

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Neurovědy



**Mgr. Dominika Radostová**

**Jednorázová asociační úloha jako základní biologický model epizodické paměti**

One-trial association task as a basic biological model of episodic memory in rats

Dizertační práce

Školitel: prof. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD., DSc.

Praha, 2023

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že práce ani žádná její podstatná část nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podrobností kvalifikačních prací.

V Praze, 22.9.2023

Dominika Radostová

## **Poděkování**

Ráda bych tímto velmi poděkovala svému školiteli a vedoucímu práce prof. RNDr. Aleši Stuchlíkovi, Ph.D., DSc. za pomoc a podporu během celého mého doktorského studia. Srdečné poděkování také náleží mé konzultantce RNDr. Haně Brožce, Ph.D. za velmi cenné rady a praktická školení v nespočtu laboratorních technik. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Oddělení Neurofyzologie Paměti za skvělý kolektiv a inspirující pracovní atmosféru. Konkrétně Mgr. Daniele Kunčické, která je mým vzorem v nekončícím boji proti chaosu. Mgr. Branislavu Krajčovičovi za jeho ochotnou pomoc a hluboké vědecké rozpravy. A Mgr. Lukáši Hejtmánkovi, Ph.D. za jeho technickou pomoc s programováním. Děkuji především také své rodině a blízkým za trpělivost a bezmeznou podporu během celého mého dlouhého doktorského studia.

# **Jednorázová asociační úloha jako základní biologický model epizodické paměti**

## **Abstrakt**

Velmi důležitou strukturou v mozku zvířete i člověka je hipokampus. Při studiu jedné z jeho mnoha funkcí, epizodické paměti u člověka, se výzkum střetává s omezeními neinvazivních metod. V tomto ohledu jsou velmi nápomocné animální modely. Za účelem detailního studia různých součástí této schopnosti, byla v této práci vyvinuta nová behaviorální asociační úloha pro testování asociace časově blízkých ale oddělených stimulů. Testovaná zvířata byla vystavena sekvenci zvukového podmíněného stimulu a nepodmíněného elektrické šoku, mezi kterými byla prodleva 2 vteřiny. 59 % testovaných zvířat si úspěšně osvojilo testovanou asociaci i správnou útekovou reakci pro řešení úlohy. Na základě výsledků by mohla být tzv. Jednorázová úloha párovacího učení s prodlevou cenným nástrojem pro detailnější pochopení incidentálního jednorázového učení zvířat důležitého pro epizodickou paměť. Dalším důležitým jevem zkoumaným v této práci je vznik nových neuronů v hipokampu během dospělosti a jeho vliv na učení a flexibilní přeučování. Po zablokování neurogeneze zvířat temozolomidem byla testována schopnost zvířat naučit se vyhýbat neviditelnému sektoru v úloze aktivního vyhýbání se místu. Flexibilita naučeného chování byla následně sledována přemístěním zakázaného sektoru. Právě kognitivní flexibilita byla po zablokování adultní neurogeneze u potkanů podpořena. V posledních experimentech byl testován vliv hypertenze potkaních modelů na adultní neurogenezi. Imunohistochemické barvení neodhalilo rozdíl v počtu nových buněk v hipokampu mezi zvířaty s různými hodnotami arteriálního krevního tlaku. Tato práce představila novou možnost pro výzkum epizodické paměti a poukázala na roli nových neuronů ve flexibilním chování.

**Klíčová slova:** adultní neurogeneze, asociace, behaviorální neurovědy, epizodická paměť, hipokampus

# **One-trial association task as a basic biological model of episodic memory in rats**

## **Abstract**

A very important structure in the animal and human brain is the hippocampus. The study one of its many functions, episodic memory, is facing with the limited possibilities of non-invasive methods. In this regard, animal models are helpful. In order to study the individual components of such a complex ability in detail, a new behavioral task testing the association of temporally close but separate stimuli was developed. The test animals were exposed to a sequence of a sound conditioned stimulus and an unconditioned electric shock, between which there was a delay of 2 seconds. 59% of the rats successfully learned the association as well as the correct escape reaction to solve the task. Based on the results, the so-called One-Trial Trace Escape Reaction task could be a very valuable tool for a more detailed understanding of animals' incidental one-trial learning important for episodic memory. Another important phenomenon investigated in this work is the development of new neurons in the hippocampus in adulthood and its influence on learning and flexibility. After blocking the animals' neurogenesis with the temozolomide, the animals' ability to learn to avoid an invisible sector in the active avoidance task was tested. The flexibility of the learned behavior was then monitored by moving the forbidden sector. This cognitive flexibility was improved by reduction of adult neurogenesis. In the last experiments, the effect of hypertension in rat models on the adult neurogenesis was tested. Immunohistochemical staining did not reveal a difference in the number of new cells between animals with different values of arterial blood pressure. This work introduced a new tool for episodic memory research and pointed to the role of new neurons in flexible behavior.

Key words: adult neurogenesis, association, behavioral neurosciences, episodic memory, hippocampus

## Seznam použitých zkratek

AAPA	Active Allothetic Place Avoidance	Aktivní vyhýbání se místu
ACQ	Acquisition learning	Akviziční učení
ANOVA	Analysis of Variance	Analýza rozptylu
<i>Arc</i>	gene coding for Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein	Gen pro aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein
BrdU	Bromodeoxyuridine	Bromodeoxyuridin
CA	<i>Cornu Ammonis</i>	<i>Cornu Ammonis</i>
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization	Fluorescenční <i>In Situ</i> Hybridizace
CD	Control Doors	Kontrolní průchod
CS	Conditioned Stimulus	Podmíněný stimul
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidin
Dahl SR	Salt Resistant Dahl rats	Potkani kmene Dahl rezistentní na sůl
Dahl SS	Salt Sensitive Dahl rats	Potkani kmene Dahl citliví na sůl
DCX	Doublecortin	Doublecortin
DG	Dentate Gyrus	<i>Gyrus dentatus</i>
EC	Entorhinal cortex	Entorhinální kortex
GABA	$\gamma$ – Aminobutyric Acid	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
HRP	Horseradish Peroxidase	Křenová peroxidáza
LTP	Long Term Potentiation	Dlouhodobá potenciace
MAP	Mean Arterial Pressure	Střední arteriální tlak
MS	Medial Septum	Mediální septum
NPCs	Neural Progenitor Cells	Neurální progenitorové buňky
NSCs	Neural Stem Cells	Neurální kmenové buňky
OTTER	One-Trial Trace Escape Reaction	Jednorázová úloha párovacího učení s prodlevou
REV	Reversal learning	Přeučení
PBS	Phosphate Buffered Saline	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
SAL	Saline	Fyziologický roztok
SHR	Spontaneous Hypertensive Rats	Spontánně hypertenzní potkani
SGZ	Subgranular Zone	Subgranulární zóna
SSC	Saline Sodium Citrate	Roztok citrátu sodného

SVZ	Subventricular Zone	Subventrikulární zóna
TBS	Tris Buffered Saline	Trisem pufovaný fyziologický roztok
TMZ	Temozolomide	Temozolomid
US	Unconditioned Stimulus	Nepodmíněný stimul
WD	Wide Doors	Široký průchod

## Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD .....	10
1.1	Epizodická Paměť .....	12
1.1.1	Mají zvířata epizodickou paměť?.....	12
1.1.2	Neuronální substráty epizodické paměti u lidí .....	14
1.1.2.1	Animální modely paměti podobné epizodické u zvířat.....	15
1.2	Hipokampus .....	18
1.2.1	Anatomie .....	18
1.2.1.1	Zapojení hipokampu a jeho okruhy .....	20
1.2.2	Funkce hipokampu a hipokampální formace .....	23
1.2.2.1	Role hipokampu ve zpracování paměti .....	23
1.2.2.2	Role hipokampu v prostorové navigaci.....	26
1.2.2.3	Role hipokampu v kognitivní flexibilitě .....	27
1.2.3	Neurogeneze v dospělém mozku.....	28
1.2.3.1	Vývoj nových buněk SGZ.....	29
1.2.3.2	Role nově dozrávajících neuronů .....	30
2	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	34
3	METODY.....	35
3.1	Zvířata .....	35
3.2	ČÁST 1: Vývoj nové Jednorázové úlohy párovacího učení s prodlevou (OTTER) .....	35
3.2.1	Zvířata .....	36
3.2.2	Behaviorální aparatura .....	36
3.2.3	Finální protokol úlohy OTTER.....	38
3.2.4	Postupný vývoj úprav úlohy OTTER.....	41
3.2.4.1	Výběr vhodného kmene laboratorních potkanů .....	42
3.2.4.2	Omezení fyzické explorační prostředí úpravou tvaru průchodu v přepážce.....	42
3.3	ČÁST 2: Aktivita hipokampu během OTTER .....	43
3.3.1	Detekce genu časné exprese <i>Arc</i> .....	43
3.3.1.1	Průběh FISH.....	44
3.3.1.2	Zpracování mikroskopických dat .....	44
3.4	ČÁST 3: Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu.....	47
3.4.1	Zvířata a jejich léčba .....	47
3.4.2	Test dávkování TMZ.....	48
3.4.3	Úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA) na Kolotočovém bludišti .....	49
3.4.3.1	Behaviorální aparatura Kolotočového bludiště .....	49



3.4.3.2	Průběh behaviorální testování AAPA .....	50
3.4.4	Imunohistochemie .....	51
3.5	ČÁST 4: Vliv hypertenze na adultní neurogenezi.....	53
3.5.1	Zvířata a jejich léčba .....	53
3.5.2	Měření krevního tlaku a zpracování tkání .....	54
3.6	Analýza dat a celková statistika .....	54
3.7	Vizualizace výsledných dat .....	55
4	VÝSLEDKY .....	56
4.1	ČÁST 1: Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER.....	56
4.1.1	Výběr vhodného kmene laboratorních potkanů .....	56
4.1.2	Vliv velikosti a tvaru průchodu v rozdělovací přepážce .....	57
4.1.3	Testování finálního protokolu úlohy OTTER .....	58
4.2	ČÁST 2: Aktivita hipokampu během OTTER.....	62
4.3	ČÁST 3: Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu.....	63
4.3.1	Kontrolní testy.....	63
4.3.2	Behaviorální výsledky v úloze AAPA .....	66
4.3.2.1	25 mg/kg TMZ .....	66
4.3.2.2	10 mg/kg TMZ .....	67
4.3.3	Korelace chování a neurogeneze v dospělosti.....	69
4.4	ČÁST 4: Vliv hypertenze na adultní neurogenezi.....	70
5	DISKUZE.....	72
5.1	Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER .....	72
5.1.1	Limitace úlohy OTTER.....	73
5.2	Aktivita hipokampu během OTTER .....	74
5.2.1	Celkové shrnutí OTTER.....	75
5.3	Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu .....	75
5.4	Vliv hypertenze na adultní neurogenezi.....	77
6	ZÁVĚR .....	79
7	SOUHRN .....	80
8	SUMMARY .....	82
9	LITERATURA.....	84
10	PUBLIKACE .....	1099
11	PŘÍLOHY .....	11010

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

Pamatování si celistvých událostí je velmi důležitou schopností člověka. Je to schopnost uložit, uchovat, vybavit si a vyjádřit vzpomínku včetně detailů o prostředí či místu, denní či roční době, nebo například o přítomnosti dalších účastníků a dalších složek vzpomínky (včetně vědomé komponenty člověka). Často se může několik po sobě jdoucích samostatných vzpomínek složit a společně dohromady vytvořit ucelený obraz celé prožité epizody našeho života (Tulving, 2002) a položit tak základy pro komplexní epizodickou vzpomínku. Epizodická vzpomínka pojí informace o tom, co se stalo, s tím kde, kdy a za jakých okolností se to stalo. Důležité pro epizodickou paměť je i to, že musí ukládat vzpomínky, i když člověk není předem upozorněn na důležitost prožívané události a to, že v budoucnu bude vzpomínku potřebovat. Tímto předpokladem je schopnost tzv. incidentálního učení (Craik & Tulving, 1975). Tyto a také další aspekty epizodické paměti je ale potřeba umět experimentálně testovat nejen u lidí, ale také u zvířat.

Postupem času se představa o lidské schopnosti epizodické paměti přesouvá i do světa ostatních živočichů a hromadí se důkazy o podobné schopnosti u zvířat, která si jsou také často schopna pamatovat detaily o tom, co, kde a kdy se něco stalo (Clayton & Dickinson, 1998), byť vědomá komponenta epizodické paměti je zde z jasných důvodů lidskému zkoumání nepřístupná. Množí se tak vědecké práce založené na behaviorálním testování zvířat, které stále otevírají otázku existence epizodické paměti nebo její obdoby u zvířat. Takové testování zvířat je však často založené na dlouhém tréninku, velkém množství vystavení dané situaci, nebo například pracují s buď naprosto přirozenými schopnostmi daného druhu, které už mohou být dány víceméně geneticky. V reálném životě zvířat, potažmo ani člověka, však k obdobným situacím prakticky nedochází. Naopak, velmi často je nezbytné si pamatovat i naprosto unikátní události, na které zvíře není předem nijak připraveno. Nejenže se z prožité události může poučit, ale nebude příště v případě potřeby odkázáno pouze na své vrozené chování a náhodu.

Modelovat přirozené prostředí zvířat a realistické situace, které by byly zároveň dostatečně kontrolovatelné a které by bylo možné využít pro výzkum, je složité. I když není účelné využívat pro zvíře vrozeného chování pro konkrétní situace, je třeba zachovávat určitou podobnost s možnými přirozenými situacemi. Právě na ně je zvíře dlouhodobě evolučně připravováno a má tak vrozené určité vzorce chování, které je lepší ve výzkumu využívat než jít proti nim. Takové experimenty jsou méně zatíženy možnými artefakty vystávajících

z nepřírodního prostředí a je možné je využívat pro získávání hlubších poznatků fungování paměti. Se správnými nástroji je možné lépe proniknout do podstaty studovaného jevu a snadněji odhalit neurální substráty epizodické paměti a její mechanismus fungování. V současnosti jsou však možnosti studia epizodické paměti u zvířat (i u lidí) velmi omezené. Hlavním cílem této práce bylo vyvinout úlohu, která pomůže objasnění neurobiologických podkladů jednorázového asociativního učení.

Vědci v minulosti ukázali, že velmi důležitou mozkovou strukturou pro epizodickou paměť u lidí a její obdobu u zvířat je hipokampus (Allen & Fortin, 2013; Moscovitch et al., 2016). I když je výzkum převážně zaměřen na plně maturovanou hipokampální tkáň, součástí diskuzí jsou také nově dozrávající buňky v *gyrus dentatus* (Fang et al., 2018). I když existují studie naznačující roli těchto nových neuronů v kódování prostorových vzpomínek (Gu et al., 2012; Martinez-Canabal et al., 2013), je možné, že se jedná spíše o vliv chování než specifických událostí a kontextů (Erwin et al., 2020). Pro plné pochopení mechanismu kódování epizodických vzpomínek je proto potřeba porozumět i funkci neuronů, které v hipokampu vznikají v dospělosti. V neposlední řadě je důležité pochopit, které aspekty ovlivňují míru adultní neurogeneze, a proto se tato práce zaměřuje také na vliv hypertenze na míru neurogeneze v dospělosti.

## 1.1 Epizodická Paměť

Pro vývoj člověka stejně jako všech dalších živočišných druhů na naší Zemi je paměť jednou z nejdůležitějších schopností, která nám napomáhá adekvátně reagovat v různých životních situacích s ohledem na naši historii. Můžeme se poučit z dřívějších chyb nebo předávat zkušenosti dalším generacím. Paměť rozdělujeme na nedeklarativní (implicitní) a deklarativní (explicitní) (Tulving, 1985). Nedeklarativní paměť je paměť vyjadřovaná pouze určitou činností nebo výkonem, který není potřeba si vědomě vybavovat. Obsah deklarativní paměťové stopy je pro člověka možné popsat nebo vypovědět verbálně. Jde převážně o pamatování si faktů (sémantická paměť) a událostí (epizodická paměť), jejichž obraz si lze vědomě nebo také podvědomě mentálně představit.

Koncepčně složitější epizodické vzpomínky uchovávají unikátní události včetně kontextu, ve kterém se staly (Baddeley, 2001). Nejde pouze o samotné zapamatování prožité události, ale také o možnost jejich zpětného prožívání. Pomocí minulých zkušeností organismus může plánovat možné budoucí scénáře a mít tak výhodu při očekávání různých situací (Tulving, 1985). Takto složitý systém je ale náchylný na různá poškození a již relativně mírné narušení může mít zásadní vliv na kvalitu života jedince. Z tohoto důvodu je plné pochopení fungování systému epizodické paměti důležité pro následný vývoj efektivnější léčby u poruch, u kterých je epizodická paměť narušena.

Velmi rozsáhle představil koncept epizodické paměti Endel Tulving, který ve své práci detailně diskutuje rozdíly sémantické a epizodické paměti v několika stanovených parametrech. Jde především o vlastní povahu pamatovaných informací nebo podmínky za kterých dochází k vybavení paměťové stopy nebo možné využití vzpomínek získaných daným typem paměti a další (Tulving, 1985). Zkoumání takových detailních aspektů paměti je úzce spojeno s lidskou schopností verbálního vyjadřování, která nelze využít u animálních modelů. Naopak v otázkách neurálního substrátu epizodické paměti přinášejí animální modely výhodu možného využití invazivnějších výzkumných technik, které nelze využít v klinických studiích.

### 1.1.1 Mají zvířata epizodickou paměť?

Pro plné pochopení komplexního systému, jakým je epizodická paměť, je důležité mít adekvátní nástroje pro jeho studium. V oblasti humánní vědy jsou možnosti omezené, a proto je využití animálních modelů velkým přínosem. Z tohoto důvodu se již dlouhou dobu vedou diskuse o

tom, zda vůbec u zvířat episodická paměť či adekvátní homologický systém paměti existuje či nikoliv. Zásadními charakteristikami epizodické paměti jsou podle Tulvinga (1985) obsah vzpomínky (musí obsahovat co, kdy a kde se stalo), schopnost mentálního cestování v čase, pocit uvědomění si sama sebe nebo tzv. autoetické vědomí, tedy uvědomění si sebe v minulé události během vzpomínání. Ale protože jsou tyto specifické vlastnosti zřejmě jedinečné jen pro člověka, zastával Tulving názor, že epizodickou paměť zvířata mít nemohou (Tulving, 1985, 2002; Tulving & Markowitsch, 1998). Podle některých oponentů není ale naše neschopnost takové aspekty testovat ani jejich případná neexistence důvodem k závěru, že zvířata epizodickou paměť nebo její obdobu vůbec nemají (Morris, 2001; Tulving & Markowitsch, 1998).

I když jsou pro nás Tulvingem navržené aspekty prožívání vybavování si vzpomínek u zvířat nepřijatelné, můžeme sledovat alespoň behaviorální projevy vybavování si vzpomínek. Clayton s kolegy (2003) přišla s behaviorálními kritérii pro hodnocení paměti zvířat podobné epizodické (episodic-like memory) na základě svých předchozích experimentů, ve kterých poprvé ukázala, že zvířata takového konceptu podobného epizodické paměti jsou schopna. Tento velmi známý příklad paměti podobné epizodické u zvířat ukazuje sojky křovinné (*Aphelocoma coerulescens*), které se dokáží při hledání své schované potravy orientovat v tom, kdy v minulosti si schovaly dva druhy potravy lišící se chutností a trvanlivostí (Clayton & Dickinson, 1998). Tyto i následující experimenty se sojkami (Clayton et al., 2001), ale později také se strakami (Zinkivskaya et al., 2009) nebo sýrkami (Feeney et al., 2009) prokázaly, že zvířata dokážou zpracovávat v paměti informace o tom co, kde a kdy se stalo. V rámci diskuze se ale objevili odpůrci těchto závěrů, kteří vysvětlují chování sojek využíváním jiných mentálních procesů (Dere et al., 2006; Jeffery & O'Keefe, 1998).

V návaznosti na tyto prvotní pokusy epizodické paměti u ptáků se začaly objevovat další obdobné práce a v současnosti již existuje mnoho studií podporujících přítomnost epizodické paměti nebo jí podobného systému u různých živočišných druhů jako jsou například hlodavci (Babb & Crystal, 2006; Zhou & Crystal, 2009), psi (Fugazza et al., 2016), primáti (Hoffman et al., 2009; Martin-Ordas et al., 2010) nebo delfini (Davies et al., 2022). I přes velké množství těchto dat je ale stále otázkou, do jaké míry může být toto chování považováno za adekvátní odraz epizodické paměti podobné té u lidí (Babb & Crystal, 2006; Suddendorf et al., 2009). Kvůli stále probíhajícím diskuzím na toto téma se u zvířat pro lepší orientaci ustálil pojem

navrhnutý Claytonovou: ‚paměť podobná epizodické‘, popřípadě ‚paměť co, kde, kdy‘ (Clayton & Dickinson, 1998).

### 1.1.2 Neuronální substráty epizodické paměti u lidí

I když je studium fungování lidského mozku omezeno na úzkou škálu použitelných metod, jsou získaná data velmi důležitou oporou pro doplňující animální výzkum. Jednou cestou může být nevyhnutelný a v různé míře invazivní zákrok v oblasti centrálního nervového systému pacienta jako nejzazší způsob léčby velmi vážných stavů. Při takovém zákroku může dojít k poškození různých systémů a struktur, a tak se vzápětí mohou vyskytnout nepředpokládané změny kognitivních funkcí jako jsou například poruchy epizodické paměti (Gabrieli, 1998; Scoville & Milner, 1957). Klinické studie pracující s výsledky chirurgických zákroků jsou ale specificky závislé na klinickém stavu pacienta, cílové oblasti a výsledném poškození tkáně a takové výsledky nejsou snadno porovnatelné a společně interpretovatelné. Přístupnější možností jsou funkční neurozobrazovací techniky, které nám umožňují specificky zobrazovat právě aktivní oblasti mozku například na základě změny metabolismu nebo průtoku krve oblastí, jako např. metody fMRI nebo PET (Gabrieli, 1998; Rugg et al., 2002). Tyto metody jsou neinvazivní a mohou je podstoupit jak zdraví jedinci, tak různě se léčící pacienti. Velkou výhodou zobrazovacích metod je možnost komunikace s testovanou osobou a sledování stavu mozkových struktur v reálném čase během současného provádění kognitivních testů.

Stejně jako samotná paměť, je také epizodická paměť člověka spojována především s hipokampem. Poškození paměti bývá jedním z hlavních symptomů poškození hipokampu (Kolb & Whishaw, 2009). Prostorová složka epizodické paměti je připisována tzv. neuronům místa a jejich roli v orientaci a navigaci v prostředí (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Díky těmto specializovaným buňkám je hipokampus schopen zpracovávat vnější orientační body, vytvářet tak mentální mapy okolního prostředí a také ukládat prostorový kontext prožitých událostí (viz dále Teorie kognitivního mapování). V oblastech CA1 a CA3 hipokampu byly nalezeny také další neurony, buňky času (time cells) (Salz et al., 2016), které kódují časový kontext (Chao et al., 2020) a dotváří tak ucelenou jedinečnou vzpomínku. Právě specifická kombinace časového a prostorového kontextu dělá z prožité události konkrétní epizodu z naší minulosti, která je ukládána společně s dalšími faktickými údaji jako celek pomocí epizodické paměti.

Velmi blízkou strukturou je amygdala, která udává lidské paměti její emoční složku (Phelps & Anderson, 1997). Ukázalo se, že se oblast amygdaly aktivuje během autobiografického vzpomínání (Fink et al., 1996). Takto je nejen svým uložením v mediálním temporálním kortexu ale i funkčně velmi blízká právě hipokampu, a proto není výjimkou, že chirurgický zákrok ovlivní obě tyto struktury (Scoville & Milner, 1957) a jejich přesné role ve zpracování vzpomínek je pak u lidí složité definovat.

Další ze studovaných struktur s ohledem na epizodickou paměť člověka je diencefalon. Ukázalo se, že talamická jádra (Koenig et al., 2019; Wolff et al., 2008) a mamilární tělíka (Tsivilis et al., 2008) jsou důležitá pro ukládání a vybavení si epizodické vzpomínky. Anteriorní talamická jádra jsou důležitá pro selekci adekvátních stimulů a správné strategie ukládání epizodických paměťových stop, zatímco mediální dorzální talamické jádro pomáhá určovat strategii vybavení si vzpomínky (Van Der Werf et al., 2003). Atrofie talamu u pacientů trpících roztroušenou sklerózou silně narušuje epizodickou paměť a další kognitivní funkce (Benedict et al., 2013; Dineen et al., 2012). Poškození mamilárních tělísek bylo již dříve asociováno s amnézií (Kopelman et al., 2007; Vann & Aggleton, 2004). Stejně tak u pacientů s cystami v této oblasti se objevila korelace mezi objemem mamilárních tělísek a výkonem v paměťových testech (Tsivilis et al., 2008).

Také struktury mozkové kůry jako prefrontální (Chao et al., 2020) a parietální kortex (Rugg & King, 2018) se podílejí na epizodické paměti. V těchto strukturách se často objevuje velmi silná lateralizace, tedy rozdíly v jedné struktuře levé a pravé mozkové hemisféry. Například fMRI u zdravých dobrovolníků ukázala na silnější aktivaci levého prefrontálního kortexu během epizodického vzpomínání oproti aktivitě v pravé hemisféře, která je ale spíše spojena s povědomostí než s klasickým pamatováním (Henson et al., 1999). Podle dalších zpráv se ale do zpracování epizodických vzpomínek u lidí zapojuje také například posteriorní temporální kůra (Kapur et al., 1992).

#### 1.1.2.1 Animální modely paměti podobné epizodické u zvířat

Zvířecí modely umožňují mnohem detailnější pohled na neuronální fungování během různých mentálních procesů a behaviorálních úloh. Pro testování paměti podobné té epizodické u zvířat jsou používány rozličné behaviorální úlohy. Jak bylo řečeno dříve, první behaviorální testy na tento typ paměti byly založeny na základních aspektech co, kde a kdy u sojek (Clayton &

Dickinson, 1998) a přirozeně využívá vrozeného potravního chování zvířete. Toto chování je závislé na hipokampu, který představuje základ pro vnímání prostoru u ptáků s tímto potravním chováním (Payne et al., 2020), i když například asociace s relativní velikostí hipokampu nebo počtem neuronů hipokampu a silou tohoto chování nebyly prokázány (K. L. Gould et al., 2013).

Existují ale i další komplexní úlohy odkázané na dlouhý trénink a opakovaná sezení, jako například úlohy rozpoznávání pachů (Fortin et al., 2004; Galizio et al., 2023; Uchida & Mainen, 2003). Bylo publikováno množství takových úloh, ty se však mezi sebou často liší pouze v aspektech designu. Ve většině případů jsou zvířata učena asociovat si různé vůně s odměnami v daném pořadí (Ergorul & Eichenbaum, 2004; Panoz-Brown et al., 2018). Bylo ukázáno, že tyto úlohy jsou závislé na správné funkci hipokampu (Panoz-Brown et al., 2018). Nicméně v tak komplexních úlohách není vyloučeno, že zvířata využívají i další kognitivní funkce kromě epizodické paměti (např. familiárnost, (Griffiths & Clayton, 2001; Panoz-Brown et al., 2018). Výsledná data tak mohou být ovlivněna neočekávaným mentálním procesem vedoucím k odlišné strategii řešení úkolu.

Dalšími používanými testy vyžadujícími určitý trénink může být tzv. *trace conditioning* nebo *delay conditioning* (Ivkovich & Stanton, 2001; Lugo et al., 2014; Sellami et al., 2017). Tyto asociační úlohy jsou založeny na vystavení zvířete podmíněnému stimulu (CS, např. zvukovému nebo světelnému), po kterém následuje nepodmíněný stimulus (US, např. elektrická ranka nebo fouknutí do oka). V případě úlohy *trace conditioning* je mezi oběma stimuly pauza (tzv. *trace interval*) a jsou tak kompletně odděleny. V úloze *delay conditioning* ale začíná US ještě během přetrvávajícího CS a oba stimuly buď končí ve stejný moment, nebo US ještě nějakou dobu přetrvává po ukončení CS. Při testovacím sezení se pak sleduje reakce zvířete na samotný US (Curzon et al., 2009). Ačkoliv je pro oba typy podmiňování nezbytná oblast mozečku (Halverson et al., 2018), oblasti prefrontální kůry (L. Q. Zhang et al., 2019) a hipokampu (Sharma et al., 2018) jsou důležité pro *trace conditioning* ale né pro *delay conditioning* (Christian & Thompson, 2003).

V přirozených podmínkách zvířata většinou nemají možnost opakovaně prožívat danou situaci, aby se ji mohli bezpečně naučit. Aby bylo možné testovat pro zvířata více přirozené situace, je třeba pracovat také s behaviorálními úlohami založenými na jednorázovém vystavení danému úkolu, který se zvířata musí naučit. Navíc jedním z předpokladů epizodické paměti u člověka je schopnost incidentálního učení (Zentall et al., 2008; Zhou et al., 2012). Tedy kódování vzpomínek na události bez předchozího upozornění na důležitost nastávající události



(Zentall et al., 2008). Opakovaná sezení v klasických úlohách ale může vytvářet určité očekávání budoucího úkolu čímž rozhodně nesplňují charakteristiku incidentálního učení.

I když mají behaviorální úlohy s dlouhým přípravným tréninkem svoji důležitou funkci při získávání poznatků o mechanismu fungování paměti podobné té epizodické u zvířat, učení a paměť v testech na jediný pokus představují jedinečný nástroj studia pro zvířata mnohem přirozenějších situací. Není ale jednoduché vytvořit takový design úlohy, aby odrážel potřeby epizodického pamatování, v průběhu mnoha let výzkumu se tak objevilo jen relativně málo takových experimentů. Kromě netradičních úloh pro testování goril (Schwartz et al., 2002) a delfínů (Davies et al., 2022) byly publikovány také práce s novými behaviorálními úlohami pro hlodavce (Bast et al., 2005; Dere et al., 2005; Kart-Teke et al., 2006). Dere a kolegové (2005) vyvinuli explorativní úlohu pro myši, kterým jsou ukázány dvě sady nových objektů. V samotném testu jsou objekty promíchány a umístěny na nové pozice a hodnoceno je explorativní chování zvířat. Řešení této úlohy je tedy závislé na zapamatování si co, kde a kdy aspektů (Dere et al., 2005). Další úlohou je alocentrické hledání odměny, která je sice vyvinuta jako úloha na jeden pokus, ale zato splnění časového atributu z preferovaného systému co, kde a kdy je diskutabilní (Bast et al., 2005).

## 1.2 Hipokampus

Hipokampus je protáhlá párová mozková struktura uložená pod neokortexem v mediální části spánkového laloku. Díky svému tvaru a zakřivení připomíná lidský hipokampus mořského koníka podle jehož latinského názvu byla celá tato struktura pojmenována.

Funkční součástí hipokampu jsou subikulum, presubikulum, parasubikulum a entorhinální kůra, které spolu tvoří tzv. hipokampální formaci (Anand & Dhikav, 2012; Andersen, Morris, Amaral, & Bliss, 2007). Tento soubor struktur je propojen s amygdalou, mamilárními tělísky, *nucleus accumbens*, nebo *gyrus cinguli*. Hipokampální formace a asociované struktury mají důležitý význam pro paměť, motivaci, náladu a vnímání bolesti. Společně se tento komplex struktur označuje jako limbický systém (Lövlad et al., 2014).

Buněčnou organizací je hipokampus podobný klasickým korovým strukturám (neokortex), ale svým vnitřním propojením a převážně jednosměrným tokem informací je hipokampus naprosto unikátní. Toto unikátní uzpůsobení hipokampu je evolučně konzervováno (Andersen et al., 2007; Clark & Squire, 2013).

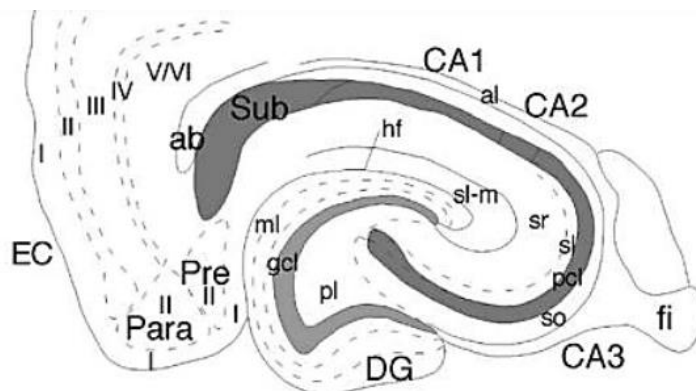
### 1.2.1 Anatomie

Hipokampus se skládá z *cornu ammonis* (CA) a *gyrus dentatus* (DG). Každou z jednotlivých částí *cornu ammonis*: CA1, CA2, CA3 (Lorente de Nó, 1934), tvoří vrstva hustě nahromaděných pyramidálních neuronů, která se zanořuje do struktury *gyrus dentatus*. DG se skládá z buněčné vrstvy *fascia dentata* a hilu, někdy nepřesně chápaného jako CA4. Část CA1 je přes oblast subikula propojena s entorhinální kůrou (Anand & Dhikav, 2012) (viz Obr. č. 1). S ohledem na rozdílnost zapojení do neuronálních okruhů se hipokampus u primátů dělí na anteriorní a posteriorní (Colombo et al., 1998), popř. na dorsální a ventrální u ostatních živočišných druhů (Fanselow & Dong, 2010; Strange et al., 2014).

Hipokampální CA má strukturu podobnou archikortexu (Amaral & Witter, 1989), která se dělí podle rozlišitelných vrstev na *stratum oriens*, *stratum pyramidale* a poslední dále členitelnou polymorfní vrstvu. Jediná koncentrovaná buněčná vrstva v oblasti CA se nazývá *stratum pyramidale* a obsahuje těla excitačních pyramidálních neuronů a mnoha typů interneuronů. Tvoří tak nejvýraznější strukturu CA, která je z obou stran obklopena samostatnými vrstvami. Směrem k povrchu se nalézá *stratum oriens* s těly inhibičních košíkových a horizontálních trilaminárních buněk. Navíc sem sahají bazální dendrity

pyramidálních neuronů. Pod *stratum pyramidale* se nalézá plexiformní oblast dále členěná dle detailních vlastností prostupujících vláken. Tenké *stratum lucidum*, přes které přicházejí signály z gyru dentatu pomocí tzv. mechových vláken, leží přímo pod *stratum pyramidale* v oblasti CA3. Následnou vrstvou je *stratum radiatum* obsahující vlákna Schafferových kolaterál vedoucí z CA3 do CA1 nebo septální a komisurální vlákna stejně jako některé druhy interneuronů. Dalšími vrstvami *stratum lacunosum a moleculare* prochází vlákna perforující dráhy z entorhinální kůry (viz dále). Oblast neobsahující buňky mezi CA1 a DG se nazývá hipokampální *sulcus* nebo *fisura* (Andersen, Morris, Amaral, & Bliss, 2007; Insausti & Amaral, 2003).

*Gyrus dentatus* má odlišnou strukturu od CA oblastí. Vnější část DG tvoří tzv. molekulární vrstva, která je tvořena především dendrity hlouběji uložených granulárních buněk a menším množstvím interneuronů. Přes tuto vrstvu prochází vlákna tzv. perforující dráhy (viz dále) přímo ke granulárním buňkám do granulární vrstvy (Amaral et al., 2007). Následná hraniční vrstva se nazývá subgranulární zóna, která je důležitým místem tzv. neurogeneze v dospělosti (viz dále) (Toni & Schinder, 2016). Poslední polymorfní vrstva obsahuje kromě množství dalších druhů buněk zejména mechové buňky (Amaral et al., 2007).



**Obr. 1** Příčný transversální řez hipokampem potkana. Sub - subikulum, CA1-CA3 oblasti *cornu Ammonis*, al - alveolus, sr - *stratum radiatum*, sl - *stratum lacunosum*, sl-m *stratum lacunosum-moleculare*, pcl - pyramidální vrstva buněk, so - *stratum oriens*, fi - fimbria, DG - *gyrus dentatus*, pl - polymorfní vrstva DG, gcl - granulární vrstva DG, ml - molekulární vrstva DG, hf - hipokampální fisura, para - parasubikulum, pre - presubikulum, EC - entorhinální kortex (upraveno dle Andersen 2007).

### 1.2.1.1 Zapojení hipokampu a jeho okruhy

#### 1.2.1.1.1 Vstupy do hipokampu

Hlavní branou pro vstup rozličných informací do hipokampu je zejména II. vrstva entorhinální kůry (EC) (Van Strien et al., 2009). Těsně před vstupem informací do hipokampu se střetávají polymodální senzory v entorhinálním kortexu. Neprostorové informace převážně v laterálním EC a prostorové informace v mediálním EC, které pak dále zpracovává hipokampus (Van Strien et al., 2009). Kromě notoricky známých projekcí z II. vrstvy EC do DG jsou součástí perforující dráhy i méně výrazné dráhy vedoucí z dalších korových vrstev EC (viz dále) (Toni & Schinder, 2016).

Velmi komplexní informace dostává hipokampus z mediálního septa (MS) (Müller & Remy, 2018), které obsahuje tři hlavní buněčné populace: cholinergní, glutamatergní a GABAergní (Leão et al., 2015). Všechny tyto typy buněk komunikují lokálně mezi sebou, ale také vysílají separátní projekce přímo do CA1 hipokampu. Nejsilnější projekce pocházejí právě od cholinergních neuronů MS a směřují přímo na pyramidální neurony CA1 (Sun et al., 2014). Cílem glutamatergních neuronů MS jsou převážně inhibiční (somatostatinové) interneurony ve *stratum oriens* CA1 (Freund & Buzsáki, 1996; Sun et al., 2014), zatímco GABAergní buňky cílí především na parvalbuminové interneurony CA1 (Sun et al., 2014). Těsné provázání hipokampu s mediálním septem hraje významnou roli v tvorbě a udržování rytmických oscilací hipokampu, především v pásmu *theta* (Müller & Remy, 2018; Yi et al., 2021).

Hlavními diencefalickými strukturami vysílajícími projekce do hipokampu jsou supramamilární jádra hypotalamu a talamické *nucleus reuniens* (Vertes, 2015). Supramamilární jádra jsou jedním z velmi silných zdrojů projekcí do hipokampu a projikují přímo do DG (Ohara et al., 2013) a nebo do CA2/CA3 oblastí (Vertes et al., 1999). Prakticky jedinou inervaci z talamu do hipokampu zajišťuje *nucleus reuniens*, které cílí přímo do CA1 (*stratum lakunosum molekulare* a molekulární vrstvy subikula (Dolleman-Van Der Weel et al., 1997; Varela et al., 2014).

Dalšími strukturami komunikujícími s hipokampem jsou amygdala, *locus coeruleus* a ventrální tegmentální oblast. Amygdala je s hipokampem velmi úzce spojena jak po funkční stránce, tak anatomicky. Nejen že její projekce do hipokampu míří nepřímě přes EC a subikulum, ale podstatná část drah z basálního jádra amygdaly vede separátně přímo do *stratum oriens* CA1 a CA3 hipokampu (Pikkarainen et al., 1999). Dalšími strukturami projikujícími do

hipokampu jsou například *locus coeruleus* mozkového kmene, jehož projekce míří do CA3 (Wagatsuma et al., 2017), nebo z rapheálních jader mozkového kmene jak do CA1, tak do CA3 (Vertes et al., 1999). Také ventrální tegmentální oblast středního mozku posílá rozprostřené projekce jak do subikula, tak do různých vrstev CA1 nebo CA3 (Gasbarri et al., 1994).

#### 1.2.1.1.2 Vnitřní hipokampální okruh trisynaptické dráhy

Vnitřní hipokampální okruh hipokampu je složen ze tří propojených komponent: perforující dráhy, mechových vláken a Schafferových kolaterál. Hlavním vstupem do hipokampu je tzv. perforující dráha, kterou vedou axony z II. (minoritně také z V. a VI.) vrstvy EC do molekulární vrstvy *gyrus dentatus* (Van Strien et al., 2009) a z III. vrstvy EC přímo do CA3 (van Groen et al., 2003) nebo CA1 (Anand & Dhikav, 2012; Van Strien et al., 2009). Nemyelizované axony granulárních buněk DG tvoří tzv. mechová vlákna, která buď zůstávají součástí DG a v polymorfické vrstvě pomáhají vytvářet lokální asociační projekce nebo vedou k pyramidálním buňkám CA3 (Amaral et al., 2007). Z CA3 vedou ipsilaterální i kontralaterální projekce pomocí tzv. Schafferových kolaterál do CA1, odkud pak projekce po posledním přepojení opouštějí hipokampus (Amaral et al., 2007; Ishizuka et al., 1990).

Dlouhou dobu relativně opomíjená oblast CA2 také dostává přímé vstupy z EC stejně jako nepřímé přes DG a CA3 (Chevalyere & Siegelbaum, 2010) nebo dodatečně přímo z DG (Kohara et al., 2014). Silné propojení EC s CA2 a jejím hlavním výstupem do CA1 (Chevalyere & Siegelbaum, 2010) vytváří další vnitřní okruh zapojení hipokampu fungující paralelně s trisynaptickou nepřímou drahou (Basu & Siegelbaum, 2015).

Posledním přepojením trisynaptické dráhy jsou silné projekce CA1 směřovány do subikula (Cenquizca & Swanson, 2007; Naber et al., 2001) a odsud do EC, nebo existují také přímé dráhy z CA1 do hlubších vrstev EC. Informace ze subikula se dostávají převážně do V. vrstvy EC (Beckstead, 1978; Cenquizca & Swanson, 2007), která ale jen vzácně posílá zpětnou vazbu počátečním vrstvám II a III, což ukazuje spíše na jiné paralelní zpětnovazebné smyčky uzavírající okruh EC-hipokampus-EC (Naber et al., 2001).

#### 1.2.1.1.3 Vnější zapojení hipokampu

Hlavním výstupním místem pro projekce z hipokampu je subikulum, které přijímá projekce hlavně z oblasti CA1 nebo přímo z EC (Naber et al., 2001). Subikulum vysílá projekce vedoucí

do telencefalických a diencefalických částí mozku (Witter & Groenewegen, 1990). Subikulum také projikuje do basálních ganglií (Groenewegen, 1987) a do jader hypothalamu, kde působí jako inhibitor hypothalamo-hypofyzární osy (Lowry, 2002).

Axonální projekce vedoucí přímo z CA1 hipokampu do ostatních oblastí mozku se dají prostorově rozdělit do několika směrů: dorzální, ventrální, rostrální a diencefalický. Vlákná z dorzální části CA1 vedou středně silné projekce do retrosplenálního kortexu a částečně zasahují až do anteriorní cingulární kůry (Cenquizca & Swanson, 2007; Miyashita & Rockland, 2007). Naproti tomu ventrálnější oblast CA1 projikuje rostrálně do infralimbické a prelimbické části prefrontálního kortexu (Barbas1r2 & Blatt2, 1995; Cenquizca & Swanson, 2007), nebo směřuje k temporálním a parietálním asociačním oblastem mozkové kůry a dále k unimodálním auditorním, vizuálním, somatosenzorickým, olfaktorickým i viscerálním oblastem (Cenquizca & Swanson, 2007). Společně s těmito korovými oblastmi jsou z ventrální CA1 inervována také jádra amygdaly (Pitkänen et al., 2000), insulární a orbitofrontální oblasti (Cenquizca & Swanson, 2007).

Další oblastí mozku, kam vedou projekce z ventrální části CA1 je hypothalamus a thalamus. Byly již zmapovány projekce do *n. reuniens* (Vertes, 2015) a mnoha dalších diencefalických jader (Cenquizca & Swanson, 2006). Přímé hipokampální výstupy vedou také do striatálního *n. accumbens* (Trouche et al., 2019) a mediálního septa (Müller & Remy, 2018; Risold & Swanson, 1997) nebo do ventrální tegmentální oblasti (Luo et al., 2011).

#### 1.2.1.1.4 Hipokampální komisury

Kromě zapojení hipokampu mezi ostatní struktury mozku je velmi důležitá také vzájemná komunikace obou hipokampů pomocí ventrální a dorzální hipokampální komisury. Ventrální hipokampální komisura zprostředkovává přímou komunikaci obou hipokampů. Je ale zachována hlavně u hlodavců, kde tvoří silný svazek vláken vystupujících z celé podélné osy hipokampů. U primátů ale ventrální komisura spojuje jen anteriorní části hipokampů a u člověka dokonce úplně mizí (Postans et al., 2020). Dorzální hipokampální komisura propojuje oba hipokampy jen nepřímo přes oblasti EC, presubikula a parahipokampální kůry. Dráha vede společně s vlákny fornixu mediálně pod *corpus callosum*, kde se vlákna z obou hipokampů kříží a směřují zrcadlově zpět do kontralaterálního hipokampu (Catani et al., 2013; Postans et al.,

2020). Dorsální komisura je u člověka velmi dobře vyvinuta a stejně jako u primátů je velmi silným traktem propojujícím oba hipokampy (Gloor, 1993).

### **1.2.2 Funkce hipokampu a hipokampální formace**

Hipokampus je spojován s mnoha funkcemi. Tradičně býval nesprávně dáván do souvislosti s čichem (Khamsi, 2022) nebo behaviorální inhibicí (Nadel et al., 1975). Dnes se nejvíce uvažuje o spojení s učením a pamětí (Squire, 1992). Konkrétně je hipokampus spojován s epizodickou pamětí obsahující komplexní informace o průběhu událostí (Stella et al., 2012). Kromě toho je hipokampus velmi důležitou součástí systému prostorové navigace a našeho vnímání okolního prostředí (O'keefe et al., 1975). Další funkcí, se kterou bývá hipokampus spojován, je například schopnost tzv. kognitivní flexibility (Rubin et al., 2014; Xiong et al., 2019).

#### **1.2.2.1 Role hipokampu ve zpracování paměti**

Zřejmě nejvíce zkoumanou funkcí hipokampu je právě jeho role v paměti. I když první zmínky o studiu paměti sahají až do devatenáctého století (podrobněji viz (Dickerson & Eichenbaum, 2010)), koncept propojení paměti s oblastí hipokampu se rozšířil až v šedesátých letech 20. století na základě popisu klinických případů několika pacientů s velmi závažnými záchvaty nebo psychotickými stavy. Chronicky známý případ Henryho Molaison (známého jako pacient H.M.) nebyl jediným takovým případem (Dickerson & Eichenbaum, 2010; Scoville & Milner, 1957). Po vyzkoušení všech jiných konzervativnějších metod léčby bylo u těchto pacientů potřeba přistoupit k radikálnější možnosti, a to resekci mediálního temporálního laloku mozku. Nezávisle na míře úspěšnosti takových operací v řešení zdravotního stavu pacientů, pokud byl chirurgický zákrok proveden oboustranně a zasahoval do větší části hipokampu, následovala ztráta paměti. Vážnost narušení paměti byla závislá na míře poškození hipokampu a způsobila částečnou retrográdní a ve vážných případech i anterográdní amnézii (Scoville & Milner, 1957). Po těchto prvních klinických studiích bylo jasné, že hipokampus je zřejmě pro paměť zásadní, a proto se ve velmi krátké době objevil nespočet dalších prací zaměřených na úlohu hipokampu v paměti.

### 1.2.2.1.1 Teorie fungování paměti

V současnosti není objasněno, jak hipokampus zprostředkovává schopnost pamatovat si, uložit a znovu si vybavit vzpomínky a informace. Existuje však několik hypotéz, jak by mohl hipokampus fungovat. Velmi důležitým poznatkem, o který se opírá většina hypotéz, je časově odstupňovaná retrográdní ztráta paměti. Což znamená, že novější vzpomínky bývají postiženy amnézií mnohem závažněji než ty starší (Ribot, 1891). I přes rozdíly se jednotlivé modely fungování paměťového systému v mozku navzájem nevylučují a, jak ukazuje současná literatura, někdy se mohou navzájem podporovat a společně poskytnout možné vysvětlení pozorovaných jevů.

Většina hypotéz funkce hipokampu v otázce paměti pracuje s předpokladem tzv. autoasociativního uložení vzpomínek v oblasti CA3 (Hopfield, 1982; Willshaw et al., 1969). Jednotkami paměťové stopy jsou neurony, jejichž synaptická vazba se navzájem posiluje. Autoasociativním aspektem je možnost vybavení si kompletní paměťové stopy na základě přítomnosti pouze některé z jejích komponent (Kohonen, 1978). Specifická lokalizace této funkce byla přisouzena oblasti CA3 nejen díky silnému synaptickému propojení s mnoha dalšími buňkami hipokampu, ale také kvůli síti zpětnovazebných propojení v rámci CA3.

Další důležitou charakteristikou buněk CA3 je schopnost na aktivitě závislého posilování vzájemných synapsí (Lisman, 1999). Bylo objeveno, že opakovanou stimulací buněk dochází k dlouhodobé potenciaci (LTP) aktivních synapsí, což vede k účinnějšímu synaptickému přenosu a zvýšení excitability buněk (Bliss & Lomo, 1973). A i když se již dávno ukázalo, že k LTP může docházet na synapsích různých mozkových oblastí i mimo hipokampus (Di Lorenzo et al., 2019; Rioult-Pedotti et al., 2000), předpokládá se, že synaptická plasticita v rámci hipokampální formace je důležitým mechanismem udržení si vzpomínek (Lamprecht & LeDoux, 2004; Martin et al., 2000). Kromě toho se však v poslední době začínají hromadit poznatky o důležitosti epigenetických modifikací histonů a DNA (Duke et al., n.d.; Monsey et al., 2011) v různých oblastech hipokampální formace nebo dokonce o mezibuněčném přesunu RNA molekul (Ashley et al., 2018; Pastuzyn et al., 2018), které by společně se synaptickou plasticitou mohly mít vliv na konsolidaci vzpomínek (Abraham et al., 2019).

První z hypotéz fungování paměti, Standardní model systémové konsolidace (*Standard Model of Systems Consolidation*) (Marr, 1970) pracuje s předpokladem, že paměťová stopa je kódována jak v hipokampu, tak v korových oblastech mozku. Hipokampus je důležitý převážně



v počáteční fázi kódování (Marr, 1971) a v průběhu času se posilují propojení mezi jednotlivými elementy korové paměťové stopy. Jakmile jsou tyto asociace utvořené, paměťová stopa je konsolidována (uložena z krátkodobé na dlouhodobou) v mozkové kůře (Marr, 1970) a role hipokampu není již dále třeba. A podle této teorie není hipokampus dále potřeba ani pro zpětné vybavení starších plně konsolidovaných vzpomínek (Squire & Alvarez, 1995). Dosud ale není známo, jak přesně by mělo dojít k tomuto „přenosu“ vzpomínek z hipokampu do kortexu a časovou osu můžeme odhadovat pouze velmi orientačně ze studií retrogradní amnézie, které ale popisují poškození hipokampu způsobující ztrátu vzpomínek starých i řadu let (Squire & Alvarez, 1995).

Teorie indexu (*Indexing theory*) byla konceptualizována Teylerem a DiScennou (1986) a pracuje s poznatky o multisynaptickém obousměrném propojení hipokampu se senzorickými a asociačními korovými oblastmi mozku. Konkrétní vzorec aktivity v korových strukturách se podle této teorie promítá do odpovídajícího vzorce aktivity v hipokampu (index). Následná aktivace „indexu“ posiluje obousměrná spojení s kortexem. V případě příštího vystavení části známého stimulu se aktivuje kompletní index v hipokampu, který následně v kortexu rekonstruuje celou reprezentaci dříve uložené vzpomínky. Toto obnovení dříve uloženého vzorce aktivity korových buněk by mohlo vysvětlovat pocit opětovného prožívání dřívějších vzpomínek (Tanaka & McHugh, 2018; T. J. Teyler & Rudy, 2007).

Teorie vícenásobných stop (*Multiple trace theory*) (Nadel & Moscovitch, 1997) stejně jako předchozí teorie uznává úzkou spolupráci hipokampu s korovými oblastmi. Část paměťové stopy vázaná na mozkovou kůru obsahuje sémantickou část vzpomínky, ke které je hipokampem doplněn prostorový a frontálním kortexem časový kontext a společně tak vytvářejí epizodickou vzpomínku (Schacter, 1987; Tulving et al., 1988). Nové hipokampální okruhy ale kódují také kontext, kterým je provázeno každé další vybavení si již zapamatované vzpomínky, a vytváří tak pokaždé novou distribuovanou paměťovou stopu. Další takovou lehce „upravenou“ kopií se jen posiluje její faktická složka kódovaná mozkovou kůrou až se z ní stává nezávislý pamatovaný fakt. Kontextová složka je pokaždé pozměněna a uložena v hipokampu znovu. V hipokampu se tak hromadí množství podobných vzpomínek různého stáří. Při poškození hipokampu jsou tedy pravděpodobněji zasaženy hlavně novější stopy, jichž je v hipokampu menší počet kopií, a u starších vzpomínek je mnohem vyšší šance zachování alespoň některých verzí (Tulving & Markowitsch, 1998).

Teorie konkurenčních stop (*Competitive trace theory*) (Yassa & Reagh, 2013) pracuje především s rolí hipokampu při vybavování si episodických vzpomínek. Podle této teorie, při tomto procesu hipokampus rekonstruuje vzpomínku pomocí překrývajících se jednoduchých paměťových stop, které společně udávají episodický kontext vzpomínky, tzv. je rekontextualizuje. Čím jsou vzpomínky starší tím více částečně překrývající se stopy kompetují s novějšími a tím se kontext starší vzpomínky postupně vytrácí a postupně se mění v čistě sémantické. Uložení takto „osekaných“ sémantických vzpomínek není již dále funkcí hipokampu, ale přechází na neokortex. Posilování vzpomínek během konsolidace tak vede k lepšímu pamatování faktů na úkor kontextuálních detailů (Yassa & Reagh, 2013).

#### 1.2.2.2 Role hipokampu v prostorové navigaci

Na základě již dřívějších poznatků vycházejících z behaviorálního testování zvířat, navrhl E.C. Tolman (1948) koncept prostorové navigace zprostředkované vnitřními kognitivními mapami. Kognitivní mapy by měly sloužit jako mentální reprezentace okolního prostředí a na základě prostorových vztahů různých orientačních bodů by měly napomáhat správné allocentrické orientaci v prostoru, tedy orientaci bez ohledu na současnou polohu těla nebo jeho dosavadní pohyb a trajektorii (Tolman, 1948).

Studium této teorie se ale rozšířilo až po převratném objevu specifických neuronů v hipokampu, konkrétně v oblasti CA1 a DG, jejichž aktivita se vztahovala ke konkrétnímu místu v prostředí. Tyto neurony byly nazvány „place cells“, tedy neurony místa (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Ukázalo se, že neuron místa má jasně dané receptivní pole, které svojí aktivitou odpovídá pouze na navštívení specifického místa prostředí zvířete (O'keefe, 1976; O'keefe et al., 1975). Každá buňka pak reaguje na odlišné pozice zvířete a společně tak představují vnitřní reprezentaci okolního prostředí v mozku: tedy vytváří vnitřní mapu prostředí vztahenou k aktuální pozici jedince (O'keefe, 1976; O'keefe et al., 1975). Spojení těchto poznatků s dřívější představou E.C. Tolmana dala vzniknout velmi důležité souhrnné práci OKeefe a Nadela, podle které jsou právě neurony místa základními stavebními kameny mentálních (allocentrických) kognitivních map vnějšího prostředí, což dělá z hipokampu strukturu naprosto nepostradatelnou pro schopnost prostorové navigace a reprezentace nejen

okolního prostoru ale také různých událostí nebo zážitků spojených s prostorem (O'Keefe & Nadel, 1978).

Pro detailní studium navigace a orientace v prostoru bylo následně použito mnoho různých behaviorálních úloh a invazivních zásahů do fungování hipokampu. Podle teorie kognitivního mapování by mělo narušení funkce hipokampu, neuronů místa nebo jejich projekcí zhoršit prostorovou navigaci, ale ne vždy se ukázaly výsledky podobných studií jednoznačné (přehledně v (Best & White, 1999). Také bylo publikováno nepřeberné množství studií za účelem úplného pochopení fungování jak neuronů místa, tak mnoha dalších následně objevených typů hipokampálních buněk, jako například buňky směru hlavy (head direction cells) nebo mřížkové buňky (grid cells) (Gerlei et al., 2020; Grieves et al., 2022). Tyto další druhy buněk ale postupně odvracely pozornost od hipokampu ke korovým oblastem, jako například entorhinálnímu kortexu, které by také měly mít velmi důležitou roli ve zpracování prostorových informací v mozku (pro přehled (Moser et al., 2017). I přesto si však převratný objev a detailní studium neuronů místa a dalších podobných typů buněk zasloužil roku 2014 udělení Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu pro Johna O'Keefa, May-Britt a Edvarda I. Moserovy.

### 1.2.2.3 Role hipokampu v kognitivní flexibilitě

Kognitivní flexibilita představuje schopnost změnit dříve využívanou behaviorální nebo mentální reakci na optimálnější chování pro aktuální situaci. Žijící organismy včetně člověka tak dokáží adekvátně reagovat na změny v prostředí, bezprostřední nebezpečí nebo například odměnu a trest v behaviorální úloze (Armbruster et al., 2012). Toto komplexní chování závisí na efektivním zapojení různých mozkových procesů, aby bylo možné efektivně identifikovat výrazné změny v okolí, cíleně k těmto změnám usměrnit pozornost, určit, že předchozí strategie již není vhodná, inhibovat předchozí vzorce chování a stanovit novou strategii (Dajani & Uddin, 2015; Nilsson et al., 2015). Ačkoliv je tato funkce primárně připisována oblasti prefrontálního kortexu (Spellman et al., 2021), velmi důležitou roli hraje také hipokampus (Anacker & Hen, 2017). Po inaktivaci dorsálního (Telensky et al., 2011) i ventrálního hipokampu (Torres-Berrío et al., 2019) u potkanů se zhoršila jejich schopnost přeučení se na nové podmínky v behaviorálních úlohách, jejichž původní verzi se před tím zvířata naučila. Navíc bylo také pomocí neurozobrazovacích metod ukázáno zapojení hipokampu do flexibilního řešení testů u lidí (Monk et al., 2002; Takahashi et al., 2008).

### 1.2.3 Neurogeneze v dospělém mozku

Dlouhou dobu se věřilo, že po ukončení embryonálního vývoje je již centrální nervová soustava kompletní a žádné nové neurony se nevyvíjí a nezačleňují do stávající nervové sítě (Ramón y Cajal & May, 1928). První zmínky o možné adultní neurogenezi u potkanů, tedy kontinuálního vývoje nových neuronů v dospělosti, se objevily v sedmdesátých letech při autoradiografických experimentech se značeným [<sup>3</sup>H]-tymidinem. Tato molekula se inkorporuje do DNA dělících se buněk a kromě dalších byla její akumulace zjištěna právě v mozku potkanů (Altman, 1962). Postupem času a s novými metodami byly známky neurogeneze v dospělosti objeveny i u dalších druhů živočichů jako například u hmyzu (Cayre et al., 2007), plazů (Font et al., 2001), pěvců (Goldman & Nottebohm, 1983), myši (Bordiuk et al., 2014) nebo u kosmanů (Gould et al., 1999).

S rostoucím počtem důkazů adultní neurogeneze u živočichů se začala postupně stáčet pozornost k člověku. Vzhledem k omezeným možnostem výzkumu lidského mozku ale získaná data byla dlouho nejednoznačná. První studie možnosti existence adultní neurogeneze u lidí ukázala inkorporaci bromodeoxyuridinu (BrdU), detekovatelného syntetického analogu thymidinu, do buněk DG ve vzorcích od pacientů s rakovinou (Eriksson et al., 1998). A i když i dalšími metodami byly prokázány známky adultní neurogeneze u lidí, začínají se hromadit také studie, ve kterých se takových výsledků nepodařilo dosáhnout (pro přehled (Moreno-Jiménez et al., 2021). Limitace studia adultní neurogeneze u lidí jsou dány nejen možným ovlivněním dat klinickým stavem (Parent et al., 1997), sběrem postmortem vzorků (Moreno-Jiménez et al., 2021), ale také například nepatrnými odlišnostmi ve zpracování vzorků a následné histologii (Flor-García et al., 2020; Tartt et al., 2018).

Neurogenezi během dospělosti pozorujeme především v oblasti subventrikulární zóny (SVZ) laterálních komor a subgranulární zóny (SGZ) hipokampálního gyru dentatu (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). Kromě toho byly ale známky adultní neurogeneze objeveny také ve striatu, neokortexu nebo hypothalamu (Lorenzini et al., 2021). I když se vývoj buněk v obou hlavních neurogenních zónách liší (Doetsch et al., 1997; Toni & Schinder, 2016), v SVZ i SGZ se nachází neurální kmenové buňky (NSCs), které mohou proliferovat a dát tak vzniknout novým multipotentním progenitorovým buňkám (NPCs) (Kempermann & Gage, 1999; Reynolds & Weiss, 1992). Tyto buňky se rychle dělí a vytvářejí migrace schopné neuroblasty, ze kterých se mohou vyvinout neurony (Alvarez-Buylla & Lim, 2004).

Neurogenní nika subventrikulární zóny je zdrojem nových neuronů, které migrují především do čichového laloku (Akter et al., 2021) nebo do neokortexu (Magavi et al., 2000). Nově maturující neurony ze subgranulární zóny migrují do sousední granulární vrstvy a zůstávají uloženy v *gyrus dentatus*, kde jsou integrovány do stávající sítě granulárních buněk (Brandt et al., 2003). Nové granulární buňky DG zřejmě mají roli v základních hipokampálních funkcích jako jsou učení a paměť, včetně té epizodické (Leuner et al., 2006).

#### 1.2.3.1 Vývoj nových buněk SGZ

Subgranulární zóna je úzký pás buněk uložený na pomezí granulární a polymorfni vrstvy DG hipokampu (viz Obr č. 1) (Amaral et al., 2007). V této tenké vrstvě se nachází těla neuronálních kmenových buněk (NSCs), neboli buněk typu 1, které se mohou dělit sice jen pomalu, ale za to se předpokládá, že mají možnost sebeobnovy neomezenou. Tyto buňky mají radiální výběžek směřující do molekulární vrstvy DG, kde se široce větví (Toni & Sultan, 2011). Vlivem tonické GABA signalizace od interneuronů (Song 2012), nebo zvýšenou neuronální aktivitou při epileptickém záchvatu (Parent et al., 1997) se mohou tyto buňky začít dělit. Dávají tak vzniknout mnohem potentnějším buňkám typu 2 (neurální progenitorové buňky, NPCs) s jednodušší morfologií s krátkými horizontálně uloženými výběžky (Fukuda et al., 2003). Tyto buňky už mají větší proliferační schopnost a mohou mít relativně různorodou morfologii. NPCs migrují ze SGZ do sousední granulární vrstvy, kde maturují a stávají se z nich mladé granulární neurony, buňky typu 3 (Brandt et al., 2003; Toni & Sultan, 2011).

Celý tento proces vývoje nového granulárního neuronu trvá přibližně 8 týdnů (Toni & Sultan, 2011) a jednotlivá vývojová stádia jsou relativně jasně rozpoznatelná nejen dle své morfologie ale také podle dynamicky se měnícího profilu exprimovaných markerů. V počátečních fázích vývoje se nové buňky typu 1 podobají gliím nejen morfologicky ale také exprimují gliové markery typu GFAP (glial fibrillary acidic protein), nestin nebo Sox2 (Steiner 2006, Fukuda 2003, Toni 2011). U následujícího stádia vývoje, buněk typu 2, se postupně snižuje exprese původních gliových markerů a začínají se exprimovat neuronální markery, jako je například doublecortin (DCX). Kromě toho exprimují také GABA receptory, jejichž aktivace může napomoci spuštění exprese proneurálního faktoru NeuroD. Během druhého týdne od (Fukuda et al., 2003; Steiner et al., 2006; Toni & Sultan, 2011) rozdělení původní NSC exprese těchto faktorů naprosto převládne a vznikají buňky typu 3, nezralé neurony (Fukuda et al., 2003; Toni & Sultan, 2011). Během finálního dozrávání (od cca třetího týdne) v granulární neurony

již nové buňky vykazují klasickou expresi postmitotických neuronálních markerů jako jsou NeuN a calbindin (Brandt et al., 2003).

Hlavním regulátorem procesu neurogeneze v SGZ hipokampu je především GABAergní signalizace pocházející z hipokampálních okruhů. Zatímco na buňky typu 1 GABA klasicky působí tlumícím efektem, na buňky typu 2 začíná GABA působit excitačně (Tozuka et al., 2005). Tato příchozí GABAergní aktivační signalizace z hipokampu napomáhá další diferenciaci nových buněk, vývoji jejich dendritů a synaptického zapojení do stávající neuronální sítě granulórní vrstvy (Ge et al., 2006). Během toho období (cca ve stáří 4-6 týdnů) vykazují nové neurony nižší práh pro vznik membránového potenciálu a vysokou synaptickou plasticitu, což u buněk indukuje dlouhodobou potenciaci (LTP) (Ge et al., 2007). S takovými vlastnostmi jsou nové neurony preferenčně zapojovány do hipokampálních okruhů (Park et al., 2016). Až po 6. týdnu vývoje začínají být nové buňky okolními interneurony normálně inhibovány (Ge et al., 2007). Po tomto období dochází ještě k finálnímu dotváření dendritických trnů až přibližně za 8 týdnů od svého vzniku získává neuron stejné morfologické a fyziologické znaky jako granulórní buňky vzniklé během embryogeneze (Laplagne et al., 2007; Toni et al., 2007).

Na úrovni celého organismu je známo mnoho vnějších vlivů, které mají významný vliv na proces adultní neurogeneze, a to jak negativní, tak pozitivní. Zřejmě nejsilněji negativně působícím faktorem je stres (Cameron & Gould, 1994). Samozřejmostí je ale také vliv zvyšujícího se věku (Kuhn et al., 1996), podávaných léčiv nebo některých onemocnění, jako jsou například Alzheimerova choroba nebo některá nádorová onemocnění (více v (Moreno-Jiménez et al., 2021)). Naopak ale mohou být jednotlivé fáze vývoje nových neuronů efektivně podpořeny. Samotné dělení buněk je například podpořeno epileptickými záchvaty (Parent et al., 1997), proliferace je zlepšována fyzickou aktivitou (Brandt et al., 2003; van Praag et al., 1999) a míra přežívání progenitorových buněk může být zase silně zlepšena obohacováním životního prostředí (Kempermann et al., 1997).

### 1.2.3.2 Role nově dozrávajících neuronů

Vzhledem k tomu, že je neurogeneze v dospělosti převážně centralizována do oblasti DG, byla funkce nových neuronů odedávna spojována s hlavními hipokampálními funkcemi, převážně s učením a pamětí (Gazzara & Altman, 1981). Následný zájem o možnou roli adultní

neurogeneze v procesu učení a paměti byl podepřen dalšími poznatky o nových neuronech, jejich integraci do stávajících synaptických sítí (Hastings & Gould, 1999; Markakis & Gage, 1999) nebo generování potenciálu (van Praag et al., 2002). Další práce také dokládají, že neurogeneze v dospělosti může mít roli v prostorovém učení (Kee et al., 2007; Stone et al., 2011), nebo například ve vybavování si vzpomínek spojených se strachem nebo stresem (Kirby 2012) a může mít vliv na náladu nebo kognitivní flexibilitu (Anacker & Hen, 2017).

Několik studií ukazuje souvislost mezi počtem nových neuronů a schopností učit se (Kempermann et al., 1997; Kempermann & Gage, 2002; van Praag et al., 1999). V úlohách závislých na správné funkci hipokampu může trénink a učení zvýšit míru adultní neurogeneze, a tedy počet nově vznikajících neuronů v DG (E. Gould et al., 1999). A naopak narušení procesu neurogeneze v dospělosti má negativní vliv na procesy učení (Bruel-Jungerman et al., 2005; Shors et al., 2002). Na druhou stranu ale existuje mnoho studií, které neobjevily souvislost mezi mírou adultní neurogeneze s učením nebo pamětí (např. (Döbrössy et al., 2003; Raber et al., 2004; Snyder et al., 2005).

Výkon v behaviorálních i jiných testech závislých na hipokampu mohou nově narozené neurony ovlivňovat nepřímo přes jejich schopnost modulace aktivity maturovaných granulárních buněk. Inhibice neurogeneze se projevila zvýšením počtu aktivních granulových buněk během přeučování v behaviorálních úlohách (Burghardt et al., 2012; Lacefield et al., 2012). Zvýšená neurogeneze má naopak za následek snížení excitability DG (Ikrar et al., 2013) a snížení aktivity maturovaných granulárních buněk (Drew et al., 2016). Toto působení může být vysvětleno vlivem dozrávajících neuronů na inhibiční interneurony, které tak více působí na plně maturované buňky (Anacker & Hen, 2017). Navíc tento efekt závisí na vývojovém stadiu testovaných neuronů, 8týdenní buňky aktivují inhibiční interneurony mnohem silněji než buňky 4týdenní (Temprana et al., 2015), což potvrzuje na to, jak je důležité rozlišovat, na jak staré buňky je vědecká studie zaměřena.

#### *1.2.3.2.1 Funkčního zapojení nových neuronů v DG*

Funkce nově dozrávajících neuronů je zřejmě závislá na jejich specifických elektrofyzilogických vlastnostech během vývoje. Jak již bylo zmíněno, v určitém časovém okně je u buněk redukována GABAergní inhibice, na kterou buňky reagují zvýšenou excitabilitou membrány (Toni & Sultan, 2011). Takže i slabý signál, který by dospělý neuron

neaktivoval, u dozrávající buňky spouští akční potenciál (Espósito et al., 2005; Mongiat et al., 2009). Kromě toho ale také mají relativně nízký počet excitačních aferentních synapsí (Toni & Schinder, 2016), který je ale i tak dostatečný pro aktivaci podstatného množství dozrávajících neuronů (Mongiat et al., 2009) a tak stále nezralým buňkám (cca 3-4 týdny věku) umožňuje přispívat k vnitřnímu zpracování informací. Neurální síť DG je tak ovlivňována mnohými signály, na které by maturované neurony vzhledem k jejich inhibici nereagovaly (Espósito et al., 2005).

Na těchto fyziologických odlišnostech nově dozrávajících neuronů v DG jsou založené teorie o dvou unikátních funkcích těchto nových neuronů a to tzv. temporální separace a integrace vzorců (Aimone et al., 2009; Becker et al., 2009). Roli nových neuronů jako substrátu pro temporální separaci postuloval Aimone (2009). Během určitého časového období je konkrétní populace nově dozrávajících neuronů právě ve fázi vývoje, kdy je citlivá na příchozí signály a je tedy snadno excitovatelná. Všechny události tohoto časového okna tak aktivují tu samou skupinu nových neuronů, na které tak dochází k určité integraci vzorců aktivity. Pokud jsou ale události dostatečně časově vzdálené, při každé z nich dozrává jiná populace nových neuronů citlivá na příchozí signály. Dané události tak už nejsou propojované, ale naopak dochází k jejich většímu odlišení, tzv. temporální separaci (Aimone et al., 2009). Tento model byl již několikrát testován a prokázalo se, že schopnost asociovat si dvě časově blízké události je opravdu na adultní neurogenezi v DG závislá (Kesner et al., 2015; Winocur et al., 2006). Přímou v DG se poté potvrdil také vzájemný překryv neuronálních reprezentací dvou různých kontextuálních vzpomínek kódovaných nedlouho po sobě (Cai et al., 2016). Nové poznatky ale naznačují, že by si dozrávající neurony v DG mohly v některých případech částečně zachovávat svoji hyperexcitabilitu i dlouhé měsíce po svém uzrání (Ohline et al., 2018), čímž je myšlenka temporální separace významně zpochybněna.

Anatomické zapojení DG bylo inspirací pro vznik teorie tzv. separace vzorců jako další možné funkce nově dozrávajících hipokampálních neuronů. Signály přicházející do hipokampu jsou kódovány pomocí vzájemně se překrývajících kombinací aktivovaných buněk (Aimone et al., 2014). DG umožňuje, vzhledem k mnohonásobnému množství neuronů, rozložení informace na samostatné vzorce aktivity. To má za následek zabránění překryvu mezi kódujícími neurony a oddělení i velmi podobných signálů. Důsledkem je lepší rozlišování podobných vzpomínek (Aimone et al., 2014). Separace vzorců a je již všeobecně uznávanou funkcí DG (Leutgeb et al., 2007; Nash et al., 2021; Sahay et al., 2011). A i když nejsou výsledky vždy jednoznačné (Saxe



et al., 2006; Zhang et al., 2008), nově dozrávající neurony v této funkci zřejmě také hrají svoji roli (přehledně ve (Fölsz et al., 2023; McAvoy et al., 2015; Sahay et al., 2011). Ukázalo se, že inhibice neurogeneze vyústila v horší rozlišovací schopnost dvou podobných kontextů prostředí (Clelland et al., 2009; Kesner et al., 2015) a naopak podpora neurogeneze rozpoznávání kontextů zlepšila (Bekinschtein et al., 2013; McAvoy et al., 2016).

Studium temporální separace a integrace vzorců na behaviorální úrovni je v současnosti stále obtížné. I když existuje mnoho obecnějších behaviorálních testů zaměřených na funkci hipokampu, výzkum funkce nových neuronů v DG má méně možností a prozatím je výběr použitelných úloh na separaci nebo integraci vzorců omezený (Garthe et al., 2009). Možné teorie fungování nových neuronů v DG se ani nemusí navzájem vylučovat. Například dozrávající neurony jako takové mohou fungovat jako integrátory vzorců aktivity, ale zároveň aktivováním inhibičních interneuronů tlumí nepřímo aktivitu maturovaných granulárních buněk DG, čímž podporuje separaci jednotlivých vzpomínek (Aimone et al., 2009; Anacker & Hen, 2017). Ať už nové neurony hrají jakoukoliv roli, už jen samotné obohacování systému o nové buňky může být určitým mechanismem kódování nových vzpomínek bez nutného narušení těch starších a dříve uložených (Aimone et al., 2009; Appleby et al., 2011).

## 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Vzhledem k současným omezeným možnostem testovat u zvířat paměť podobnou té epizodické bylo **hlavním cílem této dizertační práce vyvinout asociační úlohu** pro laboratorní potkany. Zároveň byl kladen důraz na takové provedení úlohy, které by odráželo v přírodě značně pravděpodobnou situaci, kdy je nezbytné pamatovat si události již napoprvé. Postupnými úpravami experimentálního designu bylo cíleno na co nejjednodušší provedení jak pro experimentátora, tak pro testované zvíře.

Epizodické pamatování u lidí stejně jako paměť podobná té epizodické u zvířat je zásadně závislá na správné funkci hipokampu. Dalším krokem k validaci nové behaviorální úlohy bylo tedy ověření, zda je výkon a správně **naučené řešení nové úlohy asociováno s aktivací hipokampu** porovnáním míry exprese časného genu *Arc* v této struktuře u úspěšných, neúspěšných a kontrolních zvířat.

Paměťová úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA) na Kolotočovém bludišti byla již v minulosti spojena se správným fungováním hipokampu. Současná práce **zkoumá roli nově dozrávajících neuronů v DG potkanů na učení a přeučování** v této behaviorální úloze AAPA.

Posledním cílem této práce bylo **zjistit možný vliv u lidí velmi rozšířené arteriální hypertenze na míru hipokampální neurogeneze v dospělosti**. Za použití dvou animálních modelů hypertenze byl sledován počet nově dozrávajících neuronů v gyru dentatu hipokampu.

## 3 METODY

### 3.1 Zvířata

Pro jednotlivé experimenty byli použiti samci potkanů kmene Wistar, Long Evans, Sprague Dawley, Spontánně hypertenzní potkani (SHR) a potkani kmene Dahl. Využití jednotlivých skupin zvířat je detailně popsáno vždy na začátku dané experimentální části této dizertační práce. Po doručení do chovného zařízení byla všechna zvířata ponechána v klidu po dobu minimálně 10 dní pro aklimatizaci na nové prostředí. V kontrolovaném prostředí zvěřince (22 °C, 50% vlhkost, 12hodinový světelný cyklus) byli potkani chováni po dvojicích až trojicích v průhledných plastových klecích (50 x 25 x 25 cm) s volným přístupem k čerstvé vodě a krmivu po celou dobu trvání experimentů.

Všechny experimenty probíhaly ve světelné fázi dne, která byla zvířatům nastavena od 6 hod ráno. Pro snadnou identifikaci byla zvířata označena na ocasech pomocí jednoznačných proužků lihovým popisovačem. Veškerá manipulace se zvířaty probíhala striktně dle platného zákona na ochranu zvířat České republiky a v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady (2010/63/EU) o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

### 3.2 ČÁST 1: Vývoj nové Jednorázové úlohy párovacího učení s prodlevou (OTTER)

Učení a paměť jsou jak pro člověka, tak pro zvířata důležitou součástí života. A i když se každým dalším opakováním reakce na důležitou událost zlepšují a jednodušeji se pamatují. Není výjimkou, že některé pro život zásadní situace je potřeba si zapamatovat, i když se staly pouze jednou. Pokud by tak měla událost nastat znovu, jedinec musí být připraven a umět na ni správně zareagovat. Behaviorálních úloh založených na obdobném principu, které by mohly být využity pro studium detailů tohoto pamatování komplexních událostí na první pokus, není dostupných velký počet a mají své limitace (např. Bast et al., 2005; Dere et al., 2005; Kart-Teke et al., 2006). Hlavním cílem této práce bylo vyvinutí takové behaviorální úlohy, která by u potkanů modelovala jedinečnou potřebu si zapamatovat komplexní událost, i když ji zvíře zažije pouze jednou. V principiálně jednoduché Jednorázové úloze párovacího učení s prodlevou (OTTER) je pro zvíře zapotřebí si asociovat různé aspekty prožité epizody a využít zapamatovanou

útěkovou reakcí. Tato úloha tak v několika ohledech splňuje atributy epizodického pamatování, které jsou dle Tulvinga (1984) specifické pouze pro člověka, a tím podporuje možnost existence paměti podobné té epizodické u zvířat.

### **3.2.1 Zvířata**

Pro postupnou optimalizaci behaviorálního protokolu nové úlohy OTTER bylo využito několika různých kmenů laboratorních potkanů. V těchto pokusech byly použity potkani kmene Long Evans (n = 8, FGU chov), Wistar (n = 17, ENVIGO) a Sprague Dawley (n = 36, ENVIGO). Každý z využívaných kmenů má svá behaviorální ale také senzorická specifika (Prusky et al., 2002; Rudolfová et al. 2022), a proto bylo zapotřebí zjistit, která zvířata jsou nejvhodněji uzpůsobena pro tuto úlohu. Pro následný doplňující experiment bylo využito kmene Sprague Dawley (n = 34, ENVIGO) pro úpravu průchodu rozdělující přepážkou. Pro vlastní testování finálního protokolu behaviorální úlohy OTTER byli použiti potkani kmene Wistar (n = 32, ENVIGO).

Zvířata byla zařazena do experimentů ve věku přibližně 3 měsíců, kdy vážila 250-300 g. Kvůli snížení možného stresu zvířat byla před každým experimentem přivykána na manipulaci experimentátorem tzv. handlingem po dobu 3 minut během čtyř dní za sebou. Potkani byli chováni ve zvěřinci v blízkosti experimentální místnosti, aby se omezil možný stres způsobený každodenním přenosem zvířat a možné změny se podmínky okolních laboratoří. Během vlastního experimentu byla zvířata individuálně přenášena do vedlejší experimentální místnosti v rukou experimentátora.

### **3.2.2 Behaviorální aparatura**

Pro vývoj a testování úlohy OTTER bylo využíváno odhlučného prostředí podmiňovacích boxů (TSE Systems GmbH, Německo), ve kterém se nachází plastový box o rozměrech cca 45 x 45 cm s kovovou podlahovou mřížkou složenou z paralelně uložených tyček (průměr 0,5 cm, rozteč 1,5 cm). Aparatura je vybavena horizontálně uloženými laserovými detektory pohybu zvířete, kamerou pro sledování pohybu zvířat a reproduktorem, díky kterému je možné zvířatům uvnitř boxu pustit zvuk o frekvenci 2 až 22 kHz. Tento box je rozdělen pro zvíře stále otevřeným nízkým průchodem (4 x 40 cm) na dvě stejné části o rozměrech 22,5 x 45 cm. Jedna z těchto částí má tmavé stěny i strop a brání tak nechtěnému vniknutí světla z okolního prostředí (cca

3 lx, tmavý kompartment) a naopak druhá část má jak boční stěny, tak strop kompletně průhledné, a navíc je dodatečně osvětlený přidanou 240V lampou (cca 1090 lx, světlý kompartment) (viz Obr. 2). Intenzivní světlo vytváří pro potkany nepříjemné prostředí (Barker et al., 2010), které motivuje zvířata trávit více času ve tmavém kompartmentu. Takto navržené podmínky v obou kompartmentech pomáhají využití přirozené potřeby potkanů zdržovat se na bezpečnějším tmavém místě (Campbell & Messing, 1969) a vyhýbat se nechráněným otevřeným prostorům a tím je podpořena preference tmavého kompartmentu a také je eliminován počet přechodů zvířat mezi oběma kompartmenty (viz Obr. 3).

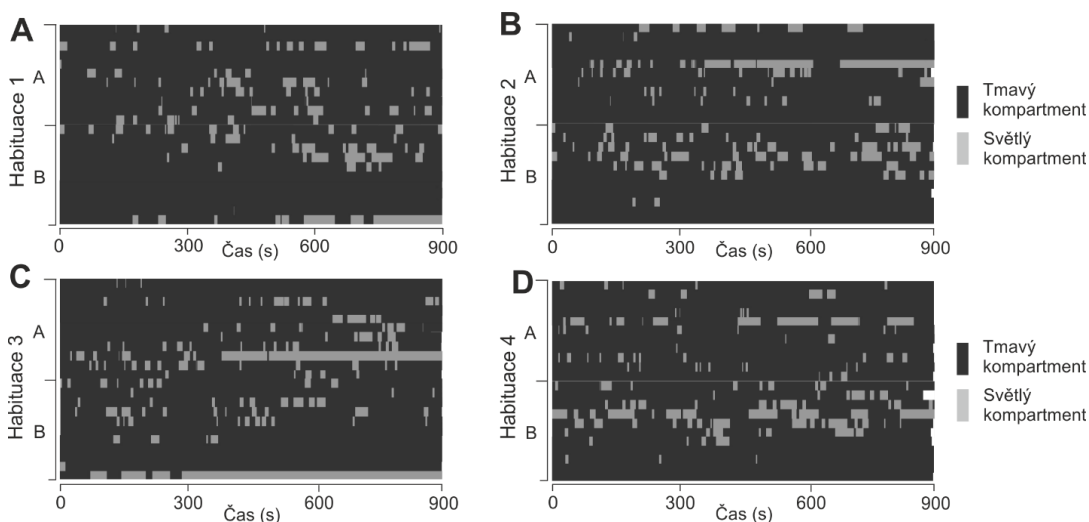


*Obr. 2 Experimentální aparatura nové behaviorální úlohy OTTER*

Pro experiment byly k dispozici dva obdobné podmiňovací boxy, ve kterých bylo pro zvířata záměrně vytvořeno olfaktoricky i vizuálně odlišné vnitřní prostředí. Zatímco v jednom byla instalována kruhová vložka s ornamenty a byl čištěn ředěným alkoholovým roztokem (kontext A), v druhém byl ponechán původní čtvercový tvar vnitřního plastového boxu a byl čištěn 2% octovým roztokem (kontext B). K těmto úpravám došlo z důvodu navození odlišného prostředí, aby jednotlivá experimentální sezení mohla proběhnout v odlišném kontextu a bylo tak možné eliminovat nechtěné kontextuální učení zvířat.

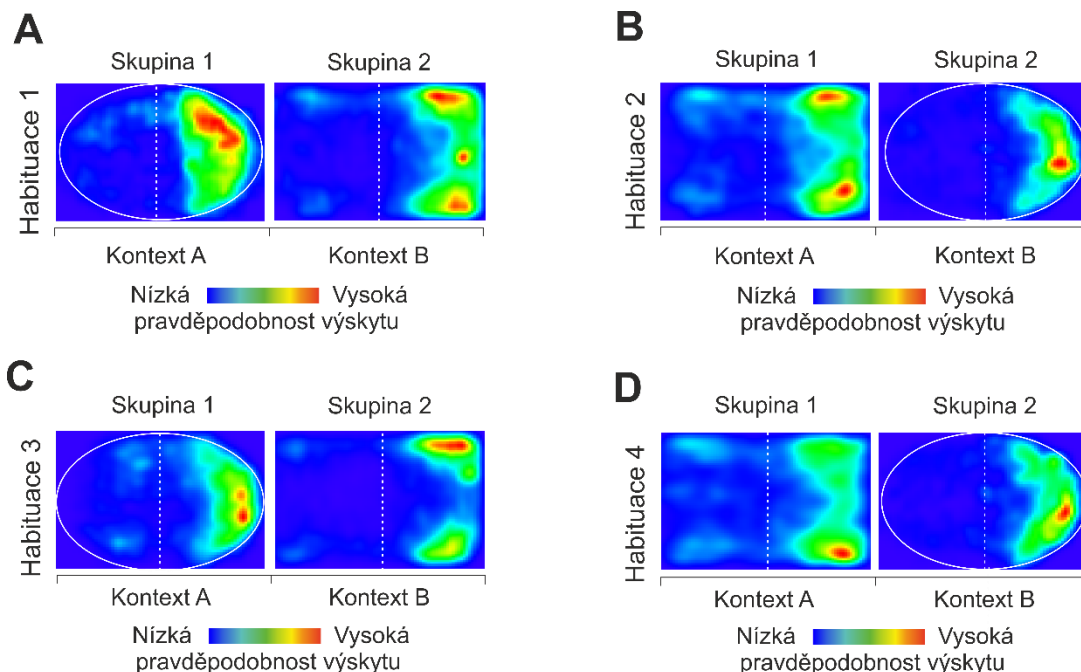
### 3.2.3 Finální protokol úlohy OTTER

První čtyři dny experimentu probíhala fáze tzv. **habituaace** za účelem přivyknutí zvířat na nové prostředí a zároveň snížení jejich exploračního chování. Zvířata byla vždy individuálně vkládána do tmavého kompartmentu střídavě vždy každý den do jiného boxu (střídavě 2x kontext A a 2x kontext B), aby si přivykla na obě tato prostředí. Habituační sezení trvalo 15 minut a díky stále otevřenému průchodu mezi oběma kompartmenty bylo umožněno volné explorování zvířat po celé aparatuře. Současně bylo chování zvířat zdokumentováno na videozáznamy pro následné analýzy jejich lokomoce. Parametrem určujícím míru habituaace na oba kontexty bylo čas trávený v tmavém kompartmentu a počet transferů zvířat mezi oběma kompartmenty. I když měla zvířata možnost se volně pohybovat po celém prostoru aparatury, právě uměle zvýšenou intenzitou osvětlení jsou motivována více setrvávat ve tmavém kompartmentu a méně explorovat ten osvětlený (Obr. 4). Počet transferů se tak během habituačních sezení, ale i mezi nimi, postupně snižoval. Pro kvalitnější hodnocení byla neutrální středová oblast definována jako oblast o šířce 2 cm, ve které se může zvíře pohybovat bez záznamu transferu. Hlavním důvodem pro definování této oblasti bylo nechtěné navyšování počtu transferů chybným zaznamenáváním softwaru jemných pohybů zvířete přímo ve středové oblasti na hranici obou kompartmentů.



**Obr. 3 Grafické znázornění pohybu každého zvířete mezi kompartmenty během všech habituačních sezení.**

Každá vodorovná řádka představuje 15 min sezení, ve kterém mohlo zvíře volně přecházet mezi tmavým (černá pole) a světlým kompartmentem (šedá pole). Svislá osa určuje momentální umístění zvířete v kontextu A nebo B.



**Obr. 4 Grafické znázornění preference zvířat pro trávení času ve tmavém kompartmentu během všech habitučních sezení.** (A-D) Pravděpodobnost výskytu zvířat během 15minutové habituace: modré odstíny znamenají nízkou pravděpodobnost výskytu, zatímco směrem k červeným odstínům barvy představují zvyšující se pravděpodobnost výskytu zvířat v daném místě aparatury.

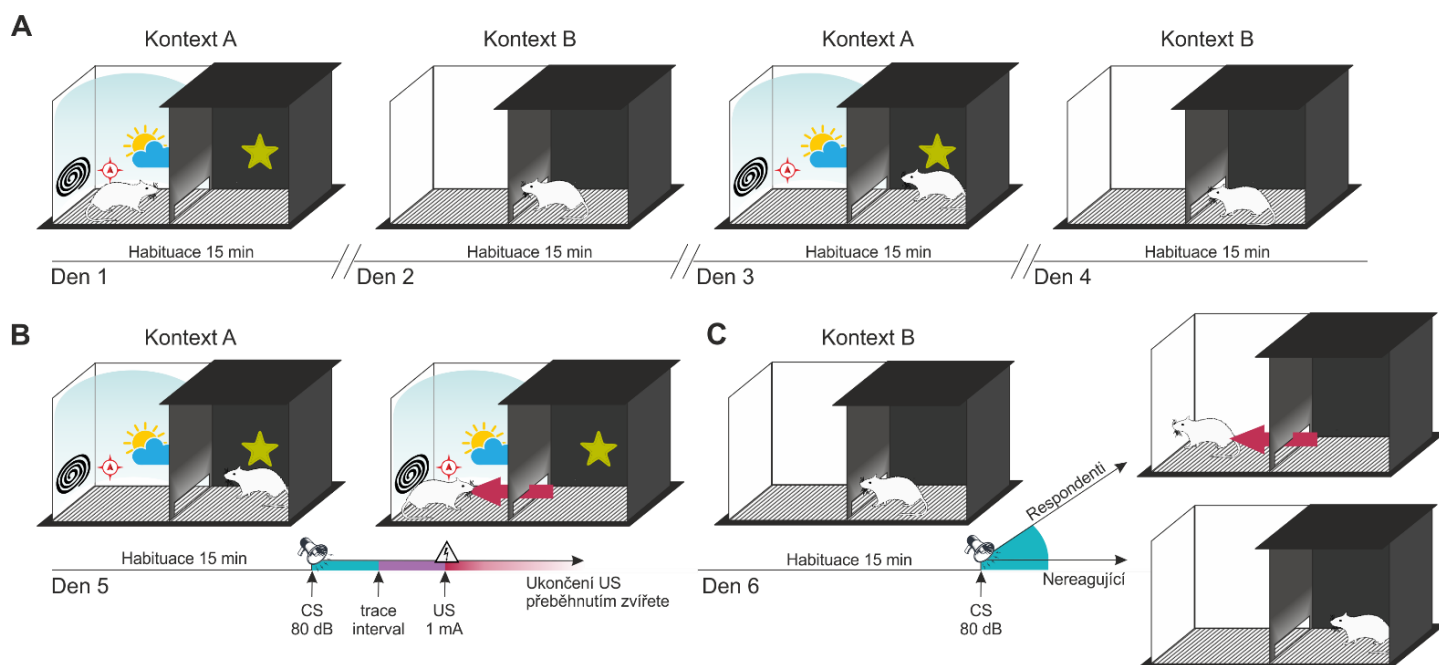
Pátý den experimentu během **tzv. párovacího sezení** jsou zvířata po prvotních 15 minutách volného pohybu jednorázově vystavena dvojici nepřekrývajících se signálů. Jakmile bylo zvíře po předchozích 15 minutách absolutně v klidu v tmavém kompartmentu, experimentátorem byl manuálně spuštěn 2s akustický podmíněný stimul (CS, 2400 Hz, 80 dB). Dvě sekundy (trace interval) po ukončení CS následovalo sepnutí pulsujícího elektrického proudu do kovové podlahy aparatury. Pravidelné elektrické ranky do tlapek zvířete (US, 1mA) byly ukončeny aktivním přeběhnutím zvířete do světlého kompartmentu. V případě, že se zvíře nepokusilo o útěk do světlého kompartmentu, byly elektrické ranky po 25 s automaticky zastaveny a zvíře bylo vyřazeno z experimentální skupiny. I kdyby si takové zvíře bylo schopno asociovat oba prožití stimuly, nemá zažitou útekovou reakci, která je třeba pro úspěšné řešení následujícího testovacího sezení a tím by mohl být znevýhodněno oproti ostatním zvířatům, která unikla. Bez ohledu na rychlost reakce, zvířata jsou 1 min po ukončení US vyjmuta z experimentálních boxů a navrácena do svých původních klecí ve zvěřinci. Celé toto akviziční

sezení je zaznamenáváno jak pomocí video nahrávek, tak také pomocí originálního softwarového a hardwarového vybavení podmiňovacích boxů (TSE Systems, Německo).

Následujícího šestého dne experimentu nastalo pro zvířata samotné **testovací sezení**, při němž se ověřilo, jak si zvířata na základě jediné předchozí zkušenosti dokázala asociovat oba dva časově oddělené stimuly. Stejně schéma střídání obou možných kontextů prostředí z habituačních sezení bylo i nadále zachováno a všechna zvířata byla tento poslední den experimentu testována právě v druhém kontextu, než proběhlo předchozí akviziční sezení. Tímto schématem bylo docíleno většího zobecnění podmínek, za kterých může dojít k obdobné situaci (stejně jako tomu může být i v přirozených podmínkách, kde je velmi malá pravděpodobnost, že se takto pro zvíře nebezpečná událost stane znovu za naprosto totožných podmínek). Zároveň bylo možné odlišit zvířata, která si zážitek spojila ‚nesprávně‘ s kontextem tmavého kompartmentu spíše než s předchozím zvukovým signálem.

Během samotného testovacího sezení bylo zvíře opět ponecháno bez zásahu minimálně po dobu 15 minut pro opětovnou exploraci prostředí a uklidnění. Po uplynutí této doby bylo opětovně chování zvířete zhodnoceno experimentátorem a v době, kdy zvíře v klidu odpočívalo v tmavém kompartmentu, byl manuálně spuštěn pouze akustický CS signál a reakce zvířete byla zaznamenána. Potkani, kteří do 10 sekund od počátku CS utekli do světlého kompartmentu, byli označeni jako „respondenti“ (tedy zvířata, která si dokázala správně vytvořit asociaci obou stimulů a současně se naučit efektivní způsob, útěk, jak se vyhnout opětovnému negativnímu zážitku). Zatímco potkani setrvávající v tmavém kompartmentu i po uplynutí této doby, byli označeni jako „nereagující“ (viz Obr. 5). Zvíře bylo dále ponecháno v experimentálním boxu po dobu následující 1 min, aby bylo posléze možné analyzovat možnou míru freezingu především u zvířat, která na CS nezareagovala útekem do světlého kompartmentu. Po uplynutí 1 minuty bylo zvíře předávkováno inhalačním anestetikem isofluranem a dekapitováno pro rychlé zpracování mozkové tkáně.





**Obr. 5 Schéma finálního experimentálního protokolu úlohy OTTER.** (A) Během prvních 4 habituačních sezení je zvíře střídavě vystavováno dvěma rozdílným kontextům, ve kterých má možnost volné explorační vždy po dobu 15 min. (B) Párovací sezení probíhá opět v opačném kontextu, než poslední den habituace. Po prvních 15 min je zvíře, když je v klidu v tmavém kompartmentu, vystaveno sekvenci CS-2s-US, která je ukončena přeběhnutím zvířete do světlého kompartmentu. (C) V posledním testovacím sezení, když je zvíře opět v klidu ve tmavém kompartmentu, je zvířeti puštěn samotný CS a je sledována reakce zvířete. Zvířata reagující útekem do světlého kompartmentu jsou označena jako „Respondenti“, zatímco pokud zvířata nevykazují útekovou reakci, jsou označena jako „Nereagující“

### 3.2.4 Postupný vývoj úprav úlohy OTTER

Během vytváření testovacího protokolu pro úlohu OTTER bylo objeveno několik aspektů důležitých pro řešení úlohy. Základním předpokladem pro úspěšné řešení je preference tmavšího a tím také pro zvířata zdánlivě bezpečnějšího prostředí tmavého kompartmentu. Takovéto chování je v přímém kontrastu s potřebou potkanů prozkoumávat okolní prostředí (Whishaw et al., 2006). Oproti původnímu protokolu úlohy (3 x habituace, 1 x párovací sezení a 1 x testovací sezení v neměnném prostředí původních boxů dodávaných jako součást podmiňovacích boxů (TSE Systems GmbH, Německo)) bylo zapotřebí provést postupně

několik úprav pro dosažení lepších ‚výkonů‘ testovaných zvířat, které vyústily ve finální podobu protokolu behaviorálního testování potkanů v úloze OTTER.

#### 3.2.4.1 Výběr vhodného kmene laboratorních potkanů

Prvním krokem optimalizace byl výběr vhodného kmene testovacích zvířat, protože je známo, že mezi jednotlivými kmeny laboratorního potkana využívaných ve výzkumu jsou zásadní rozdíly jak po behaviorální, tak například senzorycké stránce (Prusky et al., 2002; Rudolfová et al., 2022). Během porovnávacího testování zvířat LE, W a SD byla pozornost zaměřena především na mezikmenové rozdíly fyzické (lokomoce a explorační chování), kognitivní (rychlost habituace na nové prostředí a schopnost učení) nebo senzorycké (citlivost zraku vůči jasnému světlu). Všechna zvířata podstoupila původní protokol habituacního sezení, jak byl popsán výše. Pro tento experiment byl součástí aparatury průchod mezi oběma kompartmenty o rozměrech 11 x 9 cm (viz níže).

#### 3.2.4.2 Omezení fyzické explorační úpravou tvaru průchodu v přepážce

Cílem následné úpravy aparatury bylo dosažení co nejnižší explorační aktivity zvířat a nenásilného omezení jejich lokomoce na tmavý kompartment. Hlavním předpokladem správného řešení úlohy je minimální lokomoce zvířat a tím také co nejnižší počet transferů mezi kompartmenty. Tím je snížena pravděpodobnost náhodného transferu během párovacího a testovacího sezení, který by mohl být milně interpretován jako vědomá akce zvířete.

Zvířata kmene SD byla rozdělena na dvě skupiny. Každá ze skupin podstoupila původní protokol úlohy OTTER v aparatuře, která se lišila pouze tvarem a velikostí průchodového otvoru v rozdělovací přepážce mezi kompartmenty. Jedna skupina měla k dispozici průchod o rozměrech 11 x 9 cm umístěným uprostřed přepážky (tedy 18 cm z každé strany od stěn boxu), který je klasickou součástí hardwarového vybavení použitých podmíňovacích boxů. Druhá skupina zvířat měla upravenou rozdělovací přepážku s rozměry průchodového otvoru 4 x 40 cm (2,5 cm z každé strany od stěny boxu). Tento tvar průchodu také omezil prostupování světla ze světlého kompartmentu do tmavého a udělal tak tmavý kompartment pocitově bezpečnější pro testovaná zvířata.

### 3.3 ČÁST 2: Aktivita hipokampu během OTTER

Hlavním ukazatelem kvality behaviorálních úloh zaměřených na učení a paměť je odezva aktivity neuronálních buněk v hipokampu nebo se naopak po jejich narušení předpokládá zhoršený výkon jedince v takové úloze. Hraje tedy hipokampus potkanů nějakou roli v učení a správném řešení nové úlohy OTTER? Pro specifické mapování neuronální aktivity právě v konkrétním momentu testování naučeného chování byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace k detekci genu časné exprese *Arc* (Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein), který je jedním z prvních členů podílejících se na synaptické plasticitě (Minatohara et al., 2016; Nikolaienko et al., 2018), a tedy i teoretického mechanismu ukládání vzpomínek (Goto, 2022).

#### 3.3.1 Detekce genu časné exprese *Arc*

Ihned po ukončení testovací fáze nové behaviorální úlohy OTTER byla zvířata z finálního experimentu (W, n = 32) vyjmuta z aparatury a předávkována koncentrovanými parami isofluranu a ihned dekapitována. Co nejrychleji byl každý mozek vyjmut a zamražen v isopentanové lázni, která byla již předem vychlazena alkoholem na suchém ledu na přibližnou teplotu -50 °C. Takto čerstvě zamražené mozky byly až do dalšího zpracování uchovávány v teplotě -80 °C. Později byly mozky opatrně rozděleny na jednotlivé hemisféry a každá z nich dále na přibližně 4-5 mm části. První část obsahovala prefrontální kortex až oblast předního cingula, druhá část obsahovala dorsální hipokampus, třetí část obsahovala ventrální hipokampus a poslední část byla samostatnou hemisférou mozečku. Části mozků obsahující levý dorsální hipokampus a části obsahující levý ventrální hipokampus každého zvířete byly společně zality do dvou bločků ze zapouštěcího média (Tissue-Tek O.C.T. Compound medium). Vymražené bločky s jednotlivými strukturami byly pomocí kryostatu krájeny na 20 µm tenké řezy (Leica CM 1850, Německo), které byly ihned přenášeny na podložní mikroskopická skla. Postupně byl prokrájen a zpracován celý zamražený bloček tak, že na každém podložním skle byly umístěny samostatné řezy každého mozku, což zajišťuje naprosto shodné zpracování vzorků všech testovaných skupin zvířat najednou. Takto připravené řezy byly použity pro detekování genu časné exprese *Arc* v neuronech CA1 hipokampu pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH, compartment analysis of temporal activity by fluorescence *in situ* hybridization) (Guzowski et al., 1999; Kubik et al., 2012).

### 3.3.1.1 Průběh FISH

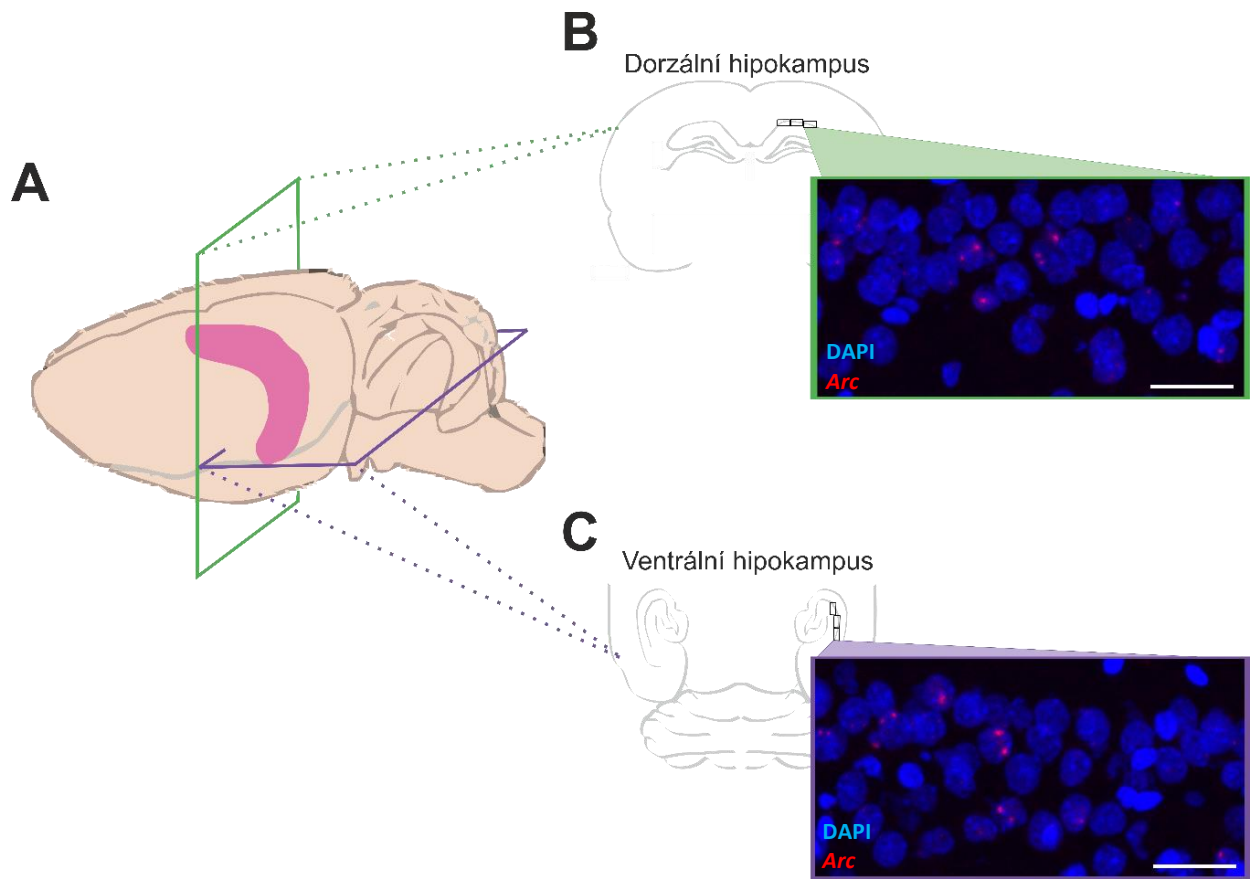
Z každého předem připraveného setu podložních skel s řezy dané mozkové struktury bylo náhodně vybráno 5 skel z průběhu celého bločku (celé struktury). Po fixaci vzorků 4% paraformaldehydem a směsí acetonu a methanolu (1:1) následoval prehybridizační krok, ve kterém byly vzorky na sklíčkách na 30 min překryty roztokem prehybridizačního pufru (50% formamid, 0.05 g/ml dextransu sodného, 50x Denhardtův roztok, 250 µl/ml RNA z kvasinek a 500 µl/ml DNA spermií lososa v citrátovém pufru). Následně byla intrajaderně uložená *Arc* mRNA hybridizována (přes noc, 56 °C) s připravenými antisense ribopróbami značenými digoxigeninem (za použití hybridizačního pufru o stejném složení jako byl použit pro prehybridizaci). Poté byly řezy opláchnuty citrátovým pufrem (SSC) a inkubovány v roztoku RNázy A (10 µg/ml v SSC, 15 min v 37 °C), aby došlo k odmytí přebytečných riboprób. Případná endogenní aktivita peroxidáz v buňkách byla zablokována jejich přesycením za pomoci 3% roztoku peroxidu vodíku v SSC. Vázané ribopróby v jádrech neuronů byly detekovány pomocí 2 hod inkubace s antidigoxigeninovou protilátkou (Anti-Dig-POD, 1:300, Roche) asociovanou s křenovou peroxidázou (HRP). Signál protilátky byl pro lepší vizualizaci dodatečně zesílen použitím tyramidového amplifikačního systému (TSA-Cy3, Perkin-Elmer). Posledním krokem bylo nespecifické značení buněčných jader pomocí DAPI (Invitrogen, ThermoFisher) a zalepení vzorků do ochranného montovacího media Vectashield (Vector Labs).

### 3.3.1.2 Zpracování mikroskopických dat

Fluorescenční signál exprimovaného genu *Arc* byl detekován pomocí skenovacího konfokálního mikroskopu Leica SP8 (objektivem HC PL APO 20x (n.a. 0,75) imm). Jaderný DAPI signál byl excitován laserem o vlnové délce 405 nm a jeho emisní spektrum bylo zachycováno v rozmezí 415-490 nm. Expres *Arc* mRNA představovaná TSA-CY3 signálem byla vizualizována pomocí excitačního laseru o vlnové délce 560 nm a detekcí emisního spektra v rozmezí 620-680 nm. Na každém analyzovaném řezu byly skenovány tři nepřekrývající se pozice na pyramidální vrstvě buněk CA1 hipokampu. Každá pozice byla snímána jako tzv. Z-stack, neboli soubor cca 22 optických vrstev, kdy je každá jednotlivá vrstva široká cca 1 µm.

Nastavení snímání každé vrstvy bylo vždy se stejným rozlišením (1024 x 514) a 1,7x přiblížením (Obr. 6).

Získaná mikroskopická data byla analyzována ve volně dostupném softwaru ImageJ (verze 1.38, (Schneider et al., 2012) za pomoci vytvořeného macra, které bylo laskavě poskytnuto RNDr. Štěpánem Kubíkem, Ph.D. Na každém snímku specifické pozice pyramidové vrstvy CA1 byla manuálně označena všechna kompletní a neponičená buněčná jádra značená DAPI signálem v prostředních a nejsilněji značených 3 vrstvách. Tak byl zajištěn výběr pouze úplně kompletních jader, ve kterých byla dále zjišťována přítomnost signálu. V případě obrazu nekompletního jádra by bylo nemožné zjistit přítomnost či nepřítomnost signálu, který by mohl i nemusel být lokalizován v odříznuté části buněčného jádra a nacházel by se tak na sousedním řezu daného mozku. Po eliminování nadměrného nespecifického pozadí červeného kanálu byla v označených jádrech zjišťována přítomnost signálu časného genu *Arc* pro spočítání poměru aktivovaných buněk (signál pozitivních) vůči celkovému počtu označených kompletních DAPI jader v dané oblasti pyramidální vrstvy hipokampu. Pro zajištění co nejvyšší objektivity počítání bylo před experimentátorem zaslepeno označení vzorků a ze stejného důvodu byl při značení kvalitních buněčných jader zobrazován pouze DAPI signál bez viditelného signálu časného genu.



**Obr. 6 Schématické znázornění lokalizace mikroskopického snímání exprese časného genu *Arc*.** (A) Ilustrativní zobrazení dvou rovin, ve kterých byly krájeny vzorky mozkové tkáně testovaných zvířat. (B) Lokalizace tří mikroskopicky snímaných pozic CA1 dorzálního hipokampu. (C) Lokalizace snímaných pozic CA1 ventrálního hipokampu. Měřítko mikroskopických snímků představuje 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.4 ČÁST 3: Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu

I přes mnoho poznatků o hipokampální neurogenezi během dospělosti stále nebyla jasně vysvětlena funkce takto nově dozrávajících granulárních buněk DG. Již dříve bylo ukázáno, že úspěšné učení potkanů v behaviorální úloze aktivního vyhýbání se místu (AAPA) je závislé na správné funkci hipokampu (Kubik 2006). Hraje ale v řešení této úlohy nějakou roli adultní neurogeneze a dospívající buňky? Pro zodpovězení této otázky byla u jedné z experimentálních skupin zvířat zablokována adultní neurogeneze podáním cytostatického temozolomidu (TMZ), který zastavuje dělení buněk včetně těch granulárních v SGZ hipokampu (Egeland et al., 2017). Vzhledem k jeho nespecifickému působení ve všech tkáních těla bylo však nejprve zapotřebí zjistit optimální dávkování TMZ, neboť je na něm závislá velikost populace zablokovaných buněk a následně také způsobené vedlejší účinky léčby. Navazujícím experimentem bylo dále zjišťováno, jak podání TMZ ovlivňuje učení a přeučování potkanů v úloze AAPA. Jak tato léčba ovlivnila adultní neurogenezi samotnou bylo hodnoceno z analyzovaného počtu dělicích se granulárních buněk v DG značených bromodeoxyuridinem (BrdU).

#### 3.4.1 Zvířata a jejich léčba

Pro experiment byli použiti samci potkana kmene LE (n= 70, FGU). Zvířata ve věku 28 dní byla rozdělena po trojicích do chovných klecí o rozměrech (50 x 25 x 25 cm). Po dobu 10 dní byla zvířata přivykána na kontakt s experimentátorem během tzv. handlingu v délce 2minutových intervalů.

Pro účinnou inhibici adultní neurogeneze v mozku potkanů byla vybrána látka temozolomid (TMZ), protinádorový lék poškozující DNA cílových buněk, které se tak nemohou dále dělit (Y. Wang & Feng, 2020). Léčivo bylo připravováno rozpuštěním kapsle (Temodal® 20 mg, Schering Plough, Německo) v okyseleném fyziologickém roztoku (pH titrováno na 3,5 pomocí kyseliny chlorovodíkové). Pro úplné rozpuštění TMZ byl roztok dále vortexován a za stálého chlazení na ledu byl ještě 30 minut promícháván na třepačce (50 rpm). Roztok byl zvířatům aplikován intragastrickou sondou okamžitě po vytvoření v objemu potřebném pro správnou dávku. Kontrolní zvířata dostala stejný objem okyseleného fyziologického roztoku (SAL), jako zvířata dostávající roztok o koncentraci 40 mg/kg TMZ. TMZ byl podáván potkanům chronicky po dobu 4 týdnů, vždy tři po sobě jdoucí dny v týdnu (úterý až čtvrtek), mezi 9 a 11 hodinou dopolední.

Pro optimální dávkování TMZ bylo nejprve zapotřebí najít takové dávkování, které účinně odstraní vznik nových neuronů v DG a zároveň bude mít co nejmenší vedlejší účinky ovlivňující chování zvířat. Z toho důvodu byly vybrány dávky 10, 25 a 40 mg/kg tělesné hmotnosti zvířat, po jejichž podání byla zhodnocena míra neurogeneze, myelosuprese a vliv na tělesnou hmotnost zvířat. Na základě získaných výsledků (viz dále), byla vybrána dávka 25 mg/kg, která byla dále použita pro inaktivaci adultní neurogeneze potkanů v behaviorální úloze AAPA na kolotočovém bludišti. Po pozdějším zjištění negativních účinků této koncentrace oproti kontrolní skupině, byl experiment opakován s použitím nejnižší dávky TMZ (10 mg/kg) za účelem vyvarování se co největšímu množství nechtěných účinků TMZ.

Pro stanovení míry adultní neurogeneze bylo využito schopnosti BrdU inkorporovat se do dělicí DNA a tím tak označit nově vznikající buňky. Posledního dne TMZ aplikace byl zvířatům intraperitoneálně aplikován roztok BrdU o koncentraci 50 mg/kg ve fyziologickém roztoku (rozpuštění BrdU probíhalo při 40 °C).

Po ukončení TMZ/SAL léčby zvířat a jednorázovém podání BrdU byla zvířata ponechána další tři týdny v klidu pro úplné zotavení. Po uplynutí této doby byly skupiny zvířat zařazené v testu adekvátní dávky TMZ usmrceny a vzorky mozků byly analyzovány pro zjištění dosažené míry adultní neurogeneze v DG. Zvířata podstupující behaviorální testování byla po uplynutí lhůty zařazena do experimentu, po kterém bylo stejným způsobem jako u předchozích zvířat zjišťován počet nově dozrávajících neuronů v DG.

### **3.4.2 Test dávkování TMZ**

Všechny kontrolní testy zvířat byly provedeny ve třech kritických časových bodech během procedury: před léčbou TMZ (před TMZ), ihned po léčbě TMZ (po TMZ) a po třech týdnech od ukončení léčby (po zotavení). Zkušeným experimentátorem bylo v každém časovém bodě jemně odebráno 200–450 µl krve z ocasní žíly všech zvířat. Vzorky krve byly odesílány k analýze do Laboratoře Freston s.r.o. (Česká republika). V krevních vzorcích byly měřeny počty erytrocytů a leukocytů pomocí veterinárního hematologického analyzátoru (Abacus Junior Vet 5, Diatron MI PLC, Maďarsko). Protože TMZ způsobuje myelosupresi, bylo hodnoceno snížení počtu bílých krvinek ve všech léčebných skupinách ve srovnání s kontrolní skupinou ihned po ošetření TMZ (POST). Navíc byly posléze imunohistochemicky obarveny doublecortin pozitivní buňky (DCX+), aby se vyhodnotilo obnovení neurogení niky SGZ po zotavení.

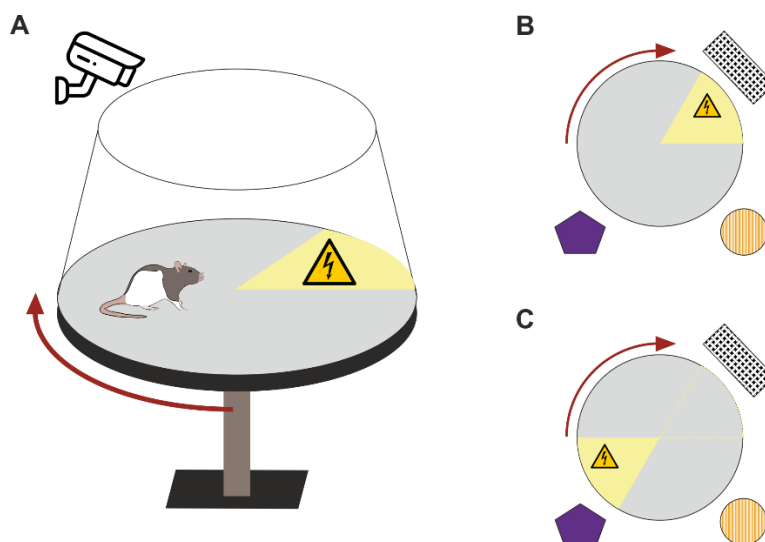


U testovaných zvířat byla hodnocena senzomotorika pomocí testu chůze po lati (podle Hamm et al., 1992). Pro test byla použita 2 m dlouhá a 2 cm široká dřevěná lať a pro hodnocení byly použity průměrné počty sklouznutí zvířat ze tří po sobě jdoucích pokusů. Aby u zvířat nedošlo k navození bezmoci, napřed postupně všechna z jedné klece dokončila jeden pokus, než podstoupila další. Nakonec byla jako důležitý ukazatel zdravotního stavu zvířat sledována tělesná hmotnost, protože odráží chuť k jídlu a přirozený růst. Z toho důvodu byla zvířata každý týden vážena.

### **3.4.3 Úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA) na Kolotočovém bludišti**

#### **3.4.3.1 Behaviorální aparatura Kolotočového bludiště**

Kolotočové bludiště (Carousel maze) je plochá kruhová aréna (82 cm v průměru) ohraničená průhlednou plastovou stěnou (vysoká 60 cm), která je umístěna přibližně ve výšce 1 m nad zemí. Během spuštěného experimentu celá aréna pomalu rotuje rychlostí přibližně 1 otáčky/min ve směru otáčení hodinových ručiček. Softwarově je na aréně definován sektor o velikosti 60° výšece kruhu, který zůstává vzhledem k místnosti stabilní a neotáčí se společně s arénou (Obr. 7). Tento sektor je pro zvířata neviditelný, ale zároveň je vstup do něj trestán mírnou elektrickou rankou do tlapek potkana (200-600  $\mu$ A, 50 Hz). Dokud zvíře neopustí definovaný sektor dostává další ranky v intervalu 1200 ms. Obdržení elektrické ranky je zprostředkováno přes implantovaný jehlový konektor v kožní řase na zádech potkana. Pro bezpečný pohyb po aréně a vyhýbání se stabilnímu sektoru musí zvířata využívat čistě jen vzdálené orientační body experimentální místnosti. Dostupnější blízké značky na aréně, jako jsou pachy, stopy moči nebo výkaly, jsou ve smyslu stále se měnících pozic na rotující aréně irelevantní.



**Obr. 7 Kolotočové bludiště pro testování úlohy aktivního vyhýbání se místu.** (A) Aparatura kolotočového bludiště. (B) Umístění zakázaného sektoru během akvizičních sezení (ACQ1 – ACQ5) a (C) umístění zakázaného sektoru během fáze přeučování (REV1 – REV4).

Kromě implantované jehly v podkoží potkana je konektor vybaven také referenční LED diodou, která je zaznamenávána kamerou umístěnou nad bludištěm a pohyb zvířete je tak detekován ve všech místech arény. Pomocí druhé LED diody umístěné na vnějším okraji arény je zaznamenávána její rotace. Společně jsou oba signály diod zpracovávány programem Tracker (Biosignal Group, USA), který také v případě lokalizování zvířete v definovaném sektoru spouští elektrickou ranku. Tím, že aréna rotuje ale vyhrazený sektor zůstává stabilní, je zřejmé, že neefektivnější strategií řešení této úlohy je chůze v protisměru rotace, aby nedocházelo k pasivnímu „dovezení“ zvířete do sektoru.

### 3.4.3.2 Průběh behaviorální testování AAPA

Behaviorální úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA) na Kolotočovém bludišti se skládá ze tří po sobě jdoucích fází: habituace, akvizice a přeučení. První den experimentu je pro zvíře habituacním sezením, při kterém si zvyká na nové prostředí rotující arény. Toto sezení trvá 20 minut a během sezení není v bludišti vymezen sektor pro vyhýbání a zvíře má možnost celou dostupnou plochu explarovat bez omezení. Následujícího dne začíná sekvence 5 po sobě jdoucích dní, kdy zvíře každý den podstupuje jedno akviziční sezení (ACQ1 – ACQ5). Při těchto sezeních je již softwarově definován 60° sektor, kterému se zvíře učí vyhýbat. Pokud se zvíře

úspěšně naučí vyhýbat se sektoru (stanovená hranice je max. 10 vstupů do sektoru za poslední ACQ5 sezení), následující 4 dny probíhají sezení přečovací (REV1 – REV4). Rozdílem oproti předchozí akviziční fázi učení je změna umístění sektoru pro vyhýbání o 180°.

Před každým sezením bylo zvíře vloženo na neotáčející se arénu na stejné místo, které není ani v jedné z fází experimentu součástí trestaného sektoru, s hlavou zvířete směřující k plastové stěně arény. Ihned po odchodu experimentátora z místnosti byla spuštěna rotace kolotočové arény a zároveň nahrávací systém sledující pohyb potkana po aréně.

### **3.4.4 Imunohistochemie**

Po zotavovací fázi (Test dávkování TMZ, n = 30) nebo po dokončení behaviorálního testování v úloze AAPA (n = 40) byla zvířata předávkována směsí ketamin/xylazin (50 mg/kg) a následně transkardiálně perfundována fosfátovým pufrům (0,2 M PB) a roztokem 4% paraformaldehydu v PB (PFA). Následně vyjmuté mozky byly ještě dalších 24 hod dodatečně fixovány v PFA. Pro důslednou kryoprotekci tkáně byl mozky postupně máčeny v 10%, 20% a 30% roztoku sacharózy v PB dokud neklesly na dno nádoby. Posléze byly mozky hluboce zamrazeny na suchém ledu a do pozdějšího zpracování byly uchovávány při teplotě – 80 °C. Mozky byly dále koronálně krájeny na řezy o šířce 40 µm pomocí kryostatu (Leica 1850, Německo), které byly do samotného imunohistochemického barvení uloženy v kryoprotektivním roztoku.

Pro detekci BrdU pozitivních buněk (BrdU+) buněk byly řezy nejprve důkladně promyty z kryoprotektiva pomocí Trisem pufovaného fyziologického roztoku (TBS). Pomocí 10minutového oplachu v roztoku 3% peroxidu vodíku a 10% methanolu v TBS byly deaktivovány endogenní peroxidázy v tkáni. Po důkladném omytí v TBS a 0,9% NaCl byla DNA 30 minut denaturována 2,5N HCl při 37 °C. Řezy byly několikrát omyty fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) a poté inkubovány v blokovacím pufru obsahujícím 0,3 % Triton X-100 a 10 % oslí sérum v PBS po dobu 1 hodiny. Následně byly inkubovány s primární anti-BrdU protilátkou naředěnou v blokovacím pufru (1:500; klon BU1/75, Serotec OBT0030) přes dvě noci při 4 °C. Řezy byly poté důkladně opláchnuty PBS a inkubovány po dobu 2,5 hodiny při pokojové teplotě se sekundární biotinylovanou IgG protilátkou (donkey anti-rat antibody, 1:500, Jackson/Dianova, 712-065-153) zředěnou pomocí PBS s přidaným 3% oslím sérem a 0,3% Tritonem X-100. Po opláchnutí PBS byly dále inkubovány v roztoku avidin/biotinového komplexu s konjugovanou křenovou peroxidázou (ABC elite kit standard,

PK6100, Vector Laboratories) po dobu 1 hodiny při koncentraci 9  $\mu$ l/1 ml každého činidla (v PBS). Nakonec byl použit diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich, D5905) jako substrát křenové peroxidázy (0,25 mg/ml DAB v PBS s 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,04 % NiCl<sub>2</sub>). Řezy byly přenesena na podložní sklíčka potažená želatinou. Po vysušení byla sklíčka omyta v roztoku Neoclear (Merck, 1098435000) a zalepena krycími skly pomocí montovacího média Neomount (Merck, 1090160500).

Obdobným barvením bylo docíleno vizualizace na doublecortin pozitivní buňky (DCX+) pro hodnocení proliferace buněk DG za použití stejného protokolu s výjimkou ošetření HCl. Byla využita primární protilátka Doublecortin C-18 (1:500, Santa Cruz, sc-8066) a sekundární biotinylovaná IgG protilátka (horse anti-goat, 1:500, Vector Laboratories, BA-9500).

### 3.5 ČÁST 4: Vliv hypertenze na adultní neurogenezi

V dnešní době se u lidí pořád častěji vyskytuje arteriální hypertenze projevující se vysokým krevním tlakem, který může mít za následek i další cerebrovaskulární onemocnění nebo kognitivní deficity, jako např. poruchy paměti (Carnevale et al., 2012). Toto propojení může naznačovat určitou souvislost mezi hypertenzí a procesy hipokampu včetně adultní neurogeneze. Tato část dizertační práce je proto zaměřena na možný vliv hypertenze na míru adultní neurogeneze za použití dvou zvířecích modelů hypertenze. Prvně byl měřen krevní tlak a následně hodnocena adultní neurogeneze u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) (Elmarakby & Sullivan, 2021), která byla chronicky léčena antihypertenzním kaptoprilem. V druhém experimentu byla adultní neurogeneze sledována u zvířecího modelu hypertenzních na sůl citlivých (SS) nebo naopak na sůl rezistentních potkanů kmene Dahl (SR). U citlivých zvířat vysoce slaná dieta způsobuje hypertenzi, zatímco u rezistentních zvířat takové projevy nevyvolává (Rapp & Dene, n.d.).

#### 3.5.1 Zvířata a jejich léčba

Inbrední zvířata kmene SHR a Dahl z chovné kolonie Fyziologického ústavu AV ČR byla zařazena do experimentu ve věku 28 dnů. V prvním experimentu byli použiti samci SHR (n = 41), kteří byli náhodně rozděleni mezi kontrolní skupinu (n = 20) a skupinu léčenou antihypertenzním kaptoprilem (n = 21), který funguje jako inhibitor enzymu angiotenzin-konvertázy a je tak používán v medicíně jako lék na mírnou až středně závažnou hypertenzi. Léčeným potkanům byl po dobu šesti týdnů kaptopril podáván rozpuštěný v pitné vodě (500 mg/l), zatímco kontrolní zvířata dostávala čistou vodu.

Ve druhém experimentu byli použiti samci potkanů kmene Dahl senzitivních na sůl v potravě (Dahl SS, n = 20) a samci kmene Dahl rezistentní na sůl (Dahl SR, n = 20). Polovina zvířat z každé z obou skupin dostávala po dobu šesti týdnů speciální stravu bohatou na sůl (4 % NaCl, Altromin C 1036), zatímco ostatní zvířata byla krmena dietou s nízkým obsahem soli (0,04 % NaCl, Altromin 1324).

Pro detekci nově narozených neuronálních buněk, byl všem zvířatům podán bromodeoxyuridin (BrdU) intraperitoneální injekcí v dávce 50 mg/kg rozpuštěný ve fyziologickém roztoku (20 mg/ml) dva týdny před eutanazií (Garthe et al., 2009).

### 3.5.2 Měření krevního tlaku a zpracování tkání

Po šesti týdnech léčby kaptoprilem popř. konzumace slané diety byl u všech potkanů měřen průměrný arteriální krevní tlak (MAP). MAP byl měřen v thiopentalové anestezii (50 mg/kg) ve femorální tepně zvířete pomocí katetru připojeného k měřicímu zařízení skládající se z MLT0380/D tlakového převodníku připojeného k QUAD Bridge a PowerLab/8SP (AD Instruments Ltd., Austrálie). Měření MAP u potkanů probíhalo ve spolupráci s kolegy z Oddělení hypertenze (FGÚ).

Ihned po měření krevního tlaku byla zvířata transkardiálně perfundována a mozky byly zpracovány pro následnou imunohistochemii. Samotná příprava vzorků stejně jako celý proces barvení BrdU+ buněk probíhala naprosto shodně s již dříve zmíněným postupem zpracování vzorků po experimentech s podáváním temozolomidu (viz. 3.4.4 Imunohistochemie, str. 45).

### 3.6 Analýza dat a celková statistika

Analýza dat získaných během vývoje protokolu behaviorální úlohy OTTER byla zaměřena především na parametry „počet transferů mezi dvěma kompartmenty“ a „čas strávený zvířetem v jednom z kompartmentů“ během habituačních sezení. Tyto sledované parametry nejlépe odrážejí míru exploračního chování zvířat a jejich ochotu trávit čas ve tmavém kompartmentu. Kromě toho u dat získaných při testování finálního protokolu úlohy OTTER byla analyzována reakce zvířete po spuštění CS během testovacího sezení. Videozáznamy ze všech těchto behaviorálních experimentů byly analyzovány za pomoci volně dostupného softwaru BORIS (verze 6.3.8.; Friard & Gamba, 2016).

Behaviorální data z úlohy AAPA byla získávána pomocí volně dostupného softwaru Carousel Maze Manager (Bahnik, 2013) a softwaru Tracker (Track Analysis, Biosignal Group, USA), který je schopen zaznamenávat polohu zvířete na otáčející se aréně pomocí referenčních diod. Pro hodnocení výkonu zvířat byly použity údaje o celkově ušlé vzdálenosti zvířete (bez ohledu na rotaci vlastní arény), která je odrazem lokomoční aktivity zvířete. Dalšími hodnocenými parametry byly počty vstupů do zakázaného sektoru a čas strávený v zakázaném sektoru. Pokud data nebyla normálně distribuována, byla použita vhodná transformace k dosažení normální distribuce. Po získání signifikantních výsledků v ANOVA testu, byl použit Gamesův-Howellův post hoc test k porovnání skupin (rozptyly nebyly zcela homogenní, ačkoli data byla normálně distribuována). Pokud byla nalezena významná interakce, byla provedena

simple-effect analýza k odhalení rozdílů mezi skupiny na každé úrovni opakovaného měření. Při posuzování významnosti korelací, byly hodnoceny jednostranné hodnoty  $p$  hodnoty, vzhledem k předpokládanému trendu mezi-skupinových rozdílů.

Mikroskopická data byla zpracovávána v softwaru ImageJ (verze 1.38, Schneider et al., 2012). Pro analýzu neuronální aktivity v době testování zapamatované asociace v úloze OTTER byl hodnocen poměr neuronů jež obsahovaly intrajaderný signál *Arc* vůči ostatním označeným kompletním neuronům bez signálu. Rozdíl v aktivitě CA1 neuronů respondentů, kteří se naučili úlohu úspěšně řešit, a „nereagující“ zvířat byl analyzován samostatně za použití dvoucestného ANOVA testu.

Buňky BrdU+ byly spočítány pod světelným mikroskopem s použitím 40x zvětšujícího objektivu. Obarvené BrdU+ buňky nalézající se v horní ohniskové rovině řezů byly opomíjeny, aby nedošlo k umělému navýšení počtu buněk jejich dvojnásobným započítáváním na řezných plochách. Pro odhad celkového množství buněk byla použita celá plocha DG každého řezu. BrdU+ buňky byly počítány v každém řezu bilaterálně a tato hodnota byla vynásobena šesti (interval vzorkování) pro získání odhadu počtu označených buněk pro celé DG. Počty imunohistochemicky obarvených buněk BrdU+ byly analyzovány pomocí t-testu.

Pro statistickou analýzu všech získaných dat byl použit software IBM SPSS Statistics (verze 23.0 a novější, IBM Corp., 2017). Některá získaná data podle Shapirova-Wilkova nebo Kolmogorova-Smirnoffova testu nesplňovala parametrické předpoklady a byla buď dále analyzována neparametrickými testy (Mannův-Whitneyův test, Friedmanův test, Wilcoxonův párový test, Kruskalův-Wallisův test, Fisherův exaktní test), nebo bylo pomocí vhodné transformace dosaženo jejich normálního rozložení. Poté byla data analyzována pomocí vhodného parametrického testu (analýza rozptylu (ANOVA) nebo t-test). Prahová hodnota signifikance byla ve většině případů stanovena na  $p = 0.05$ .

### 3.7 Vizualizace výsledných dat

Jednotlivé vizualizace získaných dat byly vytvořeny pomocí softwarů IBM SPSS Statistics (version 25.0, IBM Corp., 2017), Corel Draw (verze 2017) a R za pomoci vizualizační knihovny ggplot2 (Wickham, 2016). Heatmapy byly zpracovány s ochotnou pomocí Mgr. Lukáše Hejtmánka, Ph.D. pomocí dvourozměrné funkce odhadu hustoty jádra, kde2d, z knihovny MASS (Venables & Ripley, 2002).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 ČÁST 1: Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER

Studium tak komplexní schopnosti, jakou je epizodická paměť, využívá důležité poznatky získané z klinického výzkumu doplněné o detailnější informace získané od animálních modelů. I přes to, že již u zvířat existují různé možnosti testování mechanismů paměti podobné epizodické, je třeba nových nástrojů, které by mohly odhalit prozatím skryté aspekty tohoto druhu paměti. Proto jsme vyvinuli novou behaviorální úlohu OTTER zaměřenou na asociační učení potkanů kmene Wistar. Úloha je založena na jednorázovém učení, které nám umožňuje experimentálně testovat pro zvíře přirozenější situaci bez opakovaného tréninku.

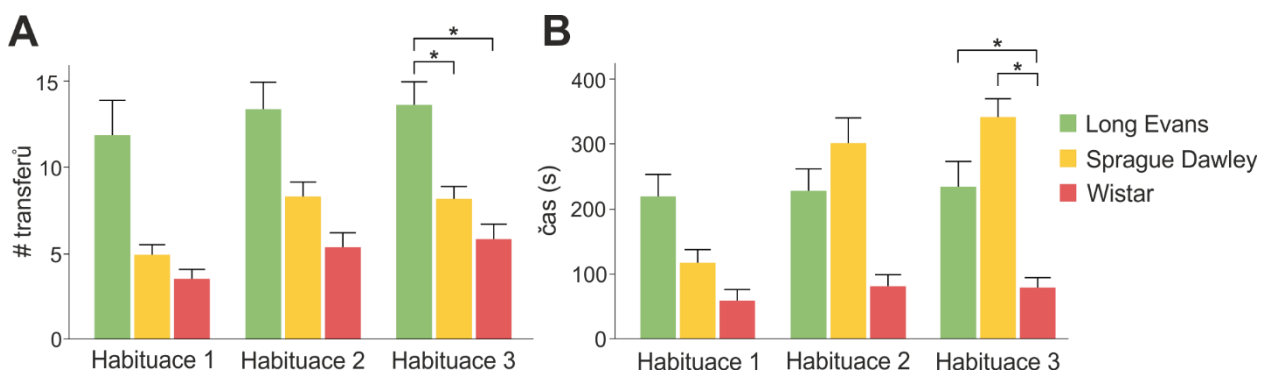
#### 4.1.1 Výběr vhodného kmene laboratorních potkanů

Počet transferů mezi kompartmenty je důležitým parametrem sledovaným posledního 3. dne habituace, aby bylo možné zhodnotit míru habituace před vystavením zvířat párovacímu sezení. Vzhledem k tomu, že data Wistar a Sprague Dawley zvířat nebyla oproti datům zvířat Long Evans normálně rozložena, použitý Kruskalův-Wallisův test odhalil statisticky významný rozdíl [ $\chi^2(2) = 13.119, p = 0.01$ ] mezi danými skupinami zvířat v počtu transferů mezi kompartmenty. Následná post hoc analýza objevila, že během třetího habitučního sezení zvířata Long Evans přecházela mezi kompartmenty signifikantně více než Sprague Dawley [ $U = 52.000, p = 0.005$  (2-tailed)] a Wistar [ $U = 11.500, p = 0.001$  (2-tailed)]. Mezi skupinami Sprague Dawley a Wistar nebyl rozdíl [ $U = 201.500, p = 0.060$  (2-tailed)]. Průměrné hodnoty transferů jednotlivých kmenů zvířat jsou zobrazeny v grafu č. 1A.

Pro doplnění byl analyzován také čas strávený ve světlém kompartmentu během třetího dne habituace. Stejně jako u počtu transferů, hodnoty času stráveného ve světlém kompartmentu byly u zvířat Long Evans normálně rozložené oproti hodnotám zvířat Wistar a Sprague Dawley. Z toho důvodu byl použit neparametrický Kruskalův-Wallisův test, který odhalil signifikantní rozdíl mezi časy zvířat jednotlivých kmenů stráveným ve světlém kompartmentu [ $\chi^2(2) = 30.367, p < 0.001$ ]. Post hoc analýza upřesnila, že potkani Wistar trávili ve světlém kompartmentu signifikantně méně času než Sprague Dawley [ $U = 24.000, p = 0.001$  (2-tailed)] i Long Evans potkani [ $U = 15.000, p = 0.002$  (2-tailed)]. Mezi zvířaty kmene Sprague Dawley



a Long Evans nebyl nalezen rozdíl [ $U = 90.000$ ,  $p = 0.119$  (2-tailed)]. Průměrné hodnoty časů strávených zvířaty ve tmavém kompartmentu jsou zobrazeny v grafu 1B.

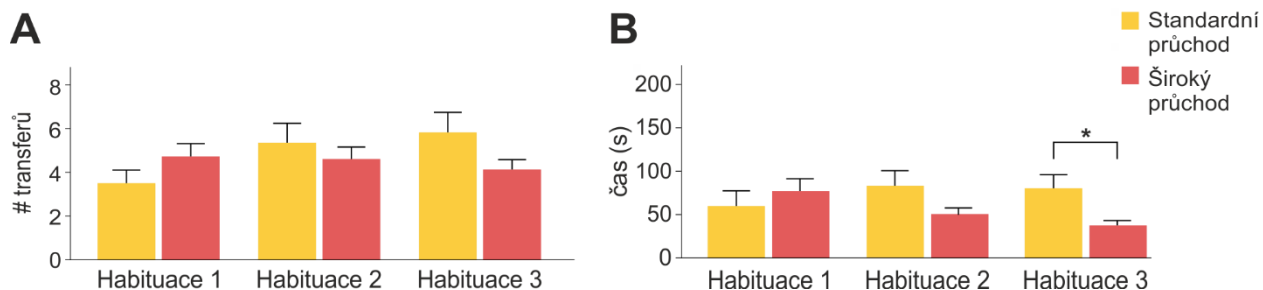


**Graf 1 Porovnání chování zvířat jednotlivých kmenů potkana během tří habitučních sezení.** (A) Počet transferů zvířat mezi kompartmenty experimentální aparatury byl u zvířat kmene Long Evans signifikantně vyšší než zvířat Sprague Dawley a Wistar. (B) Doba zvířaty strávená ve světlém kompartmentu oproti tmavému byla u zvířat kmene Wistar významně nižší. Z těchto důvodů byla pro finální experiment vybrána zvířata Wistar. Hladina statistické signifikance byla stanovena na  $p < 0.05$ . Signifikantní rozdíly byly označeny pomocí \*. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SEM.

#### 4.1.2 Vliv velikosti a tvaru průchodu v rozdělovací přepážce

Získaná data o počtu transferů mezi kompartmenty nebyla normálně rozložena a z toho důvodu byl použit neparametrický Mannův-Whitneyův test, který neprokázal statistický rozdíl mezi počtem transferů zvířat při použití standardního průchodu (CD) a širokého průchodu (WD) [ $U = 218.500$ ,  $p = 0.156$  (2-tailed)]. Průměrné hodnoty počtu transferů jsou uvedeny v grafu č. 2A.

Hodnoty času strávených ve světlém kompartmentu během třetího dne habituace byly analyzovány pomocí jednocestného ANOVA testu. Výsledky ukázaly, že zvířata testovaná za použití WD trávila ve světlém kompartmentu signifikantně méně času, než zvířata testovaná s CD [ $F(1, 49) = 0.9797$ ,  $p = 0.003$ ]. Průměrný čas strávený ve světlém kompartmentu pro obě testované skupiny jsou znázorněny v grafu 2B.



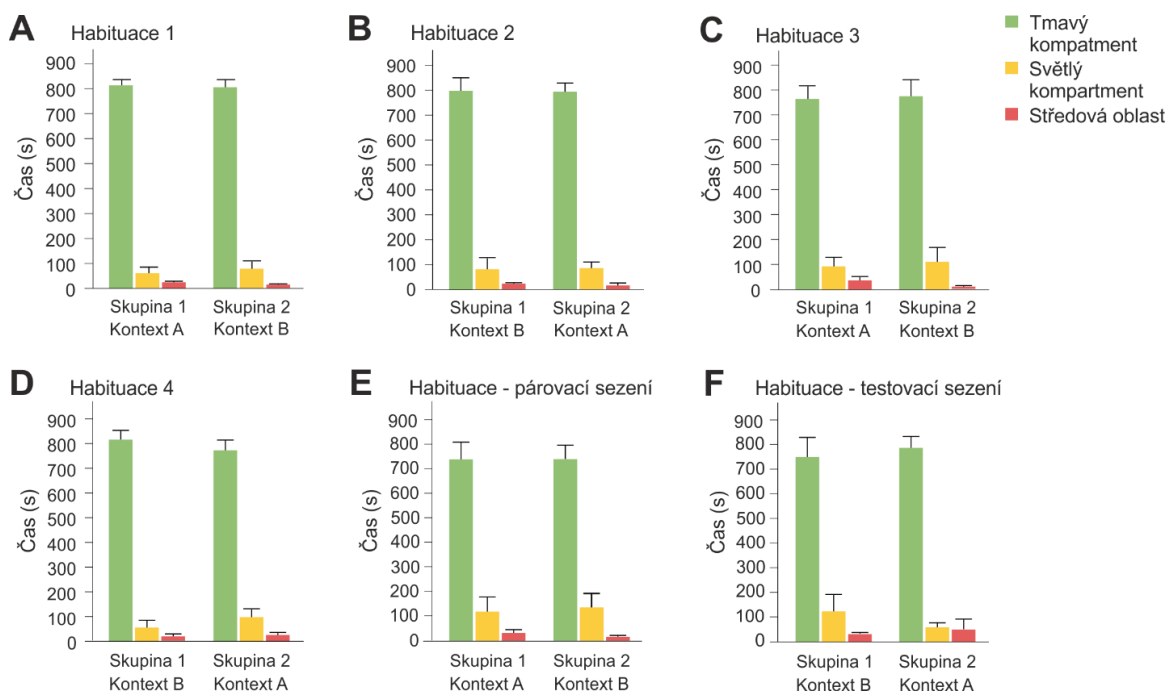
**Graf 2 Porovnání chování zvířat za použití různých průchodů v rozdělovací přepážce.** (A) Počet transferů zvířat mezi kompartmenty experimentální aparatury nebyl v aparaturách s různými průchody rozdílný. (B) Doba zvířaty strávená ve světlém kompartmentu oproti tmavému byla během třetího habituačního sezení signifikantně nižší za použití širokého průchodu v přepážce. Pro finální experiment byl vybrán široký průchod v rozdělovací přepážce.

Hladina statistické signifikance byla stanovena na  $p < 0.05$  a významný rozdíl byl označen \*. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SEM.

#### 4.1.3 Testování finálního protokolu úlohy OTTER

Na základě předchozích výsledků byl původní design úlohy OTTER v několika parametrech obměněn a byl tak vytvořen finální protokol úlohy. Experimentální aparatura byla vybavena přepážkou s nízkým a širokým průchodem umožňujícím vizuální kontrolu celého prostředí. Testování tohoto finálního protokolu úlohy bylo provedeno s potkany kmene Wistar, neboť zvířata toho kmene byla v předchozích experimentech hodnocena jako nejvhodnější. Zvířata byla střídavě vystavována dvěma různými kontextům prostředí (A a B) během všech 6 experimentálních sezení.

Během 15minutových habituačních sezení preferovala zvířata tmavý kompartment jak v kontextu A, tak v kontextu B. Bylo zjištěno, že potkani, kteří podstoupili první habituační sezení v kontextu B, přecházeli do světlého kompartmentu signifikantně méně než zvířata, která první sezení podstoupila v kontextu A (Mannův-Whitneyův test: Hab1:  $U = 55,00$ ,  $p = 0,008$ ). Žádná další sezení se již kontexty nelišila ani v počtu transferů mezi kompartmenty (Mannův-Whitneyův test: Hab2:  $U = 112,50$ ,  $p = 0,775$ ; Hab3:  $U = 72,00$ ,  $p = 0,057$ , Hab4:  $U = 116,50$ ,  $p = 0,899$ ) ani v čase stráveném ve tmavém kompartmentu (Mannův-Whitneyův test: Hab1:  $U = 94,00$ ,  $p = 0,315$ ; Hab2:  $U = 96,50$ ,  $p = 0,361$ ; Hab3:  $U = 97,00$ ,  $p = 0,373$ ; Hab4:  $U = 88,00$ ,  $p = 0,213$ ). Grafické znázornění jednoznačné preference zvířat tmavého kompartmentu aparatury bez rozdílu mezi oběma kontexty prostředí zobrazuje graf 3.



**Graf 3** Preference zvířat trávit čas primárně v tmavém kompartmentu aparatury během všech sezení experimentu (A - F). Během všech sezení a v obou kontextech trávila zvířata čas především ve tmavém kompartmentu aparatury. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SEM.

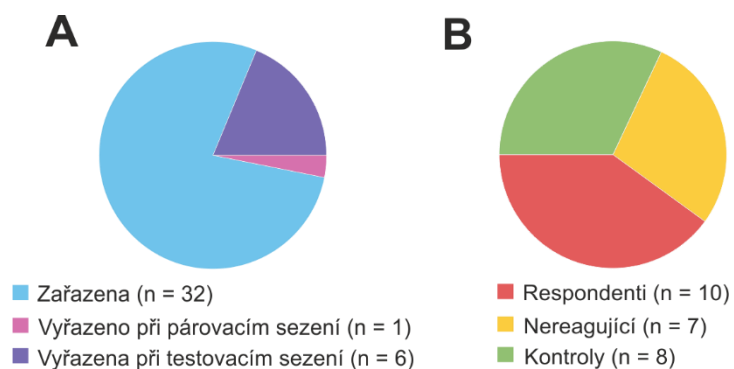
Vzhledem k tomu, že každé zvíře bylo dvakrát habituováno na oba dva kontexty, bylo dále zhodnoceno, zda jejich pořadí neznamenal rozdíl v hodnocených parametrech. U první skupiny zvířat začínající experiment v kontextu A nebyl nalezen rozdíl v počtu transferů mezi kompartmenty ani v kontextu A (Wilcoxonův test:  $Z = -0,473, p = 0,658$ ) ani v kontextu B ( $Z = -0,199, p = 0,873$ ). Žádný rozdíl nebyl u této skupiny nalezen ani v čase stráveném ve tmavém kompartmentu v kontextu A (Wilcoxonův test:  $Z = -0,879, p = 0,379$ ), ani v kontextu B ( $Z = -0,314, p = 0,753$ ). Ani v případě druhé skupiny zvířat začínající experiment v kontextu B nebyl nalezen rozdíl v počtu přechodů mezi kompartmenty (Wilcoxonův test: kontext A:  $Z = -0,063, p = 0,964$ ; kontext B:  $Z = -1,129, p = 0,283$ ), ani v čase stráveném ve tmavém kompartmentu (Wilcoxonův test: kontext A:  $Z = -0,549, p = 0,583$ ; kontext B:  $Z = -0,879, p = 0,379$ ).

Ze všech zvířat bylo na začátku párovacího sezení náhodně vybráno 24 potkanů, kteří byli vystaveni dvojici signálů CS-2s-US (testovaná skupina), a zbylých 8 potkanů bylo zařazeno do kontrolní skupiny, která byla vystavena pouze CS. Jeden potkan testovací skupiny byl z experimentu vyloučen kvůli setrvávání ve světlém kompartmentu již během párovacího sezení a nemohla mu tak být puštěna CS-2s-US sekvence. Zastoupení zvířat v jednotlivých skupinách experimentu je zobrazen v grafu č. 4. Během párovacího sezení všechna zvířata z testované

skupiny ( $n = 23$ ) po vystavení dvojici signálů přeběhla do světlého kompartmentu, průměrný čas útěku byl  $10,0 \pm 0,9$  sekund (SEM) od začátku CS. Zvířata, která během následujícího testovacího sezení měla vytvořenou asociaci mezi stimuly a vykonala správnou útekovou reakci na CS („respondenti“), byla v útěku během párovacího sezení mírně rychlejší než později nereagující zvířata (9,3 s oproti 11,0 s) ale bez statistické signifikance (Mannův-Whitneyův test:  $U = 29\ 000$ ,  $p = 0,601$ ). Žádné zvíře z kontrolní skupiny ( $n = 8$ ) po vystavení CS nepřeběhlo do světlého kompartmentu.

Během prvních 15 min testovacího sezení přecházela zvířata mezi kompartmenty výrazně méně než během prvních 15 min párovacího sezení (Wilcoxonův test:  $Z = -2,762$ ,  $p = 0,004$ ) (párovací sezení,  $Mdn = 5,5$ , testovací sezení  $Mdn = 3$ ). Ačkoli se zdálo, že potkani tráví více času v tmavém kompartmentu během testovacího sezení ( $Mdn = 843,8$  s) než během párovacího ( $Mdn = 814,4$  s), rozdíl nebyl statisticky významný (Wilcoxonův test:  $Z = -0,843$ ,  $p = 0,410$ ). Mezi budoucími respondenty a zvířaty, která nereagovala, nebyl statisticky významný rozdíl ani v počtu přechodů mezi kompartmenty (Kruskalův-Wallisův test:  $H(2) = 1,384$ ,  $p = 0,501$ ), ani v době strávené ve tmavém kompartmentu (Kruskalův-Wallisův test:  $H(2) = 1,674$ ,  $p = 0,433$ ) během prvních 15 min testovacího sezení.

Při testovacím sezení byla dvojice signálů představena celkem 17 potkanům testovací skupiny a 8 zvířatům z kontrolní skupiny. Šest potkanů testovací skupiny bylo z experimentu vyloučeno kvůli zapamatování nechtěné asociace CS s prostředím tmavého kompartmentu a nemohlo tak podstoupit testovací sezení. Zastoupení zvířat v jednotlivých skupinách experimentu je zobrazen v grafu 4. Po spuštění CS 59 % testovaných zvířat ( $n = 10$ ) přeběhlo do světlého kompartmentu do 10 s od spuštění CS. Průměrný čas reakce byl  $5,1 \pm 0,9$  sekund (SEM) od začátku CS. Žádné z kontrolních zvířat ( $n = 8$ ) po vystavení CS nepřeběhlo. Rozdíl mezi respondenty v testovací a kontrolní skupině byl statisticky významný (Fisherův exaktní test:  $p = 0,008$  (2-tailed)).



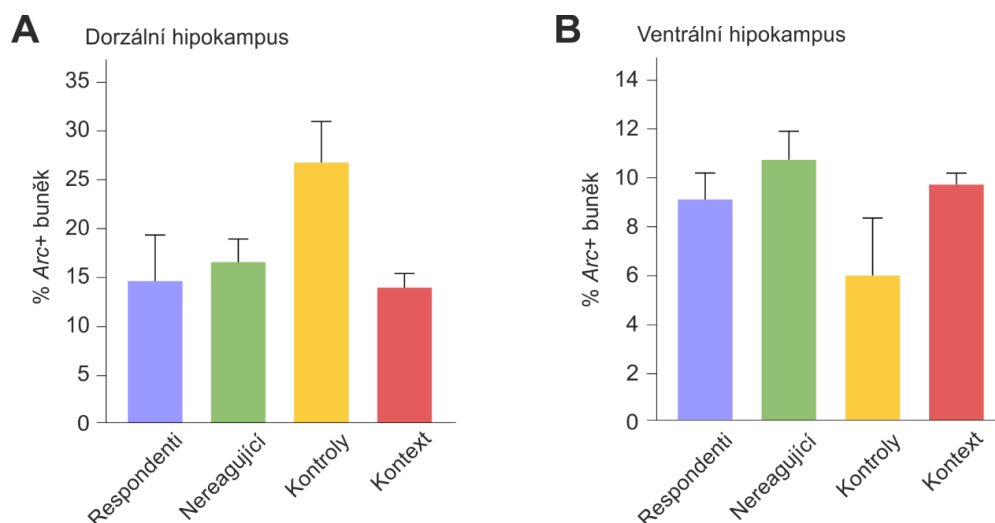
**Graf 4 Zastoupení jednotlivých skupin zvířat v experimentu testování finálního protokolu úlohy OTTER. (A)**

Rozložení celkového počtu zvířat zařazených do experimentu ( $n = 32$ ) a zvířat vyřazených během párovacího sezení ( $n = 1$ ) nebo během testovacího sezení ( $n = 6$ ). (B) Poměrové rozložení zvířat ve výsledných skupinách dle výkonu zvířat během testovací fáze OTTER. Skupina zvířat označená jako „respondenti“ si vytvořila správnou asociaci CS-2s-US a po vystavení samotnému CS unikla do bezpečného světlého kompartmentu ( $n = 10$ ), zvířata označená jako „nereagující“ si asociaci zřejmě nevytvořila a na CS nereagovala ( $n = 7$ ), zatímco kontrolní zvířata byla v párovacím i testovacím sezení vystavena pouze CS ( $n = 8$ ).

## 4.2 ČÁST 2: Aktivita hipokampu během OTTER

Dále byla hodnocena aktivita CA1 dorzálního a ventrálního hipokampu zvířat testovaných v úloze OTTER pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Detekováním exprese časného genu *Arc*, konkrétně jeho mRNA, byla aktivita buněk CA1 hodnocena u respondentů, nereagujících, kontrolních zvířat a také u zvířat, která na základě kontextuální asociace setrvala během testovacího sezení pouze ve světlém kompartmentu. Vizualizace *Arc* mRNA je hojně využívanou metodou pro zhodnocení buněčné aktivity související s neuronální plasticitou (Gallo et al., 2018; Nikolaienko et al., 2018). Pomocí poskytnutého macra softwaru ImageJ (verze 1.38, Schneider et al., 2012) bylo určeno procentuální zastoupení buněk pozitivních na *Arc* signál z celkového počtu nepoškozených buněčných jader nasnímaných v pyramidální vrstvě CA1 v obou částech hipokampu. Mezi skupinami zvířat nebyl analýzou zjištěn signifikantní rozdíl v počtu aktivních buněk v dorzálním ani ventrálním hipokampu.

Pro statistické porovnání procentuálního zastoupení na *Arc* pozitivních buněk u jednotlivých skupin zvířat byl použit jednosměrný ANOVA test. Bohužel během přípravy byly některé vzorky poškozeny, čímž se rapidně zmenšila velikost vzorku vhodného pro statistickou analýzu (Respondenti:  $n = 3$ , Nereagující:  $n = 3$ ; Kontroly:  $n = 2$ ; Kontext:  $n = 2$ ). Nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní rozdíly v dorzálním hipokampu [ $F(3,10) = 1,819, p = 0,244$ ] ani ve ventrálním hipokampu [ $F(3,10) = 1,869, p = 0,236$ ] mezi hodnocenými skupinami (viz Graf č. 5). Nicméně, jak je z grafu patrné, existuje jasný trend snížené exprese genu *Arc* v dorzálním hipokampu oproti jasnému trendu zvýšené exprese genu *Arc* ve ventrálním hipokampu ve všech skupinách vystavených dvojici signálů (CS-2s-US) ve srovnání s kontrolními zvířaty.



**Graf 5** Procentuální zastoupení Arc+ buněk v CA1 dorzálního (A) a ventrálního (B) hipokampu. U žádné ze skupin zvířat nebyl nalezen signifikantní rozdíl oproti kontrolním zvířatům nebo jiné skupině. V grafech jsou zobrazeny průměrné hodnoty + SEM.

### 4.3 ČÁST 3: Role adultní neurogenese u potkana v úloze závislé na hipokampu

Detailnější studium hipokampální adultní neurogenese byla vybrána úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA), u které již byla již dříve prokázána závislost na hipokampu. Cílem následujících experimentů bylo zjistit, jakou roli v řešení AAPA hrají právě dozrávající nové neurony v DG. Naše výsledky ukazují, že po zablokování adultní neurogenese u potkanů dochází k lepšímu přečování již dříve osvojeného chování. Samotné učení aktivního vyhýbání však nebylo ovlivněno.

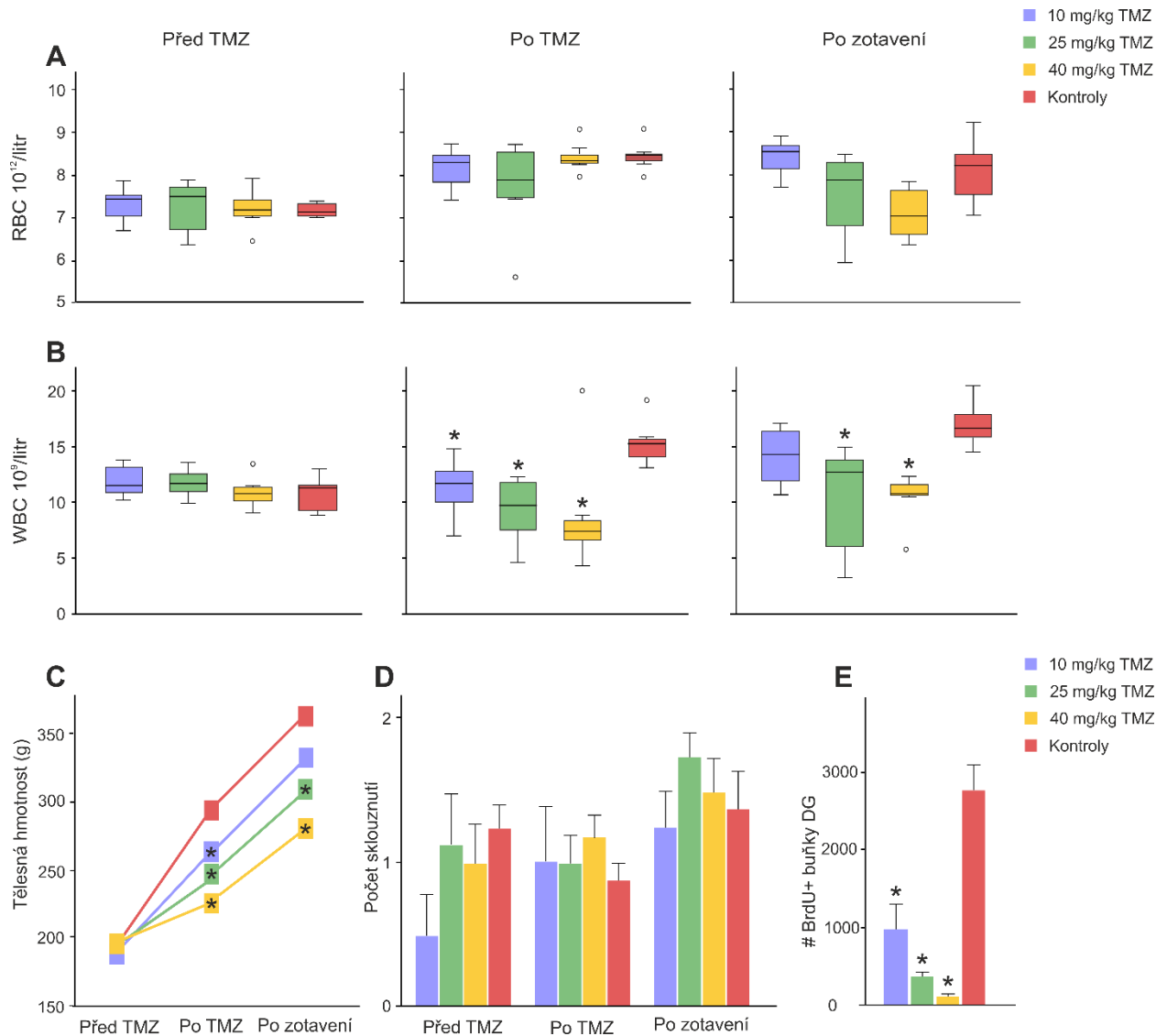
#### 4.3.1 Kontrolní testy

Vzhledem k povaze působení TMZ a k možným vedlejším účinkům, které jeho podávání může způsobit (Koukourakis et al., 2009), bylo nejprve třeba stanovit vhodné dávkování této látky. Cílem bylo nalézt takovou nejnižší dávku TMZ, která bude pro zvířata co nejméně škodlivá ale zároveň bude dostatečně účinná v inhibici adultní neurogenese v DG. V prvotních experimentech tak bylo třem skupinám zvířat podáváno TMZ v dávce 10, 25 a 40 mg/kg tělesné hmotnosti.

Účinky TMZ na zdravotní stav zvířat byly na různorodé. Nejzákladnějším hodnoceným ukazatelem byla tělesná hmotnost zvířat. Zatímco zvířata léčená nejnižší dávkou měla hmotnost srovnatelnou s kontrolními zvířaty, mírné snížení váhy se ukázalo u obou vyšších dávek TMZ. Krevní rozbory všech léčených skupin zvířat ukázaly významné snížení počtu leukocytů oproti kontrolní skupině, které se ani po rekonvalescenci nedostaly na porovnatelné hodnoty s kontrolami (Graf č. 6). Motorické schopnosti zvířat hodnocené na základě chůze po dřevěné laťce nebyly ovlivněny. Vzhledem k velmi nízkému počtu chyb (sklouznutí) nebyla data statisticky analyzována (Graf č. 6D). Při vizuálním hodnocení byla zvířata léčená nejvyšší dávkou TMZ ve špatném fyzickém stavu během samotné léčby, stejně jako po uplynutí doby rekonvalescence. Velmi slabá zvířata měla navíc lysá místa na zátylku a za krkem. I když určitou ztrátu ochlupení vykazovala během léčby také skupina léčená 25 mg/kg TMZ, po rekonvalescenci byl fyzický stav zvířat shodný s kontrolními zvířaty.

Mezi léčenými skupinami byl odhalen rozdíl v počtu BrdU+ buněk [ANOVA:  $F(3,24) = 22,969, p < 0,001$ ]. Následné post hoc testy ukázaly statisticky více značených BrdU+ buněk u kontrolní skupiny zvířat oproti všem léčeným skupinám [Bonfferoniho test: vše  $p < 0,001$ ]. Konkrétně 10 mg/kg TMZ snížilo neurogenezi dospělých o 64 %, 25 mg/kg TMZ o 89 % a 40 mg/TMZ o 97 % (Graf 6E; Obr. 8).

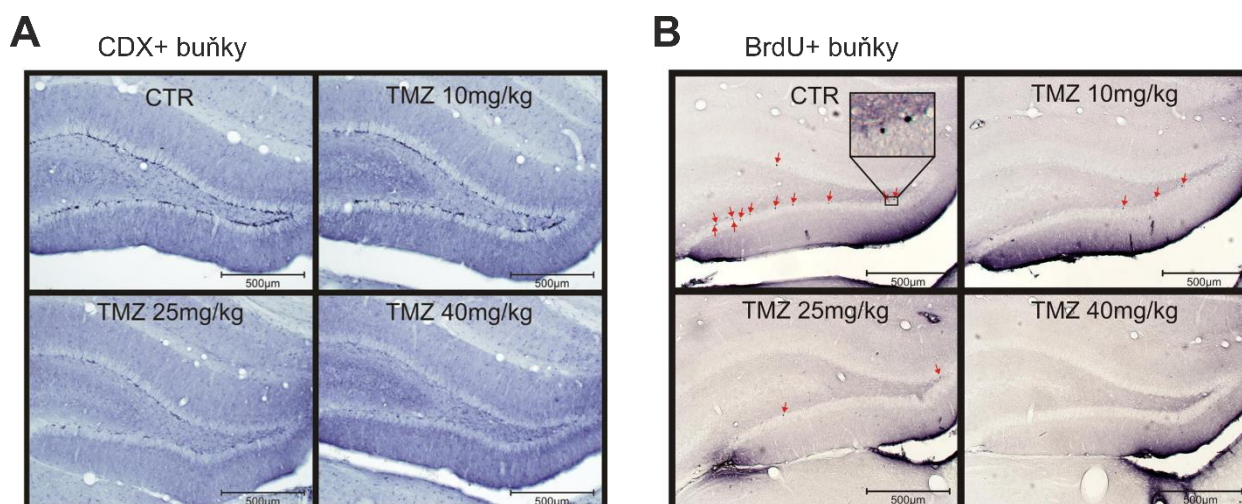




**Graf 6 Výsledky testovacích experimentů s různými dávkami TMZ.** (A) Počet červených krvinek a (B) počet bílých krvinek různě léčených zvířat ve třech kritických časových oknech experimentu (před podáním TMZ, po podání TMZ a po zotavení zvířat. O označuje odlehle hodnoty. (C) Zobrazení změn tělesné hmotnosti zvířat během experimentu. (D) Průměrný počet sklouznutí zvířat z dřevěné laťky v jednotlivých skupinách a částech experimentu. \* označuje u všech předešlých grafů statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině dosahující hladiny signifikance  $p < 0.05$ . (E) Celkový počet BrdU+ buněk v celém DG u zvířat léčených TMZ v dávkách 10 mg/kg, 25 mg/kg a 40 mg/kg nebo u kontrolních zvířat. U všech skupin léčených zvířat byl nalezen signifikantní rozdíl oproti kontrolním zvířatům označený \*, pro všechna srovnání platí  $p < 0.001$ . Všechna data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SEM.

I když měla nejnižší použitá dávka TMZ (10 mg/kg) také nejnižší dopad na zdravotní stav zvířat, neurogenese byla u této dávky snížena pouze o 64 %. Oproti tomu po vyšší dávce

TMZ (25 mg/kg) došlo ke snížení neurogeneze až o 89 % s obdobným efektem na stav zvířat. Z tohoto důvodu byla pro hlavní behaviorální experiment zvolena dávka 25 mg/kg TMZ.



**Obr. 8 Mikroskopické zobrazení DCX+ a BrdU+ buněk u jednotlivých testovacích skupin.** (A) Zobrazení DCX+ buněk obarvených v DG hipokampu pro jednotlivé testovací skupiny zvířat. (B) Příklady barvených BrdU+ buněk v DG hipokampu pro jednotlivé testovací skupiny zvířat. Jednotlivé BrdU+ buňky jsou označeny červenými šipkami.

### 4.3.2 Behaviorální výsledky v úloze AAPA

#### 4.3.2.1 25 mg/kg TMZ

Hlavním parametrem v úloze AAPA byl počet chybných vstupů do zakázaného sektoru během akvizičních (ACQ1-ACQ4) i přečovací (REV1-REV4) sezení, který byl analyzován pomocí dvoucestného testu ANOVA s opakovaným měřením. Celkově bylo takto analyzován výkon 21 zvířat léčených TMZ v dávce 25 mg/kg a 18 kontrolních zvířat v akvizičních sezeních a 20 kontrolních a 21 léčených zvířat během přečování. U dvou kontrolních zvířat proběhla analýza pouze přečovací sezení, neboť získaná data z akvizice byla kvůli chybě softwaru nepoužitelná.

Během průběhu akvizice bylo zaznamenáno celkové zlepšování výkonu zvířat a snižování počtu chyb pomocí ANOVA testu s opakovaným měřením [ $F(4,148) = 33,887, p < 0,001$ ], ale přímo mezi testovanými skupinami zvířat nebyl nalezen rozdíl [ $F(1,37) = 0,028, p = 0,869$ ]. Během následného přečování docházelo k postupnému zlepšování výkonu zvířat

[F(4,156) = 13,333,  $p < 0,001$ ]. Oproti kontrolním zvířatům, tak léčená TMZ dosáhla signifikantně nižšího počtu chyb [F(1,39) = 9,583,  $p < 0,001$ ]. Následná post hoc analýza pomocí Gamesova-Howellova testu prokázala významně lepší výkon léčených zvířat během REV1 ( $p = 0,0395$ ), REV3 ( $p < 0,001$ ) a REV4 ( $p = 0,0115$ ).

Mezi testovanými skupinami zvířat nebyl pomocí ANOVA testu nalezen rozdíl v lokomoční aktivitě během akvizice [F(1,37) = 1,573,  $p = 0,218$ ] ani během přeučování [F(1,39) = 0,272,  $p = 0,605$ ]. Pro doplnění bylo počítáno, zda zvířata z obou testovaných skupin reagovala na elektrický šok podobně pomocí výpočtu indexu učení dovedností (Lobellova et al., 2013), tedy výpočtu poměru mezi šoky a vstupy do sektoru (šoky + 1/ vstupy + 1). Perfektní výkon zvířete bez jediného vstupu a šoku v zakázaném sektoru by znamenal výsledek 1. Zvířata, která nemají takovou potřebu opustit sektor po obdržení prvního šoku (ať už například z důvodu větší pasivity zvířete nebo například nižší citlivosti k bolesti), jsou hodnocena vyšším poměrem než 1. Ve výsledku ale mezi experimentálními skupinami nebyl v tomto indexu učení dovedností nalezen rozdíl ani v akvizici [F(1,37) = 0,293,  $p = 0,591$ ], ani během přeučování [F(1,39) = 1,218,  $p = 0,276$ ].

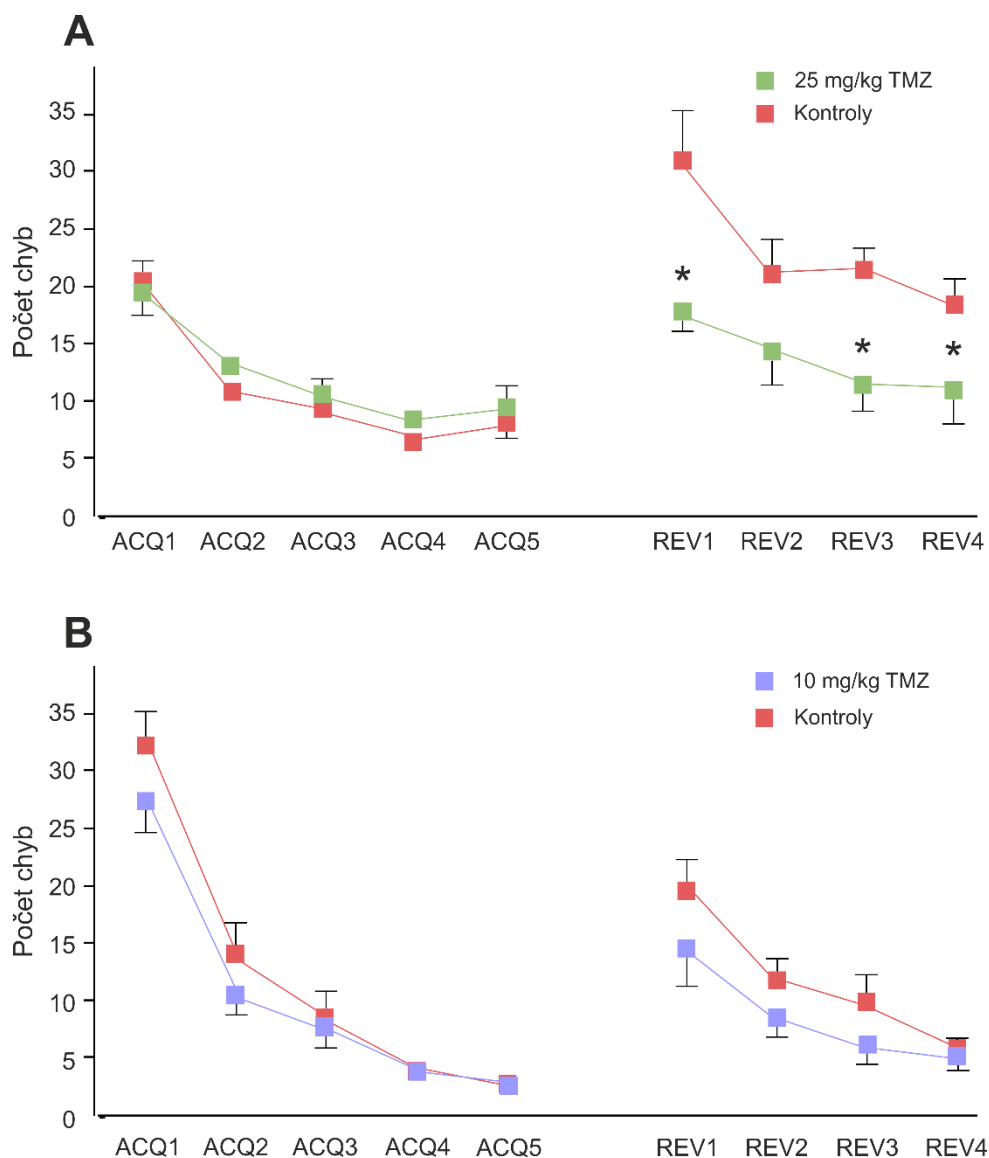
#### 4.3.2.2 10 mg/kg TMZ

Aby bylo možné stanovit, zda pozorované chování zvířat bylo způsobeno použitou dávkou TMZ, byl i přes podstatně nižší vliv na redukci adultní neurogeneze dodatečně proveden obdobný experiment s použitím nejnižší zvažované dávky TMZ (10 mg/kg). Za použití dvoucestného ANOVA testu byly analyzovány počty vstupů do zakázaného sektoru pro každý den experimentu zvlášť pro 18 léčených zvířat a 17 kontrolních zvířat.

Během všech sezení první učící fáze experimentu (ACQ1-ACQ4) došlo k významnému celkovému zlepšení výkonu zvířat [ANOVA: F(4,132) = 122,968,  $p < 0,001$ ], nicméně nebyl nalezen rozdíl mezi skupinami zvířat v počtu vstupů [F(1,33) = 0,134,  $p = 0,717$ ], ani nebyly nalezeny možné interakce mezi sezeními a skupinami zvířat [F(4,132) = 0,233,  $p = 0,919$ ]. Obdobné výsledky byly nalezeny při analýze dat z jednotlivých sezení přeučovací fáze experimentu (REV1-REV4). I přes celkové zlepšení výkonu zvířat během všech přeučovacích sezení relací [F(3,99) = 31,482,  $p < 0,001$ ] nebyl nalezen signifikantní rozdíl v počtu vstupů mezi skupinami [F(1,33) = 1,881,  $p = 0,179$ ], ani průkazné interakce [F(3,99) = 0,865,  $p = 0,462$ ]. Nebyl nalezen ani rozdíl mezi skupinami zvířat v celkové době strávené v původním,

dříve trestaném sektoru [T-test,  $t(33) = 0,696$ ,  $p = 0,491$ ], čímž bylo vyloučeno možné perseverační chování jedné ze skupin.

Pro doplnění byla také analyzována celková lokomoční aktivita zvířat. Nebyl nalezen rozdíl v ušlé vzdálenosti během sezení mezi skupinami zvířat ve fázi učení [ANOVA:  $F(1,33) = 0,892$ ,  $p = 0,352$ ], ani v přeučování [ANOVA:  $F(1,33) = 0,003$ ,  $p = 0,957$ ]. Navíc ani index učení dovedností se mezi skupinami nelišil při akvizici [ANOVA:  $F(1,33) = 0,365$ ,  $p = 0,550$ ] a ani při přeučování [ANOVA:  $F(1,33) = 2,381$ ,  $p = 0,132$ ].



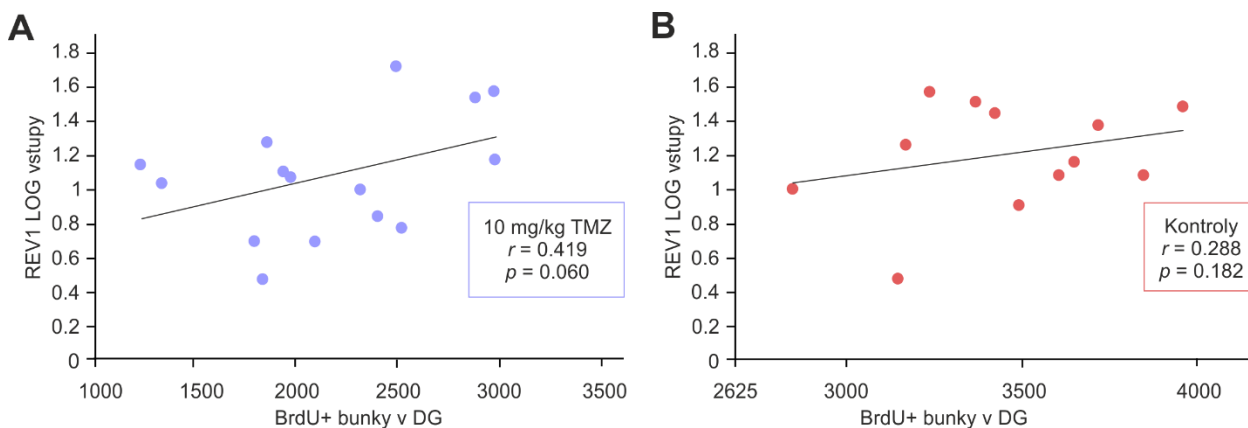
**Graf 7 Chování zvířat během úlohy aktivního vyhýbání se místu (AAPA).** (A) Počet chyb neboli vstupů do zakázaného sektoru během akvizice (ACQ1-5) a přeučování (REV1-4) zvířat léčených TMZ v dávce 25 mg/kg a kontrol. (B) Počet chyb během akvizice (ACQ1-5) a přeučování (REV1-4) zvířat léčených TMZ v dávce 10

mg/kg a kontrol bez signifikantního rozdílu mezi skupinami. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + SEM.

Hladiny statistické signifikance byla stanovena na  $p < 0,05$  a \* označuje statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině.

### 4.3.3 Korelace chování a neurogeneze v dospělosti

Pozorovaný trend lepšího výkonu zvířat po TMZ léčbě vede k zamyšlení, zda by toto zlepšení mohlo být přímo závislé na dosažené redukci neurogeneze v dospělosti. Z toho důvodu byl počet BrdU+ buněk každého zvířete korelován s počtem chyb (vstupů do zakázaného sektoru) během prvního dne přečovací fáze (REV1) AAPA experimentu pomocí Pearsonovy korelace (po logaritmické transformaci pro dosažení normality dat). Pro tuto analýzu byla použita data ze dne REV1 právě z důvodu vyšší náročnosti při přečování nového umístění sektoru. Pouze od 27 zvířat (15 zvířat léčených TMZ 10 mg/kg, 12 kontrolních zvířat) z původních 40 byla získána kompletní použitelná data pro analýzu. I přes to, že byl objeven pozitivní trend mezi počtem BrdU+ buněk a počtem chyb v AAPA, výsledek nebyl statisticky signifikantní (TMZ:  $r = 0,419$ ,  $p = 0,060$ ; CTR:  $r = 0,288$ ,  $p = 0,182$ ).



**Graf 8** Bodový graf korelace počtu BrdU+ buněk s logaritmicky upravenými hodnotami počtu vstupů do zakázaného sektoru u zvířat léčených TMZ v dávce 10 mg/kg (A) a u kontrolních zvířat bez léčby (B). Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu a hladiny signifikance  $p$  jsou přiloženy pro každou skupinu.

#### 4.4 ČÁST 4: Vliv hypertenze na adultní neurogenezi

Poslední část práce byla zaměřena na hodnocení krevního tlaku a míry adultní neurogeneze u dvou rozdílných animálních modelů hypertenze. I přes objevené rozdíly v hodnotách krevního tlaku u jednotlivých experimentálních skupin, ani u jednoho z použitých modelů hypertenze nebyl prokázán rozdíl v počtu dozrávajících buněk značených mitotickým markerem BrdU.

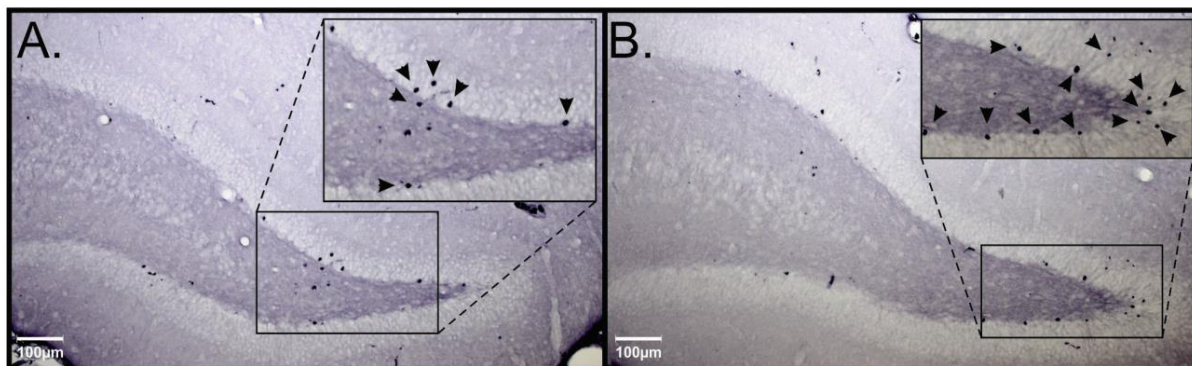
Vzhledem k nastalým metodologickým komplikacím, v prvních experimentech byl MAP analyzován jen u 13 kaptoprilem léčených a 12 kontrolních SHR potkanů. Pomocí t-testu nezávislých vzorků byl nalezen významně nižší MAP u léčených zvířat [ $t(23) = 10,200, p < 0,001$ ]. Z následné analýzy počtu BrdU+ buněk u zvířat kmene SHR bylo odstraněno 5 zvířat, neboť u nich počty buněk přesahovaly třinásobek standardní odchylky od průměru. To mohlo být zapříčiněno nesprávnou intraperitoneální aplikací BrdU, která vedla k nesprávnému značení dělicích se buněk v DG. Pro analýzu tak byla použita data od 17 z celkových 21 zvířat léčených kaptoprilem a 19 z celkových 20 kontrolních zvířat, mezi nimiž nezávislý výběrový t-test neprokázal žádné rozdíly v počtu BrdU+ buněk [ $t(34) = - 1,298, p = 0,203$ ] (Obr. č. 9).

V druhém experimentu bylo použito 13 zvířat Dahl SS a 15 zvířat Dahl SR, u kterých byl měřen MAP. Snížení počtu měřených zvířat bylo opětovně způsobeno metodologickými problémy během experimentu. Získaná data byla analyzována pomocí dvoucestného ANOVA testu, ve kterém byly stanoveny dieta a kmen potkanů jako nezávislé proměnné. Podle očekávání, u potkanů Dahl SR byl nalezen signifikantně nižší MAP než u zvířat Dahl SS [ $F(1,24) = 21,774, p < 0,001$ ]. Ale nebyl nalezen žádný rozdíl v celkovém MAP po podávání vysoko slané diety [ $F(1,24) = 2,735, p = 0,111$ ]. Nicméně interakce mezi kmenem zvířat a dietou byla téměř signifikantní [ $F(1,24) = 3,276, p = 0,083$ ]. Což by mohlo naznačovat mezikmenové rozdíly v citlivosti na sůl ve stravě, jak bylo dříve uvedeno v literatuře (Rapp a Dene 1985).

Dále byl analyzován rozdíl MAP podle podávané diety u kmenů SS a SR. U kmene Dahl SS bylo nezávislým t-testem ukázáno signifikantní zvýšení MAP zvířat po stravě s vysokým obsahem soli ve srovnání s nízkosolnou dietou [ $t(11) = 2,435, p = 0,033$ ]. U kmene Dahl SR nebyl nalezen rozdíl v MAP u zvířat na rozdílných dietách [ $t(13) = - 0,114, p = 0,911$ ].

Analýza počtu BrdU+ buněk byla provedena u 13 zvířat Dahl SS a 15 zvířat Dahl SR. Pomocí dvoucestného testu ANOVA nebyl nalezen významný rozdíl v počtu BrdU+ buněk mezi kmeny Dahl SS a Dahl SR [ $F(1,23) = 0,048, p = 0,829$ ]. Efekt příjmu soli na počet BrdU+ buněk

nebyl nijak významný [ $F(1,23) = 0,007, p = 0,934$ ], ani nebyl nalezeny interakce mezi kmeny zvířat a typem diety [ $F(1,23) = 0,408, p = 0,529$ ].



**Obr. 9** Mikroskopické zobrazení *BrdU+* buněk v DG SHR zvířat. (A) Příklad DG zvířete kmene SHR léčeného kaptoprilem. (B) Příklad DG kontrolního SHR zvířete. Konkrétní obarvené *BrdU+* buňky jsou označeny černými šipkami.

## 5 DISKUZE

Epizodická paměť ukrývá komplexní vzpomínky každého jednotlivce na osobní události, které prožil (Crystal, 2018). Oproti jiným paměťovým systémům, které uchovávají pouze fakta, epizodická paměť ukládá velmi komplexní informace o celém kontextu dané události. Epizodická paměť ukládá vzpomínky také na události, o kterých předem nevíme, že vzpomínku na ně bude někdy třeba pomoci incidentálního učení ( Craik & Tulving, 1975). Stejně jako v běžném životě nás většinou předem nic neupozorňuje na důležitost nastávající situace. Navíc se mechanismy incidentálního a záměrného učení mohou lišit (Kuhnert et al., 2013; Wang & Giovanello, 2016). Z tohoto důvodu jsme přesvědčeni, že validní behaviorální úloha testující epizodickou paměť by neměla vyžadovat přípravný trénink nebo opakování, aby mohly být splněny podmínky incidentálního učení a zároveň nebyly získané výsledky zatíženy nežádoucí familiárností stimulů (Griffiths & Clayton, 2001; Panoz-Brown et al., 2018).

### 5.1 Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER

Pro pochopení neurálního pozadí epizodické paměti je prvním krokem vyvinutí spolehlivé validní behaviorální úlohy. Naším cílem tak byla jednoduchá úloha zaměřená na asociaci časově oddělených stimulů pomocí jednorázového učení. Úspěšně zapamatovaná asociace se u zvířete následně projeví takovým jasným chováním, že bude umožňovat jednoznačné a rychlé hodnocení. Design nové úlohy OTTER je založen na principu *trace conditioningu* doplněném o aktivní vyhýbání se bezprostřednímu nebezpečí. Takto navržené uspořádání úspěšně modeluje důležitý incidentální prvek epizodické paměti, neboť jde o zapamatování skutečností prožitých pouze jedinkrát (Zentall et al., 2008; Zhou et al., 2012).

Hlavním hodnotícím prvkem úlohy OTTER je behaviorální projev zapamatované asociace CS-2s-US sekvence, tedy přeběhnutí zvířete z tmavého kompartmentu do světlého. Během prvotních pokusů bylo zjištěno, že potkani kmene Wistar během habituace přecházeli mezi kompartmenty méně než potkani Long Evans a že trávili ve tmavém kompartmentu signifikantně více času než zvířata Long Evans i Sprague Dawley. Získané výsledky jsou zřejmě ovlivněny vyšší citlivostí albinotických potkanů vůči ostrému světlu (Barker et al., 2010). Zároveň se také shodují s dřívějšími poznatky o vyšší aktivitě zvířat Sprague Dawley oproti Wistar zvířatům (Asano, 1986; Rybnikova et al., 2018). Z těchto výsledků jsme usoudili, že



nejvhodnějšími zvířaty pro OTTER bude kmen Wistar. Navíc bylo zjištěno, že při použití širokého průchodu v rozdělovací přepážce obou kompartmentů je dosaženo signifikantně vyššího času tráveného ve tmavém kompartmentu než při používání původního průchodu, tak jak jsme předpokládali dle dostupných poznatků o exploračním chování hlodavců. Obě tato opatření znamenala stabilnější a předvídatelnější chování zvířat omezující náhodný pohyb zvířete, který by mohl být později milně interpretován jako reakce na CS.

Ve shodě s prvotními experimenty, zvířata postupující finální protokol úlohy OTTER preferovala setrvávání v tmavém kompartmentu během 15minutových habituačních sezení. I když zvířata začínající experiment v kontextu B během prvního dne přecházela do světlé části významně méně, žádné jiné rozdíly mezi kontexty nebyly v průběhu experimentu zaznamenány. V první části testovacího sezení zvířata přecházela mezi kompartmenty signifikantně méně než předchozího dne během párovacího sezení, což mohlo být dáno vyšší opatrností nebo větší nejistotou zvířat po předchozím nepříjemném zážitku.

Zjistili jsme, že celkem 59 % zvířat je schopno si osvojit vyžadovanou asociaci stimulů již po jejím prvním zažití. Tento výsledek ukazuje relativní rovnováhu mezi respondenty a nereagujícími zvířaty (téměř 1:1). Pro další výzkum je výhodou, že míra asociace nedosáhla maximální možné úrovně, neboť nám dává prostor pro možné změny zlepšující výsledek. V průběhu testovacího sezení se vymezila další skupina zvířat, u kterých se i přes využití dvou různých kontextuálních prostředí boxů projevila silná averzivní kontextuální asociace ke tmavému kompartmentu. Tato pro nás nežádoucí asociace se u zvířat projevila vyhýbáním se tmavému kompartmentu během testovacího sezení a dlouhodobým setrváváním ve světle. Z toho důvodu nebylo možné tato zvířata opětovně vystavit podmíněnému stimulu.

### **5.1.1 Limitace úlohy OTTER**

Tak jako každá metoda, tak si také úloha OTTER nese své určité limitace. Především každý protokol jednorázového učení už z principu vylučuje opakovaná měření, která jsou v některých případech sběru dat výhodná. Dalším omezením je řešení úlohy závislé na propojení vzniklé asociace s motorickou činností zvířete. U zvířat nereagujících na samotný CS si nemůžeme být jisti, jestli opravdu nedošlo k potřebné asociaci stimulů. Není možné ověřit, že si zvířata asociaci sice vytvořila, ale následně si je nespojila s potřebnou útečkovou reakcí (čemuž také nasvědčuje zjištěná aktivita buněk v hipokampu, viz níže). Dalším neopomenutelným faktem je relativně

velký počet zvířat, který si vyvinul nevhodnou kontextuální asociaci s prostředím. Také i když OTTER pracuje s různými aspekty epizodického vzpomínání, splnění hlavního předpokladu pamatování si co, kde a kdy se stalo, může být diskutabilní. Výsledná úteková reakce zvířete ještě nemusí jednoznačně znamenat, že si zvíře pamatuje, kde a kdy bylo vystaveno sekvenci CS-2s-US.

## 5.2 Aktivita hipokampu během OTTER

Pomocí vizualizace exprese časného genu *Arc* byla detekována aktivita buněk pyramidální vrstvy CA1 v dorsálním a ventrálním hipokampu zvířat, která absolvovala finální podobu úlohy OTTER. *Arc* je jedním z prvních genů, který se exprimuje v závislosti na aktivitě dané buňky. Během velmi omezeného časového okna po této aktivaci je vzniklá *Arc* mRNA detekovatelná v buněčném jádře pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace. I přes jistá metodologická omezení je tato metoda důležitým nástrojem pro vizualizaci konkrétních buněk aktivních během behaviorálního testování.

Dosud nepublikovaná data ukázala jasný trend podobné aktivace hipokampu testovaných respondentů, testovaných nereagujících zvířat a zvířat s osvojenou kontextuální asociací oproti kontrolám. I když nebyla data statisticky signifikantní, mají silnou výpovědní hodnotu. Výsledky naznačují, že vzhledem k podobné aktivaci buněk v hipokampu mezi respondenty a nereagujícími zvířaty si testovaná nereagující zvířata mohla averzivní zážitek pamatovat, ale oproti respondentům a zvířatům s kontextuální asociací nenašly úspěšnou strategii, jak se mu v případě potřeby příště vyhnout.

Předpokládáme, že pro ně bylo problémem uvědomit si řešení nastalé nebezpečné situace útekem do druhého kompartmentu aparatury. U zvířat musí dojít k relativně složité dvojí asociaci nejen obou signálů ale také signálu s adekvátním chováním, tedy útekem do světla, které zapříčiní naprosto bezpečné řešení situace. Jsme si vědomi, že musí zvířata v této úloze řešit dva po sobě následující úkoly, které jsou samy o sobě obtížné.

Úloha OTTER je založena na asociativním učení s prodlevou, stejně jako *trace conditioning* úlohy, ve kterých hraje CA1 hipokampu důležitou roli v propojování časově oddělených událostí (Rogers et al., 2006; Sellami et al., 2017). Propojení hipokampu stejně jako jeho oblasti CA1 s ostatními mozkovými strukturami není ve všech částech stejné, mění se jak v proximodistální, tak dorzoventrální ose (Soltesz & Losonczy, 2018). Úloha konkrétních

populací CA1 buněk v časovém propojování však nebyla nikdy charakterizována. Naše předběžné výsledky potvrzují rozdílnou funkci CA1 dorzálního a ventrálního hipokampu, kterou připisuje právě rozdílnému zapojení těchto oblastí do neurálních sítí mozku. Navíc naše výsledky poukazující na vyšší aktivitu CA1 ventrálního hipokampu u testovaných zvířat oproti kontrolám potvrzují důležitost této části hipokampu v časové vazbě v úlohách *trace conditioning*, stejně jako bylo již dříve ukázáno po lézích ventrálního hipokampu, které způsobily deficity v řešení *trace conditioning* úloh (Czerniawski, 2008; Rogers et al., 2006)

### 5.2.1 Celkové shrnutí OTTER

Vyvinuli jsme novou behaviorální úlohu OTTER typu *trace conditioning*, která využívá druhově specifických preferencí a přirozeného chování testovaných zvířat. Tato asociační úloha pro potkany je celkově jednoduchá na provedení, zajišťuje rychlé výsledky a v případě potřeby lze protokol jednoduše obměnit. Pro osvojení potřebného učení není třeba zvířata opakovaně trénovat, cílená asociace dvou blízkých ale časově oddělených stimulů se ustanovuje již po jednorázovém učení. Tím je úloha zaměřena specificky na incidentální učení, jeden z hlavních rysů epizodické paměti. Aspekt jednorázového učení společně s využitím přirozených charakteristik testovaného zvířecího druhu dělá z představované úlohy vysoce ekologicky validní model mechanismu paměti. I přes to, že pilotní data neprokázala jasnou aktivaci hipokampu v řešení této úlohy, věříme, že po doplnění histochemických dat bude toto spojení potvrzeno. Nová behaviorální úloha OTTER může být kvalitním a přínosným nástrojem pro detailnější výzkum některých atributů epizodické paměti.

### 5.3 Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu

Cílem této části práce bylo charakterizovat roli adultní neurogeneze v řešení behaviorální úlohy aktivního vyhýbání se místu. Pro testování byla určena úloha AAPA na Kolotočovém bludišti, která se skládá z rychlé habituace na nové prostředí arény, následuje fáze samotného učení pozice zakázaného sektoru a experiment je zakončen přeučováním zvířete na novou polohu sektoru. Tato poslední fáze přeučování je závislá na schopnosti kognitivní flexibility (Hatalova et al., 2017), která umožňuje člověku i zvířatům adekvátně reagovat na změnu prostředí. Jak

fáze samotného učení (Kubik et al., 2006), tak také schopnost přeučování (Burghardt et al., 2012) jsou závislé na správné fyziologické funkci hipokampu.

Pro potřeby experimentů byla adultní neurogenese blokována podáváním temozolomidu v dávce 25 mg/kg. Toto dávkování se projevovalo vyšší inhibicí neurogenese za poměrně nízkých vedlejších účinků. Během behaviorálního testování AAPA byl prokázáno lepší přeučování potkanů se zablockovanou adultní neurogenézí, kteří během sezení dělali méně chyb (vstupů). Tyto výsledky jsou v rozporu s velmi podobnou prací Burghardta a kolegů (2012) zaměřenou na učení myši v úloze AAPA po zablockování adultní neurogenese ozářením. Jejich výsledky prokázaly silný deficit právě v přeučování. Na získané výsledky ale mohlo mít vliv hned několik důležitých faktorů, jako jsou například samotný protokol experimentu nebo velikost a stáří generace nových buněk, které byly v experimentu postihnuty. Zatímco v naší studii blokování neurogenese ovlivnilo buňky, které by měly být v době experimentu staré 21-49 dní, v Burghardtově práci byla zasažena mnohem širší generace vznikající dva měsíce před samotným experimentem. Se stářím nově dozrávajícími buněk se ale velmi rychle mění jejich funkce i začlenění do stávající neuronální sítě (Kim et al., 2012; Leuner et al., 2006), což může mít silný vliv na výsledné učení zvířat.

Redukce adultní neurogenese může zlepšovat generalizaci, zatímco velmi silná neurogenese může mít pozitivní vliv na diskriminaci podobných stimulů (Hersman et al., 2016). Což je v souladu s našimi poznatky, že snížení neurogenese vedlo k menšímu počtu chyb v AAPA. V AAPA úloze je totiž zapotřebí určité generalizace komplexního pravidla vyhýbání, které je potřeba si osvojit k co nejrychlejšímu přeučení. Na druhou stranu testování opačného jevu diskriminace podobných prostředí, a tedy diskutované separaci podobných vzorců, by bylo pomocí AAPA na Kolotočovém bludišti obtížné. Podle našeho mínění, by takový experiment vyžadoval pouze mírné pootočení zakázaného sektoru od původní lokace (oproti velmi rozdílnému zrcadlovému umístění sektoru během přeučování) a podle pozorované aktivit zvířat na Kolotočovém bludišti by to jejich chování mohlo ovlivnit pouze minimálně. Podle záznamů nachozené trajektorie zvířat během testu je zřejmé, že mírné posunutí sektoru by v mnoha případech nemusel být zvířetem vůbec zaznamenán, neboť se v těch místech i dosud zdržují minimálně. Kromě toho s rostoucí vzdáleností mezi objekty schopnost jejich diskriminace závislé na adultní neurogenезi rychle klesá (Clelland et al., 2009; Morris et al., 2012).

Lepší výkon léčených zvířat v přeučování však může být ovlivněný i jinými okolnostmi nezávislými přímo na adultní neurogenезi. I když nebyl mezi skupinami zvířat nalezen rozdíl

v indexu učení dovedností, přece jen existuje možnost, že léčba temozolomidem mohla ovlivnit jiný než sledovaný fyzický nebo mentální faktor zvířat. V první řadě se nabízí narušení adultní neurogeneze v jiných neurogenních nikách než v SGZ (Toni & Schinder, 2016). Přímou souvislost s prováděným experimentem může mít vývoj nových buněk v SVZ (Akter et al., 2021) a tím také ovlivnění pro zvířata tak důležitého pachového cití v Kolotočovém bludišti, kde je pro zvíře zásadní vnímání vlastních pachových značek zanechaných na aréně. Nicméně tyto vjemy hrají pro zvíře stejnou roli jak v akvizici, tak v přeučování, takže by se pozorované zlepšení mělo podle této teorie týkat také akvizice.

Hlavním nedostatkem této studie je nedostatečná charakterizace BrdU+ buněk. Vzhledem k tomu, že pomocí adultní neurogeneze v DG mohou vznikat i jiné buněčné typy než samotné neurony, chybí zde rozlišení BrdU+ buněčných typů, jejichž vznik omezený temozolomidem mohl mít také vliv na výsledné chování zvířat. Nicméně dle literatury tvoří více jak 80 % takto nově dozrávajících buněk v DG právě neurony (Leuner et al., 2010; Waddell & Shors, 2008), takže efekt jiných zasažených buněčných typů nemusel hrát významnou roli. Ze získaných behaviorálních výsledků bylo nadále velmi patrné, že se celkově všechna zvířata testována v prvním experimentu (Experiment s využitím dávky 25 mg/kg TMZ) učila mnohem pomaleji než všechna zvířata v druhém experimentu (Experiment s využitím dávky 10 mg/kg TMZ). Takový vliv na celkové chování zvířat v bludišti mohlo mít rozdílné roční období, ve kterém k experimentům došlo (zima vs. léto). U zvířat může docházet k rozdílům v učení a paměti nebo v chování spojeném s bolestí k sezónním výkyvům (Ferguson & Maier, 2013; Rochais et al., 2021).

I přes tyto rozdíly naše studie ukázala zlepšení flexibilního přeučování u zvířat s redukovanou adultní neurogenézí, které bylo nejspíše zapříčiněno zlepšenou schopností generalizace.

#### 5.4 Vliv hypertenze na adultní neurogenezi

Hypertenze může mít u člověka (Santisteban et al., 2023) i u zvířat vážné následky (Duchemin et al., 2013). Mimo jiné může mít negativní vliv na různé kognitivní schopnosti (Duchemin et al., 2013). Jak některé dřívější studie ukázaly, hypertenze může mít ale vliv i na adultní neurogenezi (Hwang et al., 2008; Pietranera et al., 2010). V případě experimentu se zvířaty

kmene Dahl byla prokázána úspěšná indukce vysokého krevního tlaku po podání vysoko slané diety zvířatům citlivým na sůl (Dahl SS) oproti zvířatům Dahl SR, na jejichž krevní tlak neměl obsah soli v potravě žádný vliv. Ani u jednoho z obou kmenů zvířat Dahl nebyl nalezen rozdíl v počtu BrdU+ buněk, a to v závislosti na citlivosti zvířat k soli, tak ani v podle obsahu soli ve stravě.

Hlavním cílem experimentálních studií zaměřených na hypertenzi je renin-angiotenzinový systém, skrze který je krevní tlak řízen (Su et al., 2021). V dřívějších studiích různé metody blokování angiotenzinového systému adultní neurogenezi podpořilo (Ping et al., 2014), ať už prostřednictvím inhibitorů ACE (Jenrow et al., 2010) nebo například fyzickou aktivitou (Mukuda et al., 2014). Oproti tomu v naší práci jsme ale po podávání kaptoprilu, inhibitoru ACE, žádný vliv na neurogenezi nepozorovali, stejně jako práce Lee a kolegů (Lee et al., 2012).

Rozdílnost poznatků mezi jednotlivými studii může být z velké části dána mnoha odchylkami v designech nebo metodách jednotlivých studií. Pro výzkum hypertenze je dostupný větší počet animálních modelů, a nezdá se, že jsou mezi sebou porovnávány dva odlišné kmeny zvířat. Mohou se ale objevit rozdíly také například ve věku zvířat nebo ve způsobu jejich léčby. Získaná data jsou tak velmi heterogenní.

Hlavním omezením studie je, že pomocí BrdU nebyla hodnocena adultní neurogeneze i v jiných fázích zrání nových buněk. Stejně jako u našich předchozích experimentů bylo zvoleno pouze takové časové okno zrání rozhodující pro učení a paměť (Schmidt-Hieber et al., 2004). Navíc jak bylo řečeno, BrdU značení také nijak nerozlišuje konkrétní buněčné typy, které nebyly v této studii charakterizovány ani jiným způsobem.

V námi provedených experimentech nebylo potvrzeno, že by hypertenze u dvou různých animálních modelů měla jakýkoliv vliv na počet nově proliferujících buněk, a tedy nebyla ovlivněna míra adultní neurogeneze u těchto zvířat. Oproti dostupné literatuře se naše práce lišila v několika metodologických aspektech, které mohly být příčinou, že se nám nepodařilo úspěšně replikovat dřívější výsledky jiných autorů.

## 6 ZÁVĚR

Tato práce si kladla za cíl vyvinout novou behaviorální úlohu na testování jednorázového asociativního učení, objasnit roli nových neuronů v hipokampu a zjistit vliv hypertenze na míru neurogeneze v hipokampu. Všechny cíle této práce byly splněny. OTTER je jednoduchá úloha, ve které si má zvíře zapamatovat asociaci mezi dvěma stimuly. 59 % zvířat si s jistotou vytvořilo tuto asociaci. Pomocí exprese časného genu *Arc* jsme ale zjistili, že i zvířata, která se úlohu nenaučila, mají podobný profil exprese genu *Arc* oproti kontrolám. Odstraněním adultní neurogeneze v rozmezí 4-7 týdnů před behaviorálním testováním jsme zjistili, že snížená míra neurogeneze prospívá přeučování. Tento nečekaný výsledek vysvětlujeme zvýšenou mírou generalizace, která v případě úlohy Kolotočového bludiště může vést k lepšímu přeučování. Na závěr jsme ukázali, že hypertenze nemá vliv na míru adultní neurogeneze.

## 7 SOUHRN

Předkládaná dizertační práce se zabývá vývojem nové asociační úlohy OTTER pro zvířata testující důležité aspekty epizodické paměti, dopadem adultní neurogeneze na kognitivní flexibilitu a účinky hypertenze na neurogenezi. Studie se snaží přispět k pochopení paměťových procesů a neurologických faktorů ovlivňujících funkce související s pamětí.

Na rozdíl od jiných paměťových systémů musí epizodická paměť zachytit i vzpomínky i na situace, které se nezdály být příliš důležité a jejichž zapamatování nebylo vědomé. Tento aspekt zdůrazňuje rozdíl mezi mechanismy náhodného a záměrného učení v paměťových procesech. Primárním cílem tohoto výzkumu bylo vytvořit validní behaviorální úlohu pro studium epizodické paměti. Úloha OTTER je určena pro testování jednorázového učení se zaměřením na asociaci dvou časově blízkým ale přesto oddělených stimulů. Pro experimenty byli vybráni potkani kmene Wistar, protože vykazovali optimální behaviorální charakteristiky. Výsledky naznačují, že zvířata si dokáží vytvořit nezbytnou asociaci již po jediné expozici. Nová úloha OTTER nabízí příležitost pro budoucí výzkum důležitých atributů epizodické paměti.

OTTER, stejně jako každá metoda, má svá omezení. Jednorázové učení vylučuje opakovaná měření, což omezuje možnosti sběru dat. Řešení úlohy se navíc opírá o spojení asociace s motorickou aktivitou zvířat, takže je náročné ověřit, která z těchto dvou možností je u zvířete příčinou případného neúspěšného učení. Výkon některých zvířat v úloze je navíc ovlivněn nežádoucí kontextuální asociací. Navíc je brána v úvahu také nekončící vědecká diskuze o možnostech epizodického pamatování u zvířat.

Důležitým propojením úspěšného řešení OTTER s hipokampem potkanů se zvyšuje validita této nové úlohy v souvislosti s výzkumem různých aspektů paměti. Předběžné a prozatím nepublikované výsledky naznačují podobnou aktivaci hipokampu u nereagujících zvířat a zvířat s kontextovými asociacemi oproti kontrolám, i když nebylo dosaženo statistické významnosti. Studie naznačuje potenciální vliv oblasti CA1 ventrálního hipokampu na temporální vazbu oddělených událostí během podmíňovacích úloh.

Dalším cílem práce bylo objasnění role adultní neurogeneze v kognitivní flexibilitě pomocí úlohy aktivního vyhýbání se místu na kolotočovém bludišti. Neurogeneze byla u dospělých zvířat blokována cytostatickým temozolomidem a na rozdíl od předchozího výzkumu vykazovala zvířata se sníženou neurogenézí lepší schopnost přeučování. Tyto kontrasty mohly



být způsobeny například rozdílnostmi ve věku zvířat nebo jinými odlišnostmi v provedení experimentů.

Poslední zkoumanou otázkou v této práci byl možný vliv hypertenze na neurogenezi dospělých zvířat u dvou různých animálních modelů. Výsledky ukázaly, že hypertenze neovlivnila míru neurogeneze, což je v kontrastu s některými dřívějšími nálezy. Za tyto nesrovnalosti by mohly být zřejmě zodpovědné metodologické rozdíly a heterogenní údaje v této oblasti.

Tento výzkum přispívá k našemu pochopení paměťových procesů, behaviorálních úkolů a neurologických faktorů ovlivňujících funkce související s pamětí. Zdůrazňuje složitost výzkumu paměti a nutnost pečlivého zvážení experimentálního designu a metodologie při interpretaci výsledků.

## 8 SUMMARY

The presented dissertation deals with the development of new OTTER association tasks for animals testing important aspects of episodic memory, the impact of adult neurogenesis on cognitive flexibility and the effects of hypertension on neurogenesis. The study aims to contribute to the understanding of memory processes and neurological factors influencing memory-related functions.

Unlike other memory systems, episodic memory must also capture memories even of situations that did not seem very important and the remembering was not conscious. This aspect applies to the difference between incidental and intentional learning mechanisms in memory processes. The primary goal of this research was to develop a valid behavioral task for the study of episodic memory. The OTTER task is designed to test one-trial learning, focusing on the association of two temporally close but still separate stimuli. Wistar rats were chosen for the experiments because of the optimal behavioral characteristics. The results indicate that animals can form the necessary association after just one exposure. The new OTTER task offers an opportunity for future research on important attributes of episodic memory.

The OTTER, like any method, has its limitations. One-trial learning excludes repeated measurements, which limits the possibilities of data collection. In addition, the solution of the task relies on the connection of the association with the animal's motor activity, so it is difficult to verify which of these two possibilities is the cause of the animal's possible unsuccessful learning. In addition, the performance of some animals in the task is affected by an undesirable contextual association. In addition, the never-ending scientific debate about the possibilities of episodic remembering in animals is also considered.

The important connection of the successful OTTER solution to the rat hippocampus increases the validity of this new task in the context of research on various aspects of memory. Preliminary and yet unpublished results indicate similar hippocampal activation in nonresponders and animals with contextual associations versus controls, although statistical significance was not reached. The study suggests a potential influence of the CA1 region of the ventral hippocampus on the temporal binding of separate events during conditioning tasks.

Another goal of the work was to clarify the role of adult neurogenesis in cognitive flexibility using the active avoidance task on the Carousel maze. Neurogenesis was blocked in adult animals by the cytostatic temozolomide and, in contrast to previous research, animals with

reduced neurogenesis showed better reversal learning. These contrasts could be due to, for example, differences in the age of the animals or other differences in the design of the experiments.

The last investigated question in this work was the possible influence of hypertension on the neurogenesis of adult animals in two different animal models. The results showed that hypertension did not affect the rate of neurogenesis, which contrasts with some earlier findings. Methodological differences and heterogeneous data in this area could probably be responsible for these discrepancies.

This research contributes to our understanding of memory processes, behavioral tasks, and neurological factors influencing memory-related functions. It highlights the complexity of memory research and the need for careful consideration of experimental design and methodology when interpreting results.

## 9 LITERATURA

1. Abraham, W. C., Jones, O. D., & Glanzman, D. L. (2019). Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *npj Science of Learning*, 4(1).
2. Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., Gage, F. H., Jb, A., Li, Y., Sw, L., & Gd, C. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: From genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94.
3. Aimone, J. B., Wiles, J., & Gage, F. H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, 61(2).
4. Akter, M., Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2021). Neurogenesis and neuronal migration in the postnatal ventricular-subventricular zone: Similarities and dissimilarities between rodents and primates. *Neuroscience Research*, 167.
5. Allen, T. A., & Fortin, N. J. (2013). The evolution of episodic memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(SUPPL2).
6. Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135.
7. Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). Minireview For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain astrocytes are neurogenic stem cells challenges traditional views concerning brain development as well as stem cell identity. Studies in adult birds and developing. *Neuron*, 41.
8. Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163.
9. Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3).
10. Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6).
11. Anand, K., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. In *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4).
12. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The hippocampus book. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, & J. O'Keefe (Eds.), *New York*, Oxford University Press.

13. Appleby, P. A., Kempermann, G., & Wiskott, L. (2011). The role of additive neurogenesis and synaptic plasticity in a hippocampal memory model with grid-cell like input. *PLoS Computational Biology*, 7(1).
14. Armbruster, D. J. N., Ueltzhöffer, K., Basten, U., & Fiebach, C. J. (2012). Prefrontal cortical mechanisms underlying individual differences in cognitive flexibility and stability. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 24(12).
15. Asano, Y. (1986). Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. *Experimental Animals*, 35(4).
16. Ashley, J., Cordy, B., Lucia, D., Fradkin, L. G., Budnik, V., & Thomson, T. (2018). Retrovirus-like Gag protein Arc1 binds RNA and traffics across synaptic boutons. *Cell*, 172(1–2).
17. Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2006). Episodic-like memory in the rat. *Current Biology*, 16(13).
18. Baddeley, A. (2001). The concept of episodic memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1413).
19. Bahník, S. (2013). *Carousel Maze Manager (Version 0.3.5)*. Available at: [https://github.com/bahniks/CM\\_Manager\\_0\\_3\\_5](https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_3_5).
20. Barbas1r2, H., & Blatt2, G. J. (1995). Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the Rhesus monkey. *Hippocampus*, 5.
21. Barker, D. J., Sanabria, F., Lasswell, A., Thrailkill, E. A., Pawlak, A. P., & Killeen, P. R. (2010). Brief light as a practical aversive stimulus for the albino rat. *Behavioural Brain Research*, 214(2).
22. Bast, T., Da Silva, B. M., & Morris, R. G. M. (2005). Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *Journal of Neuroscience*, 25(25).
23. Basu, J., & Siegelbaum, S. A. (2015). The corticohippocampal circuit, synaptic plasticity, and memory. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11).
24. Becker, S., MacQueen, G., & Wojtowicz, J. M. (2009). Computational modeling and empirical studies of hippocampal neurogenesis-dependent memory: Effects of interference, stress and depression. *Brain Research*, 1299.
25. Beckstead, R. (1978). Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Research*, 152(2).

26. Bekinschtein, P., Kent, B. A., Oomen, C. A., Clemenson, G. D., Gage, F. H., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2013). BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of “pattern-separated” memories. *Cell Reports*, 5(3).
27. Benedict, R. H. B., Hulst, H. E., Bergsland, N., Schoonheim, M. M., Dwyer, M. G., Weinstock-Guttman, B., Geurts, J. J. G., & Zivadinov, R. (2013). Clinical significance of atrophy and white matter mean diffusivity within the thalamus of multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(11).
28. Best, P. J., & White, A. M. (1999). Placing hippocampal single-unit studies in a historical context. *Hippocampus*, 9(4).
29. Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2).
30. Bordiuk, O. L., Smith, K., Morin, P. J., & Semënov, M. V. (2014). Cell proliferation and neurogenesis in adult mouse brain. *PLoS ONE*, 9(11).
31. Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Von Der Behrens, W., & Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3).
32. Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., & Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 21(2).
33. Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., & Fenton, A. A. (2012). Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22(9).
34. Cai, D. J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., Flores, S. E., Kim, I., Sano, Y., Zhou, M., Baumgaertel, K., Lavi, A., Kamata, M., Tuszynski, M., Mayford, M., ... Silva, A. J. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, 534(7605).
35. Cameron, H. A., & Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61(2).
36. Campbell, B. A., & Messing, R. B. (1969). Aversion thresholds and aversion difference limens for white light in albino and hooded rats. *Journal of Experimental Psychology*, 82(2).

37. Carnevale, D., Mascio, G., D'Andrea, I., Fardella, V., Bell, R. D., Branchi, I., Pallante, F., Zlokovic, B., Yan, S. S., & Lembo, G. (2012). Hypertension & cognitive impairment hypertension induces brain-amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension*, 60(1).
38. Catani, M., Dell'Acqua, F., & Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(8).
39. Cayre, M., Scotto-Lomassese, S., Malaterre, J., Strambi, C., & Strambi, A. (2007). Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: Contribution from an insect model, the house cricket. *Chemical Senses*, 32(4).
40. Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2006). Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 497(1).
41. Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, 56(1).
42. Chao, O. Y., de Souza Silva, M. A., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2020). The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 113.
43. Chevaleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinhibitory cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4).
44. Christian, K. M., & Thompson, R. F. (2003). Neural substrates of eyeblink conditioning: Acquisition and retention. *Learning and Memory*, 10(6).
45. Clark, R. E., & Squire, L. R. (2013). Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(Supplement\_2).
46. Clayton, N. S., Bussey, T. J., & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews*, 4.
47. Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 395.

48. Clayton, N. S., Yu, K. S., & Dickinson, A. (2001). Scrub jays (*Aphelocoma coerulescens*) form integrated memories of the multiple features of caching episodes. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27(1).
49. Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937).
50. Colombo, M., Fernandez, T., Nakamura, K., & Gross, C. G. (1998). Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *Journal of Neurophysiology*, 80(2).
51. Craik, F. I., & Tulving, E. (1975). Depth of processing and the retention of words in episodic memory. *Journal of Experimental Psychology: General*, 104(3).
52. Crystal, J. D. (2018). Animal models of episodic memory. *Comparative Cognition and Behavior Reviews*, 13.
53. Curzon, P., Rustay, N. R., & Browman, K. E. (2009). Cued and contextual fear conditioning for rodents (J. J. Buccafusco, Ed.). CRC Press/Taylor & Francis.
54. Czerniawski, J. L. (2008). Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus*, 19(1).
55. Dajani, D. R., & Uddin, L. Q. (2015). Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends in Neurosciences*, 38(9).
56. Davies, J. R., Garcia-Pelegrin, E., Baciadonna, L., Pilenga, C., Favaro, L., & Clayton, N. S. (2022). Episodic-like memory in common bottlenose dolphins. *Current Biology*, 32(15).
57. Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005). Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, 16(1–3).
58. Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(8).
59. Di Lorenzo, F., Motta, C., Bonni, S., Mercuri, N. B., Caltagirone, C., Martorana, A., & Koch, G. (2019). LTP-like cortical plasticity is associated with verbal memory impairment in Alzheimer's disease patients. *Brain Stimulation*, 12(1).
60. Dickerson, B. C., & Eichenbaum, H. (2010). The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35(1).



61. Dineen, R. A., Bradshaw, C. M., Constantinescu, C. S., & Auer, D. P. (2012). Extra-hippocampal subcortical limbic involvement predicts episodic recall performance in multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 7(10).
62. Döbrössy, M. D., Drapeau, E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: Learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Molecular Psychiatry*, 8(12).
63. Doetsch, F., Manuel García-Verdugo, J., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 17(13).
64. Dolleman-Van Der Weel, M. J., Lopes Da Silva, F. H., & Witter, M. P. (1997). Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 17(14).
65. Drew, L. J., Kheirbek, M. A., Luna, V. M., Denny, C. A., Cloidt, M. A., Wu, M. V., Jain, S., Scharfman, H. E., & Hen, R. (2016). Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-born neurons. *Hippocampus*, 26(6).
66. Duchemin, S., Belanger, E., Wu, R., Ferland, G., & Girouard, H. (2013). Chronic perfusion of angiotensin II causes cognitive dysfunctions and anxiety in mice. *Physiology and Behavior*, 109(1).
67. Duke, C. G., Kennedy, A. J., Gavin, C. F., Day, J. J., & Sweatt, J. D. (n.d.). Experience-dependent epigenomic reorganization in the hippocampus. *Learning & Memory*, 24(7).
68. Egeland, M., Guinaudie, C., Du Preez, A., Musaelyan, K., Zunszain, P. A., Fernandes, C., Pariante, C. M., & Thuret, S. (2017). Depletion of adult neurogenesis using the chemotherapy drug temozolomide in mice induces behavioural and biological changes relevant to depression. *Translational Psychiatry*, 7(4).
69. Elmarakby, A. A., & Sullivan, J. C. (2021). Sex differences in hypertension: Lessons from spontaneously hypertensive rats (SHR). *Clinical Science* (Vol. 135, Issue 15, pp. 1791–1804). Portland Press Ltd.
70. Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for “what,” “where,” and “when.” *Learning and Memory*, 11(4).
71. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature*, 4.

72. Erwin, S. R., Sun, W., Copeland, M., Lindo, S., Spruston, N., & Cembrowski, M. S. (2020). A sparse, spatially biased subtype of mature granule cell dominates recruitment in hippocampal-associated behaviors. *Cell Reports*, 31(4).
73. Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, 25(44).
74. Fang, J., Demic, S., & Cheng, S. (2018). The reduction of adult neurogenesis in depression impairs the retrieval of new as well as remote episodic memory. *PLoS ONE*, 13(6).
75. Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1).
76. Feeney, M. C., Roberts, W. A., & Sherry, D. F. (2009). Memory for what, where, and when in the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*). *Animal Cognition*, 12(6).
77. Ferguson, S. A., & Maier, K. L. (2013). A review of seasonal/circannual effects of laboratory rodent behavior. *Physiology and Behavior*, 119.
78. Fink, G. R., Markowitsch, H. J., Reinkemeier, M., Bruckbauer, T., Kessler, J., & Heiss, W.-D. (1996). Cerebral representation of one's own past: Neural networks involved in autobiographical memory. *The Journal of Neuroscience*, 16(13).
79. Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, E. P., Ávila, J., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2020). Unraveling human adult hippocampal neurogenesis. *Nature Protocols*, 15(2).
80. Fölsz, O., Trouche, S., & Croset, V. (2023). Adult-born neurons add flexibility to hippocampal memories. *Frontiers in Neuroscience*, 17.
81. Font, E., Desfilis, E., Pérez-Canellas, M., & García-Verdugo, J. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain. Behavior and Evolution*, 58(5).
82. Fortin, N. J., Wright, S. P., & Eichenbaum, H. (2004). Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, 431(7005).
83. Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4).
84. Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11).
85. Fugazza, C., Pogány, Á., & Miklósi, Á. (2016). Recall of Others' Actions after incidental encoding reveals episodic-like memory in dogs. *Current Biology*, 26(23).

86. Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., & Hisatsune, T. (2003). Development/plasticity/repair two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 23(28).
87. Gabrieli, J. D. E. (1998). Cognitive neuroscience of human memory. *Annual Review of Psychology*, 49.
88. Galizio, M., Lawson, K., Shaw, J., & Bruce, K. (2023). Functional equivalence classes in rats: Repeated olfactory discrimination reversals and delayed stimulus probes. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 119(2).
89. Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H., & Weisstaub, N. V. (2018). Immediate early genes, memory, and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, (12).
90. Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE*, 4(5).
91. Gasbarri, A., Packard, M. G., Campana, E., Pacitti, C., & Packard, M. G. (1994). Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Research Bulletin*, 33.
92. Gazzara, R. A., & Altman, J. (1981). Early postnatal x-irradiation of the hippocampus and discrimination learning in adult rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 95(3).
93. Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076).
94. Ge, S., Yang, C. hao, Hsu, K. sen, Ming, G. li, & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4).
95. Gerlei, K., Passlack, J., Hawes, I., Vandrey, B., Stevens, H., Papastathopoulos, I., & Nolan, M. F. (2020). Grid cells are modulated by local head direction. *Nature Communications*, 11(1).
96. Gloor, P. et al. (1993). The human dorsal hippocampal commissure: An anatomically identifiable and functional pathway. *Brain*, 116(5).
97. Goldman, S. A., & Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain

- (learning/neurogenesis/neuronal death/glia cells/endothelial cells). In *Czech Academy of Sciences*, 80.
98. Goto, A. (2022). Synaptic plasticity during systems memory consolidation. In *Neuroscience Research*, 183.
  99. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning Enhances Adult Neurogenesis in the Hippocampal Formation. *Nature*, 2(3).
  100. Gould, K. L., Gilbertson, K. E., Hrvol, A. J., Nelson, J. C., Seyfer, A. L., Brantner, R. M., & Kamil, A. C. (2013). Differences in relative hippocampus volume and number of hippocampus neurons among five corvid species. *Brain, Behavior and Evolution*, 81(1).
  101. Grieves, R. M., Shinder, M. E., Rosow, L. K., Kenna, M. S., & Taube, J. S. (2022). The neural correlates of spatial disorientation in head direction cells. *ENeuro*, 9(6).
  102. Griffiths, D. P., & Clayton, N. S. (2001). Testing episodic memory in animals: A new approach. *Physiology and Behavior*, 73.
  103. Groenewegen, H. J. et al. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1).
  104. Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12).
  105. Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature*, 2(12).
  106. Halverson, H. E., Khilkevich, A., & Mauk, M. D. (2018). Cerebellar processing common to delay and trace eyelid conditioning. *Journal of Neuroscience*, 38(33).
  107. Hamm, R., White-Gbadebo, D., Lyeth, B., Jenkins, L., & Hayes, R. (1992). The effect of age on motor and cognitive deficits after traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery*, 31(6).
  108. Hastings, N. B., & Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *Journal of Comparative Neurology*, 413(1).
  109. Hatalova, H., Radostova, D., Pistikova, A., Vales, K., & Stuchlik, A. (2017). Detrimental effect of clomipramine on hippocampus-dependent learning in an animal model of

- obsessive-compulsive disorder induced by sensitization with d2/d3 agonist quinpirole. *Behavioural Brain Research*, 317.
110. Henson, R. N. A., Rugg, M. D., Shallice, T., Josephs, O., & Dolan, R. J. (1999). Recollection and familiarity in recognition memory: An event-related functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Neuroscience*, 19(10).
111. Hersman, S., Rodriguez Barrera, V., & Fanselow, M. (2016). Assigning function to adult-born neurons: A theoretical framework for characterizing neural manipulation of learning. In *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9.
112. Hoffman, M. L., Beran, M. J., & Washburn, D. A. (2009). Memory for “What”, “Where”, and “When” information in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 35(2).
113. Hopfield, J. J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities (associative memory/parallel processing/categorization/content-addressable memory/fail-soft devices). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(8).
114. IBM Corp. (2017). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
115. Ikrar, T., Guo, N., He, K., Besnard, A., Levinson, S., Hill, A., Lee, H. K., Hen, R., Xu, X., & Sahay, A. (2013). Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Frontiers in Neural Circuits*, 7.
116. Insausti, R., & Amaral, D. G. (2003). Hippocampal formation. In *The Human Nervous System: Second Edition*.
117. Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 295(4).
118. Ivkovich, D., & Stanton, M. E. (2001). Effects of early hippocampal lesions on trace, delay, and long-delay eyeblink conditioning in developing rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(3).
119. Jeffery, K., & O’Keefe, J. (1998). Worm holes and avian space-time. *Nature*, 395.
120. Jenrow, K. A., Brown, S. L., Liu, J., Kolozsvary, A., Lapanowski, K., & Kim, J. H. (2010). Ramipril mitigates radiation-induced impairment of neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Radiation Oncology*, 5(1).

121. Kapur, N., Ellison, D., Smith, M. P., McLellan, D. L., & Burrows, E. H. (1992). Focal retrograde amnesia following bilateral temporal lobe pathology a neuropsychological and magnetic resonance Study. *Brain*, 115.
122. Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(2).
123. Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H., & Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 10(3).
124. Kempermann, G., & Gage, F. H. (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *European Journal of Neuroscience*, 16(1).
125. Kempermann, G., Kuhn, G. H., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386.
126. Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). New nerve cells for the adult brain. *Scientific American, Inc.*
127. Kesner, R. P., Hui, X., Sommer, T., Wright, C., Barrera, V. R., & Fanselow, M. S. (2015). The role of postnatal neurogenesis in supporting remote memory and spatial metric processing. *Hippocampus*, 25(9).
128. Khamsi, R. (2022). A Fragrance to remember. *Nature*, 606.
129. Kim, W. R., Christian, K., Ming, G. L., & Song, H. (2012). Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behavior. *Behavioural Brain Research*, 227(2).
130. Koenig, K. A., Rao, S. M., Lowe, M. J., Lin, J., Sakaie, K. E., Stone, L., Bermel, R. A., Trapp, B. D., & Phillips, M. D. (2019). The role of the thalamus and hippocampus in episodic memory performance in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 25(4).
131. Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H. Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R., & Tonegawa, S. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature Neuroscience*, 17(2).
132. Kohonen, T. (1978). *Associative Memory a System-Theoretical Approach*. Springer-Verlag.

133. Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2009). *Fundamentals of human neuropsychology*. Worth Publishers.
134. Hwang, I.K., Yoon, Y.S., Choi, J.H., Yoo, K.-Y., Shin, S. Y., Chung, D.W., Kim, H.-J., Kim, C.-S., Do, S.-G., Seong, J.K., Lee, I.S., & Won, M.-H. (2008). Doublecortin-immunoreactive neuronal precursors in the dentate gyrus of spontaneously hypertensive rats at various age stages: Comparison with Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(4).
135. Kopelman, M. D., Bright, P., Buckman, J., Fradera, A., Yoshimasu, H., Jacobson, C., & Colchester, A. C. F. (2007). Recall and recognition memory in amnesia: Patients with hippocampal, medial temporal, temporal lobe or frontal pathology. *Neuropsychologia*, 45(6).
136. Koukourakis, G. V., Kouloulis, V., Zacharias, G., Papadimitriou, C., Pantelakos, P., Maravelis, G., Fotineas, A., Beli, I., Chaldeopoulos, D., & Kouvaris, J. (2009). Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: Pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article. *Molecules*, 14(4).
137. Kubik, S., Miyashita, T., Kubik-Zahorodna, A., & Guzowski, J. F. (2012). Loss of activity-dependent Arc gene expression in the retrosplenial cortex after hippocampal inactivation: Interaction in a higher-order memory circuit. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(1).
138. Kubik, S., Stuchlik, A., & Fenton, A. A. (2006). Evidence for hippocampal role in place avoidance other than merely memory storage. *Physiological Research*, 55(4).
139. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6).
140. Kuhnert, M. T., Bialonski, S., Noennig, N., Mai, H., Hinrichs, H., Helmstaedter, C., & Lehnertz, K. (2013). Incidental and intentional learning of verbal episodic material differentially modifies functional brain networks. *PLoS ONE*, 8(11).
141. Lacefield, C. O., Itskov, V., Reardon, T., Hen, R., & Gordon, J. A. (2012). Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 22(1).
142. Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. In *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1).

143. Laplagne, D. A., Kamienkowski, J. E., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Zhao, C., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 25(10).
144. Leão, R. N., Leão, R. N., Targino, Z. H., Colom, L. V., & Fisahn, A. (2015). Interconnection and synchronization of neuronal populations in the mouse medial septum/diagonal band of Broca. *Journal of Neurophysiology*, 113(3).
145. Lee, T. C., Greene-Schloesser, D., Payne, V., Diz, D. I., Hsu, F.-C., Kooshki, M., Mustafa, R., Riddle, D. R., Zhao, W., Chan, M. D., & Robbins, M. E. (2012). Chronic administration of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, prevents fractionated whole-brain irradiation-induced perirhinal cortex-dependent cognitive impairment. *Radiation Research*, 178(1).
146. Leuner, B., Glasper, E. R., & Gould, E. (2010). Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS ONE*, 5(7).
147. Leuner, B., Gould, E., & Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16(3).
148. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814).
149. Lisman, J. E. (1999). Relating Hippocampal Circuitry Viewpoint to Function: Recall of Memory Sequences by Reciprocal Dentate-CA3 Interactions. *Neuron*, 22.
150. Lobellova, V., Entlerova, M., Svojanovska, B., Hatalova, H., Prokopova, I., Petrasek, T., Vales, K., Kubik, S., Fajnerova, I., & Stuchlik, A. (2013). Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behavioural Brain Research*, 246.
151. Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal Für Psychologie Und Neurologie*.
152. Lorenzini, L., Baldassarro, V. A., Stanzani, A., & Giardino, L. (2021). Nerve growth factor: The first molecule of the neurotrophin family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1331.
153. Lövblad, K. O., Schaller, K., & Isabel Vargas, M. (2014). The fornix and limbic system. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 35(5).



154. Lowry, C. A. (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: Implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(11).
155. Lugo, J. N., Smith, G. D., & Holley, A. J. (2014). Trace fear conditioning in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 85.
156. Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., & Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: A functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333(6040).
157. Magavi, S. S., Leavitt, B. R., & Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405.
158. Markakis, E. A., & Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *Journal of Comparative Neurology*, 406(4).
159. Marr, D. (1970). A Theory for Cerebral Neocortex. *Biological Sciences*, 176(1043).
160. Marr, D. (1971). *Simple Memory: A Theory for Archicortex*. Royal Society.
161. Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). An evaluation of the hypothesis. *Annual Reviews of Neuroscience*, 23.
162. Martinez-Canabal, A., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2013). Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus*, 23(1).
163. Martin-Ordas, G., Haun, D., Colmenares, F., & Call, J. (2010). Keeping track of time: Evidence for episodic-like memory in great apes. *Animal Cognition*, 13(2).
164. McAvoy, K., Besnard, A., & Sahay, A. (2015). Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: A role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9.
165. McAvoy, K. M., Scobie, K. N., Berger, S., Russo, C., Guo, N., Decharatanachart, P., Vega-Ramirez, H., Miake-Lye, S., Whalen, M., Nelson, M., Bergami, M., Bartsch, D., Hen, R., Berninger, B., & Sahay, A. (2016). Modulating neuronal competition dynamics in the dentate gyrus to rejuvenate aging memory circuits. *Neuron*, 91(6).
166. Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8.

167. Miyashita, T., & Rockland, K. S. (2007). GABAergic projections from the hippocampus to the retrosplenial cortex in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 26(5).
168. Mongiat, L. A., Espósito, M. S., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS ONE*, 4(4).
169. Monk, C. S., Zhuang, J., Curtis, W. J., Ofenloch, I. T., Tottenham, N., Nelson, C. A., & Hu, X. (2002). Human hippocampal activation in the delayed matching- and nonmatching-to-sample memory tasks: An event-related functional MRI approach. *Behavioral Neuroscience*, 116(4).
170. Monsey, M. S., Ota, K. T., Akingbade, I. F., Hong, E. S., & Schafe, G. E. (2011). Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS ONE*, 6(5).
171. Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. *Journal of Neuroscience*, 41(12).
172. Morris, A. M., Churchwell, J. C., Kesner, R. P., & Gilbert, P. E. (2012). Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(3).
173. Morris, R. G. M. (2001). Episodic-like memory in animals: Psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1413).
174. Moscovitch, M., Cabeza, R., Winocur, G., & Nadel, L. (2016). Episodic memory and beyond: The hippocampus and neocortex in transformation. *Annual Review of Psychology*, 67.
175. Moser, E. I., Moser, M. B., & McNaughton, B. L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: A history. *Nature Neuroscience*, 20(11).
176. Mukuda, T., Koyama, Y., Hamasaki, S., Kaidoh, T., & Furukawa, Y. (2014). Systemic angiotensin II and exercise-induced neurogenesis in adult rat hippocampus. *Brain Research*, 1588.
177. Müller, C., & Remy, S. (2018). Septo-hippocampal interaction. *Cell and Tissue Research*, 373(3).

178. Naber, P. A., Lopes Da Silva, F. H., & Witter, M. P. (2001). Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus*, 11(2).
179. Nadel, L., & Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 7.
180. Nadel, L., O'Keefe, J., & Black, A. (1975). Slam on the brakes: A critique of Altman, Brunner, and Bayer's response-inhibition model of hippocampal function. *Behavioral Biology*, 14.
181. Nash, M. I., Hodges, C. B., Muncy, N. M., & Kirwan, C. B. (2021). Pattern separation beyond the hippocampus: A high-resolution whole-brain investigation of mnemonic discrimination in healthy adults. *Hippocampus*, 31(4).
182. Nikolaienko, O., Patil, S., Eriksen, M. S., & Bramham, C. R. (2018). Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 77.
183. Nilsson, S. R. O., Alsiö, J., Somerville, E. M., & Clifton, P. G. (2015). The rat's not for turning: Dissociating the psychological components of cognitive inflexibility. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 56.
184. Ohara, S., Sato, S., Tsutsui, K. I., Witter, M. P., & Iijima, T. (2013). Organization of multisynaptic inputs to the dorsal and ventral dentate gyrus: Retrograde trans-synaptic tracing with rabies virus vector in the rat. *PLoS One*, 8(11).
185. Ohline, S. M., Wake, K. L., Hawkrigde, M. V., Dinnunhan, M. F., Hegemann, R. U., Wilson, A., Schoderboeck, L., Logan, B. J., Jungenitz, T., Schwarzacher, S. W., Hughes, S. M., & Abraham, W. C. (2018). Adult-born dentate granule cell excitability depends on the interaction of neuron age, ontogenetic age and experience. *Brain Structure and Function*, 223(7).
186. O'Keefe, J. (1976). Place Units in the Hippocampus of the Freely Moving Rat. *Experimental Neurology*, 51.
187. O'Keefe, J., & Dostrovsky. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*, 34.
188. O'Keefe, J., Nadel, L., Keightley, S., & Kill, D. (1975). Fornix lesions selectively abolish place learning in the rat. *Experimental Neurology*, 48.
189. O'Keefe, John., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press.

190. Panoz-Brown, D., Iyer, V., Carey, L. M., Sluka, C. M., Rajic, G., Kestenman, J., Gentry, M., Brotheridge, S., Somekh, I., Corbin, H. E., Tucker, K. G., Almeida, B., Hex, S. B., Garcia, K. D., Hohmann, A. G., & Crystal, J. D. (2018). Replay of episodic memories in the rat. *Current Biology*, 28(10).
191. Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., & Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17(10).
192. Park, S., Kramer, E. E., Mercaldo, V., Rashid, A. J., Insel, N., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2016). Neuronal allocation to a hippocampal engram. *Neuropsychopharmacology*, 41(13).
193. Pastuzyn, E. D., Day, C. E., Kearns, R. B., Kyrke-Smith, M., Taibi, A. V., McCormick, J., Yoder, N., Belnap, D. M., Erlendsson, S., Morado, D. R., Briggs, J. A. G., Feschotte, C., & Shepherd, J. D. (2018). The neuronal gene *Arc* encodes a repurposed retrotransposon Gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell*, 172(1–2).
194. Payne, H. L., Lynch, G. F., & Aronov, D. (2020). Precise spatial representations in the hippocampus of a food-caching bird. *BioRxiv*, 2020(11).
195. Phelps, E. A., & Anderson, A. K. (1997). Emotional memory: What does the amygdala do? *Current Biology*, 7.
196. Pietranera, L., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2010). Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(10).
197. Pikkarainen, M., Rönkkö, S., Savander, V., Insausti, R., & Pitkänen, A. (1999). Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 403(2).
198. Ping, G., Qian, W., Song, G., & Zhaochun, S. (2014). Valsartan reverses depressive/anxiety-like behavior and induces hippocampal neurogenesis and expression of BDNF protein in unpredictable chronic mild stress mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124.
199. Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., & Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911.

200. Postans, M., Parker, G. D., Lundell, H., Ptito, M., Hamandi, K., Gray, W. P., Aggleton, J. P., Dyrby, T. B., Jones, D. K., & Winter, M. (2020). Uncovering a role for the dorsal hippocampal commissure in recognition memory. *Cerebral Cortex*, 30(3).
201. Tulving, E. (1984). Précis of Elements of Episodic Memory. *The Behavioral and Brain Science*, 7.
202. Prusky, G. T., Harker, T. K., Douglas, R. M., & Whishaw, I. Q. (2002). Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136.
203. Raber, J., Rola, R., Lefevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., Vandenberg, S. R., & Fike, J. R. (2004). Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Research*, 162(1).
204. Ramón y Cajal, S., & May, R. M. (1928). *Degeneration & regeneration of the nervous system*. (H. Milford, Ed.). Oxford University Press.
205. Rapp, J. P., & Dene, H. (n.d.). Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension*, 7(3).
206. Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *New Series*, 255(5052).
207. Ribot, T. (1891). *Les Maladies de la Mémoire*. L'Hartmann
208. Rioult-Pedotti, M.-S., Friedman, D., & Donoghue, J. P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *New Series*, 290(5491).
209. Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Full-length review connections of the rat lateral septal complex 1. *Brain Research Reviews*, 24.
210. Rochais, C., Hotte, H., & Pillay, N. (2021). Seasonal variation in reversal learning reveals greater female cognitive flexibility in African striped mice. *Scientific Reports*, 11(1).
211. Rogers, J. L., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2006). Effects of ventral and dorsal CA1 subregional lesions on trace fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(1).
212. Rubin, R. D., Watson, P. D., Duff, M. C., & Cohen, N. J. (2014). The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8.

213. Rudolfova, V., Petrasek, T., Antosova, E., Frynta, D., Landova, E., Vales, K., & Nekovarova, T. (2022). Inter-individual differences in laboratory rats as revealed by three behavioural tasks. *Scientific Reports*, 12(1).
214. Rugg, M. D., & King, D. R. (2018). Ventral lateral parietal cortex and episodic memory retrieval. *Cortex*, 107.
215. Rugg, M. D., Otten, L. J., & Henson, R. N. A. (2002). The neural basis of episodic memory: Evidence from functional neuroimaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1424).
216. Rybnikova, E. A., Vetrovoi, O. V., & Zenko, M. Yu. (2018). Comparative characterization of rat strains (Wistar, Wistar–Kyoto, Sprague Dawley, Long Evans, LT, SHR, BD-IX) by their behavior, hormonal level and antioxidant status. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 54(5).
217. Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern separation: A common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70(4).
218. Salz, D. M., Tiganj, Z., Khasnabish, S., Kohley, A., Sheehan, D., Howard, M. W., & Eichenbaum, H. (2016). Time cells in hippocampal area CA3. *Journal of Neuroscience*, 36(28).
219. Santisteban, M. M., Iadecola, C., & Carnivale, D. (2023). Hypertension, neurovascular dysfunction, and cognitive impairment. *Hypertension*, 80(1).
220. Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Denise, A., Garcia, R., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R., & Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46).
221. Schacter, D. L. (1987). Memory, amnesia, and frontal lobe dysfunction. *Psychobiology*, 15(1).
222. Schmidt-Hieber, C., Jones, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988).
223. Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7).

224. Schwartz, B. L., Colon, M. R., Sanchez, I. C., Rodriguez, I. A., & Evans, S. (2002). Single-trial learning of “what” and “who” information in a gorilla “Gorilla gorilla gorilla”: Implications for episodic memory. *Animal Cognition*, 5(2).
225. Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1).
226. Sellami, A., Al Abed, A. S., Brayda-Bruno, L., Etchamendy, N., Valério, S., Oulé, M., Pantaléon, L., Lamothe, V., Potier, M., Bernard, K., Jabourian, M., Herry, C., Mons, N., Piazza, P. V., Eichenbaum, H., & Marighetto, A. (2017). Temporal binding function of dorsal CA1 is critical for declarative memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38).
227. Sharma, V., Cohen, N., Sood, R., Ounallah-Saad, H., Gal Ben-Ari, S., & Rosenblum, K. (2018). Trace fear conditioning: Procedure for assessing complex hippocampal function in mice. *Bio-Protocol*, 8(16).
228. Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12(5).
229. Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., & Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4).
230. Soltesz, I., & Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 21(4).
231. Spellman, T., Svei, M., Kaminsky, J., Manzano-Nieves, G., & Liston, C. (2021). Prefrontal deep projection neurons enable cognitive flexibility via persistent feedback monitoring. *Cell*, 184(10).
232. Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2).
233. Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 5.
234. Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., & Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54(8).

235. Stella, F., Cerasti, E., Si, B., Jezek, K., & Treves, A. (2012). Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7).
236. Stone, S. S. D., Teixeira, C. M., de Vito, L. M., Zaslavsky, K., Josselyn, S. A., Lozano, A. M., & Frankland, P. W. (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 31(38).
237. Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10).
238. Su, C., Xue, J., Ye, C., & Chen, A. (2021). Role of the central renin-angiotensin system in hypertension (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(6).
239. Suddendorf, T., Addis, D. R., & Corballis, M. C. (2009). Mental time travel and the shaping of the human mind. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1521).
240. Sun, Y., Nguyen, A. Q., Nguyen, J. P., Le, L., Saur, D., Choi, J., Callaway, E. M., & Xu, X. (2014). Cell-type-specific circuit connectivity of hippocampal CA1 revealed through cre-dependent rabies tracing. *Cell Reports*, 7(1).
241. Takahashi, H., Kato, M., Takano, H., Arakawa, R., Okumura, M., Otsuka, T., Kodaka, F., Hayashi, M., Okubo, Y., Ito, H., & Suhara, T. (2008). Differential contributions of prefrontal and hippocampal dopamine D1 and D2 receptors in human cognitive functions. *Journal of Neuroscience*, 28(46).
242. Tanaka, K. Z., & McHugh, T. J. (2018). The Hippocampal engram as a memory index. *Journal of Experimental Neuroscience*, 12.
243. Tartt, A. N., Fulmore, C. A., Liu, Y., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., Arango, V., Hen, R., Mann, J. J., & Boldrini, M. (2018). Considerations for assessing the extent of hippocampal neurogenesis in the adult and aging human brain. *Cell Stem Cell*, 23(6).
244. Telensky, P., Svoboda, J., Blahna, K., Bureš, J., Kubik, S., & Stuchlik, A. (2011). Functional inactivation of the rat hippocampus disrupts avoidance of a moving object. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(13).
245. Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Yang, S. M., Trinchero, M. F., Alvarez, D. D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G. M., & Schinder, A. F. (2015). Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron*, 85(1).



246. Teyler, T., & DiScenna, P. (1986). The hippocampal memory indexing theory. *Behavioral Neuroscience*, 100(2).
247. Teyler, T. J., & Rudy, J. W. (2007). The hippocampal indexing theory and episodic memory: Updating the index. In *Hippocampus*, 17(12).
248. Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, 55.
249. Toni, N., & Schinder, A. F. (2016). Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1).
250. Toni, N., & Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 33(6).
251. Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., Van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6).
252. Torres-Berrió, A., Vargas-López, V., & López-Canul, M. (2019). The ventral hippocampus is required for behavioral flexibility but not for allocentric/egocentric learning. *Brain Research Bulletin*, 146.
253. Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., & Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6).
254. Trouche, S., Koren, V., Doig, N. M., Ellender, T. J., El-Gaby, M., Lopes-dos-Santos, V., Reeve, H. M., Perestenko, P. V., Garas, F. N., Magill, P. J., Sharott, A., & Dupret, D. (2019). A Hippocampus-accumbens tripartite neuronal motif guides appetitive memory in space. *Cell*, 176(6).
255. Tsivilis, D., Vann, S. D., Denby, C., Roberts, N., Mayes, A. R., Montaldi, D., & Aggleton, J. P. (2008). A disproportionate role for the fornix and mammillary bodies in recall versus recognition memory. *Nature Neuroscience*, 11(7).
256. Tulving, E. (1985). *Elements of Episodic Memory*. Oxford University Press.
257. Tulving, E. (2002). EPISODIC MEMORY: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1).
258. Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3).

259. Tulving, E., Schacter, D. L., McLachlan, D. R., & Moscovitch, M. (1988). Priming of semantic autobiographical knowledge: A case study of retrograde amnesia. *Brain and Cognition*, 8.
260. Uchida, N., & Mainen, Z. F. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nature Neuroscience*, 6(11).
261. Van Der Werf, Y. D., Jolles, J., Witter, M. P., & Uylings, H. B. M. (2003). Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex*, 39.
262. van Groen, T., Miettinen, P., & Kadish, I. (2003). The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13(1).
263. van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature*, 2(3).
264. van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875).
265. Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4).
266. Vann, S. D., & Aggleton, J. P. (2004). The mammillary bodies: Two memory systems in one? In *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1).
267. Varela, C., Kumar, S., Yang, J. Y., & Wilson, M. A. (2014). Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Structure and Function*, 219(3).
268. Venables, W., & Ripley, B. (2002). *Modern applied statistics with S*. Springer.
269. Vertes, R. P. (2015). Major diencephalic inputs to the hippocampus: Supramammillary nucleus and nucleus reuniens. Circuitry and function. *Progress in Brain Research*, 219.
270. Vertes, R. P., Fortin, W. J., & Crane, A. M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 407(4).
271. Waddell, J., & Shors, T. J. (2008). Neurogenesis, learning and associative strength. *European Journal of Neuroscience*, 27(11).
272. Wagatsuma, A., Okuyama, T., Sun, C., Smith, L. M., Abe, K., & Tonegawa, S. (2017). Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2).

273. Wang, W. C., & Giovanello, K. S. (2016). The role of medial temporal lobe regions in incidental and intentional retrieval of item and relational information in aging. *Hippocampus*, 26(6).
274. Wang, Y., & Feng, Y. (2020). The efficacy and safety of radiotherapy with adjuvant temozolomide for glioblastoma: A meta-analysis of randomized controlled studies. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 196.
275. Wishaw, I. Q., Gharbawie, O. A., Clark, B. J., & Lehmann, H. (2006). The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behavioural Brain Research*, 171(2).
276. Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (<https://ggplot2.tidyverse.org/>). Springer-Verlag New York.
277. Willshaw, D. J., Buneman, O. P., & Longuet-Higgins, H. C. (1969). Non-holographic Associative Memory. *Nature*, 222.
278. Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S., & Wang, S. (2006). Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16(3).
279. Witter, M. P., & Groenewegen, H. J. (1990). The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Progress in Brain Research*, 83.
280. Wolff, M., Loukavenko, E. A., Will, B. E., & Dalrymple-Alford, J. C. (2008). The extended hippocampal-diencephalic memory system: Enriched housing promotes recovery of the flexible use of spatial representations after anterior thalamic lesions. *Hippocampus*, 18(10).
281. Xiong, C. H., Liu, M. G., Zhao, L. X., Chen, M. W., Tang, L., Yan, Y. H., Chen, H. Z., & Qiu, Y. (2019). M1 muscarinic receptors facilitate hippocampus-dependent cognitive flexibility via modulating GluA2 subunit of AMPA receptors. *Neuropharmacology*, 146.
282. Yassa, M. A., & Reagh, Z. M. (2013). Competitive trace theory: A role for the hippocampus in contextual interference during retrieval. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(107).
283. Yi, F., Garrett, T., Deisseroth, K., Haario, H., Stone, E., & Lawrence, J. J. (2021). Septohippocampal transmission from parvalbumin-positive neurons features rapid recovery from synaptic depression. *Scientific Reports*, 11(1).
284. Zentall, T. R., Singer, R. A., & Stagner, J. P. (2008). Episodic-like memory: Pigeons can report location pecked when unexpectedly asked. *Behavioural Processes*, 79(2).

285. Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451(7181).
286. Zhang, L. Q., Yao, J., Gao, J., Sun, L., Wang, L. T., & Sui, J. F. (2019). Modulation of eyeblink conditioning through sensory processing of conditioned stimulus by cortical and subcortical regions. *Behavioural Brain Research*, 359.
287. Zhou, W., & Crystal, J. D. (2009). Evidence for remembering when events occurred in a rodent model of episodic memory. *PNAS*, 106(23).
288. Zhou, W., Hohmann, A. G., & Crystal, J. D. (2012). Rats answer an unexpected question after incidental encoding. *Current Biology*, 22(12).
289. Zinkivskay, A., Nazir, F., Smulders, T. V., & Smulders, T. (2009). What-Where-When memory in magpies (*Pica pica*). *Animal Cognition*, 12(1).

## 10 PUBLIKACE

Publikace relevantní k dizertační práci:

- 2023 **Incidental Temporal Binding in Rats: a Novel Behavioral Task** Radostova, D., Kuncicka, D., Krajcovic, B., Hejtmanek, L., Petrasek, T., Svoboda, J., Stuchlik, A., Brozka, H.: Plos one 18.6 (2023; IF (2022) = 3,752)
- 2017 **Adult neurogenesis reduction by a cytostatic treatment improves spatial reversal learning in rats**  
Brozka, H., Pistikova, A., **Radostova, D.**, Vales, K., Svoboda, J., Grzyb, A. N., & Stuchlik, A.: Neurobiology of Learning and Memory, 141 (2017; IF = 3,244)
- 2017 **The effect of hypertension on adult hippocampal neurogenesis in young adult spontaneously hypertensive rats and Dahl rats**  
Pistikova, A., Brozka, H., Bencze, M., **Radostova, D.**, Vales, K., & Stuchlik, A.: Physiological Research 66 (2017; IF = 1,324).

Ostatní publikace:

- 2022 **Selective deficits in attentional set-shifting in mice induced by maternal immune activation with poly (I:C)**  
Maleninska, K., Janikova, M., Radostova, D., Vojtechova, I., Petrasek, T., Kirdajova, D., Anderova, M., Svoboda, J., Stuchlik, A.: Behavioural Brain Research 419 (2022; IF = 3,352)
- 2019 **No Effect of Riluzole and Memantine on Learning Deficit Following Quinpirole Sensitization – an Animal Model of Obsessive-Compulsive Disorder**  
Janikova, M., Stuchlik, A., Radostova, D., Brozka, H., Svoboda, J.: Physiology and Behavior 204 (2019; IF = 2,834)
- 2018 **Chronic MK-801 application in adolescence and early adulthood: A spatial working memory deficit in adult Long-Evans rats but no changes in the hippocampal NMDA receptor subunits**  
Utl, L., Petrasek, T., Sengul, H., Svojanovska, M., Lobellova, V., Vales, K., Radostova, D., Tsenov, G., Kubova, H., Mikulecka, A., Svoboda, J., Stuchlik, A.: Frontiers in Pharmacology 9 (2018; IF = 3,845)
- 2017 **Detrimental effect of clomipramine on hippocampus-dependent learning in an animal model of obsessive-compulsive disorder induced by sensitization with D2/D3 agonist quinpirole**  
Hatalova H., Radostova D., Pistikova A., Vales K., Stuchlik A.: Behavioural brain research 317 (2017; IF = 3,173)
- 2016 **Validity of quinpirole sensitization rat model of OCD: Linking evidence from animal and clinical studies**  
Stuchlik A., Radostova D., Hatalova H., Vales K., Nekovarova T., Koprivova J., Horacek J.: Frontiers in behavioral neuroscience 10 (2016; IF = 3,104)
- 2014 **Spatial reversal learning in chronically sensitized rats and in undrugged sensitized rats with dopamine D2-like receptor agonist quinpirole**  
Hatalova H., Radostova D., Pistikova A., Vales K., Stuchlik A., Frontiers in behavioral neuroscience 8 (2014; IF = 3,27)

## 11 PŘÍLOHY