

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Hana Matušková

**Farmakologický animální model Alzheimerovy demence (model Samaritán) a
mediátorový systém N-methyl-D-aspartátového receptoru a oxidu dusnatého
Pharmacological animal model of Alzheimer's disease (rat model Samaritan)
and mediator system of N-methyl-D-aspartate receptor and nitric oxide**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Zdena Křištofiková, Ph.D.

Praha 2015/2016

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 28.4.2016

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Zdeně Křištofikové, Ph.D., za odborné vedení experimentální části týkající se změn aktivit syntáz oxidu dusnatého, trpělivost a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Svě školitelce bych chtěla také poděkovat za poskytnutí dat týkajících se aktivity cholinergních transportérů.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Šírové za odborné vedení týkající se exprese podjednotek N-metyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru.

Mgr. Tomášovi Petráskovi, Ph.D., bych chtěla poděkovat za školení v oblasti kognitivních testů, které byly na modelu potkana Samaritán prováděny (Morrisovo vodní bludiště, aktivní alotetické vyhýbání se místu).

Děkuji také své rodině za vytrvalou podporu během celého mého studia.

Abstrakt:

Alzheimerova demence je neurodegenerativní onemocnění s nejvyšší prevalencí, které nelze v současné době vyléčit. Cílem diplomové práce bylo otestovat mediátorový systém N-methyl-D-aspartátového receptoru a oxidu dusnatého u animálního modelu sporadické formy Alzheimerovy demence (potkaní model Samaritán; Taconic Pharmaceuticals, USA) a srovnat tyto změny se změnami v hipokampálním cholinergním systému a v kognitivních testech. Tento model vznikl chronickou unilaterální aplikací β -amyloidu₄₂ a pro-oxidativních látek (heptahydrát síranu železnatého a L-buthionin-(S,R)-sulfoximin) in vivo pomocí osmotických pump Alzet® do levé komory mladého dospělého potkana kmene Long Evans. Cílem této práce bylo otestovat změny v expresi NR1/NR2A/NR2B podjednotek N-methyl-D-aspartátového receptoru a aktivity syntáz oxidu dusnatého (neuronální, endotelové a inducibilní) v pravém a levém kortexu. Naše výsledky ukazují na signifikantní změny v expresi NR2A/NR2B podjednotek N-methyl-D-aspartátového receptoru a aktivitě iNOS v kortexu potkanů modelu Samaritán při srovnání s kontrolními potkany Long Evans. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorovanými změnami v aktivitě cholinergních transportérů v hipokampu i v kognitivních testech (Morrisovo vodní bludiště a aktivní alotetické vyhýbání se místu). Naše výsledky podporují dvoufázový mechanismus změn glutamatergního systému u Alzheimerovy demence a naznačují, že tento animální model je spíše modelem raného stádia této nemoci.

Klíčová slova: Alzheimerova demence, NMDA receptor, potkaní model Samaritán, syntázy oxidu dusnatého

Abstract:

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder with the highest prevalence in the population and for which we do not have a cure so far. The aim of this thesis was to test the mediator system of the N-methyl-D-aspartate receptor and nitric oxide in an animal model of sporadic form of Alzheimer's disease (Samaritan Alzheimer's Rat Model; Taconic Pharmaceuticals, USA). Then compare these results with changes in hippocampal cholinergic system and cognitive tests. The Samaritan rat model is based on the unilateral in vivo application of β -amyloid₄₂ and the pro-oxidative substances (ferrous sulfate heptahydrate and L-buthionine-(S,R)-sulfoximine). Neurochemical methods included testing of the NR1/NR2A/NR2B subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor and activity of nitric oxide synthases (neuronal, endothelial, inducible) in the cortex, in both cases in the right and left hemisphere separately. Our results show that Samaritan rats exhibited significant changes in expression of NR2A/NR2B subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor and activity of inducible nitric oxide synthase in cortex compared to control rats. The results of glutamatergic system are consistent with changes in activity of cholinergic transporter and cognitive tests (Morris water maze and active allothetic place avoidance). Our results support the two-stage mechanism of the glutamatergic system and mimicking the situation of early stages of AD.

Key words: Alzheimer's disease, NMDA receptor, Samaritan rat model, nitric oxide synthases

Obsah

1. Úvod.....	10
1. Literární přehled.....	11
1.1 Alzheimerova demence.....	11
1.2 NMDA receptor.....	14
1.2.1 Struktura NMDA receptoru.....	14
1.2.2 Funkce NMDA receptoru.....	16
1.2.3 Modulace NMDA receptoru.....	18
1.2.4 Změny NMDA receptoru v průběhu Alzheimerovy demence.....	19
1.3 Syntázy oxidu dusnatého.....	21
1.3.1 Oxid dusnatý.....	23
1.3.2 Změny syntáz oxidu dusnatého v průběhu Alzheimerovy demence.....	23
1.4 Mediátorový systém NMDA receptoru a oxidu dusnatého a jeho změny u Alzheimerovy demence.....	24
1.5 Lateralita mozku a její změny během normálního stárnutí a Alzheimerovy demence.....	26
1.6 Animální model sporadické formy Alzheimerovy demence (model Samaritán).....	27
2. Cíle práce.....	29
3. Metody a materiál.....	30
3.1 Pufry a roztoky.....	30
3.1.1 Imunobloting (Expres podjednotek NR1/NR2A/NR2B).....	30
3.1.2 Stanovení aktivity nNOS/eNOS/iNOS.....	31
3.2 Zvířata.....	32
3.3 Expres NR1/NR2A/NR2B podjednotek NMDA receptoru – imunobloting.....	33
3.4 Stanovení aktivity syntáz oxidu dusnatého.....	35
3.4.1 Úprava kyselého ionexu na mírně zásaditý.....	35
3.4.2 Stanovení aktivity syntáz oxidu dusnatého.....	35
3.5 Analýza dat.....	36
4. Výsledky.....	37
4.1 Změny v expresi podjednotek NR1/NR2A/NR2B NMDA receptoru.....	37
4.2 Změna aktivit enzymů syntáz oxidu dusnatého.....	41
4.3 Výsledky korelační analýzy.....	44

5. Diskuze.....	48
5.1 Lateralita kontrolních zvířat Long Evans v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého	48
5.2 Změny v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého u potkanů Samaritán	49
5.3 Srovnání změn mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu se změnami cholinergního neurotransmitterového systému v hipokampu potkana Samaritán.....	51
5.4 Srovnání změn v biochemii mozku se změnami v kognitivních testech u potkanů Samaritán	53
6. Závěr.....	54
7. Literatura	55
8. Seznam příloh.....	69

Seznam zkratk:

AAPA	aktivní alotetické vyhýbání se místu (<i>active allothetic place avoidance</i>)
AD	Alzheimerova demence
AMPA	alfa-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolpropionát
ANOVA	analýza rozptylu (<i>analysis of variance</i>)
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein (<i>amyloid precursor protein</i>)
BH ₄	tetrahydrobiopterin
CAMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní protein kináza II
CNS	centrální nervová soustava
CREB	protein vázající se v genomu na element odezvy na cAMP (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
FAD	flavinadenindinukleotid.
FMN	oxidovaný flavinmononukleotid
HACU	vysokoafinitní transport cholinu (<i>high-affinity choline uptake</i>)
HC-3	hemicholinium-3
CHT1	vysokoafinitní transportér cholinu
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
LTD	dlouhodobá deprese (<i>long-term depression</i>)
LTP	dlouhodobá potenciace (<i>long-term potentiation</i>)

MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MK-801	dizocilpin
mRNA	mediátorová RNA (<i>messenger RNA</i>)
NMDA	N-methyl-D-aspartát
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NR1	podjednotka NMDA receptoru typu 1
NR2	podjednotka NMDA receptoru typu 2
NR3	podjednotka NMDA receptoru typu 3
PDZ	postsynaptický denzní protein, disc large tumor supresor, protein <i>zonula occludens-1</i>
PKA	proteinkináza typu A
PKC	proteinkináza typu C
PSD-95	protein postsynaptické denzity 95
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
SAMP8	animální model myši se zrychleným stárnutím (<i>senescence accelerated mouse prone 8</i>)
SEM	střední chyba průměru
TMD	transmembránová doména
β -amyloid	peptidy amyloidu β
β -amyloid ₄₀	peptid amyloidu β končící v pozici 40
β -amyloid ₄₂	peptid amyloidu β končící v pozici 42

1. Úvod

Alzheimerova demence (AD) je neurodegenerativní onemocnění s nejvyšší prevalencí, které nelze v současné době vyléčit (Bekris et al., 2010). Hlavními histopatologickými znaky jsou extracelulární neuritické plaky tvořené převážně agregovaným β -amyloidem a intracelulární neurofibrilární klubka vzniklá hyperfosforylovaným tau (τ) proteinem. Mezi základní dvě formy AD patří familiární (autozomálně dominantní onemocnění s časným nástupem rozvoje) a sporadická (jejímž nejrizikovějším faktorem je věk); (Bird, 2008). Jelikož transgenní animální modely odpovídají spíše familiární formě AD, jejíž pravděpodobnost výskytu je velmi nízká (5%), je v současnosti spíše snaha najít netransgenní animální model, který by poskytl informace o častěji se vyskytující sporadické formě AD. Model Samaritán (Taconic Pharmaceuticals, USA), vzniklý chronickou aplikací roztoku síranu železnatého, β -amyloidu₄₂ a L-buthioninu-sulfoximinu in vivo, by měl modelovat spíše sporadickou formu AD.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo otestovat animální model sporadické formy AD (model Samaritán) pomocí změn v expresi NR1/NR2A/NR2B podjednotek N-methyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru a v aktivitách syntáz oxidu dusnatého – neuronální (nNOS), endotelové (eNOS) a indukibilní (iNOS) v kortexu při srovnání s kontrolními potkany Long Evans. Dalším cílem bylo porovnat tyto výsledky se změnami v hipokampálním neurotransmitterovém cholinergním systému a v kognitivních testech.

1. Literární přehled

1.1 Alzheimerova demence

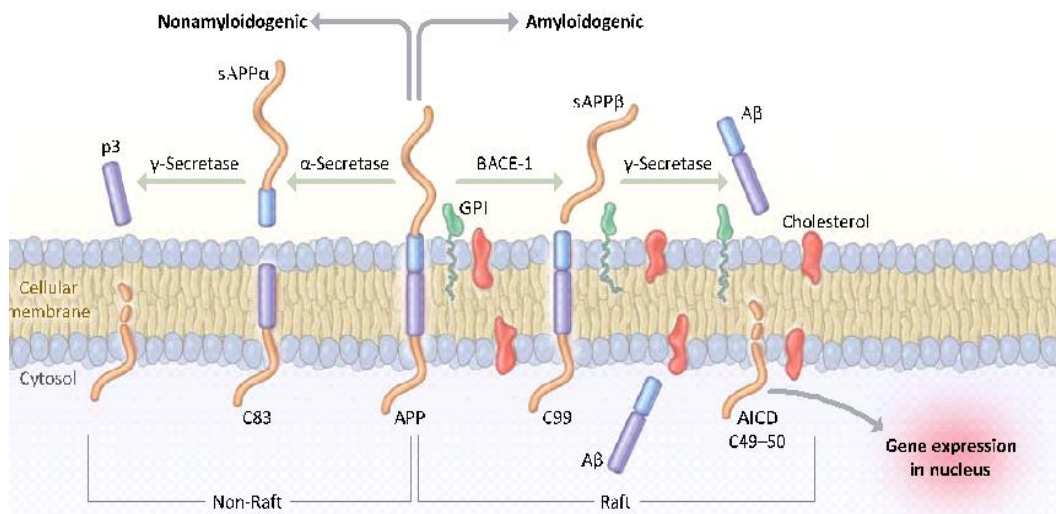
AD patří mezi nejčastější příčinu vzniku neurodegenerativního onemocnění v pokročilém věku (Bekris et al., 2010). AD je považována za multifaktoriální onemocnění, přičemž mezi nejrizikovější faktory patří věk. Dále jsou pak v literatuře zmiňovány i další rizikové faktory, jako jsou například kouření, obezita, *diabetes mellitus* nebo vaskulární onemocnění (Blennow et al., 2006).

Existují dvě základní formy AD, a to familiární a sporadická. Familiární forma AD je autozomálně dominantní onemocnění, jejíž pravděpodobnost výskytu je velmi nízká. Obecně se uvádí pravděpodobnost menší než 6% (Bird, 2008). Je způsobena mutacemi v několika genech.

Všechny geny rizikové pro vznik familiární formy AD nejsou známy, mezi nejčastěji uváděné patří amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin-1 a presenilin-2 (Blennow et al., 2006; Ittner and Götz, 2011). Lidský gen pro APP je lokalizován na 21. chromozomu (Dawkins and Small, 2014). APP je transmembránový protein typický svou velkou extracelulární doménou a intracelulární C-terminální doménou (O'Brien and Wong, 2011; Müller and Zheng, 2012). V porovnání s familiární formou se populace mnohem častěji setkává se sporadickou formou AD. Ta je spojována s alelou $\epsilon 4$ apolipoproteinu E (APOE), která zvyšuje riziko vzniku AD u heterozygotních jedinců až 3x a u jedinců homozygotních až 15x. Jednou z funkcí APOE je transport cholesterolu do neuronů, dále také hraje důležitou roli v akumulaci β -amyloidu (Blennow et al., 2006; Liu et al., 2013).

Mezi hlavní histopatologické znaky nalezené v mozcích pacientů postižených AD jsou extracelulární neuritické plaky tvořené agregovaným β -amyloidem a intracelulární neurofibrilární klubka. Peptidy β -amyloidu (o přibližné velikosti 4kDa) vznikají štěpením APP. Štěpení se účastní 2 membránově vázané endoproteázy (β - a γ – sekretázy), které jsou přítomny hlavně v neuronech. V ostatních buněčných typech se vyskytuje také α -sekretáza štěpící APP na menší úseky, které nemají tendenci agregovat (Benilová et al., 2012). Celý mechanismus tvorby β -amyloidu z APP je v současnosti velmi dobře popsán. Nejprve β -sekretáza štěpí APP a uvolňuje se derivát, který zůstává vázaný v membráně a

který je posléze štěpen γ – sekretázou. V důsledku velmi nepřesného štěpení γ – sekretázy vznikají různé druhy β -amyloidu odlišující se v C-terminální doméně. Nejčastější formou β -amyloidu je peptid končící v pozici 40 (β -amyloid₄₀) a 42 (β -amyloid₄₂). Experimentální data naznačují, že delší forma β -amyloid₄₂ má větší tendenci k tvorbě oligomerů a k agregaci a je tak běžnější součástí plaků (Murphy and LeVine, 2010). Schéma štěpení APP je znázorněno na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma štěpení APP

Neamyloidogenní cesta: α -sekretáza štěpí APP za vzniku velké sAPP α ektodomény, která se uvolňuje a nechává za sebou C-terminální fragment o velikosti 83 aminokyselin (C83) navázaný v membráně. C83 je posléze štěpen γ -sekretázou za vzniku extracelulární p3 a amyloidní intracelulární domény (AICD).

Amyloidogenní cesta: β -sekretáza štěpí APP za vzniku zkrácené sAPP β a membránově vázaný C-terminální fragment o velikosti 99 aminokyselin (C99). γ -sekretáza odštěpuje z C99 peptidy β -amyloidu o velikosti 37-43 aminokyselin a nechává v membráně navázaný AICD o velikosti 49-50 aminokyselin. AICD je poté uvolněna do cytoplazmy a transportována do jádra, kde aktivuje genovou expresi (převzato a upraveno z Querfurth and LaFerla, 2010).

Neurofibrilární klubka jsou tvořena hyperfosforylovaným τ proteinem. Protein τ je členem rodiny proteinů asociovanými s mikrotubuly (Mandelkow and Mandelkow, 2012).

U lidí se nachází především v neuronech, stopové množství lze nalézt i v jiných tkáních jako například v srdci, ledvinách, plicích a jiných. Existuje 6 izoform τ proteinu v mozku, které se odlišují změnami v C- i N-terminální doméně. Každá izoforma má odlišnou funkci a k její expresi dochází v odlišných fázích vývoje (Buée et al., 2000). V neuronech má důležitou funkci v podobě navázání a stabilizace mikrotubulů. Za fyziologických podmínek je tento protein rozpustný a jeho funkce v neuronech je udržována homeostázou mezi jeho fosforylací a defosforylací. Během patologických podmínek dochází k hyperfosforylaci, která snižuje množství navázaného τ proteinu na mikrotubulech. Nenavázaný hyperfosforylovaný τ protein má tendenci tvořit páry helikálních filament (Huang and Jiang, 2009).

Jak již bylo řečeno výše, v současné době nelze AD vyléčit. Existuje však několik možností, jak zmírnit projevy onemocnění a zpomalit jeho vývoj. Používány jsou léky kompenzující nedostatek neurotransmiterů (např. inhibitory acetylcholinesterázy nebo antagonisté NMDA receptoru), psychotropní látky (např. antidepresiva a anxiolytika), antioxidanty nebo některé protizánětlivé látky (Cummings, 2001). Cílem podávání inhibitorů acetylcholinesterázy (např. donepezil, galantamin) je částečně kompenzovat nedostatek acetylcholinu v mozku lidí s AD, vznikající poškozením cholinergních neuronů. Jejich výrazný úbytek byl pozorován především v *ncl. basalis Meynerti*, což má za následek zhoršení kognitivních schopností pacientů (Talesa, 2001). Ke zhoršení kognitivních schopností přispívá také glutamátem regulovaná excitotoxicita, která může vést k poškození funkce neuronů. Dále je při léčení AD často používán memantin, nekompetitivní antagonist NMDA receptoru (Blennow et al., 2006; Robinson and Keating, 2006). Memantin má velmi rychlou kinetiku a váže se do blízkosti vazebného místa pro Mg^{2+} uvnitř iontového kanálu (Johnson and Kotermanski, 2006; Olivares et al., 2012). Za fyziologických podmínek je NMDA receptor otevřen pouze několik milisekund a z toho důvodu se zde nemůže memantin koncentrovat a nemá proto na receptor žádný účinek. V případě nadměrné aktivace receptoru se koncentrace memantinu uvnitř iontového kanálu zvyšuje a účinně ho blokuje a brání tak nadměrnému vstupu Ca^{2+} do buňky (Lipton, 2006). Účinnost memantinu je sice malá, ale velmi nápomocná, v klinickém testování byl prokázán jeho účinek na zlepšení kognice, nálady, chování a vykonávání denních aktivit (Olivares et al., 2012).

1.2 NMDA receptor

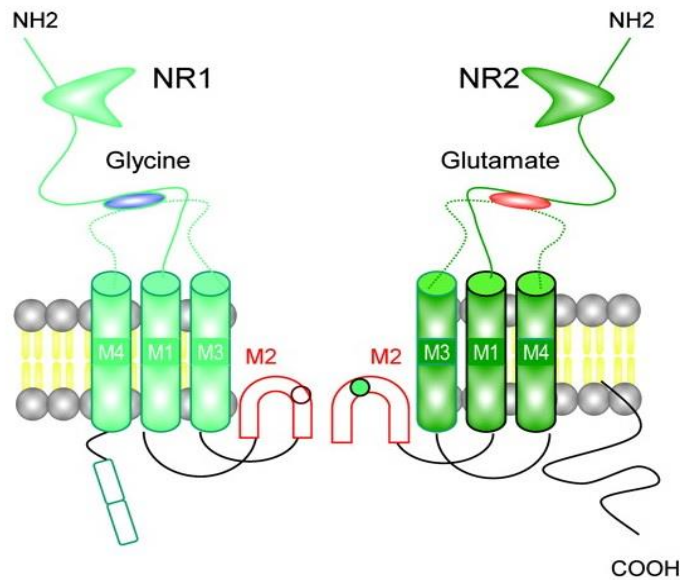
1.2.1 Struktura NMDA receptoru

NMDA receptor patří spolu s receptorem α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionát (AMPA) a kainátovým receptorem do skupiny ionotropních glutamátových receptorů (Lee et al., 2014). AMPA a kainátový receptor jsou aktivovány navázáním excitační molekuly L-glutamátu a nejčastější jejich formou je homotetramer (Karakas and Furukawa, 2014).

NMDA receptor je jedinečný v porovnání s ostatními receptory ze skupiny ionotropních glutamátových receptorů. K jeho expresi dochází v celé centrální nervové soustavě (CNS) a hraje důležitou roli během fyziologických (např. synaptická plasticita) i patofyziologických podmínek (např. neuronální smrt), (Paoletti and Neyton, 2007). NMDA receptor má několik specifických vlastností: při klidovém membránovém potenciálu je blokován extracelulárním Mg^{2+} navázaným uvnitř NMDA receptoru, který brání jeho aktivaci při napětí blížícím se tomu klidovému; vykazuje vysokou propustnost pro Ca^{2+} ; pro jeho aktivaci je nezbytné navázání glutamátu a koagonisty glycinu; kinetika NMDA receptoru je pomalá z důvodu pomalého uvolňování glutamátu; obsahuje velké množství modulačních míst (Paoletti et al., 2013; Lee et al., 2014). K aktivaci NMDA receptoru dochází teprve při výrazné depolarizaci ($\sim 40mV$) způsobené sumací několika okolních depolarizací na presynaptické a postsynaptické membráně. Depolarizace vzniká především prostřednictvím AMPA receptorů (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Nikolaev et al., 2012). To je považováno za protektivní mechanismus, který zabraňuje nadměrnému vstupu Ca^{2+} do neuronu (Bonaccorso et al., 2011). Poté co dojde k otevření receptoru, vstupuje Na^+ a Ca^{2+} do buňky. Ca^{2+} aktivuje řadu signálních kaskád, které jsou zásadní pro paměť a učení (Furukawa et al., 2005).

Existuje celkem 7 podjednotek NMDA receptoru, které tvoří obligatorní heterotetramer. Jsou to NR1, NR2 (A-D) a NR3 (A, B). Pro vytvoření funkčního receptoru je nezbytná přítomnost NR1 podjednotky (Benarroch, 2011). Nejčastěji je výsledný receptor tvořený kombinací dimerů NR1 a NR2 podjednotek (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Každá podjednotka je tvořena velkou extracelulární N-terminální doménou, ligand vázající doménou, transmembránovými doménami (TMD) a intracelulární C-terminální doménou. TMD všech čtyř podjednotek je složena ze tří transmembránových oblastí (M1, M3, M4) a M2 oblastí, která vstupuje do membrány

z intracelulární strany a vytváří vratnou kličku (Sobolevsky et al., 2009). Doména S1 a S2 NR1 podjednotky umožňuje vazbu glycinu, zatímco stejné domény NR2 podjednotky váží glutamát (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Přehledné schéma struktury NMDA receptoru je znázorněno na Obrázku 2.



Obrázek 2: Struktura NMDA receptoru

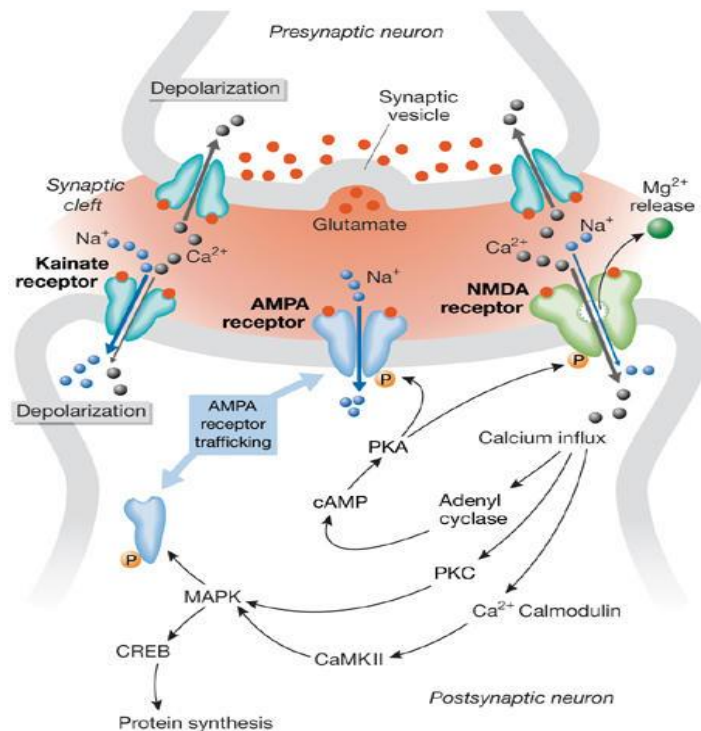
NMDA receptor je tvořen N-terminální doménou (NH₂), C-terminální doménou (COOH) a transmembránovými oblastmi (M1, M3, M4) a M2 oblastí, která tvoří vratnou smyčku. Domény NR1 podjednotky umožňují vazbu glycinu, domény NR2 podjednotky vážou glutamát (Převzato a upraveno z Benarroch, 2011).

V mozku potkanů i člověka je exprese jednotlivých podjednotek regulována různými způsoby. Podjednotky NR1 a NR2B vykazují vysokou expresi při narození. Exprese NR2A a NR2C podjednotek se však zvyšují teprve po narození (Wenzel et al., 1997; Law et al., 2003). K expresi NR2D podjednotky dochází v průběhu embryonálního vývoje a po narození je již méně signifikantní (Ritter et al., 2001). Mediátorová RNA (mRNA) podjednotek NMDA receptoru je specifická i svou distribucí. V mozku je všudypřítomná mRNA pro NR1 podjednotku, zatímco transkript pro NR2A a NR2B je

omezen na neokortex a hipokampus. NR2C mRNA je lokalizována pouze v mozečku a NR2D ve středním a zadním mozku (Portera-Cailliau et al., 1996).

1.2.2 Funkce NMDA receptoru

NMDA receptor má v CNS důležitou funkci v procesu dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD). To jsou děje, které jsou součástí synaptické plasticity, jejíž podstatou je posilování nebo zeslabování synaptického přenosu v závislosti na elektrické stimulaci (Bear and Malenka, 1994; Voglis and Tavernarakis, 2006). Nejlépe je tento děj popsán v hipokampu mezi CA3-CA1 pyramidovými neurony (Lüscher and Malenka, 2012). LTP se účastní NMDA a AMPA receptor, oba jsou aktivovány molekulou glutamátu a oba fungují jako selektivní kanály pro přenos Na^+ dovnitř (u NMDA receptoru spolu s Ca^{2+}) a K^+ ven. Jak už bylo zmíněno výše, pro aktivaci NMDA receptoru je nezbytná silná depolarizace na presynaptické i postsynaptické membráně, která umožní uvolnění Mg^{2+} . Nejprve tedy dochází k aktivaci AMPA receptoru, při které vstupuje proud Na^+ do buňky a menší proud K^+ směrem z buňky. To způsobí depolarizaci postsynaptické membrány a otevření kanálu NMDA receptoru pro vstup Ca^{2+} do intracelulárního prostoru. Zvýšená hladina Ca^{2+} aktivuje uvnitř buňky celou řadu kináz, mezi které patří také Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII), proteinkáza A (PKA), proteinkináza C (PKC) a mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) (Lüscher and Malenka, 2012; Stuchlík and Svojanovská, 2014). Aktivací kináz dochází ke změně jejich vlastností a aktivaci signálních kaskád. Dochází také k fosforylaci AMPA receptoru a jeho inzerci do postsynaptické membrány, viz Obrázek 3. Dochází k propojování sousedních synapsí, které mají podobnou aktivitu, na základě principu „*cells that fire together, wire together*” (Zito and Scheuss, 2009). Naopak dlouhodobé snížení elektrické stimulace synapsí a tedy i snížení hladiny Ca^{2+} vede k aktivaci fosfatáz a k zeslabení synapsí (Lee et al., 2003; Lau and Zukin, 2007).



Obrázek 3: Schéma LTP (Převzato z Voglis and Tavernarakis, 2006)

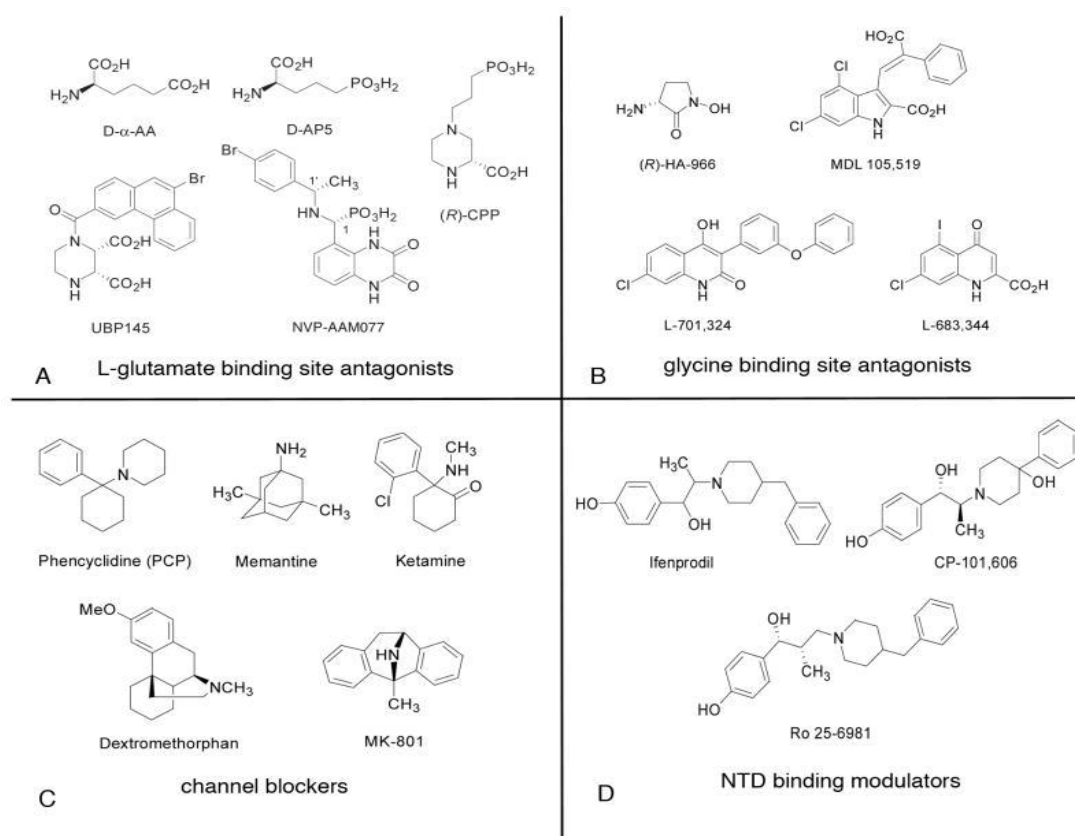
Vysokofrekvenční stimulace presynaptické membrány vede k uvolnění glutamátu a následné aktivaci AMPA receptoru. Depolarizace postsynaptické membrány a aktivace NMDA receptoru má za následek zvýšení hladiny Ca²⁺ a aktivaci CaMKII a PKC, které fosforylují a aktivují MAPK, což vede k fosforylaci a aktivaci CREB, který indukuje syntézu proteinů a jejich následnou inzerci do postsynaptické membrány. Dále pak Ca²⁺ aktivuje PKA, která fosforyluje AMPA a NMDA receptor. To vede ke zvýšení vodivosti těchto receptorů a tím prodloužení doby průchodu iontů do buňky (Derkach et al., 2007).

NMDA receptor hraje zásadní roli v tvorbě a zrání nových synapsí v průběhu vývoje. Několik experimentů potvrdilo, že dochází k různým strukturním změnám ve složení podjednotek receptoru, čímž se následně mění i jeho vlastnosti (Takahashi et al., 1996; Paoletti et al., 2013) Nejvyšší množství NMDA receptoru lze nalézt ve vyvíjejícím se jedinci a s dozráváním se jejich počet snižuje (McDonald and Johnston, 1990; Contestabile et al., 2000). NMDA receptor má ve vyvíjejícím se mozku v porovnání s dospělým mozkiem rozdílné vlastnosti: vyšší aktivita NMDA receptoru, nižší citlivost

k zablokováním Mg^{2+} , delší doba otevření a vyšší citlivost k pozitivní modulaci glycinem (Scheetz and Constantine-Paton, 1994; Feldman and Knudsen, 1998; Contestabile, 2000).

1.2.3 Modulace NMDA receptoru

Mezi nejčastěji využívaná vazebná místa, přes která lze NMDA receptor modulovat patří: vazebné místo glutamátu/glycinu, uvnitř iontového kanálu nebo na regulační N-terminální doméně. Schéma rozdělení těchto látek je znázorněno na Obrázku 4 (Monaghan et al., 2012).



Obrázek 4: Schéma modulátorů NMDA receptoru se zařazením do skupin podle vazebného místa

Ve skupině A se nacházejí látky, které fungují jako antagonisté a vážou se na vazebné místo glutamátu. Do skupiny B jsou řazeny antagonisté vážící se na vazebné místo glycinu. Skupina C znázorňuje látky blokující kanál a látky ve skupině D se vážou a moduluji N-terminální doménu (Převzato z Monaghan et al., 2012).

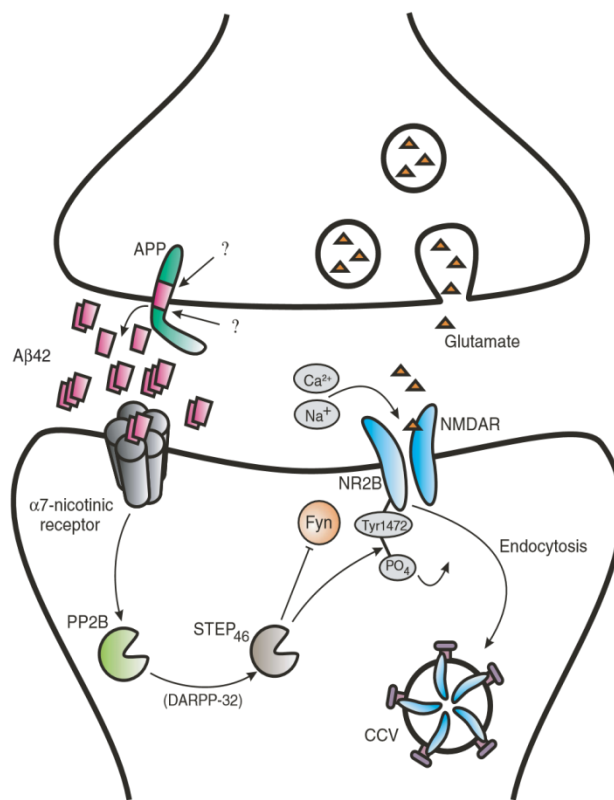
Dále můžeme dělit látky modulující NMDA receptor na kompetitivní antagonisty např. selfotel, nekompetitivní alosterické antagonisty a látky blokující iontový kanál např. MK-801 (Layton et al., 2006; Kalia et al., 2008). NMDA receptor hraje důležitou roli ve fyziologických i patologických procesech (například oxidativní stres vyvolaný nadměrnou aktivací NMDA receptoru a následným vstupem Ca^{2+}), proto je snaha využít antagonisty k terapeutickým účelům (Layton et al., 2006).

1.2.4 Změny NMDA receptoru v průběhu Alzheimerovy demence

Glutamát je jedním z hlavních excitačních neurotransmiterů v CNS a z toho důvodu je mu věnována velká pozornost také při výzkumu AD. V literatuře je velmi často zmiňovaná glutamátergní hypotéza AD (Maragos et al., 1987; Hynd et al., 2004), založená na dvoufázovém mechanismu (*two-stage mechanism*) působení glutamátu v rozvoji tohoto onemocnění. V počátečních fázích AD se předpokládá hyperaktivita glutamátergního systému, zatímco v pokročilých fázích se systém stává hypoaktivním (Olney et al. 1997). Hyperaktivita je způsobena zvýšením hladiny glutamátu, která vzniká nejspíše následkem nefunkčnosti transportérů zpětného vychytávání. Následující hypoaktivita v pokročilých fázích AD je dána ztrátou neuronů (Butterfield and Pocernich, 2003; Francis, 2003). Tento mechanismus byl potvrzen také nukleární magnetickou rezonancí, pomocí které byly měřeny hladiny glutamátu u třech skupin pacientů – kontrolní, s mírným kognitivním deficitem a s diagnostikovanou AD. Výsledky naznačovaly zvýšenou hladinu glutamátu u pacientů s mírným kognitivním deficitem oproti těm s AD a naopak signifikantně snížené hladiny u pacientů s AD (Fayed et al., 2011).

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou během fyziologických podmínek udržovány v nízkých koncentracích díky antioxidačnímu obrannému mechanismu (Massaad, 2011). V důsledku změn, mezi které patří například senilní plaky, neurofibrilární klubka, dysfunkce mitochondrií nebo zánět, dochází ke změnám citlivosti NMDA receptoru. Tyto změny pak mohou mít za následek vznik excitotoxicity (Danysz and Parsons, 2012). Studie potvrdily, že β -amyloidní oligomery aktivují NMDA a AMPA receptory lokalizované na neuronech, což vede k masivnímu vstupu Ca^{2+} do cytosolu neuronu. Zvýšená hladina následně způsobí nadměrné zatížení mitochondrií Ca^{2+} , které

reagují zvýšenou produkcí ROS. V membráně mitochondrií tento proces dále pokračuje otevřením mitochondriálního póru přechodné permeability, kterým se uvolňuje cytochrom c indukující programovanou buněčnou smrt – apoptózu (Sanz-Blasco et al., 2008; Alberdi et al., 2010; Du and Yan, 2010). Zvýšené množství β -amyloidu (a to především β -amyloid₄₂) v synapsi má dále negativní vliv na množství NMDA receptoru a to především inhibicí LTP. Celý mechanismus, jehož výsledkem je endocytóza NMDA receptoru v klatrinem obalených váčcích je znázorněn na Obrázku 5 (Tanzi, 2005; Ferreira and Klein, 2011; Crimins et al., 2013).



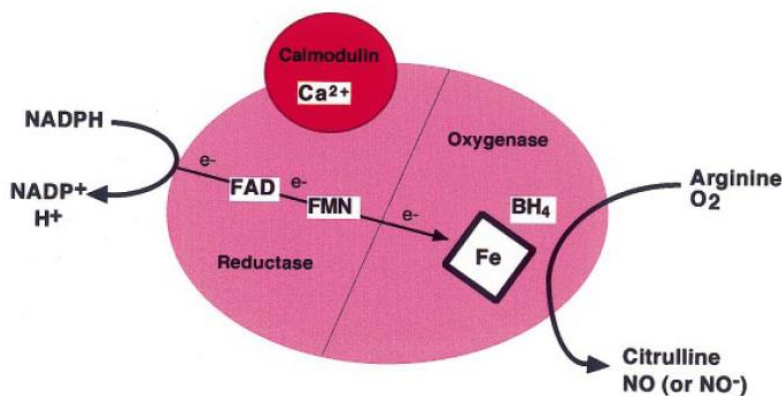
Obrázek 5: Vliv β -amyloidu₄₂ na internalizaci NMDA receptoru v synapsi

Vazba β -amyloidu₄₂ na acetylcholinový nikotinový receptor (α 7-nicotine receptor) a aktivace kalcineurinu (PP2B) vede k defosforylaci a aktivaci tyrozinofosfatázy (STEP46), která defosforyluje NR2B podjednotku NMDA receptoru, čímž dochází k indukci endocytózy NMDA receptoru (Převzato z Tanzi, 2005).

K poškození neuronů v průběhu AD přispívá také změna exprese podjednotek NMDA receptoru. Heterotetramerní NMDA receptor je nejčastěji tvořen kombinací NR1 a NR2A-B podjednotek a proto jsou také jejich změny v expresi nejčastěji měřeny. V mozcích pacientů s AD byla nalezena snížená hladina proteinů pro NR1 a NR2B podjednotku v hipokampu a dále pro NR2A a NR2B podjednotku v entorhinálním kortexu (Sze et al., 2001). Tomu odpovídá i exprese mRNA pro NR1 a NR2B podjednotku, která v průběhu rozvoje AD klesá. V případě hladin mRNA pro NR2A podjednotku nebyly nalezeny žádné změny s rozvíjející se AD (Mishizen-Eberz et al., 2004).

1.3 Syntázy oxidu dusnatého

Mezi tři hlavní typy syntáz oxidu dusnatého patří nNOS, eNOS a iNOS a jejich funkcí je tvorba oxidu dusnatého (NO). Syntéza NO je znázorněna na Obrázku 6. Jednotlivé syntázy oxidu dusnatého se od sebe vzájemně odlišují svou lokalizací a způsobem aktivace (Wendehenne et al., 2001). Patří do skupiny proteinů, které mají reduktázovou doménu s navázanými prostetickými skupinami flavinadeninnukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN) a oxygenázovou doménu s vazebným místem pro arginin, tetrahydrobiopterin (BH₄) a hem (Fischmann et al., 1999). Podle způsobu aktivace jsou rozdělovány na konstitutivní a indukovatelnou skupinu. Konstitutivní nNOS a eNOS jsou závislé na zvýšení hladiny Ca²⁺ a jeho následné vazbě na kalmodulin (Asano et al., 1994; Michel and Feron, 1997; Weaver et al., 2002). Tyto syntázy katalyzují syntézu NO v krátkých intervalech a nízkých koncentracích (Albrecht et al., 2003). Na Ca²⁺ nezávislá iNOS váže kalmodulin s vysokou afinitou a to i za nízkých koncentrací Ca²⁺ a její aktivita je závislá např. na hladině cytokinů (Asano et al., 1994; Michel and Feron, 1997; Weaver et al., 2002).



Obrázek 6: Schéma syntézy NO katalyzované syntézami oxidu dusnatého

Elektron pocházející z NADPH je převeden z reduktázové domény přes FAD a FMN na oxygenázovou doménu, kde interaguje s BH₄ a hemem. Výsledkem je urychlení reakce, při které dochází k oxidaci L-argininu za vzniku citrulinu a NO. Pro tento proces je nezbytná vazba Ca²⁺ na kalmodulin (Převzato z Alderton et al., 2001).

Konstitutivní nNOS je exprimována v neuronální tkáni ve zralých i nezralých neuronech. Pro funkčnost nNOS je nezbytná dimerizace nejčastěji mezi oxygenázovými doménami a vazba Ca²⁺ na kalmodulin. Aktivita může být ovlivněna také fosforylací, inhibitory, vazbou proteinů na PDZ doménu nNOS nebo alosterickými aktivátory (Zhou and Zhu, 2009). Aktivace tvorbou dimeru se vyznačuje také eNOS. K její expresi dochází v endoteliálních buňkách, buňkách hladkého svalstva, srdečních myocytech, krevních destičkách nebo také v neuronech. NO vznikající prostřednictvím eNOS je důležitý pro regulaci krevního tlaku (Albrecht et al., 2003; Tuteja et al., 2004). Od předchozích dvou se zcela odlišuje iNOS, která je aktivována při zánětu a vyskytuje se proto hlavně v makrofázích (Beck et al., 1999; Wendehenne et al., 2001).

1.3.1 Oxid dusnatý

NO má v těle mnoho funkcí a účastní se fyziologických a patofyziologických procesů. V periferní nervové tkáni funguje jako neuromodulátor, který reguluje gastrointestinální motilitu, krevní tlak, neuroendokrinní funkce nebo vazodilataci. V mozku hraje důležitou roli v procesu tvorby paměti a regulace odpovědi na bolestivý stimul. Účastní se také v procesu imunitní odpovědi a kontraktility a metabolismu kosterního svalstva (Christopherson and Brecht, 1997; Omer et al., 2012). V průběhu AD dochází k tvorbě ROS, jedním z nich je také peroxynitrit, který vzniká reakcí NO se superoxidem (Guix et al., 2005; Calabrese et al., 2007). Peroxynitrit je velmi silným radikálem, který způsobuje nevratnou inhibici dýchacího řetězce a oxidaci jednotlivých komponentů mitochondrií, čímž dochází k jejich poškození (Togo et al., 2004). To jsou procesy, které přispívají ke smrti neuronů v průběhu AD.

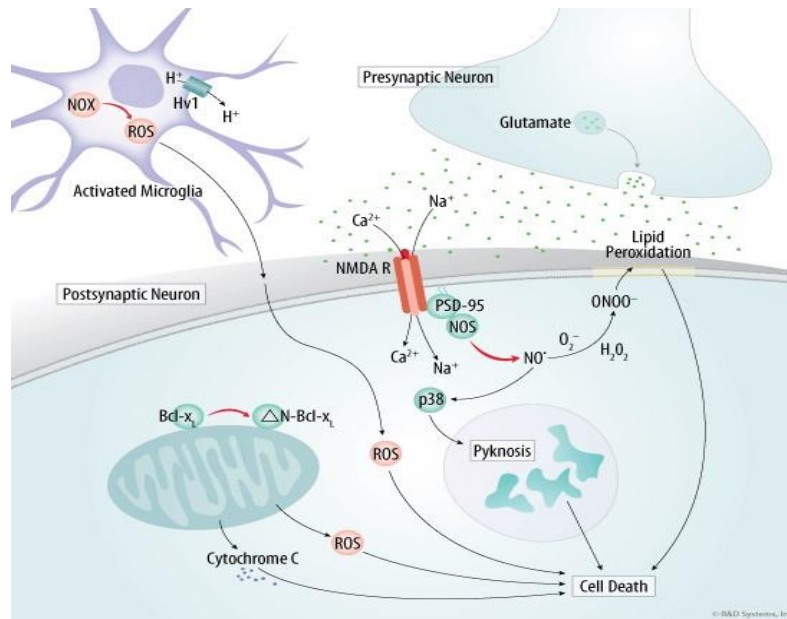
1.3.2 Změny syntáz oxidu dusnatého v průběhu Alzheimerovy demence

V průběhu AD dochází ke změnám hladin mRNA, exprese i aktivity všech tří typů syntáz oxidu dusnatého. Hladiny mRNA pro nNOS mají tendenci se snižovat u pacientů s AD (Norris et al., 1996). Naopak při studiu hladin mRNA u iNOS bylo nalezeno zvýšení, což by mohl být zdroj vyšší produkce NO během AD (Haas et al., 2002). Na základě studie provedené na animálním modelu myši se zrychleným stárnutím (SAMP8 – senescence accelerated mouse prone 8) byly nalezeny nezměněné hladiny mRNA pro eNOS (Ali et al., 2009). Studie popisující změny v expresi nNOS u lidí s AD signalizují její zvýšenou expresi v neuronech obsahujících neurofibrilární klubka a v hipokampu (Guix et al., 2005). V případě eNOS a iNOS byla nalezena zvýšená exprese v astrocytech v blízkosti senilních plaků u pacientů s AD a u transgenních myší (Heneka et al., 2001; Lüth et al., 2001). U nNOS a eNOS dochází ke zvýšení jejich aktivity v hipokampu u pacientů s AD a to zejména v levé hemisféře (Křištofiková et al., 2008). Akutní aplikace β -amyloidu in vivo vede ke zvýšení aktivity nNOS (Stepanichev et al., 2008).

1.4 Mediátorový systém NMDA receptoru a oxidu dusnatého a jeho změny u Alzheimerovy demence

Součástí změn, ke kterým dochází v průběhu AD, je i mediátorový systém NMDA receptoru a oxidu dusnatého. Jeho součástí je NMDA receptor propojený se syntázami oxidu dusnatého přes protein postsynaptické denzity 95 (PSD-95). PSD-95 reguluje expresi glutamátových receptorů na povrchu a hraje zásadní roli v procesu synaptické plasticity (Almeida et al., 2005). Interakce mezi NMDA receptorem a PSD-95 je umožněna přes propojení C-terminální domény na NR2 podjednotce receptoru a PDZ domény proteinu (Christopherson et al., 1999). Takto PSD-95 zvyšuje dobu otevření NMDA receptoru (Lin et al., 2004), ovlivňuje jeho posttranslační modifikace a stabilizuje ho na synapsi (Roselli et al., 2005). Z druhé strany je PSD-95 připojen k nNOS přes silnou interakci mezi PDZ doménami, což umožňuje efektivní aktivaci syntázy přes Ca^{2+} procházejícím NMDA receptorem (Florio et al., 2009).

Je známo, že v průběhu AD dochází k narušení LTP a ztrátě neuronů. Vazbou β -amyloidu na NMDA receptor dochází k jeho endocytóze a PSD-95 tomuto procesu zabraňuje. Zvyšující se množství β -amyloidu vede ovšem k redukci PSD-95, což vede ke snižování množství NMDA receptoru na membráně a následnému kognitivnímu zhoršení v počátečních fázích AD (Roselli et al., 2005). To také potvrzuje experiment provedený na PSD-95 *knock out* myších, který potvrzuje, že tyto myši vykazují zhoršenou schopnost učení (Migaud et al., 1998).



Obrázek 7: Schéma mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého

Za patologických podmínek dochází k nadměrné aktivaci NMDA receptoru a zvýšenému vstupu Ca^{2+} a Na^+ , které spouští tvorbu ROS. Díky propojení mezi NMDA receptorem a syntázami oxidu dusnatého se za patologických podmínek zvyšuje tvorba NO, který přispívá ke smrti neuronů. Reakcí NO s ROS vzniká silný radikál, jakým je například peroxynitrit (ONOO^-). Peroxynitrit vede k peroxidaci lipidů, čímž poškozuje buněčnou membránu. Dále dochází k narušení funkce mitochondrií, které vede k uvolnění cytochromu c a buněčné smrti. Vysoká koncentrace ROS a dusíkatých radikálů může vést také k indukci pyknózy

(Převzato z <https://www.rndsystems.com/resources/articles/neuronal-death-glutamate-excitotoxicity-protein-mediators-strategies-inhibition>).

1.5 Lateralita mozku a její změny během normálního stárnutí a Alzheimerovy demence

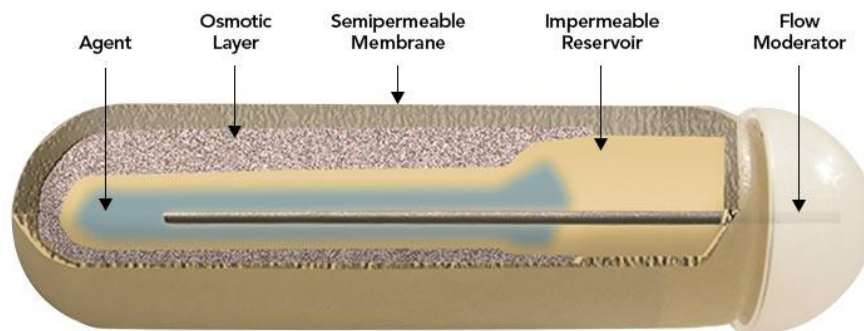
Lateralizace hemisfér je vlastností mozku, jejíž podstatou je zpracování kognitivních a behaviorálních funkcí přednostně v pravé nebo levé hemisféře (Toga and Thompson, 2003; Hugdahl, 2010). Lateralitu mozku můžeme pozorovat na různých úrovních, a to zejména morfologické (anatomické, volumetrické), funkční a neurochemické (molekulární). S jistou asymetrií hemisfér nebo některých oblastí mozku se můžeme setkat i u některých živočichů (Duboc et al, 2015). Fyziologická asymetrie souvisí s evolucí, dědičností a s ontogenetickým vývojem, může být však ovlivněna i patologickými faktory. Vztahy mezi morfologickou, funkční a neurochemickou lateralitou nejsou ještě zcela objasněny. Zdá se, že biochemická lateralita je bází funkční nebo morfologické laterality (Křištofiková et al., 2010). U lidí je pravé hemisféře obecně přisuzována schopnost rozeznání tvarů, prostorové orientace či zpracování emočních prožitků, zatímco levá hemisféra je dominantní při matematicém a logickém uvažování. Nejčastěji jsou v literatuře v souvislosti s lateralitou zmiňovány jazyková schopnost a přirozená preference levé respektive pravé ruky (Sun and Walsh, 2006).

Morfologické změny jsou studovány pomocí magnetické rezonance. V průběhu rozvoje AD byl zjištěn úbytek neuronů primárně v oblasti temporálního a limbického kortexu, který poté postupuje směrem k frontálním a okcipitálním oblastem. K přednostnímu a tedy i vážnějšímu poškození dochází v levé hemisféře (Thompson et al., 2003). Stejně tak byly pozorovány změny ve velikosti laterálních komor u pacientů s AD přednostně v levé hemisféře (Toga and Thompson, 2003). Naopak na základě analýzy změn ve velikosti hipokampu u pacientů s AD bylo zjištěno, že je tendence k většímu úbytku v pravém hipokampu (Barnes et al., 2005; Shi et al., 2009). Výraznější zranitelnost levé hemisféry byla pozorována i na biochemické úrovni u aktivit nNOS/eNOS a exprese iNOS, která se týkala především zvýšení jejich aktivity (Křištofiková et al., 2008). Také experimenty testující lateralitu mozku potkana pomocí aktivity hipokampálního vysokoafinitního transportu cholinu (HACU) vedly k závěru, že k dřívějšímu a vážnějšímu poškození dochází během normálního stárnutí v levé hemisféře (Křištofiková et al., 2010).

Při výběru animálních modelů AD je proto potřeba brát ohled na možnou přirozenou laterální mozku zvířete, která může být za patologických podmínek změněna.

1.6 Animální model sporadické formy Alzheimerovy demence (model Samaritán)

Animální model Samaritán (název patentovaný firmou Taconic Pharmaceuticals, USA) modeluje některé znaky sporadické formy AD. Pro tento model byl použit kmen potkanů Long Evans, protože jsou citliví pro rozvoj neurodegenerativních onemocnění, nesou mutaci v *cblb* genu a nedochází u nich ke zhoršení zraku jako je tomu u albinotických potkaních kmenů. Potkanům Samaritán byl aplikován FAB roztok (*ferrous sulfate*, β -*amyloid*, *buthionine sulfoximine*) složený ze síranu železnatého, β -amyloidu₄₂ a buthionin-sulfoximinu. Síran železnatý indukuje tvorbu oxidativního stresu a oxidaci buněčné membrány a dalších kompartmentů v buňce (Lecanu and Papadopoulos, 2013). Delší forma β -amyloidu tvoří téměř okamžitě oligomer, což bylo prokázáno v in vitro pokusech (El-Agnaf et al., 2000). Buthionin-sulfoximin inhibuje syntézu glutationu, který patří mezi peptidy s funkcí detoxifikace a obrany proti působení ROS na buňku (Lu, 2009). Aplikace FAB roztoku probíhala přes Alzet® osmotickou pumpu typu 2ML4 s objemem 2ml po dobu 4 týdnů. Roztok byl dávkován v množství 2,5 μ l/hodinu. Schéma osmotické pumpy je na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma osmotické pumpy typu Alzet®

Povrch osmotické pumpy je tvořen semipermeabilní membránou, pod kterou se nachází osmotická vrstva. Uvnitř pumpy je zásobník s aplikovaným roztokem a oddíl pro uvolňování roztoku (převzato z <http://www.alzet.com/>).

Osmotická pumpa byla zavedena intracerebroventrikulárně do levé komory (Lecanu et al., 2006). Unilaterální aplikace byla zvolena na základě literatury, kde je prokázáno dřívější a tedy i horší poškození levé hemisféry u pacientů s AD (Mesulam, 2003; Thompson et al., 2003). Po aplikaci byly pozorovány v mozku potkanů histopatologické změny v podobě senilních plaků tvořených β -amyloidem (v kortexu a hipokampu) a neurofibrilárních klubek. Dále byla pozorována astroglióza a mikroglióza. Tyto změny se projeví v behaviorálních testech kognitivním zhoršením (Herrlich et al., 2012; Petrásek et al., 2016).

2. Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo otestovat netransgenní animální model sporadické formy AD (Samaritán) pomocí změn v mediátorovém systému NMDA receptor - NO a srovnat tyto změny se změnami v hipokampálním cholinergním systému a v kognitivních testech.

Pomocí biochemických metod jsme testovali:

- Změny v expresi podjednotek NR1/NR2A/NR2B NMDA receptoru
- Změny v aktivitách enzymů syntáz oxidu dusnatého – nNOS/eNOS/iNOS

3. Metody a materiál

3.1 Pufry a roztoky

3.1.1 Imunobloting (Expres podjednotek NR1/NR2A/NR2B)

Homogenizační pufr

sacharóza 320 mM

Tris 10 mM

kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

0,2 mM

fenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF) 2 mM

2-mercaptoethanol (MERCK) 1mM

50 µl inhibitor proteáz

pH = 7,4

Pufr pro ředění vzorků

10% glycerol

2% sodium dodecyl sulfát (SDS), (Sigma)

5% 2-merkaptoetanol (MERCK)

63 mM Tris-HCl (pH 6,8)

0, 01% bromfenolová modř (Lachema)

3.1.2 Stanovení aktivity nNOS/eNOS/iNOS

Úprava kyselého ionexu

200 ml Dowex 50WX8 – 200 (Sigma – Aldrich)

200 ml redestilovaná voda

pecičky NaOH (Merck)

Homogenizační pufr

15,2 mg 1 mM EGTA 1 mM

6,2 mg dithiothreitol (Sigma) 1 mM

0,19 g 20 mM HEPES

4,38 g 0,32 M sacharóza

200 μ l 14,6 μ M pepstatin (Sigma)

200 μ l 21 μ M leupeptid (Sigma)

Redestilovaná voda (do 40 ml)

1M NaOH, pH = 7,4

Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové (Bradford 1976)

Zkumavky	B	S1 – S2	Vzorky (Duplikáty)
BSA (100 μ g/ml)	0	200 μ l	10 μ l
0,1 M NaOH	1000 μ l	800 μ l	990 μ l

+ 3 ml Bradfordova činidla (BioRad)

BSA (bovinní sérový albumin; $\epsilon = 0.677 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 66430; přibližná koncentrace 5 mg/mL)

Reakční pufr

7 850 μ l	homogenizační pufr
40 μ l	143 μ M NADPH (Sigma)
40 μ l	36 μ M TBH ₄ (Sigma)
70 μ l	2,3 μ M [14C] arginine - specifická aktivita 274 mCi/mmol) (ARC-American Radiolabeled Chemicals)

Ledový stop pufr

0,57 g	30 mM HEPES
85,96 mg	3 mM EDTA (Sigma)
Redestilovaná voda (do 80 ml)	
Koncentrovaná HCl, pH = 5, 5	

Inhibitory NOS

5 μ l	0,95 mM spermidin (Sigma) – nNOS
5 μ l	0,190 mM L-NAME (Sigma) – eNOS
5 μ l	0,95 mM aminoguanidin (Sigma) – iNOS

3.2 Zvířata

Experiment byl proveden na animálním modelu sporadické formy AD (model Samaritán) a odpovídajících kontrolách Long Evans (z firmy Taconic Pharmaceuticals, USA). Ve věku 8 týdnů byla zvířata transportována do Fyziologického ústavu Akademie věd, ČR. Potkani byli ustájeni v plastových akváriích v akreditovaném zvěřinci s konstantní vlhkostí (50%), teplotou (22 \pm 1°C) a s pravidelným 12 hodinovým cyklem

světlo/tma (rozsvítí se v 6:00). Po převozu jim byla ponechána doba na aklimatizaci v délce 2 týdnů. Ve Fyziologickém ústavu probíhalo behaviorální testování (Morrisovo vodní bludiště, aktivní alotetické vyhýbání se místu (AAPA)). Poté byli převezeni do Psychiatrického centra v Praze, kde byli ve věku 22 týdnů usmrceni stržením vazů a následnou dekapitací a získaná mozková tkáň byla použita na neurochemickou analýzu. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. LF UK a byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

3.3 Exprese NR1/NR2A/NR2B podjednotek NMDA receptoru – imunobloting

Frontální kortexy odebrané z potkana byly homogenizovány v 1 ml ledového roztoku homogenizačního pufru. Výsledný homogenát byl stočen na 1200 otáček po dobu 20 min ve vychlazené centrifuze na 4° a za stejných podmínek byl supernatant následně stočen na 12000 otáček. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 300 μ l redestilované vody. Koncentrace proteinu byla stanovena ve vzorku pomocí Bradfordova činidla (Sigma-Aldrich, ČR); (Bradford 1976). Na základě výsledků naměřených na spektrometru (SHIMADZU) při 595nm byly vzorky naředěny na stejnou koncentraci (1mg/ml) se vzorkovým pufrem a denaturovány (BIOTECH, ČR) po dobu 5 minut při teplotě 95°C. Rozdělení proteinů bylo provedeno na 7,5 % polyakrylamidovém gelu (Criterion Cell, Bio-Rad, USA) při 45mA. Následně byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí Criterion Blotter (Bio-Rad, USA) a blotovány po dobu 80 min při 100 V. Nеспецифické vazby byly blokovány pomocí 3% BSA. Po 5 minutovém promývání v redestilované vodě byly membrány rozříznuty na tři části, které obsahovaly proteiny našeho zájmu (130kDa pro NR1, 180kDa pro NR2A a 180kDa pro NR2B a kontrolní protein 50 kDa α -tubulin). Membrány byly inkubovány ve fosfátovém pufru společně s 0,1 % Tween (Sigma) a 3% odtučněným mlékem po dobu 30 minut. Následně byly membrány inkubovány s primárními a sekundárními protilátkami viz Tabulka 1. Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscentního substrátu (Pierce, USA) a vyhodnocována v programu Gel Doc Analysis System (Bio-Rad, USA).

Tabulka 1: Inkubace s primárními a sekundárními protilátkami

<u>PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA</u>				
Proteiny našeho zájmu	NR1 130kDa	NR2A 180 kDa	NR2B 180 kDa	α-tubulin 50 kDa
Primární protilátka	Anti – NMDAR1 monoklonální protilátka	Anti-NMDAR2A polyklonální protilátka	Anti-NMDAR2B polyklonální protilátka	anti- α -tubulin monoklonální protilátka
Výrobce	Merck Milipore, USA	Merck Millipore, USA	Merck Millipore, USA	Exbio, ČR
Inkubace a ředění	Přes noc v lednici, 1:100	2h při pokojové teplotě, 1:500	2h při pokojové teplotě, 1:500	1h při pokojové teplotě, 1:1000
<u>SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA</u>				
Proteiny našeho zájmu	NR1 130 kDa	NR2A 180 kDa	NR2B 180 kDa	α-tubulin 50 kDa
Sekundární protilátka	Polyklonální protilátka goat anti-mouse	polyklonální protilátka goat anti-rabbit	polyklonální protilátka goat anti-rabbit	polyklonální protilátka goat anti-mouse
Výrobce	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko
Inkubace a ředění	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:5000

3.4 Stanovení aktivity syntáz oxidu dusnatého

3.4.1 Úprava kyselého ionexu na mírně zásaditý

Před začátkem samotných experimentů bylo potřeba upravit kyselý ionex Dowex 50WX8-200 (s počátečním pH přibližně 3) na mírně zásaditý (tj. hodnota pH pod 8). Ke kyselému ionexu byla přidána redestilovaná voda v poměru 1:1 a po důkladném promíchání bylo změřeno počáteční pH. Poté byly do ionexu postupně přidávány pecičky NaOH, tak aby pH dosáhlo hodnot 13-14. Následovala inkubace po dobu 3 hod, během které byl roztok míchán. Po této době byl roztok nad ionexem odlit a byla přidána redestilovaná voda. Po 15 minutovém míchání byl roztok nad ionexem opět odlit a celý postup se opakoval do té doby než pH nad ionexem dosáhlo hodnot pod 8. Poté byl ionex uložen do lednice.

3.4.2 Stanovení aktivity syntáz oxidu dusnatého

Zamražené kortexy (bez frontální části) odebrány separátně z pravé a levé hemisféry byly homogenizovány v 10 násobku homogenizačního pufru na homogenizátoru teflon/sklo Potter's Brown (800 ot/min, 10 zdvihů). Homogenát (2 ml) byl odebrán do silnostěnných zkumavek a stočen při 1200 g (2800 ot/min), 10 min, 4°C (centrifuga Universal 32R). Poté byl odebrán 1 ml supernatantu do nových silnostěnných zkumavek, který byl zvortexován. Následovalo stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové (Bradford, 1976). Všechny vzorky byly naředěny homogenizačním pufrem tak, aby obsahovaly 2 mg proteinu/ml (inkubační směs obsahovala 0,5 mg/ml celkového proteinu). Vzorky v homogenizačním pufrem byly inkubovány 30 min při 37°C s reakčním pufrem. Do vzorků, ve kterých byla testována aktivita nNOS a eNOS, byl přidán 42 mM CaCl₂. Aktivity jednotlivých NOS byly odlišeny pomocí 3 inhibitorů. Aktivita nNOS byla stanovena přidáním specifického inhibitoru spermidinu. Aktivita eNOS byla změřena pomocí L-NAME po odečtení aktivity nNOS. Vzorky bez přidaného CaCl₂, ve kterých byla testována aktivita iNOS, byly inkubovány s aminoguanidinem. Přidáním ledového stop pufru byly reakce ukončeny.

Vzorky byly nality do předem připravených Pasteurových pipet umístěných ve zkumavkách a naplněných vatou s navrstveným Dowexem. Po protečení roztoku byly Pasteurovy pipety přesunuty do nových zkumavek a promyty 2x 500 µl redestilované

vody. Roztok prošlý Dowexem byl zvortexován a 250 μ l z každé zkumavky bylo napipetováno do scintilačních nádobek. Dále bylo do scintilačních nádobek přidáno 5 ml scintilačního koktejlu Gold Star (Multi-purpose liquid scintillation cocktail Meridian). Aktivita záření byla změřena na β -counteru LS 6500 (Beckman Coulter). Celé měření bylo prováděno v duplikátech.

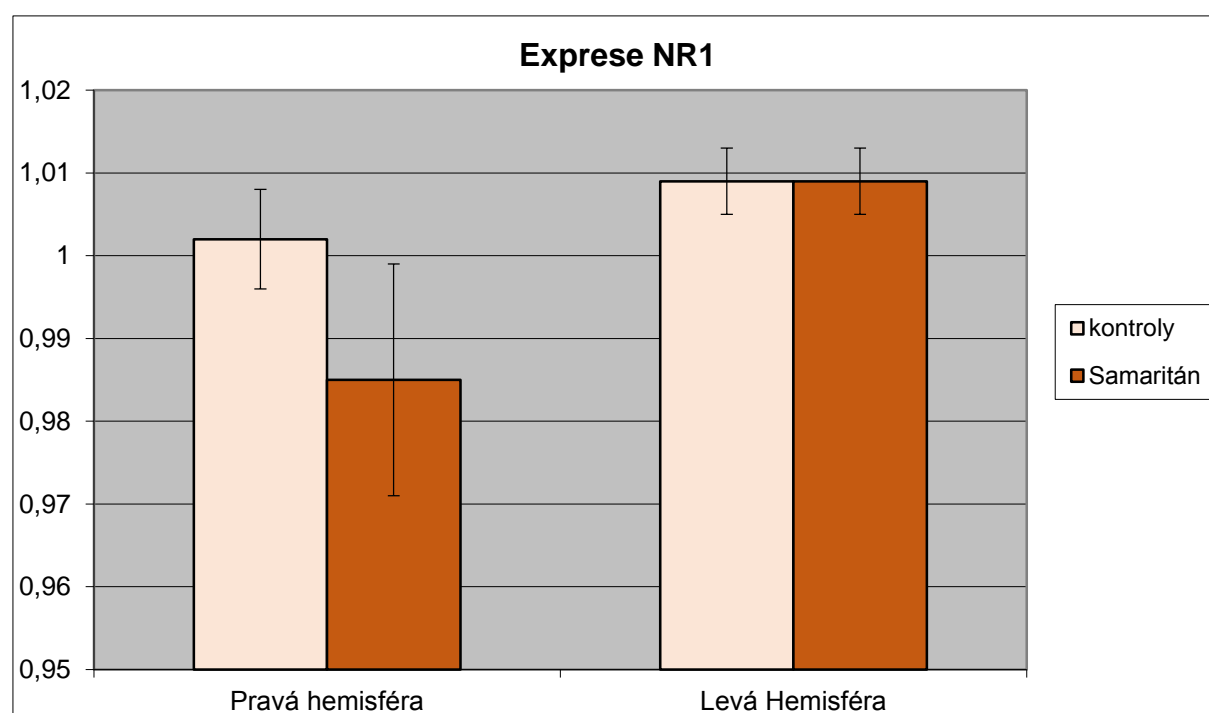
3.5 Analýza dat

Získaná data byla vyhodnocována ve statistickém programu BMDP. Ke globální analýze jsme použili analýzu rozptylu (Anova) s opakovanými měřeními, k post-hoc analýze párový t-test (pooled variance). Všechna data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM).

4. Výsledky

4.1 Změny v expresi podjednotek NR1/NR2A/NR2B NMDA receptoru

Obrázek 9 znázorňuje výsledky experimentů testující expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkanů. Z výsledků Anovy s opakovanými měřeními vyplývá, že došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese NR1 podjednotky v levé hemisféře u obou skupin zvířat.



Obrázek 9: Expresie podjednotky NR1 NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkana

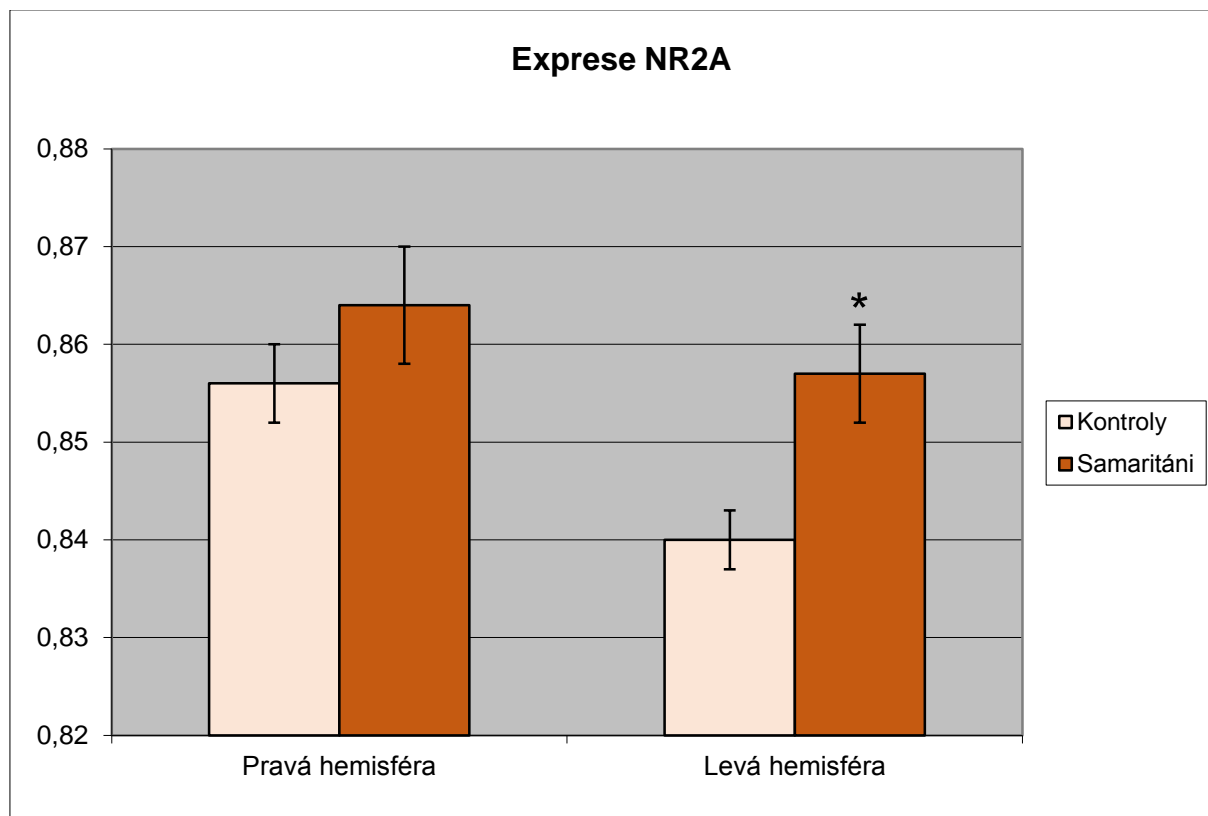
Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm SEM.

Výsledky Anovy s opakovanými měřeními: skupiny - $F(1, 16) = 0,93$; $p = 0,3499$; lateralita - $F(1, 16) = 5,22$;

$p = 0,0363^*$; interakce - $F(1, 16) = 1,45$; $p = 0,2455$

Výsledky t-testu: Pravá hemisféra: $p = 0,2728$; Levá hemisféra: $p = 0,9906$

Obrázek 10 znázorňuje výsledky experimentů testující expresi NR2A podjednotky NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkanů. Z výsledků Anovy s opakovanými měřeními a t-testů vyplývá, že u potkanů Samaritán došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese NR2A podjednotky v levé hemisféře.



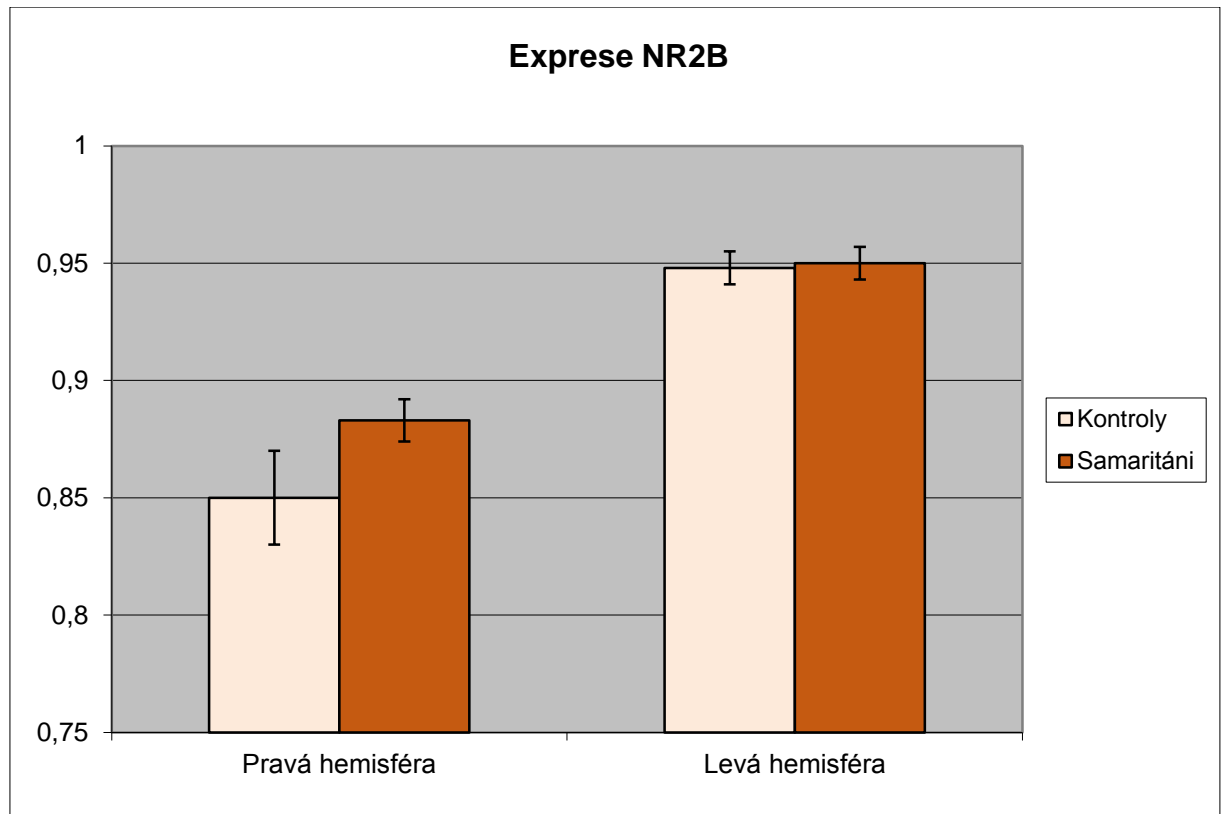
Obrázek 10: Expresie podjednotky NR2A NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkana

Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm SEM.

Výsledky Anovy s opakovanými měřeními: skupiny - $F(1, 16) = 6,43$, $p = 0,0220^*$, lateralita - $F(1, 16) = 7,89$, $p = 0,0126^*$, interakce - $F(1, 16) = 0,96$, $p = 0,3421$

Výsledky t-testu: Pravá hemisféra: $p = 0,2439$; Levá hemisféra: $p = 0,0142^*$

Výsledky experimentu stanovujících expresi podjednotky NR2B NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkana jsou znázorněny na Obrázku 11. Anova s opakovanými měřeními potvrdila významnou dominanci v expresi v NR2B v levém frontálním kortexu u kontrolních zvířat Long Evans i potkanů Samaritán. Rozdíly mezi skupinami však nebyly nalezeny.



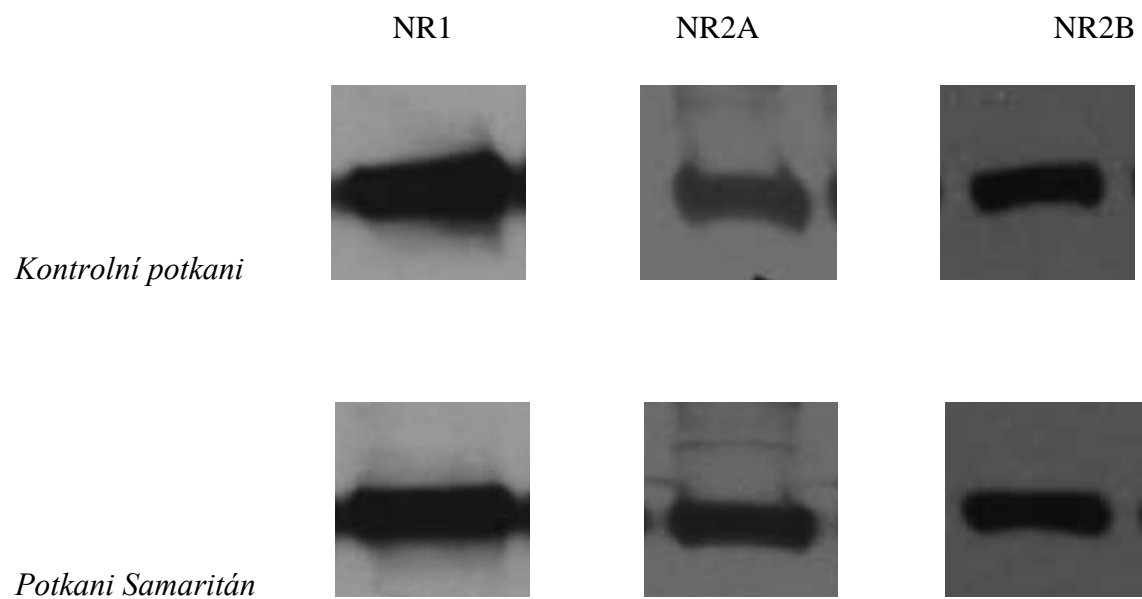
Obrázek 11: Expresie podjednotky NR2B NMDA receptoru ve frontálním kortexu potkana

Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr +/- SEM.

Výsledky Anovy s opakovanými měřeními: skupiny - $F(1, 16) = 2,85$, $p = 0,1107$, lateralita - $F(1, 16) = 28,47$,

$p = 0,0001^{*}$** , interakce - $F(1, 16) = 1,04$, $p = 0,3220$

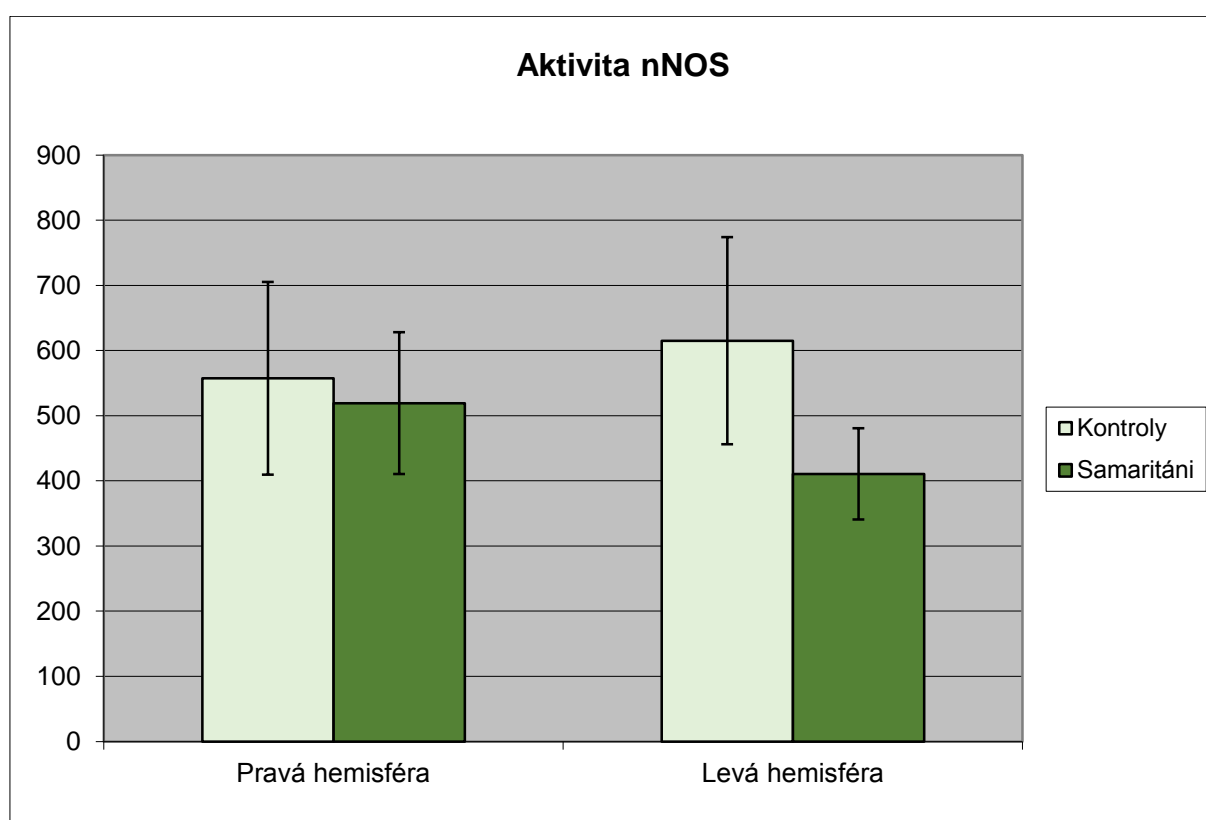
Výsledky t-testu: Pravá hemisféra: $p = 0,1863$; Levá hemisféra: $p = 0,8540$



Obrázek 12: Výsledky imunoblotting analýzy

4.2 Změna aktivit enzymů syntáz oxidu dusnatého

Z obrázku 13 je patrné, že aktivita nNOS v kortexu potkana Long Evans není významně lateralizována. Výsledky Anovy s opakovanými měřeními naznačily statisticky významnou interakci mezi skupinami a lateralitou, což lze interpretovat mírným poklesem aktivity nNOS zejména v levé hemisféře potkanů Samaritán ve srovnání s kontrolními potkany.



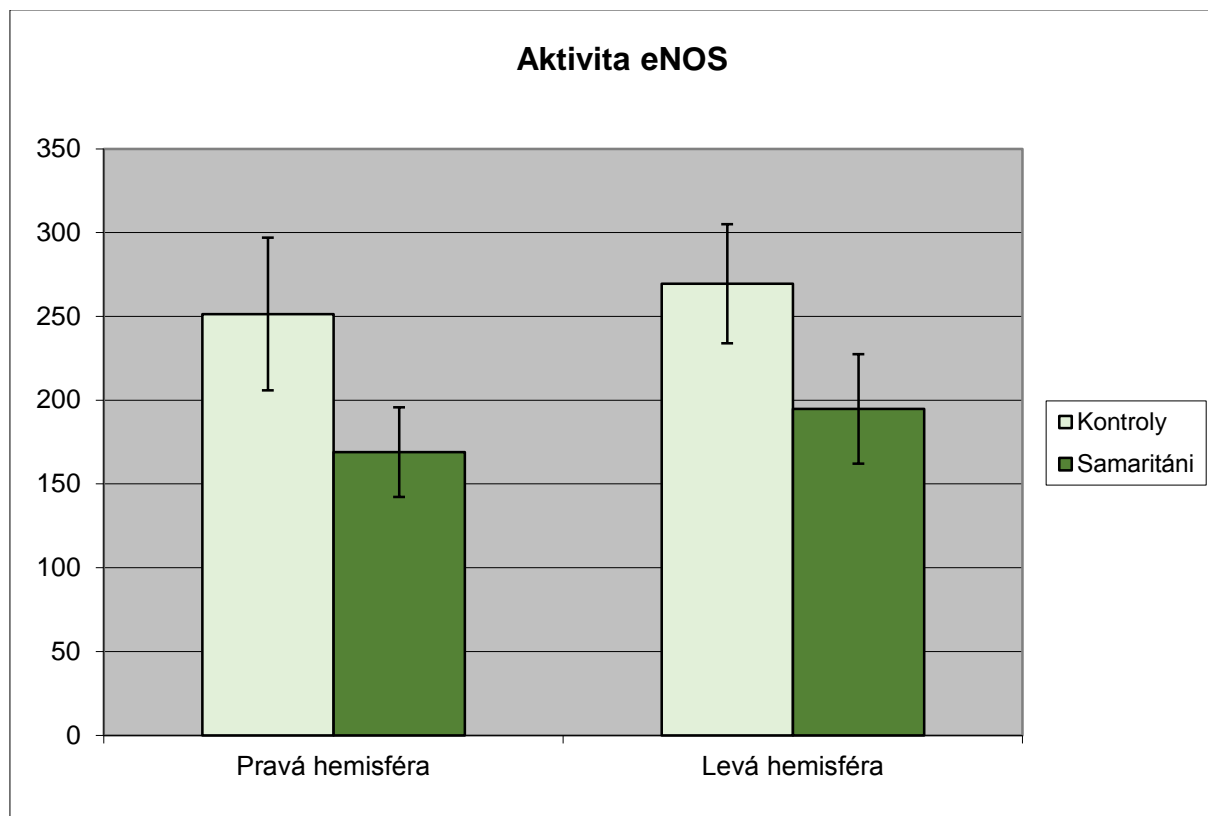
Obrázek 13: Aktivita nNOS v kortexu potkana

Aktivita nNOS je vyjádřena nmol/30min/mg proteinu. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm SEM.

Výsledky Anovy s opakovanými měřeními: skupiny $F(1, 17) = 0,45$, $p = 0,5103$, lateralita – $F(1, 17) = 0,53$, $p = 0,4747$, interakce $F(1, 17) = 5,67$, **$p = 0,0292^*$**

Výsledky t-testu: Pravá hemisféra: $p = 0,8405$; Levá hemisféra: $p = 0,273$

Z obrázku 14, který znázorňuje výsledky měření aktivity eNOS, není patrná lateralita u kontrolních zvířat Long Evans. Ačkoliv byl u potkanů Samaritán pozorován pokles (v pravé hemisféře na 67, 2 %, v levé na 72, 3 %), změny nedosáhly statistické významnosti.



Obrázek 14: Aktivita eNOS v kortexu potkana

Aktivita eNOS je vyjádřena nmol/30min/mg proteinu. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm SEM.

Výsledky Anovy s opakovanými měřeními: skupiny $F(1, 17) = 2,81$, $p = 0,1121$, lateralita – $F(1, 17) = 1,03$, $p = 0,3244$, interakce $F(1, 17) = 0,03$, $p = 0,8606$

Výsledky t-testu: Pravá hemisféra: $p = 0,1484$; Levá hemisféra: $p = 0,1430$

U kontrolních potkanů Long Evans byly hladiny iNOS velmi nízké, v řadě případů se jejich hodnoty blížily nule a měření bylo tedy zatíženo velkou chybou. Z tohoto důvodu nejsou výsledky prezentovány v grafické formě, ale pouze následujícími výsledky: kontroly pravá hemisféra $27,9 \pm 18,0$, kontroly levá hemisféra $4,9 \pm 2,0$; potkani Samaritán pravá hemisféra: $17,8 \pm 7,5$, potkani Samaritán levá hemisféra: $22,7 \pm 4,9$ (tyto výsledky jsou uváděny v hodnotách nmoly/30 min/mg proteinu). Při srovnání levé a pravé hemisféry hodnoty měření naznačovaly možnou pravo-levou asymetrii v aktivitě iNOS u kontrolních potkanů Long Evans. Ačkoliv výsledky Anovy s opakovanými měřeními (skupiny $F(1, 17) = 0,15$, $p = 0,7046$; laterality – $F(1, 17) = 0,69$, $p = 0,4165$; interakce $F(1, 17) = 1,66$, $p = 0,2148$) nesignalizovaly žádné statisticky významné změny, výsledky t-testů (pravá hemisféra: $p = 0,6258$, levá hemisféra: **$p = 0,0025^{**}$**) nevykloučily možný nárůst aktivity iNOS v levé hemisféře u potkanů Samaritán oproti kontrolním potkanům.

4.3 Výsledky korelační analýzy

Tabulka 2: Korelace mezi jednotlivými komponentami mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu potkana

Komponenty	kontroly		Samaritáni		Z-test
	KK	p	KK	p	p
1) Podjednotky					
NR1 P x lateralita NR1	-0,789	0,007**	- 0,976	0,001***	0,052
NR2A P x lateralita NR2A	-0,719	0,019*	-0,702	0,052	0,953
NR2A L x lateralita NR2B	-0,637	0,048*	-0,860	0,006**	0,356
NR2B P x lateralita NR2B	-0,979	< 0,001***	-0,979	< 0,001***	0,361
NR2B L x lateralita NR2B	+0,665	0,036*	+0,878	0,004**	0,334
2) Podjednotky a syntázy					
NR2A P x eNOS L	+0,620	0,056	-0,496	0,211	0,030*
3) Syntázy					
nNOS P x nNOS L	+0,965	< 0,001***	+0,886	<	0,272
nNOS P x eNOS P	+0,664	0,036*	0,001***		0,962
nNOS P x iNOS P	+0,750	0,012*	+0,649	0,058	0,211
nNOS L x eNOS P	+0,790	0,007**	+0,270	0,482	0,424
nNOS L x iNOS P	+0,703	0,023*	+0,556	0,120	0,448
eNOS P x eNOS L	+0,799	0,006**	+0,423	0,257	0,196
eNOS P x lateralita eNOS	-0,691	0,027*	+0,360	0,342	0,444
eNOS L x lateralita eNOS	-0,140	0,700	- 0,400	0,287	0,076
iNOS P x lateralita iNOS	-0,665	0,036*	+0,690	0,040*	0,384
iNOS L x lateralita iNOS	-0,130	0,719	- 0,858	0,003**	0,035*
			+0,779	0,013*	

KK – korelační koeficienty

U kontrolních zvířat data naznačila úzký vztah mezi expresí NR2A podjednotky v pravé a levé hemisféře (negativní korelace mezi expresí NR2A podjednotky vpravo a její asymetrií), mezi expresí NR2B podjednotky v pravé a levé hemisféře (negativní korelace mezi expresí NR2B podjednotky vpravo a její asymetrií, pozitivní korelace mezi expresí

NR2B podjednotky vlevo a její asymetrií) a mezi expresí NR2A a NR2B podjednotek (negativní korelace mezi expresí NR2A podjednotky vlevo a asymetrií NR2B podjednotky). Mezi expresemi podjednotek NMDA receptoru a aktivitou NOS nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace u kontrolních potkanů. Výsledky aktivit syntáz naznačily vztah mezi aktivitou nNOS v pravé a levé hemisféře (pozitivní korelace mezi aktivitou nNOS vpravo a vlevo), mezi aktivitou eNOS v pravé a levé hemisféře (pozitivní korelace mezi aktivitou eNOS vpravo a vlevo), mezi aktivitou nNOS, eNOS, iNOS v pravé hemisféře (pozitivní korelace mezi aktivitou nNOS a eNOS, nNOS a iNOS vpravo) a vliv aktivity nNOS v levé hemisféře na aktivitu eNOS a iNOS v pravé hemisféře (pozitivní korelace mezi aktivitou nNOS vlevo a eNOS, iNOS vpravo). Dále data vykazují statisticky významný vztah mezi NOS v pravé hemisféře a její asymetrií (negativní korelace mezi aktivitou eNOS vpravo a její lateralitou, negativní korelace mezi iNOS vpravo a její lateralitou).

Výsledky Z-testů, které mezi sebou porovnávaly kontrolní potkany Long Evans a potkany Samaritán, prokázaly signifikantní rozdíly mezi expresí NR2A podjednotky v pravé hemisféře a aktivitou eNOS v levé hemisféře, dále mezi aktivitou iNOS vlevo a její lateralitou.

Tabulka 3: Korelace mezi charakteristikami CHT1 v hipokampu u kontrolních zvířat Long Evans a potkanů Samaritán

Charakteristiky	Kontroly		Samaritáni		Z-test
	KK	p	KK	p	p
HACU P x HACU L	+0,686	0,041*	+0,105	0,805	0,225
HC-3 P x HC-3 L	+0,903	< 0,001***	+0,676	0,065	0,271

KK – korelační koeficienty

U kontrolních zvířat data naznačují vztah mezi vysokoafinitním transportem cholinu (HACU) v pravém a v levém hipokampu (pozitivní korelace mezi aktivitou vpravo a vlevo), mezi specifickou vazbou hemicholinia-3 (HC-3) v pravém a v levém

hipokampu (pozitivní korelace mezi vazbou vpravo a vlevo). Z-testem však nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolními potkany a potkany Samaritán.

Tabulka 4: Korelace mezi jednotlivými komponentami mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu a CHT1 v hipokampu

Komponenty	Kontroly		Samaritáni		Z-test
	KK	p	KK	p	p
1) NR1 NR1 L x HACU L lateralita NR1 x lateralita HC-3	-0,600 +0,438	0,088 0,238	+0,595 +0,935	0,119 < 0,001***	0,023* 0,043*
2) NR2A NR2A P x lateralita HACU NR2A P x HC-3 L	+0,711 -0,584	0,032* 0,099	+0,159 +0,488	0,707 0,220	0,229 0,047*
3) NR2B NR2B P x HACU P NR2B L x HC-3 P lateralita NR2B x HACU P	-0,740 -0,705 +0,684	0,023* 0,034* 0,042*	+0,131 -0,473 -0,276	0,757 0,236 0,509	0,074 0,549 0,064
4) nNOS nNOS L x HACU L nNOS L x HC-3 P lateralita nNOS x HACU P	+0,058 -0,678 -0,607	0,882 0,045* 0,083	+0,843 -0,467 +0,423	0,004** 0,206 0,257	0,042* 0,580 0,045*
5) eNOS eNOS P x HACU P eNOS P x HC-3 P eNOS P x HC-3 L eNOS L x lateralita HACU eNOS L x lateralita HC-3 L lateralita eNOS x HACU L	-0,679 -0,675 -0,714 +0,774 -0,732 +0,755	0,044* 0,046* 0,031* 0,014* 0,025* 0,019*	+0,018 -0,131 +0,067 +0,197 -0,096 -0,048	0,964 0,737 0,863 0,612 0,807 0,903	0,143 0,233 0,096 0,150 0,147 0,074
6) iNOS iNOS L x lateralita HACU lateralita iNOS x lateralita HC-3	-0,682 -0,682	0,043* 0,043*	+0,199 -0,196	0,608 0,614	0,073 0,272

Data prokázala statisticky významný vztah mezi NR2A podjednotkou NMDA receptoru v pravém kortexu a lateralitou HACU (pozitivní korelace mezi expresí

podjednotky NR2A vpravo a asymetrií HACU), mezi NR2B podjednotkou v pravém kortexu a HACU v pravém hipokampu (negativní korelace mezi expresí NR2B podjednotky a aktivitou HACU), dále mezi NR2B v levém kortexu a HC-3 v pravém hipokampu (negativní korelace mezi expresí NR2B a aktivitou HC-3), mezi asymetrií NR2B podjednotky a HACU v pravém hipokampu (pozitivní korelace mezi asymetrií exprese NR2B a aktivity HACU v pravém hipokampu), mezi nNOS v levém kortexu a HC-3 v pravém hipokampu. Statisticky významný vztah mezi eNOS vpravo a HACU vpravo, HC-3 vpravo, HC-3 vlevo (negativní korelace mezi aktivitou eNOS a HACU, HC-3), mezi eNOS a lateralitou HACU, HC-3 (pozitivní korelace mezi aktivitou eNOS a lateralitou HACU, negativní korelace mezi aktivitou eNOS a lateralitou HC-3 v levé hemisféře), mezi lateralitou eNOS a HACU (pozitivní korelace mezi lateralitou eNOS a HACU v levém hipokampu), mezi iNOS v levém kortexu a lateralitou HACU (negativní korelace mezi aktivitou iNOS a lateralitou HACU), mezi lateralitou iNOS a lateralitou HC-3 (negativní korelace mezi asymetrií iNOS a HC-3).

Z – test prokázal signifikantní rozdíly mezi podjednotkou NR1 a HACU v levém hipokampu, lateralitami NR1 podjednotky a HC-3, NR2A v pravé hemisféře a HC-3 v levé hemisféře, mezi aktivitou nNOS a aktivitou HACU v levé hemisféře, lateralitou aktivity nNOS a HACU vpravo.

5. Diskuze

5.1 Lateralita kontrolních zvířat Long Evans v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého

U kontrolních zvířat Long Evans jsme pozorovali nevýznamnou lateralitu v expresi NR1, výraznější pravo-levou u NR2A (viz výrazný efekt laterality u Anovy s opakovanými měřeními) a signifikantní levo-pravou u NR2B podjednotky (viz výrazný efekt laterality u Anovy s opakovanými měřeními) NMDA receptoru (viz Obrázek 9 – 11). V případě aktivit nNOS, eNOS a iNOS nebyla u kontrol pozorována žádná výraznější asymetrie (viz Obrázek 13 - 14 a Výsledky). Možná asymetrie v expresi NR2A a NR2B podjednotek lze podpořit i některými výsledky korelační analýzy kontrolních zvířat (viz signifikantní negativní korelace mezi NR2A podjednotky vpravo a lateralitou NR2A podjednotky nebo mezi NR2B podjednotkou vpravo a lateralitou NR2B podjednotky), tuto interpretaci však oslabuje výrazná negativní korelace mezi NR1 podjednotkou vpravo a její lateralitou (viz Tabulka 2). Většinu významných pozitivních korelací mezi jednotlivými syntézami v obou hemisférách lze interpretovat kooperací pravé a levé strany (viz Tabulka 2). Nelze však opomenout, že u kontrolních potkanů byla provedena stejná operace jako u potkanů Samaritánů (pomocí osmotické pumpy Alzet® jim byl unilaterálně aplikován do levé hemisféry fyziologický roztok). Naše výsledky tedy mohou být touto unilaterální aplikací ovlivněné a nelze je proto považovat za důkaz možné fyziologické laterality v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého u potkana kmene Long Evans. Přesto lze konstatovat, že např. levo-pravá asymetrie v expresi synaptické NR2B podjednotky byla nalezena i v hipokampu myši (Kawakami et al., 2003).

5.2 Změny v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého u potkanů Samaritán

Při srovnání s kontrolními potkany Long Evans jsme pozorovali u potkanů Samaritán mírný pokles na 98% u NR1 podjednotky v pravé hemisféře (viz signifikantní výsledek Anovy s opakovanými měřeními pro laterality navzdory nevýznamnému výsledku t-testu) a naopak mírný nárůst na 102% u NR2A podjednotky v levé hemisféře (viz signifikantní výsledky Anovy s opakovanými měřeními i párového t-testu). V případě NR2B podjednotky byl nalezen u potkanů Samaritán nesignifikantní nárůst na 104% a signifikantní výsledky Anovy s opakovanými měřeními pro laterality lze interpretovat spíše bazální levo-pravou asymetrií potkanů Long Evans (viz část 5.1) než změnami v lateralitě vyvolané aplikací. Literární údaje týkající se změn v expresi NR1 podjednotky během normálního stárnutí oznámily snížení (Eckles-Smith et al., 2000; Magnusson et al., 2002; Liu et al., 2008) nebo žádné změny (Sonntag et al., 2000). U lidí s AD bylo nalezeno v hipokampu významné snížení, pouze však v pozdějších stádiích onemocnění (Sze et al., 2001). Údaje týkající se NR2A podjednotky oznámily zvýšenou expresi během normálního stárnutí (Cui et al., 2013), žádné změny v časné fázi AD (Clayton et al., 2002; Mishizen-Eberz, 2004) a snížení v pokročilých fázích AD (Bi and Sze, 2002). Srovnání našich výsledků týkajících se exprese NR1 a NR2A podjednotek s údaji v literatuře tedy naznačuje, že změny u potkanů Samaritán korespondují spíše se změnami pozorovanými během normálního stárnutí a v raných stádiích onemocnění. Je známo, že NMDA receptory obsahující zvýšené množství NR2A podjednotky vykazují např. vyšší pravděpodobnost otevření kanálu při použití MK-801 antagonisty (Chen et al., 1999), nižší aktivační energii potřebnou pro otevření kanálu (Erreger et al., 2005) a rychlejší schopnost deaktivace (Vicini et al., 1998). Lze tedy konstatovat, že zvýšená exprese NR2A podjednotky by mohla odpovídat počáteční hyperaktivitě glutamatergního systému (s ohledem na již zmíněný dvoufázový mechanismus), ke které dochází v časných fázích AD.

U potkanů Samaritán jsme našli také pokles na 67% v aktivitě nNOS v levé hemisféře (viz signifikantní výsledek Anovy s opakovanými měřeními pro interakci mezi skupinami a lateralitou, viz Obrázek 12). U aktivity eNOS byl pozorován bilaterální pokles (na 67% vpravo a na 72% vlevo), výsledky statistické analýzy však nepotvrdily

žádné významné rozdíly (viz Obrázek 13). Ačkoliv Anova s opakovanými měřeními nesignalizovala významné změny v aktivitě iNOS, výsledky párového t-testu nevykloučily možné zvýšení (na 463%) v levé hemisféře u potkanů Samaritán v porovnání s kontrolními potkany. Data v literatuře týkající se aktivity nNOS ukazují na její snižování na modelu myši urychleného stárnutí (SAMP8) v kortexu a mozgovém kmeni (Colas et al., 2006) a zvýšení v levém hipokampu u lidí v pokročilejších fázích AD (Křištofiková et al., 2008). In vitro aplikace β -amyloidu₁₋₄₂ a β -amyloidu₂₅₋₃₅ vedla k inhibici aktivity nNOS (Venturini et al., 2002). Studie týkající se aktivity iNOS oznámily zvýšení během normálního stárnutí v mozku potkanů Wistar (Siles et al., 2002) a Long Evans, kde byly navíc pozorovány výraznější změny v levé hemisféře (Křištofiková et al., 2010). U lidí s AD byla nalezena zvýšená aktivita iNOS v kapilárách izolovaných z mozkové tkáně (Dorheim et al., 1994), jiní pozorovali signifikantní zvýšení spíše v její expresi, a to zejména v levé hemisféře (Křištofiková et al., 2008). Studie dělaná na kultuře astrocytů získané z potkanů zjistila, že oligomery s nízkou molekulární hmotností stejně jako rozpustný β -amyloid indukují prozánětlivou odpověď mimo jiné také zvýšením iNOS aktivity (Austin and Combs, 2008). Předpokládá se, že zvýšení v aktivitě/expresi iNOS obecně signalizuje zánětlivé procesy (Křištofiková et al., 2008). Při srovnání námi pozorovaných změn v aktivitě nNOS/iNOS u potkanů Samaritán s údaji v literatuře lze tedy konstatovat, že model potkanů Samaritán koresponduje spíše s normálním stárnutím popř. s časnou fází AD, podobně jak bylo pozorováno u podjednotek NMDA receptoru.

Výsledky korelačních analýz (viz Tabulka 2) potvrdily významné rozdíly mezi potkany Samaritán a kontrolními potkany Long Evans ve dvou případech. První signifikantní změna byla způsobena zvratem z výrazné pozitivní korelace (s hraniční signifikancí) mezi expresí NR2A vpravo a aktivitou eNOS vlevo u kontrol na nevýznamnou negativní korelaci u potkanů Samaritán. Výsledek lze obtížně interpretovat, pravděpodobně však odráží změněnou homeostázu mezi NR2A (viz také významné zvýšení NR2A vlevo) a eNOS následkem unilaterální aplikace u potkanů Samaritán. Navzdory tomu, že jsme u potkanů Samaritán přímo nenalezli významné změny v aktivitě eNOS, signifikantní výsledek korelační analýzy naznačuje, že i pozorované mírné poklesy eNOS mohou hrát určitou roli u potkanů Samaritán a jsou také v souladu s pozorovaným bilaterálním poklesem aktivity eNOS v mozku stárnoucího potkana Long Evans (Křištofiková et al., 2010). I tento výsledek potvrzuje, že potkani Samaritán jsou

modelem spíše raného stádia AD, protože u lidí v pozdějších stádiích onemocnění byl pozorován spíše nárůst aktivity eNOS, a to zejména vlevo (Křištofiková et al., 2008). Druhá signifikantní změna byla způsobena zvratem z mírné negativní korelace mezi aktivitou iNOS vlevo a její lateralitou u kontrol na výraznou pozitivní korelaci u potkanů Samaritán. Výsledek je v souladu s pozorovanými změnami iNOS vlevo (viz výsledky párového t-testu) a pravděpodobně také odráží unilaterální aplikaci látek u potkanů Samaritán

5.3 Srovnání změn mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu se změnami cholinergního neurotransmitterového systému v hipokampu potkana Samaritán

Postupné zhoršování paměti a kognitivních procesů v rozvoji AD je spojováno s postupnou ztrátou cholinergních neuronů v *ncl. basalis Meynerti* (Arendt et al., 1983). Změny v aktivitě hipokampálních nebo kortikálních presynaptických cholinergních nervových zakončení však nevylučují možný dvoufázový mechanismus změn cholinergního neurotransmitterového systému, který byl pozorovaný u AD v případě systému glutamatergního (Olney et al. 1997). Aktivitu presynaptických cholinergních nervových zakončení lze měřit stanovením aktivity a počtu CHT1 transportérů, hrajících roli ve vysokoafinitním vychytávání cholinu (HACU). Transportéry CHT1 vychytávají cholin ze synaptické štěrbině a transportují ho do presynaptické části neuronu, kde je využíván k syntéze neurotransmiteru acetylcholinu. Literární údaje naznačují, že v raných fázích AD jsou hladiny HACU (tj. aktivita CHT1) zvýšené v hipokampu nebo kortexu, pravděpodobně pomocí kompenzační reakce na poškození cholinergních neuronů v *ncl. basalis Meynerti* (Slotkin et al., 1990). V pozdějších stádiích onemocnění však aktivita CHT1 klesá (Sims et al., 1983). Podobný zvrát lze pozorovat i v případě počtu membránově vázaných CHT1 transportérů, stanovených vazbou specifického kompetitivního inhibitoru HACU hemicholinia-3 (HC-3). V raných fázích AD lze

pozorovat zvýšení specifické vazby (3H)HC-3, v pozdějších naopak pokles (Pascual et al., 1991).

Naše předchozí experimenty testující změny v CHT1 v hipokampu potkana Samaritán při srovnání s potkany kontrolními (Petrásek et al., 2016) prokázaly následující: u kontrolních potkanů Long Evans byla naměřena mírná pravo-levá lateralita v hladinách HACU i ve vazbě (3H)HC-3, u kontrolních zvířat byla také nalezena výrazná pozitivní korelace u obou markerů mezi pravou a levou hemisférou (viz Tabulka 3), u potkanů Samaritán došlo k bilaterálnímu nárůstu hladin HACU (na 142% vpravo a 132% vlevo), u vazby (3H)HC-3 nebyly statisticky významné změny pozorovány, trendy ke zvýšení však byly podobné, výsledky korelační analýzy neprokázaly signifikantní rozdíly mezi potkany Samaritán a kontrolními potkany Long Evans, ačkoliv došlo k výraznému snížení korelací mezi oběma hemisférami (viz Tabulka 3). Tyto výsledky týkající se hipokampálního cholinergního neurotransmitterového systému naznačovaly, že potkani Samaritán jsou modelem AD spíše v raném stádiu onemocnění (Petrásek et al., 2016).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo porovnat změny v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu a hipokampálních CHT1 pomocí korelační analýzy. Výsledky (viz Tabulka 4) lze sumarizovat následovně:

- 1) U kontrolních potkanů Long Evans naše data naznačila možnou souvislost mezi CHT1 a expresí NR2A/NR2B (dvě signifikantní pozitivní a dvě negativní korelace) a mezi CHT1 a aktivitou nNOS/eNOS/iNOS (dvě signifikantní pozitivní a sedm negativních korelací). Vzhledem k unilaterální aplikaci fyziologického roztoku u kontrol nelze ani v tomto případě považovat potkany Long Evans za intaktní zvířata a data by tedy neměla být přeceňována. Přesto je potřeba zdůraznit zejména významné korelace v případě CHT1 a aktivity eNOS, podporující úzký vztah mezi eNOS a cholinergním systémem popsany v literatuře (Kamimura et al., 2003).
- 2) U potkanů Samaritán jsme pozorovali pět významných rozdílů v korelacích oproti kontrolním potkanům Long Evans. Pro všechny změny byl charakteristický nárůst pozitivních korelací mezi CHT1 a NR1/NR2A/nNOS, což lze interpretovat výraznějším poškozením levého kortexu i hipokampu u potkanů Samaritán. Překvapivé je, že významná změna v korelacích nebyla pozorována v případě CHT1 a eNOS/iNOS.

5.4 Srovnání změn v biochemii mozku se změnami v kognitivních testech u potkanů Samaritán

Neurochemické analýze mozkové tkáně potkanů Samaritán a kontrolních potkanů Long Evans předcházelo jejich kognitivní testování (použito bylo Morrisovo vodní bludiště a AAPA).

Morrisovo vodní bludiště testuje paměť a schopnost přesné navigace k určenému místu. Je využíváno k testování kognitivních poruch. Zhoršení paměti, které se v tomto testu projeví, je jedním z hlavních charakteristických znaků u různých animálních modelů AD a souvisí zejména s poškozením hipokampu (D'Hooge and DeDeyn, 2001; Sabbagh et al., 2013). AAPA hodnotí prostorovou orientaci a kognitivní koordinaci, která může být poškozena i u lidí s AD (Petrásek et al., 2016).

U potkanů Samaritán a odpovídajících kontrol nejprve probíhalo testování pomocí Morrisova vodního bludiště se skrytým ostrůvkem. Výsledky globálního testu ANOVA potvrdily signifikantní zhoršení u potkanů Samaritán (delší cesta a doba potřebná k lokalizaci ostrůvku) v porovnání s kontrolními potkany Long Evans. Ve stejném testu s viditelným ostrůvkem však nebyly nalezeny signifikantní rozdíly. Výsledky z AAPA testování ve fázi akvizice ukázaly na signifikantní zhoršení u potkanů Samaritán v porovnání s kontrolními potkany. V habituační fázi nebyly potvrzeny žádné signifikantní změny, což nasvědčuje tomu, že u potkanů Samaritán nedošlo k poškození spontánní lokomoce.

Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky exprese NR1/NR2A/NR2B podjednotek NMDA receptoru a aktivit nNOS/eNOS/iNOS.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat netransgenní animální model sporadické formy AD (model Samaritán, Taconic Pharmaceuticals, USA) pomocí změn v mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého v kortexu a porovnat tyto výsledky se změnami v hipokampálním cholinergním neurotransmitterovém systému a v kognitivních testech (Morrisovo vodní bludiště, AAPA).

Ačkoliv jsme u kontrolních potkanů Long Evans pozorovali u některých složek mediátorového systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého jejich možnou asymetrii, vzhledem k unilaterální aplikaci fyziologického roztoku do levé hemisféry nelze tyto výsledky považovat za důkaz fyziologické laterality systému. Nicméně lze konstatovat, že zejména v případě levo-pravé asymetrie NR2B podjednotky byly naše nálezy v souladu s údaji v literatuře.

V kortexu potkanů Samaritán jsme pozorovali oproti kontrolním potkanům Long Evans změny v expresi NR1 podjednotky (pokles vpravo), v expresi NR2A podjednotky (zvýšení vlevo), v aktivitě nNOS (pokles vlevo) a v aktivitě iNOS (zvýšení vlevo). Výsledky korelační analýzy však naznačily, že i nesignifikantní bilaterální poklesy v aktivitě eNOS nelze u potkanů Samaritán zcela vyloučit.

Předchozí výsledky testující změny v hipokampálním cholinergním systému signalizovaly bilaterální zvýšení aktivity CHT1 transportéru v hipokampu potkana Samaritán, v souladu s kompenzačním zvýšením pozorovaným v hipokampu nebo kortexu u lidí s AD v raném stádiu onemocnění. U potkanů Samaritán byly také potvrzeny kognitivní změny (např. horší schopnost naučení se úlohy a orientace v prostoru).

Na základě výsledků této diplomové práce lze tedy konstatovat, že signifikantní změny v kortikálním mediátorovém systému NMDA receptoru a oxidu dusnatého, v souladu se změnami pozorovanými u hipokampálního cholinergního neurotransmitterového systému, odpovídají spíše raným stádiím onemocnění a že potkany Samaritán jako netransgenní model sporadické formy AD lze považovat za dobrý model AD v raných fázích. Výsledky lze podpořit i nálezem kognitivních změn u potkanů Samaritán.

7. Literatura

1. Alberdi E., Sánchez-Gómez M.V., Cavaliere F., Pérez-Samartín A., Zugaza J.L., Trullas R., Domercq M. and Matute C. (2010) Amyloid beta oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47(3): 264-272.
2. Albrecht E.W., Stegeman C.A., Heeringa P., Henning R.H. and van Goor H. (2003) Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 199(1): 8-17.
3. Alderton W.K., Cooper C.E. and Knowles R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357(Pt 3): 593-615.
4. Ali A.K., Banks W.A., Kumar V.B., Shah G.N., Lynch J.L., Farr S.A., Fleegal-DeMotta M.A. and Morley J.E. (2009) Nitric oxide activity and isoenzyme expression in the senescence-accelerated mouse p8 model of Alzheimer's disease: effects of anti-amyloid antibody and antisense treatments. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64(10): 1025-1030.
5. Austin S.A. and Combs C.K. (2008) Mechanisms of microglial activation by amyloid precursor protein and its proteolytic fragments. *Central nervous system diseases and inflammation.* 13-32.
6. Almeida C.G., Tampellini D., Takahashi R.H., Greengard P., Lin M.T., Snyder E.M. and Gouras G.K. (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis.* 20(2): 187-198.
7. Arendt T., Bigl V., Arendt A. and Tennstedt A. (1983) Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's disease. *Acta Neuropathol.*
8. Asano K., Chee C.B.E., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C., Drazen J.M. and Stamler J.S. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(21): 10089-10093.

9. Barnes J., Scahill R.I., Schott J.M., Frost C., Rossor M.N. and Fox N.C. (2005) Does Alzheimer's disease affect hippocampal asymmetry? Evidence from a cross-sectional and longitudinal volumetric MRI study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19(5-6): 338-344.
10. Bear M.F. and Malenka R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4(3): 389-399.
11. Beck K.F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Meßmer U.K., Mühl H. and Pfeilschifter J. (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.* 202(Pt 6): 645-653.
12. Bekris L.M., Yu C.E., Bird T.D. and Tsuang D.W. (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4): 213-227.
13. Benarroch E.E. (2011) NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology.* 76(20): 1750-1757.
14. Benilová I., Karran E. and De Strooper B. (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15(3): 349-357.
15. Bi H. and Sze C.I. (2002) N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 200(1-2): 11-18.
16. Bird T.D. (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet. Med.* 10(4): 231-239.
17. Bonaccorso C., Micale N., Ettari R., Grasso S. and Zappalà M. (2011) Glutamate binding-site ligands of NMDA receptors. *Curr. Med. Chem.* 18(36): 5483-5506.
18. Buée L., Bussièrè T., Buée-Scherrer V., Delacourte A. and Hof P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33(1): 95-130.
19. Butterfield D.A. and Pocernich C.B. (2003) The Glutamatergic system and Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 17(9): 641-652.

20. Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368 (9533): 387–403.
21. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
22. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A. and Stella A.M. (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8(10): 766-775.
23. Colas D, Gharib A., Bezin L., Morales A., Guidon G., Cespuglio R. and Sarda N. (2006) Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain. *BMC Neurosci.* 7: 81.
24. Contestabile A. (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32(2-3): 476-509.
25. Cui Z., Feng R., Jacobs S., Duan Y., Wang H., Cao X. and Tsien J.Z. (2013) Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci. Rep.* 3: 1036.
26. Cull-Candy S.G. and Leszkiewicz D.N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE.* 2004(255): re16.
27. Cummings J. L. (2001) Treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Cornerstone* 3(4): 27-39.
28. Clayton D.A., Mesches M.H., Alvarez E., Bickford P.C. and Browning M.D. (2002) A Hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22(9): 3628-3637.
29. Crimins J.L., Pooler A., Polydoro M., Luebke J.I. and Spires-Jones T.L. (2013) The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 12(3): 757-763.

30. Danysz W. and Parsons C. G. (2012) Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptor and memantine - searching for the connections. *Brit. J. Pharmacol.* 167(2): 324-352.
31. Dawkins E. and Small D.H. (2014) Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 129(5): 756-769.
32. Derkach V.A., Oh M.C., Guire E.S. and Soderling T.R. (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 8(2): 101-113.
33. D'Hooze, R. and De Deyn, P. P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36(1): 60-90.
34. Dorheim M.A., Tracey W.R., Pollock J.S. and Grammas P. (1994) Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(1): 659-665.
35. Du H. and Yan S.S. (2010) Mitochondrial transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta.* 1802(1): 198-204.
36. Duboc V., Dufourcq P., Blader P. and Roussigné M. (2015) Asymmetry of the brain: development and implications. *Annu. Rev. Genet.* 49: 647-672.
37. Eckles-Smith K., Clayton D., Bickford P. and Browning M.D. (2000) Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78(1-2): 154-162.
38. El-Agnaf O.M., Mahil D.S., Patel B.P. and Austen B.M. (2000) Oligomerization and toxicity of β -amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(3): 1003-1007.
39. Erreger K., Dravid S.M., Banke T.G., Wyllie D.J. and Traynelis S.F. (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol.* 563(Pt 2): 345-358.

40. Fayed N., Modrego P.J., Rojas-Salinas G. and Aguilar K. (2011) Brain glutamate levels are decreased in Alzheimer's disease: a magnetic resonance spectroscopy study. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 26(6): 450-456.
41. Feldman D.E. and Knudsen E.I. (1998) Experience-dependent plasticity review and the maturation of glutamatergic synapses. *Neuron* 20(6): 1067-1071.
42. Ferreira S.T. and Klein W.L. (2011) The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn Mem.* 96(4): 529-543.
43. Fischmann T.O., Hruza A., Niu X.D., Fossetta J.D., Lunn C.A., Dolphin E., Prongay A.J., Reichert P., Lundell D.J., Narula S.K. and Weber P.C. (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* 6(3): 233-242.
44. Furukawa H., Singh S.K., Mancusso R. and Gouau E. (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438(7065): 185-192.
45. Florio S.K., Loh C., Huang S.M., Iwamaye A.E., Kitto K.F., Fowler K.W., Treiberg J.A., Hayflick J.S., Walker J.M., Fairbanks C.A. and Lai Y. (2009) Disruption of nNOS-PSD95 protein-protein interaction inhibits acute thermal hyperalgesia and chronic mechanical allodynia in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 158(2): 494-506.
46. Francis P.T. (2003) Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 18 (Suppl 1): S15-21.
47. Guix F.X., Uribealago I., Coma M. and Muñoz F.J. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76(2): 126-152.
48. Haas J., Storch-Hagenlocher B., Biessmann A. and Wildemann B. (2002) Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with beta-amyloid 1-42 in vitro. *Neurosci. Lett.* 322(2): 121-125.
49. Heneka M.T., Wiesinger H., Dumitrescu-Ozimek L., Riederer P., Feinstein D.L. and Klockgether T. (2001) Neuronal and glial coexpression of

- argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60(9): 906-916.
50. Herrlich S., Spieth S., Messner S. and Zengerle R. (2012) Osmotic micropumps for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64(14): 1617-1627.
51. Huang H.C. and Jiang Z.F. (2009) Accumulated amyloid- β peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 16(1): 15-27.
52. Hugdahl K. (2010) Hemispheric asymmetry: contributions from brain imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 2(5): 461-478.
53. Hynd M.R., Scott H.L. and Dodd P.R. (2004) Glutamate – mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45(5): 583-595.
54. Chen N., Luo T. and Raymond L.A. (1999) Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J. Neurosci.* 19(16): 6844-6854.
55. Christopherson K.S. and Brecht D.S. (1997) Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J. Clin. Invest.* 100(10): 2424-2429.
56. Christopherson K.S., Hillier B.J., Lim W.A. and Brecht D.S. (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 274(39): 27467-27473.
57. Ittner L.M. and Götz J. (2011) Amyloid- β and tau – a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(2): 65-72.
58. Johnson J.W. and Kotermanski S.E. (2006) Mechanism of action of memantine. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6(1): 61-67.
59. Kalia L.V., Kalia S.K. and Salter M. W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* 7(8): 742-755.
60. Kamimura Y., Fujii T., Kojima H., Nagano T. and Kawashima K. (2003) Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci.* 72(18-19): 2151-2154.

61. Karakas E. and Furukawa H. (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344(6187): 992-997.
62. Kawakami R., Shinohara Y., Kato Y., Sugiyama H., Shigemoto R. and Ito I. (2003) Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. *Science* 300(5621): 990-994.
63. Křištofiková Z., Kozmíková I., Hovorková P., Říčný J., Zach P., Majer E., Klaschka J. and Řípková D. (2008) Lateralization of hippocampal nitric oxide mediator system in people with Alzheimer disease, multi-infarct dementia and schizophrenia. *Neurochem Int.* 53(5): 118-125.
64. Křištofiková Z., Říčný J., Ort M. and Řípková D. (2010) Aging and lateralization of the rat brain on a biochemical level. *Neurochem. Res.* 35(8): 1138-1146.
65. Lau C.G. and Zukin R.S. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8(6): 413-426.
66. Law A.J., Weickert C.S., Webster M.J., Herman M.M., Kleinman J.E. and Harrison P.J. (2003) Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur. J. Neurosci.* 18(5): 1197-1205.
67. Layton M.E., Kelly M.J. and Rodzinak K.J. (2006) Recent advances in the development of NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. *Curr. Top Med. Chem.* 6(7): 697-709.
68. Lee H.K., Takamiya K., Han J.S., Man H., Kim Ch.-H., Rumbaugh G., Yu S., Ding L., He Ch., Petralia R.S., Wenthold R.J., Gallagher M. and Huganir R.L. (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112(5): 631-643.
69. Lee C. H., Lu W., Michel J.C., Goehring A., Du J., Song X. and Gouaux E. (2014) NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511(7508): 191-197.
70. Lecanu L., Greeson J. and Papadopoulos V. (2006) Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death. Amyloid deposits, gliosis and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology* 76(1): 19-33.

71. Lecanu L. and Papadopoulos V. (2013) Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimers Res. Ther.* 5(3): 1-9.
72. Liu P., Smith P.F. and Darlington C.L. (2008) Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse* 62(11): 834-841.
73. Liu C.-C., Kanekiyo T., Xu H. and Bu G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 9(2): 106-118.
74. Lin Y., Skeberdis V.A., Francesconi A., Bennett M.V. and Zukin R.S. (2004) Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J. Neurosci.* 24(45): 10138-10148.
75. Lipton S.A. (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(2): 160-170.
76. Loftis J.M. and Janowsky A. (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* 97(1): 55-85.
77. Lu S.C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2): 42-59.
78. Lüscher Ch. and Malenka R.C. (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 4(6): a005710.
79. Lüth H.J., Holzer M., Gärtner U., Staufienbiel M. and Arendt T. (2001) Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 913(1): 57-67.
80. Magnusson K.R., Nelson S.E. and Young A.B. (2002) Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 99(1): 40-45.

81. Mandelkow E.M. and Mandelkow E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Respect. Med.* 2(7): a006247.
82. Maragos W.F., Greenamyre J.T., Penney Jr J.B. and Young A.B. (1987) Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci.* 10(2): 65-68.
83. Massaad C.A. (2011) Neuronal and vascular oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.* 9(4): 662-673.
84. Mesulam M.M. (2003) Primary progressive aphasia — A language-based dementia. *N. Engl. J. Med.* 349(16): 1535-1542.
85. Michel T. and Feron O. (1997) Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J. Clin. Invest.* 100(9): 2146-2152.
86. Migaud M., Charlesworth P., Dempster M., Webster L.C., Watabe A.M., Makhinson M., He Y., Ramsay M.F., Morris R.G., Morrison J.H., O'Dell T.J. and Grant S.G. (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature.* 396(6710): 433-439.
87. Mishizen-Eberz A.J., Rissman R.A., Carter T.L., Ikonovic M.D., Wolfe B.B. and Armstrong D.M. (2004) Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Dis.* 15(1): 80-92.
88. Monaghan D.T., Irvine M.W., Costa B.M., Fang G. and Jane D.E. (2012) Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int.* 61(4): 581-592.
89. Murphy M.P. and LeVine H. 3rd. (2010) Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J. Alzheimers Dis.* 19(1): 311-323.
90. Müller U.C. and Zheng H. (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2(2): a006288.
91. McDonald J.W. and Johnston M.V. (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 15(1): 41-70.

92. Nikolaev M.V., Magazanik L.G. and Tikhonov D.B. (2012) Influence of external magnesium ions on the NMDA receptor channel block by different types of organic cations. *Neuropharmacology* 62(5-6): 2078-2085.
93. Norris P.J., Faull R.L. and Emson P.C. (1996) Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41(1-2): 36-49.
94. Olivares D., Deshpande V.K, Shi Y., Lahiri D.K., Greig N.H., Rogers J.T. and Huang X. (2012) N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr. Alzheimer. Res.* 9(6): 746-758.
95. Olney J.W., Wozniak D.F. and Farber N.B. (1997) Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 54(10): 1234-1240.
96. Omer N., Rohilla A., Rohilla S. and Kushnoor A. (2012) Nitric oxide: role in human biology. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 4(2): 105-109.
97. O'Brien R.J. and Wong P.C. (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34: 185-204.
98. Paoletti P. and Neyton J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7(1): 39-47.
99. Paoletti P., Bellone C. and Zhou Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14(6): 383-400.
100. Pascual J., Fontán A., Zarranz J.J., Berriano J., Flórez J. and Pazos A. (1991) High-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: implications for the cholinergic hypothesis of dementia. *Brain. Res.* 552(1): 170-174.
101. Petrásek T., Škurlová M., Malenínská K., Vojtěchová I., Křištofiková Z., Matušková H., Šírová J., Valeš K., Řířpová D. and Aleš Stuchlík (2016) A rat model of Alzheimer's disease based on abeta42 and pro-oxidative substances exhibits cognitive deficit and alterations in glutamatergic and cholinergic neurotransmitter systems. *Front. Aging Neurosci.* 8(83)

102. Poletti P. and Neyton J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7(1): 39-47.
103. Portera-Cailliau C., Price D.L. and Martin L.J. (1996) N-Methyl-D-Aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J. Neurochem.* 66(2): 692-700.
104. Querfurth H.W. and LaFerla F.M. (2010) Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362(4): 329-344.
105. Ritter L.M., Unis A.S. and Meador-Woodruff J.H. (2001) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 127(2): 123-133.
106. Robinson D.M. and Keating G.M. (2006) Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* 66(11): 1515-1534.
107. Roselli F, Tirard M., Lu J., Hutzler P., Lamberti P., Livrea P., Morabito M. and Almeida O.F. (2005) Soluble β -amyloid₁₋₄₀ induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 25(48): 11061-11070.
108. Sabbagh J. J., Kinney J. W. and Cummings J. L. (2013) Animal systems in the development of treatments for Alzheimer's disease: challenges, methods, and implications. *Neurobiology of aging* 34(1): 169-183.
109. Sanz-Blasco S., Valero R.A., Rodríguez-Crespo I., Villalobos C. and Nuñez L. (2008) Mitochondrial Ca^{2+} overload underlies A β oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS One* 3(7): e2718.
110. Siles E, Martínez-Lara E., Cañuelo A., Sánchez M., Hernández R., López-Ramos J.C., Del Moral M.L., Esteban F.J, Blanco S., Pedrosa J.A., Rodrigo J. and Peinado M.A. (2002) Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Res.* 956(2): 358-392.
111. Sims N.R., Bowen D.M., Allen S.J., Smith C.C., Neary D., Thomas D.J. and Davison A.N. (1983) Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J. Neurochem.* 40(2):503-509.

112. Sobolevsky A. I., Rosconi M. P. and Gouau E. (2009) X-ray structure of AMPA-subtype glutamate receptor: symmetry and mechanism. *Nature* 462(7274): 745-756.
113. Sonntag W.E., Bennett S.A., Khan A.S., Thornton P.L., Xu X., Ingram R.L. and Brunso-Bechtold J.K. (2000) Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res. Bull.* 51(4):331–338
114. Sun T. and Walsh Ch.A. (2006) Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(8): 655-662.
115. Scheetz A.J. and Constantine-Paton M. (1994) Modulation of NMDA receptor function: implication for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8(10): 745-752.
116. Shi F., Liu B., Zhou Y., Yu C. and Jiang T. (2009) Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: meta-analyses of MRI studies. *Hippocampus* 19(11): 1055-1064.
117. Slotkin T.A., Seidler F.J., Crain B.J., Bell J.M., Bissette G. and Nemeroff C.B. (1990) Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer's disease: Implications for etiology and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(7): 2452-2455.
118. Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Yakovlev A.A., Khrenov A.I., Peregud D.I., Vorontsova O.N., Lazareva N.A. and Gulyaeva N.V. (2008) Amyloid- β (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem Int.* 52(6): 1114-1124.
119. Stuchlík A. and Svojanovská M. (2014) Fyziologie glutamátu, dlouhodobá potenciace, schizofrenie a paměť. *Českoslov. Fyziologie* 63: 84-91.
120. Sze C., Bi H., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Filley C.M. and Martin L.J. (2001) N-Methyl-D-Aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 182(2): 151-159.
121. Takahashi T., Feldmeyer D., Suzuki N., Onodera K., Cull-Candy S.G., Sakimura K. and Mishina M. (1996) Functional correlation of NMDA

- receptor subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. *J. Neurosci.* 16(14): 4376-4382.
122. Talesa V.N. (2001) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 122(16): 1961-1969.
123. Tanzi R.E. (2005) The synaptic A β hypothesis of Alzheimer disease. *Nat. Neurosci.* 8(8): 977-979.
124. Toga A.W. and Thompson P.M. (2003) Mapping brain asymmetry. *Nat. Rev. Neurosci.* 4(1): 37-48.
125. Togo T., Katsuse O. and Iseki E. (2004) Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Neurol. Res.* 26(5): 563-566.
126. Tuteja N., Chandra M., Tuteja R. and Misra M.K. (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J. Biomed Biotechnol.* 4: 227-237.
127. Thompson P.M., Hayashi K.M., de Zubicaray G., Janke A.L., Rose S.E., Semple J., Herman D., Hong M.S., Dittmer S.S., Doddrell D.M. and Toga A.W. (2003) Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 23(3): 994-1005.
128. Venturini G., Colasanti M., Persichini T., Fioravanti E., Ascenzi P., Palomba L., Cantoni O. and Musci G. (2002) β -Amyloid inhibits NOS activity by subtracting NADPH availability. *FASEB J.* 16(14): 1970-1972.
129. Vicini S., Wang J.F., Li J.H., Zhu W.J., Wang Y.H., Luo J.H., Wolfe B.B. and Grayson D.R. (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* 79(2): 555-566.
130. Voglis G. and Tavernarakis N. (2006) The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep.* 7(11): 1104-1110.
131. Weaver J., Porasuphatana S., Tsai P., Cao G.L., Budzichowski T.A., Roman L.J. and Rosen G.M. (2002) The activation of neuronal nitric-oxide synthases by various divalent cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(2): 781-786.

132. Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F. and Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant. Sci.* 6(4): 177-183.
133. Wenzel A., Fritschy J.M., Mohler H. and Benke D. (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.* 68(2): 469-478.
134. Zito K and Scheuss V. (2009) NMDA receptor function and physiological modulation. *Encyclopedia of Neuroscience* (Oxford: Academic Press) 6: 1157-1164.
135. Zhou L. and Zhu D.-Y. (2009) Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. *Nitric Oxide.* 20(4): 223-230.

8. Seznam příloh

Matušková H., Krištofiková Z., Šírová J. and Řípková D. Pharmacological animal model of Alzheimer's disease (Samaritan) and NMDA receptor – NO pathway. (Poster, 10th Conference of the Czech Neuroscience Society, November 18 – 19, 2015).

Petrásek T., Škurlová M., Maleninská K., Vojtěchová I., Krištofiková Z., Matušková H., Šírová J., Valeš K., Řípková D. and Stuchlík A. (2016) A rat model of Alzheimer's disease based on abeta42 and pro-oxidative substances exhibits cognitive deficit and alterations in glutamatergic and cholinergic neurotransmitter systems. *Front. Aging Neurosci.*

Matušková H. (2016) Přirozené animální modely Alzheimerovy demence. Přijato v časopise České a slovenské psychiatrie

Pharmacological animal model of Alzheimer's disease (Samaritan) and NMDA receptor – NO pathway

Hana Matušková, Zdena Křištofiková, Jana Šírová and Daniela Řípková

INTRODUCTION

Samaritan rat model from Taconic Pharmaceuticals USA is a non-transgenic model of the sporadic form of Alzheimer's disease (AD). The animal displayed significant impairment of spatial memory measured in Morris water maze task and active allothetic place avoidance (1, 2). We expected that Samaritan rats will represent changes in glutamatergic – nitric oxide system.

Aims

To test the Samaritan rat model of sporadic form of AD through measurement of changes in NR2A, NR2B subtypes of NMDAR and activities of nitric oxide synthases, and to compare changes between the left and right hemisphere.

Methods

The Samaritan rat model was developed by chronic i.c.v. application of ferrous sulfate, β -amyloid 1-42 and L-buthionine sulfoximine. The solution was infused just into the left hemisphere using an Alzet® type of osmotic micropump over the period 4 weeks. Expressions of NR2A and NR2B were estimated via Western Blotting by means of specific primary antibodies (both from Milipore, USA).

Activities of nitric oxide synthases were determined by means of (14C) arginine (ARC-American Radiolabeled Chemicals), specific inhibitors (spermidine, N-nitro-L-arginine and aminoguanidine, all from Sigma) and Dowex 50WX8-100 (Sigma).

Statistical analysis was performed using BMDP statistical software. We used ANOVA with repeated measurements with groups as a grouping factor and laterality as a within factor. As a post hoc analysis, Student's t-test (pooled variance) was used. Results are presented as means \pm SEM.

Results and discussion

The biochemical analysis shows statistically significant differences in NR2A subunit and in the activity of iNOS between Samaritan rats and controls. Differences in NR2B expression and in the activity of nNOS/eNOS were not found.

Differences in NR2A and NR2B subunits expressions are presented in Fig. 3. Expression of NR2A subunit was higher in the left hemisphere of the Samaritan rats (groups: $p = 0.0220^*$; asymmetry: $p = 0.0126^*$; interaction: $p = 0.3421$). Data in the literature shows increased NR2A/NR2B ratio in rat brain during normal aging and decreased expression of NR2A in the cortex of people with late stages of AD (3, 4). It is suggested that glutamatergic system is hyperactive (by excess production and aggregation of β -amyloid and its interaction with NMDAR) in early stages of AD while in the late stages the system is hypoactive (caused by the loss of neurons and NMDAR) (5).

While global statistical analysis didn't demonstrate any significant differences, paired t-test showed higher activity of iNOS (the increase to 463%, $p < 0.010$) in the left hemisphere of the Samaritan rats. Our results well correspond with reported increased activity of iNOS either in normal aging or in AD brain tissue (6).

CONCLUSION

Our presented data, in addition to our previous results regarding the cholinergic system, indicate that Samaritan rat model can be a good model of sporadic AD in its early stage. Changes in the left hemisphere can be supported by studies reporting higher vulnerability in the left side of AD people (6) but they rather reflect the unilateral application in our experiments.

Acknowledgement: Supported by P303-11-1907 and P304/12/G069 projects.

REFERENCES

- Lecanu L, Papadopoulos V. Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat model. *Alzheimer's Research & Therapy* 2013; 5 (17): 1-9
- Stuchlík A, et al. Rat model of sporadic Alzheimer's disease based on application of Abeta 1-42 and pro-oxidative substances exhibits cognitive deficit and alterations of hippocampal acetylcholine system. 2015 – manuscript in preparation
- Bi H, Sze Ch. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 2002; 200: 11-18
- Matthew R. Hynd, Heather L. Scott and Peter R. Dodd. Differential expression of N-methyl- D – aspartate receptor NR2A isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2004; 90: 913-91
- Butterfield A., Pocernich CH. The Glutamatergic System and Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 2003; 17 (9): 642-652
- Křištofiková Z., Kozmiková I., Hovorková P., Říčný J., Zach P., Emmerich M., Klaschka J., Řípková D. Lateralization of hippocampal nitric oxide mediator system in people with Alzheimer's disease, multi-infarct dementia and schizophrenia. *Neurochem. Int.* 2008; 53: 118-125
- Neuronal Death by Glutamate Excitotoxicity: Protein Mediators & Strategies for Inhibition: Neuronal Cell Death Induced by Ischemic and Hemorrhagic Strokes [online]. [cit. 2015-10-25]. From: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/neuronal-death-glutamate-excitotoxicity-protein-mediators-strategies-inhibition>
- ALZET SURGICAL INSTRUCTION SHEET [online]. [cit. 2015-10-25]. From: <http://www.alzet.com/downloads/ALZET%20Surgical%20Instruction%20Sheet%20-%20SC.pdf>

contact: hana.matuskova@nudz.cz

10th Conference of the Czech Neuroscience Society, November 18-19, 2015

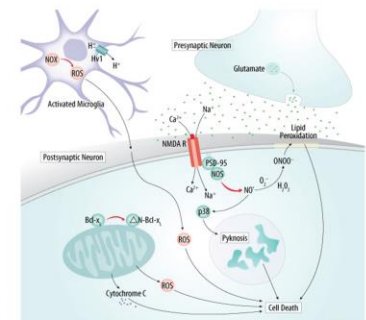


Fig. 1: Neuronal cell death caused by oxidative stress (7)



Fig. 2: Rat with Alzet® type of osmotic micropump (8)

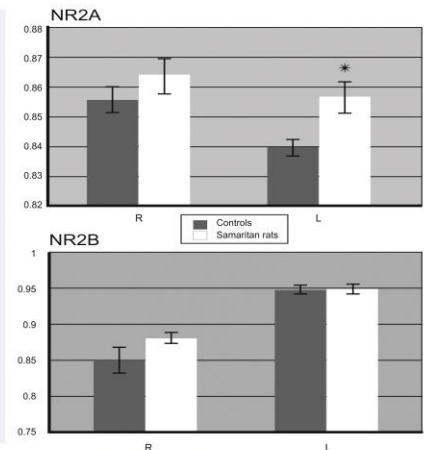


Fig. 3: Changes in NR2A and NR2B subunit expressions



A Rat Model of Alzheimer's Disease Based on Abeta₄₂ and Pro-oxidative Substances Exhibits Cognitive Deficit and Alterations in Glutamatergic and Cholinergic Neurotransmitter Systems

Tomas Petrasek^{1,2*}, Martina Skurlova¹, Kristyna Maleninska¹, Iveta Vojtechova¹, Zdena Kristofikova², Hana Matuskova², Jana Sirova², Karel Vales¹, Daniela Ripova² and Ales Stuchlik^{1*}

¹ Department of Neurophysiology of Memory, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, ² National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

OPEN ACCESS

Edited by:

Paula I. Moreira,
University of Coimbra, Portugal

Reviewed by:

Sónia C. Correia,
University of Coimbra, Portugal
Lucia Carboni,
Alma Mater Studiorum University of
Bologna, Italy

*Correspondence:

Tomas Petrasek
disworlds@gmail.com;
Ales Stuchlik
ales.stuchlik@fgu.cas.cz

Received: 20 January 2016

Accepted: 04 April 2016

Published: 20 April 2016

Citation:

Petrasek T, Skurlova M, Maleninska K, Vojtechova I, Kristofikova Z, Matuskova H, Sirova J, Vales K, Ripova D and Stuchlik A (2016) A Rat Model of Alzheimer's Disease Based on Abeta₄₂ and Pro-oxidative Substances Exhibits Cognitive Deficit and Alterations in Glutamatergic and Cholinergic Neurotransmitter Systems. *Front. Aging Neurosci.* 8:83. doi: 10.3389/fnagi.2016.00083

Alzheimer's disease (AD) is one of the most serious human, medical, and socioeconomic burdens. Here we tested the hypothesis that a rat model of AD (Samaritan; Taconic Pharmaceuticals, USA) based on the application of amyloid beta₄₂ (Abeta₄₂) and the pro-oxidative substances ferrous sulfate heptahydrate and L-buthionine-(S, R)-sulfoximine, will exhibit cognitive deficits and disruption of the glutamatergic and cholinergic systems in the brain. Behavioral methods included the Morris water maze (MWM; long-term memory version) and the active allothetic place avoidance (AAPA) task (acquisition and reversal), testing spatial memory and different aspects of hippocampal function. Neurochemical methods included testing of the NR1/NR2A/NR2B subunits of NMDA receptors in the frontal cortex and CHT1 transporters in the hippocampus, in both cases in the right and left hemisphere separately. Our results show that Samaritan rats™ exhibit marked impairment in both the MWM and active place avoidance tasks, suggesting a deficit of spatial learning and memory. Moreover, Samaritan rats exhibited significant changes in NR2A expression and CHT1 activity compared to controls rats, mimicking the situation in patients with early stage AD. Taken together, our results corroborate the hypothesis that Samaritan rats are a promising model of AD in its early stages.

Keywords: animal model, Alzheimer's disease, sporadic AD, learning and memory, cognition, neurochemistry of the acetylcholine system, hippocampus

Abbreviations: AAPA, active allothetic place avoidance; Abeta, amyloid beta; AD, Alzheimer's disease; CHT1, high-affinity choline transporter; HACU, high-affinity choline uptake; MWM, Morris water maze; NMDA, N-methyl-D-aspartate.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a serious neuropsychiatric disorder, invariably resulting in the death of the patient, preceded by a slow and excruciating deterioration of memory, cognitive abilities and personality, which constitutes a serious burden not only for patients but also for their relatives and the whole society. With the ageing population in many countries, the number of people suffering from AD will increase enormously. The exact etiology of the disease is not known, although it presents with extracellular plaques of amyloid beta (A β) peptides and intracellular tangles of protein tau (Reiman, 2014). Both these factors are suspected to play an important role in disease progression (Spires-Jones and Hyman, 2014). Apart from protein accumulations, AD is accompanied by neuroinflammation, oxidative stress, and neurodegeneration of the cholinergic, noradrenergic and serotonergic projections (Wenk, 2003). Many scientists today are not convinced that the pathological accumulation of proteins is the primary cause of the disease process, and consider neuroinflammation and disrupted axonal transport as possible factors that may be present prior to the clinical onset of the disorder (Schuitmaker et al., 2009; Ye et al., 2012). Multiple changes reaching beyond the simple description given above have been detected in AD brain neurochemistry (e.g., Cai and Ratka, 2012). These changes can be studied primarily in animal models and *post mortem* studies, since the living human brain is barely accessible to biochemical examination.

There are two basic forms of AD: familial and sporadic. The familial form is very rare and is related to inherited gene mutations (Rossor et al., 1993). The sporadic form represents a vast majority of AD cases (Piaceri et al., 2013) and typically occurs at more advanced age. There are reports that this type may start in middle age as well, although this is not very common (Reiman, 2014). A vast majority of transgenic models of AD carry various mutations in A β , tau or presenilin (Do Carmo and Cuello, 2013). In this respect, these models are closer to the familial, rather than sporadic, form of AD. However, valid models of sporadic AD, which may not necessarily involve gene mutations, are of high importance for basic and applied research focused on AD (Lecanu and Papadopoulos, 2013).

Beside massive neurodegeneration and neurochemical and anatomical changes in the brain, patients with AD exhibit severe learning and memory deficits. These include disorientation and other impairments affecting the cognitive domain (Reiman, 2014). Therefore, appropriately sensitive behavioral testing of these models coupled to detailed examinations of brain biochemistry is very important.

For the present study we used a rat model of AD based on the chronic (28 days) intracerebroventricular application of A β ₄₂ and the pro-oxidative substances ferrous sulfate heptahydrate and L-buthionine-(S, R)-sulfoximine (the Samaritan Alzheimer's Rat Model; Taconic Pharmaceuticals, USA, described in Lecanu et al., 2006). We must note that this model is mainly focused on mimicking the symptoms of the disease, and is therefore not suitable for elucidating its etiology. A previous

study (Lecanu et al., 2006) documented impairments of working memory and typical neuropathological changes in this model. We attempted to characterize the model further, using two independent spatial cognitive tasks focused mostly on hippocampal function together with a neurochemical analysis of the hippocampus.

Our working hypothesis was that the Samaritan rat model of sporadic AD would present cognitive deficits in spatial tasks and alterations in brain glutamatergic and cholinergic neurotransmitter systems.

The behavioral tasks we employed, the Morris water maze (MWM) and the active allothetic place avoidance task (AAPA), place very different demands on hippocampal functions. Solving the MWM requires storing precise representation of spatial relationships in order to locate a small, hidden goal. In the AAPA, on the other hand, the major hippocampus-dependent task involves organizing the spatial information into two conflicting frames, and selection of the relevant one. Impairments of hippocampal function therefore impact preferentially memory retrieval in the MWM, whereas in the AAPA, new learning is disrupted before retrieval (Kubik and Fenton, 2005). Therefore, we were interested in the possibility of differential impacts of AD-related cognitive decline on performance in these tests.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Young adult male Long-Evans rats were obtained from Taconic Pharmaceuticals, USA (with the patented commercial name Samaritan ratTM; see Lecanu et al., 2006), where they underwent the following procedure prior to delivery. The experimental animals received an infusion of A β ₄₂ (15 μ M) and two pro-oxidative substances, ferrous sulfate heptahydrate (1 mM) and L-buthionine-(S, R)-sulfoximine (12 mM), dissolved in artificial cerebrospinal fluid. The solution was applied chronically (4 weeks at a rate of 2.5 μ l/h) via an osmotic pump connected to a permanent cannula inserted into the left cerebral ventricle, to induce AD-like brain pathology. This procedure was described in detail by Lecanu et al. (2006). Control rats were sham-treated (infused by the solvent without active substances). Treatments started at the age of 7 postnatal weeks, and lasted for 4 weeks.

At the age of 8 weeks, the animals were transported from Taconic Pharmaceuticals to the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, where they were allowed a 2-week acclimatization period. Animals were housed in an accredited animal room with constant humidity (50%), temperature (22 \pm 1°C) and a regular light-dark cycle (lights on between 6:00 and 18:00). Animals from both groups were tested in an alternating order, to exclude bias from potential circadian changes in performance.

All experiments were approved by the local Committee for Animal Protection and complied with the Animal Protection Act of the Czech Republic, EU directive (2010/63/EC). Access to water and standard rat food was *ad libitum*.

TABLE 1 | Experimental design.

Week 7	Week 8–10	Week 11–12			Week 20–22			Week 22
Surgery (Taconic Pharmaceuticals, USA)	Arrival to the animal room, acclimation period, handling	Morris Water Maze			AAPA			Brain tissue sampling
		4 days acquisition	1 day probe trial	1 day visible platform	2 days habituation	5 days acquisition	5 days reversal	

From an initial total of 21 animals, two died, and one of the animals from the experimental group had to be excluded because of non-standard behavior (the animal was obviously anxious, aggressive when manipulated and attempted to escape from the testing apparatus). Therefore, nine Samaritan and ten control rats, aged 11–22 weeks, were used in the study.

Study Design

After the acclimatization period at the Institute of Physiology AS CR, animals were handled for 5 days (handling included habituation to human touch, holding and manipulation by the experimenters for 5–10 min per day) and then subjected to MWM testing for 6 days starting at the age of 11 weeks, and then tested in an AAPA test with reversal, starting at the age of 20 weeks. After completion of the behavioral studies, the rats were sacrificed at the age of 22 weeks and subsequent neurochemical analyses were conducted *post mortem*. Table 1 shows the timing of the most important experimental steps.

The Morris Water Maze (MWM)

The MWM is a classical test of precise place navigation and memory (Morris, 1981; Stuchlik et al., 2007a; Petrasek et al., 2014a), widely used in models of cognitive disorders. We used a reference memory protocol with four-day training, followed by a probe trial at Day 5 and visible platform testing at Day 6. The MVM (Morris, 1981; Stuchlik et al., 2007b; Petrasek et al., 2014a; reviewed in D'Hooge and De Deyn, 2001) consisted of a gray circular pool (180 cm in diameter) filled with water at a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$ to a depth of 35 cm. The water was rendered opaque by adding a small amount of non-toxic white paint (Primalex, PPG Deco; Czech Republic). The maze was located in a room providing an abundance of extra-maze cues. Swimming trajectories were monitored by an overhead camera connected to a digital tracking system and data acquisition program (Tracker, Biosignal Group, NY, USA). The maze contained a transparent plastic platform (10 cm in diameter) located in the center of the NE quadrant (the quadrants were labelled based on arbitrary compass directions) in acquisition sessions of the hidden-platform phase. In total, there were four daily sessions of hidden-platform testing in the MWM with the same platform position. The rats were released for six swims per session, separated by 15-min intervals, from different start locations, the sequence of which was changed pseudo-randomly for each daily session. Probe trial (60-s swims with the platform removed from the pool) was given in the fifth daily session to

demonstrate the remembered platform position (one session, one swim).

In the visible platform testing (one daily session) the platform was raised above the surface and marked by a dark rim. The animals underwent eight swims in 15-min intervals, always being released from pseudorandomly chosen places around the periphery. The platform position was located in the SE. All MWM experiments were done between 18:00 and 23:00, i.e., during the dark phase of the day.

Active Allothetic Place Avoidance (AAPA)

AAPA is a spatial task on a dry arena (Czéh et al., 2001), constituting prototype of a dynamic memory test (Stuchlik, 2014). Compared to the MWM, it places lower demands on precise spatial navigation, but on the other hand, it requires segregation of spatial frames, a skill that is considered equivalent to human cognitive coordination (Wesierska et al., 2005; for detailed conceptualization of this term see Phillips and Silverstein, 2003). We also included reversal training, sensitive to cognitive flexibility impairments (Petrasek et al., 2014a,b). The AAPA task is a test of both spatial abilities and executive functions, requiring animals to maintain two spatial representations and choose the relevant one, and is especially sensitive to subtle damages of hippocampal function (Kubik and Fenton, 2005; Stuchlik et al., 2013; Petrasek et al., 2014a).

The active place avoidance apparatus (Carousel; originally described by Bures et al., 1997; Fenton et al., 1998; reviewed in Stuchlik et al., 2013, 2014) was a smooth metallic arena (82 cm in diameter), enclosed with a transparent Plexiglas wall (for details of the apparatus and procedures see Stuchlik et al., 2007a; Stuchlik and Vales, 2008; Lobellova et al., 2013). At the beginning of each session, a rat was placed in the center of the arena, which rotated constantly at one revolution per minute. A 60-degree to-be-avoided sector was defined in the coordinate frame of the room by the computer-based tracking system (Tracker, Biosignal Group, NY, USA), which also recorded the positions of the rat and the arena (which were both marked by infrared LED diodes) at a sampling rate of 25 Hz. Each entrance into the sector lasting more than 300 ms was punished by mild electric footshocks (AC, 50 Hz, repeated every 1200 ms until the rat left the sector) delivered by the tracking system. The intensity of the shock was individualized for each rat (0, 3–0, 7 mA), to ensure an escape reaction while avoiding freezing caused by excessive pain. The shocks were administered through a cable attached to a harness on the back of the rat and connected to a conductive subcutaneous implant. The current was perceived by the rat at places of high-impedance contact between the paws and the grounded metallic floor. The trajectories were

digitized and recorded on a PC, allowing off-line reconstruction and analysis of the animal's trajectory (Track Analysis, Biosignal Group, NY, USA; Carousel Maze Manager, Bahnik, 2014) both in the coordinate frame of the room and in the coordinate frame of the rotating arena.

Since the arena rotated, the rat had to move actively away from the sector in the direction opposite to arena rotation, otherwise it would be passively transported into the shock sector. For successful avoidance, the animal had to distinguish the distant room-frame cues, which could be used to locate and avoid the sector, from the irrelevant, arena-frame cues (i. e. scent marks), which moved relative to the sector position and were thus misleading.

Testing began with two habituation sessions, one on a stable arena, the other with rotation, to observe the spontaneous behavior of the animals and allow them to become accustomed to the testing procedure. Ten daily 20-min sessions of active place avoidance testing were conducted separated by 24-h inter-trial intervals. The initial five sessions were considered acquisition sessions, and were followed by five reversal sessions with the sector position shifted by 180 degrees. Carousel maze testing was conducted during daylight hours (10:00–18:00).

Neurochemical Analysis of the Brain Tissue

Neurochemical analysis was focused on changes in the cortical glutamatergic and hippocampal cholinergic neurotransmitter systems, both involved in learning and memory processes. With respect to changes in the glutamatergic system in AD, the data in the literature support a two-stage mechanism. In particular, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors seem to be hyperactive in early stages but rather hypoactive in later stages of the disease (e.g., Butterfield and Pocernich, 2003). Since NMDA receptors are heteromeric complexes of particular subunits and the subunit composition can be changed among others under pathological conditions (Cull-Candy et al., 2001), we decided to evaluate the Samaritan rat model via the expression of the NR1, NR2A and NR2B subunits of NMDA receptors. Although a gradual loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert reflects a gradual deterioration of memory and cognitive processes in AD (Arendt et al., 1983), changes in the activity of hippocampal or cortical presynaptic cholinergic nerve terminals also suggest possible two-stage mechanism. This activity can be estimated via measurements of Na⁺-dependent, high-affinity choline uptake (HACU) operating via CHT1 transporters. The HACU levels are increased in early stages of AD, probably via a compensatory reaction to impairments of the cholinergic basal forebrain system (Slotkin et al., 1990). On the contrary, the activity of CHT1 is markedly decreased in later stages of AD (Sims et al., 1983). Similarly, the number of membrane-bound CHT1 transporters estimated by means of the specific binding of [3H]hemicholinium-3 ([3H]HC-3), a selective and competitive inhibitor of HACU, is initially enhanced (Slotkin et al., 1990)

but later attenuated (Pascual et al., 1991; Rodríguez-Puertas et al., 1994).

Tissue Sampling

Rats were sacrificed by cervical dislocation, decapitated and the brains rapidly removed. The frontal cortices and hippocampi, separately from the right (R) and left (L) hemisphere, were dissected and weighed. The frontal cortices were packed in aluminum foil and frozen at -40°C until assayed (no more than 2 weeks later), while the hippocampi were immediately used for preparation of synaptosomes.

Expressions of the NMDA Receptor Subunits NR1, NR2A and NR2B by Western Blotting

The frontal cortices were homogenized in 1.0 mL of lysis buffer (320 mM sucrose; 10 mM Tris, pH 7.4; 0.2 mM EDTA; 2 mM PMSF; 1 mM 2-mercaptoethanol and a cocktail of protease inhibitors, Sigma). Crude synaptosomal (P_2) fractions were isolated from homogenates and resuspended in a loading buffer (63 mM Tris; 10% glycerol; 2% SDS; 5% 2-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue). The protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as the standard (Bio-Rad, CA, USA). The resuspended material was subjected to electrophoresis in a 7.5% polyacrylamide gel (Criterion Cell, Bio-Rad, CA, USA), followed by electroblotting in Criterion blotter (Bio-Rad, USA). Non-specific binding was blocked with 3% BSA dissolved in TBS-T buffer. Blots were incubated overnight with anti-NMDAR1 (1:100; Millipore, MA, USA) or for 2 h with anti-NMDAR2A/2B (1:500; Millipore, MA, USA) primary antibodies. For loading control, blots were treated with an anti- α -tubulin antibody (1:1000; Exbio, CZ, USA) for 1 h. Then, the blots were washed in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000; Dako, Denmark). Detections were performed with a chemiluminescent substrate (Pierce, WI, USA) and evaluated by the Gel Doc Analysis system (Bio-Rad, CA, USA).

Preparation of Hippocampal Synaptosomes

The hippocampi from individual animals were separately transferred to 0.32 M sucrose and immediately used for preparation of synaptosomes using glass-Teflon Potter's Braun homogenizer, 0.32 M sucrose, an Universal 32R centrifuge (1000 g for 10 min at 4°C) and a Beckman J2-HS centrifuge (twice 20,000 g for 20 min at 4°C) in accordance with our previous studies (Kristofikova et al., 2004, 2010).

HACU Measurements

Hundred microlitres (100 μl) of synaptosomes were added to 880 μl of Krebs-Ringer-HEPES-glucose buffer (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.7 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 5 mM glucose and 10 mM HEPES, pH = 7.4) and incubated for 4 min at 37°C with 20 μl of [3H]choline ([methyl-3H]choline chloride, PerkinElmer). The final concentration of the radioisotope was 10 nM and that of total proteins (estimated by the Bradford method with BSA as a standard) 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in all incubation mixtures. The incubation was terminated by rapid cooling and filtration

under vacuum (Whatman BF/B filters). HACU was defined by its sensitivity to unlabeled HC-3 (RBI) and calculated as the difference between the uptake in samples incubated without and with 1 μM HC-3. The activity of samples was measured on a multi-purpose scintillation counter LS 6500 (Beckman Coulter) using Gold Star liquid scintillation cocktail (Meridian). Remaining synaptosomes were stored at -40°C and later used to measure the specific binding of $[3\text{H}]\text{HC-3}$.

Measurements of the Specific Binding of $[3\text{H}]\text{HC-3}$

Twenty microlitres (20 μl) of synaptic membranes were added to 170 μl of glycylglycine buffer (50 mM glycylglycine, 200 mM NaCl, pH = 7.8) and incubated for 30 min at room temperature with 10 μl of $[3\text{H}]\text{HC-3}$ ([methyl- ^3H]hemicholinium-3, diacetate salt, PerkinElmer). The final concentration of the radioisotope was 20 nM and that of total proteins was 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in all incubation mixtures. Parallel incubations in the presence of 10 μM HC-3 were performed to define the nonspecific binding. The titration and activity measurement were performed as described above.

Measured Parameters and Statistical Evaluations

In the AAPA task, total distance traveled within a session served as a measure of locomotor activity. Maximum avoidance time per session (s) and number of errors (entrances into the to-be-avoided sector) served as measures of cumulative within-session performance. Finally, latency to the first entrance from the beginning of the session (time to the first error) served as a measure of between-session learning. For the MWM we used total distance to reach the platform as a measure of acquisition performance in all sessions except in the probe trial. In the probe trials, where no platform was present, we evaluated preference for the quadrant that previously contained the platform.

Behavioral data from AAPA were analyzed separately for acquisition and reversal by two-way analysis of variance (ANOVA), with repeated measures on sessions and groups as a between subject factor. In cases of non-normality of the data (errors, maximum avoidance time and time to the first error) the natural logarithm (\ln) was used to normalize the data distribution. *Post hoc* analysis was conducted with a Newman-Keuls test. Data from the hidden platform testing in the MWM were analyzed by mixed effects ANOVA, with repeated factors of swims and sessions, and groups as a between-subject factor. Data from the visible platform testing were analyzed by a two-way ANOVA (groups \times swims) with repeated measures on swims. Data from the probe trial were analyzed with a two-sample, two tailed *t*-test. In all behavioral tests, 8 Samaritan rats and 10 controls were used. Missing values (i.e., tracks lost due to technical errors) were treated by a case-wise deletion; therefore, the degrees of freedom may differ for respective measures.

Biochemical data were analyzed by ANOVA with repeated measures with groups as a grouping factor and laterality (differences between the R and L side) as a within factor, and subsequently by one-way ANOVA. Differences between the R and L side were also characterized by the index of laterality

$[(L-R)/(L+R)]$. This index is limited to zero when all the values are not lateralized (marked asymmetry was defined in this study by indexes of laterality $> \pm 0.090$) or when the numbers of markedly R/L animals (dominance of the R side) and L/R animals (dominance of the L side) are approximately equal. Data are presented as the mean \pm standard errors of the mean (SEM).

We also performed correlations between selected parameters of neurochemical tests. We correlated the expressions of NR1/NR2A/NR2B subunits of NMDA receptors, and CHT1 parameters (HACU and the specific binding of $[3\text{H}]\text{HC-3}$). For the sake of simplicity and straightforwardness, we report only significant correlations, and an absence of correlation is reported only if it has biological significance, using Pearson's correlation (r and p values). The equality of correlation coefficients in two groups was examined using the test based on Fisher's *Z*-transformation (*Z*-test). Significance was accepted in all cases of $p < 0.05$.

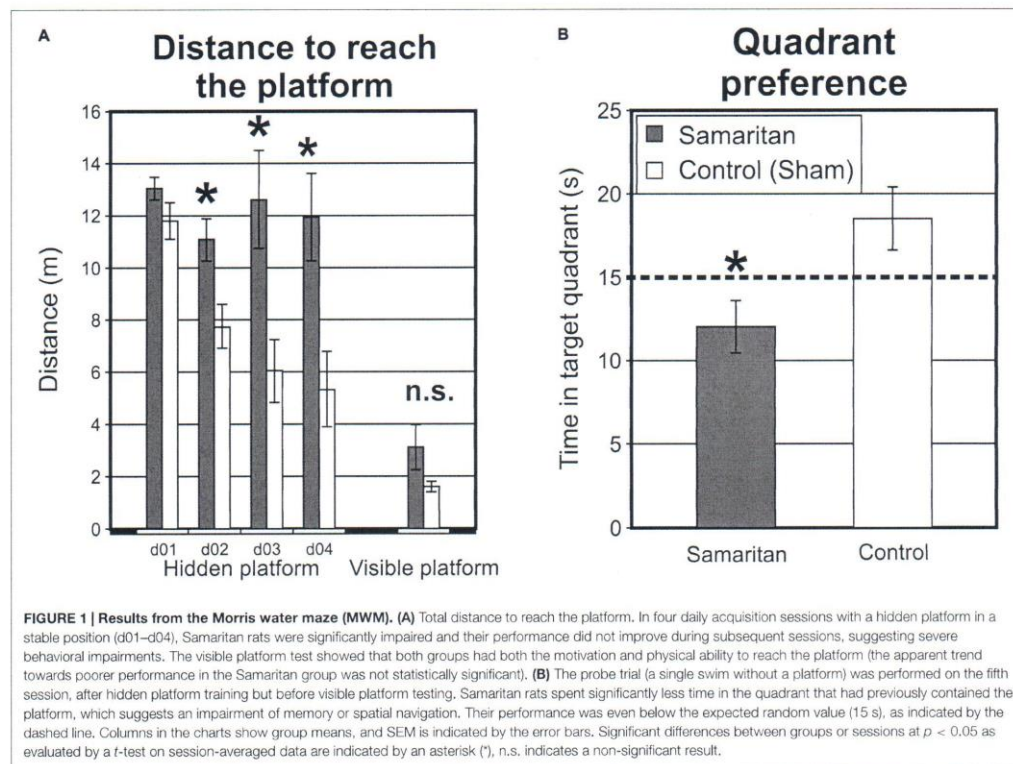
RESULTS

Morris Water Maze

First we tested rats in the MMW (Figure 1). There were four acquisition sessions in the hidden platform version of the MWM with the platform located in the NE and pseudorandom starting positions. In these sessions, Samaritan rats needed longer paths to locate the platform, indicating that they were impaired. The mixed effects ANOVA (groups \times sessions \times swims) revealed a significant main effect of group ($F_{(1,13)} = 12.62$; $p < 0.05$), sessions ($F_{(3,39)} = 4.76$; $p < 0.05$), swims ($F_{(5,65)} = 10.57$; $p < 0.05$) and interaction between groups and session ($F_{(3,39)} = 4.41$; $p < 0.05$). No other interactions, including a triple interaction between swims, sessions and groups, were detected. The total distance to reach the platform in a particular session is illustrated in Figure 1A-left; though individual swims are not depicted, the total distance decreased in both groups for subsequent swims each day.

When examining the latency to reach the platform, the results were similar. The mixed effects ANOVA (groups \times sessions \times swims) revealed a significant main effect of group ($F_{(1,16)} = 4.93$; $p < 0.05$), sessions ($F_{(3,48)} = 13.28$; $p < 0.05$), swims ($F_{(5,80)} = 4.47$; $p < 0.05$) and interaction between groups and swims ($F_{(5,80)} = 2.63$; $p < 0.05$). No other interactions, including a triple interaction between swims, sessions and groups, were detected.

Second, a probe trial was conducted during session five of the MWM. A two-sample *t*-test comparing the performance between groups revealed decreased time spent in the target quadrant that previously contained the platform ($T_{(1,16)} = 10.13$; $p < 0.05$). As can be seen from Figure 1B, the performance of control rats was above the level of chance (15 s for a randomly swimming rat), but the performance of Samaritan rats was below chance. This suggests that remembrance of the platform position was impaired in the Samaritan group. (Figure 1B) The low target sector preference of the Samaritan group in the probe trial was probably linked to their inferior



searching strategy. Visual inspection of the data suggested much higher thigmotaxis in the Samaritan group, and a slight preference for the quadrant opposite to the target (where the starting position was located). We thus evaluated thigmotaxis (measured as the distance from the center of the maze) by a two-sample t -test, which confirmed that the Samaritan rats tended to spend more time on the periphery ($T_{(1,16)} = 2.78$; $p < 0.05$).

Finally, we conducted a visible platform test (Figure 1A-right, showing the mean path needed to find the platform for each day), consisting of eight swims in 1 day. The two-way ANOVA (groups \times swims) failed to detect a significant main effect of group ($F_{(1,14)} = 3.44$; $p > 0.05$), but a significant main effect of swims was found ($F_{(7,98)} = 3.21$; $p < 0.05$). Visual inspection of the data indicated poorer performance in the initial swims (not shown), before the animals adjusted to the new task rules; however, there was no significant interaction ($F_{(7,98)} = 1.65$; $p > 0.05$). For the time to reach the platform, there was no significant effect of group ($F_{(1,16)} = 3.93$; $p > 0.05$), but there was a significant effect of swims ($F_{(7,112)} = 5.37$; $p < 0.05$). Again, no significant interaction was present ($F_{(7,112)} = 2.06$; $p > 0.05$).

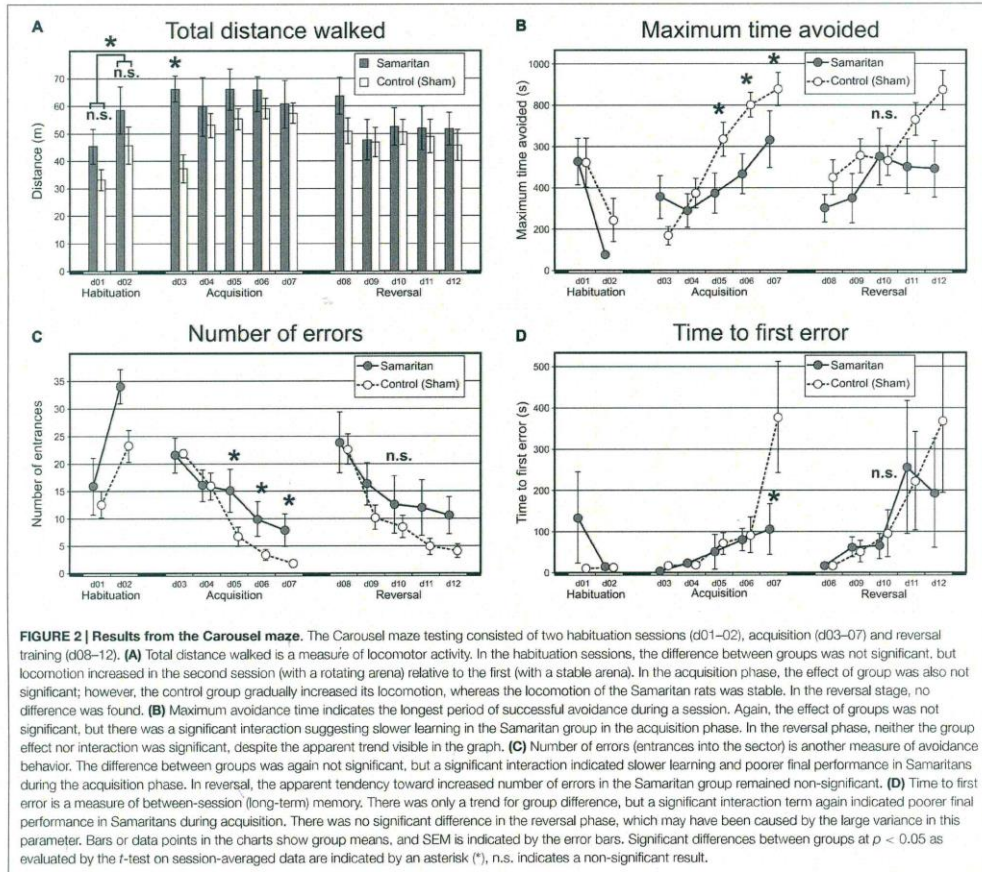
Active Allothetic Place Avoidance

Habituation Sessions

During the habituation phase (two sessions; Figure 2-left parts of panels), no effect of groups was detected ($F_{(1,15)} = 2.35$; $p > 0.05$). There was, however, a significant effect of days, with animals walking more on the second day of habituation on the rotating arena ($F_{(1,15)} = 4.74$; $p < 0.05$). No interaction between the factors of group and day was detected. Place navigation parameters were not evaluated in this phase, since there were no shocks applied and therefore no avoidance.

Acquisition Sessions

During the acquisition phase, there was no effect of groups on total distance ($F_{(1,16)} = 1.84$; $p > 0.05$); however, ANOVA revealed a significant effect of sessions ($F_{(4,64)} = 3.09$; $p < 0.05$) and a significant interaction ($F_{(4,64)} = 4.43$; $p < 0.05$). The Newman-Keuls *post hoc* test on session term revealed that the distance was higher in the last three sessions, probably as an adaptation to the task. Analysis of the interaction term demonstrated that while Samaritan rats had stable locomotion in all acquisition sessions, the control group gradually increased the total distance traveled (Figure 2A). Visual inspection of the data

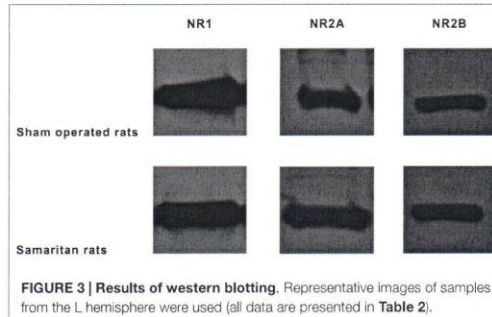


showed that some control animals exhibited passive behavior during the first avoidance session, but they gradually abandoned this strategy, and all of them were able to achieve successful avoidance. In the Samaritan group, this passive behavior was less common in the beginning, but several rats were not able to achieve the avoiding behavior at all, although some others were.

Analysis of the maximum avoidance time again revealed a significant main effect of sessions ($F_{(4,64)} = 16.19$; $p < 0.05$) but not groups ($F_{(1,16)} = 1.79$; $p > 0.05$), with the interaction term being significant ($F_{(4,64)} = 5.70$; $p < 0.05$). *Post hoc* test on sessions revealed that again, maximum avoidance time was significantly increased in last three acquisition sessions ($p < 0.05$). Analysis of the interaction term revealed that Samaritan rats had lower maximum avoidance times at the end of acquisition than controls ($p < 0.05$; **Figure 2B**).

Analysis of the number of errors revealed a significant main effect of sessions ($F_{(4,56)} = 30.90$; $p < 0.05$), but not group ($F_{(1,14)} = 2.93$; $p > 0.05$); however, the interaction term was significant ($F_{(4,56)} = 3.02$; $p < 0.05$). The *post hoc* test on the session factor revealed a lower number of errors in last three sessions compared to the first two sessions ($p < 0.05$). Analysis of the interaction term showed that Samaritan rats did not achieve the same level of final performance as controls ($p < 0.05$; **Figure 2C**).

The two-way ANOVA conducted on the data for time-to-the-first-error revealed a significant effect of sessions ($F_{(4,64)} = 9.85$; $p < 0.05$) and the interaction term ($F_{(4,64)} = 3.26$; $p < 0.05$). The effect of group exhibited only a trend ($F_{(1,16)} = 3.98$; $p = 0.06$), likely due to the high variance in the data. The *post hoc* test of the session factor showed that rats in the last two sessions had increased time to the first error compared to



the three initial sessions. Visual analysis of the group factor trend showed that control groups improved in between-session memory compared to Samaritan rats, although there was high variation. The *post hoc* analysis of the interaction term showed impaired between-session memory in Samaritan rats compared to controls (Figure 2D).

All these data suggest that the AD model animals were impaired in acquisition sessions for all measured spatial parameters, including the total distance (significant interaction term).

Reversal Sessions

Total distance in the reversal sessions was not affected by any factor, nor was any interaction detected (all $p > 0.05$). This suggests that animals were already accommodated to the task and did not have locomotor disabilities (Figure 2A-right). The two-way ANOVA conducted on maximum avoidance time revealed only a main effect of sessions ($F_{(4,60)} = 6.17$; $p < 0.05$). No other terms (groups, interaction) were significant (all $ps > 0.05$). This again suggests that there were no between group differences in this parameters in the reversal sessions, although a visual trend of an increased number of errors in Samaritan rats can be seen (Figure 2B-right). The number of errors was affected only by sessions ($F_{(4,44)} = 14.59$; $p < 0.05$); no other effects were significant (all $ps > 0.05$). The *post hoc* analysis of the session factor showed that in the first reversal session this parameter was worse than in subsequent sessions, when it gradually decreased (Figure 2C-right). There seems to be a trend in interaction, but this was not significant, probably due to high variation. Time to the first error was not affected by any factor, and this parameter also showed high variation (all $ps > 0.05$; Figure 2D-right).

Neurochemical Analysis

Table 2 shows the expression levels of NR1/NR2A/NR2B in the R and L frontal cortices. For representative image of western blot results, see Figure 3. In the sham-operated Long Evans controls, no marked asymmetries were found in NR1 (index of laterality = +0.005) or in NR2A subunit (index of laterality = -0.010). On the other hand, mild L/R dominance was observed in the NR2B subunit (index of laterality = +0.056, there was an increase to 112% in the L

TABLE 2 | Expression of NR1/NR2A/NR2B subunits of NMDA receptors in the frontal cortex.

Groups	n	R	L	L-R/L+R
NR1				
Sham-operated rats	10	1.002 ± 0.006	1.009 ± 0.004	0.005 ± 0.003
Samaritan rats	8	0.985 ± 0.014	1.009 ± 0.004	0.013 ± 0.007
One-way ANOVA		$F_{(1,16)} = 1.29$ $p = 0.2728$	$F_{(1,16)} = 0.00$ $p = 0.9906$	$F_{(1,16)} = 1.11$ $p = 0.3068$
NR2A				
Sham-operated rats	10	0.856 ± 0.004	0.840 ± 0.003	-0.010 ± 0.003
Samaritan rats	8	0.864 ± 0.006	0.857 ± 0.005*	-0.005 ± 0.004
One-way ANOVA		$F_{(1,16)} = 1.46$ $p = 0.2439$	$F_{(1,16)} = 7.56$ $p = 0.0142$	$F_{(1,16)} = 0.91$ $p = 0.3548$
NR2B				
Sham-operated rats	10	0.850 ± 0.020	0.948 ± 0.007	0.056 ± 0.015
Samaritan rats	8	0.883 ± 0.009	0.950 ± 0.007	0.036 ± 0.008
One-way ANOVA		$F_{(1,16)} = 1.91$ $p = 0.1863$	$F_{(1,16)} = 0.03$ $p = 0.8540$	$F_{(1,16)} = 1.16$ $p = 0.2969$

Mean ± SEM. Expressions of NMDA receptor subunits were estimated separately in the right (R) and left (L) frontal cortices. Results of ANOVA with repeated measures: NR1 groups: $F_{(1,16)} = 0.93$, $p = 0.3499$, laterality: $F_{(1,16)} = 5.22$, $p = 0.0363^*$, interaction: $F_{(1,16)} = 1.45$, $p = 0.2455$. NR2A groups: $F_{(1,16)} = 6.43$, $p = 0.0220^*$, laterality: $F_{(1,16)} = 7.89$, $p = 0.0126^*$, interaction: $F_{(1,16)} = 0.96$, $p = 0.3421$. NR2B groups: $F_{(1,16)} = 2.85$, $p = 0.1107$, laterality: $F_{(1,16)} = 28.47$, $p = 0.0001^{***}$, interaction: $F_{(1,16)} = 1.04$, $p = 0.3220$. * $p < 0.050$, *** $p < 0.001$.

compared to the R cortex, and the results of ANOVA with repeated measures for laterality was significant, $p < 0.001$). In Samaritan rats compared to the controls, results of ANOVA with repeated measures and one-way ANOVA only showed a significant change in the NR2A subunit (an increase to 102% in the L side of Samaritan rats). Although the results of the global test also suggested possible effects of laterality in the NR1 and NR2B subunits (with a drop to 98% of NR1 and an increase to 104% of NR2B in Samaritan rats, in both cases in the R side), results of one-way ANOVA did not support this.

Table 3 demonstrates the results of the HACU and [3H]HC-3 specific binding measurements in the R and L hippocampi. In sham-operated Long Evans controls, the data indicated a marked R/L dominance of HACU activity (index of laterality -0.094, an increase approximately to 119% in the R compared to the L hippocampus, and significant ANOVA with repeated measures for laterality $p < 0.05$). On the other hand, R/L dominance was not found in [3H]HC-3 specific binding (index of laterality -0.027, and an insignificant increase to 108% in the R compared to L side). When comparing Samaritan rats to controls, results of ANOVA with repeated measures indicated significant differences between groups in HACU values (increases to 142% in the R side and to 132% in the L side of Samaritan rats); nevertheless, the results of one-way ANOVA were only borderline significant.

No differences between groups were observed in the specific binding of [3H]HC-3.

Correlation Analysis

The results of correlation analysis from biochemical experiments are summarized in Table 4. In sham-operated controls, there

TABLE 3 | Activity and number of synaptic CHT1 transporters in the hippocampus.

Groups	n	R	L	L-R/L+R
HACU				
Sham-operated rats	9	226.2 ± 24.0	189.7 ± 24.4	-0.094 ± 0.057
Samaritan rats	9	321.1 ± 38.6	251.1 ± 27.9	-0.114 ± 0.064
One-way ANOVA		$F_{(1,16)} = 4.36$, $p = 0.0532$	$F_{(1,16)} = 2.74$, $p = 0.1174$	$F_{(1,16)} = 0.05$, $p = 0.8191$
[3H]HC-3				
Sham-operated rats	9	4465.1 ± 674.3	4123.5 ± 466.5	-0.027 ± 0.033
Samaritan rats	9	4520.3 ± 540.8	4532.5 ± 333.4	0.020 ± 0.048
One-way ANOVA		$F_{(1,16)} = 0.00$, $p = 0.9499$	$F_{(1,16)} = 0.51$, $p = 0.4859$	$F_{(1,16)} = 0.62$, $p = 0.4408$

Mean ± SEM. The activity of the high-affinity choline uptake (HACU) was estimated in synaptosomes isolated separately from the right (R) and left (L) hippocampi and expressed as fmol/4 min/mg of proteins. The specific binding of [3H]HC-3 was estimated in hippocampal synaptic membranes and expressed as fmol/mg of proteins. Results of ANOVA with repeated measures: HACU groups: $F_{(1,16)} = 5.15$, $p = 0.0374^*$, laterality: $F_{(1,16)} = 5.30$, $p = 0.0351^*$, interaction: $F_{(1,16)} = 0.53$, $p = 0.4791$. [3H]HC-3 binding—groups: $F_{(1,16)} = 0.11$, $p = 0.7399$, laterality: $F_{(1,16)} = 0.41$, $p = 0.5307$, interaction: $F_{(1,16)} = 0.47$, $p = 0.5007$. * $p < 0.050$.

TABLE 4 | Correlation analysis of data from biochemical experiments.

Parameter vs. parameter	Sham-operated		Samaritan		Z-test p
	r	p	r	p	
Subunits of NMDA receptors					
NR1 R vs. Laterality NR1	-0.789	0.007**	-0.976	< 0.001***	0.052
Laterality NR1 vs. NR2B R	0.356	0.312	-0.692	0.057	0.037*
Laterality NR1 vs. Laterality NR2B	-0.245	0.495	0.72	0.044*	0.048*
NR2A R vs. Laterality NR2A	-0.719	0.019*	-0.702	0.052	0.953
NR2A L vs. Laterality NR2B	-0.719	0.048*	-0.86	0.006**	0.356
NR2B R vs. Laterality NR2B	-0.979	< 0.001***	-0.94	< 0.001***	0.361
NR2B L vs. Laterality NR2B	0.665	0.036*	0.878	0.004**	0.334
CHT1 transporters					
HACU R vs. HACU L	0.686	0.041*	0.105	0.805	0.225
	0.903	< 0.001***	0.676	0.065	0.271
NMDA subunits and CHT1					
NR1 L vs. HACU L	-0.6	0.088	0.595	0.119	0.023*
Laterality NR1 vs. Laterality [3H]HC-3	0.438	0.238	0.935	< 0.001***	0.043*
NR2A R vs. Laterality HACU	0.711	0.032*	0.159	0.707	0.229
NR2A R vs. [3H]HC-3 L	-0.584	0.099	0.488	0.22	0.047*
NR2B R vs. HACU R	-0.74	0.023*	0.151	0.757	0.074
NR2B L vs. [3H]HC-3 R	-0.705	0.034*	-0.473	0.236	0.549
Laterality NR2B vs. HACU R	0.684	0.042*	-0.276	0.509	0.064

The laterality of particular parameters was expressed as indexes of laterality. Correlation coefficients (r) were evaluated via a test based on Fisher's Z-transformation (Z-test). * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$.

were significant relationships between all subunit expression levels in the R side and their laterality (three markedly negative correlations), between NR2B expression in the L side and its laterality (positive correlation), and finally between particular subunits with respect to their laterality (between NR1 and NR2B or between NR2A and NR2B). A comparison of controls and Samaritan rats indicated two significant differences (a shift

from a positive to a negative correlation between the laterality of NR1 and NR2B in the R side, a shift from negative to a markedly positive correlation between the laterality of NR1 and the laterality of NR2B). With respect to CHT1, correlation analysis revealed two marked positive correlations between the R and L side in the controls (for HACU as well as [3H]HC-3 binding); however, no differences between control and Samaritan rats were found. Moreover, correlation analysis revealed links between some subunits and CHT1 in sham-operated controls (two positive correlations, between NR2A in the R side and HACU laterality and between the laterality of NR2B and HACU in the R side; two negative correlations, between NR2B and HACU, both in the R side, and between NR2B in the L side and [3H]HC-3 in the R side. A comparison of control and Samaritan rats indicated three significant differences (a shift from a negative to a positive correlation between NR1 and HACU both in the L hemisphere, an increased positive correlation between the laterality of NR1 and that of [3H]HC-3, and finally a shift from a negative to a positive correlation between NR2A in the R side and [3H]HC-3 in the L side).

DISCUSSION

Impairments in the Morris Water Maze

Our results show that Samaritan rats were impaired in the reference memory version of the MWM. They took longer distances and times to reach the platform, and impairment was also present in the probe trial, where the experimental group had a significantly lower preference for the target quadrant that had previously contained the platform. In the visible platform testing, no significant difference between the groups was found.

Memory impairments in the MWM are among the major behavioral hallmarks of rodent models of AD. This task is a generally recognized model of AD because it taps hippocampal functions, which are among the first affected in human AD, is very simple and is widely used in existing studies, making it advantageous for comparisons of different models (for review, see D'Hooge and De Deyn, 2001; Sabbagh et al., 2013).

Although Lecanu et al. (2006) also examined MWM performance in the Samaritan model, they only tested the effects of experimental manipulations on the retrieval of memories acquired prior to the surgery. Our experiments assessed the ability to learn the reference memory task in rats already affected by the AD model, as well as the ability (and accuracy) of retrieval in a probe trial and the capability of the rats to master the procedural aspects of the task.

Trials using a visible platform should assess the spatial memory-independent aspects of the task, e.g., the capability to swim, ability to perceive visual cues, procedural learning and motivation to reach the platform. Although Figure 1A may suggest a trend toward poorer performance in Samaritan rats, the difference between the groups was not significant. It is also possible that the animals partly relied on a spatial strategy even

during the visible-platform test, as we did not change the visible platform position across swims. Because swimming speed was not altered in the Samaritan group (not shown), we can rule out potential locomotor impairment in the AD model.

Deficits in Active Allothetic Place Avoidance

Compared to the control group, we also observed a significant deficit of Samaritan rats in the acquisition phase of the active place avoidance test. No differences between groups were detected in the habituation phase, when only distance was evaluated (as there was no to-be-avoided sector). The lack of differences between total distances in the habituation phase (analogous to open field testing) suggests that spontaneous locomotion in Samaritan rats is normal, and confirms that no gross motoric impairments are present.

The deficits we found in the acquisition sessions (demanding mainly so-called cognitive coordination), with Samaritan rats showing a learning impairment, are a completely novel finding. There was a clear difference between groups in all spatial parameters (detected as significant interaction terms). The significant interaction term found in the total distance in acquisition sessions shows that control animals gradually increased their distance, as they adopted an active strategy enabling them to solve the task. The Samaritan rats exhibited stable (and quite high) locomotion on all days, but they nevertheless failed to reach the level of avoidance seen in the control group.

We hypothesized that a deficit in cognitive coordination would be present in the Samaritan rat model, because a meta-analysis of the Stroop effect showed impaired processing of multiple information streams in human AD patients (Ben-David et al., 2014). The deficit we observed in active place avoidance could be caused by a disruption of cognitive coordination; however, a general impairment of spatial navigation and memory (as also observed in the MWM) is in itself sufficient to explain the decreased performance in this task. Unfortunately, there are no other studies on animal models of AD and their possible deficits in cognitive coordination, so this question remains open for future studies.

In the reversal sessions of active place avoidance, demanding cognitive flexibility, we observed no significant differences between groups. Here the situation is much more difficult to interpret. From **Figures 2B,C** it is apparent that the performance of the Samaritan group actually continued to be worse even in the reversal sessions, although the difference failed to reach statistical significance, probably because the reversal performance was more variable. This variability could be related to higher stress levels and/or elevated cognitive demands. It is conceivable that the change of sector position was relatively more disturbing for the controls, which better remembered the original sector position, than for the Samaritans, and this reduced the apparent differences between them. Other observations from our laboratory (Hatalova et al., 2014) may support such an explanation.

Alterations in the Cortical Glutamatergic and Hippocampal Cholinergic Systems

In the present study, we show that there are asymmetrical differences in cortical NR2B subunit expression levels and in the activity, rather than the number, of hippocampal CHT1 transporters in adult male Long Evans controls (compare **Tables 2, 3**). Links between particular subunits of the NMDA receptor or between the R and L sides in the case of subunits/CHT1 could also be supported by our correlation analyses (**Table 4**); however, these results should not be over-interpreted since our experiments were not performed on intact animals. Nevertheless, both results are in accordance with observed lateral differences in hippocampal NR2B subunit expression in mature mice (Kawakami et al., 2003) and in hippocampal HACU in adult Long Evans rats (Kristofikova et al., 2004, 2010), and so support the hypothesis that changes in NMDA receptors and CHT1 transporters could be a molecular basis for the structural and functional asymmetry of the mature brain (Gibbs, 2000; Kawakami et al., 2003; Kristofikova et al., 2004).

A comparison of Samaritan rats with controls revealed rather unilateral changes in the frontal cortex (significantly increased NR2A expression in the L side, see **Table 2**) but bilateral alterations in the hippocampus (significantly increased HACU levels in both hemispheres, see **Table 3**). Nevertheless, the significant result of ANOVA with repeated measures for the laterality of NR1 does not exclude moderate alterations in NR1 expression in the R side of the frontal cortex (in contrast to NR2B, the effect of laterality in NR1 cannot be associated with the asymmetry of this subunit in the controls). These results may be also supported by significant correlation differences between NR1 and NR2B (**Table 4**).

Since the NR2A subunit becomes more prevalent in adulthood and with advanced aging (Cui et al., 2013) but is markedly attenuated in the autoptical cortical or hippocampal regions of people with AD (e.g., Hynd et al., 2004), our results of increased NR2A expression in the frontal cortex of Samaritan rats could be thus interpreted via the animal model mimicking early rather than terminal stages of AD. Moreover, with respect to the hyperactivity/hypoactivity of the glutamatergic system observed in AD (Butterfield and Pocernich, 2003), the increased NR2A subunit expression could reflect rather its hyperactivity since NR2A-containing receptors have a lower activation energy compared to those with NR2B (Erreger et al., 2005). We also detected bilateral increases in the activity of CHT1 in Samaritan rats compared to controls. Similar changes in CHT1 transporters observed in Samaritan rats and in people in early stages of AD (Slotkin et al., 1990) also support our above-mentioned hypothesis that Samaritan rats could be a promising model of sporadic AD, especially in its early stage.

Relationships Between Cortical NMDA Receptors and Hippocampal CHT1

Our correlation analysis suggests complicated links between the expression of NMDA receptors in the frontal cortex and hippocampal CHT1 in the controls (**Table 4**). In particular, the

data indicate possible connections between NR2A/NR2B and CHT1 activity as well as between NR2B and the number of CHT1; however, a more detailed analysis should be performed in the future to correctly interpret this hypothesis. Nevertheless, our results agree well with the reported role of prefrontal-hippocampal pathways in cognitive/memory processes, and perhaps also with the role of the R prefrontal cortex observed in human- or non-human primates (Anderson et al., 2015). On the other hand, an interpretation of changes in Samaritan rats compared to controls is not difficult. Namely, higher positive correlations between NR1 and CHT1 probably reflect similar changes in the glutamatergic and cholinergic systems mediated by applications of Abeta₄₂ and the two pro-oxidative substances into the L cerebral ventricle.

Study Limitations and Caveats

Despite what we feel are significant advances, our study is not without limitations: First, we did not measure any classical signs of AD pathology, such as amyloid plaques, neurofibrillary tangles etc. Rather we strongly relied on the published results of Lecanu et al. (2006) and the patented Samaritan model, and we used already-operated animals. Second, we found a visual trend to a worsening in performance in the visible platform version of the MWM in Samaritan rats, which might suggest some deficit in procedural aspects of the task (e.g., decreased visual acuity or motivation), but we argue that such a deficit only partially contributed to the deficit in the hidden platform task. This interpretation is also supported by the fact that in the active place avoidance task, which is procedurally very different and less dependent on precise visual navigation, the cognitive deficit of Samaritan rats was robust and manifested in multiple parameters.

The Samaritan model itself is limited by the fact that it exhibits only face validity (AD-like symptoms), but not construct validity (similarities in etiology), as it is induced by the artificial application of Abeta together with supplementary chemicals, which is obviously not the case in actual AD. Furthermore, the unilateral injection of the solution limits the validity of the model with regard to lateralized changes in neurotransmitter systems.

However, as the etiology of sporadic AD remains enigmatic, most of the existing models focus either on the familial form of the disease, or must deal with similar issues.

CONCLUSION

In summary, our results corroborate the working hypothesis that the Samaritan rat model of AD presents with deficits in both behavioral parameters tested with two spatial tasks, as well as alterations in the cortical glutamatergic and hippocampal cholinergic systems. The deficit in cognitive functions in Samaritan rats and the changes in NR2A subunit expression and in CHT1 transporters support the notion that Samaritan rats are a promising animal model of early-stage AD manifesting in changes in behavior even in young adult rats, and a candidate model of the sporadic form of the disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TP contributed to the experimental design, performed behavioral experiments including analysis and wrote part of the manuscript; MS, KM and IV performed part of the behavioral experiments. ZK conceived, performed and analyzed neurochemical studies and participated significantly in manuscript writing, HM and JS performed part of the neurochemical analyses. KV co-designed the experiment and provided practical organization of the study. DR co-designed the study and provided leadership for neurochemistry experiments, AS designed the study, wrote major parts of the manuscript, interpreted the data and provided scientific leadership.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported mainly by GACR Center of Excellence P304/12/G069. KM, KV and AS were supported also by MSMT LH14053. Institutional support was covered by RVO: 67985823 and project ED2.1.00/03.0078. We thank P.M. Luketic for proofreading of the article.

REFERENCES

- Anderson, M. C., Bunce, J. G., and Barbas, H. (2015). Prefrontal-hippocampal pathways underlying inhibitory control over memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* doi: 10.1016/j.nlm.2015.11.008 [Epub ahead of print].
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A. and Tennstedt, A. (1983). Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's disease. *Acta Neuropathol.* 61, 101–108.
- Bahník, Š. (2014). Carousel Maze Manager (Version 0.4.0) Software Available from https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_4_0
- Ben-David, B. M., Tewari, A., Shakuf, V. and Van Lieshout, P. H. (2014). Stroop effects in Alzheimer's disease: selective attention speed of processing, or color-naming? A meta-analysis. *J. Alzheimers. Dis.* 38, 923–938. doi: 10.3233/jad-131244
- Bures, J., Fenton, A. A., Kaminsky, Y. and Zinyuk, L. (1997). Place cells and place navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 343–350.
- Butterfield, D. A. and Pocernich, C. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 17, 641–652. doi: 10.2165/00023210-200317090-00004
- Cai, Z. and Ratka, A. (2012). Opioid system and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 14, 91–111. doi: 10.1007/s12017-012-8180-3
- Cui, Z., Feng, R., Jacobs, S., Duan, Y., Wang, H., Cao, X., et al. (2013). Increased NR2A: NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci. Rep.* 3, 1036. doi: 10.1038/srep01036
- Cull-Candy, S., and Brickley, S. and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00215-4
- Czéh, B., Stuchlik, A., Wesierska, M., Cimadevilla, J. M., Pokorný J., Seress, L., et al. (2001). Effect of neonatal dentate gyrus lesion on allothetic and idiothetic navigation in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 75, 190–213.
- D'Hooge, R. and De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00067-4
- Do Carmo, S. and Cuello, A. C. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* 8, 37. doi: 10.1186/1750-1326-8-37
- Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. A., and Treynelis, S. F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA

- channel kinetics and synaptic signaling profiles. *J. Physiol.* 563, 345–358. doi: 10.3410/E1023899.284783
- Fenton, A. A., Wesierska, M., and Kaminsky, Y. and Bures, J. (1998). Both here and there: simultaneous expression of autonomous spatial memories in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 11493–11498. doi: 10.1073/pnas.95.19.11493
- Gibbs, R. B. (2000). Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 101931–938. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00433-4
- Hatalova, H., Radostova, D., Pistikova, A., and Vales, K. and Stuchlik, A. (2014). Spatial reversal learning in chronically sensitized rats and in undrugged sensitized rats with dopamine d2-like receptor agonist quinpirole. *Front. Behav. Neurosci.* 8:122. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00122
- Hynd, M. R., Scott, H. L., and Dodd, P. R. (2004). Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 90: 913–919. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02548.x
- Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R., and Ito, I. (2003). Asymmetrical allocation of NMDA receptor $\epsilon 2$ subunits in hippocampal circuitry. *Science* 300, 990–994. doi: 10.1126/science.1082609
- Kristofikova, Z., Rícný, J., Ort, M. and Ripova, D. (2010). Aging and lateralization of the rat brain on a biochemical level. *Neurochem. Res.* 35, 1138–1146. doi: 10.1007/s11064-010-0165-8
- Kristofikova, Z., Stastny, F., Bubenikova, V., Druga, R., Klaschka, J. and Spaniel, F. (2004). Age- and sex-dependent laterality of rat hippocampal system in relation to animal models of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.* 29, 671–680. doi: 10.1023/b:ncr.0000018837.27383.ff
- Kubík, S., and Fenton, A. A. (2005). Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *J. Neurosci.* 25, 9205–9212.
- Lecanu, L. and Papadopoulos, V. (2013). Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimers. Res. Ther.* 5:17. doi: 10.1186/alzrt171
- Lecanu, L., Greeson, J. and Papadopoulos, V. (2006). Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology* 76, 19–33. doi: 10.1159/000088929
- Lobelova, V., Entlerova, M., Svojanovska, B., Hatalova, H., Prokopova, I., Petrasek, T., et al. (2013). Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behav. Brain Res.* 246, 55–62. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.006
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 260, 239–260. doi: 10.1016/0023-9690(81)90020-5
- Pascual, J., Fontán, A., Zarranz, J. J., Berciano, J., Flórez, J. and Pazos, A. (1991). High-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: implications for the cholinergic hypothesis of dementia. *Brain Res.* 552, 170–174. doi: 10.1016/0006-8993(91)90676-m
- Petrásek, T., Prokopova, I., Bahnik, S., Schonig, K., Berger, S., Vales, K., et al. (2014a). Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. *Neurobiol. Learn Mem.* 107, 42–49. doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.015
- Petrásek, T., Prokopova, I., Sladek, M., Weissova, K., Vojtechova, I., Bahnik, S., et al. (2014b). Nogo-a-deficient transgenic rats show deficits in higher cognitive functions, decreased anxiety and altered circadian activity patterns. *Front. Behav. Neurosci.* 8: 90. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00090
- Phillips, W. A. and Silverstein, S. M. (2003). Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behav. Brain Sci.* 26, 65–82. doi: 10.1017/s0140525x0328002x
- Piaceri, L., Nacmias, B. and Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 5, 167–177. doi: 10.2741/e605
- Reiman, E. M. (2014). Alzheimer's disease and other dementias: advances in 2013. *Lancet. Neurol.* 13, 3–5. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70257-6
- Rodríguez-Puertas, R., Pazos, A., Zarranz, J. J. and Pascual, J. (1994). Selective cortical decrease of high-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: an autoradiographic study using [³H]hemicholinium-3. *J. Neural. Transm.* 8, 161–169. doi: 10.1007/bf02260937
- Rossor, M. N., Newman, S., Frackowiak, R. S., Lantos, P. and Kennedy, A. M. (1993). Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695: 198–202. doi: 10.1016/b978-012286965-5/50006-6
- Sabbagh, J. J., Kinney, J. W. and Cummings, J. L. (2013). Animal systems in the development of treatments for Alzheimer's disease: challenges, methods and implications. *Neurobiol. Aging* 34, 169–183. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.027
- Schuitmaker, A., Dik, M. G., Veerhuis, R., Scheltens, P., Schoonenboom, N. S., Hack, C. E., et al. (2009). Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. *Neurobiol. Aging* 30, 1885–1889. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.01.014
- Sims, N. R., Bowen, D. M., Allen, S. J., Smith, C. C., Neary, D., Thomas, D. J. and Davison, A. N. (1983). Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J. Neurochem.* 40, 503–509. doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb11311.x
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Crain, B. J., Bell, J. M., Bisette, G. and Nemeroff, C. B. (1990). Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2452–2455. doi: 10.1073/pnas.87.7.2452
- Spires-Jones, T. L. and Hyman, B. T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82, 756–771. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004
- Stuchlik, A. (2014). Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front. Behav. Neurosci.* 8:106. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00106
- Stuchlik, A. and Vales, K. (2008). Role of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active place avoidance task: a dose-response study. *Neurosci. Lett.* 433, 235–240. doi: 10.1016/j.neulet.2008.01.013
- Stuchlik, A., Kubík, S., Vlcek, K. and Vales, K. (2014). Spatial navigation: implications for animal models, drug development and human studies. *Physiol. Res.* 63, S237–S249.
- Stuchlik, A., Petrásek, T., Prokopova, I., Holubová, K., Hatalova, H., and Valeš, K., et al. (2013). Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory. *Physiol. Res.* 62, S1–S19.
- Stuchlik, A., Rehakova, L., Rambousek, L., Svoboda, J. and Vales, K. (2007a). Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neurosci. Res.* 58, 133–139. doi: 10.1016/j.neures.2007.02.006
- Stuchlik, A., Rehakova, L., Telensky, P. and Vales, K. (2007b). Morris water maze learning in Long-Evans rats is differentially affected by blockade of D1-like and D2-like dopamine receptors. *Neurosci. Lett.* 422, 169–174. doi: 10.1016/j.neulet.2007.06.012
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* 64, 7–10.
- Wesierska, M., Dockery, C. and Fenton, A. A. (2005). Beyond memory, navigation and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J. Neurosci.* 25, 2413–2419. doi: 10.1523/jneurosci.3962-04.2005
- Ye, X., Tai, W. and Zhang, D. (2012). The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits. *Neurobiol. Aging* 33, 1122.e1–1122.e10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.004

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

The reviewer SCC and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Petrasek, Skurlova, Maleninska, Vojtechova, Kristofikova, Matuskova, Sirova, Vales, Ripova and Stuchlik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.