

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Bc. Eva Svobodová

**Porovnání transgenního a streptozotocinového potkaního modelu
Alzheimerovy choroby: validace systému IntelliCage
pro behaviorální fenotypizaci**

Comparison of transgenic and streptozotocin models of Alzheimer
in rats: validation of IntelliCage system for behavioral
phenotypization

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Petr Telenský, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Petrovi Telenskému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a rady při zpracování této práce. Velké poděkování patří také Mgr. Martinovi Kocourkovi, který mi v laboratoři pomáhal s veškerými technickými záležitostmi a opravami, a to kdykoli bylo potřeba; a Mgr. Petře Pohanové, která mi ochotně pomáhala s experimenty, na které jeden člověk nestačil.

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 dne:

.....

Eva Svobodová

Abstrakt

U zvířecích modelů pro výzkum Alzheimerovy choroby jsou vyvolávány kognitivní insuficience, které odpovídají příznakům nemoci a projevují se v různém věku nebo intervalu po zákroku. Zvířata jsou pak testována zavedenými behaviorálními testy, které trvají řádově minuty a odehrávají se většinou v pasivní části dne zvířete a zvíře při nich zažívá určité množství stresu.

Naše práce prezentuje validaci potkaního systému IntelliCage, kde testovaní jedinci žijí přirozeně ve skupině a data jsou měřena kontinuálně celých 24 hodin. Přesto je možné testování nastavit individuálně pro každé zvíře či testovanou skupinu zvlášť. Se zvířaty se nemanipuluje, proto výsledky testů nejsou ovlivněny nepřirozenou hladinou stresu zvířete.

Pomocí potkaní IntelliCage jsme testovali ranné kognitivní poruchy u transgenního modelu TgF344-AD ve věku 6 - 8 měsíců a dva nejčastěji se vyskytující protokoly streptozotocinového modelu – jedna intracerebroventrikulární dávka v množství 3mg/kg a dvě dávky v rozmezí 48 hodin v množství 3mg/kg. Výsledky jsme porovnali s klasickým testem Morrisova vodního bludiště (MWM).

V testu MWM se transgenní zvířata neodlišovala od kontrol v žádném parametru a u streptozotocinového modelu měla signifikantně horší výsledky pouze skupina se dvěma dávkami streptozotocinu. Oproti tomu v IntelliCage se transgenní zvířata signifikantně odlišovala v nižším počtu návštěv napájecích rohů i v nižším počtu napití oproti kontrolám. Obě streptozotocinové skupiny se v IntelliCage signifikantně odlišily od kontrol v nižším počtu napití.

Ke konečné interpretaci všech získaných dat z IntelliCage bude potřeba další testování, ale už nyní můžeme říct, že testování pomocí IntelliCage je senzitivnější v určení behaviorálního fenotypu zvířat v porovnání s MWM.

Klíčová slova

Alzheimerova choroba; IntelliCage; transgenní model TgF344-AD; streptozotocinový model; Morrisovo vodní bludiště

Abstract

Animal models of Alzheimer's disease display cognitive insufficiencies which mimic human symptoms and occur at a given age or post-treatment time. Animals are typically tested using canonical behavioral tests, lasting minutes and taking place mostly in the non-active period of the daily cycle. Animals are exposed to certain amounts of manipulation-induced stress.

Our work represents a validation study for the rat behavioral system IntelliCage. The tested individuals live freely in a group and their behavior is monitored continuously. It is however possible to set up individual tests for each animal or a group of animals. The rats are not subject to human manipulation and hence the results are not affected by manipulation-induced stress.

We tested early cognitive impairment in the transgenic rat model TgF344-AD at 6 - 8 months of age. Further, we tested two most common protocols of the streptozotocin model, i.e. single dose of intracerebroventricular 3 mg/kg streptozotocin and double dose 48 hrs apart. Results were compared with the canonical Morris Water Maze (MWM) test.

In the MWM test, transgenic animals did not differ from controls in any of the studied parameters. The streptozotocin model displayed a deficit only in the double dose group. However in the IntelliCage, transgenic animals displayed reduced number of corner visits as well as licks compared to wildtype controls. Both streptozotocin treated groups displayed a significantly reduced number of licks in the IntelliCage.

While more experiments are needed to explain the observed data, it can be concluded that behavioral testing in the IntelliCage system was more sensitive in determining the behavioral phenotype in both models as compared to the canonical MWM test.

Key words

Alzheimer disease; IntelliCage; transgenic model TgF344-AD; streptozotocin model, Morris water maze

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Alzheimerova choroba	2
2.1. Dělení AD.....	2
2.2. Rizikové faktory sporadické formy AD	2
2.2.1. Genetické rizikové faktory	3
2.3. Diagnostika AD	3
2.4. Léčba AD.....	4
3. Molekulární podstata Alzheimerovy choroby	4
3.1. Amyloidový prekurzorový protein	4
3.1.1. Dlouhodobá potenciace (Long-term potenciaci – LTP)	6
3.1.2. Štěpící dráha η	6
3.2. Apolipoprotein E	7
3.3. Tau protein.....	9
3.3.1. Axonální transport.....	10
3.4. Metabolismus glukózy v CNS	11
3.4.1. Inzulínové receptory v CNS	12
3.4.2. Inzulínová signalizace	12
4. Animální modely pro výzkum Alzheimerovy choroby	14
4.1. Vybrané animální transgenní modely AD	14
4.1.1. Myší model 3xTg	15
4.1.2. Myší model 5xFAD.....	15
4.1.3. Potkaní model TgF344-AD	15
4.1.4. Potkaní model McGill-R-Thy1-APP.....	16
4.2. Vybrané animální modely s chemicky indukovanou AD.....	16
4.2.1. Streptozotocin.....	16
4.2.2. Skopolamin.....	17
5. IntelliCage	17
5.1. Struktura IC	18
5.2. Vybrané IC testy	19
5.2.1. Adaptace (FA – free adaptation), habituace	19
5.2.2. Učení na preferované místo (Place preference – PP)	20
5.2.3. Cirkadiánní aktivita	21
5.2.4. Potkaní IC.....	21

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
6. Cíle experimentální práce	23
7. Materiál	24
7.1. Zvířata	24
7.2. Přístroje a nástroje	24
7.3. Chemikálie	24
7.4. Software	25
8. Metodika	25
8.1. Morrisovo vodní bludiště	25
8.1.1. Test plavby na viditelný ostrůvek	25
8.1.2. Nácvik pozice platformy	25
8.1.3. Probe test	26
8.2. Zpracování dat z MWM	26
8.3. Intracerebroventrikulární aplikace streptozotocinu	27
8.4. IntelliCage	29
8.4.1. Programování IC	29
8.4.1.1. Údržbové časové okno	30
8.4.2. Načipování zvířat	30
8.4.3. Kontrola zvířat	31
8.5. Zpracování dat z IntelliCage	31
9. Výsledky	32
9.1. Chování transgenního modelu TgF344-AD v prostředí IntelliCage	32
9.1.1. Morrisovo vodní bludiště	32
9.1.2. IntelliCage	35
9.1.2.1. Free adaptation	35
9.1.2.2. Place preference	40
9.2. Chování streptozotocinového modelu v prostředí IntelliCage	41
9.2.1. Morrisovo vodní bludiště	41
9.2.2. IntelliCage	45
9.2.2.1. Free adaptation	45
10. Diskuse	48
10.1. Chování transgenního modelu TgF344-AD v prostředí IntelliCage	48
10.2. Chování streptozotocinového modelu v prostředí IntelliCage	49
11. Závěr	51
12. Seznam zkratk	52
13. Seznam použité literatury	54

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. Úvod

Alzheimerova choroba (Alzheimerova demence - AD) je chronické a progresivní neurodegenerativní onemocnění mozku, které vede k atrofii mozkové tkáně, a s ní spojenému chronickému zánětu, a odumírání neuronů. Nemocný trpí postupným zhoršováním paměti a kognitivních funkcí, které vede až ke stádiu těžké demence a smrti. Onemocnění je dosud neléčitelné.

AD nejčastěji postihuje lidi nad 65 let věku, kdy se objevují první symptomy. Ve věku nad 65 let má člověk pravděpodobnost rozvoje nemoci asi 3 %, ve věku nad 85 let je to pak přes 30 %. Výskyt choroby u mladších jedinců (pod 65 let) je ojedinělý, tvoří přibližně 3 % případů ze všech nemocných (Alzheimer's Asociation, 2019).

1 ze 3 seniorů starších 65 let umírá s AD nebo jinou formou demence, počet zemřelých na AD se od roku 2000 zvýšil o 89 %. Na Alzheimerovu chorobu umírá více lidí, než na rakovinu prsu a prostaty dohromady (Alzheimer's Asociation, 2020).

Předpokládá se, že na světě žije 44 milionů lidí s AD a příslušnými příznaky demence. AD se vyskytuje nejvíce v západních zemích – západní Evropě a Severní Americe a nejméně častá je v Subsaharské Africe. Alzheimerovou chorobou onemocní nejpravděpodobněji Afroameričané, následně Hispánci, a nakonec běloši, a to s pravděpodobností v poměru 2:1,5:1. Přibližně 2/3 nemocných jsou ženy. Prevalence AD se u osob nad 65 let podle National Institute On Aging, USA zdvojnásobí každých 5 let a odhaduje se, že do roku 2050 bude jen v USA trpět AD 16 milionů lidí (Alzheimer's Asociation, 2020).

2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progredující onemocnění, které má několik fází. První fází AD je tzv. mírná kognitivní porucha (Mild Cognitive Impairment – MCI). Je to samostatné postižení, které nemusí vést k rozvoji AD, zároveň je však vždy jejím prvním stádiem. V tomto stádiu jsou potíže jen lehké, ale již měřitelné a diagnostikovatelné. Jedná se o stav, který se nachází mezi předpokládaným běžným zhoršením kognitivních funkcí během stárnutí a výrazným zhoršením při demenci. Nemocný má problémy s pamětí, soustředěním, rozhodováním či orientací, stále se však nejedná o demenci a MCI člověku nebrání v každodenních aktivitách a soběstačnosti (“Mild cognitive impairment - Symptoms and causes - Mayo Clinic,” 2021). Mezi první příznaky AD patří i depresivní stavy.

Následuje stádium demence. AD je nejčastější příčinou demence a to ze 60 – 80 % (Alzheimer’s Association, 2020). Demence je definována jako soubor symptomů - zhoršená paměť a vyjadřování, špatné tvoření úsudků a rozhodování, snížená schopnost řešit problémy - komplikující až znemožňující samostatné vykonávání běžných každodenních úkonů.

2.1. Dělení AD

AD se dělí podle věku, kdy je nemoc diagnostikována, a to na formu s časným začátkem (EOAD - Early-onset Alzheimer’s disease) před 65. rokem života a na formu s pozdním začátkem (LOAD - late-onset Alzheimer’s disease) po 65. roce života (Masters *et al.*, 2015). V naprosté většině případů mají tyto dvě formy i odlišnou etiologii.

Jedná se o familiární, tedy dědičnou formu a sporadickou formu. Familiární forma vykazuje klasickou Mendelovskou autosomálně dominantní dědičnost (Talwar *et al.*, 2015). Téměř všechny formy EOAD jsou familiární a většina forem LOAD je sporadická (Sheppard & Coleman, 2020)

2.2. Rizikové faktory sporadické formy AD

V manifestaci AD se uplatňuje vliv prostředí i dědičnost. Největší rizikový faktor je věk, který významně zvyšuje pravděpodobnost vzniku onemocnění i u dalších rizikových faktorů. Cukrovka 2. typu je rizikový faktor skrze vytvoření inzulínové rezistence (viz kapitola 3.4.2.)

2.2.1. Genetické rizikové faktory

Mutace v genu pro amyloidový prekursorový protein (APP, viz kapitola 3.1.) způsobuje EOAD. Tato mutace byla objevena jako první autosomálně dominantní příčina AD v roce 1991 (Goate *et al.*, 1991).

V dnešní době známe přes 50 mutací v APP genu způsobujících přibližně 10% familiárních AD. Například Londýnská mutace (Eckman *et al.*, 1997), Švédská mutace (Mullan *et al.*, 1992), mutace z Indiany (Murrell *et al.*, 1991) apod. Mutace v APP genu vedou ke zvýšené tvorbě amyloidu β (A β) a následnému ukládání A β plaků (viz kapitola 3.1.).

Gen pro Apolipoprotein E (ApoE, viz kapitola 3.2.) ve formě alely E4 (ApoE4) je dalším rizikovým faktorem pro LOAD. U jedinců s touto alelou se nemusí rozvinout AD, nicméně většina pacientů trpících sporadickou AD má tuto alelu. Homozygotní jedinci se dvěma alelami ApoE4 mají riziko propuknutí AD 8 – 12x vyšší než homozygotní jedinci se dvěma alelami ApoE3 (Jansen *et al.*, 2015). ApoE je hlavní přenašeč cholesterolu, který zajišťuje transport lipidů v nervové soustavě. Podílí se také na synaptické plasticitě (Mahley *et al.*, 2009) a glukózovém metabolismu a funkci mitochondrií (Chang *et al.*, 2005). Skrze všechny tyto dráhy může docházet k ovlivnění AD.

Mutace v genech pro membránové proteiny presenilin 1 a presenilin 2 (viz kapitola 3.1.) způsobují EOAD.

Downův syndrom – trisomie 21. chromozomu – je také rizikovým faktorem (Lai & Williams, 1989), jelikož se 21. chromozomu nachází gen pro APP (Goldgaber *et al.*, 1987).

2.3. Diagnostika AD

Pro diagnózu AD slouží série vyšetření a testů. Nejprve se zjišťuje rodinná anamnéza související s AD, hlavně výskyt demence a cukrovky 2. typu. Rodinní příslušníci jsou dotazováni na změny v chování pacienta a problémy s rozhodováním, jednáním a pamětí. Poté přichází na řadu kognitivní testy a fyzické a neurologické vyšetření. Lékař vyšetří reflexy, svalový tonus, schopnost a stav chůze, koordinaci pohybů a balanci. Kognitivními testy se odhalí demence, zobrazovacími metodami pak atrofie mozku, amyloidové plaky, hypometabolismus a hyperfosforylovaný tau protein, které odliší AD od demence jiného původu (Alzheimer's Asociation, 2020; "Alzheimer's disease - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic," 2021).

2.4. Léčba AD

Jelikož není známá ani přesná etiologie choroby, nelze AD v současné době vyléčit. Existuje pouze symptomatická léčba, která spolu se zdravým životním stylem oddaluje závažnější stádia nemoci. Inhibitory cholinesterázy zvyšují cholinergní signalizaci na synapsi a tím pomáhají zachovat koncentraci a paměť (Drachman & Leavitt, 1974). Patří mezi ně léky Donepezil, Rivastigmin, Galantamin.

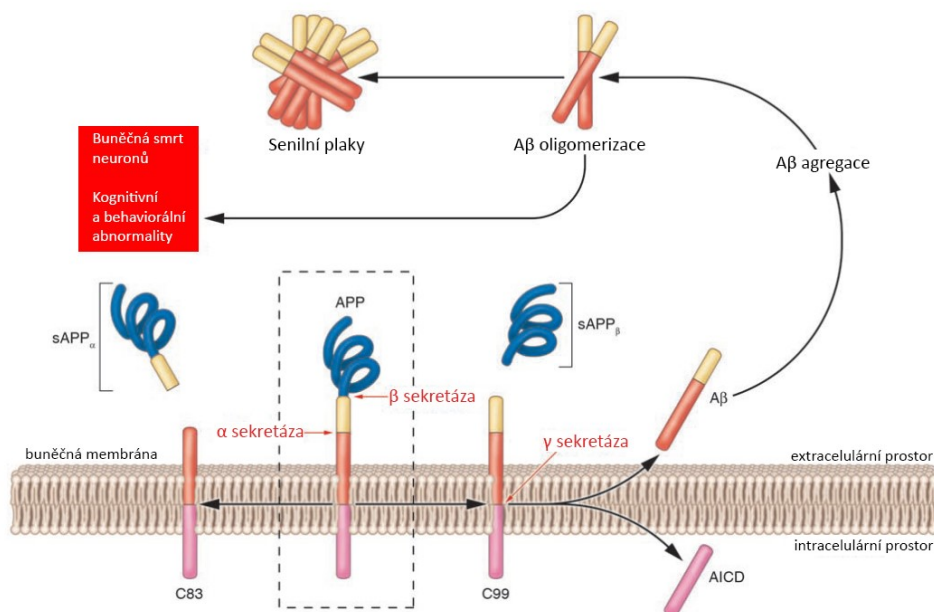
Memantin působí na glutamátergní signalizaci, blokuje NMDA receptory a tím snižuje neuronální excitotoxicitu (Reisberg *et al.*, 2003), která je rovněž zapojena do etiologie AD. Podává se hlavně pacientům s nesnášenlivostí k inhibitorům cholinesterázy.

3. Molekulární podstata Alzheimerovy choroby

Etiologie AD je stále neznámá, proto nelze zmínit všechny molekulární mechanismy vedoucí k patofyziologickým nálezům u nemocných. Jsou zde uvedeny ty dráhy / proteiny / geny, a jejich zapojení do etiologie AD, jejichž patologie dává podklad pro ty nejrozšířenější a nejuznávanější hypotézy.

3.1. Amyloidový prekurzorový protein

Ve zdravém organismu se v nervové tkáni nachází integrální membránový glykoprotein – amyloidový prekurzorový protein. Jeho gen byl popsán v roce 1987 (Goldgaber *et al.*, 1987) a nachází se na 21. chromozomu. APP obsahuje jednu transmembránovou doménu, dlouhou extracelulární část a krátký cytoplazmatický úsek. Jeho fyziologická funkce v nervové tkáni je receptorová (Weidemann *et al.*, 2002), reguluje synaptogenezi (Moya *et al.*, 1994), indukuje růst axonů (Allinquant *et al.*, 1995) a adhezuje k extracelulární matrix (Breen *et al.*, 1991), například ke kolagenu (Breen, 1992), či heparansulfátu (Narindrasorasak *et al.*, 1991). Po usazení APP do membrány buňky dochází k několikanásobnému proteolytickému štěpení, kterým vznikají krátké peptidy s různou signální funkcí. Štěpící proteiny jsou sekretázy α , β , a γ . Nejprve je APP rozštěpen sekretázou α nebo β . Štěpením α a β sekretázami vznikají rozpustné deriváty APP zvané APPs α a APPs β , které jsou uvolňovány extracelulárně. Vznikají také C-terminální fragmenty (CTF) zvané APP-CTF α (neboli C83) a APP-CTF β (neboli C99), které se podílí na buněčné signalizaci (Lu *et al.*, 2003) (Obr. 1).



Obr. 1: Štěpení APP a ukládání A β . Intermembránový APP podléhá dvěma kompetitivním štěpným drahám, které začínají sekretázou α (proces směrem doleva od APP v rámečku) nebo sekretázou β (proces směrem doprava od APP v rámečku). Produkty sekretázy α jsou APP α a C83 (také známé jako APP-CTF α) a produkty sekretázy β jsou APP β a C99 (někdy označované jako APP-CTF β). Všechny karboxylové fragmenty (C83 i C99) jsou substrátem pro sekretázu γ . Jejím štěpením vzniká intracelulární protein AICD a A β , který se následně agreguje do oligomerů, které se ukázaly jako nejvíce neurotoxické. Oligomery se skládají do senilních plaků, které, navzdory problematickému ukládání, jsou poměrně inertní (Gandy, 2005).

APP-CTF β mohou ale být ještě v membráně dále štěpeny sekretázou γ . Pravděpodobně převážně z tohoto štěpení vznikají produkty podílející se na vzniku amyloidových plaků. Proto je proces štěpení sekretázou γ jedním z těch v současné době slibnějších cílů výzkumu a je snaha rozklíčovat celý proces a chyby v něm. Katalytickou podjednotku γ sekretázy tvoří dva proteiny – presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2), skrze které sekretáza štěpí APP na dvou místech. Produktem je v cca 90 % případů β amyloid obsahující 40 aminokyselin, označovaný A β 40. V cca 10 % ale vzniká A β obsahující 42 aminokyselin, označovaný A β 42. Tato forma je více toxická, více hydrofobická a ukládá se snadněji do fibrilární struktury, která následně vede k tvorbě A β plaků (Lührs *et al.*, 2005).

Preseniliny jsou intermembránové proteiny bohaté na hydrofobní oblasti, díky čemuž je těžší určit jejich přesnou strukturu. Gen pro presenilin 1 se nachází na chromozomu 14 a gen pro presenilin 2 na chromozomu 1 (Sherrington *et al.*, 1995). Mutace v genu pro presenilin 2 jsou vzácné, proto je cílem studií hlavně presenilin 1. Preseniliny jsou zásadní pro neurogenезi, neuroprotekcii a formování axiálního skeletu během embryonálního vývoje (Shen *et al.*, 1997).

3.1.1. Dlouhodobá potenciace (Long-term potenciaci – LTP)

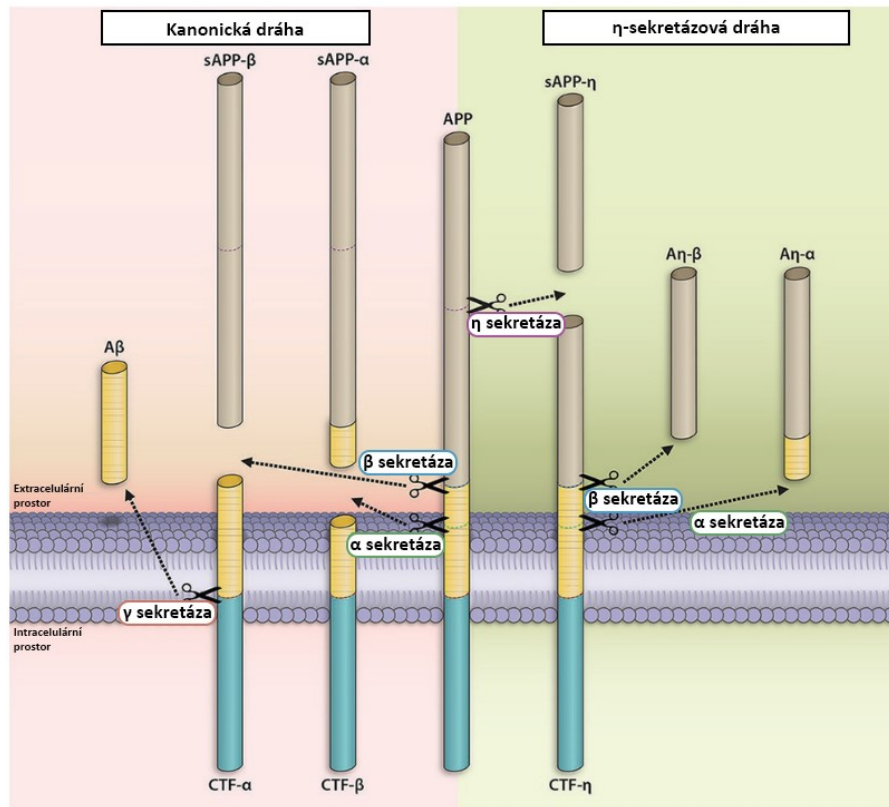
LTP je základ paměťové stopy a jejího trvání. Presynaptická deprese presenilinů mění krátkodobou plasticitu synapse. Pravděpodobně negativně ovlivňuje hladinu vápenatých kationtů v presynaptickém zakončení neuronu (Zhang *et al.*, 2009), tím dochází k nižší vazbě presynaptických vesikulů k membráně a vylití jejich menšího množství do synaptické štěrbiny. Tak je negativně ovlivněna signalizace všemi neurotransmitery. Pokud je tímto neurotransmiterem glutamát, dochází k ovlivnění LTP.

Časná LTP, která trvá méně než hodinu, vzniká, když se glutamát postsynapticky váže na AMPA receptory (iontové kanály), které následně vpustí do postsynaptické buňky sodné kationty a buňka se depolarizuje. Depolarizace uvolní hořčnaté kationty z NMDA kanálů, tím je odblokuje a skrze ně dojde k vpuštění vápenatých kationtů do buňky. Vápenaté kationty aktivují Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kinázy a přes signalizační kaskádu dojde k zabudování více AMPA receptorů do postsynaptické membrány. Dochází tak ke zpětnovazebnému posilování celého procesu a dlouhodobé potenciaci na synapsi (Dudai, 2002). Pozdní LTP zahrnuje modulaci genové exprese, která ovlivňuje geny s ranou a pozdní odpovědí (Frey *et al.*, 1988).

Zde by tedy patologie presenilinů vedla nejen k formování plaků A β 42 (Citron *et al.*, 1997), ale přes ovlivnění LTP by způsobovala přímo jeden z příznaků nemoci, zhoršenou paměť.

3.1.2. Štěpící dráha η

V roce 2015 byla popsána nová štěpící dráha η . Štěpící protein sekretáza η je membránově vázaná metaloproteáza, která APP štěpí v extracelulární části proteinu. η štěpení následuje po štěpení α nebo β . Vznikají peptidy sAPP- η , CTF- η a A η - α či A η - β (Obr. 2). U A η - α (ne však u A η - β) byly popsány synaptotoxické účinky. Ve snaze vyvinout lék na AD se mimo jiné zkouší i ovlivnění tvorby A β přes různé inhibitory β sekretázy. Zde však nastává problém, protože působení inhibitoru β sekretázy vede ke zvýšeným hladinám CTF- η a synaptotoxického fragmentu A η - α . Dráha štěpení η totiž interferuje s inhibitory β -sekretázy, poměr A η - α se zvyšuje, a to jak in vitro, tak i in vivo. Tato nově identifikovaná štěpná dráha tak ukazuje, že užití inhibitorů β -sekretázy v léčbě Alzheimerovy choroby může mít dosud nečekané negativní důsledky (Willem *et al.*, 2015).



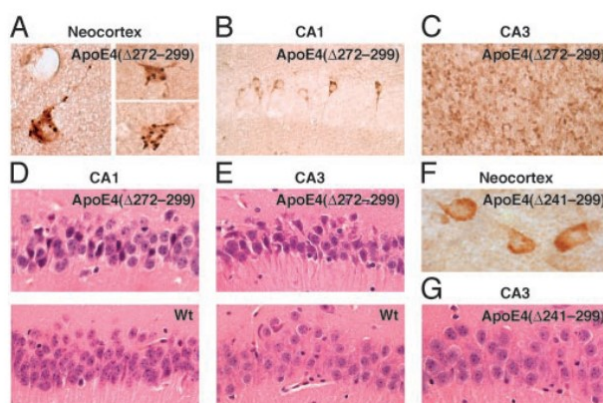
Obr. 2: Schéma štěpných drah APP. α či β sekretázová dráha se také nazývá kanonická dráha a produkuje již výše zmíněné peptidy (viz Obr. 1). Nově však byla popsána η -sekretázová dráha, jejíž produkty jsou v zeleném poli, sAPP- η a CTF- η . CTF- η dále podstupuje štěpení α či β sekretázou a tím vznikají A η - α či A η - β fragmenty (Tyan & Koo, 2015).

3.2. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je glykoprotein, který je sekretován v různých tkáních, převážně pak játrech a mozku. Jeho gen se nachází na chromozomu 19. V mozku je exprimován gliovými buňkami, hlavně astrocyty (Grehan *et al.*, 2001). Za určitých podmínek ho však mohou exprimovat i neurony, ale v menší míře (Xu *et al.*, 1999). ApoE je v krevním oběhu přítomen jako součást lipoproteinových částic – VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediate density lipoproteins) a některých HDL (high density lipoproteins). Má funkci ligandu v receptorově vázané endocytóze lipoproteinů, podílí se tak na transportu lipidů, vitamínů rozpustných v tucích a cholesterolu. V nervové soustavě je hlavním ligandem pro přenos cholesterolu do buněk a má tak nepostradatelnou úlohu při hojení tkáně, kdy jsou potřeba fosfolipidy i cholesterol pro reinervaci (Mahley *et al.*, 2009).

Lidský ApoE se vyskytuje v několika jedno nukleotidových polymorfismech, které jsou zastoupené konkrétními alelami a vedou ke vzniku různých isoform ApoE. Jedná se nejčastěji o isoformy ApoE2, ApoE3, ApoE4 (Nickerson *et al.*, 2000).

ApoE2 se špatně váže k buněčnému povrchu a považuje se za neuroprotektivní (Corder *et al.*, 1994), riziko vzniku AD snižuje (Zhao *et al.*, 2018), naopak ApoE3 a ApoE4 se váží k buňkám snadno (Weisgraber3 *et al.*, 1982). ApoE4 oproti ApoE3 v mnohem větší míře podstupuje následné proteolytické štěpení. C koncové fragmenty pak opouštějí sekreční dráhu, kterou buňka za normálních okolností vyloučí odpojený ApoE od lipidické části a tak může být znovu použit, a končí v cytosolu, kde působí neurotoxicky (Harris *et al.*, 2003). V některých neuronových buněčných kulturách byly ApoE4 fragmenty nejvíce koncentrovány uvnitř mitochondrií. Tímto jevem si autoři vysvětlovali mitochondriální disfunkce u neuronů syntetizujících ApoE4 (Chang *et al.*, 2005). Nahromaděné fragmenty ApoE4 byly pozorovány v mozcích transgenních myši exprimujících neuronální ApoE4 C terminální konce ($\Delta 272-299$), avšak zajímavé je, že nebyly pozorovány u transgenních myši, které sekretovaly ApoE4 v astrocytech. Tato zvířata byla vytvořena pomocí mikroinjektáže DNA konstruktů do vajíček kmene C57BL/6J. (Harris *et al.*, 2003) (Obr. 3).



Obr. 3: Neurodegenerace v mozku hemizygotní transgenní myši exprimující apoE4 v neuronech. Mozkové řezy 2-4 měsíce starých myši exprimují vysoké hladiny apoE4 ($\Delta 272-299$) (A-E) nebo apoE4 ($\Delta 241-299$) (F-G). Vzorky byly značeny anti-apoE4 protilátkami (A-C a F) nebo hematoxylin-eozinem (D, E a G). Původní kmen (Wild type – WT) sloužil jako kontroly (D a E). ApoE4 inkluze vidíme v oblasti kortikální (A) a hipokampálních CA1 (B) a CA3 (C). Neuronální degeneraci CA1 a CA3 oblastí hipokampu transgenních myši pozorujeme v horních částech D a E oproti kontrolám ve spodních částech D a E. A, C a F zvětšeno 600x; B, D, E a G zvětšeno 400x (Harris *et al.*, 2003).

ApoE4 fragmenty v neuronových kulturách ovlivňovaly i produkci A β . Neurony pod vlivem ApoE4 produkovaly mnohem více A β než buňky s ApoE3 (Ye *et al.*, 2005). Chang, Ma a kolektiv (2005) se zaměřili na to, jaký konkrétní úsek fragmentů ApoE4 neurotoxicitu způsobuje. Přišli na to, že celá délka ApoE4 (1-299 aminokyselin) a ApoE4 (1-240 aminokyselin) neurotoxické nejsou. Problém je v úseku ApoE4 (1-272). Je to část, kde se vyskytuje receptor vázající region spolu s lipidy vázajícím regionem. Receptor vázající region je zodpovědný za únik fragmentu ze sekreční dráhy a lipidy vázající region následně interaguje s mitochondriemi (Chang *et al.*, 2005).

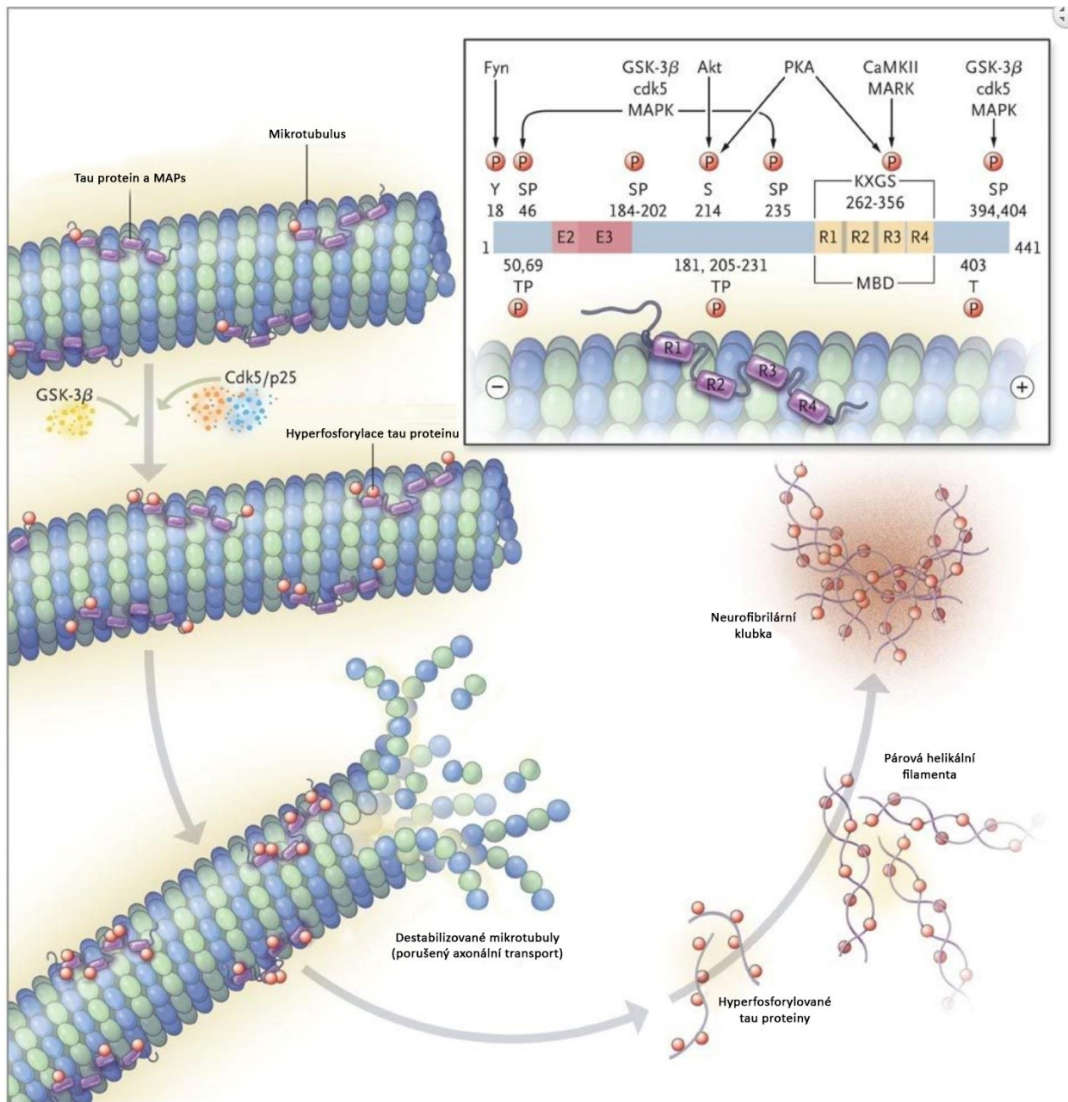
U lidí i zdraví jedinci s alelou ApoE4 (bez diagnostikované AD) vykazovali známky demence zhoršující se s pokročilým věkem (Deary *et al.*, 2002).

Zvýšená ApoE4 proteolýza a výsledná akumulace C-terminálních fragmentů v mozku také ovlivňuje fosforylaci Tau proteinu (Brecht *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2017).

3.3. Tau protein

Tau protein je kódován genem MAPT (microtubule-associated protein tau) na chromozomu 17 a jeho alternativním sestřihem vzniká šest vysoce rozpustných isoform. Jeho hlavním úkolem je stabilizace mikrotubulů v axonech neuronů centrální nervové soustavy (CNS). Tuto roli hrají i další proteiny z rodiny MAPs (microtubule-associated proteins), které jsou schopny tau protein zastoupit, což bylo dokázáno na myších s knockoutovaným MAPT genem, které vykazovaly normální imunohistochemii mozku. Také buněčné kultury neuronů vykazovaly normální růst axonů, přestože stabilita, a hlavně uspořádání mikrotubulů, bylo výrazně změněno. Zvýšená koncentrace MAP A1 proteinu naznačovala jeho možnou roli jako hlavního zástupce místo tau proteinu (Harada *et al.*, 1994).

Tau je fosfoprotein, jehož nejdelší isoforma má 79 serin-threonin fosforylačních pozic. Běžně je fosforylován na 30 z nich. Pokud však dojde k hyperfosforylaci, afinita tau proteinu k mikrotubulu výrazně klesá. Tau protein se uvolňuje, struktura mikrotubulu se rozpadá (pokud není přítomen dostatek jiných MAPs) (Biernat *et al.*, 1993) a volný tau protein vytváří volná párová helikální filamenta, která se hromadí intracelulárně a tvoří útvary zvané neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles – NFTs) (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986), která působí neurodegeneraci (Obr. 4).



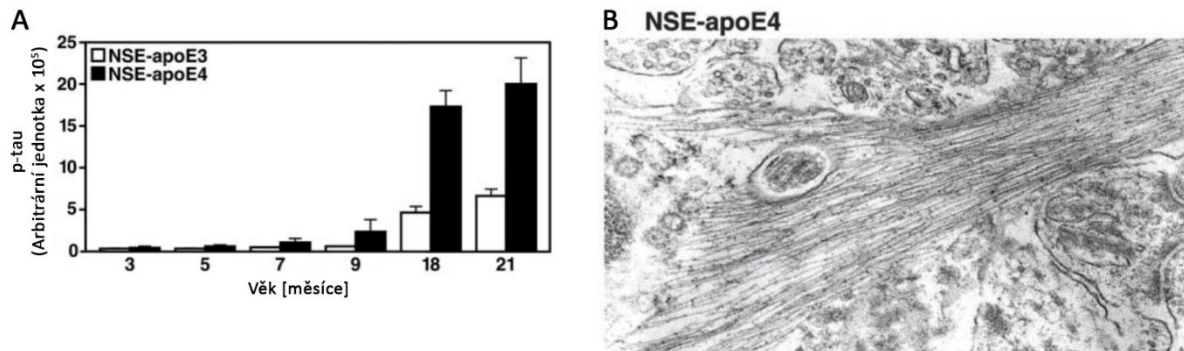
Obr. 4: Průběh hyperfosforylace tau proteinu. Hyperfosforylace tau proteinu (některé konkrétní signální dráhy vedoucí k fosforylaci konkrétních míst jsou ukázány v rámečku) vede k destabilizaci celého mikrotubulu. Tím je porušen axonální transport a hyperfosforylovaný (HF) tau protein je uvolněn do buněčné cytoplasmy, kde tvoří párová helikální filamenta až neurofibrilární klubka (“Tau Protein. Causes, symptoms, treatment Tau Protein,” 2021).

3.3.1. Axonální transport

Destabilizace a rozpad mikrotubulů má také zásadní dopad na axonální transport. Po mikrotubulech se pohybují tzv. molekulární motory, což jsou proteiny, které transportují váčky s nasycenými látkami, které jsou potřeba na jiném místě v buňce nebo složí k sekreci, jsou takto dopravovány i celé orgány, například mitochondrie. Kinesin se pohybuje k + konci mikrotubulu, který směřuje směrem od mikrotubuly organizujícího centra (MTOC) blízko jádra k buněčnému okraji, zajišťuje tedy anterográdní axonální transport. Dynein se pohybuje k – konci mikrotubulu, zajišťuje retrográdní axonální transport. Kromě některých neurotransmiterů jsou anterográdně transportovány i části mRNA, která se v některých případech translatuje až v axonálním zakončení. Anterográdně jsou

transportovány i mitochondrie potřebné pro tvorbu energie při silné synaptické aktivitě a zvýšené produkci proteinů. Pokud je při destabilizaci mikrotubulů ohrožen axonální transport, má to vliv na celé fungování synapse od přítomnosti dostatečného množství váčků neurotransmiteru až po energetické nedostatky způsobené nízkým počtem mitochondrií.

Důvodů patologické hyperfosforylace tau proteinu je několik. Jak již bylo řečeno, jedním z nich je ApoE4 produkované neuronovou tkání (glie produkující ApoE4 nevykazuje významně zvýšené ukládání tau proteinu) a jeho fragmentace - konkrétně C-koncové fragmenty (Brecht *et al.*, 2004). Brecht *et al.*, (2004) porovnává dva modely myši, jeden s ApoE3 a druhý s ApoE4 neuronální expresí (NSE-ApoE3 / NSE-ApoE4 kmen – neuron specific enolase promotor pocházející z kmene C57BL/6J) a na výsledcích vidíme nejen vliv ApoE4, ale i závislost ukládání tau proteinu na věku myši (Obr. 5).



Obr. 5: A: Na věku závislá akumulace fosforylovaného tau proteinu u myšičího transgenního kmene NSE-apoE4. Hodnota fosforylovaného tau zobrazeného pomocí western blotu s jedнокlonální protilátkou vzrůstá s věkem a dosahuje nejvyšších hodnot ve 21 měsících věku myši. U kmene NSE-apoE4, nesoucího alelu apoE4, jsou tyto hodnoty výrazně vyšší než u kmene NSE-apoE3 nesoucího alelu apoE3.

B: Fosforylovaná neurofilamenta v intraneuronálních formacích v hipokampu u 21 měsíců staré NSE-apoE4 myši značená anti-apoE a anti-p-NF imunofluorescencí (Brecht *et al.*, 2004).

Dalším důvodem je pak mutace přímo v genu MAPT. Dokládá to například zdařilá in situ transfekce lidské mutace genu MAPT zdravým potkanům do basálního předního mozku, která vedla ke vzniku fibril, tzv. „pretangles“ a později i klasických klubek tau proteinu. Transfekce myšim ukládajícím ve vysoké míře A β vedla k ukládání velkého množství tau proteinu do těchto plaků a taktéž k tvorbě vláken a „pretangles“ (Klein *et al.*, 2004).

3.4. Metabolismus glukózy v CNS

Insulin v CNS, jako jedna z prvních, zmiňuje studie Havrankové *et al.*, 1978. Měřili hladiny insulinu v mozku a oproti očekávání naměřili vyšší hodnoty než v plazmě. Jeho původ však byl nejasný, protože se předpokládalo, že inzulin je produkován pouze slinivkou a neprostupuje přes hemato-encefalickou bariéru (HEB). Následně byla inzulinová mRNA detekována

v periventriculárním nukleu hypotalamu, což svědčilo o tvorbě inzulínu přímo v mozku (Young, 1986). Později byla inzulínová mRNA potvrzena v CA1 a CA3 oblasti hipokampu, gyru dentatu a ve vrstvě granulárních buněk v bulbus olfaktorius (Devaskarss *et al.*, 1994). Také se ukázalo, že hladiny inzulínu v mozku jsou nezávislé na změnách hladiny inzulínu v krvi (Havrankova *et al.*, 1979).

3.4.1. Inzulínové receptory v CNS

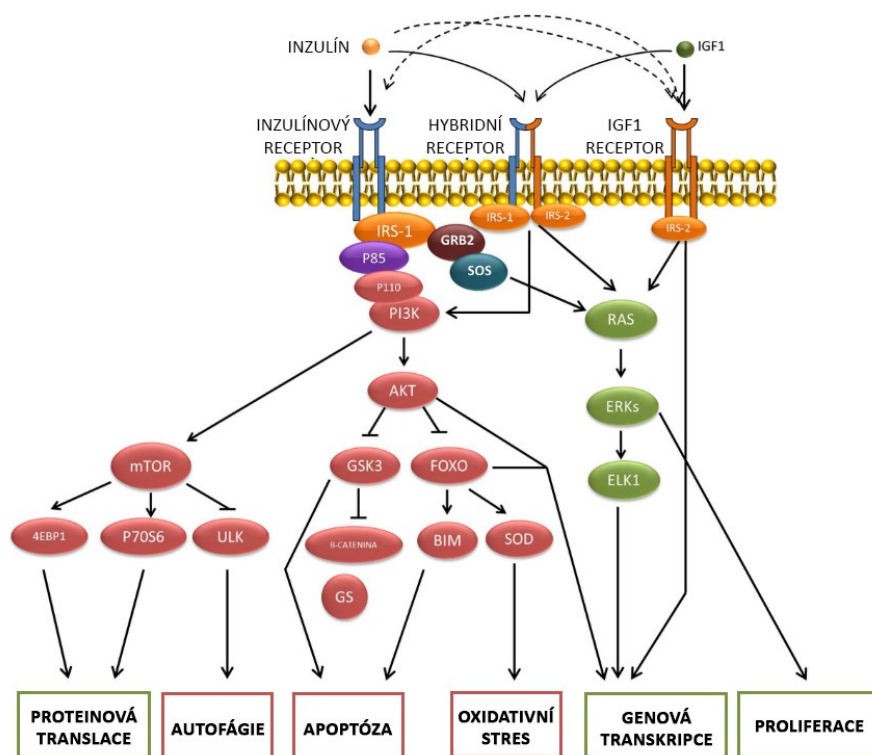
Inzulínový receptor (IR) je kódován jediným genem na 19. chromozomu. Alternativním sestřihem vznikají 2 isoformy prekurzorového proteinu IR-A a IR-B, které jsou tkáňově specifické (Seino *et al.*, 1989). U lidí je nejrozšířenější forma IR-B, vyskytuje se v insulin-senzitivních tkáních, jako je příčně pruhovaná svalovina, tuková tkáň, játra. V CNS pak najdeme IR-A formu (Moller *et al.*, 1989). IR-A forma receptoru se vyznačuje vyšší glykosylací a afinitou k ligandu. Liší se i v regulaci, systémová forma receptoru je inzulínem zpětnovazebně potlačena, na centrální IR nemá inzulín zpětnovazebně vliv žádný (Hopkins & Williams, 1997).

Inzulín se kromě IR váže také na insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptory (IGF-1r). Ty se vyskytují v potkaním mozku nejvíce v thalamu, glomerulární vrstvě bulbus olfaktorius, eminentia medialis hypothalamu, hypofýze a mozečku. Na těchto místech koncentrací převyšují IR. IR naopak dominují v oblastech hypothalamu, amygdaly, CA1 hipokampu a ve většině bulbus olfaktorius (Werther *et al.*, 1989). U lidí se potvrdil výskyt IR v oblastech hypothalamu, kůry a mozečku v mozcích posmrtně získaných ze subjektů bez diagnostikovaného diabetu (Hopkins & Williams, 1997). Některé části mozku vykazují různé zastoupení IR a IGF-1r během embryonálního vývoje a v dospělosti. Vysoká koncentrace IR v thalamu, striatu a jádrech mozkového kmene během embryonální fáze oproti řídkému zastoupení v dospělosti ukazuje na roli ve vývinu jedince (Kar *et al.*, 1993). Taktéž systémové podání inzulínu nově narozeným potkanům zvyšuje aktivitu ornitinové dekarboxylázy (která podporuje biosyntézu polyaminů), což je indikátor růstové stimulace (Roger & Fellows, 1980).

3.4.2. Inzulínová signalizace

IGF-1 reguluje růst a má anabolické funkce, inzulín stimuluje vstup glukózy do buněk indukci přesunu glukózového transportéru GLUT 4 z Golgi do plasmatické membrány (Agrawal *et al.*, 2018). IR i IGF-1r jsou receptory s tyrozin kinázovou aktivitou. Po navázání ligandu se intracelulární část receptoru autofosforyluje a tím se zahájí signální proces. Následují proteiny IRS-1 (insulin receptor substrate 1) a IRS-2 (insulin receptor substrate 2). Signalizace IRS-1 vede k potlačení autophagie, apoptózy a ke snížení oxidativního stresu. Zároveň podporuje proteinovou translaci a tím dochází k tělesnému růstu. IRS-2 fosforyluje RAS proteiny a tato dráha vede ke genové transkripci a proliferaci

tkáně (převážně v mozku), kontrole tělesné hmotnosti a glukózové homeostáze (White, 2003) (Obr. 6). V mozkové tkáni dochází k růstu, dozrávání a regeneraci axonů (Xu *et al.*, 2004) i neuritů (Ghasemi *et al.*, 2013). Na buněčných kulturách bylo dokázáno, že inzulínem indukovaná proliferace probíhá u potkaních i lidských astrocytů (Velázquez *et al.*, 2009). IGF-1 signalizace také interaguje s cholinergním systémem, IGF-1 zvyšuje senzitivitu granulárních buněk na glutamát (Calissano *et al.*, 1993). Nedostatečná inzulínová signalizace vede k nadměrné aktivitě kinázy GSK3 (Fraser *et al.*, 2001) a cyklin dependentní kinázy 5 (cdk-5), které se podílejí na hyperfosforylaci tau proteinu (Liao *et al.*, 2004). I genová exprese tau proteinu je řízena přes inzulínovou a IGF signalizaci, inzulínová rezistence tedy vede nejen k hyperfosforylaci tau proteinu, ale i k jeho nedostatečné expresi (De La Monte *et al.*, 2011).



Obr. 6: Signální dráhy indukované inzulínem nebo IGF-1 přes inzulínové, IGF-1 nebo hybridní receptory. Signalizace inzulínem či IGF-1 vede ke genové transkripci, proteinové translaci a obecně k proliferaci vůbec. Potlačena je naopak autofágie a přes blokace GSK3 kinázy a FOXO kinázy je tlumena i apoptóza a produkty oxidativního stresu (Blázquez *et al.*, 2014).

Z výše uvedeného nám vyplývá, že při narušené inzulínové signalizaci, ke které dochází například při inzulínové rezistenci, můžeme pozorovat zvýšený oxidativní stres a apoptózu, které mohou vést k chronickému zánětu a neurodegeneraci. Dochází k narušení cholinergního systému a tím procesu zapamatování a při poškození tkáně je zhoršena regenerace. Tyto příznaky pozorujeme u pacientů s cukrovkou 2. typu (typická a známá inzulínová rezistence) i u pacientů s AD.

V mozku pacientů s AD byl nalezen snížený výskyt receptoru aktivovaného peroxizomovým proliferátorem (peroxisome proliferator activator receptor - PPAR) delta (De La Monte & Wands, 2006). PPAR hraje důležitou roli při modulaci genové exprese stimulované inzulinem (Collino *et al.*, 2008). Aktivovaný PPAR delta má také protizánětlivý efekt a při pokusu na myším modelu AD bylo zjištěno i méně usazených amyloidových plaků (Kalinin *et al.*, 2009). U myši bez PPAR byly zvýšeny hladiny zánětlivých markerů CNS, zvýšen oxidativní stres mozkové tkáně a vyšší výskyt A β 42 plaků a NFTs (Barroso *et al.*, 2013).

Frölich *et al.* (1998) poprvé zkoumali na lidské mozkové tkáni, zda se s věkem či onemocněním AD nějak změní koncentrace inzulinu v mozku, koncentrace IR a IGF-1r, jejich afinita k ligandu a míra autofosforylace těchto receptorů. Porovnávali 3 skupiny, a to mozky lidí s AD, zdravé kontroly odpovídajícího věku a zdravé kontroly mladších jedinců ve středních letech. Zjistili, že množství inzulinu a c-peptidu (peptid spojující 2 inzulinové řetězce ve fázi proenzymu, jeho množství tedy koreluje s uvolňovaným nově štěpeným inzulinem) v mozku ve všech oblastech kůry s věkem klesá u AD jedinců i u zdravých jedinců, to znamená, že pravděpodobně nesouvisí přímo s postižením AD, i když u AD bylo ještě nižší (ne však statisticky významně). Koncentrace IR s věkem klesá pouze ve frontální a parietální kůře, ne však v temporální a okcipitální kůře. Afinita k ligandu zůstává u IR nezměněná. Koncentrace IGF-1r byla ve všech zmíněných částech mozku s věkem nezměněná, stejně, jako jeho afinita k ligandu. AD jedinci měli oproti stejně starým kontrolám koncentraci receptorů naopak zvýšenou s nezměněnou afinitou. Změna koncentrace zde mohla znamenat upregulaci ve snaze kompenzovat nedostatečnou inzulinovou signalizaci. Co však bylo zásadní, s věkem se snížila míra autofosforylace obou receptorů ve všech uvedených částech mozku a u AD pacientů bylo toto snížení ještě výraznější. Bylo tedy objasněno pojitko (pro oba receptory, všechny skupiny i všechny kroky inzulinové signalizace), kde je celá kaskáda narušena.

4. Animální modely pro výzkum Alzheimerovy choroby

4.1. Vybrané animální transgenní modely AD

Poté, co byly určeny konkrétní molekulárně genetické mechanismy způsobující patologii pozorovanou u AD, byly některé mutace přeneseny i do zvířecích modelů pro možnost výzkumu vedoucího k objasnění a možné léčbě AD. Tyto modely by se tedy měly přiblížit familiárním formám AD. Jelikož však ani familiární / EOAD forma nemoci není čistě geneticky způsobené onemocnění a stále zde mají pravděpodobně vliv další metabolické a vnější faktory, musíme myslet na to, že procesy ve transgenních zvířecích modelech nejsou přesnou kopií procesů v člověku s familiární AD.

4.1.1. Myší model 3xTg

Myší modely jsou nejpoužívanější animální modely vůbec. Myší APP má 97% sekvenční homologii s lidským APP (Klein *et al.*, 2004). Model 3xTg nese 3 lidské genové mutace v genomu původního kmene C57BL/6J. Jedna je KM670/671NL, tzv švédská mutace genu pro APP (APP^{sw}); druhá je P301L, mutace genu MAPT pro tau protein; třetí je M146V, mutace genu pro presenilin 1. V těchto zvířatech tak dochází ke kombinaci patologií AD, a to k tvorbě a ukládání A β , hyperfosforylaci tau proteinu a tvorbě a ukládání NFTs. Mutace v genu pro presenilin 1 ovlivní poměr A β 40 : A β 42 ve prospěch A β 42 (Citron *et al.*, 1997) a navíc může ovlivňovat LTP a tím paměť zvířat. První A β plaky byly detekovány v oblastech neokortexu, následně v CA1 oblasti hipokampu a objevily se ve věku okolo 6 měsíců myši. Ve 12 měsících věku byly pak změny patrné velmi významně a zasahovaly i do dalších částí mozku. V tomto věku se také objevily NFTs v CA1 neuronech. Zde bylo ukázáno na věku závislé ukládání A β a také rozdílný nástup patologií, kdy se A β plaky ukládaly mnohem dříve, než byly detekovatelná první NFTs (Oddo *et al.*, 2003).

4.1.2. Myší model 5xFAD

Tento model obsahuje 3 mutace v APP genu a to Švédskou, Floridskou a Londýnskou a pak 2 mutace v genu pro presenilin 1 – mutaci M146L a L286V. Původní kmen je C57BL/6J. Autoři se snažili vyvinout model který ukládá A β plaky v co nejnižším věku a také aby poměr A β 40: A β 42 byl co nejvíce ve prospěch A β 42. Zvířata vykazovala vysokou tvorbu A β 42 již od 1,5 měsíce věku, stejně tak výskyt A β plaků. A β plaky byly výrazně ukládány intraneuronálně i v extracelulární matrix (ECM). Neurodegenerace začala okolo 4 měsíců věku a maxima dosahovala okolo 9 měsíců věku. Marker neurodegenerace – komplex aktivované cyklin dependentní kinázy 5 s proteinem p25 – byl v tomto věku oproti kontrolám zvýšen na 150%. Stejně jako u ostatních modelů byl dokázán paměťový deficit stoupající s věkem a kognitivní nedostatečnost (Oakley *et al.*, 2006).

4.1.3. Potkaní model TgF344-AD

Tento model nese lidskou švédskou mutaci pro APP vedoucí k nadměrnému ukládání A β a lidskou mutaci v genu pro presenilin 1. Oboje nezávisle na sobě autosomálně dominantně způsobující EOAD. U potkanů dochází k chronickému zánětu, apoptotické ztrátě neuronů v kůře a hipokampu a zároveň ke kognitivním insuficiencím.

Potkani byli vyvinuti z kmene Fisher 344. Transgenní zvířata vykazovala 2,6x vyšší produkci APP^{sw} a 6,2x vyšší produkci mutovaného presenilinu 1 oproti endogennímu presenilinu 1. Byla zjištěna hyperaktivita vzrůstající s věkem a výrazně horší kognitivní výsledky v bludišti Barnesové, opět

zhoršující se s věkem. U transgenních zvířat byla zvýšená tvorba plaků nejen v mozkové tkáni, ale i v cévách mozku, což je známý fenomén i u AD pacientů – takzvaná cerebrální amyloidová angiopatie (CAA). Co se týká tau patogeneze, u žádné věkové kategorie (6, 15, 24 měsíců) nebyla pozorována NFTs, ale byl detekován hyperfosforylovaný tau protein (Cohen *et al.*, 2013).

4.1.4. Potkaní model McGill-R-Thy1-APP

Tento model byl vyvinut z kmene Wistar, aby obsahoval 2 mutace APP zároveň a to Švédskou mutaci a mutaci z Indiany (Murrell *et al.*, 1991) za pomoci promotoru *Thy1.2*. Autoři záměr vysvětlují tak, že ačkoli již existovalo několik transgenních modelů s mutacemi pro APP, žádný z nich nepokryl celé spektrum mutací APP zároveň a tak nedosahoval celé obdoby lidské AD. Tím, že autoři tvorbu mutovaného APP navíc podmínili a mohli řídit promotorem, dokázali, že exprese mutovaného genu koreluje s množstvím uložených A β plaků.

Tvorba APP v celé délce byla v transgenním mozku dvojnásobná. A β se usazoval nejprve v pyramidových neuronech kůry a v hipokampu a s věkem tato akumulace vzrůstala. Usazeniny byly detekovány ve všech vrstvách kůry a nejsilnější byly v oblasti ethorinální a piriformní kůry. V hipokampu pak byl A β usazen rovnoměrně ve všech oblastech. A β plaky obklopovala zánětlivá tkáň. Zánět se ale nevyskytoval okolo cév, což pravděpodobně vylučuje CAA. Kognitivní nedostatky byly pozorovány pomocí Morrisova vodního bludiště (MWM) od 3 měsíců věku (Leon *et al.*, 2010).

4.2. Vybrané animální modely s chemicky indukovanou AD

Alzheimerovu chorobu můžeme modelovat i pomocí chemických látek, které po aplikaci centrálně (na konkrétní místo v mozku) nebo systémově indukují podobný patofyziologický stav, jako nastává při AD.

4.2.1. Streptozotocin

Transgenní zvířata dobře sloužila jako modely pro familiární AD (nikoliv pro sporadickou AD), zvláště v době, kdy hlavní hypotézou patofyziologie AD bylo ukládání amyloidových plaků. S příchodem dalších hypotéz, zvláště pak zaměřených na buněčný metabolismus (disfunkční mitochondrie, chronický oxidativní stres, apoptotické signální dráhy apod.), nebyly tyto modely dostačující a musel přijít nový zvířecí model. Takový model lze získat pomocí streptozotocinu. Subjektům se aplikuje do mozkových komor, což usnadňuje stereotaktické zaměření. V mozku se následně rozvinou patologické děje podobné dějům při AD (Krasa *et al.*, 2012; Knezovic *et al.*, 2015;

Ghosh *et al.*, 2020). Streptozotocin působí inzulínovou rezistenci, která vede ke zhoršené paměti a vyšší neurodegeneraci – viz kapitola 3.4.2. (C. Correia *et al.*, 2013; Shingo *et al.*, 2013)

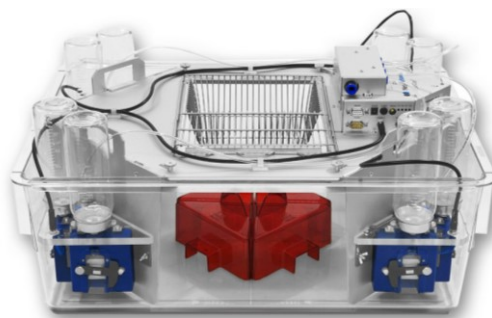
4.2.2. Skopolamin

Ve zdravém organismu se acetylcholin váže na cholinergní muskarinové receptory. Postsynaptické muskarinové receptory jsou spřaženy s Gq proteinem a signalizace po navázání acetylcholinu vede přes inositol-3-fosfát až k vylití vápenatých kationtů z endoplazmatického retikula. V CNS, hlavně pak v gyru dentatu, CA1 oblasti hipokampu, piriformní kůře a neokortexu, se tato acetylcholinová signalizace podílí na posílení neuromodulace při long-term potenciaci (zvyšuje amplitudu excitačních postsynaptických proudů po indukci LTP).

Skopolamin je antagonist cholinergních muskarinových receptorů. Blokuje tedy vazebné místo pro acetylcholin a tím narušuje proces paměti (Drachman & Leavitt, 1974, Khakpai *et al.*, 2012). Ve studii s mladými dobrovolníky s orálně a podkožně aplikovaným skopolaminem jedinci vykazovali poruchy pozornosti, konstantního výkonu a zapamatování si nových informací. Taktéž dle subjektivního hodnocení jedinci cítili delší reakční čas na veškeré podněty a sníženou pozornost (Parrott, 1986). Laczó *et al.*, (2017) testovali efekt skopolaminu a skopolaminu s donepezilem, lékem, který by měl zvrátit vliv skopolaminu, v prostorové navigaci a porovnávali vzniklý efekt u lidské a potkaní verze „Hidden Goal Task“. Tento test vychází z principu MWM a řídí se porovnatelným protokolem pro lidskou a potkaní část. U lidské i potkaní skupiny, které byl podán scopolamin, zaznamenali výzkumníci kognitivní insuficienci v prostorové orientaci. Oproti tomu lidská i potkaní skupina, které byl nejprve podán scopolamin a následně donepezil, měla výsledky srovnatelné s kontrolními skupinami. Porovnatelnost dat z protokolů pro potkaní a lidský model přiblížila základní výzkum preklinickému využití. Výhodou skopolaminového modelu je intraperitoneální (IP) podání látky (u zvířecích modelů), které se obejde bez operativního zákroku.

5. IntelliCage

IntelliCage (IC) (Obr. 7) je zařízení, ve kterém zvířata žijí po celou dobu experimentu. Má vybavení klasického ubytovacího boxu, jako krmítka, lahve s vodou, domečky a možnost jakékoli podestýlky. Dovoluje nám provádět řadu behaviorálních testů bez zásahu člověka ve smyslu manipulace se zvířetem. Nedochází ani k separaci zvířat, protože v IC žije celá skupina zvířat dohromady a vyhodnocování chování každého z nich se uskutečňuje pomocí podkožního čipu v krční oblasti zvířete. Zvířata jsou ve stálém a přesně definovaném prostředí, ať už se IC nachází v jakékoli laboratoři.



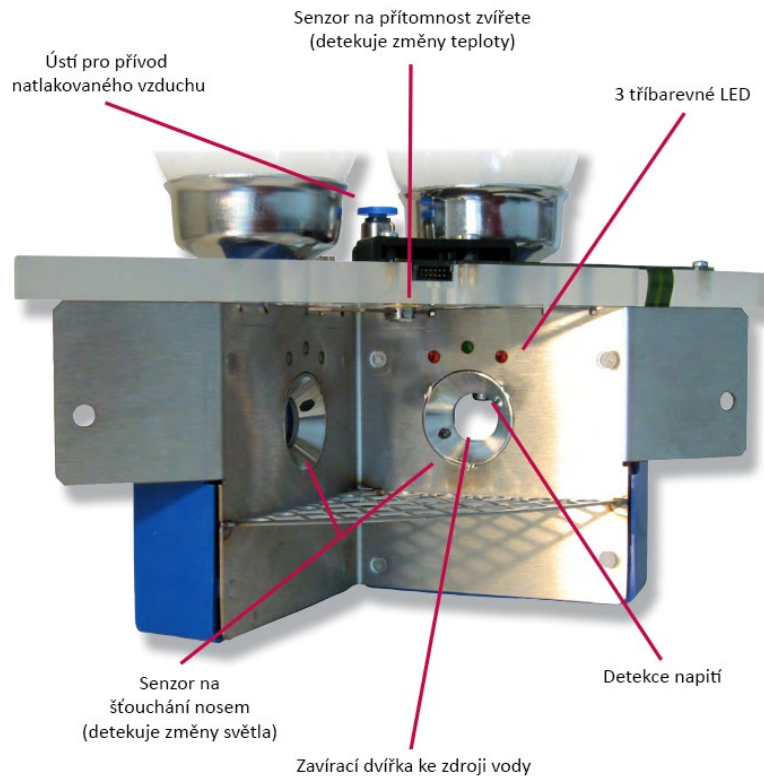
Obr. 7: Struktura myší klece IntelliCage (“IntelliCage - The New Standard For Behavioral And Cognitive Phenotyping In The Home Cage,” 2021).

Pomocí IC se tak lze vyhnout problematice standardizace jednotlivých behaviorálních testů. Crabbe *et al.* (1999) testovali 8 myších kmenů v šesti behaviorálních úlohách ve třech laboratorních komplexech. Pokusili se o maximální standardizaci protokolu testu a podmínek prostředí ve všech třech laboratořích. Poté porovnávali sílu vlivu změny prostředí, sílu vlivu genetické specifikace daného kmene, sílu vlivu pohlaví jedince v rámci daného kmene a také sílu vlivu přesunu zvířat mezi laboratořemi těsně před testem. Přestože síla vlivu genetické specifikace byla nejsilnější u všech 8 kmenů ve všech 6 testech, síla vlivu prostředí byla hned na druhém místě a ovlivnila variabilitu konkrétních čísel výsledků natolik, že prvenství určitého kmene v určité úloze bylo v jedné laboratoři signifikantní a ve druhé už ne. Překvapivě nízký vliv pak měl přesun zvířat těsně před testem, statisticky signifikantně ovlivnil výsledek pouze jednoho kmene v úloze MWM. Vliv prostředí je tedy stále významný a pro interpretaci výsledků behaviorálních pokusů je zásadní tento vliv minimalizovat.

5.1. Struktura IC

IC pracuje na principu detekce a řízení přístupu zvířat k lahvím s vodou včetně detekce pití. Klec má v každém rohu 2 lahve s vodou, ke kterým vede krátký tunel a na jeho konci, před lahvemi, je řada senzorů a dvířka. V tunelu je čtečka čipu zvířete, senzory před lahvemi pak umí detekovat přítomnost zvířete, šťouchnutí nosem a pak samotná napítí. V jedné kleci můžeme najednou testovat skupinu okolo 16 zvířat v závislosti na jejich velikosti. Každé z nich má čip, díky kterému se nejen zaznamenává počet přístupů do daného napájecího rohu (NR), ale pokus může být zároveň pro každé zvíře/skupinu upraven na specifické podmínky. Ty jsou definovány tím, kdy je zvířeti dovolen přístup k vodě a v jakém NR (kdy se po přečtení čipu dvířka k lahvím otevrou a kdy se zavrou). Ten může být buď neomezený nebo podmíněný či úplně zakázaný. Po průchodu tunelem je přítomnost zvířete v NR monitorována pomocí infračerveného senzoru. Nad otvorem ke každé z lahví jsou 3 diody, každá z nich může svítit červeně/zeleně/modře nebo jsou zhaslé. U otvoru je fotobuňka zachycující šťouchání nosem. Otvor má elektronická dvířka, jejichž otevřený/zavřený stav je specifický dle zvířete, jeho chování (dvířka se otevrou po 5 šťouchnutích nosem) nebo denního rozvrhu. Navíc jdou

nad rámec naprogramovaného pokusu kdykoli otevírat/zavírat pomocí ovládacího panelu v softwaru počítače. Posledním senzorem je pak rozpoznávání pití zvířete. Aby se zvíře napilo, ale nezůstávalo v oblasti rohu příliš dlouho a nebránilo tak přístupu jiných zvířat, je zde i vyústění přívodu natlakovaného vzduchu, kterým se na zvíře může fouknout (Obr. 8).



Obr. 8: Technické vybavení napájecího rohu IntelliCage (“IntelliCage - The New Standard For Behavioral And Cognitive Phenotyping In The Home Cage,” 2021).

IC byla použita v pokusech, které vedly k vydání více než 100 recenzovaných článků i ve velmi prestižních časopisech jako PNAS, Molecular Psychiatry nebo Nature Communications (“IntelliCage - The New Standard For Behavioral And Cognitive Phenotyping In The Home Cage,” 2021).

5.2. Vybrané IC testy

5.2.1. Adaptace (FA – free adaptation), habituace

Po vložení do IC myši intenzivně prozkoumávají prostředí během prvních 12 hodin (Galsworthy *et al.*, 2005). Adaptace na IC a osvojení si pití v rozích je obvykle dosaženo do druhého dne pokusu (Galsworthy *et al.*, 2005; Vannoni *et al.*, 2014), avšak u některých modelů s vlivem na prostorové vnímání, paměť apod, jako je například model pro AD, habituace transgenních 14 měsíců starých myši

trvala více jak 2 dny (Codita *et al.*, 2010). Multivariační analýza spontánního chování v IC dokázala vyčlenit zvířata s hipokampálními či prefrontálními lézemi od kontrol (Voikar *et al.*, 2018). IC je také schopna měřit rekonvalescenci po traumatu mozku a návrat běžné lokomoční aktivity (Muthuraju *et al.*, 2012). Jak je vidět, život ve skupině nenaruší typické individuální chování, redukuje však stres jedinců, který je v testech nežádoucí.

5.2.2. Učení na preferované místo (Place preference – PP)

Nejpoužívanější protokol v IC je učení prostorové orientace ovlivněné odměnou na jednom konkrétním místě, v případě IC v jednom napájecím rohu, nazývaný place preference. Nejčastější odměnou je vodný roztok 10% sacharózy (Onishchenko *et al.*, 2007; Konopka *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010; Karlsson *et al.*, 2011; Huo *et al.*, 2012) a odměna se dává do nejméně navštěvovaného rohu během celé FA.

Preference pro zvolený roh se vyvine velmi rychle. Během prvních 24 hodin bylo pozorováno více než 25 % (ze všech návštěv) návštěv správného napájecího rohu (Onishchenko *et al.*, 2007; Jaholkowski *et al.*, 2009; Konopka *et al.*, 2010; Faizi *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2011; Berry *et al.*, 2012; Huo *et al.*, 2012; Kalm *et al.*, 2013).

Zajímavou otázkou je, jak sociální uspořádání skupiny ovlivní schopnosti učení. O tom pojednává práce autorů Kiryk *et al.* (2011), kteří ukazují, že IC dokáže nejen detekovat rozdíly v kognitivních procesech stejně kvalitně, jako Morrisovo vodní bludiště, ale můžeme pozorovat vliv skupinového soužití zvířat. Studie pracuje s transgenním AD modelem myši s Londýnskou mutací. Pokud jsou transgenní zvířata v testu PP ve skupině s kontrolní skupinou (původní kmen – wild type - WT), jsou schopna od nich rychleji odpozorovat přítomnost odměny a její umístění. Dalším nečekaným objevem bylo, jak moc byla schopnost vyhledat žádaný napájecí roh ovlivněna aktivní či pasivní částí dne.

Ukázalo se také, že AD myši měly mnohem vyšší procento návštěv ve správném rohu během pasivní části dne. Autoři tento fakt diskutují možností nižšího rozptýlení a vyššího soustředění na provedení úkonu.

Důležité je zde však zmínit, že jakýkoli vliv cirkadiánní aktivity by se klasickými testy nemohl zjistit, neboť ty probíhají standardně v pasivní části dne a jen po krátký časový úsek.

5.2.3. Cirkadiánní aktivita

Jak již bylo řečeno, cirkadiánní aktivita je parametr, který by se bez automatizovaného systému měřil obtížně. Sice existují další zařízení, která zvíře automaticky monitorují, žádné z nich však neumožňuje monitoring celé skupiny zvířat najednou. IC dokáže detekovat hyperaktivitu i hypoaktivitu jedinců (Onishchenko *et al.*, 2007; Robinson & Riedel, 2014), nestandardně vyšší aktivitu během klidové fáze (Cathomas *et al.*, 2015) a jinou abnormální cirkadiánní aktivitu (Too *et al.*, 2014, 2016).

5.2.4. Potkaní IC

Potkaní IC funguje na naprosto shodném principu, jako myší. Funkcionalita i ovládání je totožné, zařízení je pouze větší a nepřenosné (Obr. 9)



Obr. 9: Potkaní IntelliCage (“Animalab,” 2021)

Doposud byly publikovány pouze 2 studie, ve kterých byl použit potkaní model testovaný v IC. Urbach *et al.* (2014) testovali potkaní transgenní model Huntingtonovy choroby. Jejich IC byla v té době designově odlišná, jednalo se o 4 klece spojené tunely a každá klec měla jeden napájecí roh. Chybělo variabilní osvětlení LED. Jednotlivé fáze jejich kognitivního testování trvaly maximálně 3 dny.

Wu *et al.* (2017) testovali rozpoznávací paměť na potkaním kmeni Sprague–Dawley a roli GABA_B receptorů v inzule pomocí IC. Jejich IC už byla tvořena pouze jednou klecí, jako vidíme na obrázku 9. Jednotlivé fáze kognitivního testování trvaly vždy 4 - 10 dní. Autoři uvádějí, že data z IC sbírali každý den pouze mezi 9:00 – 12:00. Z metodiky není jasné, zda zvířata mimo testovací dobu žila v IC nebo zda byla navracena do klasických klecí.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Cíle experimentální práce

Cílem této práce bylo zavedení a validace behaviorálních modelů Alzheimerovy choroby a jejich porovnání. Ověřovali jsem kognitivní postižení potkaního transgenního modelu TgF344-AD oproti WT kontrolám a kognitivní postižení streptozotocinového modelu ve dvou skupinách oproti WT kontrolám, u každé skupiny byla podána jiná dávka streptozotocinu, dle dvou různých protokolů nejčastěji se vyskytujících v literatuře. Jako dílčí cíle jsme si stanovili:

- Zavedení a validace testování kognitivních funkcí v zařízení IntelliCage
- Testování raných kognitivních změn v transgenním modelu TgF344-AD v zařízení IntelliCage
- Validace protokolu pro streptozotocinový model
- Testování kognitivních změn u streptozotocinového modelu v zařízení IntelliCage

7. Materiál

7.1. Zvířata

V pokusech jsme pracovali se samičími potkany transgenního modelu TgF344-AD a samičími WT jedinci kmene F344 V době testu WMW a následném vstupu do IC byla zvířata stará 6 - 8 měsíců. Dále jsme pracovali se samčími jedinci kmene Wistar. Ti byli v době intracerebroventrikulární aplikace streptozotocinu staří 13 týdnů, v době MWM 17 týdnů a při vstupu do IC 23 týdnů. Zvířata byla ve zvěřinci chována v boxech ve skupinách po 1-3 jedincích. Světelný režim byl nastaven 12 h/12 h (čas rozsvícení světla – 6:00). Teplota vzduchu byla 23 ± 2 °C. Zvířata měla volný přístup k vodě i potravě. V zařízení IC byla zvířata chována ve skupině po 15 nebo 18 jedincích. Světelný režim a teplota byly stejné jako ve zvěřinci. Zvířata měla volný přístup k vodě i potravě.

7.2. Přístroje a nástroje

Morrisovo vodní bludiště; Ø 150 cm	Ugo Basile, Itálie
kruhová platforma Atlantis platform; Ø 10 cm	Ugo Basile, Itálie
luxmetr LM120	Amprobe, USA
teploměr a vlhkoměr HM16	Beurer, Německo
analytické váhy	Schoeller Instruments, Česká Republika
pumpa pro mikrostříkačky AL-1000	World Precision Instruments, USA
pipetman	Eppendorf, Německo
stereotaktický přístroj	Stoelting, USA
vrtačka Dremel	Bosch, Německo
IntelliCage	TSE systems, Německo

7.3. Chemikálie

Etanol	SERVA, Německo
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, USA
Fyziologický roztok (0,9% NaCl)	Braun, Německo
Xylazin Ecuphar (20 mg/ml, účinná látka <i>Xylazinum</i>)	Bioveta, Česká Republika
Narkamon (100 mg/ml, účinná látka <i>Ketaminum</i>)	Bioveta, Česká Republika
Betadine (75 mg/ml, účinná látka <i>povidonum iodinum</i>)	Egis, Česká Republika
Nurofen (20 mg/ml, účinná látka <i>ibuprofenum</i>)	Reckitt Benckiser, Velká Británie
Sacharóza	Vrbátky, Česká Republika

7.4. Software

EthoVision XT; verze 15.0.1416; Noldus Information Technology bv, The Netherlands; <https://www.noldus.com>

GraphPad Prism; verze 8; GraphPad Software, San Diego, CA; <https://www.graphpad.com>

IntelliCagePlus Designer; verze 3.3.5.0; TSE Systems GmbH, Germany; <https://www.tse-systems.com/>

IntelliCagePlus Controller; verze 3.3.5.0; TSE Systems GmbH, Germany; <https://www.tse-systems.com/>

IntelliCagePlus Analyzer; verze 3.3.5.0; TSE Systems GmbH, Germany; <https://www.tse-systems.com/>

MS Excel 365; verze 2102; Microsoft; <https://www.microsoft.com/cs-cz/microsoft-365>

8. Metodika

8.1. Morrisovo vodní bludiště

8.1.1. Test plavby na viditelný ostrůvek

Před začátkem samotného MWM byl ověřen zrak potkanů. Během 1 dne byla provedena série 8 plaveb na viditelnou platformu (za stejných podmínek, jako následující nácvik pozice platformy – viz kapitola 8.1.2.). Platforma byla označena malou vlajkou s kontrastním praporem. Poloha platformy se s každou plavbou měnila, měnila se také startovní pozice potkana, aby se zajistilo, že se zvíře musí zorientovat zrakem. Zvířata, která nenalezla platformu více než 3x ve stanoveném časovém limitu, byla z pokusů vyřazena pro špatný zrak.

8.1.2. Nácvik pozice platformy

Plavby probíhaly v kruhové aréně o průměru 150 cm. Voda byla kvůli detekci potkanů obarvena na černo pomocí zdravotně nezávadné dětské temperové barvy a měla teplotu 23°C. V místnosti bylo 23–27°C a osvětlení uprostřed bludiště těsně nad hladinou bylo 40 luxů. Světelný zdroj byl na podlaze, aby k osvětlení docházelo od spodu a na hladině se netvořily odlesky. Vlhkost v místnosti

byla 50–60 %. Na každé stěně místnosti byly kontrastní geometrické obrazce velikosti 30 x 40 cm pro orientaci zvířat.

Zvířata byla rozdělena do skupin po 7-8 jedincích, v každé skupině byly rovnoměrně zastoupena zvířata daného modelu AD a jejich kontroly. Rozdělení do skupin a pořadí zvířat ve skupině bylo provedeno náhodným výběrem pomocí počítače. Každá skupina byla umístěna do místnosti s bludištěm minimálně 30 minut před začátkem testu.

Kruhová platforma (Atlantis platform; ugo basile) o průměru 10 cm se nacházela 1 – 1,5 cm pod vodní hladinou a byla umístěna blíže jedné světové straně. Zvířata absolvovala 8 plaveb denně po dobu pěti dnů, startovací pozice plaveb byly z jednotlivých světových stran kromě té, u které byla platforma. Jedna z nejvzdálenějších pozic se vždy opakovala 2x, protože startovacích pozic bylo 7 a plaveb 8. Pořadí startovacích pozic plaveb bylo každý den rozlosováno náhodným výběrem pomocí počítače.

Pořadí zvířat v celém pokusu bylo dané a každý den neměnné. Zvířata byla po 30 minutové habituaci rozdělena po jednom do boxů se savým papírem, do kterých se vracela po každé plavbě. Plavba byla ukončena, když zvíře našlo platformu a vylezlo na ni nebo trvala maximálně 2 minuty, po kterých bylo zvíře na platformu navedeno. Na platformě bylo zvíře ponecháno 15 sekund a pak navraceno do boxu. Rozmezí mezi plavbami jednoho zvířete bylo ± 10 minut.

8.1.3. Probe test

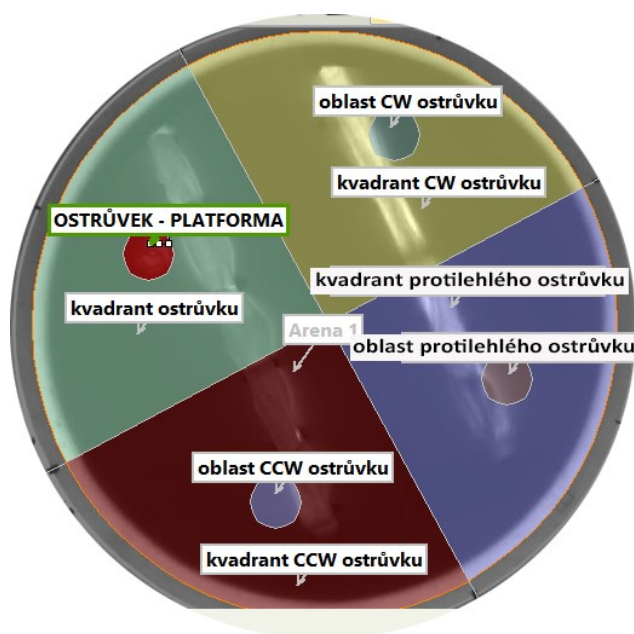
Následující den po pátém nácvikovém dni na polohu platformy byl proveden tzv. probe test. Platforma byla z bludiště odstraněna a každé zvíře absolvovalo 1 plavbu dlouhou 60 sekund. Startovací pozice byla pro všechna zvířata stejná a byla z jedné ze 3 nejvzdálenějších pozic od původního umístění platformy.

8.2. Zpracování dat z MWM

Plavby byly nahrávány a videa dále zpracována v programu EthoVision XT (EV). V EV byly nastaveny specifikace arény, jako je průměr a jednotlivé měřené kvadranty. Byla označena pozice platformy a nastaven správný kontrast zvířete ke zbytku arény. Dále byl nastaven start, průběh a doba sledování trasy zvířete. Všechny plavby byly označeny číslem zvířete a testovací skupinou, kam zvíře patřilo. Následně byly plavby odměřeny.

Změřená data byla exportována do tabulek podle testovacích skupin. Data v tabulkách byla dále manuálně zpracována v programu MS Excel a výpočty byly vloženy do programu GraphPad Prism, kde byla provedena statistická analýza výsledků. Na data z nácvikových dnů byla použita dvoucestná

ANOVA a na data z probe testu t-test nebo dvoucestná ANOVA. U parametrů probe testu byly porovnány 4 oblasti arény (Obr. 10). Cílová platforma a její kvadrant byly vždy porovnány s kvadrantem a hypotetickou polohou platformy po směru hodinových ručiček (clockwise – CW) od reálné platformy, proti směru hodinových ručiček (counterclockwise – CCW) od reálné platformy a s protilehlým kvadrantem a jeho hypotetickou polohou platformy. Hodnoty v grafech jsou aritmetické průměry všech hodnot dané testové skupiny a chybové úsečky označují střední chybu průměru (SEM).



Obr. 10: Oblasti arény MWM, které byly porovnávány vůči sobě v probe testu. Oblast reálného ostrůvku (OSTRŮVEK – PLATFORMA) a její další 3 hypotetické polohy v ostatních kvadrantech a pak kvadrant ostrůvku a ostatní 3 kvadranty. Vzájemná orientace je popsána podle směru hodinových ručiček – po směru (CW), proti směru (CCW) a protilehlá pozice.

8.3. Intracerebroventrikulární aplikace streptozotocinu

24 potkaních samců kmene Wistar bylo rozděleno do 3 skupin. Jedna skupina dostala 2 dávky streptozotocinu v rozmezí 48 hodin, druhá skupina pouze 1 dávku streptozotocinu a třetí skupině, kontrolní, byl 1x aplikován fyziologický roztok.

Zvířata byla před operací uspána pomocí směsi xylazinu dávkovaného 10,6 mg/kg a narkamonu dávkovaného 159,1 mg/kg, která byla podána intramuskulárně (IM) do stehenní oblasti a do plného nástupu anestezie byli potkani uloženi v boxu s hoblinovou podestýlkou. Po uspání byla zvířatům oholena oblast incize. Před zákrokem bylo znovu zkontrolováno bezvědomí zvířat silným štípnutím do zadní končetiny a ocasu a v případě reakce byla podána další injekce xylazinu a narkamonu IM (do druhé nohy) do celkového množství maximálně 1 ml. Jedinci byli upevněni ve stereotaktickém přístroji a oči jim byly zakryty buničinou namočenou ve fyziologickém roztoku.

Skalpelem byla provedena 1 cm dlouhá incize vedoucí v mediální rovině a začínající za očima. Kůže byla svorkami rozevřena a skalpelem byly rozříznuty a odsunuty do stran všechny měkké tkáně za účelem odhalení švů na lebce a identifikování pozice bregmy. Od bregmy byly pomocí stereotaktického přístroje naměřeny 2 body, na pravé i levé straně lebky, jejich souřadnice byly mediolaterálně 1,5 mm a anteroposteriorně 0,8 mm (Obr. 11), body byly označeny obyčejnou tužkou.



Obr. 11: Znárodnění měření pozic 2 bodů pro návrty na lebce. Jedná se pouze o přibližné znázornění, měřítko neodpovídá přesné pozici na lebce.

Ruční vrtačkou dremel s vrtákem o průměru 0,5 mm byly v označených bodech provedeny návrty lebky. Operační pole bylo opláchnuto fyziologickým roztokem a osušeno sterilní buničinou.

Po aplikaci anestezie, než zvíře usnulo, byl připraven roztok streptozotocinu. Celková dávka streptozotocinu během 1 operace byla 3mg/kg váhy zvířete a aplikovala se v objemu 10 μ l. Streptozotocin byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Aplikací soustava obsahovala 25 μ l stříkačku Hamilton s průměrem pístu 0,729 mm, hadičku a aplikační jehlu (modrá – 0,6 x 30 mm) na konci hadičky. Roztoku streptozotocinu bylo namícháno 20 μ l z důvodu zaplnění většího objemu aplikační soustavy, aby byla vidět hladina a její pohyb v hadičce nad jehlou. Stříkačka Hamilton a většina hadičky byly naplněny fyziologickým roztokem, pak byla nasáta drobná bublina vzduchu, aby se oba roztoky nepromíchaly, a nakonec byl nasát roztok streptozotocinu. Stříkačka Hamilton byla vložena do pumpy, na které byly již předem nastaveny všechny potřebné parametry – objem stříkačky, průměr pístu a požadovaná aplikační rychlost 1 μ l/min. Aplikací jehla na konci hadičky byla opatrně upevněna do stereotaktického přístroje.

Aplikační jehla byla umístěna do očištěného návrtnu na lebce a pomocí stereotaktického přístroje vsunuta do mozkové komory dorzoventrálně 3,6 mm. Následně po dobu pěti minut byl aplikován objem 5 μ l roztoku streptozotocinu. Stejným postupem bylo aplikováno druhých 5 μ l roztoku streptozotocinu do druhé komory.

Operační pole bylo vydezinfikováno 10% roztokem Betadine a rána byla zašita. Potkan byl do druhého dne umístěn na dospání do samostatného boxu. Po dobu 7 dnů po operaci bylo v napájecích

lahvích zvířat rozpuštěno analgetikum nurofen dávkovaného 3 ml/500 ml vody. Některým zvířatům se vytvořily drobné léze v místě vpichu anestezie. Tyto léze byly denně kontrolovány a ošetřeny 10% roztokem Betadine. Zvířata byla ponechána v klidu 17 dní po operaci do úplného zhojení lézí.

8.4. IntelliCage

8.4.1. Programování IC

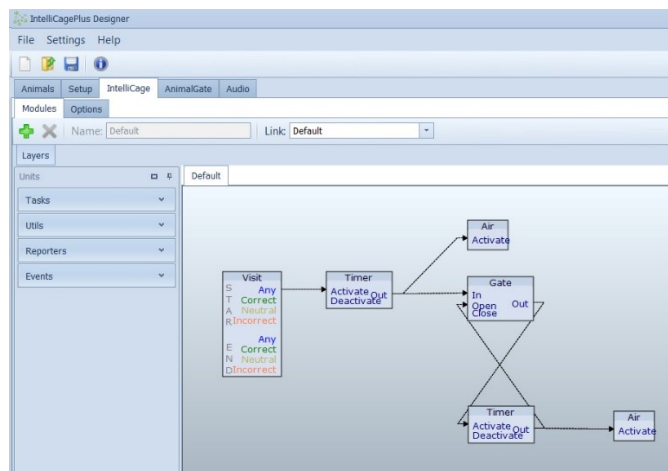
V programu IntelliCagePlus Designer byly naprogramovány jednotlivé fáze pokusu v IC (Tab. 1). Tyto fáze a jejich pořadí jsme zvolili po pečlivém prostudování článků z dosavadních pokusů v IC na myších modelech.

Úloha	Označení	Popis	Trvání (dny)
Volná adaptace	FA	Všechny dveře stále otevřeny, LED zhasnuté	4
Adaptace na šfouchnutí nosem	NPA	Přístup k vodě po pěti šfouchnutích nosem	3
Časované napájení	TD	Přístup k vodě pouze mezi 11. - 12. hodinou a 16. - 17. hodinou; v jiné časy dveře zavřené a LED svítí červeně	5
Adaptace na šfouchnutí nosem	NPA	Přístup k vodě po pěti šfouchnutích nosem	1
Učení na preferované místo	PP	Přístup k vodě pouze v jednom rohu, správné rohy jsou rozděleny rovnoměrně mezi zvířaty	5
Učení na preferované místo s použitím vzduchu	PP-Air	Stejně jako PP, navíc návštěva nesprávného rohu potrestána fouknutím vzduchu	5
Učení na protilehlé preferované místo	PP-R	Stejně jako PP, akorát správný roh je nyní na protilehlé straně IC	5
Učení na protilehlé preferované místo s použitím vzduchu	PP-R-Air	Stejně jako PP-R, navíc návštěva nesprávného rohu potrestána fouknutím vzduchu	5
Adaptace na šfouchnutí nosem	NPA	Přístup k vodě po pěti šfouchnutích nosem	1
Učení na vyhýbání se místu	PA-Air	Jedna strana klece (2 rohy) jsou k dispozici, na druhé straně jsou dveře zavřené a návštěva je potrestána fouknutím vzduchu	5
Učení na vyhýbání se protilehlému místu	PA-R-Air	Stejně jako PA-Air, akorát na protilehlé straně IC	5
Adaptace na šfouchnutí nosem	NPA	Přístup k vodě po pěti šfouchnutích nosem	1
Pití po směru hodinových ručiček	P-CW-Air	Na začátku je správný jeden roh. Po správné návštěvě se určený roh posouvá po směru hodinových ručiček. Nesprávná návštěva je potrestána fouknutím vzduchu	5
Pití proti směru hodinových ručiček	P-CCW-Air	Na začátku je správný jeden roh. Po správné návštěvě se určený roh posouvá proti směru hodinových ručiček. Nesprávná návštěva je potrestána fouknutím vzduchu	5

Tab. 1: Popis a pořadí jednotlivých plánovaných fází pokusu v IC.

U všech fází platilo, že pokud bylo zvíře v napájecím rohu (NR) déle, než 5 minut, bylo na něj každých 10 s fouknuto stlačeným vzduchem, dokud roh neopustilo. Tím se mělo zabránit blokaci rohu

a jeho nedostupnosti pro méně dominantní zvířata. Bylo to základní pravidlo pro všechny fáze a jeho naprogramování vidíte na obrázku 12.



Obr. 12: Základní pravidlo platné pro všechny fáze pokusu v IC a jeho naprogramování: Pokud je jakékoli zvíře v jakémkoli napájecím rohu (správném i špatném) déle, než 5 minut, každých 10 s se na něj foukne stlačeným vzduchem, dokud roh neopustí.

Testování bylo prováděno z časových důvodů bez zvířat. Dosud neaplikované čipy byly připevněny na tyčku a vsunuty do NR. Ostatní operace – zavírání a otevírání dvířek, LED světelná signalizace i foukání vzduchu mohlo být pozorováno z vnějšku klece. Všechny tyto operace a jejich správná funkce byly také vyzkoušeny v každém NR u každé lahve vždy před novou fází pokusu.

8.4.1.1. Údržbové časové okno

Do místnosti s IC musel být zachován přístup chovatelům a také muselo být ustanoveno časové okno pro jakoukoli údržbu či řešení problémů. Tento časový interval byl každý den mezi 9:00 a 11:00 dopoledne. Testové dny byly tedy vyhodnocovány vždy od 11:00 jednoho dne do 9:00 dne následujícího. Během údržbového okna (ÚO) byla všechna dvířka NR zavřená a všechny diody svítily červeně. Jelikož jsme se ze začátku pokusu potýkali s velmi nízkou návštěvností NR a měli starost, aby zvířata nebyla dehydratována, během ÚO dostávala zvířata dle potřeby k dispozici volně přístupné lahve s vodou.

8.4.2. Načipování zvířat

V prvním pokusu v IC bylo 15 samic, 7 z nich transgenního modelu TgF344-AD a 8 kontrolních WT samic kmene F344 věkem odpovídajících transgenním zvířatům. V druhém pokusu v IC bylo 18 samců kmene Wistar, z nich 6 streptozotocinového modelu po dvou dávkách (viz kapitola 8.3.), 6 streptozotocinového modelu po 1 dávce (viz kapitola 8.3.) a 6 kontrolních zvířat (viz kapitola 8.3.). Do

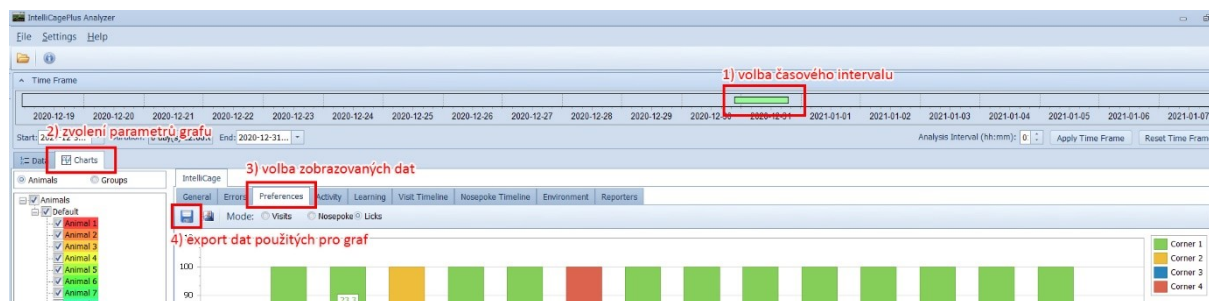
dorzální oblasti krku byl zvířatům jehlou implantován čip (ISO 11784/11785) a byla prozkoušena jeho čitelnost pomocí čtečky IC. Zvířata pak byla rozložena do skupin náhodným výběrem pomocí počítače a tyto skupiny byly naprogramovány do daných fází pokusu v IC.

8.4.3. Kontrola zvířat

Po celou dobu pokusu byla zvířata každý den (během ÚO) kontrolována a byl zběžně sledován jejich zdravotní stav. Pokud bylo nutné dát jim volně k dispozici lahve s vodou, bylo sledováno, jaká zvířata pijí a kolik toho vypijí. Ze začátku se také data vyhodnocovala na denní bázi, a protože vyhodnotit šla pouze ukončená část pokusu (stopnutá na kontrolním panelu), během ÚO se daná část pokusu zastavovala a spouštěla se nová.

8.5. Zpracování dat z IntelliCage

Nejprve byly vybrány potřebné zaznamenané části pokusu a ty byly nahrány do programu IntelliCagePlus Analyzer. Data jsou uložena ve formě komprimovaných souborů ve formátu zip a to z každé spuštěné části pokusu jeden (od startu do přerušení v program Controller). Data se zobrazí v programu Analyzer (Obr. 13). Program umí zobrazit požadované podskupiny dat v grafech, nelze zde však počítat statistické testy.



Obr. 13: Pořadí nastavování parametrů v program IntelliCagePlus Analyzer. Nejprve se nastavuje časové okno zpracovávaných dat (1), poté parametry grafu (2) a následně jaká data chceme zobrazit (3). Pomocí ikony s disketou data použitá pro graf exportujeme do formátu MS Excel (4).

Proto bylo potřeba data z tohoto programu dále exportovat k dalšímu zpracování. Jelikož data mezi 9 - 11 hodinou dopolední nemohla být započítána, musely být časové intervaly k rozboru v Analyzeru zobrazovány po dnech a tento den byl definován od 11:00 jednoho dne do 9:00 dne následujícího. Například tedy pro vyhodnocení první části pokusu s transgenními samicemi modelu TgF344-AD bylo vyexportováno 29 tabulek se surovými daty pro každý parametr měření. Dohromady se tak v této části pokusu zpracovávalo 116 tabulek, jejichž data se v excelu musela vyfiltrovat a seřadit, než se mohla přenést do programu GraphPad Prism. Tam byla provedena statistická analýza dat pomocí testů

dvoucestná ANOVA a t-test. Hodnoty v grafech jsou aritmetické průměry všech hodnot dané testové skupiny a chybové úsečky označují střední chybu průměru (SEM).

9. Výsledky

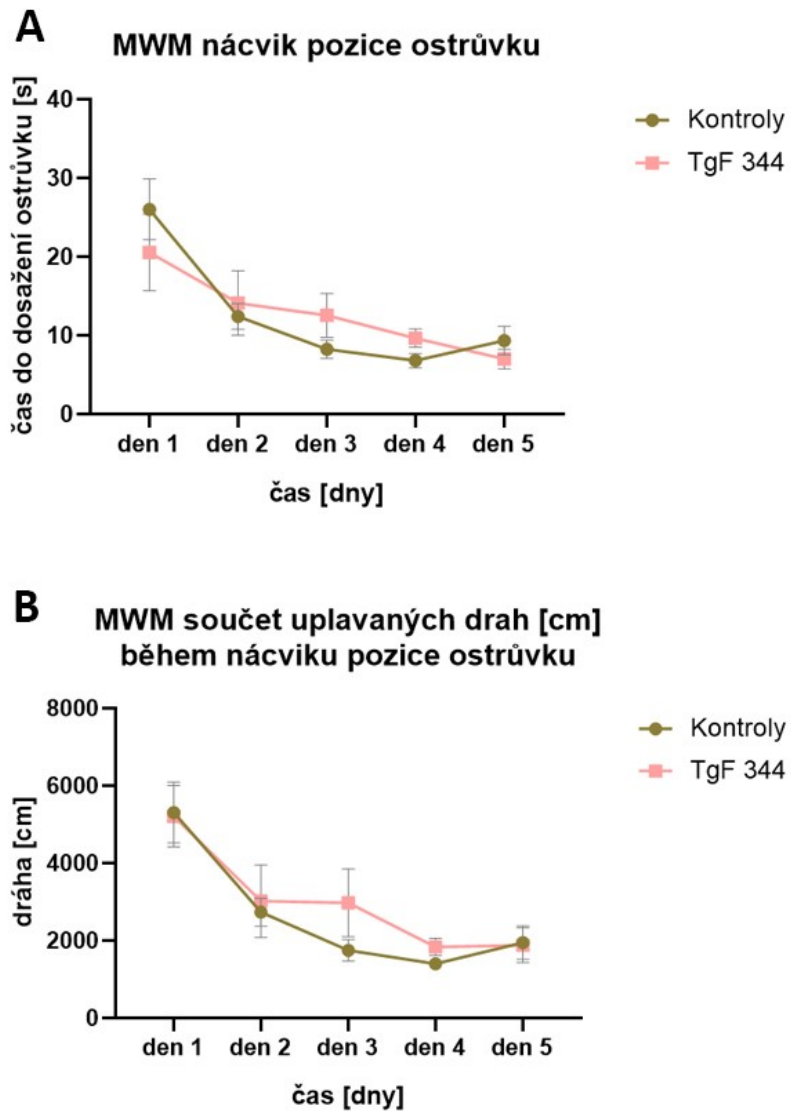
9.1. Chování transgenního modelu TgF344-AD v prostředí IntelliCage

Bylo porovnáváno 7 transgenních samic modelu TgF344-AD s 8 kontrolními WT samicemi kmene F344 věkem odpovídajícím transgenním zvířatům.

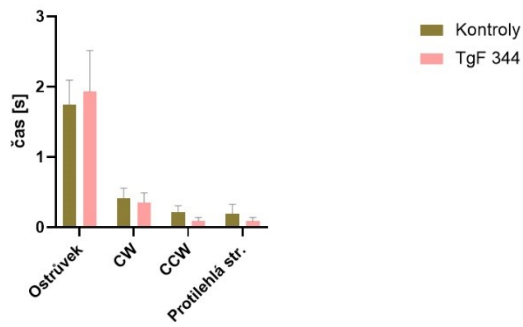
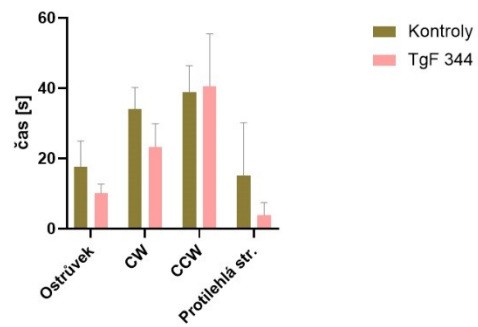
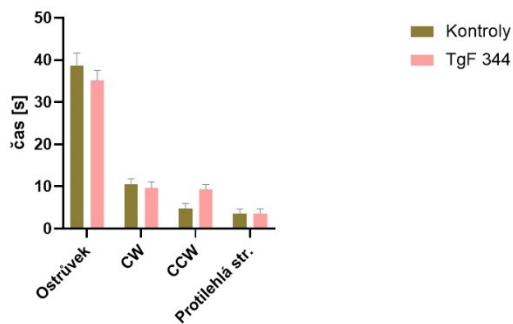
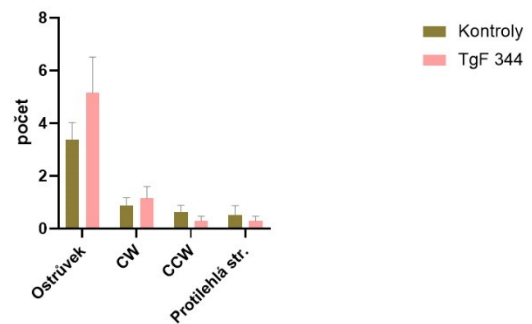
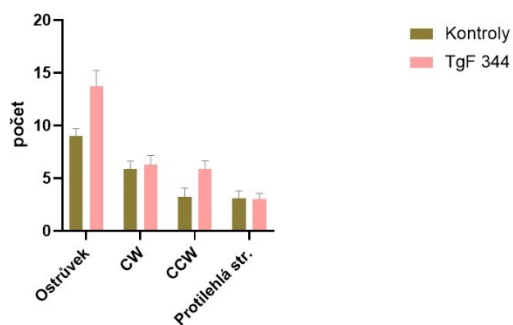
9.1.1. Morrisovo vodní bludiště

Na obrázku 14 jsou uvedeny výsledky z nácviku na pozici ostrůvku, který trval 5 dní. Oba parametry, čas (A) a dráha (B) byly srovnávány kvůli vyloučení chyby, která mohla vzniknout z různé rychlosti plavání zvířat. Ukázalo se ale, že ani pomalu plavající zvířata neovlivnila trend a oba grafy mají obdobný průběh. Signifikantní rozdíly mezi skupinami nebyly nalezeny, skupiny byly porovnávány dvoucestnou ANOVOU.

Na obrázku 15 jsou výsledky z probe testu. Každý graf zachycuje jeden parametr, který byl sledován vždy ve 4 kvadrantech po dobu 1. minuty. Byly sledovány celkové časy strávené v daných oblastech (A, C), čas do prvního vstupu do dané oblasti (B) a počty vstupů do oblastí (D, E). V žádném parametru nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami, skupiny byly porovnávány mnohonásobnými t-testy.



Obr. 14: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v testu MWM. Sledované parametry byly čas (A) a celková dráha (B) během 5 dní nácviku pozice ostrůvku. Signifikantní rozdíly nebyly nalezeny.

A Čas v oblastech ostrůvku**B** Čas do dosažení oblastí ostrůvku**C** Čas v kvadrantech**D** Počet vstupů do oblastí ostrůvku**E** Počet vstupů do kvadrantů

Obr. 15: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v testu MWM. Probe test. Byly sledovány celkové časy strávené v daných oblastech (A, C), čas do prvního vstupu do dané oblasti (B) a počty vstupů do oblastí (D, E). Statistická analýza t-testy neprokázala v žádném parametru signifikantní rozdíl mezi skupinami. Rozdíly mezi cílovými oblastmi jsou uvedeny v tabulce 2.

V tabulce 2 je výčet všech signifikantních rozdílů mezi porovnávanými cílovými oblastmi u obou skupin ve všech pěti parametrech. Všechny testy byly provedeny jednocestnou ANOVOU.

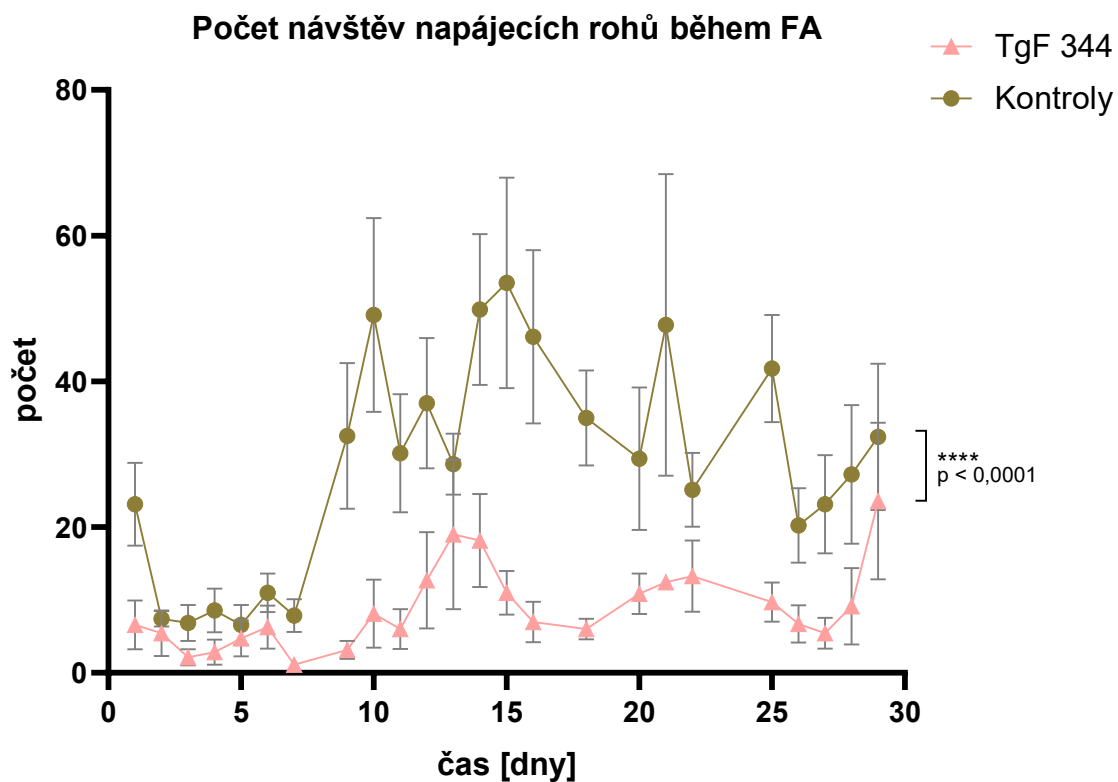
parametr	skupina	porovnávané oblasti	míra signifikance	P hodnota
čas v oblastech ostrůvku (Obr. 15 A)	kontroly	Target x CW	***	0,0005
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	TgF344-AD	Target x CW	**	0,0064
		Target x CCW	**	0,0014
		Target x protilehlá str.	**	0,0014
čas do dosažení oblasti ostrůvku (Obr. 15 B)	TgF344-AD	Target x CCW	*	0,0214
		CCW x protilehlá str.	*	0,0264
čas v kvadrantech (Obr. 15 C)	kontroly	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	TgF344-AD	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
počet vstupů do oblastí ostrůvku (Obr. 15 D)	kontroly	Target x CW	**	0,0015
		Target x CCW	***	0,0005
		Target x protilehlá str.	***	0,0003
	TgF344-AD	Target x CW	**	0,004
		Target x CCW	***	0,0005
		Target x protilehlá str.	***	0,0005
počet vstupů do kvadrantů (Obr. 15 E)	kontroly	Target x CW	*	0,0301
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	TgF344-AD	Target x CW	***	0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001

Tab. 2: MWM Probe test. Výčet všech signifikantních rozdílů mezi porovnávanými cílovými oblastmi u obou skupin ve všech pěti parametrech. Graficky jsou znázorněny na obrázku 15. Slovem „Target“ je označena cílová oblast ostrůvku nebo cílový kvadrant s ostrůvkem – dle názvu ve sloupci parametr.

9.1.2. IntelliCage

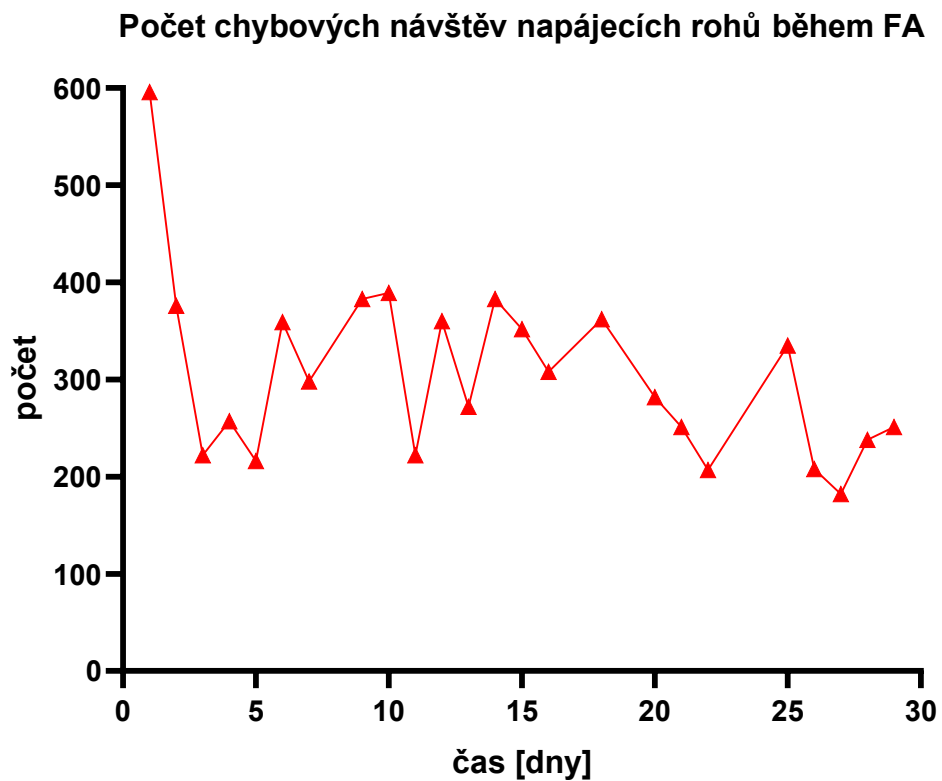
9.1.2.1. Free adaptation

Po testu MWM byla zvířata umístěna do IntelliCage, kde měla projít testováním dle protokolu z tabulky 1. V prvních dnech v IC během FA měla však zvířata extrémně nízký počet návštěv napájecích rohů. Z toho důvodu byla nejprve FA prodloužena, počet návštěv se ale nezvyšoval na dostatečnou hodnotu a byl řádově nižší, než je známo z myšího modelu v IC. Pro ostatní úlohy by tedy zvířata nebyla dostatečně motivována, proto byla zvířata nakonec sledována za podmínek FA po dobu 29 dní. Průběh návštěvnosti NR vidíme na obrázku 16. Rozdíl mezi transgenními zvířaty a kontrolami byl statisticky signifikantní [$F(2, 305) = 2291$; $p < 0,0001$]; kromě efektu skupiny byl statisticky signifikantní i efekt dní [$F(23, 305) = 17,85$; $p < 0,0001$].



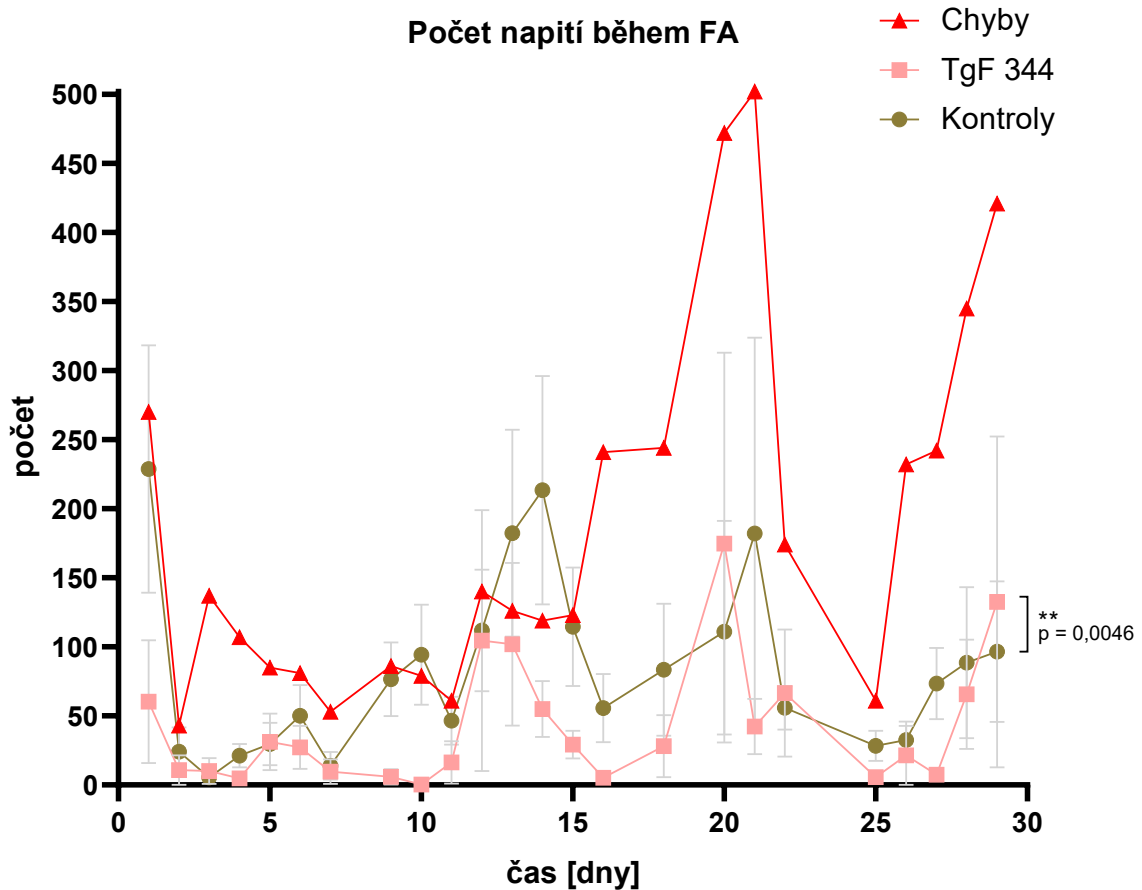
Obr. 16: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v IC během FA. Graf zobrazuje denní počet návštěv napájecích rohů. Rozdíl mezi skupinami je statisticky signifikantní [$F(2, 305) = 2291$; $p < 0,0001$]. Kromě efektu skupiny je statisticky signifikantní i efekt dní [$F(23, 305) = 17,85$; $p < 0,0001$].

Z důvodu velmi nízkého počtu návštěv zvířat v NR bylo sledováno, zda jsou opravdu všechny návštěvy správně zaregistrovány a přiřazeny ke zvířeti. Takto byla nalezena chybová hlášení nepřirazených návštěv, která se nevyskytovala v běžně exportovaných datech (Obr. 17).



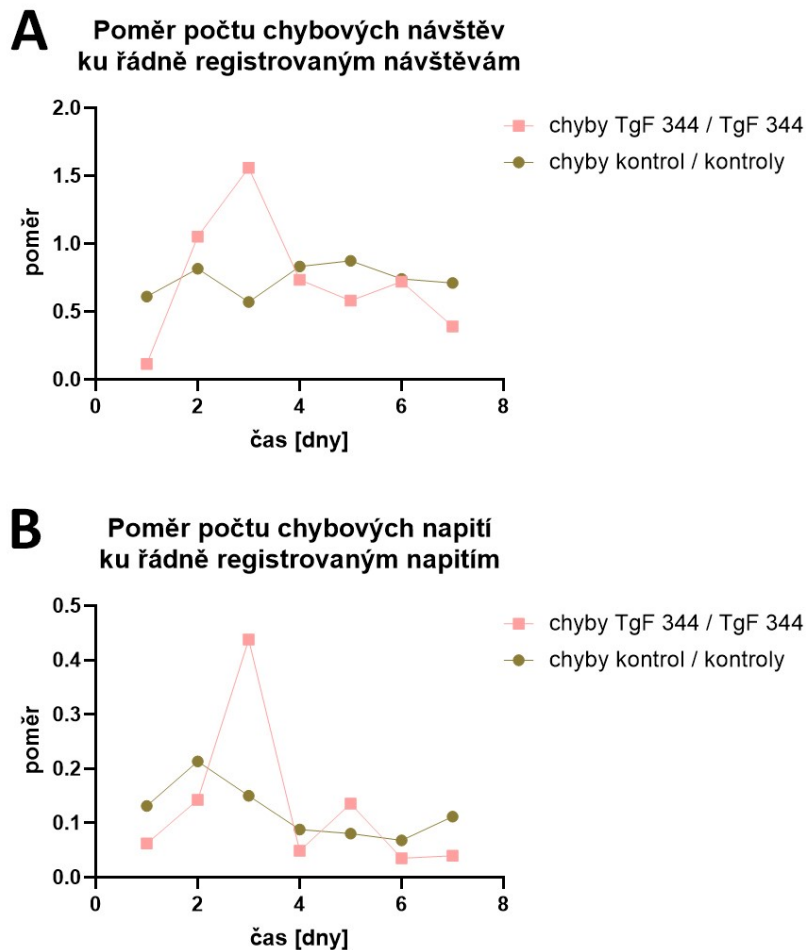
Obr. 17: Počet návštěv napájecích rohů IC během FA nepřirazených žádnému zvířeti.

Ukázalo se také, že během některých návštěv se zvířata nenapíjí, proto bylo potřeba začít sledovat jako hlavní parametr hydratace konkrétní počet napití. V grafu na obrázku 18 vidíme zanesena i chybná napití (nepřiřazená žádnému zvířeti). Rozdíl mezi transgenními zvířaty a kontrolami byl statisticky signifikantní [F (1, 305) = 8,135; p = 0,0046]; kromě efektu skupiny byl statisticky signifikantní i efekt dní [F (23, 305) = 1,694; p = 0,0261].



Obr. 18: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v IC během FA. Graf zobrazuje denní počet napití. Rozdíl mezi skupinami je statisticky signifikantní [F (1, 305) = 8,135; p = 0,0046]; kromě efektu skupiny byl statisticky signifikantní i efekt dní [F (23, 305) = 1,694; p = 0,0261].

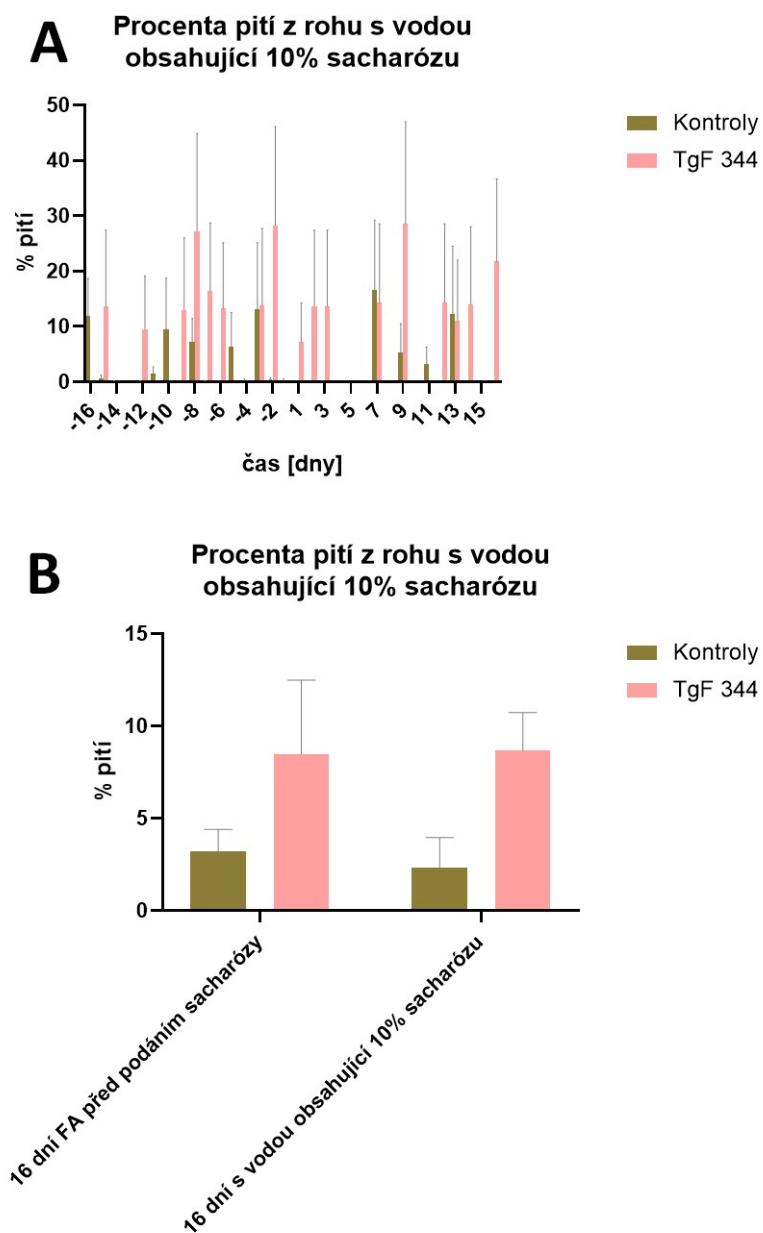
Aby byl vyloučen vyšší sociální status kontrol a případná blokace přístupu do NR kontrolami, byly do IC umístěny obě skupiny zvlášť. Test trval pro každou skupinu 7 dní a proběhl za podmínek FA. Následně byl vypočten poměr počtu chybových, nepřirazených návštěv ku řádně registrovaným návštěvám (A) a poměr počtu chybových, nepřirazených napití ku řádně registrovaným napitím (B) pro obě skupiny (Obr. 19). Statistická analýza t-testem nenašla signifikantní rozdíl poměrů obou skupin ani u návštěv, ani u napití.



Obr. 19: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v IC. Poměr počtu chybových, nepřirazených návštěv ku řádně registrovaným návštěvám (A); poměr počtu chybových, nepřirazených napití ku řádně registrovaným napitím (B). Statistická analýza t-testem nenašla signifikantní rozdíl poměrů ani u návštěv, ani u napití.

9.1.2.2. Place preference

Byl vybrán napájecí roh, do kterého chodila zvířata během FA nejméně často. V tomto rohu byly obě lahve naplněny 10% sacharózou a byl sledován rozdíl v procentech denních napití z tohoto rohu 16 dní před oslazením vody a 16 dní po oslazení vody (Obr. 20 A). Signifikantní rozdíl v procentech napití před a po oslazení vody nebyl nalezen (Obr. 20 B).



Obr. 20: Porovnání transgenního modelu TgF344-AD s kontrolami WT kmene F344 v IC v testu PP. Den 0 je den, kdy byla voda v daném rohu oslazená. Graf znázorňuje 16 dní před a 16 dní po oslazení vody (A). Statistickou analýzou nebyl nalezen signifikantní rozdíl v procentech napití z tohoto rohu po oslazení vody (B).

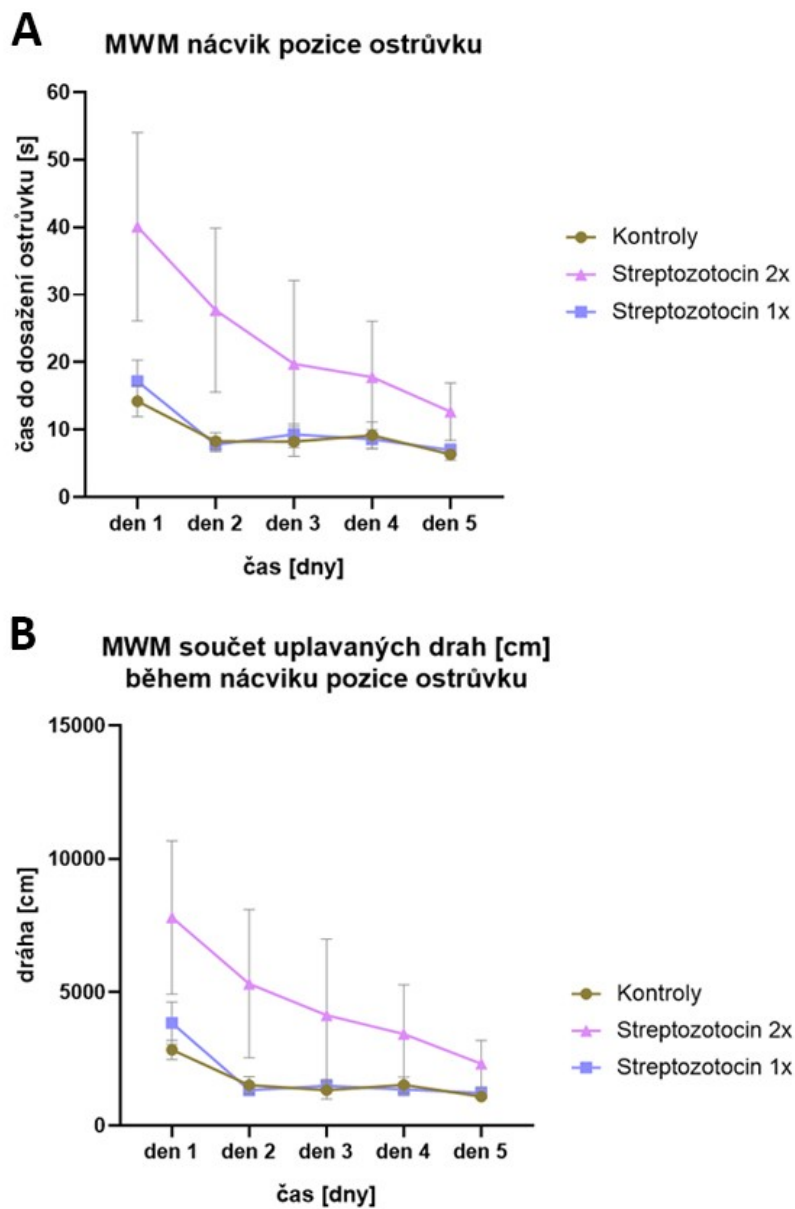
9.2. Chování streptozotocinového modelu v prostředí IntelliCage

Byli porovnáváni samci kmene Wistar. 7 zvířat s aplikovanými dvěma dávkami streptozotocinu se skupinou 8 zvířat s aplikovanou 1 dávkou streptozotocinu a se skupinou 8 kontrolních jedinců s aplikovanou 1 dávkou fyziologického roztoku. Všechna zvířata byla stejného věku.

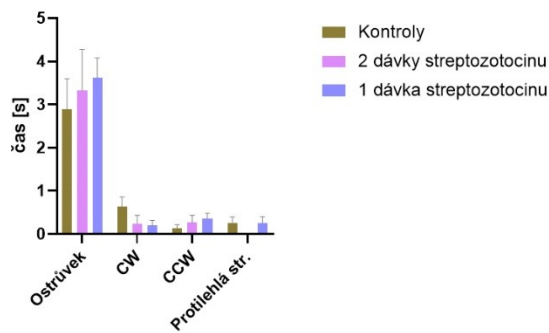
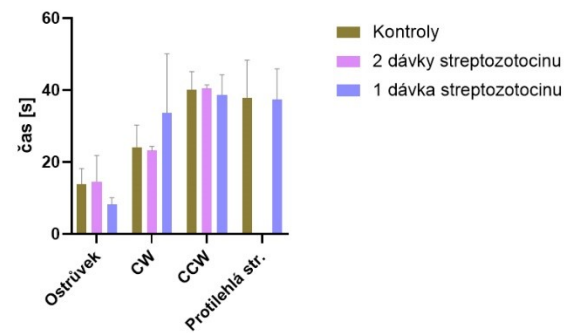
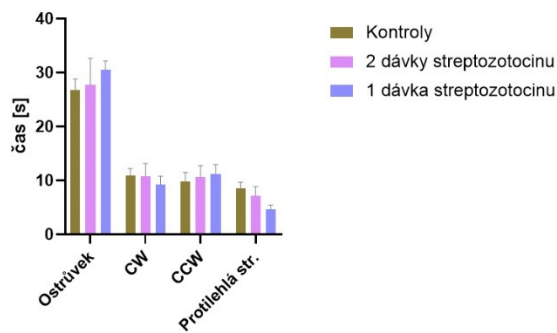
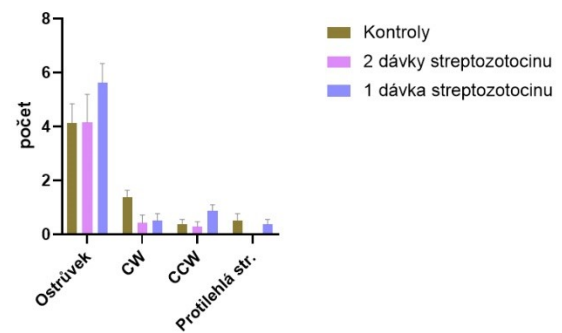
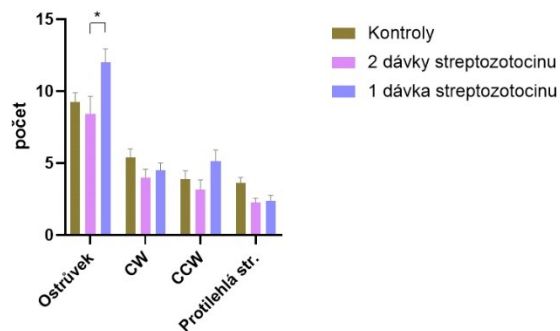
9.2.1. Morrisovo vodní bludiště

Na obrázku 21 jsou uvedeny výsledky z nácviku na pozici ostrůvku. Oba parametry, čas (A) a dráha (B) byly srovnávány, stejně jako u transgenního modelu, kvůli vyloučení chyby, která mohla vzniknout z různé rychlosti plavání zvířat. Oba grafy mají obdobný průběh. Signifikantní rozdíl byl v časech ($p = 0,0002$) (A) a dráze ($p = 0,0007$) (B) u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu. Skupiny byly porovnávány dvoucestnou ANOVOU.

Na obrázku 22 jsou výsledky z probe testu. Každý graf zachycuje jeden parametr po dobu 1. minuty. Byly sledovány celkové časy strávené v daných oblastech (A, C), čas do prvního vstupu do dané oblasti (B) a počty vstupů do oblastí (D, E). Statistická analýza jednocestnou ANOVOU prokázala signifikantní rozdíl v počtu vstupů do kvadrantu s ostrůvkem mezi skupinou se dvěma dávkami streptozotocinu a skupinou s jednou dávkou streptozotocinu. $P = 0,0450$.



Obr. 21: Porovnání streptozotocinového modelu s kontrolami WT kmene Wistar v testu MWM. Sledované parametry byly čas (A) a celková dráha (B) během 5 dní nácviku pozice ostrůvku. Signifikantní rozdíl byl v časech ($p = 0,0002$) a dráze ($p = 0,0007$) u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu.

A Čas v oblastech ostrůvku**B** Čas do dosažení oblastí ostrůvku**C** Čas v kvadrantech**D** Počet vstupů do oblastí ostrůvku**E** Počet vstupů do kvadrantů

Obr. 22: Porovnání streptozotocinového modelu s kontrolami WT kmene Wistar v testu MWM. Probe test. Byly sledovány celkové časy strávené v daných oblastech (A, C), čas do prvního vstupu do dané oblasti (B) a počty vstupů do oblastí (D, E). Statistická analýza jednocestnou ANOVOU prokázala signifikantní rozdíl v počtu vstupů do kvadrantu s ostrůvkem mezi skupinou se dvěma dávkami streptozotocinu a skupinou s jednou dávkou streptozotocinu. $P = 0,0450$ Rozdíly mezi cílovými oblastmi jsou uvedeny v tabulce 3.

V tabulce 3 je výčet všech signifikantních rozdílů mezi porovnávanými cílovými oblastmi u všech tří skupin ve všech pěti parametrech. Všechny testy byly provedeny jednocestnou ANOVOU.

parametr skupina porovnávané oblasti míra signifikance P hodnota

čas v oblastech ostrůvku (Obr. 22 A)	kontroly	Target x CW	**	0,0012
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	***	0,0002
	2x streptozotocin	Target x CW	***	0,0009
		Target x CCW	***	0,001
		Target x protilehlá str.	***	0,0004
	1x streptozotocin	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001

čas do dosažení oblasti ostrůvku (Obr. 22 B)	1x streptozotocin	Target x CCW	**	0,0052
		Target x protilehlá str.	*	0,0345

čas v kvadrantech (Obr. 22 C)	kontroly	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	2x streptozotocin	Target x CW	**	0,0037
		Target x CCW	**	0,0033
		Target x protilehlá str.	***	0,0004
	1x streptozotocin	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001

počet vstupů do oblastí ostrůvku (Obr. 22 D)	kontroly	Target x CW	***	0,0004
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	2x streptozotocin	Target x CW	***	0,0005
		Target x CCW	***	0,0003
		Target x protilehlá str.	***	0,0001
	1x streptozotocin	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001

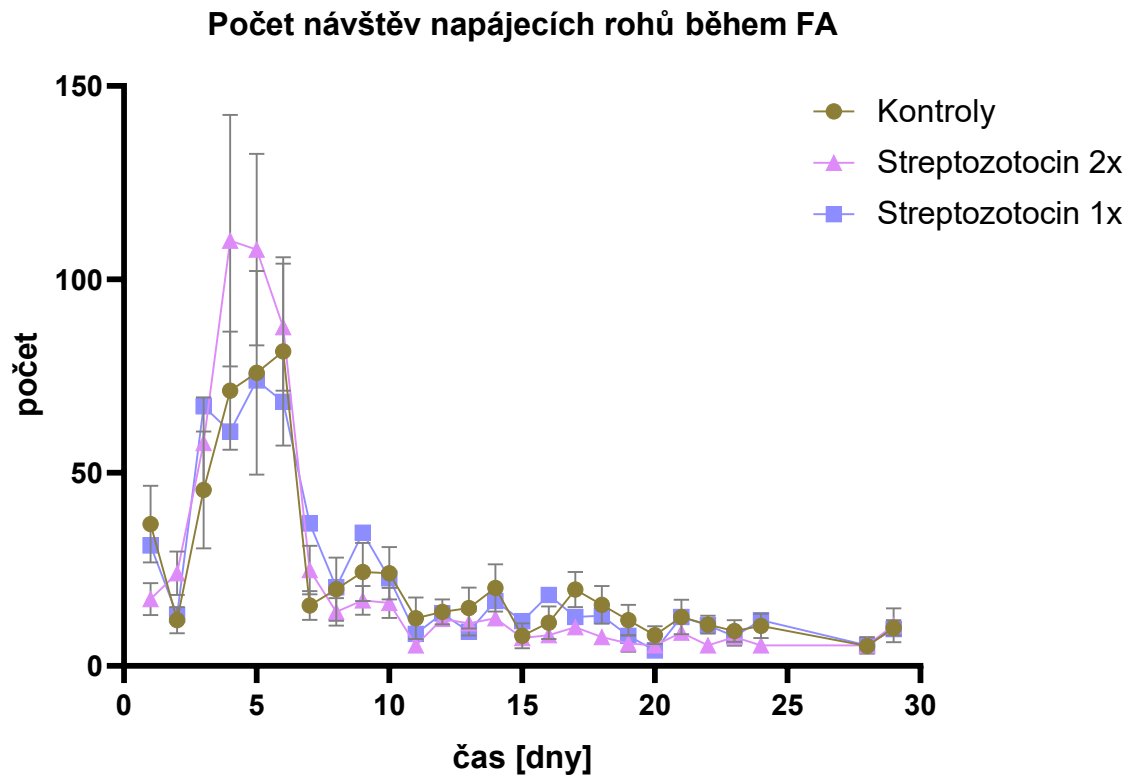
počet vstupů do kvadrantů (Obr. 22 E)	kontroly	Target x CW	***	0,0003
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	2x streptozotocin	Target x CW	**	0,0024
		Target x CCW	***	0,0003
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001
	1x streptozotocin	Target x CW	****	<0,0001
		Target x CCW	****	<0,0001
		Target x protilehlá str.	****	<0,0001

Tab. 3: MWM Probe test. Výčet všech signifikantních rozdílů mezi porovnávanými cílovými oblastmi u všech tří skupin ve všech pěti parametrech. Graficky jsou znázorněny na obrázku 22. Slovem „Target“ je označena cílová oblast ostrůvku nebo cílový kvadrant s ostrůvkem – dle názvu ve sloupci parametr.

9.2.2. IntelliCage

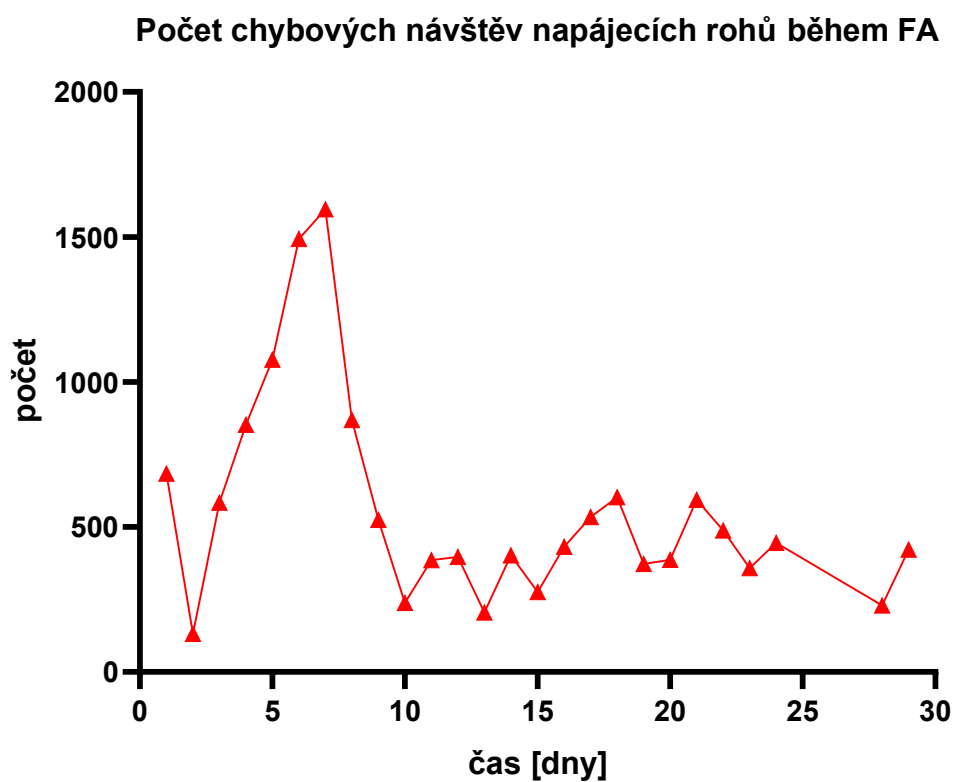
9.2.2.1. Free adaptation

Po testu MWM byla zvířata umístěna do IntelliCage. Z důvodu přesného srovnání s pokusem s transgenními zvířaty trvala fáze FA 29 dní. Návštěvnost NR vidíme na obrázku 23. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.



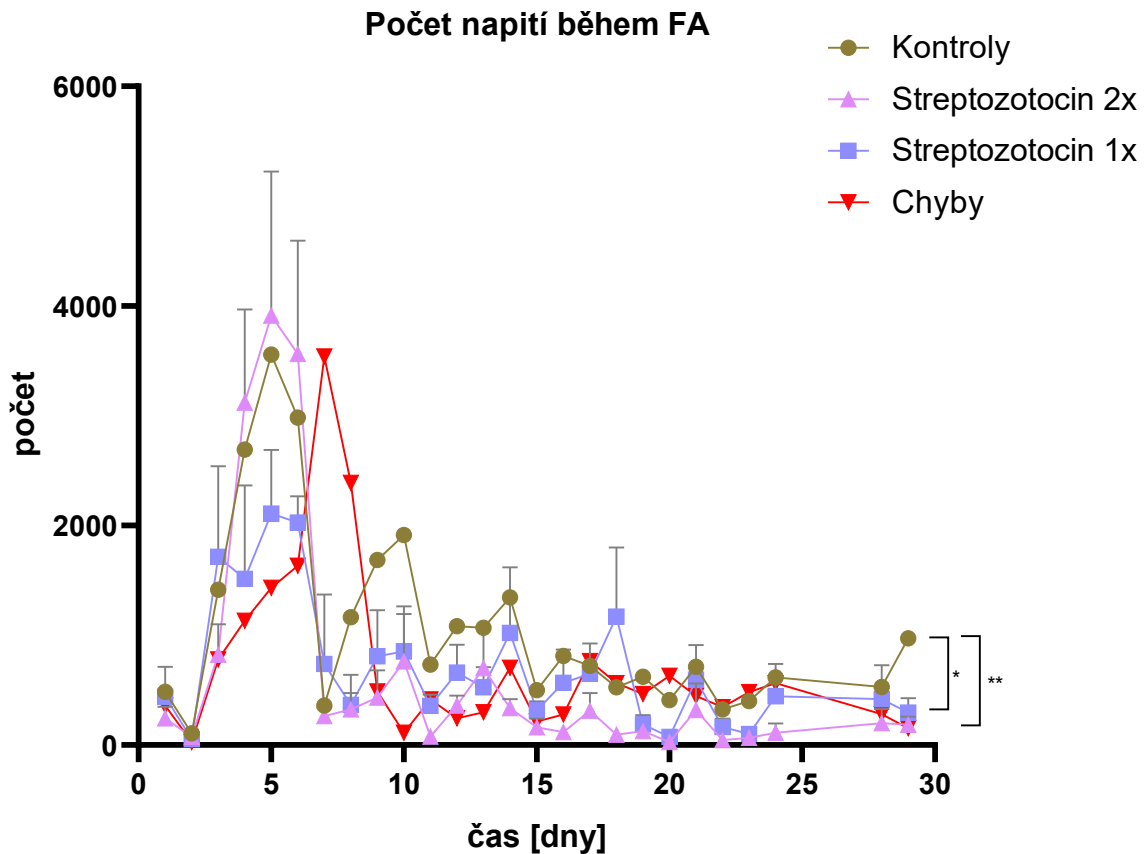
Obr. 23: Porovnání streptozotocinového modelu s kontrolami WT kmene Wistar v IC během FA. Graf zobrazuje denní počet návštěv napájecích rohů. Rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.

Počet chybových, tedy nepřirazených, návštěv v průběhu FA vidíme na obrázku 24. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.



Obr. 24: Počet návštěv napájecích rohů IC během FA nepřirazených žádnému zvířeti. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.

Počet napití i s chybovými, tedy nepřirazenými, napitími vidíme na obrázku 25. Rozdíl mezi skupinou se dvěma dávkami streptozotocinu a kontrolami je statisticky signifikantní [$p = 0,0038$]; rozdíl mezi skupinou s jednou dávkou streptozotocinu a kontrolami je statisticky signifikantní [$p = 0,0128$]. Rozdíl mezi oběma skupinami streptozotocinu pak nebyl nalezen. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.



Obr. 25: Porovnání streptozotocinového modelu s kontrolami WT kmene Wistar v IC během FA. Graf zobrazuje denní počet napití. Rozdíl mezi skupinou se dvěma dávkami streptozotocinu a kontrolami je statisticky signifikantní [$p = 0,0038$]; rozdíl mezi skupinou s jednou dávkou streptozotocinu a kontrolami je statisticky signifikantní [$p = 0,0128$]. Nebyl nalezen rozdíl mezi oběma streptozotocinovými skupinami. Datová řada “Chyby” vyjadřuje nepřirazená napití. Kvůli technické chybě nebyla data mezi dny 25-27 zaznamenána.

10. Diskuse

10.1. Chování transgenního modelu TgF344-AD v prostředí IntelliCage

V testu MWM u 6 - 8 měsíců starých potkanů nebyl pozorován kognitivní deficit transgenních zvířat oproti kontrolám. Transgenní zvířata se od kontrol neodlišovala signifikantně v žádném z testovaných parametrů probe testu. Oproti tomu v prostředí IC během 29 dní trvající FA fáze byl naměřen výrazně signifikantní rozdíl v počtu návštěv NR, kde kontroly hodnotami převyšovaly TgF344-AD, a i počet napití měly kontroly signifikantně vyšší. Počet napití se ale lišil mnohem méně než počet návštěv NR samotných. V testu PP, který trval 16 dní se neprojevil rozdíl v návštěvnosti NR před a po oslazení vody ani rozdíl v návštěvnosti mezi skupinami.

U transgenního modelu TgF344-AD se deficit prostorové paměti měřený v testu MWM nebo bludišti Barnesové projevuje ve věku 10 měsíců (Berkowitz *et al.*, 2018), ve věku 6 – 8 měsíců se neprojevuje (Cohen *et al.*, 2013; Berkowitz *et al.*, 2018; Pentkowski *et al.*, 2018). Výsledek našeho testování v MWM tedy odpovídá dosavadnímu poznání. O to zajímavější je výsledek z IC, který jasně ukazuje deficit transgenních zvířat už během fáze volné adaptace. Tento deficit byl bohužel natolik výrazný, že nedovolil přistoupit ke všem plánovaným fázím testu z obavy o dehydrataci zvířat.

Otázkou zůstává, zda naměřený deficit v návštěvnosti NR je opravdu deficit prostorové paměti. Jelikož měly kontroly mnohem větší rozdíl v počtu návštěv NR než v napitích, usuzujeme, že v tunelech vedoucích k NR trávily čas i mimo napájení a používaly je jako úkryty. Do klece jsme proto umístili plastové trubky 20 cm dlouhé o průměru odpovídajícímu tunelům k NR, abychom minimalizovali využívání tunelů k jinému účelu než jako cestu k lahvím s vodou. Z pozorování během údržbového času víme, že opatření nezabralo a převážně kontrolní zvířata byla zalezlá a spala v tunelech k NR. Otázkou zůstává, proč byla v tunelech převážně kontrolní zvířata. Transgenní jedinci mohli mít kromě prostorové paměti problém s koordinací pohybů a mohlo pro ně být obtížnější do tunelů vylézt. Tuto možnost navrhujeme ověřit testem na rotarodu. Kontrolní zvířata mohla mít ve skupině také vyšší sociální status a zabrat žádané místo. Byl problém zvířata z obsazených tunelů vyhnat, aby byl přístup k vodě volný. K tomuto účelu slouží vyústění natlakovaného vzduchu v NR. Pokud se zvíře v NR zdržuje příliš dlouho (je přesně nadefinováno v programování IC), na zvíře se foukne a to tolikrát, dokud NR neopustí. Senzor pro přítomnost zvířete je ale těsně před lahvemi, takže pobyt v tunelu nijak měřen není a je neomezený.

Dalším problémem bylo zjištění vysokého počtu chybových detekcí návštěv i napití. Tedy těch, kdy v NR bylo zvíře, ale nebyl správně načten čip, aby se návštěva nebo napití přiřadila konkrétnímu zvířeti. Jedním z důvodů mohla být velikost zvířat. Zvířata byla poměrně drobná a tunelem se protáhla

dvě vedle sebe. To mohlo být matoucí pro čtečku čipu, která pak nepřiradila návštěvu ani jednomu zvířeti. Zdůvodnění vzniklých chyb měření a jejich náprava je problematická, protože z podstaty pokusu v místnosti s IC nikdo není přítomen. Proto by jistě pomohlo opatřit klec, a hlavně vnitřek napájecích rohů, kamerami, aby se chybná událost, která má ale zaznamenaný přesný čas vzniku, dala zhodnotit obrazovou kontrolou, co se v NR skutečně dělo.

Abychom zjistili, zda je vysoká chybovost rovnoměrně rozložena mezi skupinami a můžeme tedy i přes počet chyb pracovat s naměřenými výsledky, byly do IC umístěny obě skupiny zvířat samostatně, a to vždy na 7 dní. Z těchto pobytů jsme pak vypočítali poměr chybových návštěv ku řádným a chybových napití ku řádným a poměry skupin porovnali. Jejich rozdíly nebyly statisticky signifikantní, a tak jsme chyby považovali za rovnoměrně rozložené mezi všechna zvířata v pokusu.

IC byla schopna detekovat deficit transgenních zvířat, který jsme z běžných behaviorálních testů dosud neznali, a to za podmínek přirozenějších pro zvířata a bez rušivých elementů. Je však potřeba vyřešit nežádáný pobyt zvířat v tunelech k NR a vysoký počet chybových – nepřirazených – návštěv a napití, nejen, abychom dostali přesnější data, ale aby byla hlídána dostatečná hydratace zvířat. Potom se bude moci přistoupit k dalším fázím (obměnám) testu.

10.2. Chování streptozotocinového modelu v prostředí IntelliCage

V testu MWM u 17 týdnů starých samců byl nalezen signifikantní rozdíl v nácviku na pozici ostrůvku u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu, která měla časy i dráhy delší než druhé dvě skupiny. Skupina s jednou dávkou streptozotocinu se od kontrol nelišila a její křivka grafu kopíruje průběh křivky kontrol. V probe testu se statisticky významně odlišila skupina se dvěma dávkami streptozotocinu pouze v počtu vstupů do kvadrantu s ostrůvkem, který měla vyšší, a to pouze od skupiny s jednou dávkou streptozotocinu, ne však od kontrol. Oproti tomu v prostředí IC během 29 dní trvající FA byl nalezen signifikantní rozdíl v počtu napití u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu oproti kontrolám i u skupiny s jednou dávkou streptozotocinu oproti kontrolám. Streptozotocinová zvířata pila méně než kontroly. Počet návštěv NR se mezi skupinami nelišil.

Dostatečná dávka streptozotocinu pro model AD je 3 mg/kg váhy zvířete. Při vyšších dávkách se již efekt nezvyšuje (Kraska *et al.*, 2012; Knezovic *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2020). V literatuře se však objevují dva protokoly pro počet aplikací, v jednom se aplikuje jedna dávka streptozotocinu (C. Correia *et al.*, 2013; Grieb, 2016; Alluri *et al.*, 2020), ve druhém 2 dávky po 48 hodinách (Rajasekar *et al.*, 2017; Angelova *et al.*, 2019; Sharma & Garabadu, 2020). Výsledky našeho pokusu ukazují signifikantní kognitivní insuficienci v testu MWM pouze u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu. V IC se ale obě streptozotocinové skupiny signifikantně lišily od kontrol v počtu

napití již během fáze volné adaptace. Kognitivní insuficience nastupuje již v prvních dnech po aplikaci streptozotocinu (Knezovic *et al.*, 2015; Grieb, 2016; Ghosh *et al.*, 2020; Homolak *et al.*, 2021). Nejvýznamnější je ale 1 měsíc po aplikaci (Knezovic *et al.*, 2015). V té době jsme provedli test MWM. Do IC šla zvířata 10 týdnů po aplikaci streptozotocinu, kdy podle práce Knezovic *et al.* (2015) dochází k dočasnému zlepšení kognitivních funkcí. To, stejně jako u pokusu s transgenními zvířaty, ukazuje na vyšší senzitivitu testování v IC. V literatuře není žádná zmínka o streptozotocinovém modelu, který by podstoupil testování v IC, proto nemáme naše výsledky zatím s čím porovnat.

Otázkou zůstává, zda naměřený deficit v počtu napití je opravdu deficit kognitivních funkcí. Oproti transgennímu modelu se zvířata ve streptozotocinovém pokusu nelišila v počtu návštěv NR, což vnímáme jako skutečnost, která vylučuje mnoho neznámých diskutovaných u transgenních zvířat. Zvířata ve streptozotocinovém pokusu měla také počet každodenních napití téměř o řád vyšší než transgenní zvířata, takže jsme se nemuseli obávat jejich dehydratace. Streptozotocinový model vznikl pro modelování metabolických aspektů vzniku AD. Proto snížená konzumace vody nemusí souviset s prostorovou orientací a pamětí, ale může mít metabolické odůvodnění. Hladina hydratace je nepřímo úměrná inzulínové rezistenci (Schliess & Häussinger, 2000; Schäfer *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2020), kterou streptozotocin způsobuje. To by znamenalo, že jsme byli schopni naměřit rozdíly mezi streptozotocinovými zvířaty a kontrolami v metabolických aspektech bez analýzy krve či tkání, a to už během fáze volné adaptace.

Zaznamenali jsme však také obdobné množství chybových návštěv NR a chybových napití (vztaženo k počtu správně registrovaným návštěvám a napitím) jako u pokusu s transgenními zvířaty. Jelikož byla zvířata ve streptozotocinovém pokusu větší a pravděpodobně se nevešla zároveň dvě do tunelu, tato skutečnost nám redukuje jeden možný důvod vzniku naměřených chyb. Je to však pouze spekulace, protože ve streptozotocinovém pokusu nebylo možné zvířata vizuálně kontrolovat ani během ÚO. Zde opět narážíme na situaci, kdy by bylo dobré mít možnost pořízení kamerového záznamu. Taktéž došlo k technickým komplikacím, kdy IC z neznámého důvodu tři dny nezaznamenávala data, i když kontrolní panel fungoval. Problém jsme objevili až během analýzy dat a dle této skutečnosti upravíme každodenní technické kontroly, abychom výpadek zaregistrovali co nejdříve.

Pomocí IC jsme signifikantně oddělili obě skupiny streptozotocinového modelu už během FA, což se nám behaviorálním testem MWM nepodařilo. Streptozotocinový model podrobíme v IC dalším plánovaným fázím pokusu, upravíme však délku fází. Jak jsme zjistili u fáze FA, signifikantní výsledek se dostavil po více než 14 dnech. Určitě je potřeba vyřešit vysoký počet chybových – nepřirazených – návštěv a napití a důvod výpadku zaznamenávání dat. Zaměříme se také na možné

metabolické vysvětlení nižší hydratace streptozotocinových zvířat a rozsah jejich inzulínové rezistence.

11.Závěr

Cílem této práce bylo zavedení a validace testování kognitivních funkcí potkaních modelů AD pomocí IntelliCage. Transgenní model v testovaném věku 6-8 měsíců v testu MWM neprojevil kognitivní deficit oproti kontrolám, ale v prostředí IC měl významně nižší návštěvnost NR i počet napití.

Streptozotocinový model měl v testu MWM signifikantně horší kognitivní výsledky pouze u skupiny se dvěma dávkami streptozotocinu. Skupina s jednou dávkou streptozotocinu se od kontrol nelišila. V prostředí IC měly všechny skupiny streptozotocinového pokusu stejnou návštěvnost NR, počet napití však měly obě skupiny s podaným streptozotocinem významně nižší než kontroly, přičemž skupina se dvěma dávkami streptozotocinu s vyšší mírou signifikance. A to pouze během fáze FA bez kognitivních testů.

Testování pomocí IntelliCage považujeme nejen za méně stresující a přirozenější pro zvířata, ale také za metodu dodávající více komplexní data. K definitivní interpretaci těchto dat bude zapotřebí dalších pokusů, je však možné konstatovat, že testování v prostředí IC se ukázalo jako senzitivnější pro odlišení behaviorálního fenotypu v obou studovaných modelech v porovnání s MWM.

12. Seznam zkratek

3xTg	transgenní model nesoucí 3 mutace
AD	Alzheimerova demence
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionová kyselina (AMP acid)
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE2	alela E2 apolipoproteinu E
ApoE3	alela E3 apolipoproteinu E
ApoE4	alela E4 apolipoproteinu E
APP	amyloidový prekurzorový protein
APPsw	švédská mutace genu pro amyloidový prekurzorový protein
A β	amyloid β
A β 40	amyloid β dlouhý 40 aminokyselin
A β 42	amyloid β dlouhý 42 aminokyselin
C57BL/6J	kmen černých laboratorních myší nejčastěji používaný jako WT pro tvorbu transgenních jedinců
Ca ²⁺	vápenaté kationty
CAA	cerebrální amyloidová angiopatie
CCW	proti směru hodinových ručiček (counterclockwise)
cdk-5	cyklin dependentní kináza 5
CNS	centrální nervová soustava
CTF	C-terminální fragmenty proteinu
CW	po směru hodinových ručiček (clockwise)
ECM	extracelulární matrix
EOAD	forma Alzheimerovy choroby s časným začátkem (early-onset Alzheimer's disease)
EV	program EthoVision
FA	volná adaptace (free adaptation)
FOXO	forkhead box protein O
GABA	kyselina gama aminomáselná (gamma aminobutyric acid)
GLT1	gen pro glutamátový transportér 1
GLUT 4	glukózový transportér typu 4 (glucose transporter type 4)
Gq protein	druh receptorového intracelulárního regulačního proteinu
GSK3	glykogen syntáza kináza 3
HDL	lipoproteiny s vysokou denzitou (high density lipoproteins)
HEB	hematoencefalická bariéra
HF	hyperfosforylovaný

IC	IntelliCage
IDL	lipoproteiny se střední denzitou (intermediate density lipoproteins)
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IGF-1r	receptor inzulínu podobného růstového faktoru 1 (insulin-like growth factor 1 receptor)
IM	intramuskulární
IP	intraperitoneální
IR	inzulínový receptor
IR-A	inzulínová izoforma A prekurzorového proteinu
IR-B	inzulínová izoforma B prekurzorového proteinu
IRS-1	inzulínový receptorový substrát 1 (insulin receptor substrate 1)
IRS-2	inzulínový receptorový substrát 2 (insulin receptor substrate 2)
LOAD	forma Alzheimerovy choroby s pozdním začátkem (late-onset Alzheimer's disease)
LTP	dlouhodobá potenciace (long-term potenciaci)
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly (mikrotubule-associated proteins)
MAPT	gen pro protein tau (microtubule-associated protein tau)
MCI	mírná kognitivní porucha (mild cognitive impairment)
mRNA	mediátorová rybonukleová kyselina
MTOC	mikrotubuly organizující centrum (microtubule organizing center)
MWM	Morrisovo vodní bludiště (Morris water maze)
NFTs	neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles)
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NR	napájecí roh
NSE-apoE3	transgenní kmen myši s alelou ApoE3
NSE-apoE4	transgenní kmen myši s alelou ApoE4
PP	učení na preferované místo (place preference)
PPAR	receptor aktivovaný peroxizomovým proliferátorem (peroxisome proliferator-activated receptor)
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
RAS	rodina genů ze skupiny protoonkogenů, které kódují malé monomerické proteiny schopné vázat na sebe guanosintrifosfát
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
Thy1.2	promotor proteinu buněčného povrchu původně známého jako antigen tymocytu
ÚO	údržbové okno
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou densitou (very low density lipoproteins)
WT	původní kmen (wild type)

13. Seznam použité literatury

- Agrawal, R., Vieira-De-abreu, A., Durupt, G., Taylor, C., Chan, O., & Fisher, S.J. (2018) Insulin regulates glut4 in the ventromedial hypothalamus to restore the sympathoadrenal response to hypoglycemia in diabetic rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, **315**, E1286–E1295.
- Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., & Prochiantz, A. (1995) Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell Biol.*, **128**, 919–927.
- Alluri, R., Ambati, S.R., Routhu, K., Kopalli, S.R., & Koppula, S. (2020) Phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS605240 ameliorates streptozotocin-induced alzheimer's disease like sporadic dementia in experimental rats. *EXCLI J.*, **19**, 71–85.
- Alzheimer's Asociation (2019) 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.*, **15**, 321–387.
- ** Alzheimer's Asociation (2020) Alzheimer's Disease Facts and Figures: Report 2020.
- ** Alzheimer's disease - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic [WWW Document] (2021) . URL <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/diagnosis-treatment/drc-20350453>
- Angelova, H., Pechlivanova, D., Krumova, E., Miteva-Staleva, J., Kostadinova, N., Dzhambazova, E., & Landzhov, B. (2019) Moderate protective effect of Kyotorphin against the late consequences of intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease. *Amino Acids*, **51**, 1501–1513.
- Animalab [WWW Document] (2021) . URL <https://animalab.eu/intellicage-for-rats>
- Barroso, E., del Valle, J., Porquet, D., Vieira Santos, A.M., Salvadó, L., Rodríguez-Rodríguez, R., Gutiérrez, P., Anglada-Huguet, M., Alberch, J., Camins, A., Palomer, X., Pallàs, M., Michalik, L., Wahli, W., & Vázquez-Carrera, M. (2013) Tau hyperphosphorylation and increased BACE1 and RAGE levels in the cortex of PPAR β/δ -null mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, **1832**, 1241–1248.
- Berkowitz, L.E., Harvey, R.E., Drake, E., Thompson, S.M., & Clark, B.J. (2018) Progressive impairment of directional and spatially precise trajectories by TgF344-Alzheimer's disease rats

in the Morris Water Task. *Sci. Rep.*, **8**.

- Berry, A., Amrein, I., Nötzli, S., Lazic, S.E., Bellisario, V., Giorgio, M., Pelicci, P.G., Alleva, E., Lipp, H.-P., & Cirulli, F. (2012) Sustained hippocampal neurogenesis in females is amplified in P66^{Shc^{-/-}} mice: An animal model of healthy aging. *Hippocampus*, **22**, 2249–2259.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, **11**, 153–163.
- * Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J.M. (2014) Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*,.
- Brecht, W.J., Harris, F.M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.Q., Xu, Q., Fish, J.D., Wyss-Coray, T., Buttini, M., Mucke, L., Mahley, R.W., & Huang, Y. (2004) Neuron-Specific Apolipoprotein E4 Proteolysis Is Associated with Increased Tau Phosphorylation in Brains of Transgenic Mice. *J. Neurosci.*, **24**, 2527–2534.
- Breen, K.C. (1992) APP-collagen interaction is mediated by a heparin bridge mechanism. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **16**, 109–121.
- Breen, K.C., Bruce, M., & Anderton, B.H. (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.*, **28**, 90–100.
- C. Correia, S., X. Santos, R., S. Santos, M., Casadesus, G., C. LaManna, J., Perry, G., A. Smith, M., & I. Moreira, P. (2013) Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **10**, 406–419.
- Calissano, P., Ciotti, M.T., Battistini, L., Zona, C., Angelini, A., Merlo, D., & Mercanti, D. (1993) Recombinant human insulin-like growth factor I exerts a trophic action and confers glutamate sensitivity on glutamate-resistant cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 8752–8756.
- Cathomas, F., Fuertig, R., Sigrist, H., Newman, G.N., Hoop, V., Bizzozzero, M., Mueller, A., Luippold, A., Ceci, A., Hengerer, B., Seifritz, E., Fontana, A., & Pryce, C.R. (2015) CD40-TNF activation in mice induces extended sickness behavior syndrome co-incident with but not dependent on activation of the kynurenine pathway. *Brain. Behav. Immun.*, **50**, 125–140.

- Chang, S., Ma, T.R., Miranda, R.D., Balestra, M.E., Mahley, R.W., & Huang, Y. (2005) Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 18694–18699.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St. George Hyslop, P., & Selkoe, D.J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.*, **3**, 67–72.
- Codita, A., Gumucio, A., Lannfelt, L., Gellerfors, P., Winblad, B., Mohammed, A.H., & Nilsson, L.N.G. (2010) Impaired behavior of female tg-ArcSwe APP mice in the IntelliCage: A longitudinal study. *Behav. Brain Res.*, **215**, 83–94.
- Cohen, R.M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T.M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C.G., Breunig, J.J., Rakic, P., Davtyan, H., Agadjanyan, M.G., Kepe, V., Barrio, J.R., Bannykh, S., Szekely, C.A., Pechnick, R.N., & Town, T. (2013) A transgenic alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A β , and frank neuronal loss. *J. Neurosci.*, **33**, 6245–6256.
- Collino, M., Patel, N.S.A., & Thiemermann, C. (2008) PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*,
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., & Pericak-Vance, M.A. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.*, **7**, 180–184.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D., & Dudek, B.C. (1999) Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. *Science (80-)*, **284**, 1670–1672.
- De La Monte, S.M., Tong, M., Bowling, N., & Moskal, P. (2011) Si-RNA inhibition of brain insulin or insulin-like growth factor receptors causes developmental cerebellar abnormalities: Relevance to fetal alcohol spectrum disorder. *Mol. Brain*, **4**.
- De La Monte, S.M. & Wands, J.R. (2006) Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, **9**, 167–181.

- Deary, I.J., Whiteman, M.C., Pattie, A., Starr, J.M., Hayward, C., Wright, A.F., Carothers, A., & Whalley, L.J. (2002) Ageing: Cognitive change and the APOE ϵ 4 allele. *Nature*, **418**, 932.
- Devaskarss, S.U., Giddingsn, S.J., Rajakumars, P.A., Carnaghin, L.R., Menonll, R.K., & Zahm, D.S. (1994) Insulin Gene Expression and Insulin Synthesis in Mammalian' Neuronal Cells*, *Journal of Biological Chemistry*.
- Drachman, D.A. & Leavitt, J. (1974) Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Arch. Neurol.*, **30**, 113–121.
- ** Dudai, Y. (2002) *Memory from A to Z: Keywords, Concepts and Beyond.*, Applied Cognitive Psychology. University Press, Oxford.
- Eckman, C.B., Mehta, N.D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L.M., Prada, C.M., Younkin, S.G., Hutton, M., & Hardy, J. (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (1716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 2087–2089.
- Faizi, M., Bader, P.L., Tun, C., Encarnacion, A., Kleschevnikov, A., Belichenko, P., Saw, N., Priestley, M., Tsien, R.W., Mobley, W.C., & Shamloo, M. (2011) Comprehensive behavioral phenotyping of Ts65Dn mouse model of Down Syndrome: Activation of β 1-adrenergic receptor by xamoterol as a potential cognitive enhancer. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 397–413.
- Fraser, P.E., Yu, G., Lévesque, L., Nishimura, M., Yang, D.S., Mount, H.T.J., Westaway, D., & St George-Hyslop, P.H. (2001) Presenilin function: Connections to Alzheimer's disease and signal transduction. *Biochem. Soc. Symp.*, **67**, 89–100.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., & Matthies, H. (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.*, **452**, 57–65.
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., Zöchling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K., & Riederer, P. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, **105**, 423–438.
- Galsworthy, M.J., Amrein, I., Kuptsov, P.A., Poletaeva, I.I., Zinn, P., Rau, A., Vyssotski, A., & Lipp, H.P. (2005) A comparison of wild-caught wood mice and bank voles in the Intelligence:

- Assessing exploration, daily activity patterns and place learning paradigms. *Behav. Brain Res.*, **157**, 211–217.
- Gandy, S. (2005) The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.*, **115**, 1121–1129.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., & Ahmadiani, A. (2013) Insulin in the brain: Sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.*,
- Ghosh, R., Sil, S., Gupta, P., & Ghosh, T. (2020) Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments in rats. *Metab. Brain Dis.*, **35**, 1279–1286.
- 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., Owen, M., & Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, **349**, 704–706.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., & Gajdusek, D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science (80-.)*, **235**, 877–880.
- Grehan, S., Tse, E., & Taylor, J.M. (2001) Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *J. Neurosci.*, **21**, 812–822.
- Grieb, P. (2016) Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol. Neurobiol.*,
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 4913–4917.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., & Hirokawa, N. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, **369**, 488–491.
- Harris, F.M., Brecht, W.J., Xu, Q., Tesseur, I., Kekonius, L., Wyss-Coray, T., Fish, J.D., Masliah, E.,

- Hopkins, P.C., Scearce-Levie, K., Weisgraber, K.H., Mucke, L., Mahley, R.W., & Huang, Y. (2003) Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10966–10971.
- Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M.J. (1979) Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J. Clin. Invest.*, **64**, 636–642.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., & Brownstein, M. (1978) Identification of insulin in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 5737–5741.
- Homolak, J., Perhoc, A.B., Knezovic, A., Osmanovic Barilar, J., & Salkovic-Petrisic, M. (2021) Additional methodological considerations regarding optimization of the dose of intracerebroventricular streptozotocin A response to: “Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments. *Metab. Brain Dis.*, **36**, 97–102.
- Hopkins, D.F.C. & Williams, G. (1997) Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. *Diabet. Med.*, **14**, 1044–1050.
- Huo, K., Sun, Y., Li, H., Du, X., Wang, X., Karlsson, N., Zhu, C., & Blomgren, K. (2012) Lithium reduced neural progenitor apoptosis in the hippocampus and ameliorated functional deficits after irradiation to the immature mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.*, **51**, 32–42.
- ** IntelliCage - The New Standard For Behavioral And Cognitive Phenotyping In The Home Cage [WWW Document] (2021) . URL <https://www.tse-systems.com/product-details/intellicage>
- Jaholkowski, P., Kiryk, A., Jedynak, P., Ben Abdallah, N.M., Knapska, E., Kowalczyk, A., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Figiel, I., Lioudyno, V., Widy-Tyszkiewicz, E., Wilczynski, G.M., Lipp, H.P., Kaczmarek, L., & Filipkowski, R.K. (2009) New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learn. Mem.*, **16**, 439–451.
- Jansen, W.J., Ossenkoppele, R., Knol, D.L., Tijms, B.M., Scheltens, P., Verhey, F.R.J., Visser, P.J., Aalten, P., Aarsland, D., Alcolea, D., Alexander, M., Almdahl, I.S., Arnold, S.E., Baldeiras, I., Barthel, H., Van Berckel, B.N.M., Bibeau, K., Blennow, K., Brooks, D.J., Van Buchem, M.A., Camus, V., Cavado, E., Chen, K., Chetelat, G., Cohen, A.D., Drzezga, A., Engelborghs, S.,

Fagan, A.M., Fladby, T., Fleisher, A.S., Van Der Flier, W.M., Ford, L., Forster, S., Fortea, J., Foskett, N., Frederiksen, K.S., Freund-Levi, Y., Frisoni, G.B., Froelich, L., Gabryelewicz, T., Gill, K.D., Gkatzima, O., Gomez-Tortosa, E., Gordon, M.F., Grimmer, T., Hampel, H., Hausner, L., Hellwig, S., Herukka, S.K., Hildebrandt, H., Ishihara, L., Ivanoiu, A., Jagust, W.J., Johannsen, P., Kandimalla, R., Kapaki, E., Klimkowicz-Mrowiec, A., Klunk, W.E., Kohler, S., Koglin, N., Kornhuber, J., Kramberger, M.G., Van Laere, K., Landau, S.M., Lee, D.Y., De Leon, M., Lisetti, V., Lleo, A., Madsen, K., Maier, W., Marcusson, J., Mattsson, N., De Mendonca, A., Meulenbroek, O., Meyer, P.T., Mintun, M.A., Mok, V., Molinuevo, J.L., Mollergerd, H.M., Morris, J.C., Mroczko, B., Van Der Mussele, S., Na, D.L., Newberg, A., Nordberg, A., Nordlund, A., Novak, G.P., Paraskevas, G.P., Parnetti, L., Perera, G., Peters, O., Popp, J., Prabhakar, S., Rabinovici, G.D., Ramakers, I.H.G.B., Rami, L., De Oliveira, C.R., Rinne, J.O., Rodrigue, K.M., Rodriguez-Rodriguez, E., Roe, C.M., Rot, U., Rowe, C.C., Ruther, E., Sabri, O., Sanchez-Juan, P., Santana, I., Sarazin, M., Schroder, J., Schutte, C., Seo, S.W., Soetewey, F., Soininen, H., Spuru, L., Struyfs, H., Teunissen, C.E., Tsolaki, M., Vandenberghe, R., Verbeek, M.M., Villemagne, V.L., Vos, S.J.B., Van Waalwijk Van Doorn, L.J.C., Waldemar, G., Wallin, A., Wallin, A.K., Wiltfang, J., Wolk, D.A., Zboch, M., & Zetterberg, H. (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, **313**, 1924–1938.

Kalinin, S., Richardson, J., & Feinstein, D. (2009) A PPARdelta Agonist Reduces Amyloid Burden and Brain Inflammation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **6**, 431–437.

Kalm, M., Karlsson, N., Nilsson, M.K.L., & Blomgren, K. (2013) Loss of hippocampal neurogenesis, increased novelty-induced activity, decreased home cage activity, and impaired reversal learning one year after irradiation of the young mouse brain. *Exp. Neurol.*, **247**, 402–409.

Kar, S., Chabot, J. -G, & Quirion, R. (1993) Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **333**, 375–397.

Karlsson, N., Kalm, M., Nilsson, M.K.L., Mallard, C., Björk-Eriksson, T., & Blomgren, K. (2011) Learning and Activity after Irradiation of the Young Mouse Brain Analyzed in Adulthood Using Unbiased Monitoring in a Home Cage Environment. *Radiat. Res.*, **175**, 336–346.

Khakpai, F., Nasehi, M., Haeri-Rohani, A., Eidi, A., & Zarrindast, M.R. (2012) Scopolamine induced memory impairment; possible involvement of NMDA receptor mechanisms of dorsal

- hippocampus and/or septum. *Behav. Brain Res.*, **231**, 1–10.
- Kiryk, A., Mochol, G., K. Filipkowski, R., Wawrzyniak, M., Lioudyno, V., Knapska, E., Gorkiewicz, T., Balcerzyk, M., Leski, S., Van Leuven, F., Lipp, H.-P., K. Wojcik, D., & Kaczmarek, L. (2011) Cognitive Abilities of Alzheimers Disease Transgenic Mice are Modulated by Social Context and Circadian Rhythm. *Curr. Alzheimer Res.*, **8**, 883–892.
- Klein, R.L., Lin, W.L., Dickson, D.W., Lewis, J., Hutton, M., Duff, K., Meyer, E.M., & King, M.A. (2004) Rapid Neurofibrillary Tangle Formation after Localized Gene Transfer of Mutated Tau. *Am. J. Pathol.*, **164**, 347–353.
- Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P.R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015) Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer’s disease. *J. Neural Transm.*, **122**, 577–592.
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merckenschlager, M., Theis, F.J., Köhr, G., Kaczmarek, L., & Schütz, G. (2010) MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J. Neurosci.*, **30**, 14835–14842.
- Kraska, A., Santin, M.D., Dorieux, O., Joseph-Mathurin, N., Bourrin, E., Petit, F., Jan, C., Chaigneau, M., Hantraye, P., Lestage, P., & Dhenain, M. (2012) In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. *PLoS One*, **7**, e46196.
- Laczó, J., Markova, H., Lobellova, V., Gazova, I., Parizkova, M., Cerman, J., Nekovarova, T., Vales, K., Klovrcova, S., Harrison, J., Windisch, M., Vlcek, K., Svoboda, J., Hort, J., & Stuchlik, A. (2017) Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Psychopharmacology (Berl.)*, **234**, 535–547.
- Lai, F. & Williams, R.S. (1989) A Prospective Study of Alzheimer Disease in Down Syndrome. *Arch. Neurol.*, **46**, 849–853.
- Leon, W.C., Caneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M.T., Dewilde, A., Vercauteren, F., Atifeh, R., Ducatenzeiler, A., Klein, W., Szyf, M., Alhonen, L., & Cuello, A.C. (2010) A novel transgenic rat model with a full alzheimer’s - Like amyloid pathology displays pre - Plaque

- intracellular amyloid β - Associated cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.*, **20**, 113–126.
- Liao, X., Zhang, Y., Wang, Y., & Wang, J. (2004) The effect of cdk-5 overexpression on tau phosphorylation and spatial memory of rat. *Sci. China Ser. C Life Sci.*, **47**, 251–257.
- Lu, D.C., Soriano, S., Bredeisen, D.E., & Koo, E.H. (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid β -protein toxicity. *J. Neurochem.*, **87**, 733–741.
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., & Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 17342–17347.
- * Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., & Huang, Y. (2009) Apolipoprotein E: Structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.*,
- * Masters, C., Bateman, R., Blennow, K., & Rowe, C. (2015) Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.*,
- ** Mild cognitive impairment - Symptoms and causes - Mayo Clinic [WWW Document] (2021) .
URL <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/mild-cognitive-impairment/symptoms-causes/syc-20354578>
- Min, H.K., Ko, H.Y., Kim, J.T., Bankir, L., & Lee, S.W. (2020) Low hydration status may be associated with insulin resistance and fat distribution: Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2008-2010. *Br. J. Nutr.*, **124**, 199–208.
- Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F., & Flier, J.S. (1989) Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 1263–1269.
- Moya, K.L., Benowitz, L.I., Schneider, G.E., & Allinquant, B. (1994) The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev. Biol.*, **161**, 597–603.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat. Genet.*, **1**, 345–347.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M.D. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science (80-.)*, **254**, 97–99.

- Muthuraju, S., Pati, S., Rafiqul, M., Abdullah, J.M., & Jaafar, H. (2012) IntelliCage provides voluntary exercise and an enriched environment, improving locomotive activity in mice following fluid percussion injury. *Basal Ganglia*, **2**, 143–151.
- Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez-Dewhitts, P., Poorman, R.A., Greenberg, B., & Kisilevsky, R. (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan, *Journal of Biological Chemistry*.
- Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengård, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E., & Sing, C.F. (2000) Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.*, **10**, 1532–1545.
- 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. *J. Neurosci.*, **26**, 10129–10140.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., & LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, **39**, 409–421.
- Onishchenko, N., Tamm, C., Vahter, M., Hökfelt, T., Johnson, J.A., Johnson, D.A., & Ceccatelli, S. (2007) Developmental Exposure to Methylmercury Alters Learning and Induces Depression-like Behavior in Male Mice. *Toxicol. Sci.*, **97**, 428–437.
- Parrott, A.C. (1986) The effects of transdermal scopolamine and four dose levels of oral scopolamine (0.15, 0.3, 0.6, and 1.2 mg) upon psychological performance. *Psychopharmacology (Berl.)*, **89**, 347–354.
- Pentkowski, N.S., Berkowitz, L.E., Thompson, S.M., Drake, E.N., Olguin, C.R., & Clark, B.J. (2018) Anxiety-like behavior as an early endophenotype in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **61**, 169–176.
- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., & Shukla, R. (2017) Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. *Life Sci.*, **173**, 1–10.

- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H.J. (2003) Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1333–1341.
- Robinson, L. & Riedel, G. (2014) Comparison of automated home-cage monitoring systems: Emphasis on feeding behaviour, activity and spatial learning following pharmacological interventions. *J. Neurosci. Methods*, **234**, 13–25.
- Roger, L.J. & Fellows, R.E. (1980) Stimulation of ornithine decarboxylase activity by insulin in developing rat brain. *Endocrinology*, **106**, 619–625.
- Schäfer, C., Gehrmann, T., Richter, L., Keitel, V., Köhrer, K., Häussinger, D., & Schliess, F. (2007) Modulation of gene expression profiles by hyperosmolarity and insulin. *Cell. Physiol. Biochem.*, **20**, 369–386.
- Schliess, F. & Häussinger, D. (2000) Cell hydration and insulin signalling. *Cell. Physiol. Biochem.*,
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., & Bell, G.I. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 114–118.
- Sharma, Y. & Garabadu, D. (2020) Intracerebroventricular streptozotocin administration impairs mitochondrial calcium homeostasis and bioenergetics in memory-sensitive rat brain regions. *Exp. Brain Res.*, **238**, 2293–2306.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., & Tonegawa, S. (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, **89**, 629–639.
- ** Sheppard, O. & Coleman, M. (2020) View of Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In *ALZHEIMER'S DISEASE: DRUG DISCOVERY*. Exon Publications, Brisbane, Australia, Cambridge, UK.
- 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., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., & St George-Hyslop, P.H. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, **375**, 754–760.
- Shi, Y., Yamada, K., Liddelow, S.A., Smith, S.T., Zhao, L., Luo, W., Tsai, R.M., Spina, S., Grinberg,

- L.T., Rojas, J.C., Gallardo, G., Wang, K., Roh, J., Robinson, G., Finn, M.B., Jiang, H., Sullivan, P.M., Baufeld, C., Wood, M.W., Sutphen, C., McCue, L., Xiong, C., Del-Aguila, J.L., Morris, J.C., Cruchaga, C., Fagan, A.M., Miller, B.L., Boxer, A.L., Seeley, W.W., Butovsky, O., Barres, B.A., Paul, S.M., & Holtzman, D.M. (2017) ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*, **549**, 523–527.
- Shingo, A.S., Kanabayashi, T., Kito, S., & Murase, T. (2013) Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. *Behav. Brain Res.*, **241**, 105–111.
- * Talwar, P., Sinha, J., Grover, S., Rawat, C., Kushwaha, S., Agarwal, R., Taneja, V., & Kukreti, R. (2015) Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer’s Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective. *Mol. Neurobiol.*,
- Tau Protein. Causes, symptoms, treatment Tau Protein [WWW Document] (2021) . URL <http://dxline.info/diseases/tau-protein#prettyPhoto>
- Too, L.K., McQuillan, J.A., Ball, H.J., Kanai, M., Nakamura, T., Funakoshi, H., McGregor, I.S., & Hunt, N.H. (2014) The kynurenine pathway contributes to long-term neuropsychological changes in experimental pneumococcal meningitis. *Behav. Brain Res.*, **270**, 179–195.
- Too, L.K., Mitchell, A.J., McGregor, I.S., & Hunt, N.H. (2016) Antibody-induced neutrophil depletion prior to the onset of pneumococcal meningitis influences long-term neurological complications in mice. *Brain. Behav. Immun.*, **56**, 68–83.
- * Tyan, S.H. & Koo, E.H. (2015) New tricks from an old dog: Another synaptotoxic fragment from APP. *Cell Res.*,
- Urbach, Y.K., Raber, K.A., Caneva, F., Plank, A.C., Andreasson, T., Ponten, H., Kullingsjö, J., Nguyen, H.P., Riess, O., & von Hörsten, S. (2014) Automated phenotyping and advanced data mining exemplified in rats transgenic for Huntington’s disease. *J. Neurosci. Methods*, **234**, 38–53.
- Vannoni, E., Voikar, V., Colacicco, G., Sánchez, M.A., Lipp, H.P., & Wolfner, D.P. (2014) Spontaneous behavior in the social homecage discriminates strains, lesions and mutations in mice. *J. Neurosci. Methods*, **234**, 26–37.
- Velázquez, E., Blázquez, E., & Ruiz-Albusac, J.M. (2009) Synergistic effect of glucagon-like peptide

- 2 (GLP-2) and of key growth factors on the proliferation of cultured rat astrocytes. Evidence for reciprocal upregulation of the mRNAs for GLP-2 and IGF-I receptors. *Mol. Neurobiol.*, **40**, 183–193.
- Voikar, V., Krackow, S., Lipp, H.P., Rau, A., Colacicco, G., & Wolfer, D.P. (2018) Automated dissection of permanent effects of hippocampal or prefrontal lesions on performance at spatial, working memory and circadian timing tasks of C57BL/6 mice in IntelliCage. *Behav. Brain Res.*, **352**, 8–22.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B.M., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., & Evin, G. (2002) A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with notch processing. *Biochemistry*, **41**, 2825–2835.
- Weisgraber³, K.H., Innerarity, T.L., & Mahley, R.W. (1982) Abnormal Lipoprotein Receptor-binding Activity of the Human E Apoprotein due to Cysteine-Arginine Interchange at a Single Site*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.
- Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., & Mendelsohn, F.A.O. (1989) Localization and Characterization of Insulin-Like Growth Factor-I Receptors in Rat Brain and Pituitary Gland Using in vitro Autoradiography and Computerized Densitometry A Distinct Distribution from Insulin Receptors. *J. Neuroendocrinol.*, **1**, 369–377.
- White, M.F. (2003) Insulin Signaling in Health and Disease. *Science (80-.)*,.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D.B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M.T., Thal, D.R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F.J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., & Haass, C. (2015) σ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, **526**, 443–447.
- Wu, N., Wang, F., Jin, Z., Zhang, Z., Wang, L.K., Zhang, C., & Sun, T. (2017) Effects of GABAB receptors in the insula on recognition memory observed with intellcage. *Behav. Brain Funct.*, **13**.
- Xu, P.T., Schmechel, D., Qiu, H.L., Herbstreith, M., Rothrock-Christian, T., Eyster, M., Roses, A.D., & Gilbert, J.R. (1999) Sialylated human apolipoprotein E (apoE(s)) is preferentially associated

with neuron-enriched cultures from APOE transgenic mice. *Neurobiol. Dis.*, **6**, 63–75.

Xu, Q.G., Li, X.Q., Kotecha, S.A., Cheng, C., Sun, H.S., & Zochodne, D.W. (2004) Insulin as an in vivo growth factor. *Exp. Neurol.*, **188**, 43–51.

Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., & Mahley, R.W. (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 18700–18705.

Young, W.S. (1986) Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides*, **8**, 93–97.

Zhang, C., Wu, B., Beglopoulos, V., Wines-Samuelson, M., Zhang, D., Dragatsis, I., Südhof, T.C., & Shen, J. (2009) Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature*, **460**, 632–636.

* Zhao, N., Liu, C.C., Qiao, W., & Bu, G. (2018) Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry*,

Zhu, C., Gao, J., Karlsson, N., Li, Q., Zhang, Y., Huang, Z., Li, H., Kuhn, H.G., & Blomgren, K. (2010) Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 1017–1030.

* Review

** Internetové a knižní zdroje