

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



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

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

Dominika Radostová

Praha, 2023

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Neurovědy na oddělení Neurofyziologie paměti Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky.

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

Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 14200 Praha 4

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Neurovědy dne v od hod.
Předsedou komise pro obhajobu dizertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu: prof. MUDr. Jan Laczó, PhD., Neurologická klinika 2. LF UK, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR č. 21-16667K, č. 20-00939S a č. 14-03627S, grantového projektu excelence GAČR č. P304/12/6069, GAUK č. 750214 a za institucionální podpory Fyziologického ústavu AVČR RVO č. 67985823 a projektu AVČR č. M200111204.

S dizertační prací je možno se seznámit na Oddělení PhD. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

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,

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD.....	7
1.1. Epizodická paměť.....	8
1.1.1. Epizodická paměť u zvířat.....	8
1.1.2. Animální modely paměti podobné epizodické u zvířat.....	9
1.2. Hipokampus.....	10
1.2.1. Funkce hipokampu.....	10
1.2.2. Neurogeneze v dospělém mozku.....	12
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	13
3. METODIKA.....	14
3.1. Zvířata.....	14
3.2. Behaviorální aparatury.....	14
3.2.1. Jednorázová úloha párovacího učení s prodlevou (OTTER).....	14
3.2.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu na kolotočovém bludišti.....	15
3.3. Medikace zvířat.....	15
3.4. Histologie.....	16
3.4.1. Detekce genu časné exprese Arc.....	16
3.4.2. Imunohistochemie.....	16
3.5. Analýza dat a celková statistika.....	17
3.6. Vizualizace výsledných dat.....	17
4. VÝSLEDKY.....	18
4.1. Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER.....	18
4.2. Aktivita hipokampu během OTTER.....	19
4.3. Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu.....	20
4.3.1. Behaviorální výsledky v úloze AAPA.....	20
4.3.2. Korelace chování a neurogeneze v dospělosti.....	21
4.4. Vliv hypertenze na adultní neurogenezi.....	21
5. DISKUZE.....	23
5.1. Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER.....	23
5.2. Aktivita hipokampu během OTTER.....	24
5.3. Role adultní neurogeneze u potkana v úloze závislé na hipokampu.....	25
5.4. Vliv hypertenze na adultní neurogenezi.....	27
6. ZÁVĚR.....	28
7. SOUHRN.....	29
8. SUMMARY.....	30
9. LITERATURA.....	31
10. PUBLIKACE.....	3838

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. 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. 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.

Postupně se hromadí důkazy o tom, že podobný paměťový systém mají také jiní živočichové, kteří si jsou také často schopni pamatovat detaily o tom, co, kde a kdy se něco stalo (Clayton & Dickinson, 1998). Modelovat přirozené prostředí zvířat a realistické situace, které by byly zároveň dostatečně kontrolovatelné a které by bylo možné využít pro výzkum, je složité. 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.

Nejdůležitější 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), které by mohly hrát roli právě v kódování prostorových vzpomínek (Gu et al., 2012; Martinez-Canabal et al., 2013). 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. Koncepčně složitější epizodické vzpomínky uchovávají unikátní události včetně kontextu, ve kterém se staly (Baddeley, 2001). Zásadními charakteristikami epizodické paměti člověka 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. autooetické vědomí, tedy uvědomění si sebe v minulé události během vzpomínání. Zkoumání takových detailních aspektů paměti je úzce spojeno s lidskou schopností verbálního vyjadřování, která nelze využít u animálních modelů.

1.1.1. Epizodická paměť u zvířat

Protože specifické vlastnosti epizodické paměti jsou 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 nepřístupné, můžeme sledovat alespoň behaviorální projevy vybavení si vzpomínky. Clayton s kolegy (2003) přišla s behaviorálními kritérii pro hodnocení paměti zvířat podobné epizodické (episodic-like memory) na základě svých předchozích experimentů se sojkami křovinnými (*Aphelocoma coerulescens*), ve kterých poprvé ukázala, že zvířata takového konceptu podobného epizodické paměti jsou schopna. 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 (Zhou & Crystal, 2009; Fugazza et al., 2016; Hoffman et al., 2009; 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 navržený Claytonovou: ‚paměť‘ podobná epizodické, popřípadě ‚paměť co, kde, kdy‘ (Clayton & Dickinson, 1998).

1.1.2. Animální modely paměti podobné epizodické u zvířat

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. 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 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).

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).

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.

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. Hipokampus a s ním 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. Funkce hipokampu

Hipokampus je spojován s mnoha funkcemi. 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 důležitý pro prostorovou navigaci a naše vnímání okolního prostředí (O'keefe et al., 1975) nebo pro tzv. kognitivní flexibilitu (Rubin et al., 2014; Xiong et al., 2019).

1.2.1.1. *Role hipokampu ve zpracování paměti*

Zřejmě nejvíce zkoumanou funkcí hipokampu je právě jeho role v paměti. Chronicky známý případ Henryho Molaisona (známého jako pacient H.M.) nebyl jediným takovým případem, kdy se strukturální poškození hipokampu u pacienta projevilo především poškozením paměti (Dickerson & Eichenbaum, 2010; Scoville & Milner, 1957). 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.

1.2.1.2. 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, které by měly sloužit jako mentální reprezentace okolního prostředí (Tolman, 1948). Následně byl učiněn převratný objev 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), a svojí aktivitou reagují pouze na navštívení specifického místa prostředí zvířete (O'Keefe, 1976; O'Keefe et al., 1975). Spojení těchto poznatků s dřívější představou E.C. Tolmana dala vzniknout velmi důležité souhrnné práci O'Keefe a Nadel, 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).

1.2.1.3. 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). 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).

1.2.2. Neurogeneze v dospělém mozku

První zmínky o možné adultní neurogenezi u potkanů, tedy kontinuálního vývoje nových neuronů v dospělosti, se objevily v sedmdesátých letech. Molekuly značeného [³H]-tymidinu se inkorporují 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 (Cayre et al., 2007; Font et al., 2001; Goldman & Nottebohm, 1983; Gould et al., 1999).

Neurogenezi během dospělosti pozorujeme především v oblasti subventrikulární zóny (SVZ) laterálních komor a subgranulární zóny (SGZ) hipokampálního gyru dentatu (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). 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).

Nově maturující neurony ze subgranulární zóny migrují do sousední granulární vrstvy a zůstávají uložené 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). 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).

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. METODIKA

3.1. Zvířata

Pro všechny experimenty byli použiti samci potkanů kmene Wistar (n = 49, ENVIGO), Long Evans (n = 78, místní chov FGU), Sprague Dawley (n = 70, ENVIGO), Spontánně hypertenzní potkani (n = 41, místní chov FGU) nebo potkani kmene Dahl (n = 40, místní chov FGU). 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. Behaviorální aparatury

3.2.1. Jednorázová úloha párovacího učení s prodlevou (OTTER)

Nová behaviorální úloha OTTER byla vyvinuta za použití odhlučněného 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). 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 (cca 3 lx, tmavý kompartment) a naopak druhá část je průhledná a dodatečně osvětlená (cca 1090 lx, světlý kompartment).

První čtyři dny experimentu probíhala fáze tzv. habituace. Zvířata byla vkládána do tmavého kompartmentu střídavě vždy každý den do jiného boxu (střídavě 2x kontext A a 2x kontext B). Pátý den experimentu během tzv. párovacího sezení, kdy byl experimentátorem 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. Následujícího šestého dne

experimentu nastalo pro zvířata samotné testovací sezení, při němž se ověřilo, jak si zvířata dokázala asociovat oba časově oddělené stimuly.

3.2.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu na kolotočovém bludišti

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. Aréna pomalu rotuje rychlostí přibližně 1 otáčky/min ve směru otáčení hodinových ručiček. Softwarově je na aréně definován sektor o velikosti 60° výseče kruhu, který zůstává vzhledem k místnosti stabilní a neotáčí se společně s arénou. Vstup do sektoru je trestán mírnou elektrickou rankou do tlapek potkana (200-600 μ A, 50 Hz).

První den úlohy AAPA je pro zvíře habituačním sezením, které trvá 20 minut a během sezení není v bludišti vymezen sektor pro vyhýbání. 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 přeúčovací (REV1 – REV4). Rozdílem oproti předchozí akviziční fázi učení je změna umístění sektoru pro vyhýbání o 180°.

3.3. Medikace zvířat

Pro inhibici adultní neurogeneze byl vybrán temozolomid (TMZ, Temodal® 20 mg, Schering Plough, Německo), který byl po rozpuštění aplikován zvířatům intragastrickou sondou chronicky po dobu 4 týdnů.

Pro snížení krevního tlaku u spontánně hypertenzních potkanů kmene SHR byl zvířatům podáván antihypertenzní kaptopril (500 mg/l pitné vody po dobu 6 týdnů). Oproti tomu krevní tlak potkanů kmene Dahl byl ovlivňován speciální stravou bohatou na sůl (4 % NaCl, Altromin C 1036) nebo dietou s nízkým obsahem soli (0,04 % NaCl, Altromin 1324) podávanou zvířatům rovněž po dobu 6 týdnů. Po šesti týdnech léčby byl u všech potkanů v thiopentalové anestezii (50

mg/kg) měřen průměrný arteriální krevní tlak (MAP) ve femorální tepně zvířete pomocí měřicího zařízení MLT0380/D tlakového převodníku a QUAD Bridge a PowerLab/8SP (AD Instruments Ltd., Austrálie).

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).

3.4. Histologie

3.4.1. Detekce genu časně exprese Arc

Ihned po ukončení testovací fáze nové behaviorální úlohy OTTER byla zvířata předávkována koncentrovanými parami isofluranu a ihned dekapitována. Každý mozek byl vyjmut a zamražen v isopentanové lázni a později krájen na 20 µm tenké řezy (Leica CM 1850, Německo). Po fixaci vzorků byla intrajaderně uložená Arc mRNA hybridizována (přes noc, 56 °C) s připravenými antisense ribopróbami značenými digoxigeninem. Poté vázané ribopróby v jádrech detekovány pomocí antidigoxigeninové protilátky (Anti-Dig-POD, 1:300, Roche) asociované s křenovou peroxidázou (HRP). Signál protilátky byl pro lepší vizualizaci dodatečně zesílen použitím tyramidového amplifikačního systému (TSA-Cy3, Perkin-Elmer).

3.4.2. Imunohistochemie

Zvířata léčená pomocí TMZ a BrdU byla po testování v úloze na kolotočovém bludišti předávkována směsí ketamin/xylazin (50 mg/kg) a následně transkardiálně perfundována roztokem 4% paraformaldehydu. Následně vyjmuté mozky byly ještě dalších 24 hod dodatečně fixovány v PFA a postupně máčeny v 10%, 20% a 30% roztoku sacharózy pro kryoprotekce buněk. Po zamražení byly mozky koronálně krájeny na řezy o šířce 40 µm pomocí kryostatu (Leica 1850, Německo).

Pro detekci BrdU pozitivních buněk (BrdU+) buněk byla po omytí u řezů nejprve deaktivována aktivita endogenních peroxidáz. DNA byla 30 minut denaturována 2,5N HCl při 37 °C. Řezy byly inkubovány s primární anti-BrdU protilátkou (1:500; klon BU1/75, Serotec OBT0030) přes dvě noci při 4 °C a po

oplachu se sekundární biotinylovanou IgG protilátkou (donkey anti-rat antibody, 1:500, Jackson/Dianova, 712-065-153). Dále byly inkubovány v roztoku avidin/biotinového komplexu s konjugovanou křenovou peroxidázou (ABC elite kit standard, PK6100, Vector Laboratories). Nakonec byl použit diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich, D5905) jako substrát křenové peroxidázy (0,25 mg/ml DAB v PBS s 0,01 % H₂O₂ a 0,04 % NiCl₂). Podobně byla použita 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) pro vizualizaci doublecortin pozitivních buněk.

3.5. Analýza dat a celková statistika

Videozáznamy ze všech behaviorálních experimentů byly analyzovány za pomoci softwaru BORIS (verze 6.3.8.; Friard & Gamba, 2016). Behaviorální data z úlohy AAPA byla analyzována pomocí softwaru Carousel Maze Manager (Bahnik, 2013) a softwaru Tracker (Track Analysis, Biosignal Group, USA).

Pro statistickou analýzu všech získaných dat byl použit software IBM SPSS Statistics (verze 23.0 a novější, IBM Corp., 2017). Pokud získaná data nesplňovala parametrické předpoklady byla dále analyzována neparametrickými testy 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 $p = 0.05$.

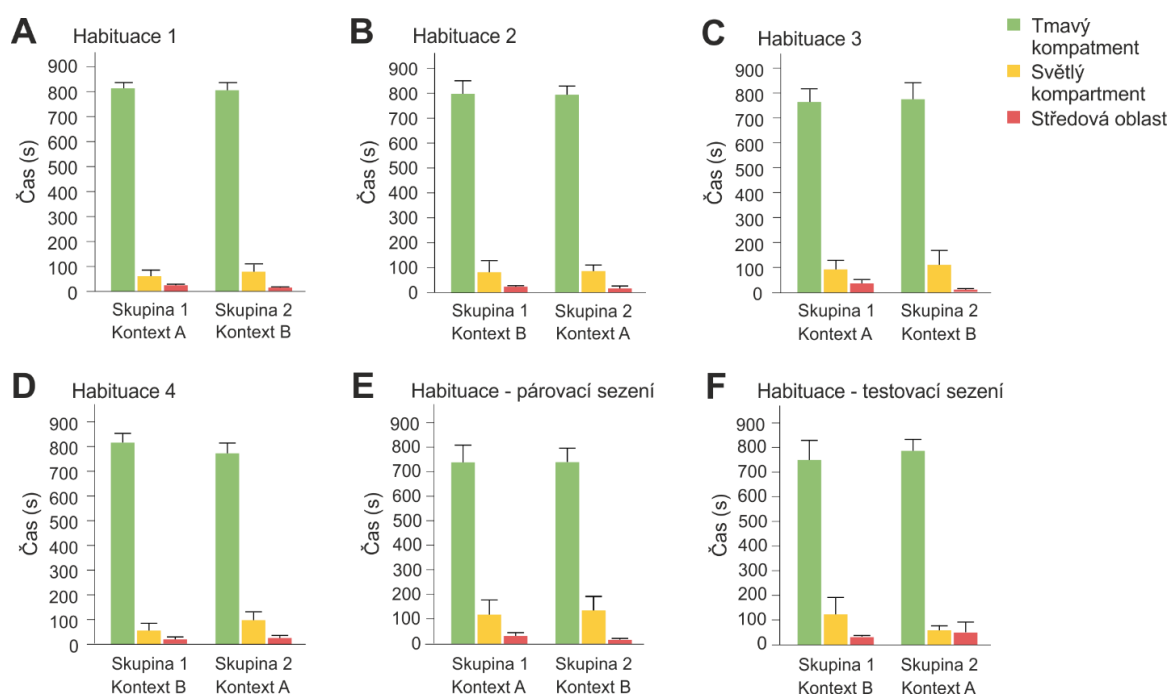
3.6. Vizualizace výsledných dat

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. Vývoj nové behaviorální úlohy OTTER

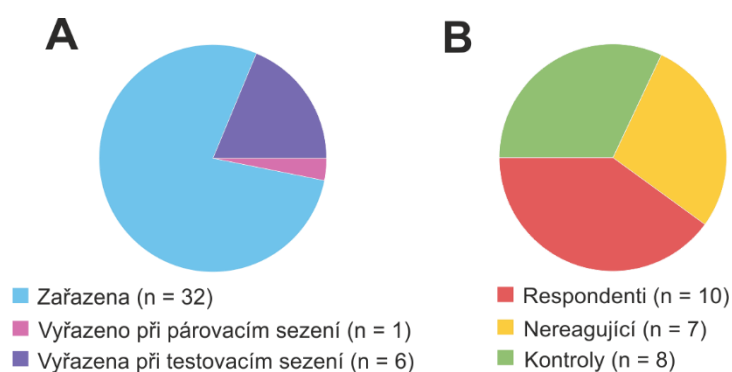
Během 15minutových habituačních sezení preferovala zvířata tmavý kompartment jak v kontextu A, tak v kontextu B. Grafické znázornění jednoznačné preference zvířat tmavého kompartmentu aparatury bez rozdílu mezi oběma kontexty prostředí zobrazuje Graf 1.



Graf 1 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.

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. Zastoupení zvířat v jednotlivých skupinách experimentu je zobrazen v Grafu 2. 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.

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. Zastoupení zvířat v jednotlivých skupinách experimentu je zobrazen v Grafu 2. 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)).

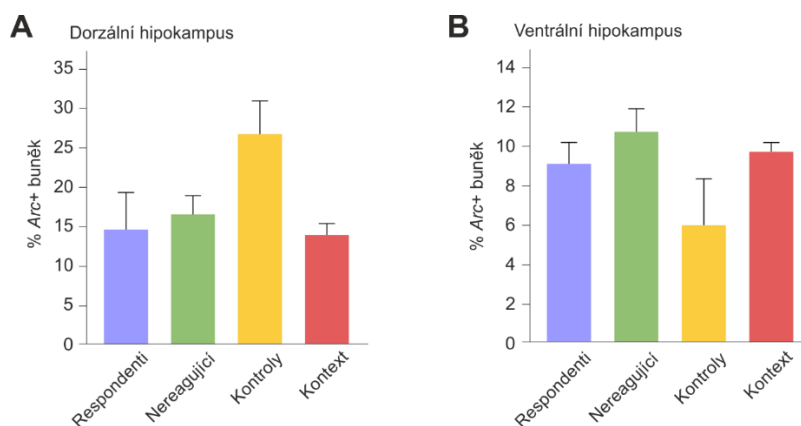


Graf 2 Zastoupení jednotlivých skupin zvířat v experimentu testování finálního protokolu úlohy OTTER. (A) Rozložení celkového počtu zvířat zařazených do experimentu ($n = 32$) a zvířat vyřazených během párovacího sezení ($n = 1$) nebo během testovacího sezení ($n = 6$). (B) Poměrové rozložení zvířat 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. Aktivita hipokampu během OTTER

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 3). 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 3 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. Role adultní neurogenese u potkana v úloze závislé na hipokampu

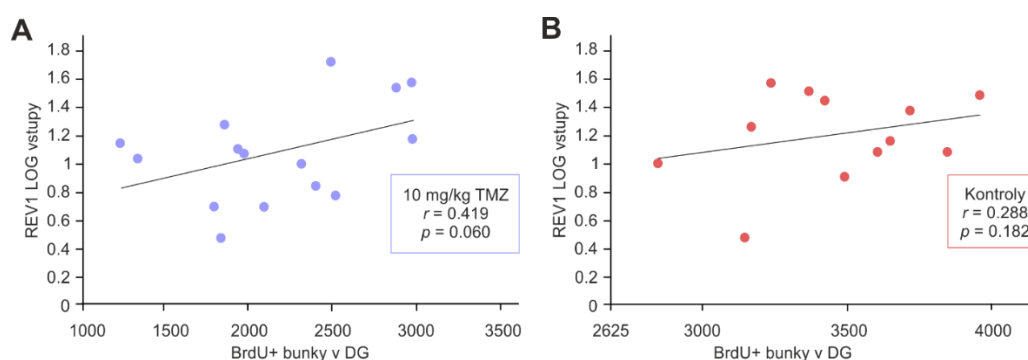
4.3.1. Behaviorální výsledky v úloze AAPA

Během průběhu akvizice bylo zaznamenáno celkové zlepšování výkonu zvířat [$F(4,148) = 33,887, p < 0,001$], ale mezi testovanými skupinami zvířat nebyl nalezen rozdíl [$F(1,37) = 0,028, p = 0,869$]. Během následného přeučování docházelo k postupnému zlepšování [$F(4,156) = 13,333, p < 0,001$]. 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 [$F(1,39) = 0,272, p = 0,605$].

4.3.2. 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 27 zvířat (15 zvířat léčených TMZ 10 mg/kg, 12 kontrolních zvířat) korelován s počtem chyb (vstupů do zakázaného sektoru) během REV1 a i když 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 4 Bodový graf korelace počtu BrdU+ buněk s logaritmičsky 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. Vliv hypertenze na adultní neurogenezi

V prvních experimentech byl MAP analyzován u 13 kaptoprilem léčených a 12 kontrolních SHR potkanů. Pomocí t-testu nezávislých vzorků byl nalezen významně nižší MAP u léčených zvířat [$t(23) = 10,200, p < 0,001$]. Pro analýzu počtu BrdU+ buněk byla použita data od 17 zvířat léčených kaptoprilem a 19 kontrolních zvířat, mezi nimiž nezávislý výběrový t-test neprokázal rozdíly [$t(34) = -1,298, p = 0,203$].

V druhém experimentu bylo použito 13 zvířat Dahl SS a 15 zvířat Dahl SR, u kterých byl měřen MAP. Získaná data byla analyzována pomocí dvoucestného ANOVA testu. 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 [$F(1,24) = 3,276, p = 0,083$].

Analýza MAP dle podávané diety u kmenů SS a SR ukázala signifikantní zvýšení MAP u Dahl SS 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 [$F(1,23) = 0,048, p = 0,829$].

5. DISKUZE

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. 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).

Ve shodě s prvotními experimenty, zvířata podstupující 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.

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 útečková 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

Dosud nepublikovaná data ukázala 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, které podporují důležitost této v časové vazbě v úlohách *trace conditioningu* (Czerniawski, 2008; Rogers et al., 2006)

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

Role adultní neurogeneze v řešení behaviorální úlohy aktivního vyhýbání se místu byla testována na Kolotočovém bludišti. Hlavně závěrečná fáze úlohy, tzv. přeúčování zvířete na novou polohu sektoru, 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 přeúčování (Burghardt et al., 2012) jsou závislé na správné fyziologické funkci hipokampu.

Pro potřeby experimentů byla adultní neurogeneze blokována podáváním temozolomidu v dávce 25 mg/kg. Toto dávkování se projevovalo vyšší inhibicí neurogeneze za poměrně nízkých vedlejších účinků. Během behaviorálního testování AAPA byl prokázáno lepší přeúčování potkanů se zablokovanou 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 zablokování adultní neurogeneze 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 neurogeneze 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 dozrávajících 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 neurogeneze může zlepšovat generalizaci, zatímco velmi silná neurogeneze může mít pozitivní vliv na diskriminaci podobných stimulů (Hersman et al., 2016). Což je v souladu s našimi poznatky, že snížení neurogeneze 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 separace podobných vzorců, by bylo pomocí AAPA na Kolotočovém bludišti obtížné. Kromě toho s rostoucí vzdáleností mezi objekty schopnost jejich diskriminace závislé na adultní neurogenezi rychle klesá (Clelland et al., 2009; Morris et al., 2012).

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.

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

5.4. Vliv hypertenze na adultní neurogenezi

Pro výzkum hypertenze je dostupný větší počet animálních modelů, a nezdá se, že jsou mezi sebou porovnávány dva odlišné kmene zvířat. 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. I když dřívější studie ukázaly, hypertenze může mít ale vliv i na adultní neurogenezi (Hwang et al., 2008; Pietranera et al., 2010). Rozdílnost poznatků mezi jednotlivými studiemi může být z velké části dána mnoha odchylkami v designech nebo metodách jednotlivých studií. Mohou se ale objevit rozdíly také například ve věku zvířat nebo ve způsobu jejich léčby.

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

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. Úloha OTTER je určena pro testování jednorázového učení se zaměřením na asociaci dvou časově blízkým ale přesto oddělených stimulů. 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.

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 podmiňovacích úloh.

Dalším cílem práce bylo objasnění role adultní neurogenese v kognitivní flexibilitě pomocí úlohy aktivního vyhýbání se místu na kolotočovém bludišti. Neurogenese byla u dospělých zvířat blokována cytostatickým temozolomidem a na rozdíl od předchozího výzkumu vykazovala zvířata se sníženou neurogenézí lepší schopnost přeučování. Poslední zkoumanou otázkou v této práci byl možný vliv hypertenze na neurogenезi dospělých zvířat u dvou různých animálních modelů. Výsledky ukázaly, že hypertenze neovlivnila míru neurogenese, což je v kontrastu s některými dřívějšími nálezy.

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

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. The OTTER task is designed to test one-trial learning, focusing on the association of two temporally close but still separate stimuli. 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 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. 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.

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. 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).
2. Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135.
3. 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.
4. Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6).
5. 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.
6. 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).
7. Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2006). Episodic-like memory in the rat. *Current Biology*, 16(13).
8. Baddeley, A. (2001). The concept of episodic memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1413).
9. Bahník, S. (2013). *Carousel Maze Manager (Version 0.3.5)*. Available at: https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_3_5.
10. 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).
11. Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., & Fenton, A. A. (2012). Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22(9).
12. 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).
13. 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.
14. 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).
 15. Clayton, N. S., Bussey, T. J., & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews*, 4.
 16. Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 395.
 17. 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).
 18. Czerniawski, J. L. (2008). Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus*, 19(1).
 19. 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).
 20. 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).
 21. Dickerson, B. C., & Eichenbaum, H. (2010). The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35(1).
 22. 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).
 23. 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).
 24. 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).
 25. 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).

26. 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).
27. Fortin, N. J., Wright, S. P., & Eichenbaum, H. (2004). Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, 431(7005).
28. 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).
29. Fugazza, C., Pogány, Á., & Miklósi, Á. (2016). Recall of Others' Actions after incidental encoding reveals episodic-like memory in dogs. *Current Biology*, 26(23).
30. 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).
31. Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE*, 4(5).
32. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning Enhances Adult Neurogenesis in the Hippocampal Formation. *Nature*, 2(3).
33. Griffiths, D. P., & Clayton, N. S. (2001). Testing episodic memory in animals: A new approach. *Physiology and Behavior*, 73.
34. 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).
35. 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.
36. 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.
37. 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).
38. 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).
39. Jeffery, K., & O'Keefe, J. (1998). Worm holes and avian space-time. *Nature*, 395.
40. 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).
41. Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). New nerve cells for the adult brain. *Scientific American, Inc.*
42. Khamsi, R. (2022). A Fragrance to remember. *Nature*, 606.
43. 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).
44. 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).
45. Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2009). *Fundamentals of human neuropsychology*. Worth Publishers.
46. Kubik, S., Stuchlik, A., & Fenton, A. A. (2006). Evidence for hippocampal role in place avoidance other than merely memory storage. *Physiological Research*, 55(4).
47. 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).
48. Leuner, B., Gould, E., & Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16(3).
49. Lövblad, K. O., Schaller, K., & Isabel Vargas, M. (2014). The fornix and limbic system. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 35(5).
50. 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).
51. 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).
52. 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).

53. 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).
54. Moscovitch, M., Cabeza, R., Winocur, G., & Nadel, L. (2016). Episodic memory and beyond: The hippocampus and neocortex in transformation. *Annual Review of Psychology*, 67.
55. 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.
56. O'Keefe, J. (1976). Place Units in the Hippocampus of the Freely Moving Rat. *Experimental Neurology*, 51.
57. O'Keefe, J., & Dostrovsky. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*, 34.
58. O'Keefe, J., Nadel, L., Keightley, S., & Kill, D. (1975). Fornix lesions selectively abolish place learning in the rat. *Experimental Neurology*, 48.
59. O'Keefe, John., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press.
60. Payne, H. L., Lynch, G. F., & Aronov, D. (2020). Precise spatial representations in the hippocampus of a food-caching bird. *BioRxiv*, 2020(11).
61. Phelps, E. A., & Anderson, A. K. (1997). Emotional memory: What does the amygdala do? *Current Biology*, 7.
62. 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).
63. 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.
64. 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).
65. 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).

66. 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.
67. Rugg, M. D., & King, D. R. (2018). Ventral lateral parietal cortex and episodic memory retrieval. *Cortex*, 107.
68. 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).
69. Schmidt-Hieber, C., Jones, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988).
70. Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1).
71. Soltesz, I., & Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 21(4).
72. Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2).
73. 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).
74. 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).
75. 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).
76. 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).
77. Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, 55.

78. 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).
79. 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.
80. 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).
81. Tulving, E. (1985). *Elements of Episodic Memory*. Oxford University Press.
82. Tulving, E. (2002). EPISODIC MEMORY: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1).
83. Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3).
84. Uchida, N., & Mainen, Z. F. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nature Neuroscience*, 6(11).
85. Venables, W., & Ripley, B. (2002). *Modern applied statistics with S*. Springer.
86. Waddell, J., & Shors, T. J. (2008). Neurogenesis, learning and associative strength. *European Journal of Neuroscience*, 27(11).
87. Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (<https://ggplot2.tidyverse.org/>). Springer-Verlag New York.
88. 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).
89. 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.
90. 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).
91. Zhou, W., & Crystal, J. D. (2009). Evidence for remembering when events occurred in a rodent model of episodic memory. *PNAS*, 106(23).
92. Zhou, W., Hohmann, A. G., & Crystal, J. D. (2012). Rats answer an unexpected question after incidental encoding. *Current Biology*, 22(12).

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)