

Univerzita Palackého v Olomouci  
Filozofická fakulta  
Katedra psychologie

# **Socializace, anxiety a paměť jsou ovlivněny sulfatačním epitopem perineurálních sítí**

Role of changes in perineuronal nets sulfation epitope in sociability,  
anxiety and memory



Bakalářská diplomová práce

Autor: **Tereza Klausová**

Vedoucí práce: **RNDr. Jiří Růžička, Ph.D.**

Olomouc

2022

Tímto bych ráda poděkovala Ústavu experimentální medicíny AVČR za možnost vypracovat bakalářskou práci zde, jmenovitě panu doktoru Růžičkovi za trpělivé vedení celé práce a cenné podněty, dále pak děkuji kolegyním Lence Gmitterkové a Tereze Špundové za všechny rady a pomoc s testováním a kamarádce Ludmile Kovářové za korekturu. Poděkování patří taktéž panu doktoru Orlovi za poutavé přednášky, které ve mně vzbudily nadšení pro oblast neurověd.

Místopřísežně prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „Socializace, anxiety a paměť jsou ovlivněny sulfatačním epitopem perineurálních sítí“ vypracovala samostatně pod odborným dohledem vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Olomouci dne 28. 3. 2022

Podpis .....

# OBSAH

<b>OBSAH.....</b>	<b>3</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>5</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Extracelulární matrix a perineurální síť.....</b>	<b>7</b>
1.0 Extracelulární matrix v těle živočichů.....	7
1.0.0 Složení a funkce extracelulární matrix .....	8
1.0.1 Extracelulární matrix v centrální nervové soustavě .....	9
1.1 Perineurální síť .....	10
1.1.1 Složení perineurálních sítí.....	12
1.1.2 Vývoj PNS a jejich sulfatační epitopy .....	15
1.1.3 Co víme o funkci perineurálních sítí.....	16
<b>2 Psychika jedince v kontextu perineurálních sítí.....</b>	<b>19</b>
2.1 Sociabilita a sociální rekognice .....	19
2.2 Paměť a PNS.....	21
2.2.1 Deklarativní paměť a rozpoznání nového objektu .....	21
2.2.2 Prostorová paměť .....	23
2.3 Psychopatologie a perineurální síť.....	25
2.3.0 Anxieta, strach a PTSD .....	25
2.3.1 Chronický stres a deprese .....	26
2.3.2 Schizofrenie a perineurální síť.....	27
<b>3 Výzkum perineurálních sítí .....</b>	<b>30</b>
3.1 Chondroitináza ABC .....	30
3.2 Knock-out experimenty .....	31
3.3 Jak poznáme změny v perineurálních sítích .....	33
<b>VÝZKUMNÁ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>4 Výzkumný problém .....</b>	<b>36</b>
<b>5 Typ výzkumu a metody sběru dat .....</b>	<b>38</b>
5.1 Behaviorální testy .....	39
5.1.1 Morrisovo vodní bludiště (Morris water maze) .....	39
5.1.2 Test spontánní alternace.....	41
5.1.3 Rozpoznání nového objektu (SNOR).....	42
5.1.4 Social recognition test.....	44
5.1.1 Open arena.....	45
5.1.2 0-maze .....	45
5.1.3 Test repetitivního chování (Marble burying test).....	46

5.1.4	Test prepulzní inhibice .....	46
5.2	Formulace hypotéz ke statistickému testování .....	47
<b>6</b>	<b>Výzkumný soubor a etika .....</b>	<b>49</b>
6.0	Etické aspekty práce se zvířaty .....	49
<b>7</b>	<b>Práce s daty a její výsledky .....</b>	<b>50</b>
7.0	Výsledky ověření platnosti statistických hypotéz .....	59
<b>8</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>68</b>
<b>LITERATURA .....</b>		<b>71</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>		<b>78</b>
<b>1</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>79</b>
<b>2</b>	<b>Abstrakt .....</b>	<b>80</b>
<b>3</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>81</b>

# ÚVOD

Vážení čtenáři,

dostává se vám do rukou bakalářská práce zabývající se tématem sulfatačních epitopů extracelulární matrix (česky mezibuněčné hmoty) v mozku. Tento text přibližuje problematiku psychických funkcí a psychopatologie z pohledu neurověd a představuje stručné shrnutí dosavadních výzkumů v této oblasti, které v českém jazyce dosud nebyly publikovány a nenajdeme je ani v rozsáhlejších učebnicích.

Výzkum extracelulární matrix v mozku se mimo jiné zabývá možností ovlivnění neuroplasticity u živočichů, které může navrátit starému jedinci paměťové schopnosti mladého, a může být, jak doufáme, dalším krokem na cestě k léčbě demencí. Pomocí experimentálních metod můžeme změnit vlastnosti mezibuněčné hmoty v mozku a sledovat vliv těchto změn, které mohou vést ke zlepšení paměťových schopností. Současně však mohou tyto změny způsobit či modulovat závažné psychopatologické projevy, se kterými se musíme jako vědci vypořádat, než se nově objevené metody stanou součástí léčebných metod.

Cílem mého výzkumu je přiblížit vliv extracelulární matrix na psychické funkce jedince. Speciálním typem extracelulární matrix jsou perineurální sítě, které regulují neuroplasticitu. Ukážeme si, jakou roli tato struktura hraje při stárnutí organismu a jak souvisí s pamětí, ale také psychopatologií jako je například schizofrenie.

Toto téma jsem si zvolila, jelikož jsem během svého studia psychologie zjistila, že mé další směřování vede spíše k neurovědám. Výzkum jsem prováděla pod Oddělením regenerace nervové tkáně Ústavu experimentální medicíny AVČR (podpořeno grantem NEURORECON, CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000419). Má spolupráce s ústavem pokračuje i po dokončení empirické části bakalářské práce a velmi si jí vážím.

Příležitosti pro výzkum perineurálních sítí stále nejsou vyčerpány – a jsem vděčná za tuto příležitost se na výzkumu aktivně podílet. Teď už zbývá jen doufat, že toto seznámení s fascinujícím světem perineurálních sítí zaujme i čtenáře této práce.

# TEORETICKÁ ČÁST

# 1 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A PERINEURÁLNÍ SÍŤ

Předmětem našeho výzkumu je extracelulární matrix (mezibuněčná hmota) v centrální nervové soustavě obratlovců. Ta zde vytváří různé struktury, které si pro přehled uvedeme – jde o bazální laminu, intersticiální matrix a pro tuto práci nejdůležitější perineurální síť.

Perineurální síť jsou mřížkovité struktury, které obklopují neurony a jejich synapse. V současné době na sebe přitahují perineurální síť pozornost vědců z různých důvodů – významně ovlivňují synaptickou plasticitu, s čímž souvisí vliv na schopnost učení a paměti. Porozumění jejich funkce může přinést pokrok například v léčbě demence, ale i jiných psychopatologických stavů (více např. Sorg et al., 2016). O tom, jak výrazně mohou perineurální síť ovlivnit chování a učení u jedince, pojednává teoretická část této práce.

Než se však zaměříme na problematiku perineurálních sítí a konkrétních psychických funkcí či psychopatologie, musíme si nejdříve stručně nastínit strukturu a funkci perineurálních sítí v CNS obratlovců.

## 1.0 Extracelulární matrix v těle živočichů

Extracelulární matrix (ECM), v našem rodném jazyce známější jako mezibuněčná hmota (angl. *extracellular matrix*) vyplňuje prostory mezi buňkami ve tkáních živočichů. Mohlo by se z názvu zdát, že jde o „výplňovou strukturu“, ve skutečnosti ale mezibuněčná hmota plní hned několik zásadních rolí ve zdravém fungování organismu.

V rostlinách je mezibuněčná hmota tvořena polysacharidy, u živočichů je tvořena komplexními strukturami tvořenými převážně z proteinů, které však často mívají cukerné složky. Je nutné si uvědomit, že bez ní by mnohobuněčný život nebyl vůbec možný (Engel & Chiquet, 2011).

## 1.0.0 Složení a funkce extracelulární matrix

Extracelulární matrix se skládá z širokého spektra látek, z nichž jsou nejvíce zastoupeny proteiny. V současnosti je jich známo přibližně 300 druhů (Hynes & Naba, 2012). Svým složením ECM definuje fyzikální vlastnosti tkání, a kromě toho představuje zásobárnu látek nezbytných pro jejich růst a vývoj (Yue, 2014). Vyjmenujme si některé z nejdůležitějších proteinů, které v mezibuněčné hmotě najdeme:

- **Kolageny** jsou proteiny skládající se ze tří polypeptidových řetězců. U obratlovců existuje 28 typů kolagenů, a jednotlivé typy se mohou lišit strukturou i významem. Kolagen typu I, II, a III formuje vlákna, kolagen typu IV formuje struktury podobné mřížkám a tvoří tak základ bazální membrány (viz dále) (Yue, 2014). V průměru tvoří právě kolageny zhruba 30% hmotnosti všech proteinů v těle živočichů (Frantz et al., 2010).
- **Proteoglykany** se skládají z proteinových jader, na která jsou kovalentně navázány glykosaminoglykanové (GAG) řetězce. Ty jsou složeny z polysacharidů tvořených opakující se disacharidovou jednotkou. Mezi základní typy GAG řetězců, které najdeme v proteoglykanech, patří hyaluronan (kyselina hyaluronová), chondroitinsulfát, dermatansulfát, keratansulfát a heparansulfát (Bandtlow & Zimmermann, 2000). Jak názvy napovídají, všechny typy vyjma kys. hyaluronové jsou sulfatované – v jejich molekulách je navázán zbytek kyseliny siřičité (Yue, 2014). Jedná se o základní složku perineurálních sítí, a proto se jim budeme v této práci věnovat podrobněji.
- **Lamininy** jsou skupina proteinů tvořící mřížkovité struktury, patří mezi proteiny zpevňující tkáň. Chemicky je řadíme mezi glykoproteiny, tedy proteiny obsahující cukernou složku. Jsou velmi významné v embryonálním vývoji (Durbeej, 2009), a strukturální roli plní také v perineurálních sítích.
- **Fibronektiny** jsou další významné glykoproteiny v ECM. Jeho funkcí je držet buňky ve tkáni při sobě a svou roli plní také při migraci buněk během vývoje organismu (Yue, 2014; Frantz et al., 2010)
- **Elastin** je bílkovina přispívající k elastickým vlastnostem tkání. Najdeme jej tedy všude, kde jsou tkáň napínány a smršťovány, jako například v plicích či vazivu (Kozel et al., 2011).



Funkce extracelulární matrix jsou poměrně různorodé. Samozřejmě, slouží jako výplň mezibuněčného prostoru. Jde však o mnohem více, ECM určuje správné uspořádání buněk a při jejich vzniku funguje jako lešení, vedoucí nové buňky na jejich určené místo. Funguje také jako „zásobárna“ růstových faktorů pro buňky (Yue, 2014). Nezanedbatelnou roli hraje mezibuněčná hmota i v udržování homeostázy (Frantz et al., 2010).

### 1.0.1 Extracelulární matrix v centrální nervové soustavě

Připomeňme si, že složení ECM se s ohledem na typ tkáně může lišit. Funkce, které plní v chrupavkách či ve svalech, je odlišná od funkce, kterou plní v centrálním nervovém systému. Pro úplnost si nyní uvedeme typy ECM v CNS: bazální laminu, intersticiální matrix a perineurální síť.

**Bazální lamina** (BL) je typem mezibuněčné hmoty, který najdeme kromě mozku i v celém těle. Vytváří tenký list hmoty a skládá se z kolagenů, fibronektinů, lamininu a dalších proteinů. Obecně odděluje epitely od pojivových tkání, obklopuje také jednotlivé svalové či tukové buňky, v periferním nervovém systému obklopuje i Schwannovy buňky. Nejde jen o fyzickou bariéru, BL aktivně komunikuje s buňkami a vytváří podmínky zcela zásadní pro jejich přežití (Alberts et al., 2015). V CNS ji najdeme při endotelu v cévách a na povrchu pod pia mater (Lau et al., 2013).

Druhým typem extracelulární matrix v CNS je **intersticiální matrix**. Stručně můžeme říci, že se jedná o typ ECM nezařaditelný k bazální lamině ani k perineurálním sítím (či podobné perinodální ECM). V jejím složení převažují proteoglykany, hyaluronan, tenasciny a link proteiny, najdeme tu však také kolageny, lamininy, glykoproteiny a fibronektin (Lau et al., 2013).

Třetím významným druhem extracelulární matrix v mozku jsou **perineurální síť** (PNS), kterým se budeme podrobněji věnovat v nadcházejících kapitolách. Strukturně podobná perineurálním sítím je i tzv. **perinodální extra-celulární matrix**, která obklopuje téměř všechny Ranvierovy zářezy v CNS savců. Od PNS se liší složením (převažují proteiny brevican, versican a neurocan, zatímco v PNS je to aggrecan; viz dále). V současnosti víme, že mají vliv na rychlost vedení nervového vzruchu a jestliže narušíme jejich strukturu knock-outem HALPN-2 – knock-out prakticky „vystřihne“

gen pro tento link protein, který se tak ve vzniklém organismu neobjeví – vedení se zpomalí (Fawcett et al., 2019a).

## 1.1 Perineurální síť

Perineurální síť (PNS) jsou speciálním případem extracelulární matrix obklopující neurony v centrální nervové soustavě obratlovců. Objeveny byly již roku 1883 (publikováno 1889) italským lékařem Camillem Golgim. On sám je považoval za „neurokeratin“ zpevňující strukturu neuronu a o původu a významu se vedly debaty ukončené vlivným názorem, že jde jen o artefakt koagulace pericelulárních tekutin v CNS. Tak zůstaly perineurální síť prakticky zapomenuty až do druhé poloviny 20. století. Za nárůst zájmu o tuto strukturu, který vidíme na obrázku 1, vděčíme až objevu imunistochemických metod (Celio et al., 1998).

Za čtyřicet let jsme se posunuli od analýzy struktury perineurálních sítí (např. Bandtlow & Zimmermann, 2000) ke zkoumání jejich role v uzavírání kritických period (např. Pizzorusso, 2002) až recentním studiím, věnujícím se jejich přímému vlivu na psychické funkce (např. Koskinen et al., 2020; Romberg et al., 2013). Součástí posledního zmíněného typu studie je právě tato bakalářská práce.

**Obrázek 1:** Z počtu publikovaných článků vidíme nárůst zájmu o perineurální síť.

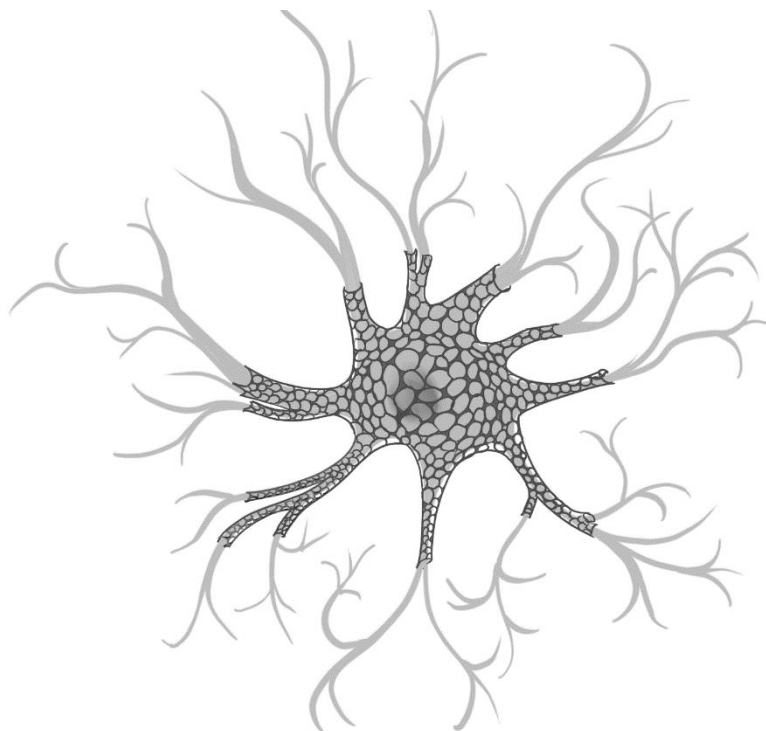


Zdroj dat: PubMed.com

PNS připomínají svou strukturou síťku či mřížku obklopující tělo neuronu a jeho proximální dendrity (Celio et al., 1998; Celio & Blümcke, 1994). Obklopují pouze

vybrané typy neuronů, nejčastěji jde o **parvalbuminové interneurony** – viz obrázek 1 (Favuzzi, 2017; Sullivan, 2018).

**Obrázek 1:** Parvalbuminový interneuron s perineurální sítí – ilustrace.



*Zdroj: vlastní tvorba, vytvořeno v programu ProCreate.*

Parvalbuminové (Pvalb/PV) interneurony (v anglické literatuře uváděny také jako košíčkové buňky = *basket cells/chandelier cells*) jsou interneurony, které najdeme v bazálních gangliích, mozkové kůře, v hippocampu, mozečku a mnoha dalších strukturách (Cowan et al., 1990; Hashemi et al., 2016; Fuchs et al., 2007), Všechny parvalbuminové interneurony jsou GABAergické, ve všech GABAergických interneuronech však Pvalb exprimován není (Cowan et al., 1990).

Parvalbumin má schopnost vázat vápník a jeho přítomnost v neuronu umožňuje velmi rychlé série akčních potenciálů (Caillard et al., 2000). PV interneurony koordinují aktivitu pyramidových buněk a nejčastěji tvoří axo-somatické a axo-axonální synapse, které obklopují celý pyramidový neuron (Freund & Katona, 2007). Z výzkumů vyplývá, že jsou PV interneurony zodpovědné za gamma oscilace viditelné na EEG a jejich inhibicí můžeme oscilace potlačit (Sohal et al., 2009), Při knock-outu parvalbuminu u myší pozorujeme rozdíly v motorice a častější epileptické záchvaty (Caillard et al., 2000), v lidském mozku je úbytek parvalbuminových interneuronů

pozorován u autistických pacientů (Hashemi et al., 2016). Abnormality v synapsích PV interneuronů narušují gama oscilace a kognitivní funkce také u pacientů trpících schizofrenií (Lewis et al., 2012). Tabulka 1 obsahuje místa, kde v mozku můžeme PNS najít.

**Tab. 1:** Typy neuronů pozitivních na PNS a jejich lokace v CNS

Lokace v CNS	Typ neuronu
Kortex	GABAergické inhibiční interneurony, inhibiční pyramidové buňky pozitivní na parvalbumin
Amygdala	inhibiční interneurony pozitivní na parvalbumin a calbindin
Hippokampus	parvalbuminové interneurony a excitační pyramidové neurony
Mozeček	excitační Golgiho neurony, Purkyňovy buňky
Mícha	velké interneurony, motoneurony

*Zdroj: Spijker & Kwok, 2017; Carulli & Verhaagen, 2021.*

V následující kapitole si přiblížíme specifické složení perineurální funkce, jejich vývoj v průběhu života a vliv na plasticitu synapsí, a také jejich význam, který se dále intenzivně zkoumá.

### 1.1.1 Složení perineurálních sítí

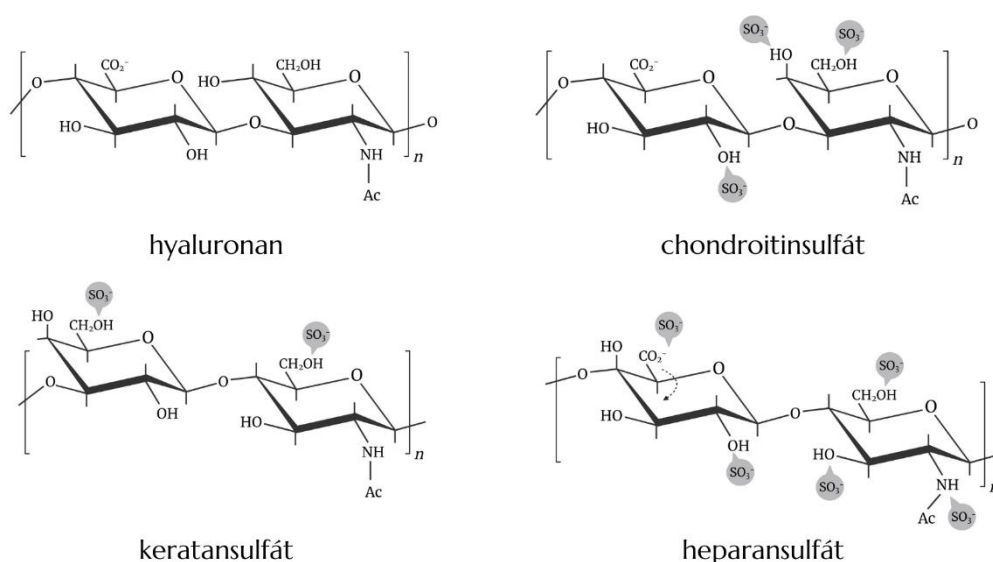
Na rozdíl od jiných typů extracelulární matrix, perineurální sítě obsahují výrazně méně fibronektinů, kolagenů a lamininů (Miner & Sanes, 1994, citováno v Giamanco & Matthews, 2012). O to více zde najdeme proteoglykanů, které tvoří jejich nejdůležitější složku.

**Proteoglykany** řadíme mezi proteiny, a charakteristické jsou navázáním glykosaminoglykanových řetězců na proteinové jádro. Glykosaminoglykany (dále GAG) jsou polysacharidy, které tvoří opakující se disacharidová jednotka, kterých zde najdeme přibližně 20 až 200 (Bandtlow & Zimmermann, 2000). Základem disacharidové jednotky jsou uronové kyseliny a hexosaminy (Pomin & Mulloy, 2018).

Specifické střídání těchto komponent vytváří různé řetězce, pomocí kterých můžeme proteoglykany rozlišovat na chondroitinsulfát, heparansulfát, dermatansulfát a hyaluronan, který na rozdíl od dříve zmíněných GAG není sulfatován (Bandtlow &

Zimmermann, 2000) – tyto základní GAG vidíme na obrázku 3. GAG v proteoglykanech vytváří jejich charakteristický záporný náboj, který ovlivňuje jejich fyziologickou funkci (viz dále).

**Obrázek 3:** Disacharidové jednotky glykosaminoglykanových řetězců



Pozn.: Šedé značky naznačují místa pro sulfataci GAG. Zdroj: vlastní tvorba, vytvořeno v softwaru BioRender.

Jednotlivé proteoglykany rozlišujeme právě podle typu navázaných GAG. Mezi nejvýznamnější z nich patří chondroitinsulfátové proteoglykany (CSPG), které jsou předmětem mnoha současných studií, vzhledem k tomu, že změny v jejich sulfataci mohou výrazně ovlivnit plasticitu synapsí (Sorg et al., 2016). CSPG jsou tak předmětem naší studie.

Nejvíce zastoupené proteoglykany v PNS jsou tzv. lecticany (angl. *lectican family*) (Milev et al., 1998). Mezi ně řadíme následující čtyři CSPG:

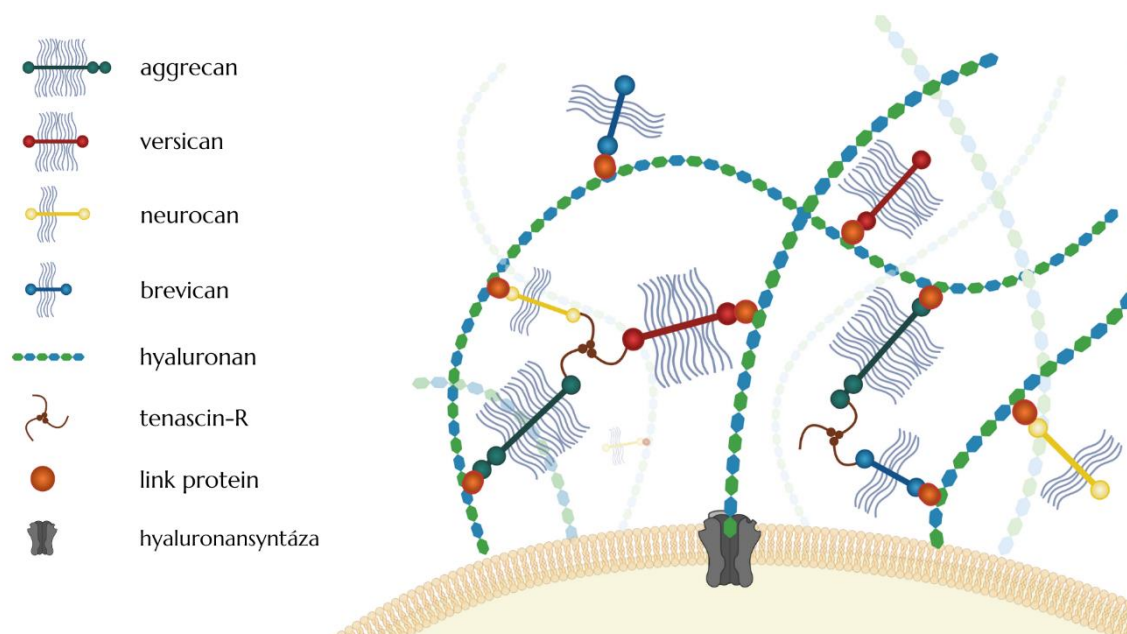
- **Aggrecan** je jedním z hlavních CSPG a pro správnou formaci PNS je nezbytný. In vitro výzkum ukázal, že bez aggrecanu se síť sice zformuje, její struktura je však deformovaná (Giamanco et al., 2010). Najdeme jej prakticky ve všech perineurálních sítích. Není specifický pro centrální nervový systém a jeho integrace do PNS je spojená s koncem kritické periody pro synaptickou plasticitu (viz dále) (Galtrey et al., 2008).

- **Brevican** (BCAN) najdeme pouze v centrální nervové soustavě. Ovlivňuje množství a zrání excitačních synapsí a spekuluje se, že by mohl přímo ovlivňovat hustotu a množství napětím řízených iontových kanálů neuronů. (Favuzzi et al., 2017).
- **Neurocan** (NCAN) je také specifický pro CNS a má vliv na správnou formaci PNS a na zrání inhibičních synapsí (Schmidt et al., 2020), a ovlivňuje také jejich hustotu a množství (Sullivan et al., 2018).
- **Versican** (VCAN) a jeho role dosud nebyly zcela objasněny. Yamagata a Sanes (2005) uvádí, že hraje roli v transformaci presynaptických útvarů. Na rozdíl od výše zmíněných lecticanů jej najdeme zejména na velkých neuronech pyramidové neurony a Purkyňovy buňky v mozečku (Horii-Hayashi et al., 2008).

Mezi další proteiny, které již neřadíme do rodiny lecticanů, najdeme například následující:

- **Phosphocan** (RPTP $\zeta$ ) propojuje perineurální síť s povrchem neuronů a přispívá k formaci její mřížkovité struktury a určuje způsob, jakým PNS neuron obklopí (Eill et al., 2020).
- **Hyaluronan** tvoří jakousi „páteř“ celé perineurální sítě, kde se váže na tenasciny a GAG proteoglykanů. Vytvářejí jej buňky pomocí membránového enzymu hyaluronan syntetázy (Kwok et al., 2010; Galtrey et al., 2008).
- **Tenasciny** patří mezi glykoproteiny a mezi jejich funkce patří stabilizace PNS. Rozlišujeme dva typy, které se vyskytují v PNS – tenascin-C (TN-C) a tenascin-R (TN-R). Během vývoje živočicha převažuje TN-C, v dospělosti pak TN-R, knock-out TN-C způsobí sníženou synaptickou plasticitu (Evers et al., 2002). Deficience v tenascin-R může narušit strukturu PNS a způsobuje její úbytek (Morawski et al., 2014).
- **Link proteiny (HALPN-1 a HALPN-4)** připívají k vazbě proteoglykanů na hyaluronanovou páteř (Fawcett et al, 2019a; Galtrey et al., 2008). Stačí odstranit pouze jeden z nich a dojde k oslabení PNS a zvýšení neuroplasticity (Fawcett et al., 2019a).

**Obrázek 4:** Schéma struktury perineurálních sítí



**Pozn.:** Můžeme si všimnout, že molekula aggrecanu obsahuje nejvíce chondroitin sulfátu, jehož sulfatační mechanismy výrazně ovlivňují funkce CNS. Trimerní tenascin-R CSPG propojuje navzájem a činí tak PNS rigidnější. Vytvořeno v softwaru BioRender.

### 1.1.2 Vývoj PNS a jejich sulfatační epitopy

Nyní se dostáváme k zásadní části této kapitoly – ukážeme si, jak se v průběhu věku mění perineurální síť. Abychom se v těchto změnách orientovali, nejdříve se zaměříme na jeden důležitý proces: sulfataci. Z minulé podkapitoly víme, že chondroitin-sulfátové řetězce jsou *sulfatované*. V perineurálních sítích mohou mít CSPG několik tzv. sulfatačních epitopů, tedy míst, kde se může na GAG řetězec navázat sulfátová skupina  $\text{SO}_3^-$ . Sulfataci GAG v perineurálních sítích realizují enzymy chondroitin 6-sulfatotransferasa-1 (C6ST-1) a chondroitin 4-sulfatotransferasa-1 (C4ST-1). C6ST-1 zodpovídá za 6-sulfataci, C4ST-1 4-sulfataci. Tyto pro čtenáře možná nepřehledné zkratky obsahují cennou informaci – kde přesně na disacharidové jednotce chondroitin-sulfátu je sulfátová skupina navázaná, viz obrázek 3, kde jsou tato vazebná místa naznačena (Mikami & Kitagawa, 2013).

Kromě těchto sulfatačních epitopů je možná i disulfatace – navázání sulfátové skupiny na dvě vhodná vazebná místa v GAG. Po chondroitin sulfát jsou to pozice 2, 6 nebo 4 a 6. 4,6-disulfatace působí inhibičně na růst axonů, vytváří však vazebné místo pro růstové faktory neuronů (Fawcett et al., 2019a).

6-sulfatace CSPG převažuje v prenatálním období života, kdy v CNS najdeme juvenilní matrix složenou z neurocanu, phosphacanu, versicanu, tenascin-C a link proteinů (Milev et al., 1998). Krátce po narození se 6-sulfatace vyskytuje u 18% CS řetězců proteoglykanů a 4-sulfatace u 60% z nich. Po uzavření kritických period pro učení (viz dále) se tvoří C6S pouze 2,5% GAG řetězců v PNS, zatímco C4S 91% (Carulli et al., 2010; citováno v Fawcett et al., 2019a).

Zdánlivě malá změna v sulfataci má dalekosáhlé důsledky. Oproti C6S chondroitin-4-sulfát tvorbu nových synapsí inhibuje, omezuje regeneraci neuronů a v dospělosti v PNS převažuje (Wang et al., 2008). Z nejnovějších výzkumů vyplývá, že právě tento posun je jedním z důvodů snížené schopnosti učení a paměti v pozdním věku. U transgenních myší se zvýšenou expresí C6ST-1 zůstala juvenilní neuroplasticita zachována. Ačkoliv obecně CSPG blokují vznikání nových synapsí, chondroitin-6-sulfát přispívá k větší propustnosti PNS (Miyata et al., 2012).

Cenným nástrojem ve výzkumu sulfatačních epitopů perineurálních sítí se staly knock-out experimenty, pomocí kterých můžeme jeden gen „vypnout“. Při knock-outu C4ST-1 úspěšně potlačíme projevy stáří a snížené plasticity myšního mozku (J. Růžička, osobní sdělení, 22. 2. 2022), knock-out C6ST-1 pak vede k prakticky opačným výsledkům (Yang et al., 2021).

### 1.1.3 Co víme o funkci perineurálních sítí

Než se přesuneme k další kapitole, shrneme si stručně vše, co o roli perineurálních sítí dosud víme.

V přechozích kapitolách jsme se věnovali vlivu perineurálních sítí na **stabilitu a plasticitu synapsí**. Starší i recentní studie potvrzují, že proteoglykanová síť okolo neuronů u dospělých jedinců stabilizuje stávající synapse a současně brání vzniku nových synapsí (Hensh, 2005; Pizzorusso, 2002). Výslednou plasticitu synapsí určuje mimo jiné převládající sulfatační epitop chondroitin-sulfátových řetězců v CSPG (Fawcett et al., 2019a; Sorg et al., 2016).

Narušením PNS vlivem enzymů či knock-outu můžeme synaptickou plasticitu zvýšit. Jestliže se podíváme na tímto způsobem nově vzniklé synapse, můžeme pozorovat pokles v excitačních a inhibičních postsynaptických proudech, narušující



fyziologii synapse, což dokazuje důležitost perineurálních sítí pro jejich stabilizaci (Spijker & Kwok, 2017).

**Perineurální síť řídí uzavírání kritických period.** Mnoho různých studií dokázalo existenci tzv. kritických period pro učení; jmenovitě například Hubel a Wiesel (1970) zakryli jedno oko koťatům a dospělým kočkám – u koťat na základě tohoto omezení došlo ke změně struktury kortexu, mozek dospělého jedince nebyl ani zdaleka tak ovlivněn, což dokazuje existenci období zvýšené plasticity, nazývané kritická perioda. Hensch (2005) a Pizzuroso a jeho tým (2002) potvrdili že formace perineurálních sítí tuto kritickou periodu ukončí.

Ukázalo se, že proteoglykany z PNS (konkrétně CSPG) ovlivňují nejen uzavření kritické periody, ale také jeho spuštění, související s modulací činnosti PV interneuronů, které obklopují (Hou et al., 2017). Ke konci kritické periody je do PNS integrován aggregan a jejich hustota narůstá, čímž je kritická perioda uzavřena (Hou et al., 2017; Galtrey et al., 2008).

Další studie ukázaly, že **PNS omezují mobilitu proteinů navázaných na neuronální membránu.** Membránové receptory v buňce nemají stálou pozici. Můžou se přesouvat po buněčné membráně a pohybovat se tak například do synaptické štěrbině či ven z ní. Tak může neuron měnit počet aktivních receptorů v synapsi. Tomuto přesunu však brání perineurální síť (Frischknecht et al., 2009). Jedná se o jeden ze známých mechanismů, kterým perineurální síť ovlivňuje plasticitu synapsí.

Další z potvrzených funkcí PNS je **koncentrace růstových faktorů okolo neuronů.** Růstové faktory se vážou na GAG řetězce CSPG, mezi známé patří NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT3 (neurotrophin3), midkin, pleiotrofin a další (Fawcett et al., 2019a; Celio & Blümcke, 1994). Zůstává zde však hodně prostoru pro další výzkum.

Kromě vázání růstových faktorů je známo, že perineurální síť, vlivem záporného náboje CSPG, mohou zachytávat kationty a ovlivnit tak fyziologii neuronů vytvářením specifického gradientu, který umožňuje těmto neuronům rychlé série akčních potenciálů (Morawski et al., 2015).

**PNS chrání nervové buňky před oxidačním stresem** – vzniku volných kyslíkových radikálů jako vedlejšího produktu metabolismu, které mohou poškozovat buňky. Parvalbuminové interneurony, obklopené PNS, jsou metabolicky velmi náročné, vzhledem k vysoké frekvenci jejich akčních potenciálů. Proto zde vzniká

riziko zvýšeného oxidačního stresu, proti kterému si vyvinuly účinnou obranu. Jedním z těchto obranných prostředků PV interneuronů jsou právě perineurální sítě (Cabungcal et al., 2013). Záporný náboj komponentů PNS dokáže zachytit potenciálně škodlivé molekuly, jako například atomy železa, které přispívají ke tvorbě potenciálně nebezpečných vodíkových radikálů. Jestliže perineurální sítě zredukujeme, neurony již nejsou před oxidačním stresem chráněny (Suttkus, 2014, citováno v Spijker & Kwok, 2017).

**Perineurální sítě se podílí i na prevenci cytotoxicity**, kterou si můžeme demonstrovat na příkladu Alzheimerovy choroby, neurodegenerace způsobené neurotoxickým  $\beta$ -amyloidem. Několik studií potvrdilo, že právě CSPG v perineurálních sítích chrání neurony oblastech bohatých na PNS před vlivem  $\beta$ -amyloidu (Miyata et al., 2007; Brückner et al., 1999).

Může pomoci odstranění perineurálních sítí? Reichelt (2020) však uvádí, že mikroglie přítomné v CNS likvidují degenerované neurony a dochází také k degradaci perineurálních sítí, což může znamenat ztrátu přirozené ochrany neuronů, ale také návrat synaptické plasticity! Injekcí chABC do hippocampu myší, které sloužily jako geneticky upravené modely Alzheimerovy choroby, se výzkumníkům skutečně podařilo zvrátit ztrátu paměti v rané fázi nemoci (Végh et al., 2014).

## 2 PSYCHIKA JEDINCE V KONTEXTU PERINEURÁLNÍCH SÍTÍ

Proč se v současnosti věnujeme struktuře, nad kterou v devatenáctém století mávl jeden ze zakladatelů neurověd Ramón y Cajal rukou jako nad nevýznamnou (Celio et al., 1988)? Jak vidíme, i vědec takového formátu se někdy může mýlit, a jak jsme si v minulé kapitole ukázali, perineurální sítě hrají v CNS obratlovců poměrně důležitou roli. V minulé kapitole jsme si ukázali, jak tyto komplexní struktury vypadají a co zatím víme o jejich funkci. V psychologii však zkoumáme konkrétní psychické funkce, s jejichž biologickými základy je potřeba se obeznámit. I zde hrají perineurální sítě svou roli, které se věnují zejména recentní studii.

V průběhu let se zaměření studií PNS měnilo. Nejprve nás zajímaly základní mechanismy, jak perineurální sítě obecně ovlivňují neurony (více např. Pizzorusso et al., 2002; Galtrey et al., 2008). Další studie zdůrazňují vliv perineurálních sítí na plasticitu synapsí, což ovlivňuje schopnosti paměti a učení (např. Romberg et al., 2013). V současnosti se studie zaměřují také rolí perineurálních sítí v psychopatologii.

Abychom mohli sledovat vliv PNS, potřebujeme modelový organismus, kterým z etických důvodů nemůže být člověk. Proto se většina zmíněných studií provádí na myším a potkaním modelu. Využíváme tedy takové metody, které nám bezpečně umožní sledovat projevy jednotlivých psychických funkcí i u hlodavců.

### 2.1 Sociabilita a sociální rekognice

**Sociabilita** neboli společenskost souvisí se vztahem jedince k ostatním jedincům stejného druhu. Pozorujeme ji u mnohých živočišných druhů včetně lidí a tuto potřebu máme relativně dobře zmapovanou. Zajímavé je, že v sociálních situacích často dojde k „emoční nákaze“, tedy kdy rozpoložení jednoho člena skupiny dokáže ovlivnit i prožívání ostatních – jestliže dáme potkana k vystresovanému potkanovi, bude po chvíli také vykazovat známky stresu (Levy & Yizhar, 2018).

Jedním z důležitých aspektů společenského chování je schopnost **sociální rekognice** (angl. *social recognition memory*), která nám umožňuje rozpoznávat známé a neznámé tváře. I tento aspekt společenského chování můžeme pozorovat a měřit

u zvířat. Z provedených studií víme, že se na utváření paměťových stop pro sociální rekognici podílí hippocampus, amygdala, anteriorní cingulární kortex a mediální prefrontální kortex. Zatímco hippocampus vytváří paměťové stopy, anteriorní cingulární kortex a amygdala koordinují aktivitu mozku v sociálních situacích (Tanimizu et al., 2017).

Všechny vyjmenované struktury obsahují velké množství parvalbuminových interneuronů obklopených perineurálními sítěmi. Kromě nich můžeme PNS najít také například na hipokampálních excitačních pyramidových neuronech – konkrétně jde o oblast CA2 v hippocampu, která je na PNS obzvláště bohatá (Cope et al., 2021). Najdeme je však také na jiném typu inhibičních interneuronů exprimujících protein calbindin, který je podobně jako parvalbumin schopen vázat vápník (Carstens et al., 2016; McDonald et al., 2018).

V případě abnormální hustoty perineurálních sítí v hippocampu v některých myších modelech pozorujeme v testech sociální paměti podstatné snížení výkonu. Po natrávení PNS chondroitinázou ABC dojde k jejich redukci, sociální paměť se výrazně zlepší (Cope et al., 2021).

### **Jak zkoumáme sociabilitu?**

Seznámení s novým jedincem v případě myši (ale i jiných savců, vzpomeňme si na psy v parku) probíhá pomocí očichávání. Pomocí čichu myš dokáže nejen rozpoznat jiné myši, ale dokáže například určit, zda se jedná o dobrého potenciálního partnera, nebo naopak potenciálního nepřítele (Choleris et al., 2009; Brennan & Keverne, 1997). Pokud se myš setká s jinou myší poprvé, očichají se a projevují zvýšený zájem, při dalším setkání však zájem částečně opadne (Winslow, 2003) – poznáme tak, že si myš tohoto jedince již zapamatovala.

Jedním z často používaných behaviorálních testů je **habituační-dehabituační** test. Testovanému hlodavci představíme jiného hlodavce a počkáme, až se seznámí. Po opakované prezentaci zájem o tohoto jedince opadá. Jestliže prezentujeme nového, dosud neznámého jedince, testovaný hlodavec znovu projeví zájem. Problémem testu je, že trvá déle, a během této doby může testovaná myš o úkol ztratit zájem a dojde tak ke zkreslení dat (Choleris et al., 2009).

Citlivějším se tak jeví test sociální diskriminace, kdy testovanému zvířeti představíme nového a již známého hlodavce zároveň (Choleris et al., 2009). Při testu nejprve zvíře vystavíme kontaktu s jiným jedincem (dbáme na to, aby nešlo o jedince ze stejné klece) a dáme mu prostor se s druhým jedincem seznámit a očichat si jej. Po uplynutí určené doby přidáme do prostoru další, novou myš, která by měla vzbudit u testované myši větší zájem, a tudíž by interakce s ní měly být za normálních okolností častější. V případě, že se doba strávená zkoumáním starého a nového podnětu nelišila, svědčí tyto výsledky o snížené sociální paměti (Winslow, 2003)

## 2.2 Paměť a PNS

**Paměť** je schopnost uchování informací a dovedností získaných učením. Z psychologie víme, že ji dělíme na **krátkodobou** a **dlouhodobou**, která se dělí na deklarativní a nedeklarativní. Deklarativní paměť zahrnuje sémantickou (znalosti) a epizodickou (životní události). Nedeklarativní pak zahrnuje naučené dovednosti (Bear et al., 2015). Pro účely této práce musíme toto dělení odsunout stranou, jelikož v současnosti můžeme vliv změn v PNS zkoumat pouze na zvířecím modelu či velmi omezeně v *post mortem* studiích.

Je již všeobecně známo, že paměť úzce souvisí se silou a plasticitou synapsí. Jestliže se aktivně učíme nové věci, synapse vznikají a můžeme je posilovat. Pokud danou schopnost neprocvičujeme, spojení mezi neurony zanikají a může se stát, že zapomeneme. Není tedy divu, že ovlivněním PNS můžeme výrazně změnit paměťové schopnosti jedince k lepšímu, ale také k horšímu (Yang et al., 2021).

### 2.2.1 Deklarativní paměť a rozpoznání nového objektu

Test spontánního rozpoznání nového objektu (angl. *spontaneous novel object recognition*, zkr. SNOR) je jedním z dílčích testů v našem experimentu (přesněji si jeho průběh ukážeme v kapitole věnující se metodám). Pokud se podíváme na objekt a uvědomíme si, že ho známe, hovoříme o **rekognici** (česky bychom mohli říci rozpoznání) – vzpomněli jsme si, že jsme tu věc alespoň jednou viděli (Brown & Aggleton, 2001). SNOR řadíme k deklarativní paměti (Romberg et al., 2013).

Mozkové struktury spojené s SNOR zahrnují hippokampus, z korových oblastí pak perirhinální, parahippokampální, entorhinální a insulární kortex (Balderas et al.,

2015). Všechny mechanismy konsolidace tohoto typu paměti nám zatím nejsou známy, dosud provedené studie ale zdůrazňují význam perirhinálního kortexu (Balderas et al., 2015) a hippocampu (Brown & Aggleton, 2001).

**Perirhinální (Prh) kortex** je jednou z asociačních oblastí spánkového laloku a přijímá podněty ze všech smyslových orgánů. Při prezentaci objektu, který je modelovému organismu již znám, zde pozorujeme sníženou aktivitu neuronů (Brown & Aggleton, 2001). Výzkumy naznačují, že jeho role v SNOR spočívá v rozpoznávání tvaru a vzoru objektů a pomáhá určit novost objektu; léze v této oblasti tuto schopnost značně limitují (Miranda & Bekinschtein, 2018, Kim et al., 2014). Zajímavé je, že léze pouze v Prh kortexu u potkanů způsobily, že bylo zvíře schopné poznat novost objektu, když byl prezentován samostatně. Při prezentaci nového a známého objektu současně však nebylo schopné určit, který z nich byl nový (Olarite-Sánchez et al., 2015).

Pro potvrzení důležitosti Prh nemusíme nutně chodit pro zvířecí modely – snížený výkon v testu rozpoznání nového objektu vykazovala i pacientka po operaci s následkem odstranění části spánkového laloku zahrnujícího perirhinální kortex (Bowles et al., 2007).

Role **hippokampu** (konkrátně jeho oblasti CA1) v SNOR zahrnuje rozpoznání umístění objektu v prostoru a konsolidace paměti (Brown & Aggleton, 2001, Cinalli Jr. et al., 2020), aktivitu pozorujeme i při setkání s neznámým prostředím (Kim et al., 2014) Další studie ukázaly, že se hippocampus aktivuje při dlouhodobějším prozkoumávání nového objektu, když myš dostane na prozkoumání méně času, aktivuje se pouze perirhinální kortex (Cinalli Jr. et al., 2020).

Jak je to s rozpoznáním nových objektů a perineurálními sítěmi? Připomeňme si výzkum Pizzurossa a kolektivu z roku 2002, kdy pomocí injekce chondroitinázy ABC (chABC) do zrakové oblasti došlo k natrávení GAG v perineurálních sítích a byla tak obnovena plasticita příznačná pro kritické období. Totéž můžeme pozorovat i v případě dlouhodobé paměti. Po aplikaci chABC ukázal test SNOR (více o tomto testu níže) výrazné zlepšení paměti, kdy byly myši s narušenými perineurálními sítěmi schopny rozpoznat nový objekt po podstatně delší době než kontrolní skupina (Romberg et al., 2013).

## 2.2.2 Prostorová paměť

Prostorová paměť je nezbytná pro správnou orientaci v prostoru (u hlodavců se jedná o nejčastěji zkoumaný typ paměti). Zapojené struktury v mozku zahrnují (opět) hippocampus, mediální entorhinální a mediální prefrontální kortex (Khoo et al., 2019; Poitreau et al., 2021).

**Hippokampus**, jak už víme, patří mezi struktury bohaté na parvalbuminové interneurony obklopené perineurálními sítěmi a při změnách v jejich struktuře můžeme výrazně ovlivnit i orientaci v prostoru (př. Morrisovo vodní bludiště, viz kapitola 4.1.1). Jestliže například odstraníme HYBID (protein sloužící k depolymeraci hyaluronanu) na myším modelu pomocí knock-outu, dojde k nahromadění hyaluronanu v oblasti hippocampu a zesílení PNS, pozorujeme zhoršení výkonu v úkolech orientovaných na prostorovou představitost. Odstranění PNS v oblasti hippocampu má za následek zvýšenou neuroplasticitu, projevuje se lepším výkonem v testech prostorové orientace (J. Růžička, osobní sdělení, 3. 3. 2022). Je to ale tak jednoznačné?

Odpověď najdeme v **mediálním entorhinálním kortexu**, který je propojen s hippocampem. Zaměříme se na skupinu buněk nazývaných anglicky *grid cells* (česky můžeme přeložit jako „mřížkové buňky“). Jedná se o typ neuronů podílející se na tvorbě kognitivních map u potkanů. Ke svému názvu přišly díky unikátní vlastnosti. Jestliže snímáme aktivitu těchto neuronů, zatímco se potkan pohybuje po otevřeném prostoru, zjistíme, že série akčních potenciálů je pravidelná. Jestliže pak výstupy spojíme a vyznačíme místa spojená s akčním potenciálem v prostoru, pozorujeme jakousi mřížku (Fyhn et al., 2008).

Fyhnová a kolektiv (2008) ve studii prokázali existenci tohoto typu neuronů také u myši, což nás vede k přesvědčení o výskytu *grid cells* u všech druhů savců. Můžeme i tyto buňky ovlivnit změnami ve struktuře perineurálních sítí? Z recentních studií již víme, že ano – velkou část inhibičních neuronů v mediálním entorhinálním kortexu tvoří parvalbuminové interneurony, obklopené PNS. Jejich narušení (například pomocí chABC) vede k destabilizaci sítě *grid cells* u pokusných zvířat, vedoucí ke změně kódování lokace v hippocampu a narušení reprezentace nového prostředí (Christensen et al., 2021).

## **Paměťové testy u hlodavců**

Abychom mohli zkoumat různé typy paměti u hlodavců, musíme nejdříve zjistit, jakým způsobem se odrážejí v chování zvířete. V průběhu let vědci vyvinuli značné množství behaviorálních metod, poměrně spolehlivě korespondujících s jednotlivými zkoumanými projevy.

O **deklarativní paměti** myši a potkanů si můžeme udělat představu právě pomocí **testů spontánního rozeznání nového předmětu (SNOR)**. Jde o behaviorální test, který opět využívá vrozené zvědavosti drobných hlodavců. Vychází ze skutečnosti, že pokud myši představíme dva objekty, z nichž jeden z nich již zná a druhý vidí poprvé, bude věnovat více pozornosti tomu, který je pro ni nový (Lueptow, 2017).

Test je opět velmi snadný a nevyžaduje žádný trénink. Hlodavci představíme předmět. Poté počkáme a po uplynutí určeného časového úseku tento předmět prezentujeme znovu, spolu s novým, dosud neznámým. Jestliže si myš již známý předmět stále pamatuje, bude preferovat nový. Tak zjistíme, jak dlouho si hlodavec dokáže uchovat informací v paměti.

Jedním z nejčastěji využívaných behaviorálních testů je Morrisovo vodní bludiště (anglicky Morris water maze, zkratkou MWM). Jednou z hlavních výhod metody je její univerzálnost, můžeme ji s úspěchem využít pro výzkum změn vyvolaných geneticky (jako v případě naší studie), ale také například účinkem drog či vznikem léze v centrální nervové soustavě; bez ohledu na povahu experimentálního zásahu nám pomáhá MWM s dostatečnou přesností měřit schopnosti učení a prostorové paměti hlodavců (Vorhees & Williams, 2006).

Jméno nese na počest svého autora, Richarda Morrise, který ji vytvořil v osmdesátých letech (Vorhees & Williams, 2006), Morris tehdy studoval prostorovou paměť a tuto metodu vyvinul speciálně pro tento účel. Je velmi jednoduchá a univerzální – nejde o bludiště v pravém slova smyslu, jde o kruhovou nádrž naplněnou obarvenou vodou, pod jejíž hladinou se skrývá malý ostrůvek, který je jedinou únikovou cestou z bludiště. Hlodavec (myš či potkan) je vypuštěn do nádrže, kde je jeho cílem najít ukrytou platformu. Jakmile jí dosáhne, výzkumník jej vytáhne ven (Morris, 1983). To je v zájmu hlodavců, jelikož pro ně pobyt ve vodě nebývá příjemný, a odebrání z nádrže tak slouží jako příhodný způsob odměny.



Vzhledem k tomu, že je ostrůvek skrytý pod hladinou neprůhledné kapaliny, zpočátku na něj zvíře narazí náhodou. Poté má dvě možnosti, může nadále hledat únikovou cestu metodou pokus-omyl, anebo se pokusit lokaci skrytého ostrůvku zapamatovat, což myši i potkani obvykle velice rychle zvládají (Morris, 1983).

## 2.3 Psychopatologie a perineurální síť

Ne vždy máme to štěstí, že vše funguje, jak by mělo – psychika není výjimkou. Statistiky nám přináší smutnou pravdu o nárůstu výskytu duševních chorob, není proto divu, že se jimi zabývají různé studie z oblasti psychiatrie, psychologie a neurověd.

Perineurální síť se až v posledních třech dekáдах dočkaly pozornosti a díky tomu víme, že mnohé psychopatologické stavy zahrnují jejich narušení. V současnosti stále nemůžeme říci, zda jsou tyto změny jednou z příčin onemocnění či jeho následkem, na což nám může odpovědět jen další výzkum

### 2.3.0 Anxieta, strach a PTSD

Zařazení anxiety neboli úzkosti do této kapitoly může být ošemetné – do jisté míry se jedná o normální emoci, která by měla patřit k našim životům. Jestliže je však jedinec sužován úzkostí bez ustání, pak mluvíme o psychopatologii. Anxieta představuje stav napětí, který je charakteristický fyziologickými změnami – jako je zrychlený tep či vyšší krevní tlak – a behaviorálními změnami, které jsou typické snahou se potenciálnímu zdroji úzkosti vyhnout (Belzung & Griebel, 2001)

Jaký je rozdíl mezi anxietou a strachem? Strach je reakcí na konkrétní podnět, který jej vyvolal, a při jeho vyvolání aktivujeme zejména oblast amygdaly. Oproti tomu s anxietou, tedy stresovou reakcí bez konkrétního podnětu, souvisí “prodloužená amygdala”, neboli **BNST** (angl. bed nucleus of stria terminalis), které má na starost monitorování potenciálních hrozeb a udržování organismu ve střehu, a tudíž stavy úzkosti trvají podstatně déle než bezprostřední strach (Davis et al., 2010). BNST sice perineurální síť skutečně obsahuje, nemáme však zatím k dispozici žádná data o jejich vlivu na funkci této struktury (Ciccarelli et al., 2021).

Při předčasném oddělení malých myší od matky můžeme pozorovat významný nárůst úzkostnosti (Murthy et al., 2019). Úzkostnost u hlodavců je spojena také s aktivitou **ventrálního hippokampu**. Léze v této oblasti způsobily úbytek úzkostnosti, naopak aktivace vedla k opačnému účinku. Výše zmínění autoři zjistili

snížení hustoty parvalbuminových interneuronů a exprese parvalbuminu obecně v této oblasti; ostatní struktury hippocampu nevykazovaly změny. Další změny se týkaly právě perineurálních sítí, které v případě předčasně odstavených myší byly v okolí parvalbuminových interneuronů zesílené, což může vést ke zvýšené aktivitě interneuronů vedoucí k hyperaktivitě a úzkostnosti u myší (Murthy et al., 2019).

Máme tedy představu o změně v PNS způsobené indukovanou úzkostí. Nemůžeme však opomenout úzkostnost jako vrozenou vlastnost jedince – existuje nějaký rozdíl v PNS mezi „odvážnou“ a úzkostnou myší? Recentní studie ukázala souvislost mezi hustotou parvalbuminových interneuronů s PNS a úzkostnými projevy měřenými v behaviorálním testu; u úzkostnějších myší byla tato hustota nižší (Lee & Lee, 2021).

Nakonec se přece jen vrátíme k **amygdale**. Tato struktura mimo jiné zpracovává vzpomínky spojené se strachem. V laboratorních podmínkách můžeme pomocí podmiňování vytvořit zvířecí model **posttraumatické stresové poruchy** (PTSD). Vytvoříme-li u potkanů takovou vzpomínku, výzkumy potvrzují, že přetrvá u dospělých jedinců celý život (Dale et al., 2004, citováno v Gogolla et al., 2009). Provedeme-li stejný experiment s velmi mladými potkany, zjistíme, že se tyto vzpomínky mohou vytratit (Gogolla et al., 2009).

Zlom nastává v momentě, kdy se v bazolaterální amygdale zformují perineurální sítě aktivně chránící nepříjemnou vzpomínku před vymazáním. V případě narušení PNS v této oblasti je možné tyto vzpomínky vymazat (Gogolla et al., 2009).

### **2.3.1 Chronický stres a deprese**

Dlouhodobý stres je jedním z největších prekurzorů vzniku depresivní poruchy (mezi další patří například dědičná zátěž). Ta v současnosti představuje velmi častou chorobu, se kterou se pacient potýká po celý život. Typickými projevy jsou anhedonie, smutek, mikromanické bludy, poruchy spánku a nechutenství. Odhaduje se, že v současnosti postihuje až 1 z 8 Evropanů, a incidence u žen je o něco častější (Malhi and Mann, 2018, citováno v Spijker et al., 2020).

Proti stresu nás chrání různé copingové strategie. Pokud selžou, dochází ke kaskádě změn narušující fungování mozku, projevující se narušením jeho homeostázy

a s tím vyplývajícím onemocněním (Spijker et al., 2020). Tyto změny můžeme pozorovat také u perineurálních sítí.

Jednou ze zasažených struktur je **dorsální hippokampus** (oblast CA1). V potkaním modelu vytvořeném pomocí sociální deprivace můžeme pozorovat úbytek kognitivních dovedností těchto zvířat. Když se podíváme na jejich perineurální síť okolo parvalbuminových interneuronů, pozorujeme nárůst jejich hustoty, což vede, jak již víme, k omezení synaptické plasticity. Natrávením PNS chondroitinázou ABC můžeme vzniklý paměťový deficit odstranit (Riga et al., 2017).

Tým Koskinenové (2020) použil pro výzkum vlivu deprese na PNS stejný model, zaměřil se však detailněji na sledování těchto změn v čase. Zjistili tak, že v prvních týdnech výzkumu, tedy vlivem akutního stresu, došlo ke snížení hustoty perineurálních sítí v oblasti CA1 hippokampu. Postupně se hustota ECM vrací do normálu, zhruba po dvou měsících se však dostane nad normu v souladu s Rigovou studií (Koskinen et al., 2020).

### 2.3.2 Schizofrenie a perineurální síť

Schizofrenie patří k nejzávažnějším duševním chorobám, které mohou člověka postihnout. Mezi nejznámější projevy patří bludy a halucinace, které nazýváme *pozitivními* příznaky (Bitanirwe & Woo, 2014). Jako *negativní* příznaky označujeme emoční oploštělost, hypoaktivitu a ve vzácných případech až katatonii. Další příznaky zahrnují zejména kognitivní deficit a změny v sociálním chování. Boj se schizofrenií je náročný a obvykle poznamenává celý život pacienta. Onemocnění provází i velká stigmatizace vlivem médií, která schizofreniky nezobrazují v nejlepším světle.

První projevy se obvykle objeví v adolescentním období či v období rané dospělosti, což je shodou okolností také doba, kdy mozek získává svou „hotovou“, dospělou podobu – tedy uzavření kritických období (Bitanirwe & Woo, 2014). Jde pouze o náhodu?

Schizofrenie narušuje gama oscilace, které jsou spojeny s kognitivními funkcemi. Připomeňme si, že za ně zodpovídají právě GABAergické parvalbuminové interneurony. Jejich synapse s pyramidovými eferentními neurony jsou však u schizofreniků narušeny, což mimo jiné vede ke kognitivnímu deficitu (Lewis et al.,

2012). A jak už z dřívějších kapitol víme, PV interneurony bývají často obklopeny perineurálními sítěmi.

Změna v expresi perineurálních sítí se skutečně při *postmortem* studii u pacientů trpících schizofrenií objevila v mnoha mozkových strukturách, což dokazuje, že narušení PNS je v případě schizofreniků pervazivní – při srovnání s kontrolní skupinou (mozky bipolárních pacientů) bylo patrné, že jde o změnu specifickou pro schizofrenii (Mauney et al., 2013).

Na tyto alterace se můžeme podívat ještě blíže. Původní dohady o možném úbytku PV interneuronů v mozku pacientů se ukázaly jako mylné, jelikož se jejich hustota významně neliší od hustoty v mozku kontrolní skupiny. Zdánlivý úbytek souvisí s nižší hladinou parvalbuminu v buňkách (Enwright et al., 2016). Mauney (2013) na základě *postmortem* imunohistochemické studie zdůraznil úbytek hustoty PNS v mozku schizofreniků, Enwrightova (2016) studie však potvrdila, že jde o pouze zdánlivou změnu hustoty pozorovatelnou při imunohistochemickém barvení. Ani hustota PNS se tedy při vypuknutí schizofrenie nemění.

Co se však mění, je viditelnost parvalbuminu a PNS na snímcích, která je snížena. Přispívala tak k nekonzistentním výsledkům předchozích studií. Vyplývá z ní, podobně jako u parvalbuminu, snížení exprese komponent perineurálních sítí, což vede ke změnám v jejich funkci – nemohou dosáhnout tak rychlých sérií akčních potenciálů. Dysfunkce parvalbuminových neuronů, ovlivněná změnou v PNS, skutečně patří mezi projevy schizofrenie (Enwright et al., 2016). V současné době si nejsme zcela jisti, zda je změna v PNS příčinou či následkem nemoci. Odpověď nám musí dát další výzkum.

### **Testování psychopatologických projevů u myších modelů**

Povědomí o výše zmíněných projevech duševních nemocí v naší společnosti roste. Abychom se o průběhu a etiologii těchto onemocnění dozvěděli více, i zde musíme sáhnout po zvířecích modelech, testujících zejména stresové reakce či úzkostnost. Další z těchto metod si představíme ve výzkumné části, spolu s daty, která z nich můžeme získat.

Nejjednodušším z nich je **open arena** (v zahraniční literatuře častěji jako *open field test*) - i přes snadnou přípravu poskytuje cenné informace o chování zvířete, zejména o jeho úzkostnosti. Jedná se obvykle o plastový výběh ve tvaru kruhu, čtverce

či obdélníku, do jehož středu na začátku testu umístíme zvíře. Jeho pohyb zaznamenáváme na kameru a následně vyhodnotíme. Open arena nám nabízí hned několik možností, jak hodnotit chování zvířete. Můžeme sledovat pohyb: čas strávený pohybem, čas strávený ve středu arény či množství trusu, které vypovídá o míře stresu (Gould et al, 2009).

Cenným nástrojem při výzkumu psychopatologických projevů je také **test repetitivního chování**, v anglické literatuře známý jako *marble burying test* (test zahrabávání kuliček). Vychází z předpokladu, že pokud hlodavci umístíme do výběhu neznámé předměty potenciálně vzbuzující nedůvěru, jako například kovové objekty udělující malé elektrické šoky či otrávené jídlo, pokusí se je zahrabat. Stejným způsobem myši a potkani reagují na přítomnost skleněných kuliček (Broekkamp et al, 1986). Umístíme-li do výběhu 25 kuliček a sledujeme zdravou nemodifikovanou myš po dobu třiceti minut, obvykle zahrabe mezi 20 až 23 kuličkami, číslo se ale samozřejmě může lišit (Archer, et al, 1987).

## 3 VÝZKUM PERINEURÁLNÍCH SÍTÍ

Než budeme moci poznatky z výzkumu perineurálních sítí aplikovat v lékařské praxi, budeme si muset nějakou dobu počkat. Předně musíme porozumět jejich funkci. Jestliže chceme porozumět funkci nějakého komponentu, nejlepší způsob výzkumu bude odstranění tohoto komponentu a následné zkoumání takto upraveného organismu.

Poznatky teoretické části tedy stavíme na mnohých studiích, založených na různých metodách, které však mají jednoho společného jmenovatele – něco odebereme. Některé metody znamenají narušení celé PNS, další míří na menší celky, jako třeba odstranění některého z CSPG, či rovnou úplné potlačení některých sulfatačních epitopů. Abychom mohli takto provedené změny pozorovat, slouží nám k tomu histologické preparáty a mikroskopie, stručně se tedy zmíníme i o těchto metodách.

### 3.1 Chondroitináza ABC

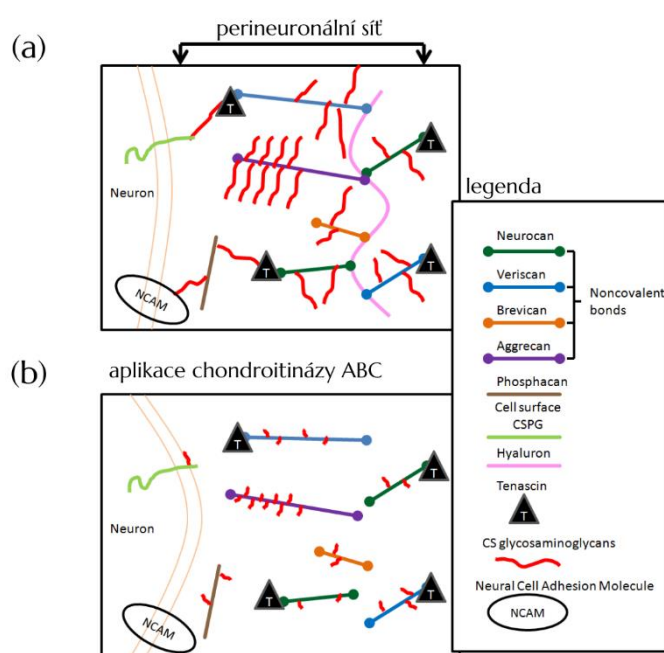
Chondroitináza ABC (ChABC) je původem bakteriální enzym řazený mezi lyázy (tj. štěpné enzymy). Dokáže rozštěpit GAG řetězce v chondroitin sulfátu, a tím narušit strukturu perineurálních sítí (viz obrázek 5). K této látce se upínají velké naděje – jestliže aplikujeme chABC v místě zranění míchy, dojde k narušení CSPG v extracelulární matrix a podnícení regenerace přerušovaných axonů. Tato terapie se u zvířecích model ukázala jako účinná (Bradbury & Carter, 2011).

Pomocí chABC můžeme znovu otevřít kritickou periodu u dospělých zvířat a navrátit tak neuroplasticitu typickou pro mladé jedince – jednou z klasických prací je Pizzorusova (2002) studie provedená na zrakové kůře potkanů. Pomocí aplikace tohoto enzymu se povedlo také zlepšit paměť starým myším (Yang et al., 2021), vymazat vzpomínky spojené se strachem (Gogolla et al., 2009) či zvrátit ztrátu paměťových schopností v modelu Alzheimerovy choroby (Végh et al., 2014).

Musíme si však uvědomit, že chABC, štěpící chondroitinsulfát, ale také dermatansulfát a hyaluronan, narušuje strukturu celé PNS, ale také u intersticiální

matrix (Muir et al., 2019). Nemůžeme tak sledovat význam jednotlivých proteoglykanů jejich GAG řetězců, a už vůbec ne vliv jednotlivých sulfatačních epitopů v GAG. Jedná se sice o velmi nadějnou látku z hlediska podnícení regenerace nervové tkáně (momentálně jsou v řešení například genové terapie umožňující aplikaci chABC bez nutnosti použití injekce), pro výzkum významu komponent PNS je potřeba sáhnout k jiným metodám.

**Obrázek 5:** Schéma rozštěpení PNS pomocí chABC



*Zdroj: Wikimedia Commons, k volnému užití. Upraveno.*

## 3.2 Knock-out experimenty

Knock-out (KO) je jednou z metod, za které vdčíme genovému inženýrství. Dovoluje nám zkoumat jednotlivé geny tím, že je z genomu vyřadíme a sledujeme, jak si organismus povede. Existuje několik metod, které však přesahují rozsah této bakalářské práce. Pro ilustraci si popíšeme tu, kterou jsme použili i v této studii.

Problémem pro knock-out genu může být skutečnost, že je gen obvykle exprimován v mnoha typech tkání, což by ve výsledném fenotypu vedlo ke komplexním změnám. Jen s obtížemi bychom tak mohli zkoumat účinek knock-outu na námi zkoumanou tkáň. Právě tuto komplikaci v myším modelu vyřeší systém **LoxP/Cre** (Kos, 2004). Abychom mohli KO provést, potřebujeme dvě geneticky upravené linie myší, které následně křížíme mezi sebou.

První z těchto linií má určitý gen označený dvěma loxP místy (v anglické literatuře najdeme název „*floxed gene*“). Druhá linie má do genomu vloženou Cre rekombinázu, exprimovanou jen v určité tkáni (díky jejímu promotoru specifickému pro danou tkáň). Při zkřížení těchto dvou linií Cre rekombináza „vystřihne“ úsek DNA označený loxP místy, ovšem jen pod předem daným promotorem. Získáváme tak knock-outové myši, které daný gen postrádají jen ve zkoumané tkáni – třeba právě v nervové (Kos, 2004).

Díky KO experimentům se můžeme tentokrát zaměřit na jednotlivé komponenty perineurálních sítí, z nichž nejdůležitější jsou CS proteoglykany. Právě použití KO myšičího modelu přispělo k poznatkům o funkci jednotlivých CSPG v PNS blíže popsaných v kapitole 1.1.1. Můžeme se však zaměřit i na menší celky – jako jsou třeba jednotlivé sulfatační epitopy CSPG.

Připomeňme si, že sulfataci CSPG řadíme mezi posttranslační úpravy (tedy úpravy proteinu, které probíhají až po jeho syntéze). Enzymy, které se na této úpravě podílejí, se nazývají sulfatotransferasy. Sulfatotransferasy evidujeme sedm (Mikami & Kitagawa, 2013), v problematice perineurálních sítí nás nejvíce zajímají již zmíněné enzymy: chondroitin 6-sulfatotransferasa-1 a chondroitin 4-sulfatotransferasa-1 (dále budeme uvádět pouze zkratkami).

C6ST-1 je kódována genem *Chst3*. Jestliže tento gen vymažeme, silně zredukujeme přítomnost 6-sulfatace, což vede k rigidnější struktuře perineurálních sítí. V konečném důsledku tedy dojde ke zhoršení paměti a učení, a můžeme tak s úspěchem vytvořit model stárnutí mozku (Yang et al., 2021). Druhou sulfatotransferasu, C4ST-1, kóduje gen *Chst11*. Jeho delecí docílíme potlačení 4-sulfatace, což vede k formaci méně restriktivní PNN s převažující 6-sulfatací (Miyata et al., 2012).

I tyto knock-outy s úspěchem provádíme pomocí systému LoxP-Cre, kde je potřeba určit promotor značící zasažený typ tkáně. Z průběžných výsledků z našeho oddělení vyplývají rozdíly mezi myšmi s *Chst11* knock-outem pod parvalbuminovým promotorem a KO tohoto genu pod nestinovým promotorem (J. Růžička, 2022; osobní sdělení, 3. 3. 2022).



### 3.3 Jak poznáme změny v perineurálních sítích

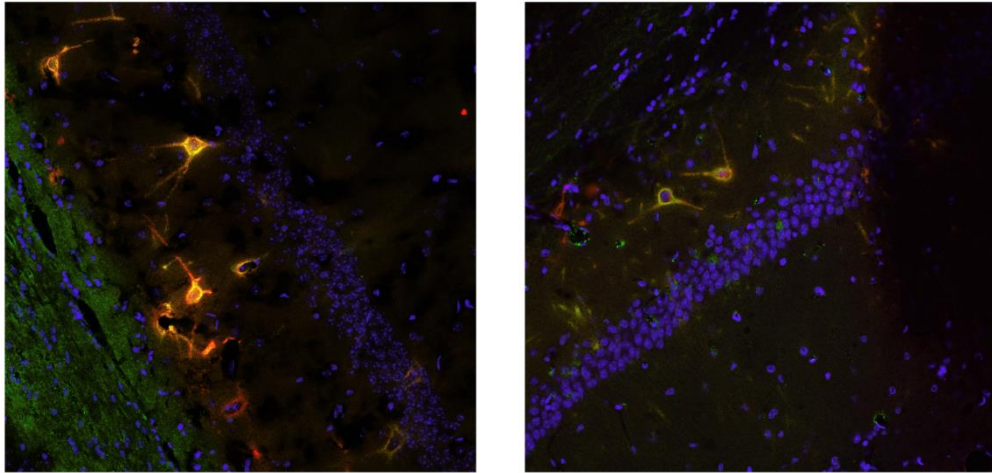
Jak vidíme, máme k dispozici precizní metody, které nám umožňují uhládit expresi jednotlivých složek PNS, můžeme je narušit i pomocí enzymů. Tím však výzkum ani zdaleka není u konce. Musíme se přesvědčit, zda námi provedený zásah měl efekt, a jak velký.

Jedním z velmi cenných nástrojů jsou behaviorální testy, které budeme využívat i v praktické části této bakalářské práce. Slouží nám k ověření vlivu změn v perineurálních sítích (a obecně experimentálního zásahu) na chování modelu (více např. Gould et al., 2009; Vorhees & Williams, 2006; Morris, 1983). S konkrétními příklady behaviorálních testů se blíže seznámíme v kapitole 5.

Behaviorální testy nám mohou o povaze změn v PNS říci hodně, ale zdaleka ne vše. Nevyhneme se nutnosti použít histologické metody, pomocí kterých se můžeme podívat přímo na samotné neurony. Cenným nástrojem se staly imunohistochemické metody, které, jak název napovídá, využívají k obarvení preparátu vlastností přirozeného imunitního systému. Víme, že každá struktura v našem těle má své specifické antigeny, proti kterým existují protilátky. Po přidání těchto protilátek k preparátu se na něj navážou. Na tyto protilátky můžeme navázat specifický enzym a následně dostat preparát do kontaktu se substrátem pro tento enzym, čímž dojde k obarvení pouze stanovené skupiny buněk – té, kterou jsme si označili protilátkami. Preparát tak můžeme zkoumat pod mikroskopem (Beranová & Toran, 2002).

K zobrazení komponent perineurálních sítí využíváme nejčastěji původem rostlinný protein zvaný *Wisteria Floribunda agglutinin* (WFA). Nyní už nám zbývá jen zobrazit tento preparát pod konfokálním mikroskopem, díky kterému získáme snímek, který vidíme např. na obrázku 6.

**Obrázek 6:** Perineurální síť v hippocampální oblasti CA1 u skupiny Flox (vlevo) a Chst11KO (vpravo)



**Pozn.** červená barva značí aggrecan, zelená perineurální síť označené pomocí WFA (tyto barvení mohou kolocalizovat v rámci PNS) a modrá jádra buněk a. Pozorujeme značnou redukci v PNS ve vzorku Chst11KO  
Zdroj: Použito se svolením RNDr. Jiřího Růžičky, PhD, Ústav experimentální medicíny AVČR.

*Máme k dispozici mocné nástroje – můžeme se podívat na struktury v řádu nanometrů, můžeme snímat elektrické potenciály jednotlivých neuronů pomocí mikroelektrod. I přes takovou výbavu však ani zdaleka nemůžeme říci, že o perineurálních sítích víme vše. Najde se ještě dost prostoru pro další studie – jako je třeba ta naše.*

# VÝZKUMNÁ ČÁST

## 4 VÝZKUMNÝ PROBLÉM

Z teoretické části práce vyplývá, že i extracelulární matrix hraje nezanedbatelnou roli v centrální nervové soustavě živočichů. Její narušení může navrátit starému mozku plasticitu nového (viz Fawcett et al., 2019a; Hensch et al., 2005; Pizzorusso et al., 2002; Sorg et al., 2016), zároveň však může způsobit i komplikace projevující se v podobě psychopatologie (např. Enwright et al., 2016).

Předmětem našeho výzkumu je vliv sulfatačního epitopu perineurálních sítí na chování jedince. Pro naše účely jsme získali linii myší s knock-outem genu *Chst11*, který kóduje enzym C4ST-1. Omezili jsme tak 4-sulfataci a uměle zvýšili neuroplasticitu u těchto jedinců. Tento knock-out byl proveden pomocí Cre-LoxP systému, jako promotor Cre rekombinázy jsme využili protein parvalbumin, vyskytující se v některých GABAergických interneuronech.

Tím jsme dosáhli strukturálních změn v PNS obklopujících právě tento typ nervových buněk. Jelikož by u těchto zvířat měla výrazně převažovat 6-sulfatace, předpokládáme, že jejich paměťové schopnosti budou lepší než u kontrolních skupin (Miyata et al., 2012; Romberg et al., 2013). Tento zásah však znamená také narušení přirozené struktury PNS okolo PV interneuronů, které jsou, jak jsme si ukázali, velmi důležité např. v sociabilitě jedince (Cope et al., 2021). Předpokládáme, že C4S hraje stabilizační roli v PNS a očekáváme výrazné změny v chování těchto zvířat, jako například nárůst úzkostnosti (Lee & Lee, 2021).

Předpokládané změny způsobené KO sledujeme u myší z experimentální skupiny pomocí série osmi behaviorálních testů. Testovat jsme začali, když byly myši 3 měsíce staré – jde tedy o mladá zvířata, u kterých ještě nedošlo k uzavření kritické periody. V tomto věku mozek zvířat reaguje mnohem lépe na získání nových podnětů funkčně i morfologicky, což je pro naši studii přínosem.

Dalším důvodem pro volbu mladých zvířat je koncepce studie, kde sledujeme vývojový model. Pro účely bakalářské práce testujeme mladá zvířata, další část studie proběhne po uzavření kritických period, kde nás zajímá, jestli dřívější testování mělo za následek výrazné změny v chování.

Cílem této bakalářské práce je odpovědět na dvě otázky:

1. **Ovlivní knock-out *Chst11* paměť myši z experimentální skupiny?**
2. **Znamená knock-out *Chst11* výraznou změnu v chování a mohla by tato zvířata sloužit jako model psychózy?**

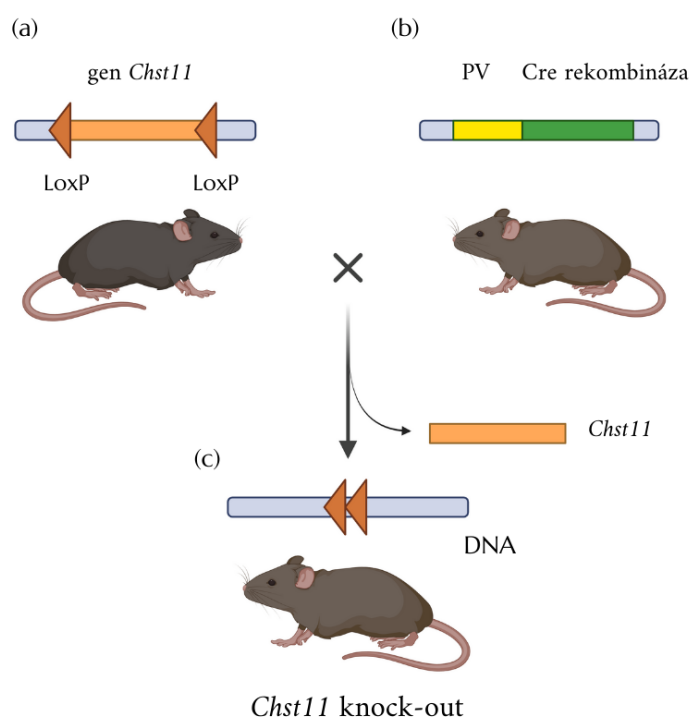
Zjištění z této série testů (a celé zbývající studie) poslouží jako podklad pro navazující studie, zaměřené zejména na výzkum souvislosti perineurálních sítí a psychóz.

## 5 TYP VÝZKUMU A METODY SBĚRU DAT

Tato bakalářská práce je součástí studie, která je knock-out experimentem, tedy experimentem sledujícím následky smazání určitého genu. My sledujeme myši s chybějícím genem *Chst11* a víme, že tato změna povede k výrazné redukci nepropustné 4-sulfatace perineurálních sítí. Tento knock-out byl proveden specialisty ve výzkumném ústavu BIOCEV, kde se myši narodily, poté byly převezeny k nám na Ústav experimentální medicíny.

V neurovědách je mocným nástrojem systém *LoxP-Cre* zmíněný v kapitole 3.2. Obrázek 7 představuje schéma tohoto knock-outu, který se projeví pouze na parvalbuminových interneuronech – na ostatních neuronech exprimujících PNS by k žádné změně dojít nemělo.

**Obrázek 7:** Schéma knock-outu pomocí systému *LoxP-Cre* použitého v našem výzkumu.



**Pozn.:** Myš na obrázku (a) má pomocí dvou *LoxP* míst označen úsek DNA – gen *Chst11*. Myš (b) má do DNA uměle vložený enzym *Cre* rekombinázu (zelený úsek), která se bude exprimovat pouze v kombinaci s promotorem – zde protein Parvalbumin (PV). Zkřížením těchto myší *Cre* rekombináza doslova „vystřihne“ *Chst11* na parvalbuminových interneuronech potomků. Zdroj: Vlastní tvorba, vytvořeno v softwaru BioRender.

Role myši s LoxP označenými geny (dále pouze flox) a myši exprimujících Cre rekombinázu (cre) nespočívá v naší studii pouze v plození KO jedinců. Využili jsme je totiž jako kontrolní skupiny. Důvodem je to, že chceme ukázat, že změny v perineuronálních sítích, kterých jsme dosáhli, souvisí opravdu s knock-outem a ne s vložením označení LoxP či genu kódujícího Cre rekombinázu do DNA.

Experimentální design není zvolený náhodou – celá studie, jejíž částí je i tato bakalářská práce, si klade za cíl ověření kauzálního vztahu mezi sulfatačním epitopem perineurálních sítí a chováním jedince.

## 5.1 Behaviorální testy

Jako behaviorální testy označujeme skupinu testů na zvířatech, ve kterých sledujeme jejich chování. Umožňují nám tak analýzu vnějších projevů našeho experimentálního zásahu. Část z nich tvoří testy paměti – jak prostorové, tak deklarativní – a sledujeme, zda je výkon experimentální skupiny vyšší než u kontrol. Pomocí těchto testů se pokusíme odpovědět na první výzkumnou otázku.

Další z těchto testů se zaměřují na anxiету a socializaci a pomocí nich určíme, zda zvířata s knock-outovaným genem *Chst11* vykazují změny v chování odpovídající modelům psychotických poruch.

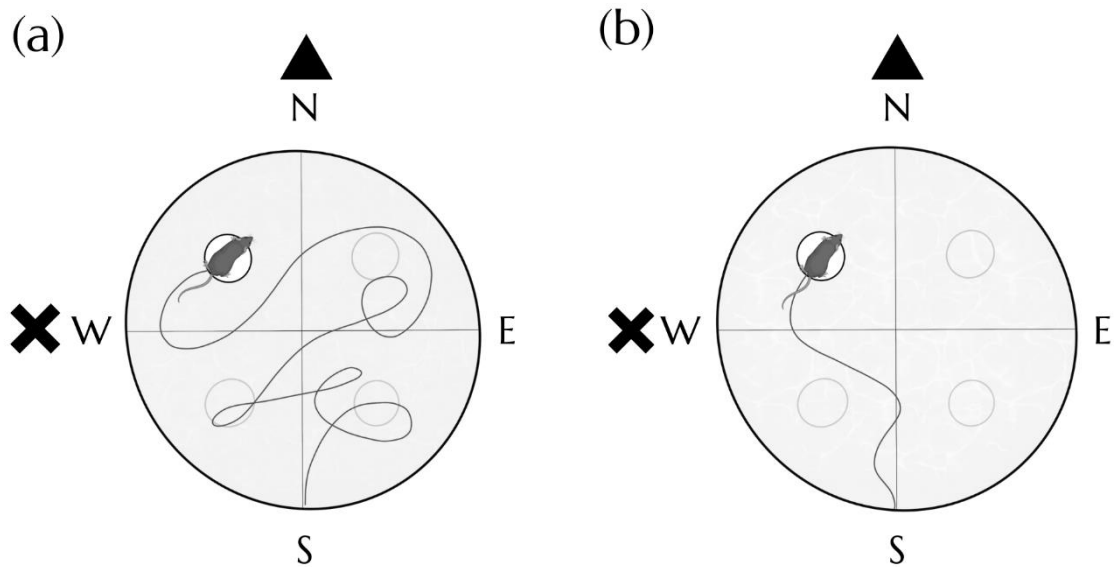
Testování jsme zahájili u tříměsíčních myši. Z časových důvodů jsme využili dvě skupiny zvířat, v obou byly zastoupené myši z experimentálních skupin a obou kontrol. Behaviorální testování probíhalo po dobu přibližně dvou měsíců. Testy 5.1.1 až 5.1.3 jsou zaměřené na různé typy paměti a poskytnou nám odpověď na první výzkumnou otázku. Testy následující po nich se zaměřují na anxiету a společenské chování, pomocí nich odpovíme na druhý výzkumný problém. Toto rozdělení však není závazné, jelikož i některé z paměťových testů mohou pomoci odpovědět na otázku, zda se u myši objevily psychotické projevy.

### 5.1.1 Morrisovo vodní bludiště (Morris water maze)

MWM je ideální metodou pro měření paměťových schopností – konkrétně si díky tomuto testu můžeme udělat představu o prostorové paměti. Pomocí možných

modifikací testu jsme takto měřili dlouhodobou paměť, schopnost přeučení se na novou lokaci cíle a krátkodobou paměť.

**Obrázek 8:** Schéma MWM a možné trajektorie myši na začátku (a) a na konci (b) testu



*Pozn.: Na obrázku (a) vidíme, jak by mohla vypadat trajektorie myši na začátku pokusu – cíl najde prakticky náhodou. Myš na obrázku (b) se již v bludišti orientuje pomocí záchytných bodů přilepených na okraji nádrže (zde křížek a trojúhelník).*

Pro interpretaci získaných dat je nádrž rozdělená dvěma osami (sever-jih, východ-západ) na čtyři kvadranty (obrázek 8). Zvíře se při testování pouští do bludiště z jednoho z označených směrů, ostrůvek je umístěn do některého ze čtyř kvadrantů, přičemž jak umístění ostrůvku, tak startovní pozici můžeme obměňovat.

V naší studii jsme použili nádrž o průměru 120 cm, naplněnou vodou do výšky cca 50 cm. Vodu jsme obarvili zdravotně nezávadnou bílou barvou, abychom dosáhli požadované neprůhlednosti a mohli jsme ukrýt bílý ostrůvek pod hladinu – myš ho tak neviděla a musela se spoléhat na vlastní paměť. Jako záchytné body posloužily vyměnitelné cedule s jednoduchými tvary. Abychom minimalizovali stres zvířat, teplotu vody jsme udržovali na 25°C. Celé bludiště bylo snímáno kamerou a pomocí softwaru VideoMot jsme zaznamenávali trajektorie zvířat a měřili čas strávený pohybem ve vodě. Na nalezení cíle měly myši přesně 60 sekund, po uplynutí tohoto časového úseku či po úspěšném nalezení ostrůvku byl záznam trajektorie ukončen.



Provedli jsme čtyři modifikace tohoto testu:

1. **Test dlouhodobé paměti** – ostrůvek byl po dobu 5 dnů umístěn na stejném místě a myši jsme pouštěli do bludiště každý den čtyřikrát – pokaždé z jiného směru. Pořadí směrů jsme každý den obměňovali. Výstupem bylo pět tabulek pro každý den, každá z nich obsahovala čtyři hodnoty času pro každou myš. Pro statistické účely jsme tyto denní hodnoty každého zvířete zprůměrovali a s těmito průměry statisticky pracujeme.
2. **Test přeučení** – po testu dlouhodobé paměti umístíme cíl na jinou pozici. S daty pracujeme stejně jako v předchozím testu.
3. **Probe test** – v tomto testu cíl vyjmeme a necháme myš volně plavat. Jednou před zahájením testu dlouhodobé paměti, podruhé těsně po něm a potřetí po ukončení testu přeučení. Pomocí VideoMotu sledujeme trajektorii zvířat a které oblasti při volné plavbě preferovala (ve snaze najít zde ostrůvek).
4. **Test krátkodobé paměti** – opět využijeme cílový ostrůvek, tentokrát se však jeho pozice každý den mění. Myš však pouštíme z jednoho směru každý den. I zde máme datové tabulky podobné těm v testu dlouhodobé paměti a přeučení, zahrnující čas ze všech čtyř denních plaveb. S daty však dále pracujeme (blíže v kapitole 7).

### 5.1.2 Test spontánní alternace

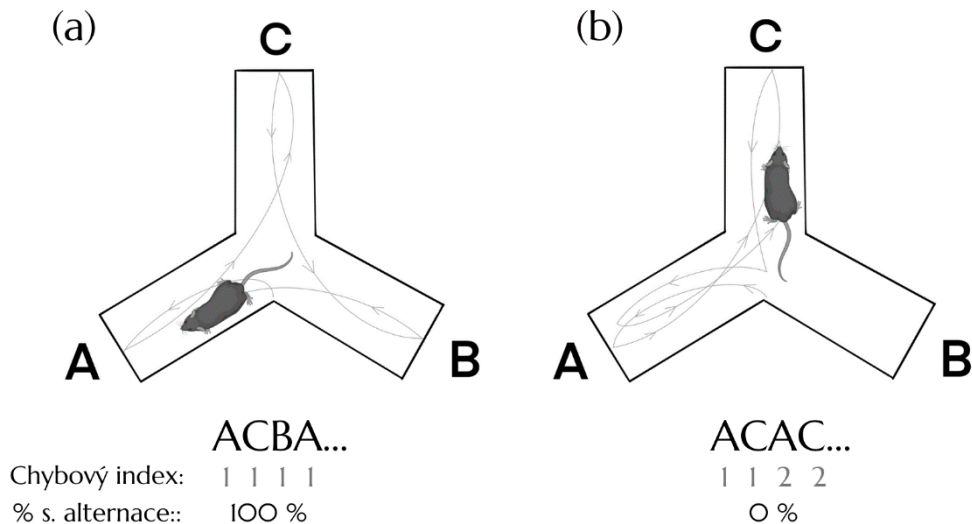
Test spontánní alternace odhalí případné nedostatky v pracovní a prostorové paměti. Jde o jednoduchý test: Myš je umístěna do bludiště a sledujeme, do jakého ramene se vydá. Hlodavci jsou od přírody zvědavá stvoření, tudíž předpokládáme, že po prozkoumání jednoho ramene bludiště vyrazí do některého z ještě neprozkoumaných ramen. Myš s dobrou pracovní prostorovou pamětí pak navštívená ramena střídá, jelikož nemá problém zapamatovat si, kde byla naposledy, selhávání pak může znamenat její poruchu (Kraeuter et al., 2019).

Pro tento test jsme využili *y-maze*, neboli bludiště ve tvaru rovnoramenného písmene Y (viz obrázek 9).

Pro účely vyhodnocení dat jsme si ramena bludiště označili písmeny ABC. Pohyb myši jsme po dobu pěti minut zaznamenávali na kameru, a když zavítala do některého z ramen, zapsali jsme s do textového souboru jeho označení. Ideální sekvence by pak vypadala v souboru jako ABCABCAB. Následně jsme spočítali průměrný chybový index

a % spontánních alternací (viz obrázek 9). Tato data následně využíváme pro statistickou analýzu.

**Obrázek 9:** Schéma testu spontánní alternace.



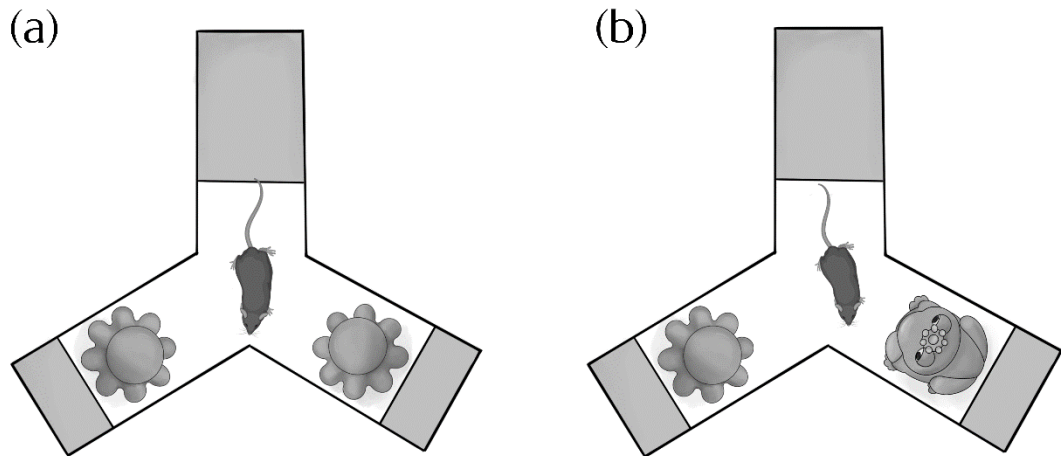
*Pozn.: Obrázek (a) zobrazuje ideální trasu myši – střídání ramen ABC. Obrázek (b) znázorňuje příklad, kdy je spontánní alternace u myši narušená a střídá pouze ramena A a C.*

### 5.1.3 Rozpoznání nového objektu (SNOR)

Test SNOR jsme krátce zmínili v teoretické části jako vhodnou metodu testování deklarativní paměti hlodavců na základě schopnosti rozpoznat nový objekt od již známého. V naší studii jsme opět využili Y-maze, dvou ze tří ramen labyrintu jsme umístili objekty (obrázek 10), třetí rameno jsme uzavřeli. Bludiště jsme umístili do tlumeně osvětlené kóje oddělené závěsem. Test probíhal ve dvou fázích:

1. **Sample** – tréninková fáze, kdy myš dostala čas se seznámit se dvěma totožnými objekty. Zaznamenává se čas strávený zájmem o objekty, který by měl být v této fázi pro oba objekty stejný.
2. **Choice** – myš je umístěna do stejné arény po uplynutí určitého časového úseku (v našem případě jsme testovali intervaly 3 hodiny, 24 hodin, 48 hodin a 96 hodin). Opět připravíme dva objekty, jeden z nich zvíře zná z předchozí fáze, jeden je pro ni nový. Opět zaznamenáváme čas strávený zájmem o objekty, který by se tentokrát měl lišit.

**Obrázek 10:** Schéma testu SNOR

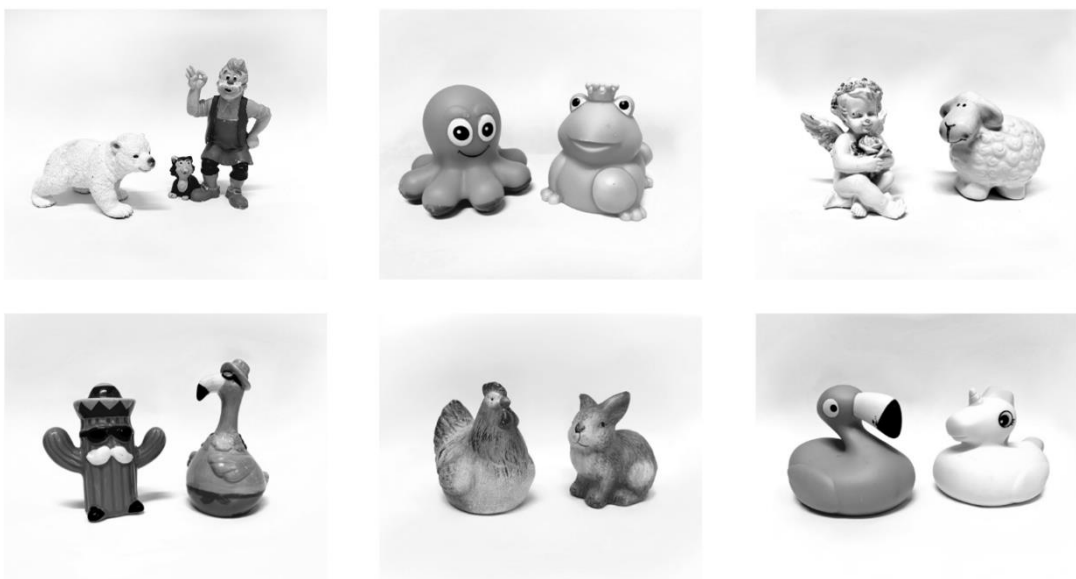


*Pozn.: Šedé části značí nepřístupné prostory. Z největší šedé oblasti myš vypouštíme do bludiště.*

Pro účely testu jsme zvolili předměty ze stejného materiálu, které mají podobné vlastnosti. Zabránili jsme tak situaci, kde by atraktivita objektu mohla převážet nad jeho relativní novostí a zkreslit tak data. Stejně tak pokud vybereme například dva stejné objekty lišící se jen barvou či vzorem, je možné, že je zvíře od sebe nerozezná (Ennaceur, 2010).

Při analýze dat sledujeme záznam a měříme čas strávený s jednotlivými předměty, pro statistickou analýzu pracujeme s rozdílem těchto časů v podobě diskriminačního indexu (blíže v kapitole 7).

**Obrázek 11:** Předměty použité v SNOR testu



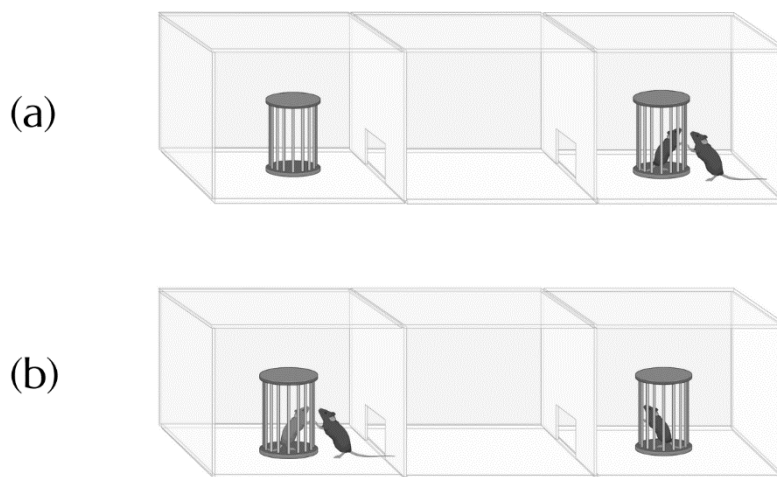
### 5.1.4 Social recognition test

Pro účely naší studie jsme využili diskriminační design, který se pro naše účely hodí nejvíce. Interakce myší jsme snímali shora, při vyhodnocování jsme se soustředili na rozdíly v době trávené s prezentovanými myšmi.

Test jsme provedli v tříkomorové aréně se stěnami matné šedé barvy, do postranních komor jsme vložili klíčky, ve kterých byly prezentovány myši jako podněty (obrázek 11). Probíhal ve třech fázích:

1. **Habituační** – myš strávila 5 minut o samotě v prostřední komoře, která byla od ostatních dvou oddělena dvířky.
2. **Test sociability** – po pěti minutách jsme dvířka komor otevřeli. Myš měla deset minut na prozkoumání dvou klecí. V jedné byla přítomna myš, druhá byla prázdná. Měříme časy strávené zájmem o každou z klecí.
3. **Test social novelty** – do prázdné klece vložíme druhou myš. Opět měříme čas strávený zájmem o každou z klecí.

**Obrázek 12:** Schéma *social recognition* testu



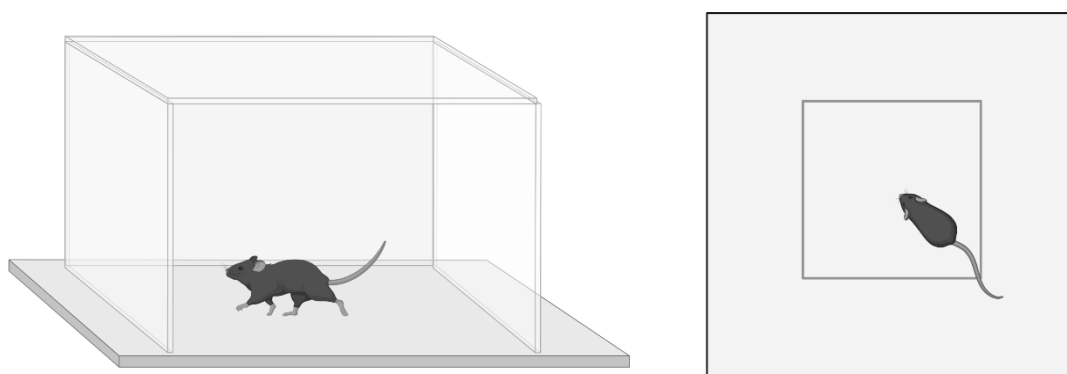
*Pozn.: Ve fázi (a) myš obvykle věnuje větší pozornost druhé myši než prázdné kleci, ve fázi (b) pak preferuje novou myš. Zdroj: vytvořeno v softwaru BioRender.*

Při vyhodnocování druhé fáze sledujeme čas, který myš stráví zájmem o druhou myš. U třetí fáze pak sledujeme rozdíly v čase tráveném očicháváním nejnovější prezentované myši a té, která byla do arény vložena jako první. Pro tento test je důležité, aby ani jedna z prezentovaných myší nebyla ze stejné ubikace jako testovaná myš. Myši prezentované jako podněty musí být stejného pohlaví jako testovaná myš.

### 5.1.1 Open arena

Open arena (obrázek 12) nám umožňuje zkoumat míru úzkostnosti zvířat na základě sledování trajektorie jejich pohybu v otevřené prázdné nádobě. V naší studii využíváme čtvercovou arénu o rozměrech 40x40cm z bílého plastu umístěnou v tlumeně osvětlené kóji oddělené od zbytku místnosti závěsem. Pohyb myši zaznamenáváme na černobílou kameru umístěnou nad arénu po dobu pěti minut. Hodnotíme trajektorii pohybu myši a pomocí počítačového programu získáme přesné údaje o tom, zda myš dávala přednost „jistějším“ okrajům arény či středu.

**Obrázek 13:** Open arena test a možné rozdělení oblasti pro analýzu.



*Zdroj: Vytvořeno v softwaru BioRender.*

### 5.1.2 0-maze

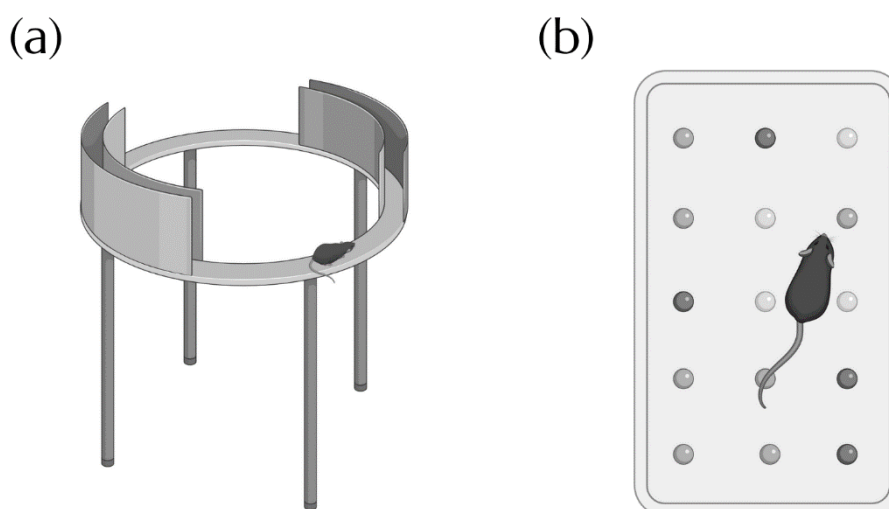
Tento test nám pomáhá v určování míry anxiety. 0-maze (zero maze) je, jak již název napovídá, bludiště ve tvaru písmene 0 - vyvýšená kruhová platforma asi 70 cm nad zemí (obrázek 12a). Je rozdělená na kvadranty, kde dva protilehlé mají stěny, zbylá oblast představuje jen poměrně úzkou lávku, kterou pokusné zvíře vnímá jako nebezpečnou. I zde sledujeme myš po dobu pěti minut a zajímá nás poměr času strávený pohybem na otevřené lávce a v uzavřeném prostoru bludiště.

Úzkostnější myš bude po delší dobu schovaná v bezpečné zóně či strnule stát na místě, zatímco „odvážnější“ myš se po bludišti pohybuje s podstatně vyšší sebejistotou. Při vyhodnocení dat pracujeme s časem stráveným pohybem po odhalené části bludiště a časem tzv. *freezingu* – doby, kdy myš vlivem strachu „zamrzne“ na místě.

### 5.1.3 Test repetitivního chování (Marble burying test)

Repetitivní chování nám může mnohé říci o míře úzkostnosti hlodavců. Jestliže do jejich ubikace umístíme potenciálně nepříjemný podnět, pokusí se ho odstranit tím, že ho zahrabe – a to včetně skleněných kuliček. Pro tento test jsme využili obdélníkové výběhy o rozměrech 35x25cm naplněné podestýlkou z dřevěných hoblin do výšky cca 15 cm. Na povrch jsme umístili dvacet skleněných kuliček (obrázek 12b). Myš strávila ve výběhu 20 minut, zapsali jsme čas, kdy začala hrabat, a na konci testu počet zahrabaných kuliček. Při statistickém vyhodnocení dat jsme pracovali s časem, který uplynul, než myš začala hrabat, a s procentem zahrabaných kuliček.

**Obrázek 14:** (a) bludiště 0-maze (b) schéma *Marble burying testu*



*Zdroj: Vytvořeno v softwaru BioRender.*

### 5.1.4 Test prepulzní inhibice

Jestliže myš vystavíme náhlému hlasitému zvukovému impulzu, můžeme pozorovat úlekovou reakci. Prepulzní inhibice je jev, který pozorujeme, když zvířeti nejdříve přehrajeme méně hlasitý zvuk (*prepulz*), a až poté velmi intenzivní zvukový podnět (tzv. *startle*). Úleková reakce zvířete by měla být nižší, než pokud přehrajeme pouze *startle* (Geyer et al., 2002).

Test probíhá ve zvukotěsném sarkofágu, kam vložíme odhlučňenou krychli s myší. Pomocí skriptu v softwaru Matlab přehráváme zvukové impulzy o různé hlasitosti (až 85 dB). Abychom nezpůsobili poškození sluchu, tyto impulzy trvají v řádu

milisekund, celý skript trvá 50 minut. Pohybový senzor v izolační kleci pak snímá pohyby myši, které jsou dobrým indikátorem míry úleku. V testu nás zajímá, o kolik % byly inhibovanější reakce na *startle* oproti reakci příslušející pouze *startle* podnětu.

## 5.2 Formulace hypotéz ke statistickému testování

Náš výzkum zahrnuje sérii behaviorálních testů provedených na třech skupinách – jedné experimentální (*Chst11* KO) a dvou kontrolních (linie Cre a linie Flox). Abychom odpověděli na naši výzkumnou otázku, provádíme analýzu dat ze všech provedených behaviorálních testů a testujeme následující statistické hypotézy.

V Morrisově vodním bludišti jsme provedli celkem čtyři dílčí testy a testujeme čtyři hypotézy:

- **H1.1:** *Chst11*KO myši v testu dlouhodobé paměti v Morrisově vodním bludišti naleznou cíl za kratší čas než myši z kontrolních Cre a Flox skupin.
- **H1.2:** Průměrný čas strávený hledáním cíle v testu přeučení je u *Chst11*KO nižší než u kontrolních skupin.
- **H1.3:** Průměrné paměťové indexy získané v testu krátkodobé paměti se mezi skupinami liší.
- **H1.4:** *Chst11*KO myši v testu *probe 1* testu tráví větší procento času ve virtuální cílové zóně, kde byl naposledy umístěný cíl než kontrolní skupiny.
- **H1.5** *Chst11*KO myši v testu *probe 2* testu tráví větší procento času ve virtuální cílové zóně, kde byl naposledy umístěný cíl než kontrolní skupiny.

Pro test spontánní alternace:

- **H2.1** Procento správných alternací je u *Chst11*KO vyšší než u Cre a Flox myší.
- **H1.2** Průměrná chybovost *Chst11*KO je nižší než u Cre a Flox myší.

V testu rozpoznání nového objektu ověřujeme následující hypotézy:

- **H3** Rozdíly diskriminačních indexů času stráveného s novým objektem mezi *Chst11*KO jedinci a Cre a Flox se zvětšujícím časovým intervalem mezi Sample a Choice fází rostou.

V testu *social recognition*:

- **H4.1** Sociabilita – rozdíl mezi časem stráveným s druhou myší vs. prázdnou klecí během testu sociální rekognice se mezi skupinami liší.
- **H4.2** *Social novelty* – rozdíl mezi časem stráveným s novou myší a známou myší se mezi skupinami liší.

Hypotéza pro test *open arena* je následující:

- **H5**: Procento času strávené ve středové oblasti arény je u *Chst11KO* myší nižší než u kontrolních *Cre* a *Flox* skupin.

Pro *0-maze* ověřujeme hypotézu:

- **H6.1** Čas strávený pohybem v otevřených zónách vyvýšeného bludiště je u *Chst11KO* skupiny nižší než u kontrolních skupin.
- **H6.2** *Chst11KO* myši stráví více času *freezingem* než kontrolní skupiny.

Pro marble burying test:

- **H7** Rozložení četnosti počtu zahrabaných kuliček se mezi skupinami liší.

A konečně, pro prepulzní inhibici testujeme následující hypotézu:

- **H8** Procento prepulzní inhibice pro jednotlivé intenzity zvukových impulzů se mezi skupinami *Chst11KO* a *Flox* liší.



## 6 VÝZKUMNÝ SOUBOR A ETIKA

Ve studii jsme použili 34 myší, z toho 16 samců a 18 samic. Využili jsme celkem 3 linie – experimentální skupina (*CHS11KO*) a dvě kontrolní, pocházející z linií Cre a Flox příslušných námi zkoumanému knock-outu (roli Cre a Flox myší blíže popisuje obrázek 7). Zvířata pochází z výzkumného ústavu BIOCEV.

**Tab. 2:** Podskupiny výzkumného souboru

Typ	Počet (celkem)	Počet (samci)	Počet (samice)
Cre	13 (†1)	6(†1)	6
Flox	12	5	7
<i>Chst11</i> KO	10	5	5

**Pozn:** Jeden ze samců uhynul v rané fázi studie, naměřené hodnoty jsme z analýzy vyloučili.

Myši jsme chovali v ubikacích ve skupinkách od 1 do 5 jedinců. Měly neomezený přístup k vodě a potravě a v místnosti byl uměle udržován cirkadiánní rytmus pomocí automaticky řízeného osvětlení (12 hodin den, 12 hodin noc). V místnosti je udržována konstantní teplota (22 °C) a hlídána je i vlhkost vzduchu.

### 6.0 Etické aspekty práce se zvířaty

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

Náš experiment obsahoval pouze neinvazivní zásahy (myši se s knock-outem narodily), zvířata podstoupila sérii behaviorálních testů, která neměla způsobit bolest ani extrémní stres.

## 7 PRÁCE S DATY A JEJÍ VÝSLEDKY

Získaná data od všech tří skupin jsme následně statisticky vyhodnotili. K dispozici jsme měli textové soubory obsahující naměřené časy, ale také výstupy z programu VideoMot (pro analýzu trajektorie v MWM a open areně) a programu Matlab (data z pohybových senzorů v případě prepulzní inhibice). Pro úpravu dat jsme využili program Microsoft Excel 365. K analýze i tvorbě grafů jsme využili program GraphPad Prism9, ideální pro rychlou analýzu a přehlednou grafickou prezentaci dat.

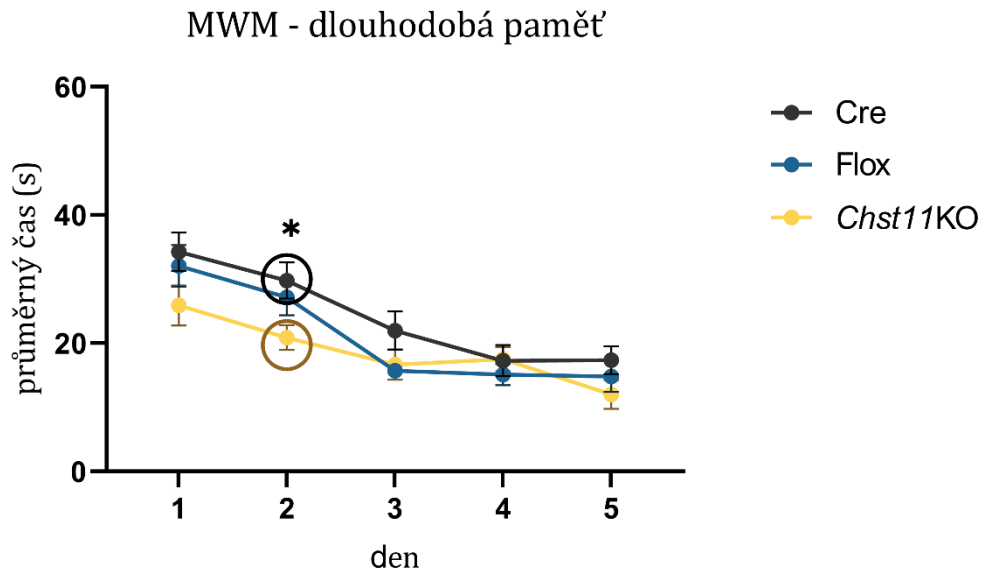
### **Morrisovo vodní bludiště**

Jako první se zaměříme na data z jednotlivých **MWM testů**. Vzhledem k malému rozsahu souboru ( $n=34$ ) bylo před volbou statistických metod potřeba provést test normality, jehož výsledek nám umožnil využití parametrických metod.

Pro analýzu testu dlouhodobé paměti jsme využili parametrickou dvoucestnou analýzu rozptylu (angl, two-way ANOVA), která nám umožňuje analyzovat dva faktory zároveň – skupinu (zda jde o knock-out či některé z kontrol) a počet dní, po který již test probíhá. Analýzou jsme pro rozdíl mezi skupinami získali následující výsledek:  $F(2, 30) = 3,46$ ,  $*p = 0,044$ .

Ačkoliv pozorujeme signifikanci, po využití Tukeyho testu pozorujeme signifikantní rozdíl pouze druhý den testu mezi skupinami Cre a *Chst11KO* ( $q = 3,68$ ,  $*p = 0,046$ ), jiné signifikantní výsledky post hoc test neodhalil. I přesto **můžeme alternativní hypotézu H1.1 přijmout**. Na grafu z obrázku 15 vidíme průměry v čase u jednotlivých skupin, proložené ućící křivkou. Všimněme si, že na grafu můžeme pozorovat i rozdíly v průměrném výkonu jednotlivých skupin.

**Obrázek 15:** Graf zobrazující křivky učení jednotlivých skupin. Body představují průměrný čas skupiny v jednotlivé dny.



**Pozn.:** Chybové úsečky značí střední chybu průměru. Zakroužkované body představují hodnoty, mezi kterými Tukeyho test našel statisticky významný rozdíl.

Stejným způsobem pracujeme s daty z druhého testu v MWM – testu přeučení. I zde pozorujeme na grafu (obrázek 16a) rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Výsledek dvoucestné ANOVY:

$$F(2, 30) = 1,87, p = 0,172$$

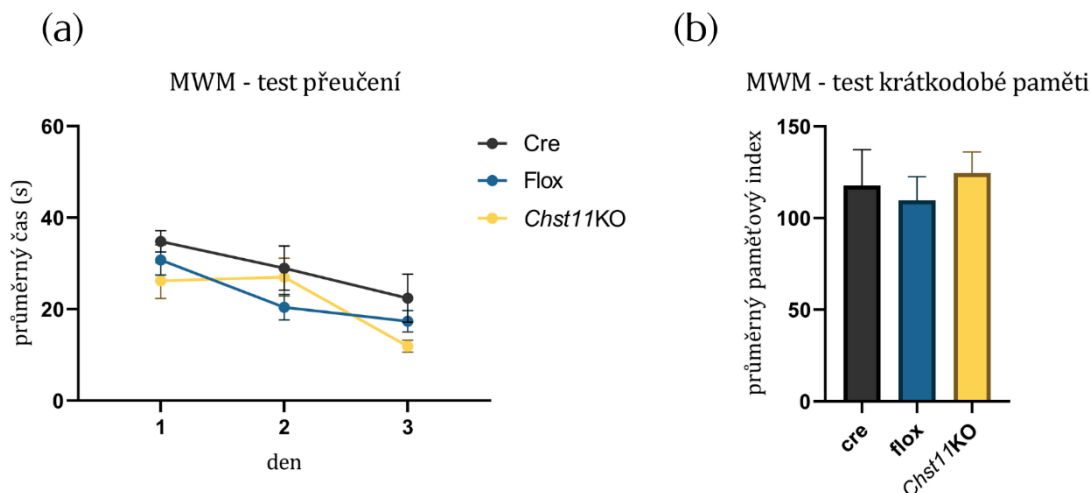
Ani po provedení Tukeyho testu nelze rozdíly mezi skupinami nelze považovat za signifikantní a **nezamítáme nulovou hypotézu** k hypotéze 1.2.

Pro **test krátkodobé paměti** si nevystačíme pouze s průměrnými časy každé myši pro každý den, jelikož každý den měníme polohu ostrůvku a máme spíše pět separátních testů krátkodobé paměti. Zavádíme proto *paměťový index*, vypočítaný podle následujícího vzorce:

$$x = \frac{\text{průměr}(t_2, t_3, t_4)}{t_1} \cdot 100,$$

kde  $t_1$  představuje dobu, za jakou dobu myš našla ostrůvek v první plavbě dne. Časy  $t_2$ ,  $t_3$  a  $t_4$  pak představují časy zbývajících tří plaveb. Tento index nám tak říká míru zlepšení času v dalších třech pokusech oproti prvnímu. Nakonec pro každou myš zprůměrujeme paměťové indexy za celých 5 dní – skupinové průměry vidíme na obrázku 16b.

**Obrázek 16:** (a) Učící křivky jednotlivých skupin – body představují průměrný čas skupiny v jednotlivé dny, (b) průměrný index krátkodobé paměti u všech skupin během testovacího týdne.



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Pro následnou analýzu dat jsme využili jednocestnou ANOVU:

$$F(2, 30) = 0,22; p = 0,809$$

Ani zde nepozorujeme signifikantní rozdíly mezi skupinami a **nulovou hypotézu H1.3 nemůžeme zamítnout**.

V **probe testech** sledujeme trajektorii zvířete. Měřili jsme celkem dva, jeden po skončení testu dlouhodobé paměti (probe 1), jeden po skončení testu přeučení (probe 2). Zaměřujeme se na zóny, kde se nacházel cílový ostrůvek. Počítáme s % času, který myš strávila v jednotlivých zónách a sledujeme, jak se změnila preference těchto zón, v závislosti na umístění ostrůvku v jednotlivých testech – viz obrázek 17.

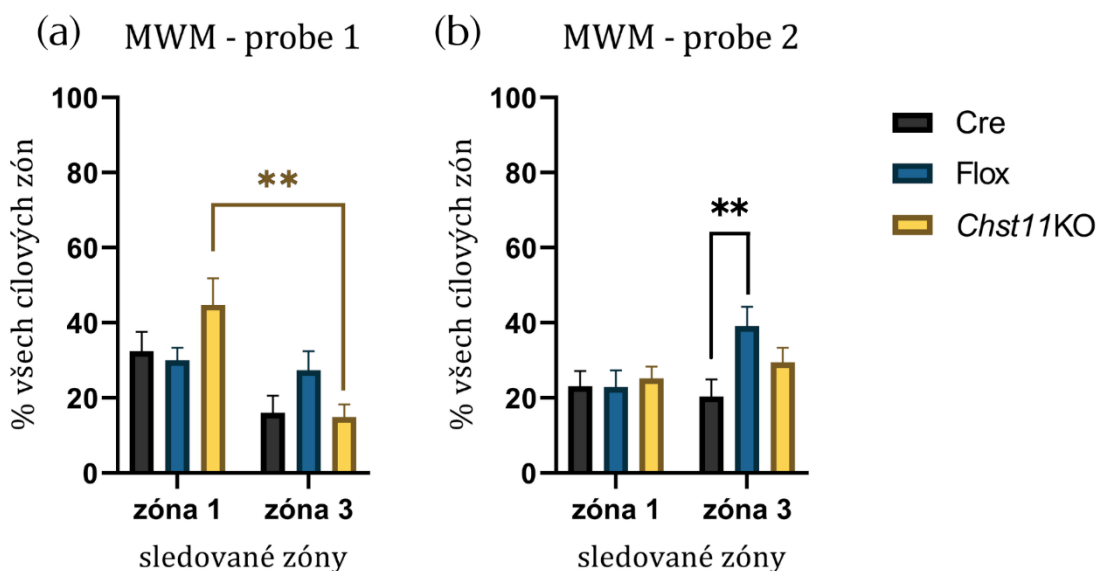
Pro analýzu výsledků obou měření jsme využili dvoucestnou ANOVU. Získali jsme následující výsledky (pracovali jsme se dvěma faktory – skupinou a preferencí zóny)

- Probe 1:  $F(2, 30) = 0,93; p = 0,406$
- Probe 2:  $F(2, 30) = 6,531; **p = 0,004$

Po provedení Tukeyho test na datech z *probe 1* vidíme u *Chst11KO* skupiny signifikantní rozdíl v čase stráveném v místě, kde se v testu dlouhodobé paměti nacházel ostrůvek ( $p < 0,01$ , viz obr. 17). **Alternativní hypotézu H1.4 přijímáme**.

Probe 2 test, konaný po testu přeučení, neodhalil pro experimentální skupinu žádné významné rozdíly v preferenci mezi zónou 1 a zónou 3, **nulovou hypotézu H1.5 tedy nemůžeme zamítnout.**

**Obrázek 17:** Grafy preference jednotlivých cílových zón (a) po testu dlouhodobé paměti, (b) po testu přeučení.



*Pozn. Chybové úsečky značí střední chybu průměru. (a) V testu dlouhodobé paměti byl ostrůvek umístěn v zóně 1, zóna 3 zde představuje místo nejméně pravděpodobné místo výskytu ostrůvku. (b) V testu přeučení se ostrůvek nacházel v zóně 3.*

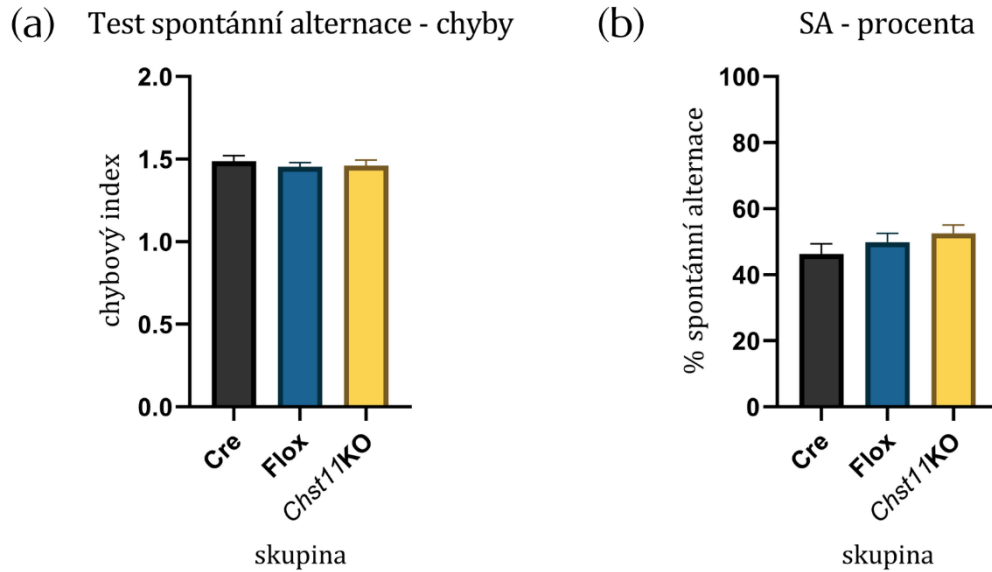
### Test spontánní alternace

Tento paměťový test je zaměřený na prostorovou orientaci a pracovní paměť. Hodnotíme ji zde pomocí dvou proměnných: průměrný chybový index a procento „správných“ spontánních alternací. Oba tyto údaje jsme získali z textového souboru, do kterého zaznamenáváme pohyb myši (viz obrázek 9). Obě proměnné následně vyhodnotíme pomocí jednofaktorové ANOVY.

- Pro chybový index:  $F(2, 30) = 0,33$ ,  $p = 0,725$
- Pro procento SA:  $F(2, 30) = 1,22$ ,  $p = 0,309$

**Ani zde nemůžeme, pro žádnou z těchto proměnných, zamítnout nulovou hypotézu.** Průměry jednotlivých skupin se prakticky neliší, což vidíme i na grafu (obrázek 18a a 18b).

**Obrázek 18:** Graf průměrných chybových indexů v testu spontánní alternace (a) a procenta spontánních alternací (b)



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

### SNOR test

Posledním provedeným testem zaměřeným na paměť je test spontánního rozpoznání nových objektů (SNOR). Výstupem z měření jsou jednotlivé hodnoty času strávené s jednotlivými předměty. Statisticky pracujeme s diskriminačním indexem, počítaného pomocí vzorce:

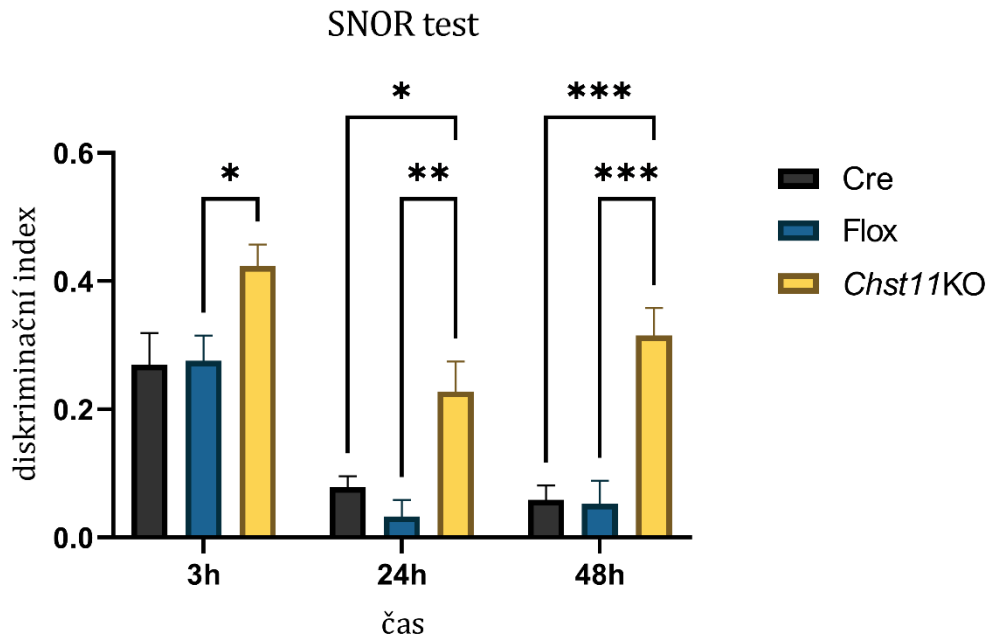
$$DI = \frac{t_{nový} - t_{starý}}{t_{nový} + t_{starý}}$$

Využíváme dvoucestnou ANOVU ve smíšeném modelu, jelikož v testech po 3 a 48 hodinách chyběla data od jedné myši.

- $F(2, 29) = 19,72, ****p < 0,0001$

Na základě této analýzy můžeme přijmout alternativní hypotézu. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami detailněji analyzujeme pomocí post hoc Tukeyho testu, jehož výsledky jsme zanesli i do grafu (obrázek 19).

**Obrázek 19:** Graf průměrného diskriminačního indexu jednotlivých skupin pro zkoumané časové intervaly



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru. Lišty pak značí výsledek Tukeyho testu – statistickou signifikanci rozdílů průměrů jednotlivých skupin. \* -  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Graf (obrázek 19) ilustruje rostoucí rozdíly v průměrném diskriminačním indexu u jednotlivých skupin. Nápadné rozdíly vidíme již v čase 24h. Rozdíly mezi skupinami Cre a Flox nejsou statisticky signifikantní.

Nyní máme zpracovaná data z paměťových testů a přesuneme se k datům, která nám pomohou odpovědět na druhou výzkumnou otázku.

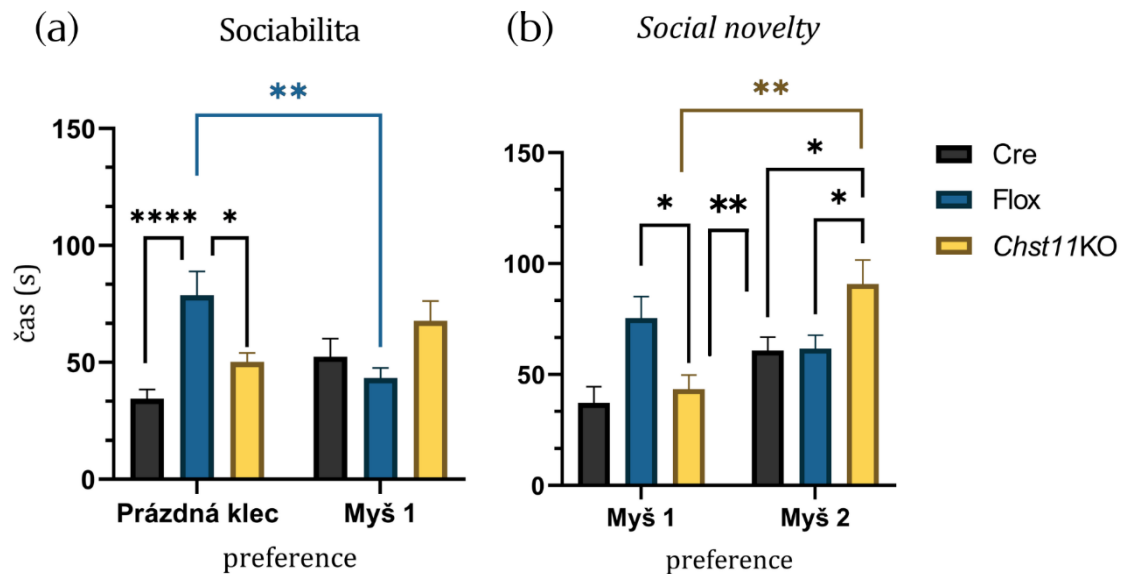
### Social recognition test

Z tohoto testu jsme získali údaje o sociabilitě jedince a o *social novelty* (preferenci nového jedince před známým). Provádíme tedy dvě dvoucestné ANOVY – jednu pro první fázi testu (sociabilita – myš volí mezi plnou a prázdnou klecí) a druhou pro fázi testu, kde myš volí mezi novou myší a již známou myší (zde nás zajímá konstrukt *social novelty* – preference nové myši před známou).

- Sociabilita:  $F(2, 30) = 3,934$ ;  $*p = 0,0304$
- Social novelty:  $F(2, 30) = 4,27$ ;  $*p = 0,023$

Provedli jsme také post hoc analýzu obou částí testů, její výsledky vidíme na grafu na obrázku 20.

**Obrázek 20:** Míra sociability (a) a *social novelty* (b) u testovaných skupin



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru. \* -  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\* -  $p < 0,0001$

Mezi skupinami pozorujeme statisticky významné rozdíly a v obou případech dosahují nejvyšších hodnot myši z experimentální skupiny. Nejméně sociabilní jsou myši ze skupiny Flox, výrazně preferující prázdnou klec před druhou myš.

### Open arena

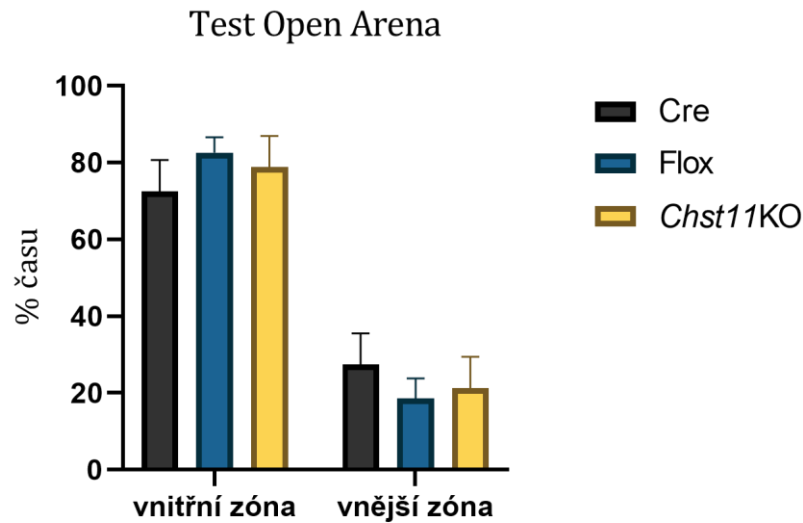
Arénu jsme si rozdělili na dvě zóny (vnitřní a vnější). V softwaru VideoMot jsme sledovali trajektorii zvířete a jako výstup jsme získali procenta z celkového času strávená v jednotlivých zónách – průměrné naměřené hodnoty vidíme na obrázku 21. Procenta času strávená v obou zónách porovnáváme mezi skupinami pomocí dvoucestné ANOVY.

Získali jsme výsledek  $F(2, 23) = 1,11$ ;  $p = 0,348$ , neprozrazující žádné signifikantní rozdíly v času stráveném v jednotlivých zónách arény mezi skupinami.

**Nulovou hypotézu H5 nelze na základě naměřených dat zamítnout.**



**Obrázek 21:** Naměřené hodnoty v testu open areny pro jednotlivé skupiny.



Pozn. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

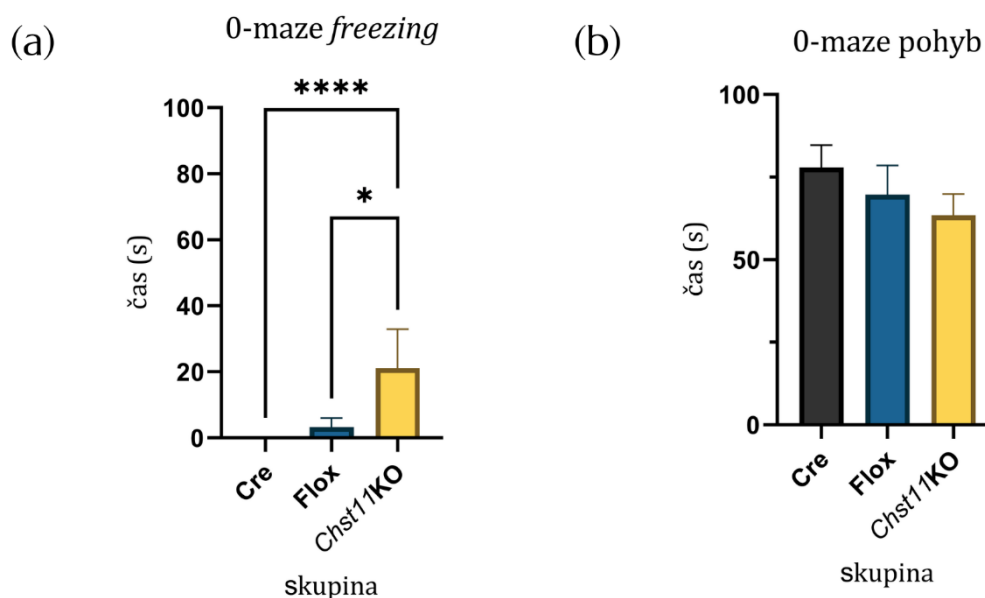
### 0-maze

V tomto testu sledujeme míru úzkostnosti, kterou můžeme určit pomocí dvou ukazatelů: času pohybu v otevřeném prostoru a času stráveného zamrznutím – *freezingem*. Pro obě proměnné využijeme Kruskal-Wallisovu ANOVU, jelikož naměřené časy zejména v případě *freezingu* nemají normální rozdělení a vzhledem k malému rozsahu souboru se nemůžeme spolehnout na centrální limitní větu. Získali jsme následující výsledky:

- Čas pohybu:  $H = 1,74$ ;  $p = 0,419$
- Čas *freezingu*:  $H = 18,09$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

Pro čas *freezingu* **alternativní hypotézu H6.2 přijímáme**, také na základě Dunnova post hoc testu poskytujícího srovnání mezi jednotlivými skupinami. Výsledky analýzy vidíme na obrázku 22. **Nulovou hypotézu H6.1 nemůžeme na základě těchto dat přijmout.**

**Obrázek 22:** Průměrné časy pohybu (a) a *freezingu* (b) u jednotlivých skupin.



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru. Lišty pak značí výsledek Dunnova testu – statistickou signifikanci rozdílů průměrů jednotlivých skupin. \* -  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$

### Test repetitivního chování (marble burying test)

Zde pracujeme s počtem zahrabaných kuliček – ten se pohyboval v intervalu (0;20). Pracujeme s kontingenční tabulkou (viz Tab. 3). Pro porovnání rozložení četností využijeme Pearsonův  $\chi^2$  test.

$$\chi^2 (28) = 24,49; p = 0,658$$

Nepozorujeme zde žádný signifikantní vztah mezi skupinou a počtem zahrabaných kuliček a **nulovou hypotézu H7 nelze zamítnout**.

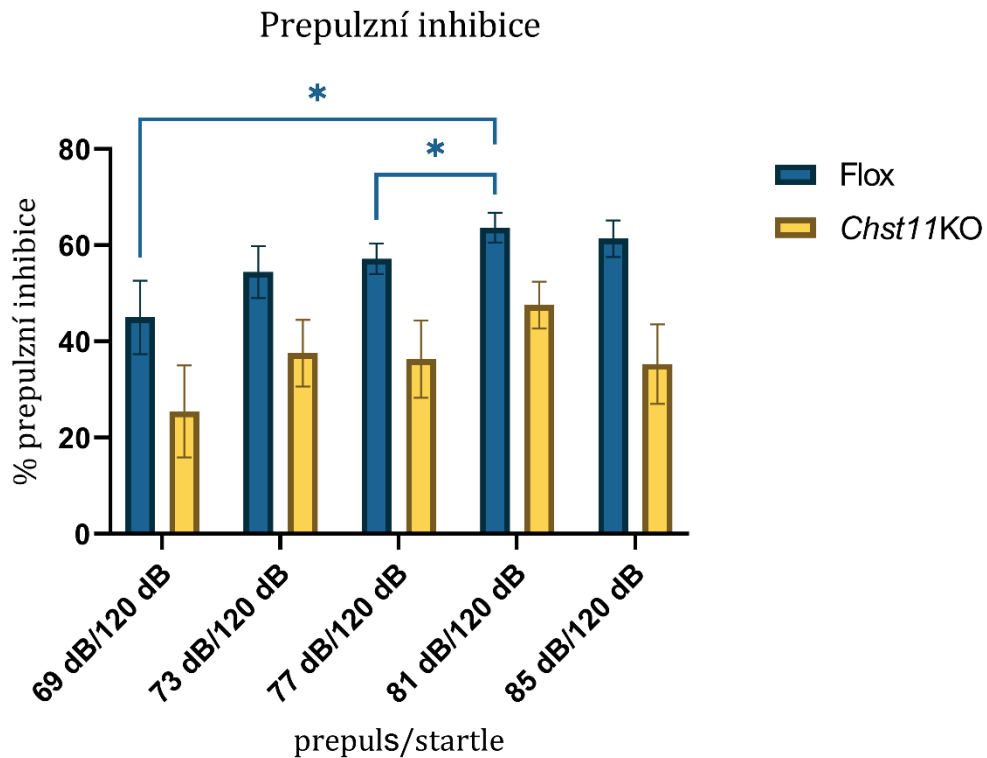
**Tab. 3:** Ukázka kontingenční tabulky získaná z marble burying testu

	10	11	12	13	14	15	16	...
Cre	0	0	3	1	1	2	0	
Flox	1	1	0	1	1	1	1	
Chst11KO	1	0	0	0	1	2	1	

### Test prepulzní inhibice

V tomto testu nás zajímá, o kolik % se utlumila úleková reakce myši po přehrání prepulzního podnětu před *startle* podnětem. Z důvodu extrémní časové náročnosti času jsme jej provedli pouze mezi skupinami *Chst11KO* a *Flox*. Průměrné % prepulzní inhibice pro obě skupiny vidíme obrázku 23.

**Obrázek 23:** Graf zobrazující % prepulzní inhibice pro jednotlivé intenzity zvukových impulzů.



Pozn.: Chybové úsečky značí střední chybu průměru. Hodnoty na ose x jsou formátovány jako intenzita prepulzu/intenzita startlu. Povšimněme si mírného nárůstu v procentu PPI u kontrolní skupiny, zatímco u Chst11KO míra PPI spíše kolísá.

Pro analýzu získaných dat jsme využili dvoucestnou ANOVU a získali výsledek (uvádíme pouze rozdíl mezi skupinami):  $F(1, 23) = 6,05$ ,  $*p = 0,022$ . **Můžeme tedy přijmout alternativní hypotézu H8.**

## 7.0 Výsledky ověření platnosti statistických hypotéz

Shrneme si nyní stručně všechny výsledky provedené analýzy dat ze všech behaviorálních testů.

### Morrisovo vodní bludiště:

- **H1.1:** Chst11KO myši v testu dlouhodobé paměti v Morrisově vodním bludišti naleznou cíl za kratší čas než myši z kontrolních Cre a Flox skupin.

Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 30) = 3,46$ ,  $*p = 0,044$ . **Alternativní hypotézu přijímáme.**

- **H1.2:** *Průměrný čas strávený hledáním cíle v testu přeučení je u Chst11KO nižší než u kontrolních skupin.*  
Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 30) = 1,87$ ,  $p = 0,172$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**
- **H1.3:** *Průměrné paměťové indexy získané v testu krátkodobé paměti se mezi skupinami liší.*  
 $F(2, 30) = 0,22$ ;  $p = 0,809$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**
- **H1.4:** *Chst11KO myši v testu probe 1 testu tráví větší procento času ve virtuální cílové zóně, kde byl naposledy umístěný cíl než kontrolní skupiny.*  
Dvoucestná ANOVA:  $F(2, 30) = 0,93$ ;  $p = 0,406$  + Tukey (\*\* $p < 0,01$ ). **Přijímáme alternativní hypotézu,**
- **H1.5** *Chst11KO myši v testu probe 2 testu tráví větší procento času ve virtuální cílové zóně, kde byl naposledy umístěný cíl než kontrolní skupiny.*  
Dvoucestná ANOVA:  $F(2, 30) = 6,531$ ; \*\* $p = 0,004$  + Tukey ( $p > 0,05$ ). **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**

#### Test spontánní alternace:

- **H2.1** *Procento správných alternací je u Chst11KO vyšší než u Cre a Flox myší.*  
 $F(2, 30) = 1,22$ ;  $p = 0,309$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**
- **H2.2** *Průměrná chybovost Chst11KO je nižší než u Cre a Flox myší.*  
 $F(2, 30) = 0,33$ ;  $p = 0,725$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout**

#### SNOR test:

- **H3** *Rozdíly diskriminačních indexů času stráveného s novým objektem mezi Chst11KO jedinci a Cre a Flox se zvětšujícím časovým intervalem mezi Sample a Choice fází rostou.*  
Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 29) = 19,72$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . **Přijímáme alternativní hypotézu.**

#### Social recognition test:

- **H4.1** *Sociabilita – rozdíly mezi časem stráveným s druhou myší vs. prázdnou klecí během testu sociální rekognice se mezi skupinami liší.*  
Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 30) = 3,934$ ; \* $p = 0,0304$ . **Přijímáme alternativní hypotézu.**
- **H4.2** *2 Social novelty – rozdíly mezi časem stráveným s novou myší a známou myší se mezi skupinami liší.*  
Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 30) = 4,27$ ; \* $p = 0,023$ . **Přijímáme alternativní hypotézu.**

**Open arena:**

- **H5:** *Procento času strávené ve středové oblasti arény je u Chst11KO myši nižší než u kontrolních Cre a Flox skupin.*

Dvoucestná ANOVA;  $F(2, 23) = 1,11$ ;  $p = 0,348$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**

**O-maze:**

- **H6.1** *Čas strávený pohybem v otevřených zónách vyvýšeného bludiště je u Chst11KO skupiny nižší než u kontrolních skupin.*

Kruskal-Wallisova ANOVA:  $H = 1,74$ ;  $p = 0,419$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**

- **H6.2** *Chst11KO myši stráví více času freezingem než kontrolní skupiny.*
- Kruskal-Wallisova ANOVA;  $H = 18,09$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . **Přijímáme alternativní hypotézu**

**Marble burying test:**

- **H7** *Rozložení četnosti počtu zahrabaných kuliček se mezi skupinami liší.*
- Pearsonův  $\chi^2$  test;  $\chi^2(28) = 24,49$ ;  $p = 0,658$ . **Nulovou hypotézu nelze zamítnout.**

**Prepulzní inhibice:**

- **H8** *Procento prepulzní inhibice pro jednotlivé intenzity zvukových impulzů se mezi skupinami Chst11KO a Flox liší.*
- Dvoucestná ANOVA;  $F(1, 23) = 6,05$ , \* $p = 0,022$ . **Přijímáme alternativní hypotézu**

## 8 DISKUZE

V naší práci jsme se pomocí behaviorálních testů a statistické analýzy z nich získaných dat pokusili popsat rozdíly mezi experimentální skupinou Chst11KO a dvěma kontrolami ze skupin Cre a Flox. Snažili jsme se potvrdit, že myši z experimentální skupiny budou mít lepší paměť, ale zároveň budou vykazovat změny v chování, které by z nich mohly učinit dobrý model pro výzkum psychóz. Shrňme si nyní získané výsledky.

### **Chst11KO myši dosahují lepších výsledků v testech dlouhodobé paměti.**

Jak test dlouhodobé paměti v MWM, tak test deklarativní paměti SNOR odhalily statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami a z výsledků je patrné, že Chst11KO skupina ostatní dvě skupiny v testech dlouhodobé paměti předčí. V testu MWM se jedná o relativně malý rozdíl (viz obr. 15). Ten jsme však podpořili provedením probe 1 testu, kde vidíme signifikantně větší preferenci cílové zóny, ve které byl umístěn ostrůvek během týdne testování dlouhodobé paměti (obrázek 17a).

Z testu SNOR jsme pak získali vysoce signifikantní výsledky ve prospěch experimentální skupiny (obr. 19). Jde pravděpodobně o přímý důsledek knock-outu bránícího vzniku inhibiční 4-sulfatace, který má za následek plastičtější perineurální síť. Rombergová a kolektiv (2013) popsali podobnou situaci – využili stejný design a zkoumali paměť myší s knock-outem link proteinu (Ctrl1/HALPN1), který perineuronální síť oslabil. I tyto myši dokázali bezpečně rozeznat nový podnět od starého i po 48 hodinách. Podobných výsledků dosáhly i kontroly po aplikaci chondroitinázy ABC (Romberg et al., 2013).

### **Krátkodobá paměť a pracovní paměť Chst11KO se od kontrolních skupin významně neliší. Zlepšení nepozorujeme ani u testu přeučení.**

K tomuto závěru jsme došli po analýze ostatních testů provedených v MWM a testu spontánní alternace (viz obrázky 16, 17 a 18) – v těchto testech nedosahovaly KO myši žádných signifikantně lepších výsledků než kontrolní skupiny. V grafech vidíme, že je Flox skupina dokonce předčí. Důvodem by mohla být spojitost těchto úloh s prostorovou pamětí, jelikož narušení perineurálních sítí vede i ke změně

reprezentace prostoru z důvodu ovlivnění činností mřížkových buněk (více v Fyhn et al., 2008) mediálního entorhinálního kortexu (Christensen et al., 2021).

Absenci významných rozdílů v obou proměnných analyzovaných v testu spontánní alternace lze vysvětlit mladým věkem zvířat. Tento test obvykle zachytává poruchy pracovní paměti a s úspěchem jej používají výzkumíci zabývající se například Alzheimerovou chorobou (Kraeuter et al., 2019). Pravděpodobně bychom významnějšího rozdílu dosáhli zopakováním testu na starších jedincích, což je podnětem pro další studii.

Test přeučení a probe testy nepřinesly signifikantní výsledky ve prospěch *Chst11KO* skupiny, i přesto jsme z nich získali cennou informaci, která je podnětem k pokračování výzkumu – zejména na obrázku 17b (grafu probe testu provedeného po testu přeučení) vidíme, že tyto myši hledaly cíl jak na místě, kde byl během testu dlouhodobé paměti, i na místě, kde byl v testu přeučení. Poukazuje to na jistou rigiditu v učení, což hraje ve prospěch odpovědi na naši druhou výzkumnou otázku.

### **Chst11KO skupina je více sociabilní.**

Obě analyzované fáze social recognition testu nám poskytly signifikantní výsledky – pozorujeme zvýšenou sociabilitu, ale také vyšší preferenci nového jedince (social novelty). Jedná se o poměrně překvapivý výsledek, jelikož v dále rozebíraných testech vykazují zvýšenou míru anxiety.

Jedním z důvodů může být skutečnost, že v námi zvoleném diskriminačním designu měla testovaná myš plnou kontrolu nad svým prostředím. Obě prezentované myši byly v malých klíčkách a nehrozilo prakticky žádné riziko konfliktu mezi jedinci. Jiného výsledku bychom pravděpodobně dosáhli při využití jiného designu, kde by se mohla volně pohybovat i prezentovaná myš (více např. Choleris et al., 2009) - pak bychom pravděpodobně dosáhli jiných výsledků (J. Růžička, osobní sdělení, 22. 3. 2022). Jak vidíme, téma sociability *CS4KO* myši je podnětem pro další výzkum.

### **Myši z experimentální skupiny Chst11KO více podléhají freezingu**

*Freezing*, neboli strnutí/zamrznutí na místě, je jednou z úlekových reakcí, kterou můžeme pozorovat také u lidí. Z výsledků získaných v testu 0-maze vidíme vysoce signifikantní rozdíl v čase *freezingu* *KO* skupiny a kontrol (obr. 21a). Některé

myši zamrzly na místě po dobu desítek sekund, což značí podstatně větší míru anxiety než je tomu u kontrolních skupin Cre a Flox.

Vztahem perineurálních sítí a anxiety se zabýval Murthy a kolektiv v roce 2019, kdy pozorovali zvýšenou hustotu perineurálních sítí obklopující PV interneurony u myši předčasně odstavených od matky, V případě vrozené úzkostnosti pozorujeme opačný vztah, zjišťujeme snížení hustoty perineurálních sítí (Lee & Lee, 2021). Je tedy možné, že oslabení PNS v okolí PV interneuronů vedlo ke změnám popisovaným ve výše zmíněné studii.

### **V dalších testech anxiety nepozorujeme žádné rozdíly mezi skupinami.**

Navzdory očekávání se nám v testech *open arena* a *marble burying* zjistit žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami. V OA, určené k testu vrozené úzkostnosti (Lee & Lee, 2021), strávily všechny testované skupiny v „bezpečnější“ okrajové zóně podstatně více času než ve středové zóně, což vidíme také v grafu na obrázku 20. Nesignifikantní výsledek může být způsoben mladým věkem zvířat, nebo jejich nedostatečným počtem (v době testování OA nebyla první skupina kompletní, jelikož šlo o úvodní test celé série).

Z podobného důvodu jsme získali nesignifikantní výsledky z testu *marble burying* – ve skupinách jsme měli 10-12 myší, což je nedostatečný počet pro testování rozdělení četností. Jako řešení se nabízí replikace testu v případné další studii, s větším počtem jedinců ve skupinách.

### **U Chst11KO skupiny je výrazně sníženo procento prepulzní inhibice.**

Test PPI jsme provedli pouze na skupinách KO a kontrolních Flox myších, které jsou nejbližší nijak neupraveným wild type myším (J. Růžička, osobní sdělení, 21. 3. 2022). Jak vidíme na grafu (obr. 22). Procento inhibice u Flox myší se zvyšující intenzitou prepulzu roste, zatímco u *Chst11KO* značně kolísá. Při pohledu na raw data soubor jsme si povšimli, že KO myši vykazují úlekovou reakci i na slabší, prepulzní podněty.

Tento významný rozdíl v chování zkoumaných skupin nám poskytl další střípek informací, abychom mohli odpovědět, zda námi provedený knockout chondroitin 4-sulfatotransferasy na parvalbuminových interneuronech vedl ke změně v chování podobné modelům schizofrenie.



## **Co už o Chst11 knock-outu víme?**

Tato bakalářská práce prezentuje mezivýsledky téměř rok trvající studie zahrnující behaviorální testování ve 3 a 6 měsících věku zvířat. Pracujeme zde pouze s tříměsíčními zvířaty, která v tomto věku stále nemají uzavřené kritické periody (v 6 měsících už jsou kritické periody uzavřeny, více např. Galtrey et al., 2008). I přesto jsme v určitých aspektech odhalili statisticky významné rozdíly. Připomeňme si, že už po narození procento propustnější 6-sulfatace v CNS klesá (Carulli et al., 2010, citováno v Fawcett et al., 2019a) a PV interneurony jsou typem neuronu nejčastěji exprimujícím perineurální síť (Favuzzi, 2017). Snadno si tedy můžeme odvodit, že námi způsobená změna v sulfatačním epitopu CS měla poměrně dalekosáhlé důsledky také u mladých zvířat.

Naše první výzkumná otázka zní: **„Ovlivní knock-out Chst11 paměť myší z experimentální skupiny?“** Na základě našich výsledků můžeme říci, že **ano**, musíme však dodat malé „ale“ – KO způsobil zlepšení dlouhodobé paměti, *ale* v krátkodobé a pracovní paměti nepozorujeme žádné signifikantní rozdíly mezi experimentální skupinou a kontrolami. Tuto otázku si znovu pokládáme v analýze dat od stejných myší, ale až po testu provedeném v 6 měsících, popřípadě na starších zvířatech, kde můžeme pozorovat úbytek pracovní paměti (např. Kraeuter et al., 2019).

Položme si nyní znovu druhou výzkumnou otázku: **„Znamená Chst11 knock-out výraznou změnu v chování a mohla by tato zvířata sloužit jako model psychózy?“**

Získali jsme několik výsledků mluvících ve prospěch kladné odpovědi – pozorujeme jistou rigiditu v přeučování (obrázky 15 a 16b) a výrazně vyšší čas *freezingu* v testu zaměřeného na anxieta a významně odlišné chování při testu prepulzní inhibice. Vidíme však také statisticky významný nárůst sociability (obrázek 19), který pro nás byl překvapením a budeme se jím zabývat dále. Další prováděné testy, OA a marble burying test, nám však jednoznačnou odpověď neposkytují a pravděpodobně bude nutné provést analýzu znovu na datech od starších zvířat, popřípadě zreplikovat studii s větším počtem jedinců.

Nezapomeňme však na důležitou roli histologických metod při zkoumání změn v perineurálních sítí. Jak víme, v mozku schizofrenních pacientů pozorujeme úbytek

exprese parvalbuminu, snižující funkci PV interneuronů, což může znamenat jednu z příčin kognitivního úbytku schizofrenních pacientů (Enwright et al., 2016).

Výsledky behaviorálních testů je tedy ještě potřeba podpořit analýzou histologických preparátů (řezů oblasti CA1 hippocampu), kde sledujeme počet synapsí a míru exprese parvalbuminu. Ta nám pomůže objasnit vztah mezi schizofrenií, expresí parvalbuminu a změnami hustoty v PNS. Tato analýza však zůstává nad rámec rozsahu této bakalářské práce. Abychom mohli kladně odpovědět na druhou výzkumnou otázku, musíme získat silnější argumenty.

## 9 ZÁVĚR

Pomocí behaviorálních testů jsme se pokusili odpovědět na dvě otázky: (1) Jak uměle indukovaná změna sulfatačního epitopu (*Chst11* KO) perineurálních sítí ovlivní paměť? (2) Povede tato změna k projevům psychózy? Shrňme si nyní poznatky získané analýzou naměřených dat:

- Pozorujeme významné zlepšení dlouhodobé paměti u experimentální *Chst11*KO skupiny, a to jak v prostorové navigaci, tak v deklarativní paměti.
- *Chst11*KO skupina má problém s přečtením při změně lokace cíle.
- V testech krátkodobé paměti a pracovní paměti nepozorujeme žádné významné rozdíly ve prospěch experimentální skupiny. Důvodem může být nízký věk zvířat, a proto budeme data analyzovat také u starších jedinců.
- *Chst11*KO myši vykazují vyšší sociabilitu. Při volbě mezi známou a novou myší preferují kontakt s novou.
- Na základě testu *0-maze* prověřujícího míru anxiety můžeme potvrdit významně vyšší výskyt *freezingu* (ustrnutí). Testy OA a marble burying však signifikantní rozdíly v anxiety mezi skupinami neodhalili.
- Procento prepulzní inhibice je u myší z experimentální skupiny významně nižší než u Flox kontroly.

Na otázku (1) můžeme odpovědět kladně, s upřesněním, že signifikantní zlepšení pozorujeme u mladých myší pouze v případě dlouhodobé paměti. Kladnou odpověď na otázku (2) jsme analýzou našich dat podpořili, je však potřeba ji podpořit také histologickými metodami, které překračují rámec bakalářské práce.

## 10 SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá rolí sulfatačních epitopů perineurálních sítí na psychické funkce jedince. Perineurální sítě jsou mřížkovité struktury, které nalzáme v CNS obratlovců, kde obklopují určité typy neuronů (př. parvalbuminové interneurony) (Celio & Blümcke, 1994; Fawcett et al., 2019a). Skládají se z proteoglykanů, ale také z hyaluronanu či link proteinů (Sorg et al., 2016). V popředí našeho zájmu jsou právě proteoglykany – makromolekuly obsahující proteinový základ a na něm kovalentně navázané glykosaminoglykanové řetězce (GAG) – polysacharidy s opakující se disacharidovou jednotkou (např. Bandtlow & Zimmermann, 2000). Jedním z nejčastěji vyskytujících se GAG řetězců je chondroitin sulfát (CS), obsahující ve své molekule sulfátovou skupinu ( $-\text{SO}_3^-$ ). Ta může být v disacharidové jednotce navázaná na pozici 4 či 6 (Fawcett et al., 2019a).

Právě pozice sulfátové skupiny v proteoglykanech ovlivňuje jejich funkci, což v konečném důsledku určuje vlastnosti celé PNS. Zatímco 6-sulfatace (C6S) umožňuje větší propustnost PNS pro tvorbu nových synapsí (Miyata et al., 2012), 4-sulfatace (C4S) je inhibiční a vzniku nových synapsí brání. Krátce po narození převažuje 6-sulfatace, ale v průběhu let je postupně nahrazována 4-sulfatací, což vede ke snížení tvorby synapsí – a tedy i schopnosti učení a paměti (Wang et al., 2008). Perineurální sítě ovlivňují fyziologii neuronů a mají tak vliv na celou řadu psychických funkcí i poruch (př. Entwright et al., 2015).

V této práci se zabýváme 4-sulfatací chondroitin sulfátu na myším modelu. Jak už jsme zmínili v kapitole 3.2, nejlépe zjistíme funkci nějaké komponenty tak, že ji vymažeme a sledujeme důsledky. Pomocí knock-outu (vymazání) genu *Chst11* kódujícího enzym zodpovědný za vznik inhibičních C4S jsme získali zvířata, u kterých převažuje permissivní sulfatační epitop C6S. Zajímá nás tedy, **zda díky vyšší plasticitě synapsí budou mít tato zvířata lepší schopnosti paměti a učení.**

Knock-out jsme provedli selektivně na již zmíněných PV interneuronech, o kterých víme, že jejich dysfunkce je spojená se schizofrenií (Lewis et al., 2012). Změny se projeví i v perineurálních sítích, nevíme, zda se jedná o příčinu či následek

onemocnění (Entwright et al., 2015; Mauney et al., 2013). Omezení 4-sulfatace vede k narušení struktury PNS. Proto nás dále zajímá, **zda změna v sulfatačním epitopu perineurálních sítí způsobí změny v chování, které bychom mohli považovat za psychotické projevy.**

Pracovali jsme se třemi skupinami myší – jedna experimentální (*Chst11KO*) a dvě kontrolní, pocházející z různých kmenů. Provedli jsme tedy sérii osmi behaviorálních testů zaměřených na různé typy paměti a projevy anxiety, které jsme následně statisticky analyzovali.

**Na základě dat jsme tak zjistili, že zkoumaný knock-out *Chst11* vedl u experimentální skupiny k statisticky významnému zlepšení dlouhodobé paměti** – a to jak v testu prostorové paměti (\* $p < 0,05$ ), tak v testu deklarativní paměti (\*\* $p < 0,001$ ). V testech pracovní paměti a krátkodobé paměti nevedl knock-out k signifikantnímu zlepšení, což může být způsobeno narušenou prostorovou reprezentací způsobenou knock-outem (více v Christensen et al., 2021), ale také nízkým věkem zvířat – rozdíly v krátkodobé paměti se prohlubují až ve vyšším věku, a pravděpodobně bychom signifikantní výsledky získali až od starších zvířat.

Druhá otázka, tedy zda knock-out *Chst11* vedl k psychotickým projevům u experimentální skupiny, zůstává po provedení statistické analýzy zodpovězená jen napůl. V testu 0-maze zaměřeném na sledování anxiety v potenciálně nebezpečném prostředí jsme u *Chst11KO* pozorovali výrazně vyšší výskyt freezingu (ustrnutí při pocitu ohrožení) než u kontrolních skupin (\*\* $p < 0,0001$ ). Nárůst úzkostnosti může souviset se změnou struktury PNS, ke které knock-out genu *Chst11* vedl (Lee & Lee, 2021).

Signifikantní rozdíl jsme zjistili také v testu prepulzní inhibice – jde o jev, který pozorujeme, když zvířeti nejdříve přehrajeme méně hlasitý zvuk (*prepulz*), a až poté velmi intenzivní zvukový podnět (tzv. *startle*). Úleková reakce zvířete by měla být nižší, než pokud přehrajeme pouze *startle* (Geyer et al., 2002). Míra prepulzní inhibice u sledované *Chst11KO* skupiny byla signifikantně nižší než u použité kontroly (\* $p < 0,05$ ). Zbývající testy anxiety nám však signifikantní výsledky neposkytly.

Ve prospěch kladné odpovědi na druhou výzkumnou otázku hraje také provedený behaviorální test zaměřený na přeučení – myši znaly lokaci cíle ve vodním bludišti a byly na něj naučené. Po změně pozice cíle jsme sledovali, jak rychle se zvířata

této změně přizpůsobí. U *Chst11KO* přizpůsobení prakticky nepozorujeme, což může vypovídat o snížené plasticitě učení.

Z provedených testů sociability a fenoménu *social novelty* (preference interakce s novým jedincem oproti již známému) jsme zjistili, že je *Chst11KO* o málo sociabilnější než kontrolní skupiny. Jestliže mají tyto myši na výběr mezi známým a novým jedincem, věnují svou pozornost novému jedinci (\*\* $p < 0,01$ ). Tento výsledek nás překvapil, jelikož jsme sociabilitu *Chst11KO* očekávali spíše sníženou. Jedním z důvodů může být skutečnost, že v námi zvoleném diskriminačním designu měla testovaná myš plnou kontrolu nad svým prostředím. Obě prezentované myši byly v malých klíčkách a nehrozilo prakticky žádné riziko konfliktu mezi jedinci. V případě, že by prezentované myši měly možnost volného pohybu, je možné, že by se vyskytla stresová reakce (J. Růžička, osobní sdělení, 22. 3. 2022).

Abychom mohli jednoznačně odpovědět, zda námi provedená změna sulfatačního epitopu perineurálních sítí vedla k projevům srovnatelným se schizofrenií, musíme se spolehnout také na mikroskop a histologické metody, díky kterým můžeme propojit výsledky statistických analýz chování zvířat s morfologickými změnami v PNS vyvolanými knock-outem – zejména změny v počtu synapsí a míře exprese parvalbuminu. Tak se nám možná podaří objasnit vztah mezi schizofrenií, expresí parvalbuminu a změnami hustoty perineurálních sítí. Tato analýza však zůstává nad rámec rozsahu této bakalářské práce. **Abychom mohli kladně odpovědět na druhou výzkumnou otázku, musíme pomocí histologických metod získat silnější argumenty.**

# LITERATURA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Archer, T., Fredriksson, A., Lewander, T., & Söderberg, U. (1987). Marble burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam. *Scandinavian Journal of Psychology*, 28(3), 242-249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.1987.tb00761.x>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>
- Bandtlow, C. E., & Zimmermann, D. R. (2000). Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins. *Physiological Reviews*, 80(4), 1267-1290. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1267>
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. A. (2015). *Neuroscience: Exploring The Brain, Enhanced Edition* (4th edition). Jones & Bartlett Learning.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00291-1)
- Beranová, M., & Toran, Z. (2002). *Principy a příklady imunohistochemie*. Retrieved March 11, 2022, from [http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc\\_low\\_res.pdf](http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_low_res.pdf)
- Bitanhirwe, B. K. Y., & Woo, T. -U. W. (2014). Perineuronal nets and schizophrenia: The importance of neuronal coatings, 45, 85-99. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.018>
- Bowles, B., Crupi, C., Mirsattari, S. M., Pigott, S. E., Parrent, A. G., Pruessner, J. C., Yonelinas, A. P., & Kohler, S. (2007). Impaired familiarity with preserved recollection after anterior temporal-lobe resection that spares the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16382-16387. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705273104>
- Bradbury, E. J., & Carter, L. M. (2011). Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Research Bulletin*, 84(4-5), 306-316. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.06.015>
- Brennan, P. A., & Keeverne, E. B. (1997). Neural Mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology*, 51(4), 457-481. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00069-X)
- Broekkamp, C. L., Rijk, H. W., Joly-Gelouin, D., & Lloyd, K. L. (1986). Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, 126(3), 223-229. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(86\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(86)90051-8)
- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(1), 51-61. <https://doi.org/10.1038/35049064>
- Brückner, G., Hausen, D., Härtig, W., Drlicek, M., Arendt, T., & Brauer, K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(3), 791-805. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00071-8)
- Cabungcal, J. -H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9130-9135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>

- Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., & Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(24), 13372-13377. <https://doi.org/10.1073/pnas.230362997>
- Carstens, K. E., Phillips, M. L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R. J., & Dudek, S. M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *36*(23), 6312-6320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016>
- Carulli, D., & Verhaagen, J. (2021). An Extracellular Perspective on CNS Maturation: Perineuronal Nets and the Control of Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052434>
- Celio, M. R., & Blumcke, I. (1994). Perineuronal nets — a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Research Reviews*, *19*(1), 128-145. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90006-X)
- Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S., & Vitellaro-Zuccarello, L. (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences*, *21*(12), 510-515. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01298-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01298-3)
- Ciccarelli, A., Weijers, D., Kwan, W., Warner, C., Bourne, J., & Gross, C. T. (2021). Sexually dimorphic perineuronal nets in the rodent and primate reproductive circuit. *Journal of Comparative Neurology*, *529*(13), 3274-3291. <https://doi.org/10.1002/cne.25167>
- Cinalli Jr., D. A., Cohen, S. J., Guthrie, K., & Stackman Jr., R. W. (2020). Object Recognition Memory: Distinct Yet Complementary Roles of the Mouse CA1 and Perirhinal Cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.527543>
- Cope, E. C., Zych, A. D., Katchur, N. J., Waters, R. C., Laham, B. J., Diethorn, E. J., Park, C. Y., Meara, W. R., & Gould, E. (2021). Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Molecular Psychiatry*, 1-5. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01174-2>
- Cowan, R. L., Wilson, C. J., Emson, P. C., & Heizmann, C. W. (1990). Parvalbumin-containing gabaergic interneurons in the rat neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology*, *302*(2), 197-205. <https://doi.org/10.1002/cne.903020202>
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 105-135. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.109>
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 259-268. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>
- Eill, G. J., Sinha, A., Morawski, M., Viapiano, M. S., & Matthews, R. T. (2020). The protein tyrosine phosphatase RPTPζ/phosphacan is critical for perineuronal net structure. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(4), 955-968. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49907-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49907-8)
- Engel, J., & Chiquet, M. (2011). On Overview of Extracellular Matrix: Structure and Function. In R. P. Mecham (Ed.), *The Extracellular Matrix: an Overview* (1st ed., pp. 1-40). Springer Science & Business Media, 2011. <https://books.google.cz/>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Enwright, J. F., Sanapala, S., Foglio, A., Berry, R., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2016). Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *41*(9), 2206-2214. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.24>



- Evers, M. R., Salmen, B., Bukalo, O., Rollenhagen, A., Bösl, M. R., Morellini, F., Bartsch, U., Dityatev, A., & Schachner, M. (2002). Impairment of L-type Ca<sup>2+</sup> Channel-Dependent Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Deficient in the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-C. *The Journal of Neuroscience*, *22*(16), 7177-7194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-07177.2002>
- Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C. M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., & Rico, B. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron*, *95*(3), 639-655.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028>
- Fawcett, J. W., Oohashi, T., & Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(8), 451-465. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0196-3>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195-4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Freund, T. F., & Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron*, *56*(1), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.012>
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *12*(7), 897-904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>
- Fuchs, E. C., Zivkovic, A. R., Cunningham, M. O., Middleton, S., LeBeau, F. E. N., Bannerman, D. M., Rozov, A., Whittington, M. A., Traub, R. D., Rawlins, J. N. P., & Monyer, H. (2007). Recruitment of Parvalbumin-Positive Interneurons Determines Hippocampal Function and Associated Behavior. *Neuron*, *53*(4), 591-604. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.031>
- Fyhn, M., Hafting, T., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. -B. (2008). Grid cells in mice. *Hippocampus*, *18*(12), 1230-1238. <https://doi.org/10.1002/hipo.20472>
- Galtrey, C. M., Kwok, J. C. F., Carulli, D., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. (2008). Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, *27*(6), 1373-1390. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06108.x>
- Geyer, M. A., McIlwain, K. L., & Paylor, R. (2002). Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Molecular Psychiatry*, *7*(10), 1039-1053. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001159>
- Giamanco, K. A., & Matthews, R. T. (2012). Deconstructing the perineuronal net: Cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience*, *218*, 367-384. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.055>
- Giamanco, K. A., Morawski, M., & Matthews, R. T. (2010). Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, *170*(4), 1314-1327. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.032>
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science*, *325*(5945), 1258-1261. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, 1-20. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1)
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2016). The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cerebral Cortex*, *23*(3), 1931-1943. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw021>
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(11), 877-888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>

- Horii-Hayashi, N., Okuda, H., Tatsumi, K., Ishizaka, S., Yoshikawa, M., & Wanaka, A. (2008). Localization of chondroitin sulfate proteoglycan versican in adult brain with special reference to large projection neurons. *Cell and Tissue Research*, 334(2), 163-177. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0698-1>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *The Journal of Physiology*, 206(2), 419-436. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009022>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a004903-a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
- Choleris, E., Clipperton-Allen, A. E., Phan, A., & Kavaliers, M. (2009). Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(4), 442-459. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.003>
- Christensen, A. C., Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dragly, S. -A., Sutterud, H., Blackstad, J. S., Fyhn, M., & Hafting, T. (2021). Perineuronal nets stabilize the grid cell network. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20241-w>
- Khoo, G. H., Lin, Y. -T., Tsai, T. -C., & Hsu, K. -S. (2019). Perineuronal Nets Restrict the Induction of Long-Term Depression in the Mouse Hippocampal CA1 Region. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6436-6450. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1526-1>
- Kim, J. M., Kim, D. H., Lee, Y., Park, S. J., & Ryu, J. H. (2014). Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Research*, 1552, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.024>
- Kos, C. H. (2004). Methods in Nutrition Science: Cre/loxP System for Generating Tissue-specific Knockout Mouse Models. *Nutrition Reviews*, 62(6), 243-246. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00046.x>
- Koskinen, M. -K., van Mourik, Y., Smit, A. B., Riga, D., & Spijker, S. (2020). From stress to depression: development of extracellular matrix-dependent cognitive impairment following social stress. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73173-2>
- Kozel, B. A., Mecham, R. P., & Roselbloom, J. (2011). Elastin. In R. P. Mecham (Ed.), *The Extracellular Matrix: an Overview* (1st ed., pp. 267-300). Springer Science & Business Media, 2011. <https://books.google.cz/>
- Kraeuter, A. -K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Pre-Clinical Models*, 105-111. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10)
- Kwok, J. C. F., Carulli, D., & Fawcett, J. W. (2010). In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of Neurochemistry*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x>
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 722-729. <https://doi.org/10.1038/nrn3550>
- Lee, J., & Lee, K. (2021). Parvalbumin-expressing GABAergic interneurons and perineuronal nets in the prelimbic and orbitofrontal cortices in association with basal anxiety-like behaviors in adult mice. *Behavioural Brain Research*, 398. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112915>
- Lensjø, K. K., Christensen, A. C., Tennøe, S., Fyhn, M., & Hafting, T. (2017). Differential expression and cell-type specificity of perineuronal nets in hippocampus, medial entorhinal cortex, and visual cortex examined in the rat and mouse. *eneuro*, 4(3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0379-16.2017>
- Levy, D. R., & Yizhar, O. (2018). Stress and sociability. *Nature Neuroscience*, 21(3), 304-306. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0088-2>

- Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., & Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 35(1), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004>
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (126). <https://doi.org/10.3791/55718>
- Mauney, S. A., Athanas, K. M., Pantazopoulos, H., Shaskan, N., Passeri, E., Berretta, S., & Woo, T. -U. W. (2013). Developmental Pattern of Perineuronal Nets in the Human Prefrontal Cortex and Their Deficit in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 74(6), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.007>
- McDonald, A. J., Hamilton, P. G., & Barnstable, C. J. (2018). Perineuronal nets labeled by monoclonal antibody VC1.1 ensheath interneurons expressing parvalbumin and calbindin in the rat amygdala. *Brain Structure and Function*, 223(3), 1133-1148. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1542-8>
- Mikami, T., & Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(10), 4719-4733. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>
- Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., Margolis, R. K., & Margolis, R. U. (1998). Differential Regulation of Expression of Hyaluronan-Binding Proteoglycans in Developing Brain: Aggrecan, Versican, Neurocan, and Brevican. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(2), 207-212. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8759>
- Miranda, M., & Bekinschtein, P. (2018). Plasticity Mechanisms of Memory Consolidation and Reconsolidation in the Perirhinal Cortex. *Neuroscience*, 370, 46-61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.002>
- Miyata, S., Nishimura, Y., & Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Research*, 1150, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.066>
- Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., & Kitagawa, H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neuroscience*, 15(3), 414-422. <https://doi.org/10.1038/nn.3023>
- Morawski, M., Dityatev, A., Hartlage-Rübsamen, M., Blosa, M., Holzer, M., Flach, K., Pavlica, S., Dityateva, G., Grosche, J., Brückner, G., & Schachner, M. (2014). Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0046>
- Morawski, M., Reinert, T., Meyer-Klaucke, W., Wagner, F. E., Tröger, W., Reinert, A., Jäger, C., Brückner, G., & Arendt, T. (2015). Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep16471>
- Muir, E., De Winter, F., Verhaagen, J., & Fawcett, J. (2019). Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC. *Experimental Neurology*, 321. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113032>
- Murthy, S., Kane, G. A., Katchur, N. J., Lara Mejia, P. S., Obiofuma, G., Buschman, T. J., McEwen, B. S., & Gould, E. (2019). Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biological Psychiatry*, 85(12), 1011-1020. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.021>
- Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Warburton, E. C., Aggleton, J. P., & Dalley, J. (2015). Perirhinal cortex lesions impair tests of object recognition memory but spare novelty detection. *European Journal of Neuroscience*, 42(12), 3117-3127. <https://doi.org/10.1111/ejn.13106>

- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, 298(5596), 1248-1251. <https://doi.org/10.1126/science.1072699>
- Poitreau, J., Buttet, M., Manrique, C., Poucet, B., Sargolini, F., & Save, E. (2021). Navigation using global or local reference frames in rats with medial and lateral entorhinal cortex lesions. *Behavioural Brain Research*, 413. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113448>
- Pomin, V., & Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/ph11010027>
- Reichelt, A. C. (2020). Is loss of perineuronal nets a critical pathological event in Alzheimer's disease?. *EBioMedicine*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102946>
- Riga, D., Kramvis, I., Koskinen, M. K., van Bokhoven, P., van der Harst, J. E., Heistek, T. S., Jaap Timmerman, A., van Nierop, P., van der Schors, R. C., Pieneman, A. W., de Weger, A., van Mourik, Y., Schoffelmeer, A. N. M., Mansvelder, H. D., Meredith, R. M., Hoogendijk, W. J. G., Smit, A. B., & Spijker, S. (2017). Hippocampal extracellular matrix alterations contribute to cognitive impairment associated with a chronic depressive-like state in rats. *Science Translational Medicine*, 9(421). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8753>
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., Bussey, T. J., Fawcett, J. W., Pizzorusso, T., & Saksida, L. M. (2013). Depletion of Perineuronal Nets Enhances Recognition Memory and Long-Term Depression in the Perirhinal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(16), 7057-7065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013>
- Schmidt, S., Arendt, T., Morawski, M., & Sonntag, M. (2020). Neurocan Contributes to Perineuronal Net Development. *Neuroscience*, 442, 69-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.040>
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely, 2010 §. Získáno z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32010L0063>
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, H., Kwok, J. C. F., & Miquel, M. (2016). Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 36(45), 11459-11468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016>
- Spijker, H. M., & Kwok, J. C. F. (2017). A Sweet Talk: The Molecular Systems of Perineuronal Nets in Controlling Neuronal Communication. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnint.2017.00033>
- Spijker, S., Koskinen, M. -K., & Riga, D. (2020). Incubation of depression: ECM assembly and parvalbumin interneurons after stress, 118, 65-79. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.015>
- Sullivan, C. S., Gotthard, I., Wyatt, E. V., Bongu, S., Mohan, V., Weinberg, R. J., & Maness, P. F. (2018). Perineuronal Net Protein Neurocan Inhibits NCAM/EphA3 Repellent Signaling in GABAergic Interneurons. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24272-8>
- Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P. W., & Kida, S. (2017). Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, 37(15), 4103-4116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017>
- Végh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., van Nierop, P., Mansvelder, H. D., Hol, E. M., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2014). Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0076-z>

- Wang, H., Katagiri, Y., McCann, T. E., Unsworth, E., Goldsmith, P., Yu, Z. -X., Tan, F., Santiago, L., Mills, E. M., Wang, Y., Symes, A. J., & Geller, H. M. (2008). Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *Journal of Cell Science*, *121*(18), 3083-3091. <https://doi.org/10.1242/jcs.032649>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*, *1*(2), 848-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Winslow, J. T. (2003). Mouse Social Recognition and Preference. *Current Protocols in Neuroscience*, *22*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0816s22>
- Yamagata, M., & Sanes, J. R. (2005). Versican in the Developing Brain: Lamina-Specific Expression in Interneuronal Subsets and Role in Presynaptic Maturation. *Journal of Neuroscience*, *25*(37), 8457-8467. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1976-05.2005>
- Yang, S., Gigout, S., Molinaro, A., Naito-Matsui, Y., Hilton, S., Foscarin, S., Nieuwenhuis, B., Tan, C. L., Verhaagen, J., Pizzorusso, T., Saksida, L. M., Bussey, T. M., Kitagawa, H., Kwok, J. C. F., & Fawcett, J. W. (2021). Chondroitin 6-sulphate is required for neuroplasticity and memory in ageing. *Molecular Psychiatry*, *26*(10), 5658-5668. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01208-9>
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix. *Journal of Glaucoma*, *23*, S20-S23. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>

# PŘÍLOHY

## **Seznam příloh:**

1. Seznam použitých zkratek
2. Abstrakt v českém jazyce
3. Abstrakt v anglickém jazyce

# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

C4S	chondroitin-4-sulfát
C6S	chondroitin-6-sulfát
C4ST-1	chondroitin 4-sulfatotransferasa-1
C6ST-1	chondroitin 6-sulfatotransferasa-1
CNS	centrální nervový systém
CS	chondroitinsulfát
CSPG	chondroitinsulfátové proteoglykany
ECM	extracelulární matrix
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
chABC	chondroitináza ABC
KO	knock-out
MWM	<i>Morris water maze</i>
OA	<i>open arena</i>
PNS	perineurální síť
PPI	prepulzní inhbice
Prh	perirhinální
PV	parvalbumin
SNOR	<i>spontaneous novel object recognition</i>
TN-C	tenascin-C
TN-R	tenascin-R

## 2 ABSTRAKT

**Název práce:** Socializace, anxiety a paměť jsou ovlivněny sulfatačním epitopem perineurálních sítí

**Autor práce:** Tereza Klausová

**Vedoucí práce:** RNDr. Jiří Růžička, Ph.D.

**Počet stran a znaků:** 78 stran, 104 896 znaků

**Počet příloh:** 3

**Počet titulů použité literatury:** 103

**Abstrakt (800-1200 zn.):**

Cílem této práce je prozkoumat vliv uměle vyvolané změny v sulfatačním epitopu perineurálních sítí – speciálním typu extracelulární matrix v centrální nervové soustavě – na myším modelu. Pomocí knock-outu (KO) jsme u experimentální skupiny silně zredukovali inhibiční epitop perineurálních sítí C4S, který omezuje synaptickou plasticitu a s přibývajícím věkem způsobuje snížení schopnosti učení. Knock-out jsme provedli lokálně, na parvalbuminových interneuronech, jejichž dysfunkce bývá spojována s psychotickými poruchami. Provedli jsme sérii osmi behaviorálních testů na souboru 34 mladých myší rozdělených do dvou kontrolních skupin ( $n = 12$  a  $n = 12$ ) a jedné experimentální ( $n = 10$ ). Z testů zaměřených na paměť vyšlo najevo signifikantní zlepšení dlouhodobé paměti u knock-outové skupiny. V části testů zaměřených na anxiety se projevují změny v chování podobné modelům psychóz, potenciálně způsobené strukturální změnou v perineurálních sítí obklopujících parvalbuminové interneurony. K potvrzení těchto změn je potřeba provedení histologické analýzy preparátů po ukončení studie.

**Klíčová slova:** extracelulární matrix, perineurální sítě, dlouhodobá paměť, anxiety, behaviorální testy



# 3 ABSTRACT

**Title:** Role of changes in perineuronal nets sulfation epitope in sociability, anxiety and memory

**Author:** Tereza Klausová

**Supervisor:** RNDr. Jiří Růžička, Ph.D.

**Number of pages and characters:** 78 pages, 104 896 characters

**Number of appendices:** 3

**Number of references:** 103

**Abstract (800-1200 characters):**

The aim of this thesis is the exploration of artificially induced change in sulfation epitope of perineuronal nets (a special type of extracellular matrix in the central nervous system) in a mouse model. We use knock-out to significantly reduce the C4S sulfation epitope that causes limitation of synaptic plasticity in ageing animals and therefore limits the abilities to learn and memorize. The knock-out is local, only expressed in perineuronal nets surrounding the parvalbumin interneurons. The dysfunction of this neuron subtype is associated with psychotic disorders. We executed a series of eight behavioural tests using the sample of 34 3-months old mice consisting of two control groups (n = 12 each) and one experimental knock-out group (n=10). Using memory tests, we identified a significant improvement occurring in long-term memory in the experimental group. There was also a significant increase in anxiety-like behaviour similar to psychosis models, potentially caused by structural changes in perineuronal nets around the parvalbumin interneurons. Further histological analysis is needed to confirm the relationship between these changes and perineuronal net structure.

**Key words:** extracellular matrix, perineuronal nets, long-term memory, anxiety, behavioural tests