

2007

LENKA ŘEHÁKOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ NEUROBIOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**MODULACE LOKOMOČNÍ AKTIVITY A
PROSTOROVÉHO CHOVÁNÍ POMOCÍ ANTAGONISTŮ
D1-LIKE A D2-LIKE RECEPTORŮ**

PRAHA, 2007

Autorka: **Lenka Řeháková**
Vedoucí práce: RNDr. Aleš Stuchlík, Ph.D. z Fyziologického ústavu AV
ČR
Garant na fakultě: RNDr. Jan Moravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem následující diplomovou práci na téma „Modulace lokomoční aktivity a prostorového chování pomocí antagonistů D1-like a D2-like receptorů“ vypracovala samostatně.

Její experimentální část byla vypracována v Laboratoři neurofyzologie paměti ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky a použité citace jsou uvedeny i s příslušnými prameny.

V Praze dne 23.4. 2007

.....

podpis diplomantky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Dr. Aleši Stuchlíkovi za řadu cenných rad, které mi ochotně poskytoval jak při laboratorní práci, tak při práci s počítačem. Poděkování patří rovněž celému kolektivu Laboratoře neurofyziologie paměti za vědecké zázemí.

Oponentka diplomové práce:

Doc. MUDr. Romana Šlamberová, Ph.D.

Ústav normální, patologické a klinické fyziologie

3. lékařská fakulta UK

Ke Karlovu 4

120 00 Praha 2

Modulace lokomoční aktivity a prostorového chování pomocí antagonistů D1-like a D2-like receptorů

Anotace

Dopaminergní receptorový systém ovlivňuje lokomoční a prostorové chování. Předkládaná práce shrnuje dosavadní poznatky o dopaminergní modulaci těchto typů chování a ukazuje, jak se aplikace antagonistů D1-like receptorů (látky SCH23390) a D2-like receptorů (sulpiridu) projeví na pohybové aktivitě a prostorovém chování laboratorních potkanů.

Modulation of locomotor activity and spatial behavior by D1-like and D2-like receptor antagonists

Annotation

Dopamine receptor system is thought to influence locomotor and spatial behavior. The present study will summarize contemporary knowledge of such a modulation and it will show how the administration of D1-like receptor antagonist SCH23390 and D2-like receptor antagonist sulpiride influences locomotor activity and spatial behavior in rats.

Abstrakt

Dopamin je jedním z neuropřenašečů savčího mozku, který hraje důležitou úlohou v mnoha funkcích centrální nervové soustavy. Podílí se na řízení motorických funkcí, na procesech motivace a odměny, a zároveň se účastní kognitivních funkcí. Porucha dopaminergního systému hraje patrně roli v patofyziologii mnoha typů onemocnění mozku, např. schizofrenie, extrapyramidových onemocnění a závislostních poruch.

Výzkum chování a zvláště prostorové orientace patří k obecně používaným metodickým přístupům ke studiu projevů nervové soustavy a celého organismu a některé druhy prostorového chování jsou mnoha autory pokládány za model vyšších nervových funkcí člověka.

V předkládané diplomové práci jsem se zaměřila na testování vlivu systémové blokády dopaminových D1-like a D2-like receptorů pomocí specifických antagonistů na chování potkanů v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu (AAPA) a při hledání skrytého cíle v Morrisově vodním bludišti (MWM).

Antagonisté dopaminových receptorů (D1-like antagonist SCH23390 a D2-like antagonist sulpirid) byly podávány před behaviorálním testováním, následně bylo analyzováno chování zvířat ve zmíněných úlohách.

Výsledky ukázaly, že antagonisté dopaminových receptorů způsobily změny chování a lokomoce, které se lišily podle typu úlohy a rovněž podle toho, zda se jednalo o D1-like nebo D2-like antagonistu.

Látka SCH23390 v úloze AAPA zhoršila prostorovou orientaci v obou dávkách (0,02 a 0,05 mg/kg), zatímco v MWM vyšší dávka postihla procedurální aspekt úlohy a nižší nepostihla ani procedurální, ani kognitivní funkce. Sulpirid v úloze AAPA způsobil snížení lokomoce a zhoršení prostorové orientace, a to až v nejvyšší dávce, která rovněž poškozovala kognitivní funkce v MWM. Žádná ze studovaných dávek sulpiridu nezpůsobila v MWM deficit (sensorimotorický či motivační) v procedurálním aspektu úlohy.

Výsledky této diplomové práce naznačují, že oba dopaminové receptorové podsystemy se podílejí na regulaci lokomoce a prostorového chování v obou těchto úlohách, přičemž v této modulaci existují odlišnosti v závislosti na typu úlohy a na podtypu receptorů. Dosažené výsledky mohou být východiskem pro další studium role dopaminového neuropřenašečového systému v prostorové kognici za použití lokálních mikroaplikací příslušných receptorových ligandů do vybraných mozkových struktur a okruhů.

Seznam zkratek

AA	arachidonová kyselina
AAPA	aktivní allothetické vyhýbání se místu
AC	adenylylcykláza
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionová kyselina
AP5	kompetitivní antagonist NMDA receptorů
CA	cornu ammoni
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DA	dopamin
D-R	dopaminový receptor
D1-D5	typy dopaminových receptorů
D1-like	podskupina dopaminových receptorů
D2-like	podskupina dopaminových receptorů
GABA	γ -aminobutyrová kyselina
GTP	guanosintrifosfát
LTP	long-term potentiation, dlouhodobá potenciace
MK-801	dizocilpin
MWM	Morrisovo vodní bludiště
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PFC	prefrontální kortex
SCH23390	((R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochlorid)

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. Kognitivní mapy.....	11
2.2. Allothetická a idiothetická navigace.....	11
2.3. Mimoarérové versus nitroarérové orientační body.....	13
2.4. Experimentální úlohy využití ke studiu prostorové navigace.....	13
2.4.1. Morrisovo vodní bludiště (MWM).....	14
2.4.1.1. Faktory uplatňující se při učení v Morrisově vodním bludišti.....	15
2.4.1.1.1. Rozdíly v pohlaví a učení v Morrisově vodním bludišti.....	15
2.4.1.1.2. Mezdruhové a mezikmenové rozdíly v učení v MWM.....	16
2.4.1.1.3. Vliv věku zvířat na učení v MWM.....	17
2.4.1.1.4. Nutrice a MWM.....	17
2.4.1.1.5. Stres a infekce.....	18
2.4.1.2. Mozkové oblasti podílející se na učení v MWM.....	19
2.4.1.2.1. Hipokampus.....	20
2.4.1.2.2. Hipokampální dlouhodobá potenciace (<i>long-term potentiation</i> - LTP).....	21
2.4.1.2.3. Striatum.....	22
2.4.1.2.4. Mozeček.....	23
2.4.1.2.5. Neokortex.....	23
2.4.1.3. Neurofarmakologie prostorového učení v Morrisově vodním bludišti.....	24
2.4.1.3.1. Excitační aminokyseliny.....	25
2.4.1.3.2. Inhibiční aminokyseliny.....	26
2.4.1.3.3. Acetylcholin a biogenní aminy.....	26
2.4.1.3.4. Neuropeptidy.....	27
2.4.1.3.5. Napětově ovládané iontové kanály.....	28
2.4.2. Úloha vyhýbání se místu.....	28
2.4.2.1. Faktory uplatňující se při učení úlohy aktivního vyhýbání se místu.....	29
2.4.2.1.1. Pohlaví zvířat a fáze estrálního cyklu u samic.....	29
2.4.2.1.2. Úloha hipokampu a vliv hipokampální inaktivace.....	31
2.4.2.1.3. Systémová blokáda muskarinových acetylcholinových receptorů.....	32
2.4.2.1.4. Blokáda NMDA podtypu glutamátových receptorů.....	32
2.5. Dopaminové neuronální okruhy.....	33
2.5.1. Dopamin – úvod.....	33
2.5.2. Základní dopaminergní dráhy mozku.....	33
2.5.3. Působení dopaminu na neurony a dopaminové receptory.....	34
2.5.4. Signální transdukcční dráhy zprostředkující působení dopaminu.....	35
2.5.4.1. Adenylcykláza.....	35
2.5.4.2. Vápníkové a draslíkové kanály.....	36
2.5.4.3. Arachidonová kyselina.....	36
3. FORMULACE EXPERIMENTÁLNÍCH OTÁZEK	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ METODY	38
4.1. Zvířata.....	38
4.2. Použité chemické látky.....	38
4.3. Pokusná zařízení.....	39
4.3.1. Aktivní allothetické vyhýbání se místu (AAPA).....	39
4.3.2. Morrisovo vodní bludiště (MWM).....	41
4.4. Trénink a behaviorální testování zvířat.....	42
4.4.1. Testování v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu.....	42
4.4.2. Testování v Morrisově vodním bludišti.....	43
4.5. Experimentální a kontrolní skupiny.....	43
4.6. Měřené parametry.....	43
4.7. Statistika.....	44
5. VÝSLEDKY	45

5.1. Srovnání lokomoce v AAPA u kontrolních skupin.....	45
5.2. Srovnání počtu vstupů do zakázané oblasti u kontrolních skupin.....	46
5.3. Vliv SCH23390 na učení (<i>acquisition</i>) v úloze AAPA.....	47
5.3.1. Vliv SCH23390 na lokomoci.....	47
5.3.2. Vliv SCH23390 na počet vstupů do zakázané oblasti.....	48
5.3.3. Vliv SCH23390 na maximální čas vyhýbání.....	49
5.4. Vliv sulpiridu na učení v úloze AAPA.....	50
5.4.1. Vliv sulpiridu na lokomoci	50
5.4.2. Vliv sulpiridu na počet vstupů do zakázaného sektoru.....	51
5.4.3. Vliv sulpiridu na maximální čas vyhýbání.....	52
5.5. Srovnání latencí nalezení viditelného ostrůvku v MWM u kontrolních skupin.....	53
5.6. Vliv SCH23390 na učení v Morrisově vodním bludišti s viditelným ostrůvkem – testu senzorimotorického a motivačního poškození.....	54
5.7. Vliv sulpiridu na učení v Morrisově vodním bludišti s viditelným ostrůvkem – testu senzorimotorického či motivačního poškození.....	55
5.8. Test viditelné platformy v MWM, test sensorimotorického a motivačního deficitu –poznámka.....	56
5.9. Vliv SCH23390 na učení v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem – testu prostorové kognice.....	57
5.10. Vliv sulpiridu na učení v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem – testu prostorové kognice.....	58
6. DISKUZE	59
6.1. Vliv blokády D1 receptorů látkou SCH23390 na lokomoci a prostorové chování v úloze AAPA a v Morrisově vodním bludišti.....	59
6.2. Blokáda D2 receptorů sulpiridem a její vliv na lokomoci a prostorovou orientaci v úloze AAPA a na učení v Morrisově vodním bludišti.....	62
7. ZÁVĚR	65
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66

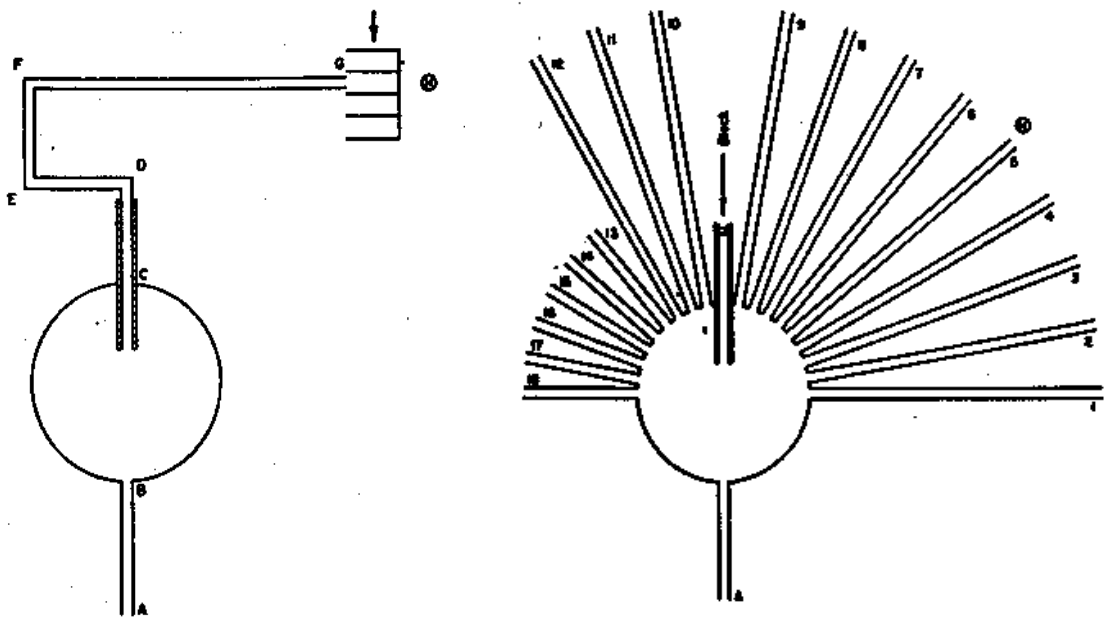
1. ÚVOD

Veškeré živočišné organismy s výjimkou přisedlých čelí ve svém životě nutnosti orientovat se ve svém prostředí, ať už za účelem získání potravy, vyhnout se predátorům, apod. Proto není překvapující, že se schopnost orientovat se v prostoru vyvinula jak u fylogeneticky pokročilejších, tak u relativně „primitivních“ organismů. Nalézáme ji u mnoha živočichů, od členovců a hmyzu (včely, pavouci) přes ryby, plazy, až po hlodavce a primáty včetně člověka. Není zde jistě prostor popisovat mechanismy prostorové navigace u jednotlivých živočišných řádů, následující text bude proto zaměřen na schopnost prostorové kognice u hlodavců, především potkanů, kteří jsou hojně využíváni výzkumníky zabývajícími se tímto typem chování, ať už jde o etology, neurofyziology, farmakology nebo elektrofyziology. Schopnost orientovat se v prostoru je považována za model lidských vyšších nervových funkcí. Někteří autoři dokonce považují prostorovou orientaci za ekvivalent lidské deklarativní paměti. Prostorové chování je možno třídit podle různých kritérií. Například podle povahy cíle, vůči kterému se zvíře orientuje. Z tohoto hlediska lze rozeznat navigaci

- i) k přímo perceptibilním cílům, např. viditelným a
- ii) k cílům, které nejsou přímo viditelné a jejichž polohu je možné určit pouze nepřímo. Navigace ke skrytým cílům vyžaduje komplexní kognitivní procesy s určitou mírou abstrakce, která je možná u zvířat překvapující.

Edward C. Tolman (1948) publikoval výsledky svých experimentů, ve kterých byli potkani trénováni dosáhnout přímou trajektorií místa, kde obdrželi odměnu; při následující cestě byla do této trajektorie umístěna přepážka zabráňující přímé cestě. Potkani při následující trajektorii použili tzv. „detour behaviour” - překážce se vyhnuli a obešli ji, což vedlo Tolmana k závěru, že potkani si selektivně vytvářejí kognitivní mapu. První zmínka o existenci kognitivních map anebo informačních registrů obsahujících informace o prostorovém rozvržení prostředí, o vzájemných prostorových vztazích mezi různými orientačními body a vztazích mezi nimi a subjektem se však objevila už

asi o 10 let dříve. Tolmanův koncept kognitivních map byl v rozporu s názorem publikovaným v pracích Hulla, který razil názor, že učení se v bludišti je zajištěné pouhým naučením se odpovídajících reakcí na dané podněty. Sekvence těchto kroků typu podnět-odpověď pak podle Hulla vedla v bludišti zvíře až k cíli. Pozdější pokusy testující obě hypotézy daly nakonec za pravdu Tolmanově konceptu kognitivních map.



Obr. 1. Tolmanovo bludiště. Převzato z Tolman E. C. (1948), *Cognitive maps in rats and men*, *Psychol. Rew.*, 55: 189-208. Obrázek nalevo ukazuje jednoduché bludiště. Potkan měl za úkol běžet z místa A do místa G, kde našel potravu. H značí světlo. Po čtyřech nocích, každou noc se prováděly tři pokusy, ve kterých se potkan naučil bez váhání projít cestu z A do G, bylo toto bludiště vyměněno za paprskovité (obrázek napravo). Potkani byli opět položeni na centrální základnu, odkud měli jít na konec každého z ramen, kde na ně čekala odměna. Optimálním řešením pro potkany bylo navštívit všechna ramena a vyhnout se návratu do již navštíveného ramene.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. KOGNITIVNÍ MAPY

V první polovině minulého století byl Tolman prvním badatelem, který navrhl teorii kognitivní mapy. Podstatou je předpoklad, že si zvíře vytváří v mozku vnitřní reprezentaci okolního prostředí. Ta mu umožňuje vytyčit správný směr na základě povědomí o vzájemných prostorových vztazích mezi okolními objekty, svojí současnou pozicí, pozicí výchozího bodu a pozicí cíle, kterého má dosáhnout, popřípadě se mu vyhýbat. Podstatným přínosem pro teorii kognitivní mapy byl objev tzv. místových neuronů (place cells) v hipokampu. Tyto buňky jsou aktivní pouze tehdy, pokud se zvíře nachází v určitém místě pokusné arény. Významným byl také objev tzv. neuronů směru hlavy (head-direction cells), tj. buněk, jejichž elektrická aktivita se výrazně zvyšuje, pokud je longitudinální osa hlavy natočena určitým směrem; nezávisle na pozici zvířete v aréně. Objev těchto prostorově či směrově specificky aktivních neuronů vedl k hypotéze, že právě mozkové struktury, které tyto buňky obsahují, by mohly být substrátem kognitivní mapy. Aktivita místových neuronů a neuronů směru hlavy byla zprvu sledována pouze u zvířat, která neřešila prostorové úlohy, ale pouze volně explorovala v pokusné aréně. Zinyuk et al. (2000) ukázali, že během úlohy preference místa, tj. pokud je potkan trénován opakovaně navštěvovat určité neoznačené místo definované v souřadnicovém systému místnosti na rotující aréně a následně odměňován potravou (Rossier et al., 2000), si většina místových neuronů zachová konstantní specifická aktivní místa. Zatímco pokud je aréna rotována a zvíře po ní volně exploruje, aktivní místa těchto buněk buď změni svoji polohu, či zcela vymizí.

2.2. ALLOTHETICKÁ A IDIOTHETICKÁ NAVIGACE

Navigace může být principiálně zajišťována dvěma mechanismy: allothetickou (O'Keefe, Nadel, 1978) a idiothetickou (Mittelstaedt, Mittelstaedt, 1980) orientací. Funkce allothetické navigace je založena na pamatování si prostorových vztahů mezi jednotlivými orientačními body v prostředí, zatímco

idiothetická navigace je založena na integraci signálů generovaných vlastním pohybem zvířete, tj. především informací přicházejících z vestibulárního systému a proprioceptorů. Oba tyto systémy jsou na stabilní aréně ve vzájemném souladu. Pokud aréna, na které se zvíře pohybuje, rotuje, informace z obou systémů se dostanou do rozporu. Idiothetickou navigaci lze v podstatě rozdělit na substrátovou a inerciální idiothezi. Na substrátové idiothezi se nepodílí aktivně vestibulární systém registrující možný pasivní pohyb zvířete, zatímco při inerciální idiothezi je pasivní pohyb aktivně kompenzován. Toto tvrzení si lze představit na modelu, kde je zvíře trénováno periodicky přebíhat z jednoho okraje rotující kruhové arény přímou trajektorií na protilehlý okraj. Při substrátové idiothezi bude jeho trajektorie lineární v souřadnicovém systému otáčející se arény, zatímco pro pozorovatele v referenčním rámci místnosti bude zakřivena díky pasivní rotaci arény. Naopak při inerciální idiothezi bude trajektorie zvířete lineární v koordinátovém systému místnosti a zakřivena v koordinátovém rámci arény díky aktivní kompenzaci pasivní rotace. Ve skutečnosti je trajektorie zvířete kompromisem mezi těmito dvěma extrémními případy. Se zvyšující se rychlostí rotace arény postupně stále více převažuje inerciální složka idiothetické orientace nad substrátovou (Mittelstaedt, Glasauer, 1991; Mittelstaedt, Mittelstaedt, 1980). Tento náález naznačuje, že informace přicházející z vestibulárního systému jsou konfrontovány v CNS s eferentními kopiemi motorických příkazů generovanými během aktivního pohybu, důsledkem čehož je zvíře schopno kompenzovat pasivní pohyb.

Bylo prokázáno, že zvíře je schopno se účinně vyhýbat místu na rotující aréně v temnotě definovanému v souřadnicovém systému arény (Bureš et al., 1998). Bylo zjištěno, že idiothetická navigace se stává velmi nepřesnou v závislosti na délce dráhy, kterou zvíře urazí (Gallistel, 1990; Etienne et al., 1996), což je způsobeno kumulujícími se chybami při idiothetickém odhadu pohybu, především během rotací těla zvířete během aktivního pohybu, ale také při odhadu vzdálenosti absolvovaného lineárního segmentu trajektorie (Benhamou et al., 1990).

2.3. MIMOARÉNOVÉ VERSUS NITROARÉNOVÉ ORIENTAČNÍ BODY

Význam orientačních bodů lokalizovaných uvnitř arény pro prostorovou orientaci byl studován od počátku 20. století. A to jak v přirozených, tak v experimentálních podmínkách. Několik studií se zabývalo vnášením umělých čichových stop do experimentálních prostorů, ale jejich výsledky byly často protichůdné. Experimenty s prostorovým chováním u normálních a anosmických potkanů ukázaly, že slepí potkani se stávají kriticky závislími na čichové orientaci. Takové nálezy jsou v souladu s obecnou představou o tom, že nefunkčnost jedné modalit je kompenzována zvýšenou citlivostí ostatních fungujících senzoričeských modalit.

Experimenty Diez-Chamizo et al. (1986) ukázaly, že potkan používá jak nitroarénové tak i mimoarénové orientační body, což je v souladu s představou, že potkani jsou schopni se vyhýbat současně dvěma místům na experimentální aréně. Jednomu bodu definovanému v souřadnicovém systému rotující arény a jednomu zafixovanému v souřadnicovém systému místnosti. Tento nálezy podporuje hypotézu, že potkani mohou používat proximální orientační body vázané na substrát arény a inkorporovat je do své kognitivní mapy prostředí.

Celkově lze říci, že jak mimoarénové, tak nitroarénové orientační body vnímané různými smyslovými modalitami vytvářejí flexibilní a robustní komplex, který může být vázán ke kognitivní mapě a používán velmi pohotově pro efektivní prostorovou orientaci v prostoru podle okamžitých potřeb zvířete.

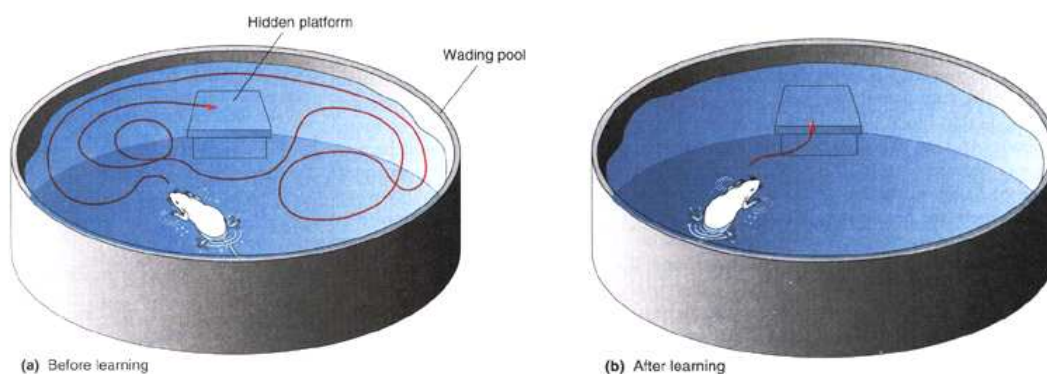
2.4. EXPERIMENTÁLNÍ ÚLOHY VYUŽITÉ KE STUDIU PROSTOROVÉ NAVIGACE

V následujícím textu budou podrobněji popsány prostorové úlohy, které byly využity při této práci, tedy Morrisovo vodní bludiště (MWM) a úloha aktivního allothetickeho vyhýbání se místu (AAPA). Zdůrazněny budou faktory, které se zdají být důležitými při hodnocení výsledků z těchto experimentálních úloh, přičemž objemově větší část zabírá přehled výsledků z Morrisova vodního bludiště, které je velmi dobře prozkoumanou prostorovou úlohou. Oproti tomu popis faktorů uplatňujících se v úloze vyhýbání se místu bude stručnější, a to

vzhledem k omezeným dostupným datům týkajících se této úlohy, která byla do výzkumné praxe zavedena cca před 10 lety.

2.4.1. Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Morrisovo vodní bludiště (MWM) se skládá z kruhového bazénu naplněného vodou a malým kruhovitým ostrůvkem umístěným ve středu jedné ze čtyř čtvrtin bazénu (Morris, 1984). Ostrůvek může být skrytý, a tedy ne přímo patrný z hladiny do té doby, než na něj zvíře narazí, nebo vyčnívá z vody, takže ho zvíře může dobře vidět. Zvířata jsou vypuštěna z různých míst okraje bazénu a jediná možnost jak zabránit utopení se je nalézt ostrůvek a stoupnout si na něj. Umístění ostrůvku může být buď pevné v souřadnicovém rámci místnosti (referenční paměť), nebo může být měněno v každém pokusu (pracovní paměť) (Morris, 1984; Dudchenko, 2004). Obecně může potkan využít tři odlišné strategie k nalezení platformy (Brandeis et al., 1989). Může se naučit sled pohybů, které ho dovedou až k platformě (strategie praxe), může dosáhnout platformy díky orientačním bodům vázaným k bazénu (strategie taxie), nebo se může na ostrůvek dostat díky informacím o lokalizaci platformy vzhledem k bodům v okolí bazénu (prostorová nebo mapová strategie). Bylo zjištěno, že potkani směřující přímo k viditelnému ostrůvku (buď v pevném nebo měnícím se umístění) se rychle naučí orientovat se (Steele, Morris, 1999).



Obr. 2. Schematická ilustrace Morrisova vodního bludiště. *Potkan vypouštěný z různých startovacích míst hledá ostrůvek, který představuje jedinou únikovou možnost.*

Potkani hledající skrytý ostrůvek provedou úkol téměř se stejnou účinností, ale pouze v případě, že je ostrůvek umístěn stále na stejném místě (i když je potkan vypuštěn z odlišných míst na okraji bazénu) (Dalm et al., 2000). Zvířata, která mají najít skrytý ostrůvek nepravidelně měnící svoji pozici v bazénu, ho mohou najít pouze po předchozím nepravidelném hledání a jejich zvládnutí úkolu je viditelně horší než u zvířat z předchozích skupin. Experiment se skrytým ostrůvkem v konstantním umístění poskytl jasný důkaz, že si potkani pamatují prostorové vztahy mezi body vně bazénu (např. kusy nábytku) a ostrůvkem. Pokud se tento vztah naruší (v případě neviditelného ostrůvku měnící svoji pozici), doba hledání ostrůvku se prodlužuje. Její zkrácení je výsledkem zlepšené strategie hledání díky dlouhotrvajícímu tréninku (Moghaddam, Bures, 1996; Benhamou, 1997).

Když se plánují experimenty v MWM, je třeba vzít v úvahu několik vlastností experimentálních zvířat. Faktory jako váha, věk, pohlaví mohou ovlivnit rychlost plavání (Wenk, 1998). Rozdíly ve výkonu existují nejen mezi druhy, ale také mezi kmeny myši nebo potkanů. Několik studií též demonstrovalo, že prostorové učení může být vážně ovlivněno u stesovaných, hladových nebo nemocných zvířat.

2.4.1.1. Faktory uplatňující se při učení v Morrisově vodním bludišti

2.4.1.1.1. Rozdíly v pohlaví a učení v Morrisově vodním bludišti

Lepší výsledky při řešení úlohy MWM ukázali samci (Brandeis et al., 1989). Avšak Bucci et al. (1995) dokázali ekvivalentní výkony u samců i samic testovaných v 6 měsících věku a předpokládají, že tyto výsledky reflektují jejich rozdílné stupně maturace v době provádění experimentu. Pohlavní hormony zřejmě vysvětlují rozdíly mezi pohlavími v kognitivním učení. Dokládají to pokusy, při kterých byl testosteron aplikován během prvního týdnu po narození. Samice byly při pokusech v MWM úspěšnější (Roof, 1993). Samice s gonádami byly horší než ty, kterým byly vaječníky odebrány (Daniel et al., 1999). Bylo pozorováno, že skrytý ostrůvek v MWM lépe našly samice během estru než

během proestru (Warren, Juraska, 1997). Intrahipokampálně podaná dávka estradiolu zlepšila výkon v MWM u samic s gonádami stejně dobře jako u samců (Packard et al., 1996; Packard, Teather, 1997).

Na základě pohlavních rozdílů při učení v MWM byly navrženy změny ve výkladu úlohy cholinergního systému. Samice byly shledány jako více citlivé než samci na efekt cholinergního blokátoru scopolaminu (Berger-Sweeney et al., 1995). V případě estradiolu bylo navrženo, že hormon interaguje s cholinergním systémem a zlepšuje prostorové učení. Ale jeho zlepšující efekt byl blokován scopolaminem (Packard et al., 1996).

2.4.1.1.2. Mezidruhové a mezikmenové rozdíly v učení v MWM

MWM bylo původně navrženo ke studování mechanismů prostorové lokalizace u potkanů (*Rattus norvegicus*) (Morris, 1981; Brandeis et al., 1989). Testovány byly i myši (*Mus musculus*), ty však vykazovaly velmi odlišný způsob chování. Tendence nechat se nadnášet a thigmotaxe (plavání podél stěny bazénu) byly u myší více zřetelné než u potkanů, což může komplikovat testování. Byly pozorovány i jiné rozdíly mezi potkany a myšmi při úloze v MWM. Oba druhy reagovaly odlišně na stres indukující prostředí. Například Crawley (1985) porovnal zvířecí modely při stresu a konstatoval, že explorační chování lépe funguje u myší, zatímco potkani se rychleji unavili. Experimenty D'Hooge a De Deyn (2001) ukázaly, že myši jako by ustrnuly a nehledaly vhodnou cestu k nalezení ostrůvku. Učení v úlohách MWM je averzivně motivované chování, které může být v zásadě jedna z nevýhod této techniky a rozdíly mezi potkany a myšmi mohou být příčinou celkem divergentních rozdílů v chování těchto druhů v takovémto prostředí.

Rozdíly v učení v MWM též existují mezi různými kmeny myší a potkanů. Stejně výkony byly například pozorovány mezi C57BL/6JBy laboratorních myší (*Mus musculus domesticus*) a CAST/Ei myší poddruhu *castaneus* (*M. m. castaneus*) (Le Roy et al., 1998). Divoké myši (*Peromyscus maniculatus*) si v úlohách vedly úspěšněji než laboratorní myši (*Mus musculus*) kmene Swib - Webster (Petrie, 1995). Galea et al. (1994) použili dva poddruhy divokých myší

(*Peromyscus maniculatus*) a zjistili lepší výkony v hledání skrytého ostrůvku u zvířat z ostrovní populace (*P. m. angustus*) v porovnání s populací z pevniny (*P. m. artemisiae*). Zdá se, že potkani náležející rodině Muridae jsou obzvláště užiteční v tomto typu úlohy. Mnoho z těchto menších druhů potkanů jsou živočichové žijící v noře a využívající svých schopností navigace k pohybu v komplikovaném podzemním systému tunelů. Kimble a Whishaw (1994) srovnali výkony v MWM mezi potkany Long-Evans a brazilských krátkoocasých vačic (*Monodelphis domestica*) a konstatovali, že vačice byly neschopné najít ostrůvek skrytý pod hladinou MWM.

2.4.1.1.3. Vliv věku zvířat na učení v MWM

Bylo prokázáno, že výkony v úloze MWM klesají se stářím zvířat (Brandeis et al., 1989). Alespoň část tohoto zhoršení může být způsobena věkem navozenými změnami v plavání, lokomoci a exploraci. Mimo to, stárnoucí zvířata, stejně jako lidé, vykazují změny v kognitivním chování při řešení řady úkolů, což se shoduje se strukturními a fyziologickými změnami v mozkových oblastech zahrnujících tyto funkce. Mnoho autorů se domnívá, že s věkem spojený pokles schopností prostorového učení je způsoben změnami ve funkci a morfologii hipokampální formace (Gallagher, Nicolle, 1993; Geinisman et al., 1995). Oxidativní poškození může být způsobeno procesem stárnutí, které zahrnuje i kognitivní poruchu. Někteří autoři publikovali se stářím spojený pokles neuromotorických funkcí, které mohou též přispět k defektům v MWM. Kmen myši rychleji stárnoucích (senescence-accelerated mouse SAM), zajímavý myší model využívaný ke studiu s věkem spojených změn vyvinutý na Kyotské univerzitě, ukázal ovlivnění v několika paměťových úlohách (Takeda, 1994). Při nejmenším při úloze skrytého ostrůvku v MWM bylo těžké u těchto zvířat oddělit kognitivní ovlivnění od průvodního motorického poklesu.

2.4.1.1.4. Nutrice a MWM

Nutriční stav zvířat může ovlivnit výkony v MWM mnoha způsoby. Celý život trvající hypokalorická dieta zamezí věkem způsobeným deficitům v MWM

u potkanů starých 24 měsíců (Pitsikas et al., 1990; Stewart et al., 1989). Omezení potravy také ochránilo potkany před deficitem indukovanými intrahipokampální kainátovou injekcí (Bruce-Keller et al., 1999). Ovšem dietetické omezení nemá tak jasné prospěšné následky u myši (Bellush, 1996). A dieta nasazená v polovině života měla dokonce negativní efekt na úlohu skrytého ostrůvku (Means et al., 1993). Bedi (1992) při svých pokusech nedostatečně živil potkany během prvních 30 dní postnatálního života a zjistil, že podvyživená zvířata měla horší výsledky než kontroly. Avšak i krátká doba nutriční rehabilitace zvrátila tyto škodlivé efekty malnutrice. Obohacení výživy potkanů o (n-3) polynenasycené mastné kyseliny během čtyř generací zlepšilo výsledky v MWM u potomků (Jensen et al., 1996).

2.4.1.1.5. Stres a infekce

Je známo, že kognitivní funkce jsou ovlivněny stresem, jak u zvířat tak u lidí. Učení v MWM je averzivně motivované chování. I když jsou averzivní faktory minimalizovány, jak je to jen možno, je tento úkol pro testované potkany stresující událost. Za těchto podmínek může mít ještě další stres působící na potkany závažný vliv na kognitivní chování (Holscher, 1999). Následkem stresu nejsou hyperaktivní potkani kmene Wistar-Kyoto schopni efektivně řešit úlohu MWM se skrytým ostrůvkem (Grauer, Kapon, 1993). Stres též negativně ovlivňuje retenci úlohy. Důkazy ukazují, že autonomní a endokrinní odpovědi na stres a aktivace osy hypotalamus-hypofýza-nadledvinky jsou způsobeny vlivem stresu na učení a paměť. Sandi (Sandi, 1998) se domnívá, že vyplavení adrenálních steroidních hormonů jako následek stresu přímo ovlivňuje formování paměti. Snížené nebo zvýšené hladiny adrenálních stresových hormonů ovlivnily učení, zatímco jiné hormony zahrnuté v chování spojeném se stresem, jako angiotenzin II, zdá se, nemají vliv (Walther et al., 1999). Úloha skrytého ostrůvku byla narušena u transgenních myši s centrální overexpresí kortikotropin-releasing faktoru (Heinrichs et al., 1996), učení bylo poškozeno též u adrenalectomizovaných potkanů (Roozendaal et al., 1998). Deficit v získání paměťové stopy pro polohu skrytého ostrůvku byl publikován u transgenních

myši s poškozenou funkcí glukokortikoidního receptoru (Rousse et al., 1997). De Quervain et al. (1998) popsali pokus, při kterém potkanům podávali 30 minut před testováním glukokortikosteron. Ten v závislosti na dávce narušil výkon v pokusu, v němž je skrytý ostrůvek odstraněn (*probe trial*).

Též nejružnější infekční agens a parazité mohou ovlivnit chování hostitele. U některých infekcí bylo prokázáno přímé nebo nepřímé ovlivnění kognice v úloze skrytého ostrůvku v MWM. Virové nebo bakteriální infekce změnilly výkon u postižených myši i potkanů (Gibertini et al., 1995; McLean et al., 1993; Yayou et al., 1993).

2.4.1.2. Mozkové oblasti zahrnuté při učení v MWM

Doposud již mnoho studií zkoumalo roli určitých mozkových oblastí na učení v MWM. Deficit byl zjištěn u zvířat s poškozením hipokampu, striata, předního mozku, mozečku a několika neokortikálních oblastí a tudíž je těmto oblastem přisuzována důležitá role při řešení úloh v MWM. Zapojení mozkových oblastí do prostorové navigace může být mnohem více komplexní a může zahrnovat více oblastí a cest než bychom možná očekávali (Cain, Saucier, 1996). Je třeba si uvědomit, že prostorové učení obecně, a úlohy v MWM obzvlášť, závisí na koordinované akci různých mozkových oblastí tvořících integrovanou neurální síť. Potkani s lézemi thalamické laterální medulární laminy vykazovali oslabení v učení u skryté i viditelné platformy v úloze MWM (Savage et al., 1997). Talamické struktury mohou stejně tak dobře hrát roli v prostorové pracovní paměti (Mumby et al., 1999). Prostorová pracovní paměť byla též poškozena u potkanů s lézemi mamilárního tělesa (Santin et al., 1999). Několik studií se zaměřilo i na amygdalu a její úlohu v MWM (Decker et al., 1995; Roozendaal, McGaugh, 1997; Spanis et al., 1999). Jak se ukázalo, měly léze locus coeruleus a nucleus raphe nepříznivý vliv na výkon v MWM (Compton et al., 1995; Riekkinen et al., 1990). Léze v nucleus raphe dorsalis nezasáhly učení v MWM jako takové, ale zhoršily efekt lézí nucleus basalis (Riekkinen et al., 1990). Léze nucleus accumbens nezhoršily výkon v MWM (Thifault et al., 1998), ale tato struktura může hrát roli v konsolidaci prostorové informace (Setlow, McGaugh,

1998).

Je důležité si uvědomit, že spíše než poškození zmíněných mozkových oblastí může více negativně ovlivnit výkon v MWM přerušení nervových drah. Například léze fimbrie a fornixu přerušuje mnoho nervových vláken procházejících těmito strukturami. Hipokampální-subikulární vstup do nucleus accumbens a projekce ze stoupajícího nucleus raphe do dorzálního hipokampu jsou dvě z cest, které jdou skrz fimbria-fornix. Přetnutí fimbria-fornix ukončí hipokampální-subikulární vstup do nucleus accumbens a stejně tak i cholinergní vstup do hipokampu. Přetnutí fimbria-fornix zanechává hipokampus disfunkční, ačkoliv mohou vlákna fimbria-fornix zprostředkovat i funkce, které nejsou přisuzovány hipokampu (Whishaw, Jarrard, 1995). Na úrovni behaviorální léze fimbria-fornix narušily hledání skrytého ostrůvku u potkanů (Nilson et al., 1987). Eichenbaum et al. (1990) demonstrovali, že potkani s lézemi ve fimbria-fornix si pomaleji zapamatovali úlohu než kontroly, ale úplně neschopní byli, když se cíl nebo startovní pozice měnily. Zjednodušení úlohy omezením distálních podnětů umožnilo potkanům s lézí fimbria-fornix dosáhnout stejné výkonnostní úrovně jako kontroly (Wörtwein et al., 1995).

2.4.1.2.1. Hipokampus

Morrisovo vodní bludiště bylo zavedeno hlavně ke zkoumání účinků hipokampálních lézí u potkanů (Morris 1981; Morris, 1984; Morris et al., 1982; Stewart, Morris, 1993). Bylo prokázáno, že potkani s lézemi hipokampu jsou horší v úloze se skrytým ostrůvkem ale ne s ostrůvkem viditelným. Potkani s lézemi hipokampu byli též schopni lokalizovat skrytou platformu, která byla stále ve stejné vzdálenosti a stejném směru od orientačního bodu (Pearce et al., 1998). Tyto pokusy dokázaly, že schopnost použít dopředný vektor je u takovýchto zvířat stále zachována. Poškození prostorového učení u potkanů s lézemi hipokampu je odvozeno od objemu poškozené hipokampální tkáně, přičemž léze dorzálního hipokampu mají hlubší dosah než léze ventrálního hipokampu (Moser et al., 1993; Moser et al., 1995). Hipokampální místové buňky (place cells) byly navrženy jako primární substrát schopností prostorové paměti, které jsou základem procesů

prostorové navigace zahrnuté v úloze skryté platformy MWM (Poucet et al., 2000). Důkazy ukazují, že hipokampus je nezbytný jak pro získání prostorové informace tak pro její konsolidaci, skladování. Riedel et al. (1999) demonstrovali, že reverzibilní hipokampální inaktivace pomocí AMPA/kainátového antagonisty vážně poškozuje učení v MWM u potkanů. Zvířata s hipokampální inaktivací během pokusu v bazénu bez ostrůvku (*probe trial*) ukázala stejnou techniku hledání jako kontroly, ale hledali na nesprávném místě, zatímco zvířata s inaktivací plavala během fáze učení bezcílně kolem bazénu a nevykazovala žádné zaměřené hledání.

Whishaw et al. (1997) spojili hipokampus s integrací dráhy užívající idiotheticých podnětů. Tento proces integrace dráhy by zvířeti umožnil odhadnout jeho pozici vzhledem ke startovní pozici založenou na informaci získané při svém pohybu. Tato informace může být získána z několika odlišných zdrojů zahrnujících vestibulární systém, svalové a kloubní receptory, motorická centra a také vnější podněty působící při pohybu.

Redish a Touretzky (1998) navrhli dvě role hipokampu při hledání skryté platformy v MWM: lokalizace vlastního těla a přehrání cesty. Lokalizace vlastního těla odráží schopnost zvířete určit svoji pozici ve vztahu k cíli, když se vrací na určité místo, zatímco přehrání cesty je paměťový proces, který umožňuje zvířeti znovu vybatvit předchozí cestu v daném prostředí. Podle nich závisí tyto schopnosti na kombinaci hipokampálních polí místových buněk a procesů *long-term potentiation* (LTP).

2.4.1.2.2. Hipokampální dlouhodobá potenciace (*long-term potentiation* – LTP)

Několik autorů se domnívá, že hipokampální LTP může být neuronálním základem pro hipokampově dependentní učení, ale tato představa ještě musí být prověřena (Bliss, 1998; Cain, 1997) Jiní autoři totiž ukázali, že učení v MWM je stále možné u zvířat, u kterých byly procesy LTP blokovány, a také že výkon v MWM může být negativně ovlivněn, když je LTP facilitována (Cain, 1997). Studie s geneticky upravenými myšmi odhalily, že oslabená LTP v hipokampální CA1 oblasti vede k poruše učení v MWM (Grant, Silva, 1994; Wilson, Tonegawa,

1997). V tomto ohledu je zde několik příkladů demonstrujících, že přerušení hipokampální LTP, ať už na receptorové nebo enzymatické úrovni, vyloučí prostorové učení. Transgenní myši postrádající podjednotku $\epsilon 1$ NMDA receptoru vykazovaly defekt v hipokampální LTP a stejně tak i poškození v úloze skryté platformy a při řešení úlohy bez ostrůvku (*hidden-platform acquisition and probe trial performance*) (Sakimura et al., 1995). Také myši deficientní v α -calcium-calmodulin kinase II, enzymu účastnícího se regulace LTP (Silva et al., 1992), a zvířata s cílenou mutací cAMP-responsive element binding (CREB) proteinu (Bourtchuladze et al., 1994) vykazovala deficientní LTP i poškozený výkon v MWM.

Dlouhotrvající synaptické změny fungují jako neuronální báze paměťových procesů zahrnutých v MWM. Hipokampální LTP je v tomto ohledu nepochybně nejrozsáhleji prozkoumaný synaptický jev. Eventuální konsolidace prostorové informace do *long-term* paměti může zahrnovat jevy zahrnuté v syntéze proteinů a tvorbě synapsí. Meiri a Rosenblum (1998) publikovali, že intraventrikulární injekce anisomycinu, inhibitoru syntézy proteinů, poškozuje v závislosti na dávce hledání skryté platformy v MWM, aniž by ovlivnila krátkodobou paměť nebo výbavnost dřívějších stop.

2.4.1.2.3. *Striatum*

Bilaterální léze striata postihují provedení úlohy v MWM také (Whishaw et al., 1987). Spousta autorů zaznamenala podobnosti mezi zvířaty se striatálními lézemi v kognitivním a motorickém poškození. Striatální léze způsobené intrastriatální injekcí quinolinové kyseliny poškodily u potkanů úlohu se skrytým ostrůvkem (Block et al., 1993). Tito potkani se pohybovali více podél stěny bazénu (*thigmotaxe*) a plavali značně pomaleji než kontroly. Obecně potkani s lézemi mediálního striata vykazovali vytrvalost, ale selhali při pokusech vyžadujících kognitivní flexibilitu. Striatum může tedy hrát roli ve flexibilitě odpovědí a motorické kontrole spíše než ve vlastních mnemonických aspektech učení v MWM. Učení při skryté i viditelné platformě bylo nezměněno u potkanů s dorzálními striatálními lézemi (Thullier et al., 1996). Léze laterálního striata

ovlivnily senzomotorické funkce, zatímco léze mediálního striata narušily kognitivní prostorové aspekty úkolů v MWM. Devan a White (1999) zjistili, že léze laterálního striata nepostihly trénování se skrytou ani viditelnou platformou. Na druhou stranu, léze mediálního striata nezabrání kompletně osvojení si úlohy v MWM, ale potkani s lézemi preferují viditelnou platformu v kompetičním testu a vykazují zvýšenou thigmotaxi během počátečních akvizitních pokusů (*acquisition trials*).

2.4.1.2.4. Mozeček

Myši s poškozením mozečku jeví zhoršené učení v MWM (Lalonde, 1994), ale přesná role mozečku v úlohách MWM může být poněkud komplexnější. Mozeček získává vstupy z těchto mozkových oblastí zahrnutých v mnoha aspektech učení v MWM: vizuální kortex, colliculus superior a hipokampus a, nehledě na motorickou kontrolu a získání podmíněných reflexů, jejich specifické funkce mohou zahrnovat kognitivní procesy (Lalonde, 1997; Molinari et al., 1997). Petrosini et al. (1996) navrhli, že primární rolí mozečku v prostorovém učení je kontrola procedurálních aspektů této úlohy. Mozeček by mohl být zahrnut spíše v procedurách požadujících nalezení objektu v prostoru než znát jeho prostorovou lokalizaci (Petrosini et al., 1998). Potkani s polovinou mozku byli horší v exploračním chování během pokusu se skrytou platformou (Petrosini et al., 1996). Nezdálo se, že by potkani s polovinou mozečku ztratili snahu z vody uniknout, ale rychle šplhali na ostrůvek, pokud do něj narazili. Avšak trénink před chirurgickým zákrokem nebo prodloužený trénink s viditelnou platformou umožnil i potkanům s polovinou mozečku získat požadované informace a řešit úlohu se skrytou platformou.

2.4.1.2.5. Neokortex

Jak kompletní odstranění kortexu tak i více specifické léze kortikálních oblastí škodí výkonu v MWM. Během tréninku v MWM se zvířata musí učit nejen prostorovou lokalizaci skryté platformy ale i jiné aspekty této úlohy, jako je plánování a provádění potřebných pohybů. Některé kortikální oblasti hrají zřejmě

roli v těchto mnemonických ale i jiných aspektech učení v MWM. Zdá se tedy, že je neokortex součástí funkčně integrovaného systému zúčastněných mozkových oblastí. Potkani s lézemi v prefrontálním kortexu ukazují poškození při úloze, zatímco potkani s parietálními lézemi horší nebyli (Mogensen et al., 1995). Potkani s prefrontálními lézemi se ukázali jako schopni využít distálních podnětů k lokalizaci skryté platformy, ale proces plánování byl narušen (Granon, Poucet, 1995; Mogensen et al., 1995). Léze anteriorního cingulárního kortexu lehce poškodily výkon v úloze skryté platformy (*hidden platform acquisition*), zatímco léze posteriorního cingulárního kortexu neměly žádný efekt (Warburton et al., 1998). Inaktivace insulárního kortexu, nazývaného též viscerální kortex, tetrodotoxinem buď před tréninkem skryté platformy nebo po něm poškodila u potkanů výkon v experimentu bez ostrůvku (*probe trial performance*) (Bermudez-Rattoni et al., 1991), zatímco blokáda NMDA receptorů v insulárním kortexu zhoršila osvojení si úlohy (*acquisition*) i výkon v experimentu bez ostrůvku (*probe trial*) (Gutiérrez et al., 1999). Insulární kortex získává chuťové a viscerální informace z thalamu a je zahrnut ve viscerálních reakcích a stresu. Výsledky z MWM potvrzují, že insulární kortex hraje roli v percepci temporálních předloh různých tříd sensorických stimulů (Bermudez-Rattoni et al., 1991).

2.4.1.3. Neurofarmakologie prostorového učení v Morrisově vodním bludišti

Od té doby co bylo MWM zavedeno, využívalo se ve studiích zaměřených na neurochemické systémy v prostorovém učení a paměti a pro efekty neurofarmakologické manipulace na prostorové funkce (Brandeis et al., 1989; McNamara, Skelton, 1993). McNamara a Skelton (1993) ve své práci popisovali, jak se účastní různé neurotransmitery a modulátorové systémy v prostorovém učení a domnívají se, že pouze cholinergní glutamatergní a některé peptidergní systémy mohou být nutné pro tento druh učení, zatímco systémy užívající γ -aminobutyrovou kyselinu (GABA), opioidy nebo biogenní aminy jsou buď škodlivé nebo s těmito funkcemi nesouvisí. Mimochodem mnoho studií uvedlo, že efekty neurofarmakologických prostředků na výkon v MWM stejně jako zahrnutí různých neurochemických systémů v prostorovém učení mohou být mnohem více

komplexní než se původně myslelo. Morris et al. (1986) byli první, kteří ukázali, že intraventrikulární infuze kompetitivního antagonisty N-methyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru, AP5, poškozuje učení v pokusu se skrytou platformu i v pokusu bez ní (*hidden-platform acquisition and probe trial performance*). Tyto výsledky naznačují, že NMDA typ glutamátových receptorů hraje zásadní roli v prostorovém učení, které je omezeno na proces vytváření paměťové stopy (*acquisition process*), ale nezahrnuje proces její konsolidace nebo vybavení (McNamara, Skelton, 1993). Cholinergní systém je bezpochyby druhý nejdůležitější neurochemický systém zkoumaný v MWM. Sutherland et al. (1982) zjistili, že potkani s intraperitoneální injekcí atropinu nebyli schopni použít strategii prostorové mapy k hledání skryté platformy MWM.

2.4.1.3.1. Excitační aminokyseliny

Excitační aminokyselinové neurotransmitery využívají odlišné typy ionotropních a metabotropních receptorů. Iontropní glutamátové receptory zahrnují NMDA, kainátové a AMPA receptory (Dingledine et al., 1999). Aby bylo možno zkoumat jejich efekt na MWM učení, byly první kompetitivní antagonisté NMDA receptorů, z důvodu jejich neschopnosti projít hematoencefalickou bariérou, podány intracerebrálně. Mezitím se staly dostupné silnější, systémově aktivní látky a několik autorů ukázalo, že jak intracerebrální tak systémová aplikace antagonistů NMDA receptorů poškodí získání prostorové informace (*acquisition*) v MWM (McNamara, Skelton, 1993; Morris, Davis, 1994; Rison, Stanton, 1995). Experimenty Davise et al. (1992) naznačují, že NMDA receptory hrají důležitou roli v prostorovém učení. Systémově aktivní antagonisté NMDA receptorů AP5 rodiny, jako 3-(2-karboxypiperazine-4-yl)propyl-1-fosfonová kyselina (CCP) nebo 2-amino-4-methyl-5-fosfono-3-pentenová kyselina (4-methyl APPA) zhoršují výkon v MWM u myší i potkanů. Také nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů, jako ketamin a dizocilpin, narušují učení v MWM (McNamara, Skelton, 1993). Cain a spolupracovníci (Cain et al., 1997; Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996) vyslovují myšlenku, že NMDA antagonisté postihují výkon v MWM spíše prostřednictvím indukce

senzorimotorických defektů a hyperaktivity, než způsobením deficitů prostorového učení.

Pokusy naznačují, že NMDA receptory mohou přispívat k prostorovému učení, ale nejsou esenciální (Saucier, Cain, 1995). Staubli et al. (1994) zkoušeli efekty experimentální benzamidové drogy 1-(1,3-benzodioxol-5-yl karbonyl)-piperidinu, která facilitovala funkci AMPA receptorů, a zjistili zlepšení MWM akvizice (*MWM acquisition*).

2.4.1.3.2. Inhibiční aminokyseliny

Inhibiční aminokyselina GABA se váže na GABA_A a GABA_B receptory. Aktivace inhibičního GABA neurotransmitterového systému nejspíše interferuje přímo se schopnostmi prostorového učení, zatímco suprese GABA systému může tyto a další funkce posílit (McNamara, Skelton, 1993). Tyto poznatky ovšem nejsou jednoznačné. Podání vigabatrinu, GABAergní látky, neovlivnilo výkon v MWM (Ylinen et al., 1991). Na druhou stranu, podání agonistů GABA_A receptorů chlórdiazepoxidu, diazepamu a CL 218,872 poškodilo učení v MWM (McNamara et al., 1993). Diazepamem způsobený deficit v MWM však může být eliminován předešlým seznámením se s úlohou (Zanotti, 1994). Systémové nebo intrahipokampální podání baklofenu, agonisty GABA_B receptoru zhorší výkon v MWM (Arolfo, 1998). Brucato et al. (1996) zjistili, že antagonist GABA_B receptorů CGP-46381 ovlivnil akvizici (*MWM acquisition*), ale neměl žádný efekt na pracovní paměť v úloze radiálního bludiště. Pozorovali, že několik potkanů s podanou látkou CGP-46381 vykazovalo pasivní chování a nestoupalo si na ostrůvek, ačkoliv do něj během plavání několikrát narazilo.

2.4.1.3.3. Acetylcholin a biogenní aminy

Důležitost cholinergního systému pro prostorové učení byla dobře prozkoumána a jeho antagonisté účinně blokovaly tyto funkce. Blokáda centrálních muskarinových acetylcholinových receptorů atropinem nebo skopolaminem poškodila MWM akvizici ale ne schopnost vybavení paměťových stop, což nemůže být redukováno pouze na motivační nebo senzorimotorické

poruchy (Brandeis et al., 1989; McNamara, Skelton, 1993). Skutečnost, že mozková deplece noradrenalinu, dopaminu nebo serotoninu nezhoršuje výkon v MWM, podporuje hypotézu, že aminergní systémy nehrají významnou roli v prostorovém učení (McNamara, Skelton, 1993). Ovšem pozdější studie navrhují nepatrné funkce různých aminergních systémů ve vytváření prostorové paměti. Deplece noradrenalinu, jak se zdá, zhoršuje konsolidační proces a zanechává paměťovou stopu méně stabilní a/nebo více citlivou k interferenci. Od té doby co bylo prokázáno, že dopaminergní antagonisté poškozovaly hledání skryté i viditelné platformy při učení v MWM, se předpokládalo, že senzomotorické nebo motivační deficity mohou podléhat efektům těchto sloučenin (McNamara, Skelton, 1993).

Zvířata s deficiencí D1 receptorů ukázala deficit reakce na prostředí (Smith et al., 1998). Injekce dopaminergního antagonisty haloperidolu do nucleus accumbens poškodila u potkanů hledání skryté ale ne viditelné platformy v MWM (Ploeger et al., 1994). Přesná role serotoninergního systému v MWM je nejasná z důvodu heterogenity receptorů 5-hydroxytryptaminu (5-HT) a exprese velkého množství různých podtypů v centrálním nervovém systému. Podtypy 5-HT receptorů mohou ovlivňovat výkon v MWM mnoha odlišnými způsoby.

2.4.1.3.4. *Neuropeptidy*

Několik peptidů v centrální nervové soustavě slouží jako neurotransmitery nebo neuromodulátory a některé z nich jsou součástí procesů účastnících se učení v MWM. Somatostatin, vazoaktivní intestinální peptid (VIP) a některé další peptidy ovlivňují MWM akvizici, ale jejich příspěvek k prostorovému učení je stále nejasný (Fitzgerald, Dokla, 1989; Itoh et al., 1994; McNamara, Skelton, 1993). Septální podání vazopresinu poškodilo hledání skryté platformy, zatímco podání vazopresinového antagonisty nemělo žádný efekt (Engelmann et al., 1992; Everts, Koolhaas, 1999). Systémová aplikace substance P zlepšila výkon u potkanů s lézemi hipokampu a starých potkanů (Hasenohrl et al., 1990; Sprick et al., 1996). Některé studie ukazují, že aktivace opioidního systému poškozuje učení v MWM (Brandeis et al., 1989; McNamara, Skelton, 1993). Některé efekty

opioidů na prostorové učení mohou být způsobeny inhibicí opioidy navozené noradrenergí aktivace (Introini-Collison et al., 1995). Deficity akvizice byly indukovány injekcí dynorfinu do dorzálního hipokampu ale ne do ventrálního hipokampu (McDaniel et al., 1990).

2.4.1.3.5. *Napětově ovládané iontové kanály*

Napětově závislé vápníkové kanály jsou důležité v regulaci intracelulárních hladin vápníku. Paměťové procesy zahrnuté v MWM a v ostatních formách učení mohou vyžadovat vápníkově závislé enzymatické procesy v neurálních systémech, které hrají roli v takovýchto funkcích. Snížené nebo naopak nadměrně zvýšené hladiny Ca^{2+} poškozují paměť. U mozku starého nebo poškozeného mohou blokátory vápníkových kanálů zabránit škodlivým vlivům zvýšeného Ca^{2+} . Za těchto podmínek mohou být tyto blokátory vápníkových kanálů neuroprotektivní. Neuroprotektivní efekty byly pozorovány i u jiných blokátorů iontových kanálů. Orální podání antagonisty sodíkových kanálů BW619C89 bránilo poruchám učení v MWM a poškozením po okluzi arteria cerebri media u potkanů (Smith et al. 1997). Blokátor calcium dependentních draslíkových kanálů apamin zlepšil MWM akvizici a poruchy u myši s lézemi mediálního septa (Ikonen et al., 1998).

2.4.2. **Úloha vyhýbání se místu**

Ve výzkumu mechanismů prostorového chování je také možné použít behaviorální metody založené na negativní (averzivní) motivaci subjektu. Metodou použitelnou pro výzkum allotheticke prostorové orientace je úloha aktivního allotheticke vyhýbání se místu (AAPA: Cimadevilla et al., 2000). Spočívá v tom, že potkan se musí aktivně pohybovat, aby se vyhnul oblasti, jejíž návštěva je potrestána. Na kruhové otáčející se aréně je vymezena zakázaná oblast, která je definována v souřadnicovém systému místnosti. Po vstupu do této oblasti je zvíře potrestáno mírným elektrickým šokem. Pokud by se potkan aktivně nepohyboval, byl by opakovaně zavážen do zakázané oblasti postupným otáčením arény. Zvíře se však brzy naučí aktivně se pohybovat proti směru rotace

arény a kompenzovat tak pasivní pohyb generovaný otáčející se arénou. Aby se potkan vyhnul zakázané oblasti, využívá orientačních bodů uvnitř arény (referenční rámec arény) i orientačních bodů vázaných ke geometrii místnosti (referenční rámec místnosti) (Fenton et al., 1998). Rotace arény oddělí referenční rámec místnosti a arény. Zvířata tak musí řešit konflikt mezi dvěma soubory prostorových stimulů: informacemi z referenčního rámce místnosti na jedné straně a referenčního rámce arény na straně druhé. Potkani musí vybrat rámec místnosti jako jediný relevantní pro účinnou navigaci.

2.4.2.1. Faktory uplatňující se při učení v úloze aktivního vyhýbání se místu

2.4.2.1.1. Pohlaví zvířat a fáze estrálního cyklu u samic

Je známo, že samci a samice reagují na stresové situace rozdílně (Aloisi, 1997; Zimmerberg, Farley, 1993) a vykazují odlišnou mobilitu (Dawson et al., 1975). Právě to může být vysvětlením, proč mají samci v úlohách testujících prostorovou paměť lepší výsledky než samice (Perrot-Sinal et al., 1996). V těchto pokusech se ukázalo, že po několika tréninkových sezeních byl stres odbourán a samice vykazovaly stejně tak dobré nebo dokonce lepší výsledky než samci. Cimadevilla et al. (2000) prováděli pokusy aktivního vyhýbání se místu, při kterých byla 40 minutová sezení rozdělena do dvou 20 minutových period. V prvních 20 minutách (fáze akvizice) dostali potkani po vstupu do zakázané oblasti arény mírný elektrický šok. V následujících 20 minutách (fáze extinkce) nebyl vstup do zakázané oblasti potrestán elektrickým šokem. Tato studie neukázala signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi během prvního dne pokusu. Jediný rozdíl mezi samci a samicemi v první den pokusu byla distribuce sektorů, kterým se vyhýbali, nebo je naopak preferovali, během fáze extinkce. Zatímco samci jasně preferovali sektor naproti zakázané oblasti, samice ukázaly téměř stejnou preferenci pro sektor sousedící se sektorem zakázaným ve směru rotace arény. Po vypnutí elektrického šoku se úhybové chování u samců postupně snižovalo, zatímco u samic zůstávalo nezměněno. Tento rozdíl v extinkci mezi samci a samicemi nejspíš vyjadřuje odlišné zpracování prostorové informace. Rozdíl mezi

samci a samicemi nemůže být vysvětlován rozdílnou lokomoční aktivitou, protože celková dráha ušlá během extinkce byla stejná u samců i samic. Ale samice strávily mnohem více času v kritické oblasti.

Výraznější extinkce u samic patrně souvisí s existencí dvou odlišných mechanismů zajišťujících akvizici a retenci, což je dobře dokumentováno selektivními mozkovými lézemi. Například potkani s kombinovanými dorzálními a mediálními lézemi nucleus raphe si úlohu osvojí a aktivně se vyhýbají stejně jako potkani pouze s lézemi mediálního nucleus raphe. Bilaterální léze v entorhinálním kortexu poškodí akvizici ale ne znovuvybavení, pokud je léze provedena po učení úloze aktivního nebo pasivního vyhýbání (*passive avoidance*) (Ueki et al., 1994). Také systémová blokáda NMDA receptorů má nepříznivý vliv na akvizici pasivního vyhýbání, ale neinterferuje s konsolidací informace nebo znovuvybavením (Jones et al., 1989).

Lepší pamatování u samců je nejspíše důsledkem existence dimorfní cesty, která může zahrnovat hipokampus. Morfologické změny demonstrovány v gyrus dentatus dobře korelují s výkonem samců a samic v prostorových úlohách. Cimadevilla et al. (2000) též neprokázali signifikantní rozdíl ve výkonu samic při testování v různých fázích jejich estrálního cyklu, ačkoliv je známo, že počet synapsí a dlouhodobá potenciace se mění s hladinou hormonů během estrálního cyklu (McEwen, Woolley, 1994; Warren et al., 1995). Na druhou stranu několik autorů publikovalo, že samice mají nižší práh bolesti než samci (Drury, Gold, 1978). Bylo dokázáno, že se práh bolesti mění během estrálního cyklu. Během fáze proestrus, kdy je signifikantně zvýšená hladina estradiolu, jsou samice více citlivé na elektrické šoky (Sfikakis et al., 1978). Tato fáze je spojena s facilitací odpovědi. Diestrus a estrus jsou spojeny s nižší hladinou sérového estradiolu a redukcí v úhybové odpovědi (Sfikakis et al., 1978). Cimadevilla et al. (2000) použili ve své studii mírné elektrické šoky, aby motivovali potkany vyhnout se určitému místu. Vzhledem k tomu, že neprokázali signifikantní rozdíly mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu, je možné, že požadavky úlohy maskovaly reaktivitu na šoky. Je jasné, že výraznější odpověď na šok nemusí nutně pomoci

zvířeti lokalizovat zakázanou oblast. Tak je možno vysvětlit, proč potkani vykazovali stejnou akvizici ve všech fázích cyklu. Zatímco odlišné výkony samců a samic byly zjištěny během extinkce úlohy vyhýbání se místu, hormonální změny během estrálního cyklu nebyly provázeny podobnými změnami v chování.

2.4.2.1.2. Úloha hipokampu a vliv hipokampální inaktivace

Názor, že je hipokampus důležitý pro prostorovou kognici, byl založen na objevu hipokampálních místových buněk (*place cells*) (O'Keefe, Dostrovsky, 1971; Muller, 1996). Tento názor byl podpořen důkazy, že hipokampální destrukce nebo inaktivace poškozuje výkon v různých prostorových úlohách (Fenton, Bures, 1993; Jarrard, 1993; Morris et al., 1982; O'Keefe, Nadel, 1978; Whishaw, Jarrard, 1996). Cimadevilla et al. (2000) ve své práci dokázali, že hipokampální aktivita je nutná pro řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu. Provedli pokus, při kterém funkčně inaktivovali dorzální hipokampus tetrodotoxinem. Tetrodotoxin blokoval jak akvizici prostorové paměti tak její vybavení. Jejich výsledky ukazují, že podání tetrodotoxinu způsobí signifikantní nárůst v počtu vstupů do zakázané oblasti. Potkani nevykazovali snahu se zakázané výseči vyhýbat. V kontrastu se změnami ve výkonu při vyhýbání se zakázané oblasti se však lokomoční aktivita měřená jako celková délka ušlé dráhy signifikantně nezměnila oproti pokusům bez podání tetrodotoxinu.

Injekce tetrodotoxinu zajistily funkční vyřazení mozkové oblasti zodpovědné za proces učení, což bylo užitečné pro studium prostorové a časové dynamiky plastických změn, které tvoří základ učení a paměti (Bures, Buresova, 1990; Bures et al., 1988). V práci Cimadevilla et al. (2000) poskytla tetrodotoxinová inaktivace možnost zkoumat roli hipokampu ve znovuvybavení paměti získané během několikadenního testování v úloze aktivního vyhýbání se místu. Chování v této úloze se během čtyř dnů zlepšovalo, ale po podání tetrodotoxinu byl výkon potkanů na úrovni prvního dne pokusu nebo dokonce horší. To nám dokazuje, jak je hipokampus důležitý pro vybavení dlouhodobé paměti, která byla upevňována během předchozích dní.

2.4.2.1.3. Systémová blokáda muskarinových acetylcholinových receptorů

Valeš a Stuchlík (2005) prováděli pokusy, ve kterých blokovali centrální muskarinové acetylcholinové receptory pomocí systémového podání scopolaminu v dávkách 0,5; 1,0; 2,0 mg/kg. Výsledky ukazují, že potkani s dávkou scopolaminu 2,0 mg/kg i přes několikadenní trénink před jeho podáním vykazovali hyperlokomoci a signifikantní poškození výkonu v úloze aktivního vyhýbání se místu a to jak ve formě znovuvybavení (*reacquisition*) paměti, tak ve formě provádění stejného úkolu avšak v jiné místnosti (místnosti s jinými orientačními body). Dávka 1,0 mg/kg způsobila poškození pouze ve znovuvybavení paměti. Je možné, že systémové podání vysokých dávek scopolaminu vede k poškození funkcí v kortexu, které představují základ těchto druhů chování. Je třeba vzít v úvahu i vliv stresu, kterému jsou potkani během prezentovaných pokusů vystaveni, a který tudíž může mít vliv na zhoršený výkon.

Výsledky práce Valeše a Stuchlíka (2005) naznačují, že neurální okruhy kterých se účastní muskarinové acetylcholinové receptory hrají klíčovou roli v nervových procesech, které jsou základem efektivního chování v úloze AAPA a které mohou být součástí kognitivních procesů u potkanů.

2.4.2.1.4. Blokáda NMDA podtypu glutamátových receptorů

Stuchlík a Valeš (2005) ve svých pokusech blokovali NMDA receptory pomocí systémového podání buď dávky 0,15 mg/kg nebo 0,2 mg/kg dizocilpinu (MK-801), nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů. NMDA dependentní neurotransmise je důležitá pro hipokampální dlouhodobou potenciaci (LTP), která hraje důležitou roli u procesů učení a paměti zahrnujících prostorovou kognici.

Potkani prošli v této práci nejprve pretréninkem a potom jim byl podán dizocilpin. Účinek dizocilpinu byl testován na schopnost vybavení paměti a schopnost přeúčit se úlohu v jiné místnosti s jinými orientačními body. Výsledky této studie ukazují, že MK-801 (0,2 mg/kg) zvyšuje lokomoci v úloze AAPA. To je v souladu s předchozími studiemi, které prokázaly hyperlokomoci a hyperaktivitu po podání NMDA antagonistů. Předpokládá se, že hyperlokomoce

je nejspíše zprostředkována interakcí glutamatergních a dopaminergních systémů v mozku (Adriani et al., 1998). U dávky 0,15 mg/kg MK-801 nebyla hyperlokomoce pozorována. MK-801 v dávce 0,2 mg/kg narušil vybavení paměti. Přeučení stejného principu úlohy AAPA v jiné místnosti bylo poškozeno u obou dávek MK-801.

Podání MK-801 způsobilo orientační deficit v úloze AAPA bez ohledu na předchozí intaktní pretrénink. Tyto výsledky podporují hypotézu, že NMDA receptory hrají klíčovou roli v kognitivních procesech.

2.5. DOPAMINOVÉ NEURONÁLNÍ OKRUHY

2.5.1. Dopamin – úvod

Neurotransmitter dopamin (DA) je zahrnut v řadě funkcí centrálního nervového systému. Dopaminergní systém reguluje normální motorickou aktivitu na úrovni bazálních ganglií (Stoof et al., 1992), reguluje uvolňování acetylcholinu v mozku, což je vztaženo ke kognitivním funkcím jak u mladých tak i starších potkanů (Hersi et al., 1995). Dopamin patří do skupiny neurotransmiterů nazývaných katecholaminy. Jejich charakteristickými strukturními znaky jsou aminová skupina, katecholové jádro a postranní řetězec z ethylaminu nebo jednoho z jeho derivátů (Feldman et al., 1997). Prekurzorem pro syntézu DA je aromatická aminokyselina tyrozin. Dvě reakce přeměňují tyrozin na DA: první reakcí je tyrozin enzymem tyrozin hydroxylázou (TH) konvertován na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Druhým krokem je dekarboxylace, během níž je DOPA katalyzována aromatickou L-amino acid dekarboxylázou (AADC), která produkuje DA (Feldman et al., 1997). DA tvoří asi 80% obsahu katecholaminů v mozku.

2.5.2. Základní dopaminergní dráhy mozku

Spojení pocházející z mozkových oblastí, které syntetizují tento neurotransmitter vytváří čtyři axonální okruhy: (1) nigro-striatální; (2) mesolimbický; (3) mesokortikální; a (4) tuberoinfundibulární. Spojení které představují nigrostriatální dráhu vychází z dopamin syntetizujících neuronů jádra

středního mozku, substantia nigra compacta, která inervuje dorzální striatum (nucleus caudatus, putamen). Nigrostriální dráha je zahrnuta v kontrole pohybu a její degenerace způsobuje Parkinsonovu chorobu charakterizovanou třesem, strnulostí a akinezi (Gerfen, 1992; Lang, Lozano, 1998). Mesokortikální dráha vystupuje z ventrální tegmentální oblasti a inervuje různé oblasti frontálního kortexu. Tato dráha je zahrnuta v některých procesech učení a paměti (Feldman et al., 1997; Le Moal, Simon, 1991). Mesolimbická dráha začíná ve středním mozku ve ventrální tegmentální oblasti a inervuje ventrální striatum (nucleus accumbens), bulbus olfactorius a části limbického systému (Feldman et al., 1997). Tato dráha má vliv na motivované chování (Koob, 1992; Koob, Bloom, 1988). Spojce tuberoinfundibulární dráhy dosáhnou hypothalamu, kde uvolní DA do perivaskulárních prostorů kapilárního plexu hypothalamo-hypofyzárního portálního systému. DA je tedy transportován do hypothalamu, kde působí na laktotrofy za účelem inhibice vylučování prolaktinu. Tento hormon stimuluje produkci mléka v mléčných žlázách (Feldman et al., 1997; Doppler, 1994). Též stimuluje proliferaci laktotrofů autokrinním mechanismem v hypofýze.

2.5.3. Působení dopaminu na neurony a dopaminové receptory

Dopamin vykonává svůj účinek prostřednictvím vazby na specifické membránové receptory (Gingrich, Caron, 1993), které náleží do rodiny receptorů se sedmi transmembránovými podjednotkami. Pět odlišných dopaminových receptorů (D-Rs) bylo izolováno, charakterizováno a rozděleno do dvou podskupin, D1-like a D2-like receptory, na základě jejich biochemických a farmakologických vlastností. D1-like podskupina zahrnuje D1 a D5 receptory, zatímco D2-like podskupina obsahuje D2, D3 a D4 receptory. C-konec v obou podskupinách má fosforylační a palmitoilační místa, o kterých se domníváme, že jsou zahrnuty v procesu desenzitizace receptorů závisící na agonistovi (Bates et al., 1991; Journot et al., 1987; Ng et al., 1994). Dopaminerní ligand dobře rozlišuje mezi podskupinami D1-like a D2-like receptorů. Ovšem některé ligandy jasně nerozliší jednotlivé receptory v rámci jedné podskupiny. Geny D1-R a D2-R jsou nejrozšířenější a mají nejvyšší hladinu exprese ze všech DA receptorů.

D1-R jsou exprimovány hlavně v nucleus caudatus, putamen, nucleus accumbens, bulbus olfactorius, cerebrálním kortexu a amygdale (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994). Mimo to byly D1 receptory detekovány v Callejových ostrůvcích (densní shluky jader na bázi předního mozku) a v nucleus subthalamicus (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994). Ačkoliv byla v substantia nigra pars reticularis prokázána vazba specifických D1-R ligandů, žádná mRNA nebyla detekována. To naznačuje, že D1-R je syntetizován v striatálních neuronech, které vysílají své výběžky do substantia nigra přes přímou striato-nigrální dráhu. V porovnání s genem pro D1-R má gen pro D5-R omezenější místa exprese. Jeho exprese byla detekována v hipokampu, mamillárním jádru a v hypothalamu (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994). D2 receptor je přednostně exprimován v částech mozku, jako je nucleus caudatus a putamen, bulbus olfactorius a nucleus accumbens. Ale také v substantia nigra pars compacta a ve ventrální tegmentální oblasti. Mimo mozek jsou D2 receptory lokalizovány též v retině, ledvinách, cévním systému a hypofýze (Ng et al., 1994; Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Picetti et al., 1997). Distribuce D3-R je omezena na několik oblastí v mozku, jako jsou Callejovy ostrůvky, několik septálních jader, hypothalamus a oblasti thalamu, mozečku (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994). D4 receptor je vysoce exprimován ve frontálním kortexu, amygdale, bulbus olfactorius, hipokampu, hypothalamu a mesencephalu.

2.5.4. Signální transdukční dráhy zprostředkující působení dopaminu

Signálních transdukčních drah aktivovaných D-R je mnoho. Avšak nejlépe popsané jsou DA zprostředkované aktivace a inhibice cAMP dráhy a modulace Ca^{2+} signalizace. Stimulace celulárních efektorů z DA receptorů je zprostředkována interakcí s heterotrimerními GTP-vázajícími proteiny.

2.5.4.1. Adenylycykláza

Receptory podskupiny D1-like receptorů jsou pozitivními regulátory hladiny cyklického AMP (c-AMP) (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Monsma et al., 1990; Sunahara et al., 1991). Jejich stimulace vyúsťuje v aktivaci

proteinkinasy A (PKA). Ta na oplátku fosforyluje cytoplasmatické a nukleární proteiny, reguluje celulární metabolismus, ovlivňuje funkci iontových kanálů a desenzitizuje transmembránové s G-proteinem spojené receptory vedoucí k buněčné odpovědi na uvolnění neurotransmiteru (Choi et al., 1993; Hofmann et al., 1994). Ovšem inhibice aktivity adenylylcyklázy (AC) je, jak se zdá, vlastností D2-like receptorů. D2-R byl poprvé charakterizován jako inhibitor hladiny intracelulárního cAMP v hypothalamu a buňkách striata. D2-R spouští inhibici AC díky připojení k signálním drahám blokováných pertussis toxinem (PTX) (Gingrich, Caron, 1993; Jacksson, Westlind-Danielsson, 1994). Podobně jako D2-R i D3-R byl popsán jako inhibitor hladiny endogenního cAMP v mnoha buněčných liniích (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998; Robinson, Caron, 1997). Ovšem zdá se, že D3-R inhibuje AC méně účinně než D2-R (Missale et al., 1998). Bylo též publikováno, že D4-R může inhibovat cAMP akumulaci v retině a v mnoha buněčných liniích (Missale et al., 1998).

2.5.4.2. Vápníkové a draslíkové kanály

D1 receptory mobilizují intracelulární zásoby Ca^{2+} aktivací cAMP dráhy aniž by aktivovaly hydrolýzu fosfoinozitudu (PI) (Missale et al., 1998). D2-like receptory mohou přímo modulovat několik odlišných efektorů díky spárování s $G_{i/o\alpha}$ podjednotkami. Bylo demonstrováno, že agonisti D1-like receptorů zvyšují draslíkový proud z kuřecí retinální buňky přes AMP-dependentní mechanismus, ale inhibují tento výlev v krysích striatálních neuronech (Missale et al., 1998). K^+ proud v mnoha nervových tkáních, jako jsou striatum, mesencephalické dopaminergní neurony, laktotrofy, melanotrofy, je regulován aktivací D2-R (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Liu et al., 1996).

2.5.4.3. Arachidonová kyselina

D2-R je může také stimulovat syntézu arachidonové kyseliny (AA). Když se zvýší koncentrace Ca^{2+} , D2-R signalizace může potenciovat syntézu AA v nervových buňkách, zatímco D1-R takový efekt nemá (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Piomelli, 1993).

3. FORMULACE EXPERIMENTÁLNÍCH OTÁZEK

- 1.** Jak postihne systémová aplikace D1 antagonisty SCH23390 a D2 antagonisty sulpiridu lokomoční a prostorové chování v úloze aktivního vyhýbání se místu?
- 2.** Jak se projeví aplikace obou látek na učení v Morrisově vodním bludišti s viditelnou platformou (v testu sensorimotorického/motivačního deficitu)?
- 3.** Jak ovlivní systémová blokáda D1 a D2 receptorů za použití zmíněných látek učení v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem (v testu allothetické prostorové navigace)?

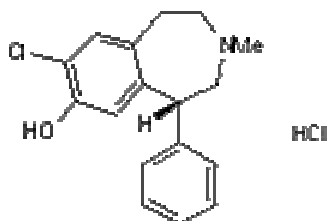
4. EXPERIMENTÁLNÍ METODY

4.1. ZVÍŘATA

Pokusy byly prováděny na tři měsíce starých samcích potkanů (*Rattus norvegicus*) kmene Long-Evans o váhovém rozpětí 250-400 g. Zvířata pocházela z interního chovu Fyziologického ústavu. Byla umístěna do průhledných plastových boxů o rozměrech 25 cm × 30 cm × 45 cm po 2-3 zvířatech. Zvířata byla chována v klimatizované místnosti s konstantní vlhkostí, teplotou 22 °C a řízeným světelným režimem (12 h světlo / 12 h tma; světlo se zapíná v 7:00). Voda a potrava byly během pokusů přístupné *ad libitum*. Experimenty byly prováděny se souhlasem etické komise Fyziologického ústavu a v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání ČR. Pokanům, kteří prováděli úlohu AAPA byl implantován nízkoodporový konektor. Konektor tvořila tenká chirurgická jehla, kterou se propíchl kůže mezi rameny potkana. Ostrý konec jehly byl ustřižen a pomocí pinzety ohnut do malé smyčky. Ta zabránila vypadnutí konektoru a posloužila jako kotva pro svorku, která byla připojena ke kabelu přenášejícímu elektrické šoky.

4.2. POUŽITÉ CHEMICKÉ LÁTKY

D1 antagonist **SCH23390**-((R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochlorid). Látka byla rozpuštěna ve fyziologickém roztoku v koncentracích 0,02mg/ml a 0,05 mg/ml.



Obr. 3. Strukturní vzorec SCH23390

D2 antagonist **sulpirid** ((RS)-(\pm)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxy benzamide). Sulpirid byl rozpuštěn

v koncentracích 30, 60, 100 mg/ml roztoku, a to tak, že chemikálie byla rozpuštěna v ledové kyselině octové a 5 % roztoku glukózy.



Obr. 4. Strukturní vzorec sulpiridu

Oba roztoky byly uchovány v lednici při 4 °C a skladovány maximálně čtyři dny. Obě chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Česká republika.

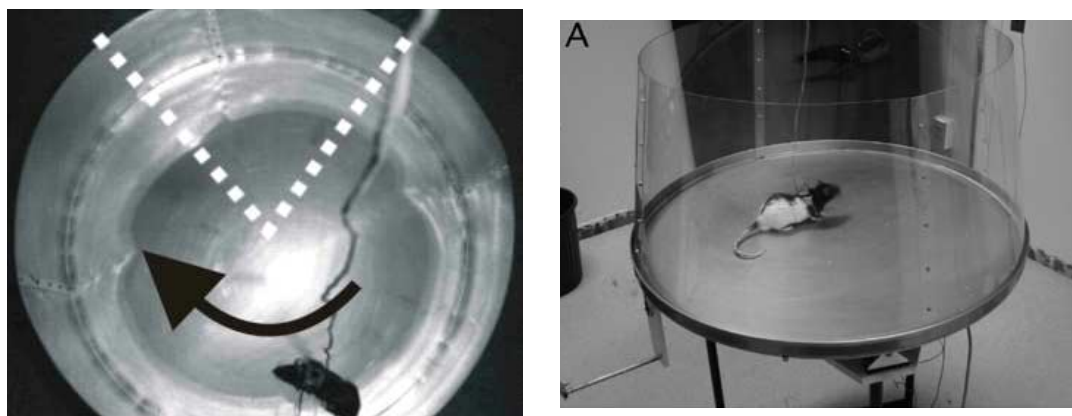
4.3. POKUSNÁ ZAŘÍZENÍ

4.3.1. Aktivní allothetické vyhýbání se místu (AAPA)

Zařízení pro studium AAPA se skládá z hladké kovové kruhové arény (80 cm v průměru) obehnané 30 cm vysokou stěnou z plexiskla, která zabrání potkanovi uniknout z arény a zároveň mu zajistí dobrou viditelnost okolí arény. Aréna je ve výšce 1 m nad zemí v místnosti o velikosti 4 m × 5 m. Místnost obsahuje velké množství mimoarénových orientačních bodů (poličky, okno, stůl, dveře). Nad arénou je zavěšena kamera zachycující infračervené světlo, která přenáší informaci o pozici zvířete na obrazovku počítače. Na vnější straně arény je umístěna infračervené světlo emitující dioda (*light-emitting diode, LED*), která se otáčí společně s arénou a umožňuje sledovat na obrazovce počítače pohyb arény a pozici potkana vzhledem k povrchu arény a/nebo vnějším orientačním bodům. Pozice zvířete a vyznačení zakázaného sektoru (60° výseč) na obrazovce počítače je umožněno sledovacím programem iTrack (Bio-Signal Group, DE, USA) zaznamenávajícím trajektorii zvířete.

Na začátku každého sezení byl potkan umístěn na arénu do míst naproti zakázané oblasti. Potkanovi byl kolem trupu nasazen latexový pásek, na kterém

byla nalepena světlo emitující dioda (*light - emitting diode, LED*). Poté se pomocí počítače spustil sledovací program a aréna rotovala rychlostí 1 otáčky za minutu (1 rpm). Sledovací systém zaznamenával pozici potkana každých 40 ms a ukládal do souboru k pozdější off-line analýze (TrackAnalysis; Bio-Signal Group, DE, USA). Kdykoliv potkan vstoupil do zakázané oblasti na více než 0,5 s, sledovací systém vydal elektrický šok a započítal vstup. Pokud potkan neopustil sektor, dostal každých 1,5 s elektrický šok, ale vstupy se nezapočítaly, dokud potkan neopustil zakázanou oblast na více než 0,5 s. Mírný elektrický šok (50 Hz, 0,5 s, 0,4-0,7 mA) dostal potkan stojící na uzemněné aréně skrz tenký podkožní nízkoodporový konektor. Velikost elektrického proudu byla pro každého potkana individuální, aby bylo dosaženo rychlé únikové reakce ale ne ustrnutí. Experimentální sezení v AAPA trvalo 20 minut a každý potkan měl denně jedno sezení. Celkem trval experiment s každou skupinou skládající se z osmi potkanů čtyři dny. Povrch arény byl po každém zvířeti vyčištěn, takže každý potkan mohl použít pouze své značky. Po skončení pokusu byli potkani vráceni do chovné místnosti.



Obr. 5. Fotografie arény v úloze AAPA. Levý snímek představuje pohled shora na arénu. Černá šipka značí směr rotace arény, vytečkovaná výseč znázorňuje sektor v němž potkan dostává elektrické šoky a který pro něj není viditelný. Pravé foto ukazuje boční pohled na arénu.

4.3.2. Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Morrisovo vodní bludiště tvoří kruhový bazén (187 cm v průměru, 40 cm vysoký) naplněný vodou 20 °C teplou. V bazénu stojí průhledný kruhový ostrůvek (10 cm v průměru). Ostrůvek podle typu řešení úlohy buď vyčnívá 1 cm nad hladinu, nebo je ponořen 1 cm pod hladinou. Po stranách bazénu je označení světových stran. Bazén stojí v místnosti s řadou orientačních bodů, které mohou potkanům pomoci při řešení úlohy. Nad bazénem je zavěšena kamera, která snímá pohyb potkana a přenáší do počítače. Experimentátor může sledovat chování potkana na obrazovce počítače.

Při experimentu byl potkan vypuštěn čelem ke stěně z okraje bazénu postupně ze čtyř světových stran. Jeho úkolem bylo co nejrychleji nalézt ostrůvek. Pokud se mu to do 60 s nepodařilo, byl k cíli naveden experimentátorem. Dráha plavby se zaznamenávala pomocí programu iTrack (Bio-Signal Group, DE, USA) a záznam byl poté využit k off-line analýze (TrackAnalysis; Bio-Signal Group, DE, USA). Každá skupina skládající se z osmi zvířat byla trénována po dobu čtyř dnů. Každý potkan plaval denně osmkrát, z každé světové strany dvakrát (S, N, W, E, S, N, W, E). Po skončení experimentu byly potkani vráceni do chovné místnosti.



Obr. 6. Morrisovo vodní bludiště (MWM)



Obr. 7. Pohled shora na potkana hledajícího ostrůvek v MWM

4.4. TRÉNINK A BEHAVIORÁLNÍ TESTOVÁNÍ ZVÍŘAT

4.4.1. Testování v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu

Každá skupina potkanů skládající se z osmi zvířat byla trénována po dobu čtyř dnů. Každý den prošel potkan pokus pouze jedenkrát. Potkani byli přineseni z chovné místnosti a dostali intraperitoneální (SCH23390) nebo subkutánní (sulpirid) injekci zkoumané látky. Po časovém úseku nutném k účinnému působení látky byl potkanovi nasazen latexový pás s diodou LED a pomocí svorky připevněn ke konektoru umístěnému na kůži mezi rameny potkana. Potkan byl vložen na arénu naproti zakázanému sektoru a aréna se začala po spuštění počítačem otáčet. Pokus trval dvacet minut. Poté byl potkan přemístěn z arény do plastového boxu a umístěn do chovné místnosti. Povrch arény byl vyčištěn, a tak připraven pro pokus s dalším zvířetem.

4.4.2. Testování v Morrisově vodním bludišti

Každá skupina potkanů skládající se z osmi zvířat byla trénována po dobu čtyř dnů. Každý potkan měl denně osm plaveb, z každé světové strany dvakrát (S, N, W, E, S, N, W, E). Všechny osm potkanů bylo postupně testováno z S, poté všichni potkani postupně z N atd. Každý potkan byl vypuštěn z okraje bazénu a hledal ostrůvek. Pokud ho do 60 s nenašel, byl k němu naveden. Dráha jeho pohybu byla zaznamenána počítačem. Potkan byl deset sekund ponechán na ostrůvku, aby se mohl zorientovat. Poté byl přemístěn z bazénu do plastového boxu. Po skončení všech osmi plaveb byl potkan přenesen do chovné místnosti.

4.5. EXPERIMENTÁLNÍ A KONTROLNÍ SKUPINY

Vliv blokády D1 receptorů pomocí látky SCH23390 byl testován v koncentracích účinné látky 0,02 mg/kg a 0,05 mg/kg váhy zvířete. Látka byla potkanům podána intraperitoneálně 20 min. před pokusem. Pro srovnání byla použita skupina, které byl aplikován fyziologický roztok.

Vliv blokády D2 receptorů za pomoci látky sulpiridu byl testován v následujících koncentracích: 30 mg/kg, 60 mg/kg a 100 mg/kg váhy zvířete. Látka byla podána subkutánně mezi ramena 40 min. před pokusem. Pro srovnání byla použita i skupina, které byl aplikován kontrolní roztok, tj. rozpouštědlo sulpiridu, které však neobsahovalo účinnou látku.

4.6. MĚŘENÉ PARAMETRY

Následující parametry byly zaznamenány v průběhu každého dne a analyzovány za účelem stanovení chování potkanů v AAPA. Celková dráha ušlá potkanem během sezení odráží lokomoční aktivitu potkana vůči povrchu arény. Počet vstupů do zakázané oblasti (počet chyb) odráží schopnost řešení této úlohy. Byla měřena i maximální doba, kterou potkan strávil mimo zakázaný sektor mezi dvěma šoky-maximální čas vyhýbání. To odráželo schopnost zapamatovat si umístění zakázané oblasti a vyhnout se jí.

U MWM byla měřena doba, než potkan najde ostrůvek (latence nalezení ostrůvku).

4.7. STATISTIKA

Při vyhodnocování pokusů byly vytvořeny průměry jednotlivých dnů a zvířat a stanovena střední chyba průměru. Data popisující vliv obou látek, tedy sulpiridu a SCH23390, byla analyzována odděleně s použitím odpovídajících kontrolních skupin. Experimenty byly vyhodnocovány dvoufaktorovou analýzou rozptylu (faktory: Dávka x Sezení). Kontrolní skupiny byly rovněž vzájemně porovnány, aby byl vyloučen rozdíl mezi nimi. Srovnání kontrolních skupin bylo provedeno dvoufaktorovou analýzou rozptylu (faktory: Skupina x Sezení).

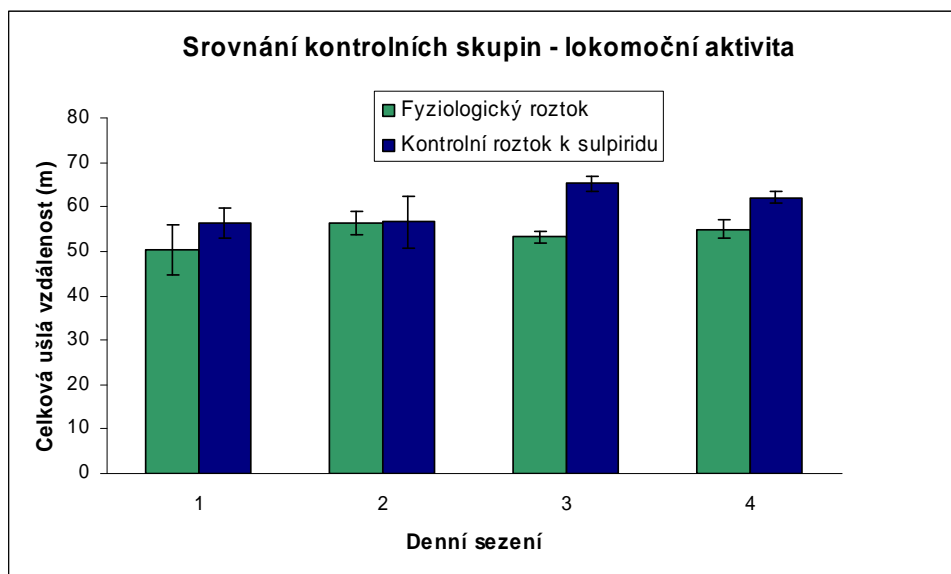
Obě kontrolní skupiny byly porovnány v úloze AAPA a v testu viditelné platformy Morrisově vodního bludiště, s negativním výsledkem, a následně v testu skryté platformy byla již použita jediná kontrolní skupina, jíž byl aplikován kontrolní roztok k sulpiridu.

Pokud byla zjištěna přítomnost signifikance faktorů Dávka nebo Skupina, byly specifické rozdíly mezi jednotlivými dávkami (skupinami) testovány na statistickou významnost pomocí Tukeyho HSD post-hoc testu mnohonásobného porovnání. Za signifikantní byl považován výsledek na 5%-ní hranici statistické významnosti.

5. VÝSLEDKY

5.1. SROVNÁNÍ LOKOMOCE V AAPA U KONTROLNÍCH SKUPIN

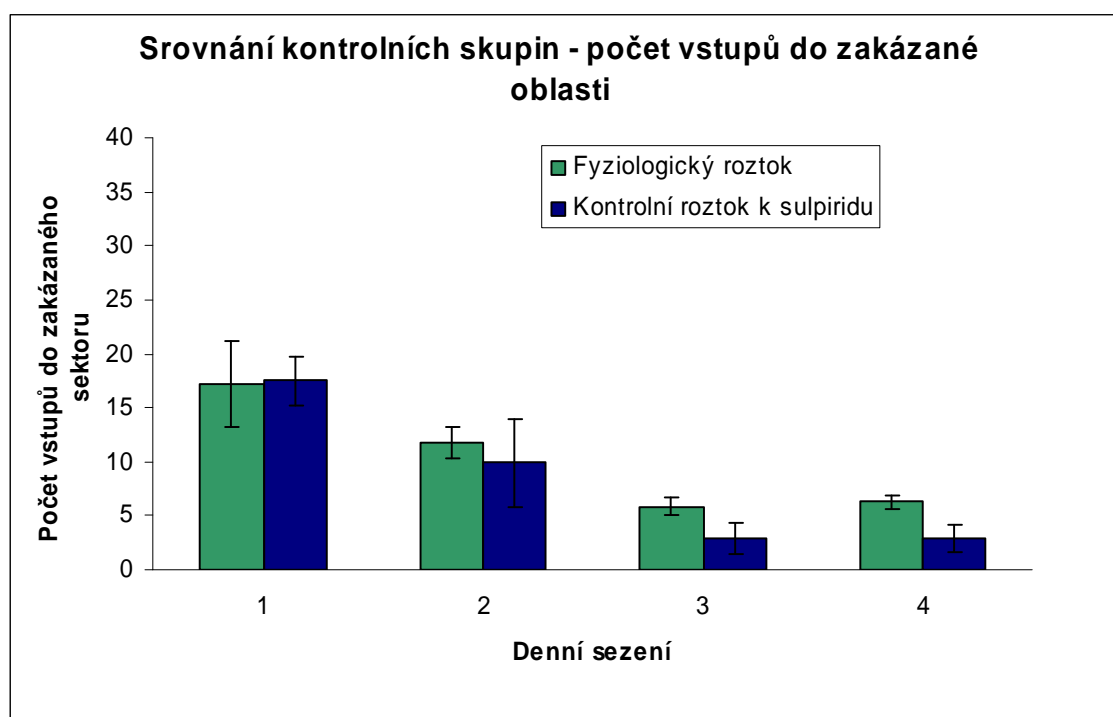
Úvodem jsou porovnány obě kontrolní skupiny, tedy potkani s aplikací fyziologického roztoku jako kontroly k látce SCH23390 a kontrolního roztoku k sulpiridu (viz experimentální metody). Srovnání lokomoční aktivity v úloze AAPA ukázalo, že mezi oběma kontrolními skupinami nebyl rozdíl v celkové ušlé vzdálenosti během sezení, obě skupiny vykazovaly podobnou lokomoční aktivitu. Tento nález byl podpořen dvoufaktorovou analýzou rozptylu (Skupina x Sezení), která neukázala signifikantní efekt faktoru Skupina ($F(1,14)=3,06$; $P > 0,05$) ani efekt faktoru Sezení ($F(3,42)=1,53$; $P > 0,05$) ani interakci mezi těmito dvěma faktory ($F(3,42)=1,27$; $P > 0,05$). Z toho lze usuzovat, že lokomoční aktivita se mezi oběma kontrolními skupinami nelišila a neměnila se ani v průběhu tréninkových sezení.



Graf 1. Lokomoční aktivita u skupiny s aplikovaným fyziologickým roztokem a u skupiny s kontrolním roztokem k sulpiridu. Průměrná ušlá vzdálenost za jedno sezení (průměr \pm S.E.M.) u potkanů s fyziologickým roztokem a u potkanů s kontrolním roztokem k sulpiridu. Lokomoční aktivita se mezi oběma skupinami výrazně nelišila. Během tréninku nedošlo k jejímu zlepšení. Počet zvířat v každé skupině byl osm.

5.2. SROVNÁNÍ POČTU VSTUPŮ DO ZAKÁZANÉ OBLASTI U KONTROLNÍCH SKUPIN

Obě kontrolní skupiny se statisticky významně nelišily ani v prostorově specifickém parametru počtu vstupů do zakázaného sektoru, což bylo potvrzeno opět dvoufaktorovou analýzou rozptylu (Skupina x Sezení), která neukázala signifikantní efekt faktoru Skupina ($F(1,14)=0,62$; $P > 0,05$), ale ukázala statisticky významný vliv faktoru Sezení ($F(3,42)=18,28$; $P < 0,05$). Interakce mezi těmito dvěma faktory nebyla prokázána ($F(3,42)=0,32$; $P > 0,05$). To ukazuje, že během učení došlo ke zlepšování v tomto parametru u obou kontrolních skupin.



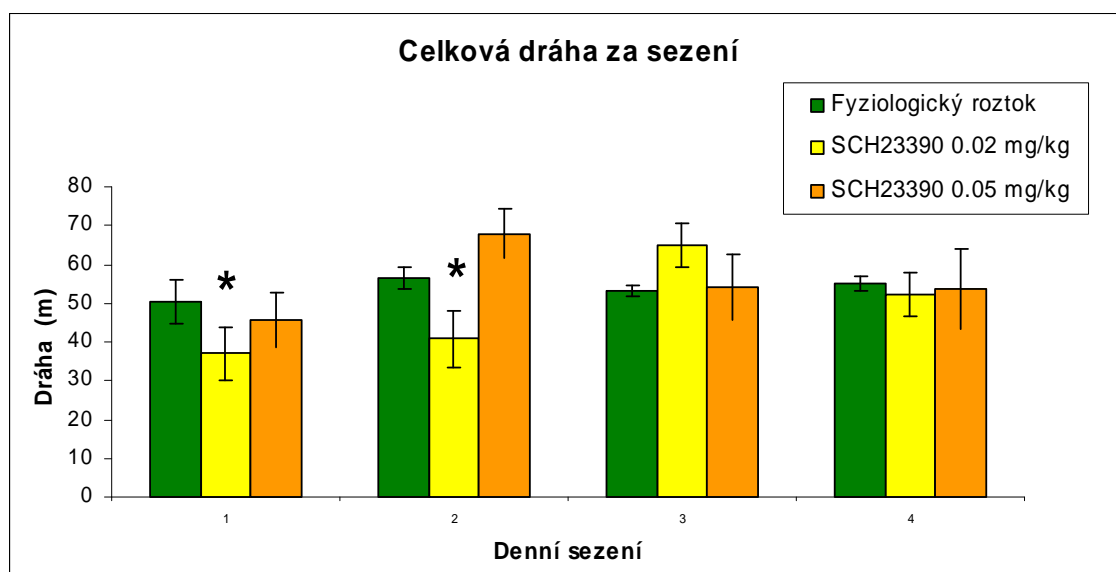
Graf 2. Srovnání počtu vstupů do zakázané oblasti u skupiny s aplikovaným fyziologickým roztokem a u skupiny s kontrolním roztokem k sulpiridu. Průměrný počet vstupů do zakázané oblasti (průměr \pm S.E.M.) u zvířat s fyziologickým roztokem a u zvířat s kontrolním roztokem k sulpiridu. Skupiny se statisticky významně nelišily v počtu vstupů. V průběhu tréninku došlo ke zlepšení v tomto parametru. Počet zvířat v každé skupině byl osm.

5.3. VLIV SCH23390 NA UČENÍ (ACQUISITION) V ÚLOZE AAPA

Kontrolní potkani dosáhli během 4 experimentálních sezení poměrně dobré úrovně výkonnosti, zatímco zvířata, kterým byl aplikován D1 antagonista SCH23390, dosahovala horších výsledků. Kromě prostorových parametrů u některých z nich došlo také ke snížení lokomoce.

5.3.1. Vliv SCH23390 na lokomoci

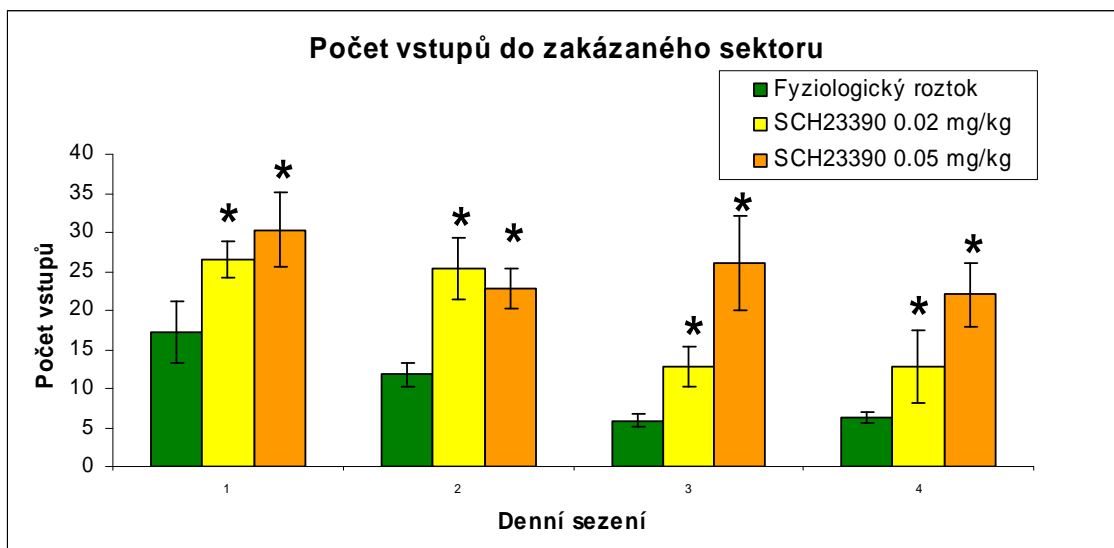
Pokud byla hodnocena lokomoční aktivita, tedy celková ušlá vzdálenost během sezení, dvoufaktorová analýza rozptylu (faktory Dávka x Sezení) ukázala signifikantní efekt faktoru Dávka ($F(2,21)=5,30$; $P < 0,05$), avšak neodhalila efekt faktoru Sezení ($F(3,63)=1,88$; $P > 0,05$). Post-hoc test ukázal, že skupina, které byla aplikována nižší dávka SCH23390 (0,02 mg/kg), vykazovala nižší vzdálenost ušlou během sezení, a to v prvních dvou sezeních.



Graf 3. Vliv aplikace SCH23390 na celkovou dráhu ušlou během sezení. Průměrná ušlá vzdálenost za jedno sezení (průměr \pm S.E.M.) u potkanů kterým byl aplikován fyziologický roztok a SCH23390 v dávkách 0,02 a 0,05 mg/kg. Zvířata s nižší dávkou vykazovala sníženou lokomoci, avšak pouze v prvních dvou sezeních. Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

5.3.2. Vliv SCH23390 na počet vstupů do zakázané oblasti

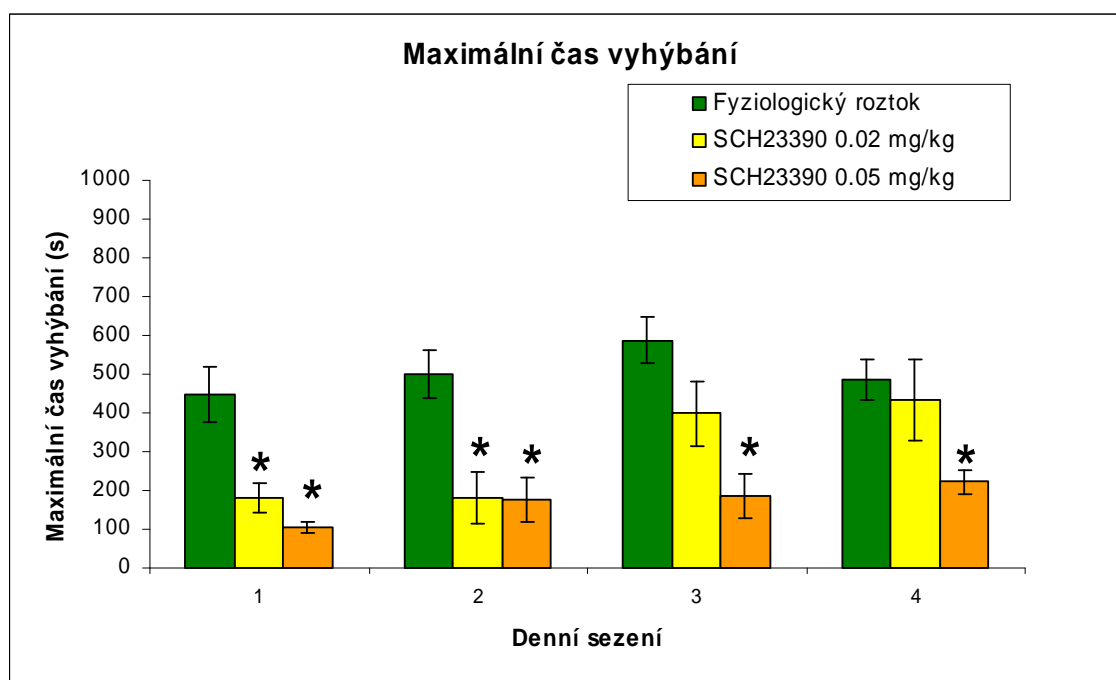
Pokud jde o hodnocení počtu vstupů do zakázané oblasti, obě skupiny s aplikací SCH23390 dosáhly horších výsledků než kontrolní potkani, což bylo potvrzeno dvoufaktorovou analýzou rozptylu (faktory Dávka x Sezení), která ukázala signifiaktní efekt faktoru Dávka ($F(2,21)=14,65$; $P < 0,05$) a rovněž signifikantní efekt faktoru Sezení ($F(3,63)=7,15$; $P < 0,05$). Post-hoc test na faktor Dávka ukázal, že zvířata s oběma dávkami SCH23390 (0,02 a 0,05 mg/kg) měla signifikantně vyšší počet vstupů do zakázané oblasti než kontrolní potkani.



Graf 4. Vliv aplikace SCH23390 na počet chyb. Průměrný počet vstupů (průměr ± S.E.M.) do zakázaného sektoru u kontrolních zvířat a po aplikaci SCH23390. Z grafu je patrné, že obě dávky SCH23390 způsobily zvýšení počtu vstupů (chyb), a to ve všech experimentálních sezeních. Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

5.3.3. Vliv SCH23390 na maximální čas vyhýbání

Pokud se týká maximálního času vyhýbání, bylo zjištěno, že potkani, kterým byl aplikován D1 antagonista SCH23390, dosahovali v tomto parametru horších výsledků než kontrolní zvířata, kterým byl aplikován fyziologický roztok. Rozdíl mezi skupinami byl potvrzen dvoufaktorovou analýzou rozptylu, která ukázala signifikantní vliv faktoru Dávka ($F(2,21)=15,48$; $P < 0,05$) a faktoru Sezení ($F(3,63)=12,77$; $P < 0,05$). Rovněž byla detekována statisticky významná interakce mezi těmito dvěma faktory ($F(6,63)=2,80$; $P < 0,05$). Post-hoc Tukeyho test ukázal, že obě skupiny, jimž bylo aplikováno SCH23390, vykazovaly v tomto parametru horší výsledky než kontrolní skupina.

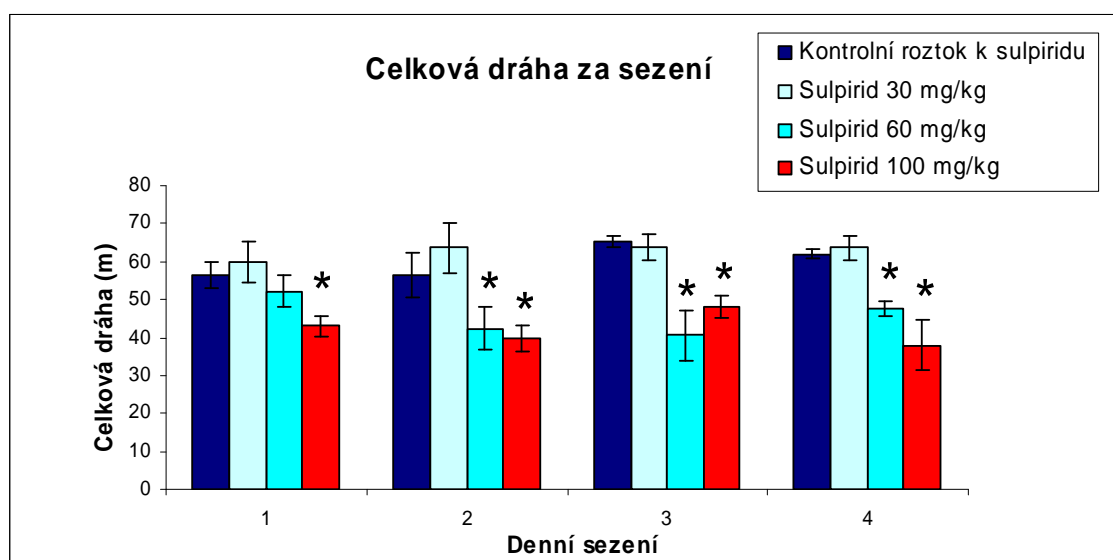


Graf 5. Vliv aplikace SCH23390 na maximální čas vyhýbání. Graf znázorňující průměrný maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru (průměr \pm S.E.M.) u kontrolní skupiny a dvou skupin s různými dávkami SCH23390. Z grafu je zřejmé, že obě dávky SCH23390 (0,02 mg/kg a 0,05 mg/kg) způsobily zhoršení prostorové orientace v tomto parametru, přičemž u nižší dávky je patrné zlepšení během tréninku (přítomnost interakce). Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

5.4. VLIV SULPIRIDU NA UČENÍ V ÚLOZE AAPA

5.4.1. Vliv sulpiridu na lokomoci

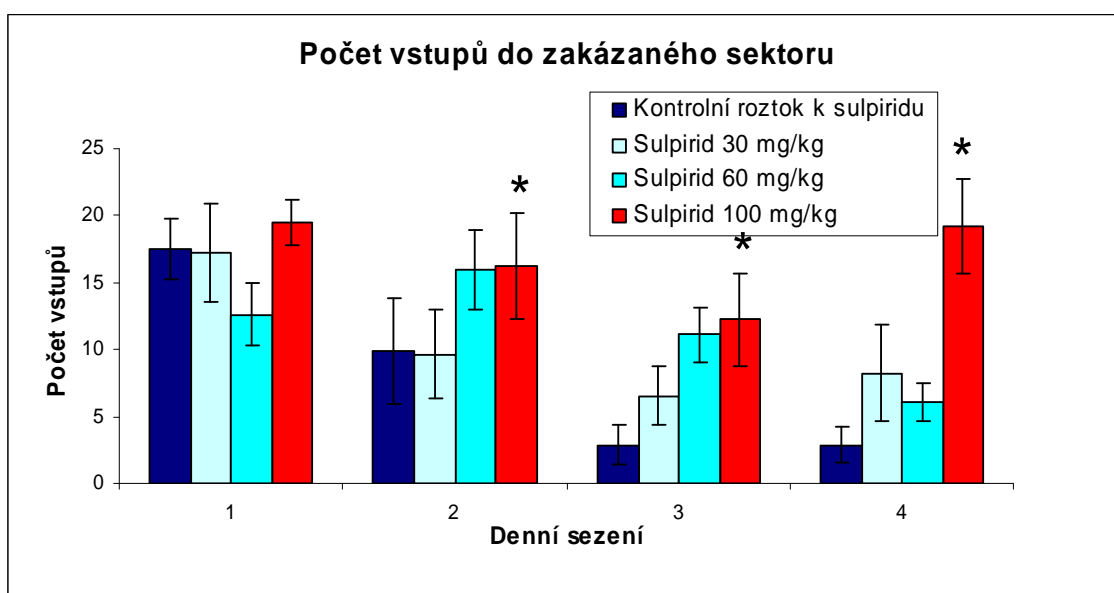
Potkani, kterým byl aplikován sulpirid, byli méně aktivní než kontrolní potkani, což bylo potvrzeno analýzou ušlé vzdálenosti během sezení. Celková ušlá vzdálenost byla kratší u zvířat s dávkami 60 mg/kg a 100 mg/kg. Dvoufaktorová analýza rozptylu (Dávka x Sezení) ukázala statisticky významný efekt Dávky ($F(3,28)=8,21$; $P < 0,05$), avšak neukázala efekt Sezení ($F(3,84)=0,74$; $P > 0,05$). Interakce mezi těmito dvěma faktory rovněž nebyla prokázána ($F(9,84)=1,52$; $P > 0,05$). Tukeyho post-hoc test ukázal, že skupiny Sulpirid 60 mg/kg a Sulpirid 100 mg/kg ušly během sezení signifikantně kratší celkovou dráhu než kontrolní potkani.



Graf 6. Vliv sulpiridu na lokomoční aktivitu. Graf znázorňuje vliv sulpiridu na průměrnou celkovou vzdálenost ušlou za jedno sezení (průměr \pm S.E.M.). Z obrázku je patrné, že střední a vyšší dávka sulpiridu (tj. 60 mg/kg a 100 mg/kg) snížily lokomoční aktivitu zvířat. Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

5.4.2. Vliv sulpiridu na počet vstupů do zakázaného sektoru

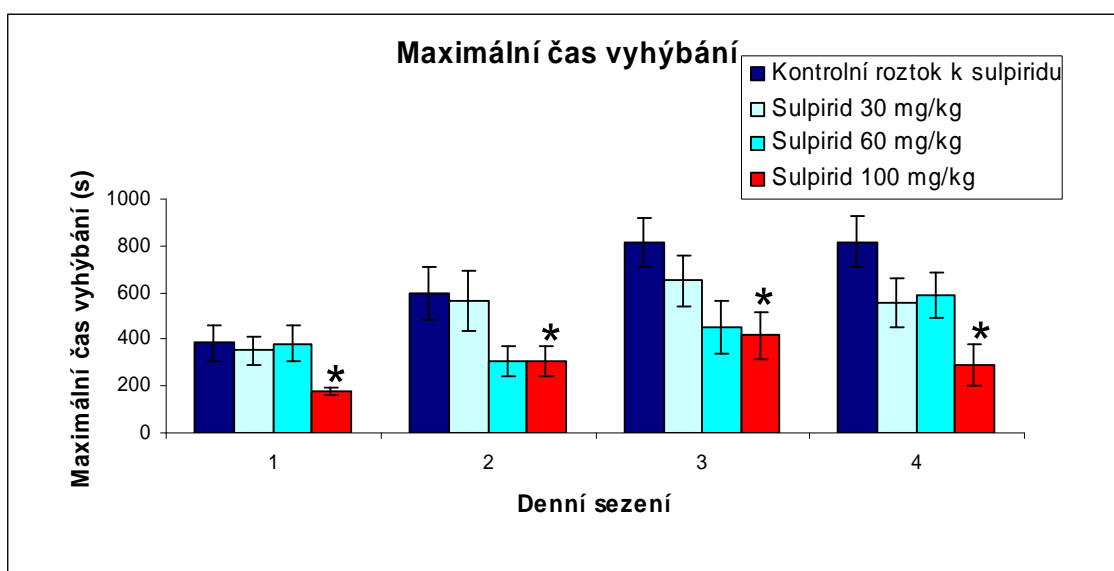
Analýza počtu chyb – počtu vstupů do zakázané oblasti ukázala, že k signifikantnímu zvýšení tohoto parametru v důsledku aplikace sulpiridu nedošlo. Dvoufaktorová analýza rozptylu (Dávka x Sezení) neukázala signifikantní efekt faktoru Dávka ($F(3,28)=2,62$; $P > 0,05$), avšak ukázala statisticky významný efekt faktoru Sezení ($F(3,84)=10,48$; $P < 0,05$) a signifikantní interakci mezi těmito dvěma faktory ($F(9,84)=2,21$; $P < 0,05$). Post-hoc Tukeyho test ukázal, že kontrolní potkani a potkani s nižší (30 mg/kg) a střední dávkou (60 mg/kg) sulpiridu se během tréninku zlepšovali, na rozdíl od potkanů s vyšší dávkou sulpiridu.



Graf 7. Vliv sulpiridu na počet chyb. Graf znázorňuje vliv sulpiridu (v dávkách 30 mg/kg, 60 mg/kg a 100 mg/kg) na počet vstupů do zakázaného sektoru (průměr \pm S.E.M.). Zhoršení prostorové orientace měřené počtem vstupů je patrné až u nejvyšší dávky sulpiridu (přítomnost interakce), nižší a střední dávka počet vstupů statisticky významně nezvyšují. Počet zvířat v každé skupině byl osm. $*P < 0,05$

5.4.3. Vliv sulpiridu na maximální čas vyhýbání

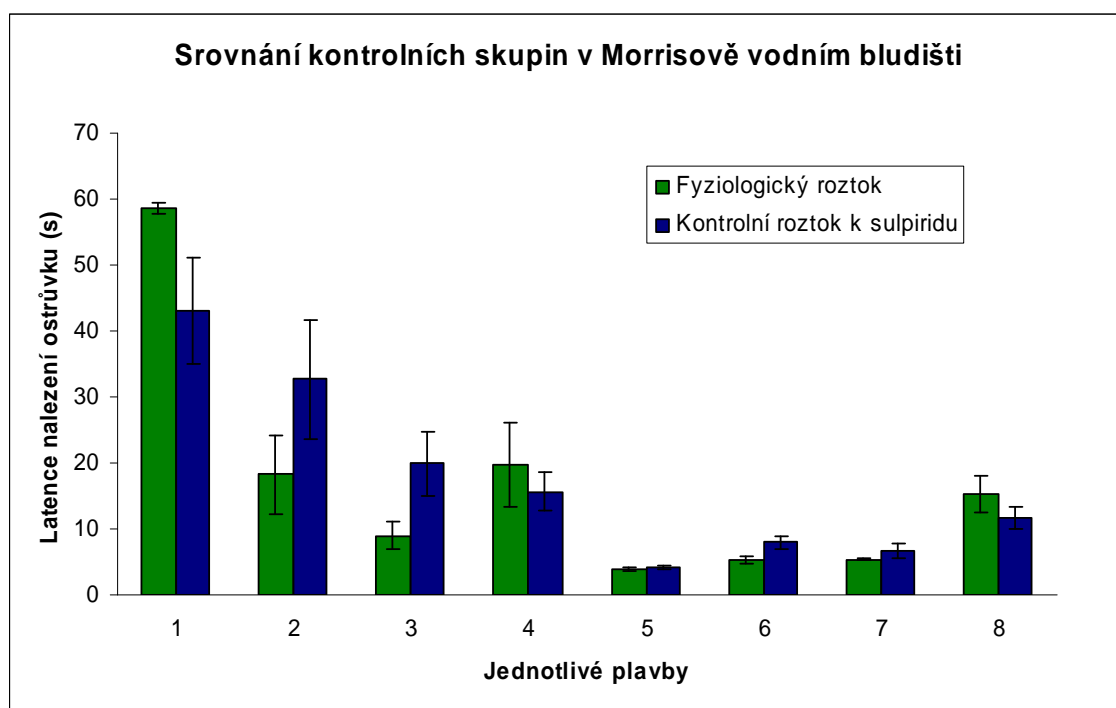
Při analyzování maximálního času stráveného v aréně (MAX T), měli nejhorší výsledky potkani s aplikovanou nejvyšší dávkou sulpiridu. Dvoufaktorová analýza rozptylu odhalila signifikantní hlavní efekt Dávky ($F(3,28)=3,51$; $P < 0,05$) a signifikantní efekt Sezení ($F(3,84)=10,77$; $P < 0,05$), avšak žádná interakce nebyla nalezena ($F(9,84)=1,51$; $P > 0,05$). Post-hoc test ukázal, že skupina Sulpirid 100 mg/kg měla signifikantně horší výkon než kontroly ($P < 0,05$). Co se týče rozdílů mezi denními sezeními, v sezení 1 byly všechny skupiny horší než v sezení 3 a 4 ($P < 0,05$), což naznačuje zlepšení výkonu během tréninku.



Graf 8. Vliv sulpiridu na maximální čas vyhýbání. Tento graf znázorňuje vliv sulpiridu na průměrný maximální čas vyhýbání za dané sezení (průměr \pm S.E.M.). Zhoršení je patrné pouze u nejvyšší dávky sulpiridu (100 mg/kg), a to ve všech experimentálních sezeních (absence interakce). Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

5.5. SROVNÁNÍ LATENCÍ K NALEZENÍ VIDITELNÉHO OSTRŮVKU V MWM U KONTROLNÍCH SKUPIN

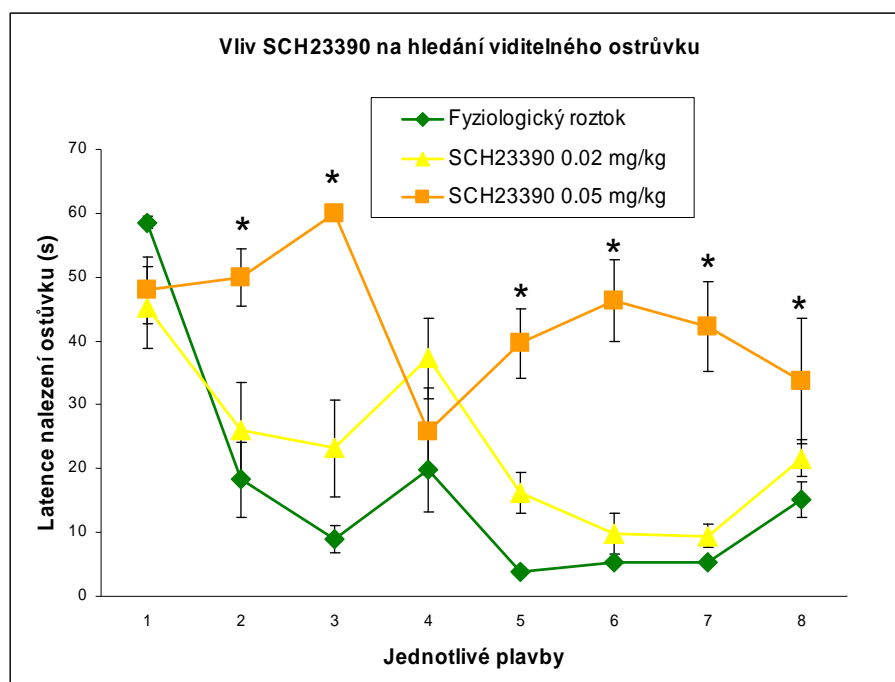
Pokud byla srovnávána latence k nalezení viditelného ostrůvku u skupiny, které byl aplikován fyziologický roztok, a u skupiny s kontrolním roztokem k sulpiridu, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi těmito skupinami. Dvoufaktorová analýza rozptylu (Skupina x Plavba) neukázala statisticky významný vliv faktoru Skupina ($F(1,6)=0,08$; $P > 0,05$), ukázala signifikantní efekt faktoru Plavba ($F(7,42)=9,86$; $P < 0,05$) a nenalezla interakci mezi těmito dvěma faktory ($F(7,42)=0,91$; $P > 0,05$). Signifikantní efekt faktoru Plavba ukazuje na zlepšující se učení během tréninku u obou zkoumaných skupin.



Graf 9. Latence k nalezení viditelného ostrůvku u skupiny s aplikovaným fyziologickým roztokem a u skupiny s kontrolním roztokem k sulpiridu. Průměrná doba k nalezení viditelného ostrůvku při jednotlivých plavbách (průměr \pm S.E.M.) u zvířat s fyziologickým roztokem a zvířat s kontrolním roztokem k sulpiridu. Mezi skupinami nejsou statisticky významné rozdíly v tomto parametru. U obou skupin dochází ke zlepšení učení během tréninku. Počet zvířat v každé skupině byl čtyři.

5.6. VLIV SCH23390 NA UČENÍ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI S VIDITELNÝM OSTRŮVKEM – TESTU SENZORIMOTORICKÉHO A MOTIVAČNÍHO POŠKOZENÍ

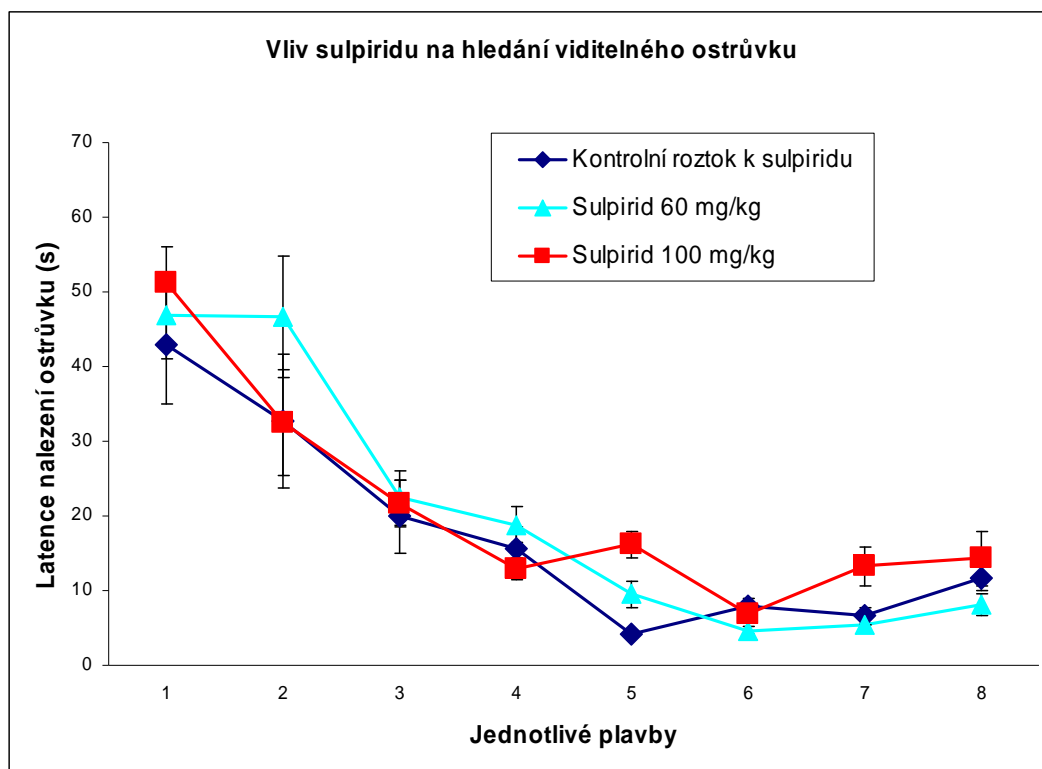
Analýza vlivu D1 antagonisty SCH23390 ukázala, že vyšší dávka SCH23390 narušovala orientaci v testu viditelné platformy ve vodním bludišti, nižší dávka nikoliv. Dvoufaktorová analýza rozptylu ukázala signifikantní efekt faktoru Dávka ($F(2,9)=7,33$; $P < 0,05$), rovněž signifikantní efekt faktoru Plavba ($F(7,63)=6,80$; $P < 0,05$) a signifikantní interakci mezi těmito dvěma faktory ($F(14,63)=2,73$; $P < 0,05$). Post-hoc Tukeyho test ukázal, že skupina SCH23390 0,05 mg/kg dosahovala signifikantně horších výsledků než kontrolní skupina. Post-hoc test rovněž ukázal zlepšování latence nalezení ostrůvku v závislosti na faktoru Plavba.



Graf 10. Vliv SCH23390 na nalezení viditelného ostrůvku v MWM. Průměrná latence nalezení viditelného ostrůvku (průměr \pm S.E.M.) při aplikaci SCH23390 v dávkách 0,02 a 0,05 mg/kg. Vyšší dávka narušovala orientaci v bludišti a způsobila signifikantně horší výsledky než jaké mají kontroly. V průběhu tréninku docházelo ke zlepšení nalezení ostrůvku. Počet zvířat v každé skupině byl čtyři. * $P < 0,05$

5.7. VLIV SULPIRIDU NA UČENÍ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI S VIDITELNÝM OSTRŮVKEM – TESTU SENZORIMOTORICKÉHO ČI MOTIVAČNÍHO POŠKOZENÍ

Pokud se jedná o vliv sulpiridu na naučení se hledání viditelného ostrůvku, žádná z dávek sulpiridu (30, 60 a 100 mg/kg) nezpůsobila signifikantní prodloužení latence nalezení ostrůvku. Potvrdila to ANOVA (Dávky x Plavby), která neukázala efekt faktoru Dávka ($F(2,9)=0,80$, $P > 0,05$), avšak ukázala vliv faktoru Plavba ($F(7,63)=13,71$; $P < 0,05$). Interakce mezi těmito dvěma faktory nebyla prokázána ($F(14,62)=0,39$; $P > 0,05$). Post-hoc Tukeyho test faktoru Plavby ukázal, že všechny skupiny dosahovaly v plavbách 3-8 lepších výsledků než v plavbách 1 a 2.



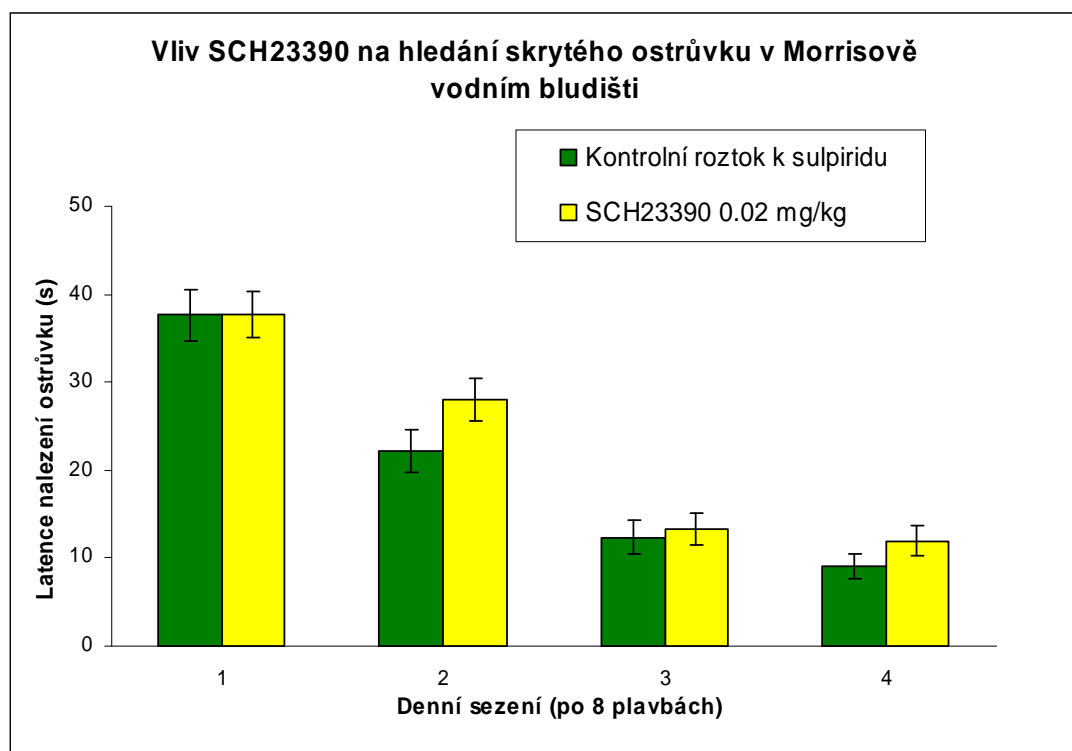
Graf 11. Vliv sulpiridu na nalezení viditelného ostrůvku v MWM. Graf vyjadřuje průměrnou latenci nalezení ostrůvku v jednotlivých plavbách (průměr \pm S.E.M.). Žádná z dávek nezpůsobila signifikantní prodloužení latence. Během tréninku docházelo ke zlepšení nalezení ostrůvku. Počet zvířat v každé skupině byl čtyři.

5.8. TEST VIDITELNÉ PLATFORMY VMWM, TEST SENZORIMOTORICKÉHO A MOTIVAČNÍHO DEFICITU – POZNÁMKA

Tyto výsledky lze shrnout tak, že ani jedna z dávek D2 antagonisty sulpiridu nezpůsobovala poškození navigace vzhledem k viditelné platformě, nižší dávka D1 antagonisty SCH23390 také ne, ale vyšší dávka SCH23390 takovéto poškození způsobila. Z uvedeného lze vyvodit, že sulpirid nezpůsobuje v žádné z dávek obecnější poškození (senzorimotorický či motivační deficit), zatímco látka SCH23390 v dávce 0,05 mg/kg takovéto obecnější poškození způsobuje. V následující fázi studie, tedy testování navigace vzhledem ke skrytému ostrůvku, jsme se tedy zaměřili na testování vlivu sulpiridu ve třech výše uvedených dávkách (30, 60, 100 mg/kg) a látky SCH23390 v dávce 0,02 mg/kg.

5.9. VLIV SCH23390 NA UČENÍ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI SE SKRYTÝM OSTRŮVKEM – TESTU PROSTOROVÉ KOGNICE

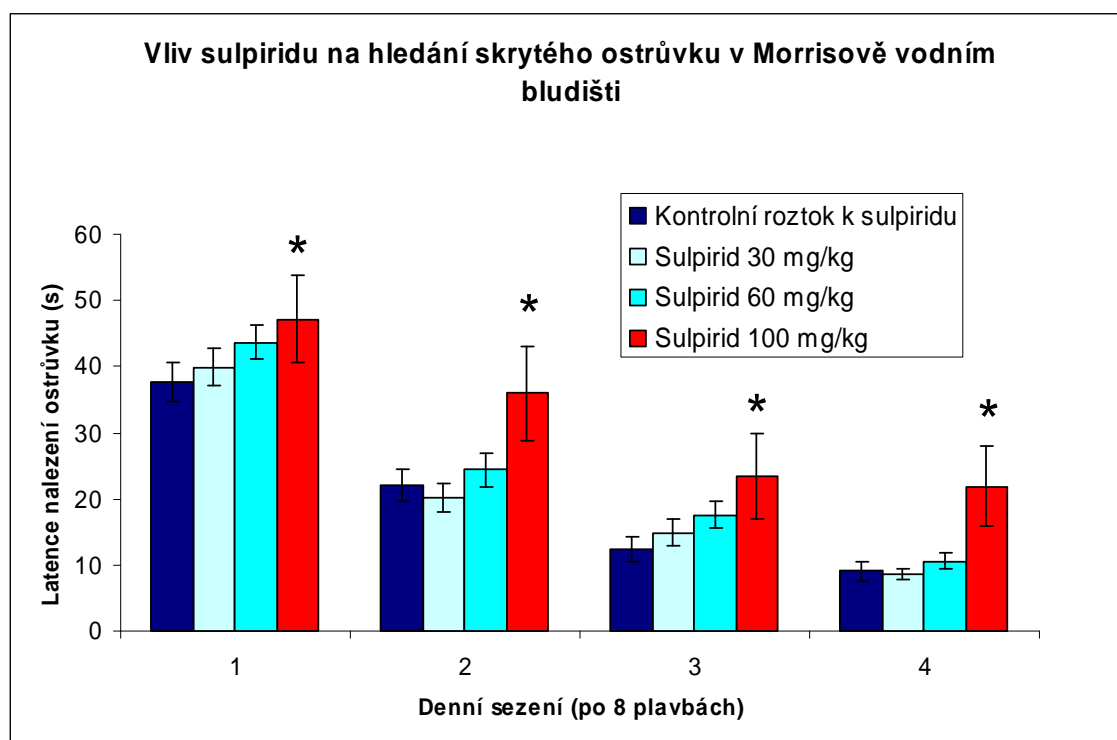
Mezi zvířaty s nižší dávkou SCH23390 (0,02 mg/kg) a kontrolními potkany nebyl nalezen rozdíl v prostorové orientaci měřené latencí nalezení skrytého ostrůvku. Tyto latence se u obou skupin statisticky významně nelišily. To bylo potvrzeno třífaktorovou analýzou rozptylu (Dávka x Plavba x Sezení), která nenalezla signifikantní vliv faktoru Dávka ($F(1,14)=0,74$, $P > 0,05$), avšak našla statisticky významný efekt faktoru Plavba a rovněž faktoru Sezení ($F(7,98)=34,45$; $P < 0,05$ a $F(3,42)=10,09$; $P < 0,05$). Tyto významné rozdíly v rámci faktorů Plavby a Sezení reprezentují postupné učení v obou skupinách zvířat.



Graf 12. Vliv SCH23390 na hledání skrytého ostrůvku. Na grafu je ukázána průměrná latence k nalezení skrytého ostrůvku (průměr \pm S.E.M.). Mezi kontrolními potkany a potkany s SCH23390 v dávce 0,02 mg/kg nebyl v tomto parametru nalezen rozdíl. U obou skupin došlo v rámci tréninku ke zlepšení výkonu. Počet zvířat v každé skupině byl osm.

5.10. VLIV SULPIRIDU NA UČENÍ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI SE SKRYTÝM OSTRŮVKEM – TESTU PROSTOROVÉ KOGNICE

Sulpirid měl na učení nalézání skrytého ostrůvku vliv pouze v nejvyšší testované dávce (100 mg/kg), dvě nižší dávky neporušily kognici měřenou jako tato latence. Třífaktorová analýza rozptylu potvrdila signifikantní efekt faktoru Dávka ($F(3,28)=4,49$; $P < 0,05$) zároveň ukázala efekt faktoru Plavba ($F(7,196)=74,74$; $P < 0,05$) a také signifikantní efekt faktoru Sezení ($F(3,84)=26,5$; $P < 0,05$). Interakce mezi těmito faktory nebyla prokázána. Post-hoc Tukeyho test ukázal, že skupina s nejvyšší dávkou sulpiridu vykazovala statisticky významně delší latence k nalezení ostrůvku než kontrolní zvířata.



Graf 13. Vliv sulpiridu na nalezení skrytého ostrůvku v MWM. Znáznorněna je průměrná latence nalezení skrytého ostrůvku v jednotlivých dnech (průměr \pm S.E.M.). Skupina s nejvyšší dávkou vykazovala statisticky významně delší latence nalezení ostrůvku. Naopak obě nižší dávky latenci nepoškodily. Počet zvířat v každé skupině byl osm. * $P < 0,05$

6. DISKUZE

6.1. VLIV BLOKÁDY D1 RECEPTORŮ LÁTKOU SCH23390 NA LOKOMOCI A PROSTOROVÉ CHOVÁNÍ V ÚLOZE AAPA A V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI

Výsledky předkládané diplomové práce ukazují, že systémové podání antagonisty D1-like receptorů SCH23390 v dávkách 0,02 a 0,05 mg/kg signifikantně poškozuje učení v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu. Obě dávky způsobily zhoršení prostorové orientace a dávka 0,02 mg/kg navíc i snížení lokomoce. Snížená lokomoce pozorovaná po aplikaci nižší dávky možná přispívá k behaviorálnímu deficitu, avšak potkani s dávkou SCH23390 byli stále schopni ujít přibližně 50 m za sezení. To naznačuje, že jejich lokomoce byla postačující pro řešení úlohy. V důsledku systémového podání látky SCH23390 není možné jasně říci, který mechanismus je zodpovědný za inhibici lokomoce po podání nižší dávky. Pokud se zaměříme na efekt SCH23390 na prostorové chování, jsou tyto výsledky v souladu se studií Liao et al. (2002), kteří demonstrovali deficit prostorové navigace po systémovém podání látky SCH23390 u potkanů, kteří řešili úlohu radiálního bludiště.

Je třeba otevřeně říci, že za behaviorální deficit pozorovaný v této studii nemusí být zodpovědná pouze narušená kognice v důsledku aplikace SCH23390. V úloze AAPA dostávají potkani elektrické šoky, což pro ně znamená stres. Jak bylo demonstrováno, stres indukuje výlev dopaminu (Stoof et al., 1992). Centrální blokáda dopaminových receptorů pomocí SCH23390 může blokovat postsynaptické působení stresově, v závislosti na uvolňovaném dopaminu na příslušných synaptických zakončeních. Navíc by mohla tato blokáda interferovat s motivací potkana, nicméně vizuální pozorování potkanů v aréně, kdy reagovali na elektrické šoky únikovou reakcí, naznačuje, že percepce šoků a tedy negativní motivace zůstala zachována i po aplikaci D1 antagonisty.

Zcela zásadním aspektem chápání funkce D1 receptorů je jejich účast ve vyšších kognitivních procesech, především pracovní paměti, orientované pozornosti a exekutivních funkcí (Williams a Castner, 2006). Funkce D1

receptorů je úzce svázána s oblastí prefrontální kůry (PFC), která zahrnuje neuronální obvody kritické pro správné fungování vyšších kognitivních procesů. Prvotním zjištěním významné úlohy D1 receptorů v pracovní paměti bylo zjištění Brozoskiho et al. (1979), kteří ukázali, že 6-hydroxydopaminové léze dopaminergních neuronů v PFC nebo lokální podání antagonisty D1 receptorů (Sawaguchi, Goldman-Rakic, 1994) způsobuje u primátů deficit pracovní paměti. Steele et al. (1996) ukázali, že SCH23390 blokuje uvolnění acetylcholinu ve striatu a prefrontálním kortexu, což může způsobit zhoršení kognitivních funkcí experimentálních zvířat. V jedné z nedávných studií (Vales, Stuchlík, 2005) bylo ukázáno, že rovněž blokáda muskarinových acetylcholinových receptorů poškodila učení v úloze AAPA. Je tedy možné, že takovýto mechanismus může být alespoň částečně zodpovědný za behaviorální deficit po podání SCH23390 pozorovaný v této studii.

Je možné, že v předkládané diplomové práci SCH23390 po systémové aplikaci interferuje s účinným výkonem v úloze AAPA kvůli snížené dopaminergní D1 neurotransmisi v neokortikálních oblastech, hlavně v prefrontálním kortexu. Nicméně efekt SCH23390 na ostatní oblasti mozku nemůže být vyloučen.

Stuchlík a Valeš (2006) ve své studii zkoumali roli dopaminových D1 receptorů v prostorové kognici použitím systémové aplikace agonisty D1 receptorů A77636. Byly aplikovány následující dávky A77636: 0,1 a 0,5 mg/kg. Na PFC a též na hipokampu je závislá kognitivní koordinace, která hraje roli v efektivní orientaci v úloze AAPA. Existuje koncept nelineárního vztahu mezi intenzitou dopaminergní D1 transmise v PFC a účinností kognitivních procesů. Zdá se, že je zde specifické rozpětí aktivity D1 transmise podmiňující optimální výkon v kognitivních úlohách (Williams, Castner, 2006). Výsledky studie Stuchlíka a Valeše ukazují, že aplikace nižších dávek A77636 zlepšila účinnost prostorového chování. Vysoká dávka A77636 (1,0 mg/kg) signifikantně zvýšila lokomoční aktivitu, ale nevyvolala signifikantní změny v účinnosti prostorového chování. Tyto výsledky, stejně jako výsledky předkládané diplomové práce

popisující efekt D1 antagonismu na prostorové chování, podporují představu, že mozkový dopaminergní D1 neurotransmiterový systém moduluje neurální procesy podléhající prostorové kognici. Stuchlík (2007) dále prováděl pokusy, při kterých potkani prošli nejprve pretréninkem bez aplikace látek, aby si zvykli na úlohu, a poté jim aplikoval D1 receptorového agonistu A77363. Předpokládalo se, že zlepšující efekt D1 agonisty A77363 na kognici, prezentovaný v jeho předchozí studii, bude eliminován pomocí pretréninku, ve kterém nebyla potkanům aplikována žádná látka. Intaktní pretrénink eliminoval efekt A77363.

Pokud se jedná o chování v Morrisově vodním bludišti, výsledky předkládané diplomové práce, které popisují chování po aplikaci SCH23390 v Morrisově vodním bludišti, ukazují, že vyšší použitá dávka SCH23390, tedy 0,05 mg/kg, poškozuje sensorimotorické či kognitivní funkce, což je naznačeno zhoršením navigace k viditelné platformě. Tento test procedurálního aspektu MWM je zhoršen aplikací vyšší dávky SCH23390, avšak nižší dávka na tento test neměla vliv. Zároveň je třeba říci, že nižší dávka SCH23390, tedy 0,02 mg/kg, nepoškozovala test skrytého ostrůvku v MWM, který je považován za test kognitivních funkcí.

Vliv vyšší dávky SCH23390 na lokomoci je v souladu se studií popisující vliv SCH23390 na lokomoční aktivitu a katalepsii. Tato studie (Meyer et al., 1993) popisuje dávkově závislé snížení lokomoce se signifikantními periodami nehybnosti, které se projevuje v dávkách vyšších než 0,03 mg/kg.

Prací, které se zabývají vlivem SCH23390 na učení v Morrisově vodním bludišti, je málo. Práce O'Carroll et al. (2006) ukázala poškození výkonu úlohy jako funkci zpoždění vybavení paměti (*delay - dependent impairment*). Bilaterální intrahipokampální infuze SCH23390 před první plavbou neměla na výkon v druhé plavbě, která se konala po 20 minutách, žádný vliv. Avšak způsobila blok paměti po 6 hodinách. Pozdější experimenty odhalily, že infuze SCH23390 okamžitě po první plavbě neměla vliv na retenci o 6 hodin později a zhoršená paměť byla pozorována po delším intervalu. Tyto výsledky ukazují, že aktivace D1-like receptorů během kódování paměti je nutná pro formování dlouhodobější nebo

dokonce trvalé paměťové stopy v hipokampu. V literatuře popsané efekty D1-like receptorové blokády na trvání LTP a paměti jsou shodné s myšlenkou, že změny v síle synapse tvoří základ paměti.

Lze shrnout, že nalezený výsledek, totiž že systémová blokáda poškozuje navigaci v prostorově navigační úloze AAPA, je v souladu s jinými pracemi, které popisují deficit indukovaný blokádou D1 receptorů v jiných prostorových úlohách. Oproti tomu se v této práci nepodařilo v Morrisově vodním bludišti oddělit kognitivní deficit od procedurálního, vyšší dávka SCH23390 způsobovala procedurální deficit, zatímco nižší nepostihla ani kognitivní, ani procedurální aspekt úlohy.

6.2. BLOKÁDA D2 RECEPTORŮ SULPIRIDEM A JEJÍ VLIV NA LOKOMOCI A PROSTOROVOU ORIENTACI V ÚLOZE AAPA A NA UČENÍ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI

Předkládaná diplomová práce ukázala, že D2 receptorová blokáda po podání sulpiridu v závislosti na dávce snižovala lokomoční aktivitu. Toto snížení bylo doprovázeno zhoršením schopnosti řešit úlohu AAPA pouze v nejvyšší dávce sulpiridu. Dávky 60 a 100 mg/kg sulpiridu snižují lokomoci, zatímco pouze dávka 100 mg/kg významně zhoršila řešení úlohy. To naznačuje, že snížení lokomoce se děje v nižších dávkách než změny v prostorovém chování. Je nutné podotknout, že rozsah podávaných dávek v této studii je relativně malý, a tak nemůže být ověřeno, zda deficit v prostorovém chování po podání sulpiridu v dávce 100 mg/kg je způsoben poškozením kognice, nebo zda je to důsledek změněného lokomočního chování.

V Morrisově vodním bludišti oproti tomu žádná z dávek (30, 60 a 100 mg/kg) nezpůsobila významné narušení orientace vzhledem k viditelné platformě, z čehož lze usuzovat, že ani jedna z dávek nepostihuje procedurální aspekt MWM, tedy sensorimotorické a motivační funkce. V testu skryté platformy, tedy testu kognitivních funkcí, byla účinná až nejvyšší dávka (100 mg/kg).

Relativně slabý vliv D2 receptorového antagonismu, přítomný až ve

vyšších dávkách antagonisty, na prostorové chování je v souladu se studií Mehta et al. (2005) prováděné na zdravých lidských dobrovolnících, která neukázala vliv sulpiridu na prostorovou kognici. Mehta et al. testovali paměť u zdravých dobrovolníků, kterým podávali sulpirid v jednorázové dávce 400 mg/kg. Jejich cílem bylo podrobně zkoumat roli dopaminergního D2 receptorového systému v mnemonických funkcích testováním dlouhodobé a emoční paměti. Osmnáct zdravých mužských dobrovolníků prošlo baterií kognitivních testů po orální aplikaci sulpiridu nebo placeba. Při testování pracovní paměti se užívalo prostorové úlohy (*spatial searching task*) a úlohy sluchové s distrakcí (*auditory counting with distraction*). Úlohy, které nekladly důraz na pracovní paměť, byly prostorové nebo neprostorové úlohy typu pokus-omyl (*spatial and non-spatial trial-and-error learning*), úlohy na dlouhodobou prostorovou paměť (*long-term spatial memory*) a paměť emoční (*emotional memory*). Po blokádě dopaminových D2 receptorů nebyl zhoršen výkon u úloh testujících prostorovou pracovní paměť, avšak byl postižen u úlohy sluchové s distrakcí. Jak se ukázalo, sulpirid nepoškodil, ale spíše zlepšil výkon v úloze pokus-omyl. Tato studie podpořila názor, že dopaminergní modulace preferenčně neovlivňuje zpracování prostorové nežli neprostorové informace během procesu učení. Emoční rozpoznávání bylo po aplikaci sulpiridu mírně postiženo. Tyto nálezy podle autorů naznačují, že vliv dopaminové D2 receptorové modulace na prostorovou paměť je velmi závislý na typu prostorové úlohy a zdůrazňují nutnost senzitivních testů ke studování dopaminergní modulace prostorové a emoční paměti.

Jiná, dřívější práce Mehty a spolupracovníků (2004) ukázala, že podání sulpiridu poškozuje výkon v úloze měřené jako zpožděné vybavení paměti (*delayed-response task*). Jak výsledky ukazují, je třeba vliv sulpiridu vztahovat spíše na konkrétní typ úlohy nežli na jeho vliv obecný.

Jiná studie provedená na potkanech (Scatton et al., 2001) neodhalila poškození učení v Morrisově vodním bludišti u potkanů po systémové injekci tiapridu, benzamidového derivátu s podobným mechanismem účinku jako sulpirid.

Ve studii Chrobaka a Napiera (1992) nebylo prokázáno ovlivnění procedurálních funkcí po aplikaci sulpiridu v testu radiálního bludiště. Totéž ukázali též Bushnell a Levin (1993) při testování potkanů v úloze apetitivního operantního chování.

Závěrem lze říci, že výsledky této diplomové práce se shodují s výsledky jiných studií, které též ukázaly vliv blokády dopaminových D2 receptorů v závislosti na typu použité úlohy. V této diplomové práci se ukázalo, že potkani po aplikaci sulpiridu mají v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu (AAPA) učení poškozeno až v nejvyšší dávce (100 mg/kg) antagonisty. Tato dávka spolu s dávkou 60 mg/kg poškozuje i lokomoci. V úloze Morrisova vodního bludiště (MWM) postihuje kognitivní funkce pouze nejvyšší dávka antagonisty, tedy 100 mg/kg, a procedurální aspekt chování není postižen ani jednou z dávek sulpiridu. Výsledky této diplomové práce také ukazují, že ovlivnění motorických funkcí a prostorového chování pomocí antagonismu D1 i D2 receptorů jsou kvantitativně i kvalitativně diferencované podle použitého typu úlohy, ve které je toto chování sledováno. Je možné se domnívat, že za chování v těchto úlohách (jak lokomočního tak prostorového) jsou zodpovědné odlišné, nebo pouze částečně se překrývající neuronální obvody a mozkové struktury, což má za následek, že jejich ovlivnění pomocí blokátorů mozkových receptorů se rovněž liší. Podobné výsledky, kdy je v různých úlohách farmakologicky ovlivněno chování různě, byly prokázány např. u non-kompetitivního antagonisty NMDA podtypu glutamátových receptorů, látky MK-801 (Stuchlík et al., 2004; Vales et al., 2006). Podrobný přehled rozdílů ve farmakologickém ovlivnění chování v různých prostorových úlohách podává rovněž Myhrer (2003).

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce si kladla za úkol studovat vliv systémové blokády dopaminových D1-like a D2-like receptorů pomocí specifických antagonistů těchto receptorů (SCH23390 a sulpiridu) na lokomoci a prostorovou orientaci v úlohách aktivního allothetického vyhýbání se místu a Morrisově vodním bludišti. Látky byly aplikovány před behaviorálním testováním.

Výsledky ukazují, že D1-like receptorová blokáda pomocí látky SCH23390 způsobila deficit v prostorovém chování v úloze aktivního vyhýbání se místu, a to v obou studovaných dávkách (0,02 mg/kg a 0,05 mg/kg). Nižší dávka rovněž snížila lokomoci v této úloze. Oproti tomu v Morrisově vodním bludišti způsobila procedurální (sensorimotorický či motivační) deficit vyšší dávka SCH23390 (0,05 mg/kg), u nižší dávky nebyl prokázán vliv ani na procedurální aspekt úlohy, ani vliv na kognitivní funkce. Antagonismus D2-like receptorů pomocí sulpiridu (30 mg/kg, 60 mg/kg a 100 mg/kg) poškodil navigaci v úloze aktivního allothetického vyhýbání se místu v nejvyšší dávce (100 mg/kg), které předcházelo rovněž snížení lokomoční aktivity, přítomné již v dávce 60 mg/kg. V Morrisově vodním bludišti nepoškodila žádná z dávek sulpiridu procedurální aspekty učení, a u nejvyšší dávky (100 mg/kg) bylo pozorováno poškození kognitivních funkcí. Tyto výsledky naznačují, že blokáda obou typů receptorů má odlišný vliv na chování v obou použitých úlohách, a že ovlivnění procedurálních a motorických aspektů od kognitivních funkcí je poměrně obtížné po systémové aplikaci zmíněných antagonistů.

Výsledky předložené diplomové práce mohou být východiskem pro další studie zkoumající roli dopaminového synaptického přenosu v chování a procesech učení a paměti za použití lokálních mikroaplikací receptorově specifických antagonistů a agonistů do vybraných mozkových struktur.

Výsledky rovněž naznačují, že v budoucích studiích popisujících farmakologické ovlivnění paměťových funkcí nelze zobecňovat výsledky z dané paměťové úlohy, aniž by byl prostudován vliv farmakologické manipulace i na jiných prostorových úlohách.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adriani W., Felici A., Sargolini F., Roullet P., Usiello A., Oliverio A. (1998). N-methyl-D-aspartate and dopamine receptor involvement in the modulation of locomotor activity and memory processes. *Exp. Brain Res.*, 123: 52-59.

Aloisi A. M. (1997). Sex differences in pain-induced effects on the septohippocampal systém. *Brain Res. Rev.*, 25: 397-406.

Arolfo M. P., Zanudio M. A., Ramirez O. A. (1998). Baclofen infused in rat hippocampal formation impairs spatial learning. *Hippocampus*, 8: 109-113.

Bates M. D., Senogles S. E., Bunzow J. R., Liggett S. B., Civelli O., Caron M. G. (1991). Regulation of responsiveness at D2 dopamine receptors by receptor desensitization and adenylyl cyclase sensitization. *Mol. Pharmacol.*, 39: 55-63.

Bedi K. S. (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol. Behav.*, 51: 1001-1007.

Bellush L. L., Wright A. M., Walker J. P., Kopchick J., Colvin A. (1996). Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiol. Behav.*, 60: 541-547.

Benhamou S. (1997). Path integration by swimming rats. *Anim. Behav.*, 54: 321-327.

Benhamou S., Sauvé J. P., Bovet P. (1990). Spatial memory in large scale movements: efficiency and limitations of the egocentric coding process. *J. Theor. Biol.*, 145: 1-12.

Berger-Sweeney J., Arnold A., Gabeau D., Mills J. (1995). Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. *Behav. Neurosci.*, 109: 859-873.

Bermudez-Rattoni F., Introini-Collison I. B., McGaugh J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5379-5382.

Bliss T. V. P. (1998). The saturation debate. *Science*, 281: 1975-1976.

Block F., Kunkel M., Schwarz M. (1993). Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci. Lett.*, 149: 126-128.

- Bourtchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G., Silva A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79: 59-68.
- Brandeis R., Brandys Y., Yehuda S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48: 29-69.
- Brozoski T. J., Brown R. M., Rosvold H. E., Goldman P. S. (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, 205: 929-932.
- Brucato F. H., Levin E. D., Mott D. D., Lewis D. V., Wilson W. A., Swartzwelder H. S. (1996). Hippocampal long term potentiation and spatial learning in the rat: effects of GABA_B receptor blockade. *Neuroscience*, 74: 331-339.
- Bruce-Keller A. J., Umberger G., McFall R., Mattson M. P. (1999). Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.*, 45: 8-15.
- Bucci D. J., Chiba A. A., Gallagher M. (1995). Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behav. Neurosci.*, 109: 180-183.
- Bures J., Buresova O. (1990). Reversible lesions allow reinterpretation of system level studies of brain mechanisms of behaviour. *Concepts Neurosci.*, 1: 69-89.
- Bures J., Buresova O., Krivanek J. (1988). *Brain and Behaviour: Paradigms for Research in Neural Mechanisms*. Wiley, Chichester: p. 304.
- Bures J., Fenton A. A., Kaminsky Y., Wesierka M., Zahalka A. (1998). Rodent navigation after dissociation of the allocentric and idiothetic representation of space. *Neuropharmacology*, 37: 689-699.
- Bushnell P. J., Levin E. D. (1993). Effects of dopaminergic drugs on working and reference memory in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45: 765-776.
- Cain D. P. (1997). LTP, NMDA, genes and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 235-242.
- Cain D. P., Saucier D. (1996). The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Rev. Neurosci.*, 7: 215-231.
- Cain D. P., Saucier D., Boon F. (1997). Testing hypotheses of spatial learning: the role of NMDA receptors and NMDA-mediated long-term potentiation. *Behav. Brain Res.*, 84: 179-193.

Cain D. P., Saucier D., Hall J., Hargreaves E. L., Boon F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behav. Neurosci.*, 110: 86-102.

Cimadevilla J. M., Fenton A. A., Bures J. (2000). Continuous place avoidance task reveals differences in spatial navigation in male and female rats. *Behav. Brain Res.*, 107: 161-169.

Cimadevilla J. M., Fenton A. A., Bures J. (2000). Functional inactivation of dorsal hippocampus impairs active place avoidance in rats. *Neurosci. Letters*, 285: 53-56.

Cimadevilla J. M., Kaminsky Y., Fenton A., Bures J. (2000). Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *J. Neurosci. Methods*, 102: 155-164.

Compton D. M., Dietrich K. L., Smith J. S., Davis B. K. (1995). Spatial and non-spatial learning in the rat following lesions to the nucleus locus coeruleus. *Neuroreport*, 7: 177-182.

Crawley J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 9: 37-44.

Dalm S., Grootendorst, de Kloet E. R., Oitzl M. L. (2000). Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behav. Res. Methods*, 32: 134-139.

Daniel J. M., Roberts S. L., Dohanich G. P. (1999). Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiol. Behav.*, 66: 11-20.

Davis S., Butcher S. P., Morris R. G. (1992). The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.*, 12: 21-34.

Dawson J. L. M., Cheung Y. M., Lau R. T. S. (1975). Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol. Psychol.*, 3: 213-219.

de Quervain D. J., Roozendaal B., McGaugh J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394: 787-790.

Decker M. W., Curzon P., Brioni J. D. (1995). Influence of separate and

combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety and locomotor activity in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 64: 156-168.

Devan B. D., White N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *J. Neurosci.*, 19: 2789-2798.

D'Hooge R., De Deyn P. P. (2001). Application of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36: 60-90.

Diez-Chamizo V., Sterio D., Mackintosh D. J. (1986). Blocking and overshadowing between intramaze and extramaze cues: A test of independence of local and guidance learning. *Quart. J. Exp. Psychol.*, 37: 235-253.

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51: 7-61.

Doppler W. (1994). Regulation of gene expression by prolactin. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 124: 93-130.

Drury R. A., Gold R. M. (1978). Differential effects of ovarian hormones on reactivity to electric footshock in the rat. *Physiol. Behav.*, 20: 187-191.

Dudchenko P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28: 699-709.

Eichenbaum H., Stewart C., Morris R. G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.*, 10: 3531-3542.

Engelmann M., Bures J., Landgraf R. (1992). Vasopressin administration via microdialysis into the septum interferes with the acquisition of spatial memory in rats. *Neurosci. Lett.*, 142: 69-72.

Etienne A., Maurer R., Seguinot V. (1996). Path integration and its interaction with visual landmarks. *J. Exp. Biol.*, 199: 201-209.

Everts H. G., Koolhaas J. M. (1999). Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition and anxiety-related behaviors in rats. *Behav. Brain Res.*, 99: 7-16.

Feldman R. S., Meyer J. S., Quenzer L. F. (1997). Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 277-344.

Fenton A. A., Bures J. (1993). Place navigation in rats with unilateral tetrodotoxin inactivation of the dorsal hippocampus: place but not procedural learning can be lateralised to one hippocampus. *Behav. Neurosci.*, 107: 552-564.

- Fenton A. A., Wesierska M., Kaminsky Y., Bures J. (1998). Both here and there: simultaneous expression of autonomous spatial memories in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11493-11498.
- Fitzgerald L. W., Dokla C. P. (1989). Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine-induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. *Brain Res.*, 505: 246-250.
- Galea L. A., Kavaliers M., Ossenkopp K. P., Innes D., Hargreaves E. L. (1994). Sexually dimorphic spatial learning varies seasonally in two populations of deer mice. *Brain Res.*, 635: 18-26.
- Gallagher M., Nicolle M. M. (1993). Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behav. Brain Res.*, 57: 155-162.
- Gallistel C. R. (1990). *The Organization of Learning*. Cambridge MIT Press, 650
- Geinisman Y., Detolledo-Morrell L., Morrell F., Heller R. E. (1995). Hippocampal markers of aged-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog. Neurobiol.*, 45: 223-252.
- Gerfen C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 285-320.
- Gibertini M., Newton C., Friedman H., Klein T. W. (1995). Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1 β . *Brain Behav. Immun.*, 9: 113-128.
- Gingrich J. A., Caron M. G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16: 299-321.
- Granon S., Poucet B. (1995). Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behav. Neurosci.*, 109: 474-484.
- Grant S. G. N., Silva A. J. (1994). Targeting learning. *Trends Neurosci.*, 17: 71-75.
- Grauer E., Kapon Y. (1993). Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: impaired working memory and hyper-activity to stress. *Behav. Brain Res.*, 59: 147-151.
- Gutiérrez H., Hernandez-Echeagaray E., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni

- F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, 89: 751-758.
- Hasenohrl R. U., Huston J. P., Schuurman T. (1990). Neuropeptide substance P improves water maze performance in aged rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 101: 23-26.
- Heinrichs S. C., Stenzel-Poore M. P., Gold L. H., Battenberg E., Bloom F. E., Koob G. F., Vale W. W., Pich E. M. (1996). Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience*, 74: 303-311.
- Hersi A. I., Rowe W., Gaudreau P., Quirion R. (1995). Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience*, 69 (4): 1067-1074.
- Hofmann F., Biel M., Flockerzi V. (1994). Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 399-418.
- Holscher C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav. Brain Res.*, 100: 225-235.
- Choi E. J., Xia Z., Villacres E. C., Storm D. R. (1993). The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 269-273.
- Chrobak J. J., Napier T. C. (1992). Delayed-non-match-to-sample performance in the radial arm maze: effects of dopaminergic and gabaergic agents. *Psychopharmacol.*, 108: 72-78.
- Ikonen S., Schmidt B., Riekkinen Jr. P. (1998). Apamin improves spatial navigation in medial septal-lesioned mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 347: 13-21.
- Intorini-Collison I. B., Ford L., McGaugh J. L. (1995). Memory impairment induced by intraamygdala β -endorphin is mediated by noradrenergic influences. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 63: 200-205.
- Itoh S., Takashima A., Morimoto T. (1994). Impaired spatial learning by vasoactive intestinal peptide in Morris water maze task in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72: 25-29.
- Jackson D. M., Westlind-Danielsson A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.*, 64: 291-370.
- Jarrard L. E. (1993). On the role of hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural. Biol.*, 60: 9-26.

- Jensen M. M., Skarsfeldt T., Hoy C. E. (1996). Correlation between level of (n-3) polyunsaturated fatty acids in brain phospholipids and learning ability in rats. A multiple generation study. *Biochem. Biophys. Acta*, 1300: 203-209.
- Jones K. W., Schaeffer C. L., DeNoble V. J. (1989). Systematically administered NMDA interferes with acquisition of a passive avoidance response in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 34 (1): 181-185.
- Journot L., Homburger V., Pantaloni C., Priam M., Bockaert J., Enjalbert A. (1987). An islet activating protein-sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and thyrotropin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 262: 15106-15110.
- Kimble D., Whishaw I. Q. (1994). Spatial behavior in the Brazilian shorttailed opossum (*Monodelphis domestica*): comparison with the Norway rat (*Rattus norvegicus*) in the Morris water maze and radial arm maze. *J. Comp. Psychol.*, 108: 148-155.
- Koob G. F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 177-184.
- Koob G. F., Bloom F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242: 715-723.
- Lalonde R. (1994). Cerebellar contributions to instrumental learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 18: 161-170.
- Lalonde R. (1997). Visuospatial abilities. *Int. Rev. Neurobiol.*, 41: 191-215.
- Lang A. E., Lozano A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1044-1053.
- Lang A. E., Lozano A. M. (1998). Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1130-1143.
- Le Moal M., Simon H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.*, 71: 155-234.
- Le Roy I., Roubertoux P. L., Jamot L., Maarouf F., Tordjman S., Mortaud S., Blanchard C., Martin B., Guillot P. V., Duquenne V. (1998). Neuronal and behavioral differences between *Mus musculus domesticus* (C57BL/6JBy) and *Mus musculus castaneus* (CAST/Ei). *Behav. Brain Res.*, 95: 135-142.

- Leggio M. G., Neri P., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M, Petrosini L. (1999). Cerebellar contribution to spatial event processing: characterization of procedural learning. *Exp. Brain Res.*, 127: 1-11.
- Liao R. M., Lai W. S., Lin J. Y. (2002). The role of catecholamines in retention performance of a partially baited radial eight-arm maze for rats. *Chin. J. Physiol.*, 45: 177-185.
- Liu L. X., Monsma Jr. F. J., Sibley D. R., Chiodo L. A. (1996). D2L, D2S, and D3 dopamine receptors stably transfected into NG108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse*, 24: 156-164.
- McDaniel K. L., Mundy W. R., Tilson H. A. (1990). Microinjection of dynorphin into the hippocampus impairs spatial learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 35: 429-435.
- McEwen B. S., Woolley C. S. (1994). Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp. Gerontol.*, 29: 431-436.
- McLean J. H., Shipley M. T., Bernstein D. I., Corbett D. (1993). Selective lesions of neural pathways following viral inoculation of the olfactory bulb. *Exp. Neurol.*, 122: 209-222.
- McNamara R. K., dePape G. E., Skelton R. W. (1993). Differential effects of benzodiazepine receptor agonists on hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the Morris water maze. *Brain Res.*, 626: 63-70.
- McNamara R. K., Skelton R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain. Res. Rev.*, 18: 33-49.
- McNamara R. K., Skelton R. W. (1996). Baclofen, a selective GABA_B receptor agonist, dose-dependently impairs spatial learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53: 303-308.
- Means L. W., Higgins J. L., Fernández T. J. (1993). Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiol. Behav.*, 54: 503-508.
- Mehta M. A., Hinton E. C., Montgomery A. J., Bantick R. A., Grasby P. M. (2005). Sulpiride and mnemonic function: effects of a dopamine D2 receptor antagonist on working memory, emotional memory and long-term memory in healthy volunteers. *J. Psychopharmacol.*, 19: 29-38.

- Mehta M. A., Manes F. F., Magnolfi G., Sahakian B. J., Robbins T. W. (2004). Impaired set-shifting and dissociable effects on tests of spatial working memory following the dopamine D2 receptor antagonist sulpiride in human volunteers. *Psychopharmacol.*, 176: 331-342.
- Meiri N., Rosenblum K. (1998). Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res.*, 789: 48-55.
- Meyer M.E., Cottrell G. A., Van Hartesveldt C., Potter T. J. (1993). Effects of dopamine D1 antagonists SCH23390 and SKF83566 on locomotor activities in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 429-432.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.*, 78: 189-225.
- Mittelstaedt M. L., Mittelstaedt H. (1980). Homing by path integration in a mammal. *Naturwissenschaften*, 68: 566.
- Mittelstaedt M. L., Glasauer S. (1991). Idiopathic navigation in gerbils and humans. *Zool. Jb. Physiol.*, 95: 427-435.
- Mogensen J., Pedersen T. K., Holm S., Bang L. E. (1995). Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. *Brain Res. Bull.*, 38: 425-434.
- Moghaddam M., Bures J. (1996). Contribution of egocentric spatial memory to place navigation of rats in the Morris water maze. *Behav. Brain Res.*, 78: 121-129.
- Molinari M., Petrosini L., Grammaldo L. G. (1997). Spatial event processing. *Int. Rev. Neurobiol.*, 41: 217-230.
- Monsma Jr. F. J., Mahan L. C., McVittie L. D., Gerfen C. R., Sibley D. R. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6723-6727.
- Morris R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.*, 12: 239-260.
- Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11: 47-60.
- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M. (1986). Selective

impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319: 774-776.

Morris R. G. M., Davis M. (1994). The role of NMDA receptors in learning and memory, in: Collingridge G. L., Watkins J. C. (Eds.). *The NMDA Receptor*. 2nd Edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 340-375.

Morris R. G. M., Garrud P., Rawlins J. N. P., O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297: 681-683.

Moser E., Moser M. B., Anderson P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.*, 13: 3916-3925.

Moser M. B., Moser E. I., Forrest E., Anderson P., Morris R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 9697-9701.

Muller R. U. (1996). A quarter of a century of place cells. *Neuron*, 17: 813-822.

Mumby D. G., Cameli L., Glenn M. J. (1999). Impaired allocentric spatial working memory after thalamic damage caused by thiamine deficiency in rats. *Behav. Neurosci.*, 113: 42-50.

Myhrer T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Rev.*, 41: 268-287.

Ng G. Y., Mouillac B., George S. R., Caron M., Dennis M., Bouvier M., O'Dowd B. F. (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 267: 7-19.

Nilson O. G., Shapiro M. L., Gage F. H., Olton D. S., Björklund A. (1987). Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp. Brain Res.*, 67: 195-215.

O'Carroll C. M., Martin S. J., Sandin J., Frenguelli B., Morris R. G. (2006). Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.*, 13: 760-769.

O'Keefe J., Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res.*, 34: 171-175.

O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford.

Packard M. G., Kohlmaier J. R., Alexander G. M. (1996). Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic system. *Behav. Neurosci.*, 110: 626-632.

Packard M. G., Teather L. A. (1997). Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport*, 8: 3009-3013.

Pearce J. M., Robert A. D., Good M. (1998). Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature*, 396: 75-77.

Perrot-Sinal T. S., Kostenuik M. A., Ossenkopp K. P., Kavaliers M. (1996). Sex differences in performance in the Morris Water Maze and the effects of initial non-stationary hidden platform training. *Behav. Neurosci.*, 110: 1309-1320.

Petrie B. F. (1995). Learning set spatial navigation performance in three mouse strains. *Psychol. Rep.*, 77: 1339-1342.

Petrosini L., Leggio M. G., Molinari M. (1998). The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? *Prog. Neurobiol.*, 56: 191-210.

Petrosini L., Molinari M., Dell'Anna M. E. (1996). Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 1882-1896.

Picetti R., Saiardi A., Abdel Samad T., Bozzi Y., Baik J. H., Borrelli E. (1997). Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 11: 121-142.

Piomelli D. (1993). Arachidonic acid in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 274-280.

Pitsikas N., Carli M., Fidecka S., Algeri S. (1990). Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiol. Aging*, 11: 417-423.

Ploeger G. E., Spruijt B. M., Cools A. R. (1994). Spatial localization in the Morris water maze in rats: acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behav. Neurosci.*, 108: 927-934.

Poucet B., Save E., Lenck-Santini P.-P. (2000). Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev. Neurosci.*, 11: 95-111.

Redish A. D., Touretzky D. S. (1998). The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput.*, 10: 73-111.

- Riedel G., Micheau J., Lam A. G., Roloff E., Martin S. J., Bridge H., Hoz L., Poeschel B., McCulloch J., Morris R. G. M. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat. Neurosci.*, 2: 898-905.
- Riekkinen Jr. P., Sirvio J., Riekkinen P. (1990). Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. *Brain Res.*, 527: 342-345.
- Rison R. A., Stanton P. K. (1995). Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurological disease? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19: 533-552.
- Robinson S. W., Caron M. G. (1997). Selective inhibition of adenylyl cyclase type V by the dopamin D3 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 52: 508-514.
- Roof R. L. (1993). Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav. Brain Res.*, 53: 1-10.
- Roosendaal B., McGaugh J. L. (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci.*, 9: 76-83.
- Roosendaal B., McGaugh J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 67: 176-179.
- Roosendaal B., Sapolsky R. M., McGaugh J. L. (1998). Basolateral amygdala lesions block the disruptive effects of long-term adrenalectomy on spatial memory. *Neuroscience*, 84: 453-465.
- Rossier J., Kaminsky Y., Schenk F., Bures J. (2000). The place preference task: a new tool for studying the relation between behavior and place cell activity in rats. *Behav. Neurosci.*, 114: 273-284.
- Rousse I., Beaulieu S., Rowe W., Meaney M. J., Barden N., Rochford J. (1997). Spatial memory in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Neuroreport*, 8: 841-845.
- Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T., Aizawa S., Inoue Y., Sugiyama H., Mishina M. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature*, 373: 151-155.

Sandi C. (1998). The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast.*, 6: 41-52.

Santin L. J., Rubio S., Begega A., Arias J. L. (1999). Effects of mammillary body lesions on spatial reference and working memory tasks. *Behav. Brain Res.*, 102: 137-150.

Saucier D., Cain D. P. (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature*, 378: 186-189.

Saucier D., Hargreaves E. L., Boon F., Vanderwolf C. H., Cain D. P. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behav. Neurosci.*, 110: 103-116.

Savage L. M., Sweet A. J., Castillo R., Langlais P. J. (1997). The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behav. Brain Res.*, 82: 133-147.

Sawaguchi T., Goldman-Rakic P. S. (1994). The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J. Neurophysiol.*, 71: 515-528.

Scatton B., Cohen C., Perrault G., Oblin A., Claustre Y., Schoemaker H., Sanger D. J., Rouquier L., Porsolt R. (2001). The preclinical pharmacologic profile of tiapride. *Eur. Psychiatry*, 16: 29-34.

Setlow B., McGaugh J. L. (1998). Sulpiride infused into the nucleus accumbens posttraining impairs memory of spatial water maze training. *Behav. Neurosci.*, 112: 603-610.

Sfikakis A., Spyraiki C., Sitaras N., Varonos D. (1978). Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, 21: 441-446.

Silva A. J., Paylor R., Wehner J. M., Tonegawa S. (1992). Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257: 206-211.

Smith D. R., Striplin C. D., Geller A. M., Mailman R. B., Drago J., Lawler C. P., Gallagher M. (1998). Behavioural assessment of mice lacking D1A dopamine receptors. *Neuroscience*, 86: 135-146.

Smith S. E., Hodges H., Sowinski P., Man C. M., Leach M. J., Sinden J. D., Gray J. A., Meldrum B. S. (1997). Long-term beneficial effects of BW619C89 on neurological deficit, cognitive deficit and brain damage after middle cerebral

artery occlusion in the rat. *Neuroscience*, 77: 1123-1135.

Spanis C. W., Bianchin M. M., Izquierdo I., McGaugh J. L. (1999). Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Res.*, 816: 329-336.

Sprick U., Hasenohrl R. U., Krauth J., Klapdor K., Huston J. P. (1996). Effects of chronic substance P treatment and intracranial fetal grafts on learning after hippocampal kainic acid lesions. *Peptides*, 17: 275-285.

Staubli U., Rogers G., Lynch G. (1994). Facilitation of glutamate receptors enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 777-781.

Steele T. D., Hodges Jr. D. B., Levesque T. R., Locke K. W., Sandage Jr. B. W. (1996). The D1 agonist dihydroxidine releases acetylcholine and improves cognition in rats. *Ann. N Y Acad. Sci.* 777: 427-430.

Steele R. J., Morris R. G. (1999). Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, 9 (2): 118-136.

Stewart C. A., Morris R. G. M. (1993). The water maze, in: Saghal A. (Ed.), Press, Oxford, pp. 107-122.

Stewart J., Mitchell J., Kalant N. (1989). The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol. Aging*, 10: 669-675.

Stoof J. C., Durakarch B., De Boer P., Westerink B. H., Groenewgen H. J. (1992). Regulation of the activity of the striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience*, 47: 755-770.

Stuchlik A. (2007). Further study of the effects of dopaminergic D1 drugs on place avoidance behavior using pretraining: Some negative evidence. *Behav. Brain Res.*, doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.046.

Stuchlik A., Rezacova L., Vales K., Bubenikova V., Kubik S. (2004). Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci. Lett.*, 366: 162-166.

Stuchlik A., Vales K. (2005). Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. *Behav. Brain Res.*, 159: 163-171.

Stuchlik A., Vales K. (2006). Effect of dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 and D1 agonist A77636 on active allothetic place avoidance, a spatial cognition task. *Behavioural Brain Research*, 172: 250-255.

Sunahara R. K., Guan H. C., O'Dowd B. F., Seeman P., Laurier L. G., Ng G., George S. R., Torchia J., Van Tol H. H., Niznik H. B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350: 614-619.

Sutherland R. J., Whishaw I. Q., Regehr J. C. (1982). Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 96: 563-573.

Takeda T. (Ed.) (1994). *The SAM Model of Senescence*. Elsevier, Amsterdam.

Thifault S., Kremarik P., Lalonde R. (1998). Effects of bilateral electrolytic lesions of the medial nucleus accumbens on exploration and spatial learning. *Arch. Physiol. Biochem.*, 106: 297-307.

Thullier F., Lalonde R., Mahler P., Joyal C. C., Lestienne F. (1996). Dorsal striatal lesions in rats. 2: Effects on spatial and non-spatial learning. *Arch. Physiol. Biochem.*, 104: 307-312.

Tolman E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.*, 55: 189-208.

Ueki A., Miwa C., Miyoshi K. (1994). Impairment in the acquisition of passive and active avoidance learning tasks due to bilateral entorhinal cortex lesions. *J. Neurol. Sci.*, 125 (1): 14-21.

Vales K., Stuchlik A. (2005). Central muscarinic blockade interferes with retrieval and reacquisition of active allothetic place avoidance despite spatial pretraining. *Behav. Brain Res.*, 161: 238-244.

Vales K., Valesova-Bubenikova V., Klement D., Stuchlik A. (2006). Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci. Research*, 55: 383-388.

Walther T., Voigt J. P., Fukamizu A., Fink H., Bader M. (1999). Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behav. Brain Res.*, 100: 1-4.

Warburton E. C., Aggleton J. P., Muir J. L. (1998). Comparing the effects of selective cingulate cortex lesions and cingulum bundle lesions on water maze

performance by rats. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 622-634.

Warren S. G., Humphreys A., Juraska J. M., Greenough W. T. (1995). LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res.*, 703: 26-30.

Warren S. G., Juraska J. M. (1997). Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.*, 111: 259-266.

Wenk G. L. (1998). Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water mazes, in: Crawley J., Gerfen C., McKay R., Rogawski M., Sibley D., Skolnick P. (Eds.). *Current Protocols in Neuroscience*. Wiley, New York.

Whishaw I. Q., Jarrard L. E. (1995). Similarities vs. differences in place learning and circadian activity in rats after fimbria-fornix section or ibotenate removal of hippocampal cells. *Hippocampus*, 5: 595-604.

Whishaw I. Q., Jarrard L. E. (1996). Evidence for extrahippocampal involvement in place learning and hippocampal involvement in path integration. *Hippocampus*, 6: 513-524.

Whishaw I. Q., McKenna J. E., Maaswinkel H. (1997). Hippocampal lesions and path integration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 228-234.

Whishaw I. Q., Mittelman G., Bunch S. T., Dunnett S. B. (1987). Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav. Brain Res.*, 24: 125-138.

Wilson M. A., Tonegawa S. (1997). Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci.*, 20: 102-106.

Williams G. V., Castner S. A. (2006). Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience*. In Press.

Wörtwein G., Saerup L. H., Charlottenfeld-Starpov D., Mogensen J. (1995). Place learning by fimbria-fornix transected rats in a modified water maze. *Int. J. Neurosci.*, 82: 71-81.

Yayou K., Takeda M., Tsubone H., Sugano S., Doi K. (1993). The disturbance of water-maze task performance in mice with EMC-D virus infection. *J. Vet. Med. Sci.*, 55: 341-342.

Ylinen A., Lahtinen H., Sirvio J., Partanen J., Asikainen A., Gulyas A., Freund T. F., Riekkinen P. (1991). Behavioural, electrophysiological and histopathological changes following sustained stimulation of the perforant pathway input to the

hippocampus: effect of the NMDA receptor antagonist, CGP 39551. *Brain Res.*, 553: 195-200.

Zanotti A., Arban R., Perazzolo M., Giusti P. (1994). Diazepam impairs place learning in native but not in maze-experienced rats in the Morris water maze. *Psychopharmacology (Berl.)*, 115: 73-78.

Zimmerberg B., Farley M. J. (1993). Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.*, 54: 1119-1124.

Zinyuk L., Kubik S., Kaminsky Y., Fenton A., Bures J. (2000). Understanding hippocampal activity by using purposeful behavior: place navigation induces place cell discharge in both task-relevant and task-irrelevant spatial reference frames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3771-3776.