se u značné části zvířat receptory neexprimovaly, nebo se neexprimovaly v cílové oblasti.**

Test sociability (obr. 15a) dokázal, že myši preferují klec s jinou myší před prázdnou klecí, a to zcela bez rozdílu vlivu genotypu a treatmentu. Výsledek odpovídá sociabilitě stejně starých APP/PSEN1 samců (obr. 13b), kde vidíme, že ani samotný Alzheimerův genotyp nemá v podmínkách naší laboratoře na tento druh chování žádný vliv.

Krátkodobá sociální paměť pak neukazuje ani výraznou preferenci pro dosud neznámé zvíře. To bychom mohli považovat za významný výsledek, jelikož se může jednat o nedostatečnou schopnost sociální diskriminace či projev rigidity. Tyto výsledky jsme však pozorovali opět u obou genotypů a aplikovaných látek (obr. 15b). Zde pozorujeme odlišnost mezi APP/PSEN1^{xPvCre} a APP/PSEN1 zvířaty, kde jsme u samců (AD⁺ i AD⁻) pozorovali statisticky významnou preferenci neznámé myši.

Test dlouhodobé sociální paměti ukazuje signifikantní preferenci pro neznámou myš u AD⁺ samců, kterým jsme pomocí C21 aktivovali parvalbuminové interneurony. Tento výsledek je sám o sobě poměrně zajímavý, ale také je možné, že jde o pouhou náhodu,

jelikož kontrolní skupina, které jsme aplikovali fyziologický roztok, podobnou signifikanci nevykazuje. V plánu je však rozšíření skupin, což tento trend může potvrdit, či vyvrátit.

6.1.5 Míra prepulzní inhibice není ovlivněna aktivací PVI

Jak se nám podařilo zjistit u APP/PSEN1, alzheimerovská zvířata vykazují výrazný pokles míry prepulzní inhibice. Očekávali jsme, že behaviorální fenotyp kříženců APP^{swE}/PSEN1^{dE9} x PvCre bude prakticky shodný. Jak nám ale ukazuje graf vyhodnocených dat z PPI (obr. 16), vidíme, že se po podání fyziologického roztoku míra PPI u myši s Alzheimerovou chorobou (AD⁺) a kontrolami (AD⁻) prakticky neliší, zatímco %PPI u kontrol se v obou případech pohybuje okolo 50% (obr.14). Tento výsledek nás donutil uvažovat, do jaké míry se chování původního modelu a našich kříženců skutečně shoduje.

Jedinou detekovanou změnou bylo mírné snížení PPI (*p <0,05) u skupiny AD⁺, kde jsme aplikovali C21 a aktivovali parvalbuminové interneurony, a to při frekvenci prepulzu 12 Hz. U této skupiny jsme však vlivem tohoto zásahu naopak očekávali zlepšení PPI.

Literatura často uvádí narušení funkce parvalbuminových interneuronů ve spojitosti se schizofrenií, která je též spojená s narušením senzomotorického gatingu a PPI patří mezi klasické behaviorální testy u animálních modelů této choroby. Inhibice PVI vede k významnému poklesu prepulzní inhibice u těchto zvířat (Brown et al., 2015; Toader, 2020).

ZÁVĚR

Tato diplomová práce měla dva cíle:

1. Zmapování behaviorálního fenotypu APP^{swe}/PSEN1^{dE9} myšího modelu zaměřené na sociální chování a anxiету, později jsme do baterie testů přidali test prepulzní inhibice.
2. Zjistit vliv chemogenetické aktivace parvalbuminových interneuronů na sociální chování a anxiету modelových zvířat (APP^{swe}/PSEN1^{dE9} x PvCre)

U APP^{swe}/PSEN1 modelu jsme provedli sérii behaviorálních testů zahrnující test otevřeného pole, vyvýšené křížové bludiště, tříkomorový a test sociálních interakcí, kde nepozorujeme žádný významný vliv alzheimerovského genotypu na chování těchto zvířat. Baterii testů jsme doplnili o test prepulzní inhibice, který ukázal výrazné narušení senzomotorického gatingu u těchto myší.

Výsledky z chemogenetického experimentu neposkytují žádný přesvědčivý důkaz o vlivu aktivace parvalbuminových interneuronů na chování zvířat, kde jsme provedli modifikovaný tříkomorový test a test prepulzní inhibice. Výsledky také naznačují odlišnosti v míře prepulzní inhibice mezi AD⁺ zvířaty (kde zcela chybí) a PvCreAD⁺ zvířaty, u kterých je PPI pouze lehce snížena. Vzhledem k nedostatečné expresi DREADDs u mnoha těchto myší je však potřeba ve studii pokračovat a rozšířit výzkumný soubor také o samice.

CITOVANÁ LITERATURA

- Andrieu, S., Coley, N., Lovestone, S., Aisen, P. S., & Vellas, B. (2015). Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions: lessons learned from clinical trials and future directions. *The Lancet Neurology*, *14*(9), 926-944. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00153-2)
- Arnsten, A. F. T., Datta, D., Del Tredici, K., & Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *17*(1), 115-124. <https://doi.org/10.1002/alz.12192>
- Bártová, P., Walczysková, S., Plevová, P., Ratajová, L., Havelka, J., Šilhánová, E., Rössner, P., & Školoudík, D. (2011). Hereditární časná forma Alzheimerovy nemoci v důsledku zárodečné mutace p.M139V v genu PSEN1 – kazuistika. *Česká A Slovenská Neurologie A Neurochirurgie*, *74/107*(5), 569-574.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *6*(3), 131-144. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>
- Booker, S. A., & Vida, I. (2018). Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell And Tissue Research*, *373*(3), 619-641. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2882-2>
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1263-1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2012). *Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin?* (Vol. 25, Issue 6, p. -714) [Online]. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835a3432>
- Brown, J. A., Ramikie, T. S., Schmidt, M. J., Báldi, R., Garbett, K., Everheart, M. G., Warren, L. E., Gellért, L., Horváth, S., Patel, S., & Mirnics, K. (2015). Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. *Molecular Psychiatry*, *20*(12), 1499-1507. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.192>
- Bucurenciu, I., Kulik, A., Schwaller, B., Frotscher, M., & Jonas, P. (2008). Nanodomain Coupling between Ca²⁺ Channels and Ca²⁺ Sensors Promotes Fast and Efficient Transmitter Release at a Cortical GABAergic Synapse. *Neuron*, *57*(4), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.026>
- Buchan, R. J., Nagata, K., Yokoyama, E., Langman, P., Yuya, H., Hirata, Y., Hatazawa, J., & Kanno, I. (1997). Regional correlations between the EEG and oxygen metabolism in dementia of Alzheimer's type. *Electroencephalography And Clinical Neurophysiology*, *103*(3), 409-417. [https://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)00015-5)

- Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L. -H., & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, *459*(7247), 663-667. <https://doi.org/10.1038/nature08002>
- Celio, M. R., & Heizmann, C. W. (1981). Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature*, *293*(5830), 300-302. <https://doi.org/10.1038/293300a0>
- Coward, P., Wada, H. G., Falk, M. S., Chan, S. D. H., Meng, F., Akil, H., & Conklin, B. R. (1998). Controlling signaling with a specifically designed G sub β /sub γ -coupled receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *95*(1), 352-357. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.352>
- Crook, R., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., Gwinn, K., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Ylikoski, R., Pöyhönen, M., Kucera, S., & Haltia, M. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nature Medicine*, *4*(4), 452-455. <https://doi.org/10.1038/nm0498-452>
- Czigler, B., Csikós, D., Hidasi, Z., Anna Gaál, Z., Csibri, É., Kiss, É., Salacz, P., & Molnár, M. (2008). Quantitative EEG in early Alzheimer's disease patients — Power spectrum and complexity features. *International Journal Of Psychophysiology*, *68*(1), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2007.11.002>
- DAVIES, P. (1976). SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet*, *308*(8000), 1403-1403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron*, *73*(4), 685-697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nature Methods*, *8*(1), 26-29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Deleuze, C., Bhumbra, G. S., Pazienti, A., Lourenço, J., Mailhes, C., Aguirre, A., Beato, M., & Bacci, A. (2019). Strong preference for autaptic self-connectivity of neocortical PV interneurons facilitates their tuning to γ -oscillations. *Plos Biology*, *17*(9), e3000419-e3000419. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000419>
- Deng, X., Gu, L., Sui, N., Guo, J., & Liang, J. (2019). Parvalbumin interneuron in the ventral hippocampus functions as a discriminator in social memory. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *116*(33), 16583-16592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819133116>
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, *13*(9), 952-963.

- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality.: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, *133*(2), 155-175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- Dubey, M., Pascual-Garcia, M., Helmes, K., Wever, D. D., Hamada, M. S., Kushner, S. A., & Kole, M. H. P. (2022). Myelination synchronizes cortical oscillations by consolidating parvalbumin-mediated phasic inhibition. *Elife*, *11*. <https://doi.org/10.7554/eLife.73827>
- Dutschmann, M., Menuet, C., Stettner, G. M., Gestreau, C., Borghgraef, P., Devijver, H., Gielis, L., Hilaire, G., & Van Leuven, F. (2010). Upper Airway Dysfunction of Tau-P301L Mice Correlates with Tauopathy in Midbrain and Ponto-Medullary Brainstem Nuclei. *The Journal Of Neuroscience*, *30*(5), 1810-1821. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5261-09.2010>
- Elangovan, A., Babu, H. W. S., Iyer, M., Gopalakrishnan, A. V., & Vellingiri, B. (2023). Untangle the mystery behind DS-associated AD – Is APP the main protagonist? *Ageing Research Reviews*, *87*, 101930-101930. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2023.101930>
- Fuchs, E. C., Zivkovic, A. R., Cunningham, M. O., Middleton, S., LeBeau, F. E. N., Bannerman, D. M., Rozov, A., Whittington, M. A., Traub, R. D., Rawlins, J. N. P., & Monyer, H. (2007). Recruitment of Parvalbumin-Positive Interneurons Determines Hippocampal Function and Associated Behavior. *Neuron*, *53*(4), 591-604. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.031>
- Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M. J., Engelborghs, S., De Deyn, P., Berr, C., Pasquier, F., Dubois, B., Tognoni, G., Fiévet, N., Brouwers, N., Bettens, K., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, M., et al. (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance: a major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular Psychiatry*, *16*(9), 903-907. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. -C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704-706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Gomez, J. L., Bonaventura, J., Lesniak, W., Mathews, W. B., Sysa-Shah, P., Rodriguez, L. A., Ellis, R. J., Richie, C. T., Harvey, B. K., Dannals, R. F., Pomper, M. G., Bonci, A., & Michaelides, M. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, *357*(6350), 503-507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2475>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *Journal Of Biological Chemistry*, *261*(13), 6084-6089. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38495-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38495-8)

- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 83(13), 4913-4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>
- Guerchet, M. , Prince, M., & Prina, M. (2020). *Numbers of people with dementia worldwide: An update to the estimates in the World Alzheimer Report 2015.: An update to the estimates in the World Alzheimer Report 2015* [Online]. <https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/>
- Hejl, A. -M., Glenthøj, B., Mackeprang, T., Hemmingsen, R., & Waldemar, G. (2004). Prepulse inhibition in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology Of Aging*, 25(8), 1045-1050. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.11.005>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Higgins, L. S., Holtzman, D. M., Rabin, J., Mobley, W. C., & Cordell, B. (1994). Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. *Annals Of Neurology*, 35(5), 598-607. <https://doi.org/10.1002/ana.410350514>
- Hijazi, S. (2021). *Inhibiting Alzheimer's disease by restoring Parvalbumin interneuron activity* [Online].
- Hijazi, S., Heistek, T. S., Scheltens, P., Neumann, U., Shimshek, D. R., Mansvelder, H. D., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2020). Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 25(12), 3380-3398. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0483-4>
- Hijazi, S., Heistek, T. S., van der Loo, R., Mansvelder, H. D., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2020). Hyperexcitable Parvalbumin Interneurons Render Hippocampal Circuitry Vulnerable to Amyloid Beta. *IScience*, 23(7), 101271-101271. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101271>
- Hijazi, S., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2023). Fast-spiking parvalbumin-positive interneurons in brain physiology and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02168-y>
- Howard, M. W., Rizzuto, D. S., Caplan, J. B., Madsen, J. B., & Lisman, J. (2003). Gamma Oscillations Correlate with Working Memory Load in Humans. *Cerebral Cortex*, 13(12), 1369-1374. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhg084>
- Huang, H., Nie, S., Cao, M., Marshall, C., Gao, J., Xiao, N., Hu, G., & Xiao, M. (2016). Characterization of AD-like phenotype in aged APPSwe/PS1dE9 mice. *Age*, 38(4), 303-322. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9929-7>
- Hulshof, L. A., Frajmund, L. A., van Nuijs, D., van der Heijden, D. C. N., Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2022). Both male and female APPSwe/PSEN1dE9 mice are impaired

- in spatial memory and cognitive flexibility at 9 months of age. *Neurobiology Of Aging*, 113, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.12.009>
- Chintapaludi, S. R., Uyar, A., Jackson, H. M., Acklin, C. J., Wang, X., Sasner, M., Carter, G. W., & Howell, G. R. (2020). Staging Alzheimer's Disease in the Brain and Retina of B6.APP/PS1 Mice by Transcriptional Profiling. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 73(4), 1421-1434. <https://doi.org/10.3233/JAD-190793>
- Iqbal, K., Wiśniewski, H. M., Shelanski, M. L., Brostoff, S., Liwnicz, B. H., & Terry, R. D. (1974). Protein changes in senile dementia. *Brain Research*, 77(2), 337-343. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90798-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90798-7)
- Jackson, H. M., Soto, I., Graham, L. C., Carter, G. W., & Howell, G. R. (2013). Clustering of transcriptional profiles identifies changes to insulin signaling as an early event in a mouse model of Alzheimer's disease. *Bmc Genomics*, 14(1), 831-831. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-831>
- Jafari, Z., Kolb, B. E., & Mohajerani, M. H. (2020). Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and P50 gating in aging and alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 59, 101028-101028. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101028>
- Jardanhazi-Kurutz, D., Kummer, M. P., Terwel, D., Vogel, K., Dyrks, T., Thiele, A., & Heneka, M. T. (2010). Induced LC degeneration in APP/PS1 transgenic mice accelerates early cerebral amyloidosis and cognitive deficits. *Neurochemistry International*, 57(4), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.02.001>
- Klausová, T. (2022). *Socializace, anxiety a paměť jsou ovlivněny sulfatačním epitopem perineurálních sítí* (p. -11) [Online].
- Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J., & Kuhn, J. (2013). Prepulse inhibition in psychiatric disorders – Apart from schizophrenia. *Journal Of Psychiatric Research*, 47(4), 445-452. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.11.018>
- Lahiri, D., Maloney, B., Riyaz Basha, M., Wen Ge, Y., & Zawia, N. (2007). How and When Environmental Agents and Dietary Factors Affect the Course of Alzheimers Disease: The LEAR Model (Latent Early-Life Associated Regulation) May Explain the Triggering of AD: The LEAR Model (Latent Early-Life Associated Regulation) May Explain the Triggering of AD. *Current Alzheimer Research*, 4(2), 219-228. <https://doi.org/10.2174/156720507780362164>
- Lannfelt, L., Bogdanovic, N., Johnston, J., & Cowburn, R. (1994). APP Gene Mutations in Familial Alzheimer's Disease in Sweden. In *Amyloid Protein Precursor in Development, Aging and Alzheimer's Disease*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-01135-5>
- Le Duc, J., Fournier, P., & Hébert, S. (2016). Modulation of Prepulse Inhibition and Startle Reflex by Emotions: A Comparison between Young and Older Adults: A Comparison between Young and Older Adults. *Frontiers In Aging Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00033>
- León, R., Gutiérrez, D. A., Pinto, C., Morales, C., de la Fuente, C., Riquelme, C., Cortés, B. I., González-Martin, A., Chamorro, D., Espinosa, N., Fuentealba, P., Cancino, G. I.,

- Zanlungo, S., Dulcey, A. E., Marugan, J. J., & Álvarez Rojas, A. (2023). C-Abl tyrosine kinase down-regulation as target for memory improvement in Alzheimer's disease. *Frontiers In Aging Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1180987>
- Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., & Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends In Neurosciences*, 35(1), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004>
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. -L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. -H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., & McGowan, E. (2001). Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science*, 293(5534), 1487-1491. <https://doi.org/10.1126/science.1058189>
- Liu, Y., Fang, S., Liu, L. -M., Zhu, Y., Li, C. -R., Chen, K., & Zhao, H. -B. (2020). Hearing loss is an early biomarker in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *Neuroscience Letters*, 717, 134705-134705. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134705>
- Locci, A., Orellana, H., Rodriguez, G., Gottliebson, M., McClarty, B., Dominguez, S., Keszycki, R., & Dong, H. (2021). Comparison of memory, affective behavior, and neuropathology in APPNLGF knock-in mice to 5xFAD and APP/PS1 mice. *Behavioural Brain Research*, 404, 113192-113192. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113192>
- Lu, L. -P., Chang, W. -H., Huang, J. -J., Tan, P., & Tsai, G. E. (2022). Lithium Benzoate Exerts Neuroprotective Effect by Improving Mitochondrial Function, Attenuating Reactive Oxygen Species, and Protecting Cognition and Memory in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Journal Of Alzheimer's Disease Reports*, 6(1), 557-575. <https://doi.org/10.3233/ADR-220025>
- MacLaren, D. A. A., Browne, R. W., Shaw, J. K., Krishnan Radhakrishnan, S., Khare, P., España, R. A., & Clark, S. D. (2016). Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments: Implications for Designing DREADD Experiments. *Eneuro*, 3(5), ENEURO.0219-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0219-16.2016>
- McGeer, P. L., & Rogers, J. (1992). Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(2), 447-447. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.2.447>
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkänen, A., & Tanila, H. (2009). Amyloid β -Induced Neuronal Hyperexcitability Triggers Progressive Epilepsy. *The Journal Of Neuroscience*, 29(11), 3453-3462. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009>
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M. D. (1991). A mutation in the Amyloid Precursor Protein Associated with Hereditary Alzheimer's Disease. *Science*, 254(5028), 97-99. <https://doi.org/10.1126/science.1925564>

- Nanou, E., Lee, A., & Catterall, W. A. (2018). Control of Excitation/Inhibition Balance in a Hippocampal Circuit by Calcium Sensor Protein Regulation of Presynaptic Calcium Channels. *The Journal Of Neuroscience*, 38(18), 4430-4440. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0022-18.2018>
- Nguyen, R., Morrissey, M. D., Mahadevan, V., Cajanding, J. D., Woodin, M. A., Yeomans, J. S., Takehara-Nishiuchi, K., & Kim, J. C. (2014). Parvalbumin and GAD65 interneuron inhibition in the ventral hippocampus induces distinct behavioral deficits relevant to schizophrenia. *Journal Of Neuroscience*, 34(45), 14948-14960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-14.2014>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *The Journal Of Neuroscience*, 26(40), 10129-10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Olesen, L. Ø., Bouzinova, E. V., Severino, M., Sivasaravanaparan, M., Hasselstrøm, J. B., Finsen, B., & Wiborg, O. (2016). Behavioural Phenotyping of APP^{swE}/PS1^{ΔE9} Mice: Age-Related Changes and Effect of Long-Term Paroxetine Treatment: Age-Related Changes and Effect of Long-Term Paroxetine Treatment. *Plos One*, 11(11), e0165144-e0165144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165144>
- Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G., & Tomlinson, B. E. (1977). NECROPSY EVIDENCE OF CENTRAL CHOLINERGIC DEFICITS IN SENILE DEMENTIA. *The Lancet*, 309(8004), 189-189. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91780-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91780-9)
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., & Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals Of Neurology*, 43(6), 815-825. <https://doi.org/10.1002/ana.410430617>
- Price, J. L., McKeel, D. W., Buckles, V. D., Roe, C. M., Xiong, C., Grundman, M., Hansen, L. A., Petersen, R. C., Parisi, J. E., Dickson, D. W., Smith, C. D., Davis, D. G., Schmitt, F. A., Markesbery, W. R., Kaye, J., Kurlan, R., Hulette, C., Kurland, B. F., Higdon, R., et al. (2009). Neuropathology of nondemented aging: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiology Of Aging*, 30(7), 1026-1036. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.002>
- Quon, D., Wang, Y., Catalano, R., Scardina, J. M., Murakami, K., & Cordell, B. (1991). Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature*, 352(6332), 239-241. <https://doi.org/10.1038/352239a0>
- Reisberg, B., & Franssen, E. H. (1999). The clinical stages of Alzheimer's disease. In *An atlas of Alzheimer's disease* (pp. 11-20). The Parthenon Publishing Group.

- Rupert, D. D., & Shea, S. D. (2022). Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Cortical Sensory Plasticity in Adulthood and Development Through Shared Mechanisms. *Frontiers In Neural Circuits*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.886629>
- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N., & Saido, T. C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 17(5), 661-663. <https://doi.org/10.1038/nn.3697>
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2)
- Selles, M. C., Fortuna, J. T. S., de Faria, Y. P. R., Siqueira, L. D., Lima-Filho, R., Longo, B. M., Froemke, R. C., Chao, M. V., & Ferreira, S. T. (2023). Oxytocin attenuates microglial activation and restores social and non-social memory in APP/PS1 Alzheimer model mice. *Iscience*, 26(4), 106545-106545. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106545>
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. -F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754-760. <https://doi.org/10.1038/375754a0>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Skokowa, J., Cario, G., Uenal, M., Schambach, A., Germeshausen, M., Battmer, K., Zeidler, C., Lehmann, U., Eder, M., Baum, C., Grosschedl, R., Stanulla, M., Scherr, M., & Welte, K. (2006). LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopenia and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nature Medicine*, 12(10), 1191-1197. <https://doi.org/10.1038/nm1484>
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 289, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>
- Strobel, G. *What Is Early Onset Familial Alzheimer Disease (eFAD)?* [Online]. <https://www.alzforum.org/early-onset-familial-ad/overview/what-early-onset-familial-alzheimer-disease-efad>
- Su, S. J., Chen, G., Gao, M., Zhong, G., Zhang, Z., Wei, D., Luo, X., & Wang, Q. (2023). Kai-Xin-San protects against mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease through SIRT3/NLRP3 pathway. *Chinese Medicine*, 18(1), 26-26. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00722-y>
- Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., Kim, T. -W., Moir, R. D., Guenette, S. Y., & Wasco, W. (1996). REVIEW: The Gene Defects Responsible for Familial Alzheimer's Disease: The

- Gene Defects Responsible for Familial Alzheimer's Disease. *Neurobiology Of Disease*, 3(3), 159-168. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0016>
- Thompson, K. J., Khajehali, E., Bradley, S. J., Navarrete, J. S., Huang, X. P., Slocum, S., Jin, J., Liu, J., Xiong, Y., Olsen, R. H. J., Diberto, J. F., Boyt, K. M., Pina, M. M., Pati, D., Molloy, C., Bundgaard, C., Sexton, P. M., Kash, T. L., Krashes, M. J., et al. (2018). DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs in Vitro and in Vivo. *Acs Pharmacology & Translational Science*, 1(1), 61-72. <https://doi.org/10.1021/acspsci.8b00012>
- Toader, O., von Heimendahl, M., Schuelert, N., Nissen, W., & Rosenbrock, H. (2020). Suppression of Parvalbumin Interneuron Activity in the Prefrontal Cortex Recapitulates Features of Impaired Excitatory/Inhibitory Balance and Sensory Processing in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 46(4), 981-989. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz123>
- Tolar, M., Hey, J., Power, A., & Abushakra, S. (2021). Neurotoxic soluble amyloid oligomers drive Alzheimer's pathogenesis and represent a clinically validated target for slowing disease progression. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6355.
- Tsai, M. S., Tangalos, E. G., Petersen, R. C., Smith, G. E., Schaid, D. J., Kokmen, E., Ivnik, R. J., & Thibodeau, S. N. (1994). Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease.: risk factor for Alzheimer disease. *American Journal Of Human Genetics*, 54(4), 643-9.
- Ueki, A., Goto, K., Sato, N., Iso, H., & Morita, Y. (2006). Prepulse inhibition of acoustic startle response in mild cognitive impairment and mild dementia of Alzheimer type. *Psychiatry And Clinical Neurosciences*, 60(1), 55-62. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2006.01460.x>
- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies: Recent treatment strategies. *European Journal Of Pharmacology*, 887, 173554-173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Végh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., van Nierop, P., Mansvelder, H. D., Hol, E. M., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2014). Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 76-76. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0076-z>
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M. I., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A. C., Mody, I., Mucke, L., & Palop, J. J. (2012). Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell*, 149(3), 708-721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.046>
- Vojtechova, I., Machacek, T., Kristofikova, Z., Stuchlik, A., & Petrasek, T. (2022). Infectious origin of Alzheimer's disease: Amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity: Amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity. *Plos Pathogens*, 18(11), e1010929-e1010929. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010929>

- Wang, H., He, J., Zhang, R., Zhu, S., Wang, J., Kong, L., Tan, Q., & Li, X. -M. (2012). Sensorimotor gating and memory deficits in an APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 233(1), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.007>
- Wang, J., Fang, Y., Wang, X., Yang, H., Yu, X., & Wang, H. (2017). Enhanced Gamma Activity and Cross-Frequency Interaction of Resting-State Electroencephalographic Oscillations in Patients with Alzheimer's Disease. *Frontiers In Aging Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00243>
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., & Van Eldik, L. J. (2013). Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(3), 28-28. <https://doi.org/10.1186/alzrt182>
- Wilcock, D. M., Lewis, M. R., Van Nostrand, W. E., Davis, J., Previti, M. L., Gharkholonarehe, N., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2008). Progression of Amyloid Pathology to Alzheimer's Disease Pathology in an Amyloid Precursor Protein Transgenic Mouse Model by Removal of Nitric Oxide Synthase 2. *The Journal Of Neuroscience*, 28(7), 1537-1545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5066-07.2008>
- Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K. J., Wolfer, D. P., Welzl, H., Gall, D., Schiffmann, S. N., & Schwaller, B. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Translational Psychiatry*, 5(3), e525-e525. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.19>
- Xia, F., Richards, B. A., Tran, M. M., Josselyn, S. A., Takehara-Nishiuchi, K., & Frankland, P. W. (2017). Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27868>
- Zetterberg, H., & Mattsson, N. (2014). Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Review Of Neurotherapeutics*, 14(6), 621-630. <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.915740>
- Zhang, H., Ben Zablah, Y., Liu, A., Lee, D., Zhang, H., Meng, Y., Zhou, C., Liu, X., Wang, Y., & Jia, Z. (2021). Overexpression of LIMK1 in hippocampal excitatory neurons improves synaptic plasticity and social recognition memory in APP/PS1 mice. *Molecular Brain*, 14(1), 121-121. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00833-3>
- Zhang, C., Kuo, C. -C., Moghadam, S. H., Monte, L., Campbell, S. N., Rice, K. C., Sawchenko, P. E., Masliah, E., & Rissman, R. A. (2016). Corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonism mitigates beta amyloid pathology and cognitive and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 12(5), 527-537. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.09.007>
- Zhang, L., Chen, C., Mak, M. S. H., Lu, J., Wu, Z., Chen, Q., Han, Y., Li, Y., & Pi, R. (2020). Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 431-458. <https://doi.org/10.1002/med.21624>

- RESEARCH MODELS Tg2576/Tau(P301L) (APPSwe-Tau)* [Online].
<https://www.alzforum.org/research-models/tg2576taup3011-appswe-tau>
- RESEARCH MODELS: NSE-APP751: NSE-APP751* [Online].
<https://www.alzforum.org/research-models/nse-app751>
- (2009). *Prague: What Say You, Alois—Should It Be “Alzheimer-Fischer” Disease?: What Say You, Alois—Should It Be “Alzheimer-Fischer” Disease?* [Online].
<https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/prague-what-say-you-alois-should-it-be-alzheimer-fischer-disease>
- (2023). *F00-F09 - Organické duševní poruchy včetně symptomatických* [Online].
- (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1598-1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- (2024). *Rising Leqembi Prescriptions Are Straining Clinic Capacity* [Online].
<https://www.alzforum.org/news/research-news/rising-leqembi-prescriptions-are-straining-clinic-capacity>
- B6.Cg-Tg(APPswe,PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax*[Online]. <https://www.jax.org/strain/005864>
- Chemogenetics Guide*
[online]<https://www.addgene.org/guides/chemogenetics/#experiment>
- APPSwe/PSEN1dE9 (C57BL6)* [Online].