

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní obor: Fyziologie živočichů

Zaměření: Neurobiologie



**Akutní účinky skopolaminu, antagonisty centrálních
muskarinových acetylcholinových receptorů, na učení ve dvou
kognitivních testech: Srovnání outbredních kmenů potkana
Long–Evans a Wistar**

*Acute effects of central muscarinic antagonist scopolamine on learning in two
cognitive tasks: Comparison of Long–Evans and Wistar outbred rat strains*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Marie Entlerová

Školitel: Doc. RNDr. Aleš Stuchlík, Ph.D.

Odd. Neurofyziologie paměti, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Katedra Fyziologie, PřF UK

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci „**Akutní účinky skopolaminu, antagonisty centrálních muskarinových acetylcholinových receptorů, na učení ve dvou kognitivních testech: Srovnání outbredních kmenů potkana Long–Evans a Wistar**“ vypracovala samostatně na základě citované literatury, výsledků z vyhodnocených dat a za pomoci konzultací se svým školitelem. Na statistickém hodnocení výsledků se podílel můj školitel doc. RNDr. Aleš Stuchlík, Ph.D.

V Praze dne 14. 8. 2013

.....

Marie Entlerová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat především svému školiteli doc. RNDr. Aleši Stuchlíkovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a trpělivost, které mi věnoval při vypracovávání této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Oddělení neurofyzologie paměti, zejména pak Michaele Fialové, Antonínu Zahálkovi a Jindřichovi Kalvodovi za laboratorní a technické zázemí.

Velké poděkování náleží MUDr. Filipu Tylšovi z Psychiatrického centra Praha za odborné konzultace v oblasti neuroanatomie a Mgr. Anně Vrbové za pomoc při jazykové korektuře.

Poděkování také patří Mgr. Lence Kletečkové, Mgr. Barboře Krausové, Mgr. Markétě Chvojkové a Bc. Elišce Antošové za morální podporu.

V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala svému tátovi Milanu Entlerovi za jeho trpělivost a podporu ve studiu.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT13386, projektem AV ČR M200111204 a GAČR P304/12/G069.

Abstrakt

Prostorová navigace je velice významná pro život nejen u savců. Vědecky lze měřit neuronální a neurofarmakologické změny v učení a paměti člověka i potkana prostřednictvím jejich chování a reakcí na podněty. V rámci experimentálních modelů kognitivních deficitů představuje Morrisovo vodní bludiště (*Morris Water Maze*, MWM) velmi dobrý test přesné alotetické reprezentace pozice subjektu v prostoru, tj. jeho kognitivní mapy. Dalším významným testem prostorové navigace je Kolotočové bludiště (*Active Allothetic Place Avoidance*, AAPA), pomocí něhož lze ověřit schopnost kognitivní koordinace, tedy schopnost odlišit podstatné podněty od nepodstatných. Pro oba tyto testy existují analogické úlohy pro testování kognitivních schopností u člověka (např. *Blue Velvet Arena* pro MWM, simulace virtuální reality na PC pro AAPA, aj.). Cílem této studie je srovnání citlivosti outbredních kmenů potkana Long-Evans a Wistar z chovů Fyziologického ústavu AV ČR na akutní podání tří dávek (0,8 mg/kg; 1,5 mg/kg a 3,0 mg/kg) skopolaminu, antagonisty centrálních muskarinových cholinergních receptorů. Výsledky ukazují, že v testu AAPA je kmen Wistar více ovlivněn cholinergní blokádou než kmen Long-Evans, v testech MWM byla také tato vyšší citlivost prokázána. Dále se ukázalo, že kontrolní potkani kmene Long-Evans mají obecně lepší výkony v testu AAPA a lépe řeší úlohu viditelné platformy v MWM než kontroly kmene Wistar, což naznačuje lepší zrak pigmentovaných potkanů. Tato studie naznačuje, že pro vývoj a studium mechanismů působení neurokognitiv by měli být přednostně používáni potkani kmene Wistar v prostorových úlohách díky jejich vyšší citlivosti na amnestické agens. Tato mezikmenová studie má obecný význam pro modelování poklesu kognitivních funkcí, např. u Alzheimerovy choroby.

Klíčová slova

behaviorální farmakologie, mezikmenové rozdíly, skopolamin, prostorová navigace, učení

Abstract

Spatial navigation is essential for survival not only in mammals. Neural and neuropharmacological changes of learning and memory in humans and rats could be measured through their behavior and responses to stimuli. In focus of experimental models of cognitive deficits, the Morris water maze (MWM) represents a classical test of exact allothetic representation, i.e. the cognitive map. Another important test of spatial navigation is the active place avoidance, or Carousel maze (also AAPA, Active Allothetic Place Avoidance), that can be used to test the ability of cognitive coordination, thus the ability to distinguish relevant stimuli from irrelevant. There are analogous tasks for testing cognitive abilities in humans for both tests (e.g. Blue Velvet Arena for MWM, virtual reality simulations on PC for AAPA, etc.). Aim of the present study is to compare the sensitivity of outbred Long-Evans and Wistar strains of rats from the institutional breeding to the acute administration of scopolamine, the antagonist of central muscarinic acetylcholine receptors, at doses 0.8 mg/kg; 1.5 mg/kg and 3.0 mg/kg. The results show that the Wistar strain is more influenced by cholinergic blockade than Long-Evans strain in both AAPA and the MWM. Furthermore, it appears that the control rat strain Long-Evans have better performance in test AAPA and better resolves task the visible platform in the MWM than control Wistar suggesting better vision pigmented rats. This study suggests that Wistar rats might be preferentially considered for future testing in anticholinergic models of preclinical drug research, behavioral and cognitive deficits after cholinergic blockade in spatial tasks, due to their higher sensitivity to scopolamine. This study might also have general impact on research of cognitive decline such as in Alzheimer's disease.

Keywords

behavioral pharmacology; inter-strain differences; scopolamine; spatial navigation; learning

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Keywords	5
Obsah	6
1. Seznam použitých zkratk	7
2. Úvod	9
3. Literární přehled	10
3.1. Taxonomie paměti	10
3.2. Acetylcholin a cholinergní systém	12
3.2.1. Objev acetylcholinu	12
3.2.2. Acetylcholin a jeho metabolismus	13
3.2.3. Nikotinové cholinergní receptory (nAChR)	13
3.2.4. Muskarinové cholinergní receptory (mAChR)	14
3.2.5. Jednotlivé složky a lokalizace cholinergního systému	15
3.2.6. Cholinergní signalizace do hipokampu	16
3.3. Centrální cholinergní systém a prostorové učení: studie lézí	17
3.3.1. Basokortikální dráhy	18
3.3.2. Septohipokampální a septoentorhinální dráhy	20
3.3.3. Striatální cholinergní systém	23
3.4. Farmakologické manipulace cholinergní transmise a prostorového učení	24
3.4.1. Agonisté a antagonisté muskarinových receptorů	25
3.5. Acetylcholin, theta rytmus a synaptická plasticita	30
3.6. Skopolamin	32
4. Cíle práce	33
5. Metody	34
5.1. Zvířata	34
5.2. Chemikálie	34
5.3. Aparatury a behaviorální procedury	35
5.3.1. Aktivní vyhýbání se místu (AAPA)	35
5.3.2. Morrisovo vodní bludiště (MWM)	37
5.4. Hodnocené parametry, statistické zpracování	39
6. Výsledky	40
6.1. AAPA	40
6.2. Morrisovo vodní bludiště	42
6.2.1. Test viditelné platformy	42
6.2.2. Test skryté platformy	43
6.2.3. Probe trial	44
7. Diskuze	45
8. Shrnutí	48
9. Podpůrné publikace	49
10. Literatura	50
11. Přílohy	64

1. Seznam použitých zkratek

AAPA	– <i>Active Allothetic Place Avoidance, Carousel maze</i> – test aktivního vyhýbání se místu, kolotočové bludiště
Acetyl-CoA	– acetylkoenzym A
ACoA	– <i>anterior communicating artery</i> , anteriorní spojovací artérie
AD	– <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimerova choroba
ACh	– acetylcholin
AChE	– acetylcholinesteráza
AMPA	– α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
AOB	– <i>accessory olfactory bulb</i> , přídatný čichový lalok
ATP	– adenosin-5'-trifosfát
ATPáza	– enzym vytvářející protonový gradient za současného štěpení ATP
BNST	– <i>bed nucleus of stria terminalis</i>
BuChE	– butyrylcholinesteráza
BVA	– <i>Blue Velvet Arena</i> , test kognitivní reprezentace prostoru u pacientů
Ca ²⁺	– vápenatý kation
CA1	– <i>Cornu Ammonis Area 1</i> , CA1 oblast hipokampu
CA3	– <i>Cornu Ammonis Area 3</i> , CA3 oblast hipokampu
CCh	– karchol
cAMP	– cyklický adenosin-5'-monofosfát, cyklické AMP
CNS	– centrální nervová soustava
DG	– <i>gyrus dentatus</i>
DMTP	– úloha <i>delayed-matching-to-place</i> v MWM
DNMTP	– úloha <i>delayed-non-matching-to-place</i> v MWM
EC	– entorhinální kortex
EEG	– elektroencefalograf
G-protein	– heterotrimerní protein vázající guaninový nukleotid
GABA	– kyselina γ -aminomáselná
G _{i/o}	– α 0 (G _i třída) podjednotka G-proteinu inhibující produkci cAMP z ATP
G _{q/11}	– α 11 (G _q třída) podjednotka G-proteinu aktivující fosfolipázu C

HDBB	– <i>horizontal limb of the diagonal band of Broca</i> , horizontální svazek diagonálního Brocova pásu
CH1 – CH6	– typy cholinergních skupin buněk tvořící komplexní anatomické oblasti
ChAT	– cholin- <i>O</i> -acetyltransferáza, acetylcholintransferáza
icv	– intracerebroventrikulární podání látky
IgG-saporin	– imunoglobulin G vázaný na saporin
ip	– intraperitoneální podání látky
K ⁺	– draselný kation
L-skopolamin	– levotočivá forma skopolaminu
LTP	– <i>long-term potentiation</i> , dlouhodobá potenciace
M1 – M5	– podtypy muskarinových cholinergních receptorů
mAChR	– muskarinové cholinergní receptory
MOB	– <i>main olfactory bulb</i> , hlavní čichový lalok
ms	– mediální septum
MSN	– <i>medial septal nucleus</i> , mediální jádro septa
MTT	– <i>Multiple Trace Theory</i> , teorie mnohonásobných paměťových stop
MWM	– <i>Morris Water Maze</i> , Morrisovo vodní bludiště
<i>n. acceleratus</i>	– <i>nervus acceleratus</i>
<i>n. vagus</i>	– <i>nervus vagus</i> , bloudivý nerv
NA	– noradrenalin
Na ⁺	– sodný kation
NAcc	– <i>nucleus accumbens</i>
nAChR	– nikotinové cholinergní receptory
NBM	– <i>nucleus basalis magnocellularis</i> , bazální magnocelulární jádro
nbM	– <i>nucleus basalis Myenerti</i> , bazální Myenertovo jádro
NGF	– nervový růstový faktor
PAG	– <i>periaqueductal grey</i> , periakvaduktální šedá hmota
S.E.M.	– <i>standard error of the mean</i> , střední chyba průměru
sc	– subkutánní podání látky
VAcHT	– vezikulární acetylcholinový transportér
VDBB	– <i>vertical limb of the diagonal band of Broca</i> , vertikální svazek diagonálního Brocova pásu
VTA	– <i>ventral tegmental area</i> , ventrální tegmentální oblast

2. Úvod

Schopnost orientace v prostoru, prostorová navigace, je pro přežití organismů na Zemi esenciální. Prostorová navigace je jedním z nejpůvodnějších fenoménů k posuzování funkce mozku ve vztahu k chování. Nabízí koncepční výhody, jakými mohou být například poměrně dobře definovaná role mozkových struktur (Hooge a Deyn, 2001) a neurotransmiterových systémů (Myhrer, 2003), a také přesné hodnocení kontroly podnětů a výběru vhodné strategie (Maaswinkel a Whishaw, 1999). Dále je prostorová navigace využívána ke studiu kognitivních deficitů v animálních modelech mozkových poruch a neurodegenerativních onemocnění, jako jsou schizofrenie (Didriksen et al., 2007) či Alzheimerova choroba (Koistinaho, 2001). Tyto deficity v prostorové navigaci jsou prokazatelně evidovány jak v animálních modelech, tak i v klinice, a často v prodromálních fázích (Laczo et al., 2011).

Acetylcholin (ACh) jakožto nejrozšířenější neurotransmitter v centrální nervové soustavě savců je mimo jiné velice významný v učení a paměti. Klíčová role ACh pro správné fungování paměti je možná nejlépe ilustrována u Alzheimerovy choroby (*Alzheimer's disease*, AD), jejíž deficity v pozornosti, učení a pracovní paměti jsou doprovázené redukcí cholinergních projekcí a receptorů v kortexu a v hipokampu. Tato zjištění se stala podkladem pro cholinergní hypotézu AD (Bartus et al., 1982). Experimenty se skopolaminem, antagonistou centrálních muskarinových acetylcholinových receptorů (mAChR), který vyvolává kognitivní deficity připomínající AD u zdravých lidí (Drachman a Leavitt, 1974), tuto teorii podporují. V současné době je velká část léčby AD založená na obnovení cholinergní signalizace inhibováním enzymu acetylcholinesterázy (AChE), která řídí metabolismus ACh (Lane et al., 2006). Posílení cholinergní signalizace vede k obnovení deficitů dlouhodobé potenciace (LTP) *in vitro* a kognitivních deficitů u experimentálních modelů AD *in vivo* (Caccamo et al., 2006; Chen et al., 2006). Skopolamin je proto využíván u experimentálních studií na hlodavcích v primárním výzkumu kognitivních onemocnění jako výchozí screeningová metoda k identifikování nových terapeutických kandidátů.

3. Literární přehled

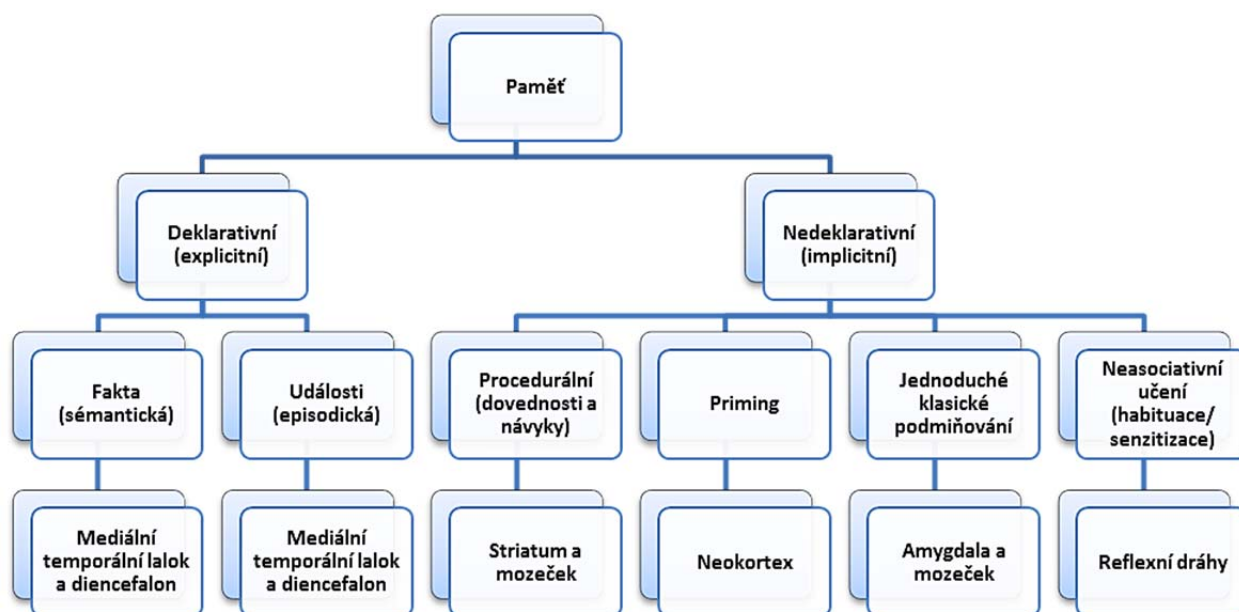
3.1. Taxonomie paměti

Učení odráží komplexní soubor neuronálních procesů a spočívá v následujících principech: akvizice (osvojení), ukládání (uchovávání) a vybavení informace. Počáteční akvizice paměťové stopy vede k behaviorálním modifikacím jedince a paměť je pak nejlépe popsána a detekována jako behaviorální modifikace, obzvláště u zvířat, u nichž nelze konceptualizovat verbální paměť. Paměť můžeme dělit na základě několika kritérií, a to: dle jejího obsahu – na deklarativní neboli explicitní a nedeklarativní čili implicitní paměť (Squire, 1992); dle doby trvání – na dlouhodobou a krátkodobou paměť (Gold a McGaugh, 1975; Cherkin, 1969); nebo podle její povahy, která může být buď archivní – dlouhodobá a krátkodobá paměť; anebo přechodná – pracovní paměť (Gold a McGaugh, 1975; Goldman-Rakic, 1992). V roce 1992 Larry R. Squire (Squire, 1992) navrhl rozdělení paměti na deklarativní (explicitní; Tulving, 2002) a nedeklarativní (implicitní; Schacter, 1987) paměť (**Obrázek 1**). Deklarativní paměť se vztahuje k vědomému, bezprostřednímu vybavení si zkušeností a faktů ("*knowing that...*"), které mohou být vybaveny a verbálně vyjádřeny, a je o ní známo, že je závislá na hipokampu. Nedeklarativní paměť se naopak objevuje při nevědomém vybavení si zkušeností, stejně jako zvyků a osvojených dovedností ("*knowing how...*"; Mishkin a Petri, 1984) či při jednoduchém podmiňování, aj. a povětšinou se nevztahuje k hipokampu (Squire, 1982; Micheau et al., 2004). Tato práce se dále zabývá pouze aspekty deklarativní paměti a cholinergním systémem, více o nedeklarativní paměti a acetylcholinu je uvedeno v Robinson et al. (2011).

Deklarativní paměť může být dále dělena do dvou hlavních podtypů, na sémantickou a epizodickou paměť. Sémantická paměť, také nazývána jako konceptuální povědomí, představuje paměť významů, pochopení, faktů a dalších na konceptu založených znalostí, nezávislých na specifických zkušenostech (Tulving, 1972). Epizodická paměť reprezentuje detailní vědomé vybavování si zkušeností, pokud jde o jejich prvky (co), lokaci (kde) a časovou souvislost (kdy), a předpokládá se, že vyžaduje „sebepojetí“, „uvědomění“ a schopnost „vnímat čas“ (Morris, 2001; Ferbinteanu et al., 2006; Crystal, 2010). Prokázání epizodické paměti bez schopnosti verbálního vyjádření u zvířat není jednoduchým úkolem, protože neexistují žádné konzistentní neverbální behaviorální indikátory vědomé zkušenosti. Epizodická paměť je tedy obecně vnímaná jako unikátní pro člověka, protože se má za to, že

zvířatům chybí „sebepojetí“ a schopnost „vnímat čas“. Nicméně nejnovější behaviorální studie navrhuje paměť podobnou epizodické u hlodavců (Morris et al., 2003; Dere et al., 2006) a u ptáků (Clayton a Dickinson, 1998; Grodzinski a Clayton, 2010), která je založená na behaviorálních úlohách vyžadujících od zvířat uchování vzpomínky podobné epizodické (obsahující složky „co a kdy“, „co a kde“ či „kdy a kde“, event. "kdy, kde a kontext" – ten v tomto případě nahrazuje věcnou komponentu) a používající tuto informaci k tvorbě specifických odpovědí. Příklady zahrnují mnohonásobné přeúčování, určité *one-trial* úlohy učení (učení na jeden pokus), úlohy *delayed-matching-to-place* (DMTP) a *delayed-non-matching-to-place* (DNMTP) v MWM, na scéně specifickou paměť a případně tzv. *occasion setting*. Velmi známé jsou pokusy Nicolý Clayton s epizodickou pamětí u sojek *Aphelocoma californica* (*scrub jays*; Clayton a Dickinson, 1998). Paměť pro události, tedy některé epizodické aspekty, a také prostorové učení nemusí nutně být jedinečné pouze pro člověka.

Prostorová paměť je jednou ze základních typů vyšších kognitivních funkcí u savců a zahrnuje schopnost zachytit, uložit a aktivně využít informaci o konkrétním prostředí a jeho prostorovém uspořádání. O prostorové paměti je uvažováno v kontextu epizodické paměti (Burgess et al., 2001; O'Keefe a Nadel, 1978), pouze výjimečně v souvislosti se sémantickou pamětí. K orientaci v prostoru mohou být používány orientační body pro konstrukci kognitivních map, tedy pro vnitřní reprezentaci daného prostředí (O'Keefe a Nadel, 1978). Vytvoření těchto map je buď na základě idiotetické strategie, definované v závislosti na lokaci a pohybu uvnitř bludiště, anebo alotetické strategie, s jejíž pomocí se subjekt orientuje na základě trojrozměrného uspořádání externích objektů a orientačních značek v prostředí (Aggleton et al., 2000; Benhamou a Poucet, 1998). Tvorbu kognitivní mapy prostoru lze testovat úlohami v experimentálních bludištích, jako jsou např. vodní bludiště (Morris, 1984), bludiště s radiálními rameny (Olton et al., 1978), bludiště Barnesové (Barnes, 1979), T- nebo Y- bludiště (Deacon a Rawlins, 2006; Lalonde, 2002), které jsou podrobně popsány v rozsáhlých vědeckých článcích zahrnujících detailní srovnání výhod a omezení konkrétních prostorových úloh (Paul et al., 2009). Hipokampus a jeho cholinergní systém je nejvíce zapojen v akvizici alotetických prostorových reprezentací (Morris, 1981).



Obrázek 1 – Hierarchická organizace paměti s deklarativní a nedeklarativní paměti jakožto dvěma ústředními formami a jejich součástí s mozgovými strukturami, které jsou zapojené do zprostředkování těchto procesů. *Převzato a upraveno podle publikace Deiana et al., 2011.*

3.2. Acetylcholin a cholinergní systém

3.2.1. Objev acetylcholinu

Acetylcholin (ACh) a jeho role v organismu je blíže známa již od počátku 20. let 20. století. Už německý fyziolog a farmakolog Otto Loewi (1873 – 1961) roku 1921 demonstroval působení ACh na srdeční větví bloudivého nervu (*n. vagus*) a vyslovil představu chemické synapse (Todman, 2008). Tato myšlenka byla později potvrzena pro řadu periferních i centrálních funkčních kontaktů, tj. chemických synapsí; za což byl v roce 1936 oceněn spolu s Henrym Dalem Nobelovou cenou za medicínu a fyziologii. Experiment spočíval v pozorování frekvence srdeční akce dvou zavěšených srdcí žab - dárcovského a recipientního. Po elektrické stimulaci bloudivého nervu donorové srdce zpomalilo tlukot a následně Otto Loewi přenesl vzorek perikardiální tekutiny recipientnímu srdci, které rovněž zpomalilo, aniž by mu byl elektricky stimulován bloudivý nerv. Loewi usoudil, že je možné, aby se přenos vzruchu vedl i chemickou cestou. V podstatě došlo k tomu, že ACh z *n. vagus* srdce zpomaloval, zatímco noradrenalin (NA) z *n. acceleratus* jej zrychloval. Látkou

zprostředkující přenos vzruchů na postsynaptických spojích parasympatiku je právě ACh (Zimmer, 2006).

3.2.2. Acetylcholin a jeho metabolismus

Acetylcholin je hlavním neuropřenašečem v centrální nervové soustavě (CNS) savců, ale zásadní úlohu má i v periferním nervovém systému, kde působí jako přenašeč vzruchů z motoneuronů na kosterní sval a jako postgangliový mediátor parasympatiku. ACh je distribuován v celém mozku, cholinergní neurony se nacházejí ve všech částech předního a středního mozku a v mozkovém kmeni (Drever et al., 2011).

ACh je syntetizován enzymem cholin-*O*-acetyltransferázou (ChAT), která katalyzuje acetylaci cholinu pomocí acetyl-CoA. ACh je hromaděn v synaptických váčcích prostřednictvím vezikulárního acetylcholinového transportéru (VAChT), tento proces je poháněn transvesikulárním protonovým gradientem vytvářeným ATPázou (Parsons, 2000). Kvantový výlev ACh do synaptické štěrbině je spuštěn vtokem Ca^{2+} iontů vyvolávající depolarizaci, přičemž dochází k vazbě na oba pre- i postsynaptické muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR) receptory (Wevers, 2011; van der Zee a Keijsers, 2011). K hydrolýze ACh dochází během milisekund prostřednictvím acetylcholinesterázy (AChE) či butyrylcholinesterázy (BuChE), jež vytváří kyselinu octovou a cholin, které jsou znovu připravené ke zpětnému vychytávání a k resyntéze.

ACh působí svou vazbou na celou škálu typů nikotinových (nAChR) a muskarinových (mAChR) cholinergních receptorů.

3.2.3. Nikotinové cholinergní receptory (nAChR)

Nikotinové cholinergní receptory (nAChR) jsou součástí nadrodiny ligandem řízených iontových kanálů. Nikotinové podjednotky α ($\alpha 2 - \alpha 10$), β ($\beta 2 - \beta 4$), γ , δ a ϵ (v dospělém svalstvu) spolu vytvářejí pentamerickou kombinaci, symetricky uspořádanou okolo centrálního póru. Aktivace nAChR způsobí rychlé zvýšení propustnosti membrány pro Na^+ a Ca^{2+} ionty, depolarizaci a excitaci, a dlouhodobé vystavení nikotinu také vede ke konformační změně a receptorové desenzitizaci (Guo a Lester, 2007). Všechny podtypy nAChR disponují vysokou propustností pro kationty sodíku Na^+ a draslíku K^+ , ale liší se svou permeabilitou pro

kation vápníku Ca^{2+} , přičemž $\alpha 7$ receptory mají největší hladiny vápníkové propustnosti (Drever et al., 2011).

Podjednotky α ($\alpha 2 - \alpha 10$) a β ($\beta 2 - \beta 4$) jsou navzájem homologní, avšak geneticky odlišné, jejichž různé kombinace vytvářejí individuální nAChR podtypy, každý s unikátními funkčními a strukturními vlastnostmi (Fenster et al., 1997; Nai et al., 2003). Přestože $\alpha 4\beta 2$ podtypy se nejčastěji vyskytují v mozku (Cooper et al., 1991; Kalin, 2002; Wada et al., 1989), $\alpha 7$ je převládajícím podtypem v hipokampu a je lokalizován na mnoha neuronech, získávajících jak glutamátergní, tak GABAergní inervaci a obsahující postsynaptická zhuštění (Fabian-Fine et al., 2001; Seguela et al., 1993; Zarei et al. 1999). $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 3\beta 4$ receptory se také vyskytují v hipokampu, přičemž v mnoha případech může být jednotlivý hipokampální neuron ovlivněn prostřednictvím všech tří nikotinových podtypů (Alkondon a Albuquerque, 2004). Distribuce rozdílných podjednotek nikotinových receptorů v mozku hlodavců je podrobně probrána v pracích Changeux et al. (1998) a Gotti a Clementi (2004). Ve zkratce, v mozku hlodavců jsou podjednotky $\alpha 2$ zastoupeny rozptýleně a poměrně slabě v hipokampu a v kortexu, $\alpha 3$ jsou hustě distribuovány ve 4. kortikální vrstvě a v dorsálním a ventrálním talamu zahrnující laterální kolínkovité jádro (*lateral geniculate nucleus*); $\alpha 4$ se hojně nachází v kortexu, talamu a v amygdale a v menším počtu také v hipokampu; $\alpha 7$ jsou mírně exprimované v hipokampu, kortexu, mozkovém kmeni a v mozečku a $\beta 2$ podjednotky jsou rozptýlené v kortexu a v dorsálním hipokampu, ale jsou hojně zastoupené v talamu.

3.2.4. Muskarinové cholinergní receptory (mAChR)

Muskarinové cholinergní receptory (mAChR) jsou rozsáhle exprimovány napříč celou CNS a své pojmenování získaly na základě citlivosti k muskarinu (Ishii a Kurachi, 2006), alkaloidu izolovaného z muchomůrky červené (*Amanita muscaria*). Muskarinové receptory patří do nadrodiny metabotropních receptorů a jsou receptory se sedmi transmembránovými průniky, které interagují s heterotrimerními G-proteiny, tedy jsou charakterizovány jako tzv. pomalé receptory. U potkana je dosud známo 5 genů kódujících mAChRs, značené malými písmeny m_1 až m_5 (Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988; Buckley et al., 1989), které vytváří M_1 až M_5 cholinergní receptory (Caulfield a Birdsall, 1998). Ty jsou pak dále rozdělovány do dvou skupin na základě jejich mechanismu signální transdukce (Caulfield a Birdsall, 1998). M_1 , M_3 a M_5 receptory jsou všechny spřažené s fosfolipázou C cestou $G_{q/11}$ a vedou k mobilizaci intracelulárních zásob Ca^{2+} , zatímco M_2 a M_4 receptory jsou negativně

spřažené s adenylátcyklázou prostřednictvím $G_{i/o}$ a způsobují snížení hladin cAMP (Lanzafame et al., 2003).

U potkana M_1 receptory převažují v gangliích sympatiku a v exokrinních žlázách (Buckley a Burnstock, 1986) a v CNS jsou široce distribuovány jako dominantní mAChR podtyp v mozkové kůře, v hipokampu a v amygdale. M_2 receptory jsou hojně zastoupeny v myokardu, ale jen nepatrně v čichovém laloku a v hypotalamu. M_3 receptory se nejvíce vyskytují v hladkém svalstvu a v exokrinních žlázách, ale také vykazují větší expresi v kortexu, v hipokampu a v talamu. *In situ* hybridizace M_4 receptorů ukázala rozptýlený výskyt v kortexu a ve striatu, zatímco M_5 receptory jsou lokalizovány v hipokampu, v habenule a v talamu (Tohyama et al., 1998). Obecně lze říci, že M_1 receptory jsou v rámci CNS nejrozšířenější, M_2 a M_4 receptory jsou pak v CNS méně exprimovány a M_3 a M_5 receptory se zde vyskytují pouze v nízkých hladinách (Rouse et al., 1997; van der Zee a Luiten, 1999). V hipokampu se v různé míře vyskytuje všech 5 podtypů muskarinových receptorů, M_1 a M_3 receptory jsou především exprimovány v principiálních (pyramidových) neuronech a M_2 a M_4 receptory v interneuronech, na rozdíl od M_5 receptorů, které jsou v hipokampu detekovány jen ve velmi nízkých hladinách (Volpicelli a Levey, 2004).

Diverzita muskarinových účinků a přítomnost každého z molekulárních receptorových podtypů v hipokampu naznačuje, že tyto receptory by mohly hrát klíčovou roli v řadě procesů včetně učení a paměti.

3.2.5. Jednotlivé složky a lokalizace cholinergního systému

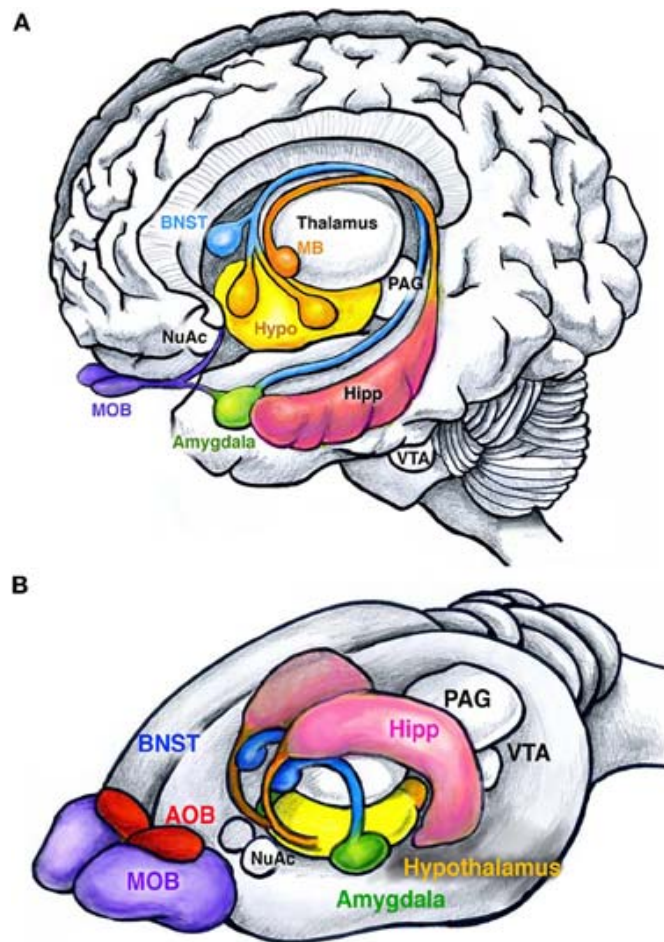
Cholinergní systém se skládá z několika oblastí s vysokou hustotou a) projekčních neuronů syntetizujících ACh a b) tzv. cholinopetálních oblastí exprimujících rozdílné ACh receptory (jak muskarinové, tak i nikotinové podtypy). Podobnosti a rozdíly u lidí a u hlodavců jsou shrnuty v pracích Weverse (2011) a van der Zee a Kejisera (2011). Dále je text zaměřen na pochopení cholinergní funkce v prostorovém učení.

V mozku hlodavců bylo dosud objeveno 6 cholinergních skupin buněk (CH1 – CH6) s rozdílnými projekčními oblastmi (Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1983b; Tohyama et al., 1998). V rámci bazálního předního mozku CH1 skupina zahrnuje mediální jádro septa (*medial septal nucleus*, MSN) a CH2 skupina vertikální svazek diagonálního Brocova pásu (*vertical limb of the diagonal band of Broca*, VDBB). Obě hustě projikují do hipokampální formace (Auld et al., 2002). CH3 jsou homologní s horizontálním svazkem diagonálního

Brocova pásu (*horizontal limb of the diagonal band of Broca*, HDBB), vysílajícího vlákna jak do čichového laloku, tak i do talamické retikulární oblasti. CH4, bazální magnocelulární jádro (*nucleus basalis magnocellularis*, NBM), je také propojené s talamem, ale navíc i s neokortexem a s amygdalou. Poslední dvě oblasti CH5 a CH6 se nachází ve středním mozku a jsou tvořeny pedunculo-pontinem a laterodorsálním tegmentem, jejichž vlákna projikují především do kortexu a do různých talamických oblastí (Mesulam et al., 1983a; Rye et al., 1987). Tato propojení jsou často předmětem zájmu mnoha prací, např. Barryho Everitta a Trevora Robbinse (1997). Kromě tohoto projekčního systému jsou zde i četná cholinergní vlákna zasahující do specifických oblastí jako je např. striatum.

3.2.6. Cholinergní signalizace do hipokampu

Hipokampus je součástí limbického systému mozku (**Obrázek 2**). Hlavní cholinergní vstupy do hipokampu pocházejí z mediálního septa a z Brocova diagonálního svazku prekomisurální větví dráhy fimbrie a fornixu (Cobb et al., 1999; Dutar et al., 1995). Tyto struktury poskytují přímý vstup do principiálních (pyramidových) neuronů a také do hipokampálních interneuronů (Frostcher a Leranthe, 1985; Leranthe a Frostcher, 1987). Septo-hipokampální projekce je pro správnou funkci hipokampu zcela klíčová, a to především pro pravidelné rytmické oscilace (tzv. theta rytmus, 8 – 11 Hz), nezbytné k ukládání a snad i konsolidaci paměťových stop (Buzsaki, 2002; Stewart a Fox, 1990). Mimo jiné je známo, že zde existuje také malý počet cholinergních interneuronů (Frostcher et al., 2000). Dále bylo zjištěno, že existuje nonsynaptická difúzní transmise, díky níž může ACh modifikovat sílu přenosu informace v mozkových oblastech prostřednictvím rozsáhlého uvolňování do nejrůznějších non-synaptických buněčných cílů a také do již zmíněných přímých cholinergních synaptických spojení (Umbriaco et al., 1995).



Obrázek 2 – Hlavní struktury limbického systému u lidí a hlodavců. **(A)** Zobrazení lidského mozku ukazuje amygdalu (zeleně), *bed nucleus of stria terminalis* (BNST, modře), hypotalamus (žlutě) a hipokampus (růžově). Hipokampus projikuje do mamiliárních tělísek (oranžově) cestou fimbrie a fornixu. Čichové vstupy jsou přijímány z hlavního čichového laloku (MOB, fialově). Další limbické struktury zahrnují *nucleus accumbens* (NAcc), ventrální tegmentální oblast (VTA) a periakvaduktální šedou hmotu (PAG). **(B)** Stejně struktury jsou zobrazeny u mozku hlodavců, s rozdíly prodlouženého čichového laloku oproti lidem a navíc i s přidatným čichovým lalokem (AOB, červeně). *Převzato z Sokolowski et Corbin, 2012.*

3.3. Centrální cholinergní systém a prostorové učení: studie lézí

Mnoho výzkumných prací se zabývalo radiofrekvenčně specifickými a neurotoxickými lézemi na základě anatomických zjištění o selektivních centrech cholinergních neuronů v bazálním předním mozku. Často zmiňovaným důvodem, proč jsou tyto experimenty prováděny, je úzký vztah k degeneraci neuronů bazálního předního mozku spolu se snížením cholinergních markerů v kortexu a hipokampu u pacientů, kteří trpí Alzheimerovou chorobou (AD) (Schliebs a Arendt, 2011). Léze bazálního předního mozku

vedou ke značnému poškození v učení a paměti a mají poměrně slabé, ne-li žádné, následky na celkové zachování funkcí. Nicméně je třeba poznamenat, že pacienti s AD mohou mít větší anomálie v mozkovém oběhu než pouze cholinergní deficity, a proto nejsou úplně vhodnými kandidáty pro definici cholinergní funkce v kognici.

Nejranější popsání lidské amnézie po fokálním poškození oblasti bazálního předního mozku zahrnují pacienty, kteří podstoupili chirurgickou operaci aneurysmy anteriorní spojovací artérie (*anterior communicating artery*, ACoA) v 60. letech 20. století (Morris et al., 1992). Tito pacienti vykazovali anterozádní amnézii, byli emocionálně labilní, agresivní a kognitivně neflexibilní, ale také vykazovali hypotalamickou dysfunkci (*diabetes insipidus*). To vyvolalo otázky, zda menší léze mohou mít také podobné následky. Zatím je znám pouze jediný případ pacientů, kterým byla chirurgickou operací odstraněna mikrocysta astrocytomu s diskretní, nonvaskulární lézí, zaměřenou pouze na bazální přední mozek, která vyvolala akutní a o 18 měsíců později i hlubokou celkovou amnézii (Guo a Lester, 2007). Ačkoli deficity pracovní paměti spojené s dysfunkcí postižené oblasti se vyskytly akutně a tyto deficity z velké části vymizely po dvou letech, zanechávají téměř úplnou amnézii v oblasti dlouhodobé paměti.

Zvláště významné jsou následky lézí na prostorovou výkonnost, která byla narušena v prostorovém rozlišování u makaka jávského (*Macaca fascicularis*) (Voytko et al., 1994), kosmanů (*Callitrichidae*) a kotulů (*Saimirinae*) (Ridley et al., 1995) a potkanů, u kterých byla provedena selektivní intraventrikulární imunotoxická léze s užitím 192 IgG-saporinu (Kinoshita et al., 1992a; Kinoshita et al., 1992b). Avšak jiné publikované výsledky, kde byly provedeny stejné imunotoxické léze CH1 a CH4 receptorů, ukázaly pouze mírné poškození či vůbec žádné deficity pracovní paměti (Traissard et al., 2007; Vuckovich et al., 2004). Proto byly prováděny pokusy o celkový úbytek ACh, odpovědný za tyto deficity, a přesnější lokální infúze, které selektivně poškozují bazální jádro (*nucleus basalis*, CH4; jako projekční dráha do korového límce; *cortical mantle*) či MSN (CH1; jako projekční vlákno do hipokampální formace).

3.3.1. Basokortikální dráhy

Nucleus basalis Meynerti (nbM, CH4) u lidí obsahuje těla cholinergních vláken vedoucích do neokortexu. Cytotoxické léze CH4, například za užití lokální infúze ibotenové kyseliny či radiofrekvenční ablace skupin buněk, způsobují signifikantní redukci ChAT a

AChE (Dubois et al., 1985; Hannila et al., 1990; Nieto–Escamez et al., 2002; Pepeu et al., 1986; Salamone, 1986), ale behaviorální testy se sníženým neokortikálním cholinergním tonusem se setkaly s protichůdnými výsledky, alespoň pokud jde o prostorové učení. Zatímco některé výzkumné laboratoře uvádějí jako důsledek CH4 lézí mírné poškození ve zpracování prostorových informací (Berger–Sweeney et al., 1994; Dokla a Thal, 1988; Hannila et al., 1990; Kwo-On-Yuen et al., 1990; Riekkinen et al., 1995), u jiných se naopak nepodařilo najít trvalé poškození (Baxter et al., 1995; Garcia-Alloza et al., 2006; Lehmann et al., 2003; Page et al., 1991; Torres et al., 1994) a jejichž výsledky velmi závisely na použitém neurotoxinu a na specifických podmínkách behaviorálního testu. Stupeň kortikální ACh redukce v některých studiích koreluje se závažností deficitu prostorového učení, avšak u jiných studií nikoli (Connor et al., 1991; Dunnett et al., 1987; Dunnett et al., 1991; Mandel et al., 1989a,b). NBM léze způsobené ibotenovou či quisqualovou kyselinou vedou ke srovnatelným redukcím v kortikální ChAT aktivitě, ale k rozdílným stupňům deficitů prostorového učení (Connor et al., 1991; Dunnett et al., 1987; Dunnett et al., 1991); přesto podání AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát), vysoce selektivního neurotoxinu cholinergních neuronů, nedokáže zcela poškodit prostorové učení (Page et al., 1991; Riekkinen et al., 1990). Tyto výsledky zpochybňují důležitost cholinergního vstupu do neokortexu jako klíčového prvku v prostorovém učení.

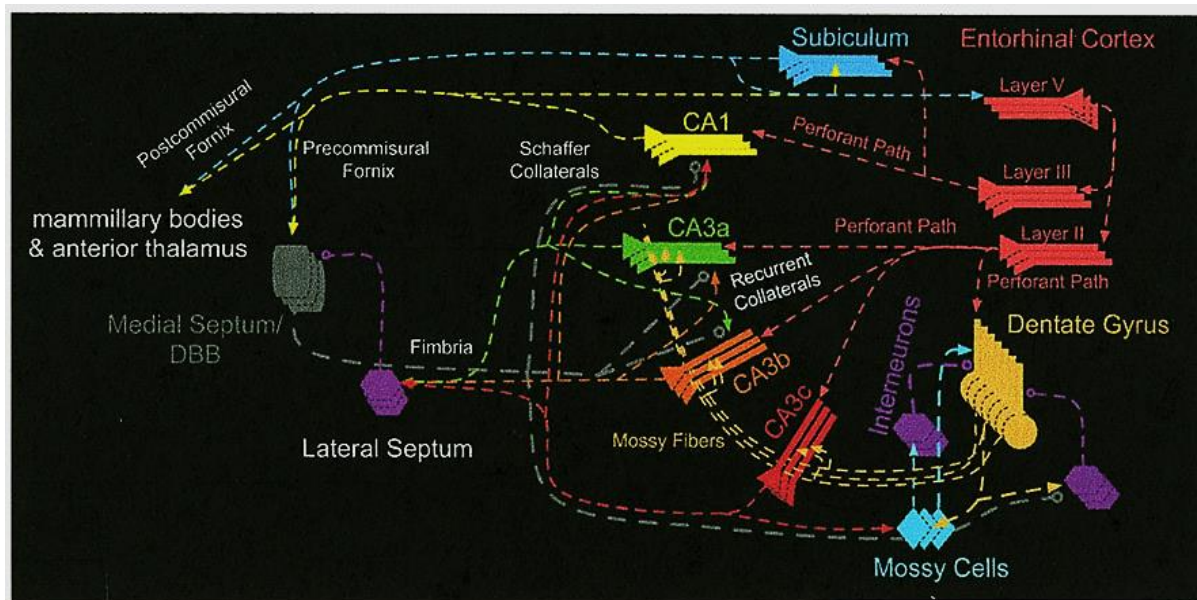
Je také představitelné, že pokud se deficity vyskytují po lézi NBM s následkem snížené cholinergní aktivace kortikálních oblastí mozku, pak znovuustavení normálního cholinergního tonu by mohlo narušenou paměť zlepšit. Tato hypotéza byla otestována podáním ACh agonisty oxotremorinu (Miyamoto et al., 1989), stejně jako podáním inhibitorů AChE huperzinu A (sesquiterpenový alkaloid izolovaný z rostliny *Huperzia serrata*), fyzostigminu (eserinu; indolový alkaloid izolovaný ze semen liány *Physostigma venenosum*), tacrinu či aplikací nervového růstového faktoru (NGF) jako trofické podpory pro buněčné přežití (Dokla a Thal, 1988; Kwo-On-Yuen et al., 1990; Mandel et al., 1989a; Mandel et al., 1989b; Mandel a Thal, 1988). Tyto výsledky ukazují, že deficity prostorového učení vznikají, alespoň částečně, jako důsledek cholinergní buněčné smrti v NBM. Zda nedostatek cholinergní aktivity přímo mění zpracování prostorové informace či zda jsou narušeny alternativní non-mnemonické mechanismy, v těchto studiích není uvedeno. Z těchto studií je ovšem patrné, že ACh vykazuje silné účinky na pozornostní zpracování (Dashniani et al., 2009; McDonald a Overmier, 1998), naznačující, že deficity prostorového učení se mohou vyskytovat pouze během komplexní úlohy s vysokými pozornostními nároky.

3.3.2. Septohipokampální a septoentorhinální dráhy

Hipokampus nepochybně hraje klíčovou roli ve formování prostorové paměti (Cain a Saucier, 1996; Morris et al., 1982). Léze hipokampu způsobují deficitory akvizice v úlohách v radiálním bludišti (Bouffard a Jarrard, 1988; Jarrard, 1993) a ve vodním bludišti (Morris et al., 1982; Sutherland et al., 1989). Některé kontroverzní výsledky mohou být způsobeny obtížemi při dosažení kompletních hipokampálních lézí, z důvodu jeho velikosti a zakřivení v podélné ose, lze však využít a) více infuzních míst a b) neurotoxinů, které nepoškodí procházející vlákna (Jarrard, 1993). Rolí hipokampu v prostorovém učení a ve formování paměti se zabývají tři hlavní teorie. Standardní konsolidační teorie předpokládá časově vázanou roli zapojení hipokampu v učení a konsolidaci prostorové informace, která může být následně po delší době vybavena bez hipokampálního zapojení (Alvarez a Squire, 1994; Riedel et al., 1999; Squire, 1992). Teorie mnohonásobných paměťových stop (*Multiple Trace Theory*, MTT) (Moscovitch et al., 2005; Moscovitch et al., 2006; Nadel a Moscovitch, 1997) předpokládá, že prostorové učení a vybavování informací z dlouhodobé paměti vždy zahrnuje hipokampální aktivitu a že opakování určité události uloží mnohonásobné stopy stejné vzpomínky, které je potom obtížné kompletně vymazat. Z toho vyplývá, že starší vzpomínky jsou tvořeny více paměťovými stopami. Poslední hypotézou je teorie kognitivní mapy, která postuluje, že alotetická prostorová informace je reprezentována místovými buňkami (*place cells*), které kódují rozdílné prvky prostředí jako tzv. aktivní pole (*firing fields*). Suma aktivity všech místových buněk pak může být kombinovaná do trojdimenzionální mapy prostředí.

V posledních letech je stále zřejmější, že zpracování prostorové informace není limitováno hipokampem, ale zahrnuje také rozsáhlý počet kortikálních a subkortikálních struktur (Aggleton et al., 2000; Moser et al., 2008). Optimální dynamika oběhu v hipokampální formaci pro účinné kódování, konsolidaci a vybavení je nejspíše kontrolována cholinergními vstupy z oblastí CH1 a CH2 (Hasselmo a McGaughy, 2004; Hasselmo, et al., 1995). Vysoké hladiny ACh tímto usnadňují kódování nové informace ovlivněním zpětných kolaterál a Schafferových kolaterál, které začínají na mechových vláknech (*mossy fibres*) a na vstupech z tzv. perforující dráhy, vedoucí z entorhinální kůry do *gyrus dentatus* (DG, **Obrázek 3**). Naopak nízké hladiny ACh nemusí být dostačující ke kódování nové informace, ale usnadňují konsolidaci a vybavení si známé informace (Hasselmo a McGaughy, 2004; Hasselmo et al., 1995). Ztráta septo-hipokampální cholinergní aktivity ovlivňuje tzv. *remapping*, který normálně zprostředkovává ustavení rozdílných hipokampálních prostorových reprezentací pro odlišná prostředí (Ikonen et al., 2002). To se shoduje

s představou, že cholinergní vstup může determinovat, zda nová či vzdálená vizuální informace z prostředí bude aktivně zpracována hipokampálním okruhem.

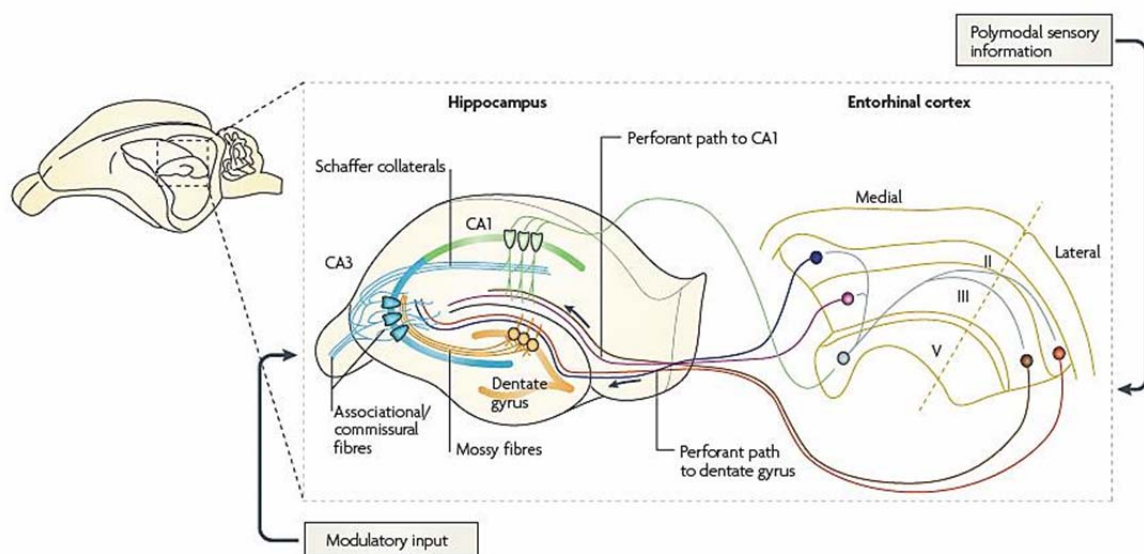


Obrázek 3 – Neurální okruh ovlivňující fungování CA3 podoblasti hipokampu. *Převzato z Kesner, 2013.*

Hipokampální cholinergní vstup vychází z CH1 (mediální septum) a z CH2 (diagonální Brocův pás). Role těchto projekcí v prostorové paměti byly zpochybňovány, protože selektivní odstranění tohoto vstupu se nezdá být dostatečné k narušení prostorového učení a paměti (Baxter et al., 1995; Berger–Sweeney et al., 1994; Bizon et al., 2003; Niewiadomska et al., 2009), což naznačuje, že samotná cholinergní deprivace nestačí k vyvolání poškození na hipokampu závislého prostorového učení. Tato zjištění jsou v kontrastu s konceptem, že léze CH1 snižují intrahipokampální metabolismus ACh (Ginn a Peterson, 1992), odstraňují theta rytmickou aktivitu (Andersen et al., 1979) a mají za následek hipokampální dysfunkci (Deiana et al., 2011). Aspirace či elektrolytické odstranění CH1 poškozuje jak akvizici, tak i uchování prostorové paměti v úlohách vodního bludiště (Brandner a Schenk, 1998; Decker et al., 1994; Fraser et al., 1991; Hagan et al., 1988), T-bludiště (Johnson et al., 2002), kuželového bludiště (*cone-field maze*) (Van der Staay et al., 2006) a bludiště s radiálními rameny (Feasey–Truger et al., 1992; Janis et al., 1998; Lehmann et al., 2003; Walsh et al., 1996), přičemž snížení cholinergních markerů koreluje s výkonem v bludišti. Ovšem ne všechny studie užívající neurotoxické a imunotoxické léze tato data potvrzují (Baxter et al., 1995; Bizon et al., 2003; Fletcher et al., 2007; McMahan et al., 1997).

Výzkumný tým amerického neurofyziologa Bruce L. McNaughtona (Shen et al., 1996) popisuje rozdílné následky imunotoxických lézí, které poškozovaly prostorovou pracovní paměť, ale neměly vliv na referenční paměť u potkanů s lézí, což naznačuje, že septo-hipokampální cholinergní projekce nedomuluje žádný signifikantní stupeň prostorového zpracování vyskytující se v hipokampu (Everitt a Robbins, 1997). Ačkoli tyto výsledky zpochybňují důležitost vstupu ze septa do hipokampu v prostorovém učení, v žádném případě neargumentují proti tomu, že je hipokampální formace centrem zpracování stimulů z prostředí.

Pro prostorové zpracování informace je také významný entorhinální kortex (EC, **Obrázek 4**), v podobě neuronů, které vysílají výběžky formující perforující dráhu do hipokampu, jež poskytuje předzpracování informace o kontextuálních podnětech (Witter et al., 2000). Entorhinální aferenty pocházejí celkově z kortikálních oblastí, které zahrnují piriformní, perirhinální, parahipokampální, orbitofrontální, cingulární a retrosplenální korové oblasti (Lavenex a Amaral, 2000) a poskytují informaci k vytvoření topograficky organizované neurální mapy prostorového prostředí (Hafting et al., 2005; Moser et al., 2008). Neurotoxické léze EC u mladých potkanů vyvolávají deficity v prostorovém učení (Goodlett et al., 1989; Jarrard et al., 1984) a v behaviorální flexibilitě, která je posuzována prostřednictvím posouvání platformy do protilehlého kvadrantu ve vodním bludišti (Hagan et al., 1992). Avšak tyto studie neposkytují jednoznačný důkaz, že by nedostatek zpracování informace o prostoru v rámci EC kompromitoval formování prostorové paměti. Alternativní interpretace může být taková, že změněný hipokampální vstup v důsledku ablace perforující dráhy vede k chybnému zpracování prostorové informace. EC přijímá cholinergní projekce z CH1 podobně jako hipokampus (Alonso a Kohler, 1984; Jones, 1993) a některé výsledky naznačují, že cholinergní septo-entorhinální projekce může být také zapojena v učení a paměti (Walsh et al., 1996). Nicméně neurotoxické léze CH1 nemohou plně rozlišit mezi cholinergními účinky v hipokampu a v EC, a k vyřešení této otázky je proto třeba více výzkumů užívající lokální infuze neurotoxické látky inhibující cholinergní receptory.



Nature Reviews | Neuroscience

Obrázek 4 – Hipokampus má laminární organizaci, ve které jsou těla buněk pevně sbalená do tvaru písmene C. Schéma zapojení hipokampu je tradičně prezentováno jako trisynaptická smyčka. Hlavní vstup je veden axony z perforující dráhy, které přinášejí do *gyrus dentatus* polymodální smyslové informace z neuronů II. vrstvy entorhinálního kortexu. Axony perforující dráhy tvoří excitační synaptický kontakt s dendrity granulárních buněk, resp. axony z laterálního a mediálního entorhinálního kortexu inervují vnější a střední třetinu dendritického stromu. Granulární buňky projikují svými axony (mechovými vlákny, *mossy fibres*) do proximálních apikálních dendritů pyramidových buněk CA3 oblasti, následně projikují ipsilaterálně do pyramidových buněk CA1 oblasti prostřednictvím Schafferových kolaterál a kontralaterálně do pyramidových buněk CA3 a CA1 oblasti prostřednictvím komisurálních projekcí. Kromě trisynaptické smyčky je zde také hustá autoasociativní síť propojující CA3 buňky na stejné straně. Pyramidové buňky CA3 oblasti jsou také inervovány přímým vstupem z buněk II. vrstvy entorhinálního kortexu (na obrázku není zobrazeno). Dálší apikální dendrity pyramidálních neuronů CA1 oblasti přijímají přímý vstup z buněk III. vrstvy entorhinálního kortexu, kde je také modulační vstup do hipokampálních neuronů. Hipokampus také obsahuje pestrou paletu inhibičních neuronů (zde nevyobrazeny). *Převzato z Guilherme et al., 2008.*

3.3.3. Striatální cholinergní systém

Striatum kontroluje odpovědi na stimuly, motorické dovednosti a procedurální prvky selekce prostorové odpovědi (McDonald a White, 1993). Jeho účast v těchto procesech lze testovat u potkanů ve specializovaných bludištích. Potkani si vybírají správné rameno v křížovém bludišti na základě strategie místa či na základě strategie odpovědi, závislých na rozsahu trénování (Packard, 1999; Packard a McGaugh, 1996). Simultánní měření hladin ACh v mozku potkanů prostřednictvím mikrodialýzy naznačuje, že hipokampální systém je zapojen do procesu prostorové odpovědi, zatímco striatum je aktivováno až později, když už je implementována strategie odpovědi (Chang a Gold, 2003). Ablace striatálních cholinergních interneuronů vede k poškození procedurálního učení v úloze tónem-*naváděného*

vyhýbání se (*tone-cued avoidance*), stejně tak jako poškození prostorové pracovní paměti v úloze alternace v T-bludišti, avšak nemá žádný dopad na akvizici referenční paměti ve vodním bludišti (Kitabatake et al., 2003).

Rozdílné striatální podoblasti se pravděpodobně podílí na jednotlivých aspektech výkonu ve vodním bludišti (Devan et al., 1999; Devan a White, 1999). Obzvláště významné je dorzomediální striatum se svou rolí v akvizici jak v úloze viditelné, tak i skryté platformy ve vodním bludišti (Devan et al., 1999; Whishaw et al., 1987). Deficity byly způsobeny lézi-indukovanou tigmotaxí, která brání potkanům používat optimální navigační strategii. ACh v rámci dorzomediálního striata pravděpodobně kontroluje inhibici vzorců předchozí relevantní odpovědi a umožňuje učení nové, vhodnější prostorové odpovědi (Ragozzino, 2003; Ragozzino a Choi, 2004; Ragozzino et al., 2002). Modulace výlevu ACh během prostorového reverzálního učení naznačuje, že cholinergní neurony v dorzomediálním striatu jsou aktivovány podle nových nároků prostředí tak, aby mohly být pozměněny vzorce pro novou prostorovou odpověď.

3.4. Farmakologické manipulace cholinergní transmise a prostorového učení

Přestože studie lézí mohou indikovat, zda je ACh *a priori* významný v neuronální aktivitě během určitých typů chování, neposkytují odpověď na otázky, který systém receptorů je aktivní či během které periody výkonu v úloze se ACh uvolňuje. Centrálně aktivní cholinergní látky s vyšším časovým rozlišením umožňují tyto otázky zodpovědět, ovlivňují fyziologické projevy, jako je EEG (Platt a Riedel, 2011), či cholinergní tonus, a zároveň modifikují behaviorální výkony v jednotlivých kognitivních úlohách jak u lidí, tak i u zvířat. Ovšem jejich zřejmou nevýhodou je, že mohou poskytnout pouze omezené informace o cholinergním podsystemu a systémové (intraperitoneální, subkutánní) podání nemusí mít žádné rozlišení pro konkrétní specifickou oblast v mozku.

Farmakologické manipulace se speciálně používají k testování prostorového zpracování a jsou realizovány prostřednictvím podávání agonistů a antagonistů centrálních cholinergních receptorů, jak muskarinových, tak i nikotinových, či prostřednictvím exogenní blokády nebo posílení cholinergní aktivity. Cholinergní tonus může být navíc nepřímo modifikován jinými neuropřenašecovými systémy, což představuje další komplikující faktor.

3.4.1. Agonisté a antagonisté muskarinových receptorů

Blokáda muskarinových receptorů předcházející proces učení, například užitím nespecifických antagonistů skopolaminu či atropinu, inhibuje prostorovou paměť. Většina studií užívající skopolamin či atropin jako výchozí screeningovou metodu (Tabulka 1) k identifikování terapeutických kandidátů k léčbě kognitivních onemocnění je prováděna na hlodavcích (Drachman a Leavitt, 1974). U lidí skopolamin způsobuje deficity v úlohách, které zahrnují nové kombinace již dobře známých prvků (Beatty et al., 1986), ale nepoškozuje pracovní paměť pro známé podněty, jako jsou slova či čísla. U hlodavců muskarinová blokáda vyvolává deficity jak u prostorového učení, tak i u selekce strategie v úloze referenční paměti ve vodním bludišti; nicméně neprostorový předtrénink (*non-spatial pretraining*) umožňuje zvířatům najít nejvhodnější strategii (Cain et al., 2000). Předpokládá se, že tato poškození mohou být způsobena neschopností inhibovat neefektivní únikové strategie (Day a Schallert, 1996). Blokáda muskarinových receptorů proto může narušovat selekci nejvhodnější strategie učení (Day a Schallert, 1996; Sutherland et al., 1982; Whishaw, 1985; Whishaw et al., 1995). Tento deficit může být překonán opakovaným tréninkem, dokud převládá prostorová strategie (Day a Schallert, 1996). To je v souladu s pozorováním, že blokáda cholinergní transmise narušuje prostorovou pracovní paměť (Ballard a McAllister, 1999; Buxton et al., 1994; Han et al., 2000; Whishaw et al., 1995), a v souladu s anxiogenním profilem skopolaminu, který může přispívat k poškození v sensorickém filtrování (Smythe et al., 1996).

Časový průběh podání ACh vzhledem k začátku úlohy hraje kritickou roli s ohledem na účinky anticholinergních látek. Cholinergní blokáda před tréninkem narušuje neuronální procesy počátečního kódování, zatímco pokud je cholinergní blokátor podán během konsolidace, nevyvolává poškození ve vybavování. Z toho je patrné, že se role ACh mění během rozdílných stavů paměťového zpracování a je bifázická, tedy vyšší během formování a nižší během pozdějších stavů paměťového zpracování.

Ačkoliv základní mechanismy nejsou zcela jasné, zdá se, že modulace uvolňování ACh v periodách následujících po učení umožňuje udržení stabilní aktivity, což podporuje dvoufázové působení ACh ve formování prostorové paměti (Marighetto et al., 1993; Micheau a Marighetto, 2011). Kromě možné léčby AD mohou být cholinomimetika považována také za látky zlepšující pokles kognitivních funkcí ve fyziologickém stárnutí. Souhrn studií na hlodavcích s podáváním muskarinových agonistů, jako jsou pilokarpin, karbachol, oxotremorin a další, je uveden v review Deiana et al. (2011). Klíčovým prvkem je integrita cholinergního systému, u mladých kontrolních subjektů cholinergní agonisté neovlivňují

signifikantně paměťové zpracování (Givens a Olton, 1990), spíše se zdají být efektivní u starších zvířat, zvířat s modelovanou demencí či u pacientů trpících demencí (Brandeis et al., 1990; De-Mello et al., 2005; Markowska et al., 1995), u nichž je cholinergní systém narušen. To může být způsobeno na věku závislým narušením cholinergní funkce, která je citlivá k látkami vyvolanému posílení ACh; u mladých subjektů je aktivita ACh saturována, a proto nemusí využívat další či déletrvající aktivace receptorů.

Co se týče zlepšení na věku závislých deficitů, muskarinové agonisté obecně zabraňují deficitům prostorové paměti vyvolaných farmakologickou cholinergní blokádou prostřednictvím zvýšení aktivity septo-hipokampálních neuronů (Givens a Sarter, 1997; Markowska et al., 1995), což má za následek zvýšené uvolňování ACh v hipokampu (Bland a Oddie, 1998; Givens a Olton, 1994; Givens a Olton, 1995; Monmaur a Breton, 1991). Podání cholinergních blokátorů po akviziční fázi vyvolává zhoršení výkonu prostorové paměti (Bunce et al., 2003; Bunce et al., 2004) naznačující narušení v konsolidaci paměti. Toto opět ukazuje na dvoufázovou roli ACh během akvizice a retence (Marighetto et al., 1993).

Avšak z farmakologických studií skopolaminu stále není znám specifický receptorový podtyp, který je aktivován během rozdílných úloh. Na základě distribuce receptorů v kortexu a hipokampu podněcuje blokáda M_2 receptorů uvolňování ACh z kortikálních, hipokampálních a striatálních oblastí v potkaním mozku, narozdíl od blokády M_1 receptorů (Lachowicz et al., 2001; Lapchak et al., 1989; Quirion et al., 1995; Quirion et al., 1994; Stillman et al., 1996).

Selektivní M_2 antagonisté, jako je BIBN-99, jsou schopni zlepšit prostorovou paměť ve vodním bludišti u starých potkanů s kognitivními poruchami (Doods et al., 1993; Rowe et al., 2003). Jejich účinky byly dlouhodobé, přetrvávající i po ukončení léčby. Zablokování M_2 receptorů v dorsolaterálním striatu selektivně zlepšuje procedurální, nikoli však referenční prostorovou paměť (Lazaris et al., 2003), zatímco podání do dorzálního hipokampu nemá žádný efekt na dlouhodobou, ani na krátkodobou prostorovou paměť (Andrews et al., 1994; Herrera-Morales et al., 2007). Nicméně M_2 knockoutované myši nevykazují lepší výkony v prostorových úlohách, naopak se spíše zdá, že absence M_2 je pro kognici nežádoucí, naznačující celkovou abnormální aktivitu mozku v důsledku mutantních M_2 receptorů (Bainbridge et al., 2008; Seeger et al., 2004). Naopak a v souladu s předpoklady selektivní aktivace M_2 receptorů nereverzují kognitivní deficity vyvolané skopolaminem (Shannon et al., 1990).

Pokud jsou M_1 cholinergní receptory lokalizovány postsynapticky (Wevers, 2011) jejich inhibice pirenzepinem v předtréninku oslabuje prostorové učení (Bymaster et al., 1993). V souladu s tímto působením lze prostorový deficit závislý na věku zvrátit agonisty M_1 receptorů v úlohách – jak v bludišti s radiálními rameny, tak i ve vodním bludišti (Brandeis et al., 1989; Brandeis et al., 1990). Vysoce potentní noví M_1 -selektivní agonisté dokonce zlepšují výkony u normálních subjektů (Vanover et al., 2008), což naznačuje, že by to mohla být efektivní a nadějná terapeutická cesta v blízké budoucnosti.

Kmen potkanů	Věk	Behaviorální test	Způsob či místo podání	Fáze podání	Efekt	Publikace
Lister hooded	Dospělí	DMTP verze vodního bludiště	ip	Pre-trénink	Deficit prostorové pracovní paměti, intaktní procedurální paměť	von Linstow Roloff et al., 2007
Long-Evans	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	?	Pre-test	Narušení	McNamara a Skelton, 1992
Kuo: Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	Anteriorní cingulární kortex	Post-trénink	Bez efektu	Riekkinen et al., 1995
Kuo: Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	Anteriorní cingulární kortex	Pre-trénink	Bez efektu	Riekkinen et al., 1995
Lister hooded	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	icv	Pre-trénink	Narušení	Hagan et al., 1987
Sprague Dawley	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Post-trénink/Pre-test	Narušení	Jackson a Soliman, 1996
Long-Evans	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-prostorový trénink/post-neprostorový trénink	Narušení prostorové odpovědi	Cain et al., 2000
Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-test	Narušení	Riekkinen et al., 1990
Lister hooded	4 měsíce	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-trénink	Narušení	Buresova et al., 1986
Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-trénink	Narušení	Yaguchi et al., 2009
Lister hooded	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-trénink	Narušení	von Linstow Roloff et al., 2007
Sprague Dawley	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	ms	Pre-akvizice	Narušení	Elvander et al., 2004
Kuo: Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	Posteriorní cingulární kortex	Post-trénink	Bez efektu	Riekkinen Jr et al., 1995
Kuo: Wistar	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	Posteriorní cingulární kortex	Pre-trénink	Narušení	Riekkinen Jr et al., 1995
F 344	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	sc	Pre-test	Narušení	Cozzolino et al., 1994
Sprague Dawley	Dospělí	Test referenční paměti ve vodním bludišti	sc	Pre-trénink	Narušení	Wang et al., 2000
Wistar	2-3 měsíce	Test referenční paměti ve vodním bludišti	sc	Pre-trénink	Narušení	Buccafusco et al., 2008
Long-Evans	7-9 měsíců	Test pracovní paměti ve vodním bludišti	ip	Pre-akvizice	Narušení	Hodges Jr et al., 2009
Long-Evans	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	ip	Post-akvizice	Narušení	Cassel a Kelche, 1989
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	ip	Post-test	Bez efektu na konsolidaci	Mundy a Iwamoto, 1988

Kmen potkanů	Věk	Behaviorální test	Způsob či místo podání	Fáze podání	Efekt	Publikace
Long-Evans	7-9 měsíců	Bludiště s radiálními rameny	ip	Pre-akvizice	Narušení	Hodges Jr et al., 2009
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	ip	Pre-test	Narušení v akvizici	Mundy a Iwamoto, 1988
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	ip	Pre-test	Narušení	Xiong a Tang, 1995
Wistar	7 týdnů	Bludiště s radiálními rameny	ip	Pre-test	Narušení	Masuoka a Kamei, 2009
Lister hooded	4 měsíce	Bludiště s radiálními rameny	ip	Pre-trénink	Narušení	Buresova et al., 1986
Lister hooded	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	sc	Post-trénink/Pre-test	Narušení	Dennes a Barnes, 1993
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	Substantia nigra	Post-trénink/Pre-test	Bez efektu	Levin et al., 1994
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	Ventrální hipokampus	Post-trénink/Pre-test	Narušení	Kim a Levin, 1996
Sprague Dawley	Dospělí	Bludiště s radiálními rameny	VTA	Post-trénink/Pre-test	Bez efektu	Levin et al., 1994
F 344	12 týdnů	Prostorová alternace potravní prezentace (pracovní paměť)	sc	Pre-akvizice	Narušení	Shannon et al., 1990
F 344	6-8 měsíců	Prostorová alternace potravní prezentace	sc	Pre-trénink	Narušení	Bymaster et al., 1993
Long-Evans	Dospělí	Spontánní alternace v T-bludišti	ms	Pre-test	Narušení	Givens a Olton, 1990
Long-Evans	Dospělí	Spontánní alternace v T-bludišti	ip	Pre-akvizice	Narušení	Givens a Olton, 1995
Long-Evans	10,22,32 měsíců	Spontánní alternace v T-bludišti	ip	Pre-akvizice	Narušení nezávislé na věku	Ordy et al., 1988
Sprague Dawley	Dospělí	Prostorová úloha pracovní paměti párové diskriminace	sc	Pre-test	Narušení	Grauer a Kapon, 1996
Wistar	Dospělí	Úloha kuželového bludiště	ip	Pre-test	Narušení	van der Staay a Bouger, 2005
Long-Evans	Dospělí	DMTP úloha v MWM	sc	Pre-test	Narušení	Andrews et al., 1994
Long-Evans	4 měsíce	Hebb-Williamsovo bludiště	CA3, CA1	Pre-test	Deficit v kódování, bez efektu na retrieval	Rogers a Kesner, 2003
Wistar	3 měsíce	Lokalizace objektu	sc	Pre-test	Narušení	Pitsikas, 2007

Tabulka 1 – Přehled účinků na muskarinové receptory po podání skopolaminu na prostorovou paměť u vybraných kmenů potkanů. DMTP – úloha *delayed-matching-to-place* v Morrisově vodním bludišti, icv – intracerebroventrikulární, ip – intraperitoneální, ms – mediální septum, sc – subkutánní, VTA – ventrální tegmentální area. *Převzato a upraveno dle Deiana et al., 2011*

3.5. Acetylcholin, theta rytmus a synaptická plasticita

Předpokládá se, že cholinergní signalizace je odpovědná za životně důležitou roli v generování oscilačních stavů v CNS. Dále se předpokládá, že síťové oscilace *in vivo* poskytují časovou souvislost, podle níž může přesně načasovaná aktivita buněk dekodovat informaci, a konečně, hipokampální oscilace mohou být nezbytné v asociativním učení a jako reference pro kódování místovými buňkami (Buzsaki, 2002; O'Keefe a Recce, 1993).

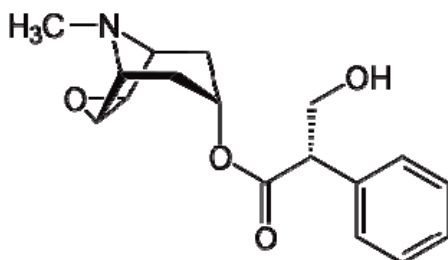
Většina výzkumů zaměřená na mechanistické aspekty síťových oscilací byla prováděna *in vitro* díky zvýšené experimentální dosažitelnosti nahrávání z řezů oproti *in vivo*. Aktivace ACh receptoru může vést k nesčetně synchronizovaným oscilačním stavům závislých na koncentraci použitého agonisty a na aktivovaných podtypech receptorů, zahrnující nízkofrekvenční aktivitu a theta, gama a beta frekvenční oscilace (Fisahn et al., 1998; Luo et al., 2008; Shimono et al., 2000). Tyto oscilační stavy závisejí na inhibiční i excitační neurotransmisi a jsou abnormální při narušení GABAergní, stejně jako glutamátergní, signalizace.

Zvláštní zájem je věnován roli ACh v theta-oscilacích. Hipokampální theta rytmus je závislý na projekcích z oblasti mediálního septa a vyskytuje se u potkanů, když se zabývají průzkumným chováním a během REM spánku (Brankack et al., 2009; Buzsaki, 2002). Tyto oscilace jsou ve své podstatě svázány s učením a pamětí a umožňují rychlý přechod mezi kódováním a vybavením informací (Buzsaki, 2002; Hasselmo et al., 2002; Winson, 1978). Aplikace agonistů mAChR na řezy hipokampu vyvolává theta frekvenční oscilace, které modulují indukci dlouhodobé potenciace (*long-term potentiation*, LTP) (Huerta a Lisman, 1995; MacVicar a Tse, 1989; Traub et al., 2004; Whitlock et al., 2006). V CA1 (*Cornu Ammonis Area 1*) oblasti hipokampálních řezů vyvolává karbachol (CCh, agonista nAChR) theta-podobné oscilace, které jsou spojené s muskarinovým potlačením GABAergní inhibice, a indukce LTP na řezech s CCh o koncentracích v optimálním rozsahu pro vyvolání theta frekvenčních oscilací je potenicována (Huerta a Lisman, 1993; Natsume a Kometani, 1997). Mimo jiné CCh-vyvolané theta oscilace snižují práh vyvolání LTP (Huerta a Lisman, 1995). Tato facilitace je blokována atropinem, což naznačuje silnou vazbu na muskarinové receptory (Natsume a Kometani, 1997). Ve skutečnosti je oscilogenní (pro-oscilační) aktivita ACh zprostředkována predominantně prostřednictvím mAChRs, nAChRs se neúčastní přímo generování síťových oscilací, ale spíše modulování pre-existujících stavů (Cobb et al., 1999;

Williams a Kauer, 1997). Například, v CA3 (*Cornu Ammonis Area 3*) oblasti hipokampálních řezů endogenní aktivace nAChRs po farmakologické stimulaci muskarinových receptorů konvertuje vzor síťové aktivity v theta-frekvenční depolarizující epizody (Cobb et al., 1999). V případě LTP je však určení role individuálních muskarinových podtypů v odlišných vzorcích síťových oscilací obtížné kvůli prozatímni absenci podejdnotkově specifických ligandů, ačkoli řešení postupně přichází s použitím muskarinových knockoutů.

3.6. Skopolamin

Skopolamin (hyoscin), ester skopinu a kyseliny tropové, je tropanový alkaloid vyskytující se v lilkovitých rostlinách (*Solanaceae*) (Alves et al., 2007), např. v rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*), blínu černém (*Hyoscyamus niger*), durmanu obecném (*Datura stramonium*) či mandragoře lékařské (*Mandragora officinalis*). Chemicky je příbuzný atropinu, má terciální dusík a účinná je pouze jeho levotočivá forma (L-skopolamin, **Obrázek 5**), stejně jako u atropinu. Skopolamin působí na vegetativní orgány kvalitativně stejně jako atropin. V účincích na CNS stojí na rozdíl od atropinu v popředí tlumivé účinky, které se dají využít v profylaxi zvracení při kinetózách. Skopolamin proniká do mozku snáze a rychleji než atropin, protože vyšší podíl dávky je ve formě lipofilní báze. Působí jako antagonist centrálních muskarinových receptorů v mozku (Ben-Barak a Dudai, 1980). Svými účinky narušuje učení a paměť, vyvolává poruchy paměti a neschopnost úsudku. V určitém dávkovém rozsahu se centrální příznaky otravy projevují jako zmatenost a halucinace (Lüllmann et al., 2004). Někdo již po zlomcích mg reaguje značnou psychickou tupostí, po případě spánkem. Přitom však může odpovídat na otázky značně rychle, dokonce tak, že nevzniká korekce autokritikou. Ukázalo se, že této vlastnosti skopolaminu nelze využít k dosažení pravdivé výpovědi, poněvadž se takto může přiznat k trestnému činu nejen pachatel, nýbrž každý, kdo na tento čin jen kladně pomyslel (Riedl et al., 1971). Skopolaminový model amnézie je velmi často využíván jako screeningový test ve výzkumu látek posilujících paměť (Blokland, 2005). V lékařství je dnes využíván jako sedativum motorického neklidu u duševních chorob, jako parasympatolytikum, lék tlumící činnost pasympatického systému (např. při léčbě křečových bolestí), či jako antiemetikum, látka potlačující zvracení (u kinetóz – např. u mořské nemoci či u letecké nevolnosti). V České republice však není registrován jako lék.



Obrázek 5 – Chemická struktura levotočivé formy skopolaminu (L-skopolamin). *Převzato z Wikimedia Commons*

4. Cíle práce

- **Porovnat citlivost prostorové navigace dvou outbredních kmenů potkana Long–Evans a Wistar z chovů Fyziologického ústavu AV ČR k akutnímu intraperitoneálnímu podání roztoku skopolaminu jako modelového amnestického agens.**
- **Stanovit dávkovou závislost této odpovědi u obou kmenů s využitím tří dávek skopolaminu: 0,8 mg/kg; 1,5 mg/kg a 3,0 mg/kg.**
- **Otestovat skopolaminem navozený kognitivní deficit potkanů ve dvou prostorových úlohách: v aktivním vyhýbání se místu, testu kognitivní koordinace, a v Morrisově vodním bludišti, testu přesné reprezentace místa.**

5. Metody

5.1. Zvířata

Ve studii byli použiti dospělí outbrední samci potkanů kmene Long–Evans (pigmentovaní), v počtu 64, a kmene Wistar (albíni), v počtu 65. Kmen Long–Evans a Wistar byl dodán z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, v. v. i.. Váha potkanů se pohybovala mezi 250 – 400 g dle jejich stáří, které bylo v průměru 90 dní. Potkani byli chováni v odděleném zvěřinci laboratoře Oddělení neurofyzologie chování a paměti, FGÚ AV ČR, v průhledných plastových boxech (25 x 25 x 40 cm) po 2 až 4 jedincích ve skupině a v 12/12hodinovém režimu den a noc. V klimatizované místnosti byla konstantní teplota, a konstantní vlhkost. Po celou dobu studie měli potkani volně dostupnou potravu a vodu. Než potkani vstoupili do experimentu, byli nejméně po dobu 5 dnů ochočováni experimentátorem. Před testováním v úloze AAPA byl vybrané skupině potkanů citlivě implantován kovový čip (injekční jehla se zatupeným a zatočeným koncem) do podkožního záhybu na zádech, k němuž byla v testu připevněna krokodýlová svorka propojená s šokovacím zařízením (více v kapitole 5.3. Aparatura a behaviorální procedury). Tento zákrok je analogický s hypodermickou injekcí u lidí a nevyžaduje anestézii. Každá testovaná skupina o 8 potkanech byla zařazena buď do experimentu MWM, anebo do experimentu AAPA. Veškeré manipulace se zvířaty byly provedeny dle Směrnic o chovu a využití laboratorních zvířat, v souladu se Zákonem č. 149/2004 Sb., včetně dodatku o ochraně zvířat proti týrání, a Vyhláškou Ministerstva zemědělství České republiky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a odpovídající směrnice Rady evropských společenství (European Community Council (2010/63/EC)).

5.2. Chemikálie

Centrálně aktivní antagonistu acetylcholinových muskarinových receptorů skopolamin hydrobromid (dále jako skopolamin, dodán firmou Sigma Aldrich spol., s. r. o., ČR) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl). Ve studii byly použity 3 koncentrace skopolaminu, a to: 0,8 mg/ml, 1,5 mg/ml a 3,0 mg/ml. Roztoky skopolaminu byly vždy připravovány čerstvé první den testovacího týdne a během experimentu byly uchovávány

v chladu a chráněny před světlem. Roztok skopolaminu či fyziologický roztok byl intraperitoneálně aplikován v objemu 1 ml/kg dle zařazení do skupiny (kontrolní s fyziologickým roztokem nebo testovací s roztokem skopolaminu v dávce 0,8 mg/kg, 1,5 mg/kg či 3,0 mg/kg) vždy 20 minut před zahájením testování v AAPA a vždy 20 minut před první plavbou v MWM. Potkani obdrželi stejný objem skopolaminu či fyziologického roztoku odpovídající tělesné váze v každé injekci.

5.3. Aparatury a behaviorální procedury

5.3.1. Aktivní vyhýbání se místu (AAPA)

Aparatura aktivního se vyhýbání místu (dále AAPA; **Obrázek 6**) (Stuchlik et al., 2004, 2008, 2012) představuje kruhovou arénu o průměru 82 cm s hladkým kovovým povrchem, která je vyvýšená 1 m nad zemí. Aréna je obklopena průhlednou plexisklovou bariérou o výšce 30 cm. Během testování jsou v místnosti konstantní vzdálené orientační body (dveře, plakáty, nábytek aj.) (Bures et al., 1997). Na začátku sezení je potkanovi nasazen leký postrojek s LED diodou a je mu připevněna krokodýlová svorka ke kovovému čipu (injekční jehla, viz výše) na zádech, čímž je propojen se šokovacím zařízením. Potkan je následně umístěn do středu arény, která se otáčí konstantní rychlostí, 1 otáčka za minutu. Na aréně je vymezen neznačený, pro potkana zakázaný sektor, který je definován v souřadnicích místnosti a stabilně orientovaný na sever po celou dobu testování. Sektor je definován pomocí sledovacího systému (Tracker, Biosignal Group, USA) propojeného s počítačem. Tento systém také monitoruje polohu potkana v aréně (o frekvenci 25 Hz) díky LED diodě umístěné na jeho zádech. Druhá LED dioda je lokalizována na periferii arény a udává informaci o její rotaci. Trajektorie jsou digitalizovány a nahrávány do počítače jak v souřadnicích arény, tak i v souřadnicích místnosti, pro budoucí rekonstrukci a analyzování dráhy potkana pomocí analyzačního programu (TrackAnalysis, Biosignal Group, USA).

Pokud se potkan zdrží v zakázaném sektoru déle jak 300 ms, obdrží jemný elektrický šok (střídavý proud, konstantní proudová regulace; 50 Hz, 200-600 μ A) do plošek na chodidlech v intervalech 1200 ms, dokud zakázaný sektor neopustí. Elektrický šok je zprostředkován generátorem propojeným kabelem s krokodýlovou svorkou, která je připevněna ke kovovému čipu v podkoží na zádech potkana, který stojí na uzemněné kovové aréně, čímž se uzavírá elektrický obvod. Velikost elektrického šoku je individualizována pro

každé zvíře zvlášť tak, aby byl dostatečný k únikové reakci, ale ne příliš silný, aby se předešlo nehybnému chování, kdy potkan na impuls rezignuje a elektrický šok dál ignoruje. Jak se aréna permanentně otáčí, je potkan nucen se aktivně vyhýbat zakázanému sektoru ve směru proti jejímu otáčení, jinak je do něj pasivně zavezen. Testování v AAPA trvá 4 dny, kdy v každém dni je provedeno 1 sezení trvající 20 minut, tedy mezi jednotlivými sezení je 24hodinový interval. Fyziologický roztok či roztok skopolaminu (o koncentraci 0,8 mg/ml, 1,5 mg/ml či 3,0 mg/ml), byl intraperitoneálně aplikován vždy 20 minut před zahájením každého sezení. V každé testované skupině bylo po 8 potkanech, tedy Wistar – kontrolní, fyziologický roztok; Wistar – skopolamin 0,8 mg/kg; Wistar – skopolamin 1,5 mg/kg; Wistar – skopolamin 3,0 mg/kg; Long–Evans – kontrolní, fyziologický roztok; Long–Evans – skopolamin 0,8 mg/kg; Long–Evans – skopolamin 1,5 mg/kg a Long–Evans – skopolamin 3,0 mg/kg; tedy celkem 4 testované skupiny pro každý kmen.



Obrázek 6 – Fotografie potkana v úloze aktivního vyhýbání se místu (AAPA).

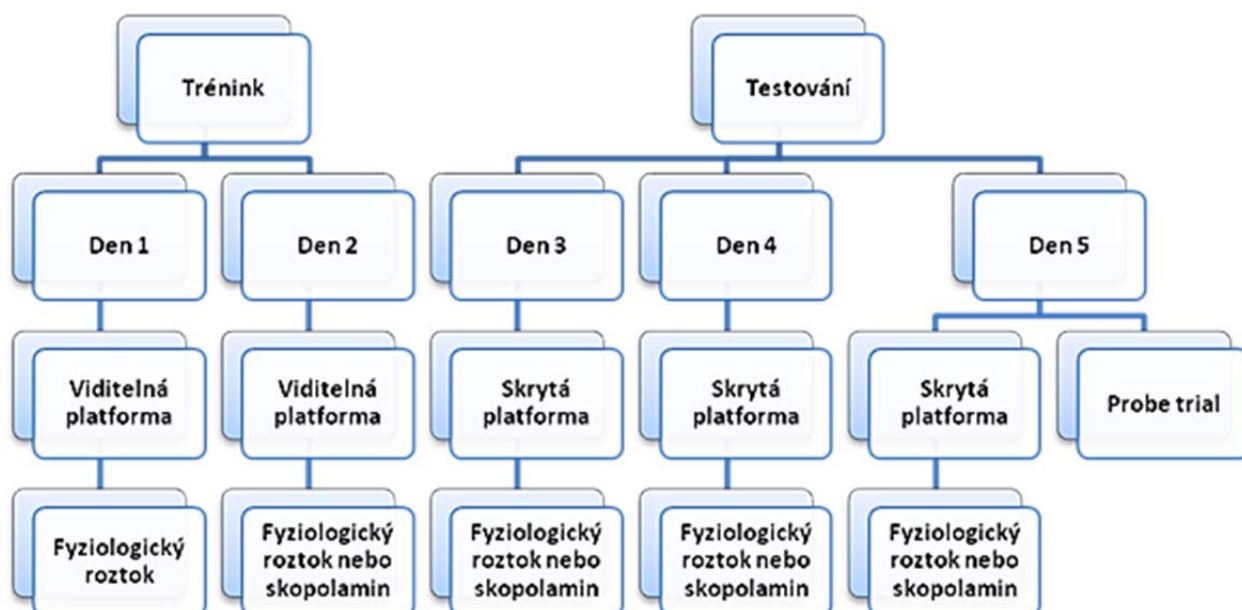
5.3.2. Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Morrisovo vodní bludiště (Morris, 1981) sestává z šedého kruhového bazénu (180 cm v průměru) naplněného vodou o pokojové teplotě ($t = 21 \pm 2$ °C) do výšky 35 cm. Voda v bazénu byla na jednotlivá sezení pravidelně vyměňována a vždy zakalována přidáním malého množství bílé netoxické malířské barvy (Primalex, PPG Deco, ČR). Bazén je v místnosti, ve které jsou umístěny vzdálené orientační body (plakáty, okna, dveře, nábytek aj.), pomocí nichž je potkanovi usnadněna lokalizace platformy. Trajektorie plaveb je nahrávána kamerou, umístěnou nad bazénem a která je propojená s digitálním trekovacím systémem a s programem ukládající data (Tracker, Biosignal Group, USA). Ve vodním bludišti se nachází průhledná plastová platforma, která je umístěna doprostřed libovolně definovaných kvadrantů a lokalizována vždy do jednoho ze světových směrů (S, SV, V, JV, J, JZ, Z, SZ).

Testování v Morrisově vodním bludišti je prováděno vždy během světelné fáze dne a jednotlivá sezení mají 24-hodinové intervaly. Trénink viditelné platformy v MWM spočívá v učení potkana na viditelnou platformu a skládá se ze dvou fází, sezení 1 a 2. Během tréninku je platforma v bludišti vynořena 1,5 cm nad hladinu a je opatřena modrobílým plastovým kroužkem. V obou sezeních potkani absolvují 10 plaveb s 10-minutovými intervaly, kdy je zvíře vypouštěno vždy ze stejné startovní pozice (J), ale pozice viditelné platformy je pseudonáhodně měněna pro každou plavbu (v sezení 1: SV, S, JZ, SZ, J, JV, Z, V, SZ, SV a v sezení 2: SZ, Z, V, J, SV, JV, V, JZ, SZ, SV). Maximální čas k nalezení platformy byl 1 minuta, pokud ji potkan do té doby nenašel, byl na ní naveden experimentátorem a měl cca 20 sekund k zapamatování si její pozice. V 1. sezení viditelné platformy všechna zvířata obdržela intraperitoneální injekci fyziologického roztoku v dávce 1 ml/kg dle tělesné váhy, vždy 20 minut před první plavbou. V 2. sezení pak byla zvířatům aplikována injekce roztoku dle zařazení do skupiny; fyziologický – kontroly, roztok skopolaminu o koncentraci 0,8 mg/kg, 1,5 mg/kg či 3,0 mg/kg; opět vždy 20 minut před první plavbou.

Samotné testování na skrytou platformu pak probíhalo během následujících 3 dnů, tedy sezení 3 – 5. Platforma již nebyla značena modrobílým kroužkem a byla zanořena 1 cm pod hladinu tak, že nemohla být spatřena plavajícím potkanem. Její pozice byla během těchto sezení stabilní, vždy ve středu kvadrantu, orientována na SV, avšak startovní pozice vypouštění potkana se během jednotlivých sezení pseudonáhodně měnily. Každé sezení

zahrnovalo 8 plaveb s 10minutovými intervaly se startovními pozicemi ze všech světových směrů, jejichž pořadí bylo pro každé sezení unikátní (v sezení 3: J, Z, JV, SZ, V, JZ, SV, S; v sezení 4: S, JV, Z, SV, J, SZ, V, JZ a v sezení 5: S, Z, JV, SZ, V, JZ, SV, J). Poslední den testování na skrytou platformu, sezení 5, po skončení všech 8 plaveb potkani podstoupili tzv. *probe trial*, kdy byla platforma z bludiště vyjmuta. Potkani byli vypouštěni z J startovní pozice a měli 1 minutu na plavání v bazénu, kdy se hodnotila preference k cílovému kvadrantu, tedy ověření vytvoření kognitivní mapy polohy platformy v bludišti. **Obrázek 7** popisuje design pokusu v MWM. Během testování na skrytou platformu potkani obdrželi v každém sezení intraperitoneální injekci roztoku v dávce 1 ml/kg dle zařazení do skupiny; fyziologický – kontroly, roztok skopolaminu o koncentraci 0,8 mg/kg, 1,5 mg/kg či 3,0 mg/kg; opět vždy 20 minut před první plavbou. Do experimentu v MWM bylo zařazeno 8 testovaných skupin potkanů, a to: Wistar – kontrolní, fyziologický roztok (n = 8); Wistar – roztok skopolaminu o koncentraci 0,8 mg/kg (n = 8); 1,5 mg/kg (n = 9) a 3,0 mg/kg (n = 8); Long–Evans – kontrolní, fyziologický roztok; Long–Evans – roztok skopolaminu o koncentraci 0,8 mg/kg (n = 8); 1,5 mg/kg (n = 8) a 3,0 mg/kg (n = 8); tedy opět celkem 4 testované skupiny pro každý kmen.



Obrázek 7 – Schéma designu pokusu v MWM; Den 1, 2 – test viditelné platformy, Den 3, 4, 5 – test skryté platformy s následným *probe trialem*.

5.4. Hodnocené parametry, statistické zpracování

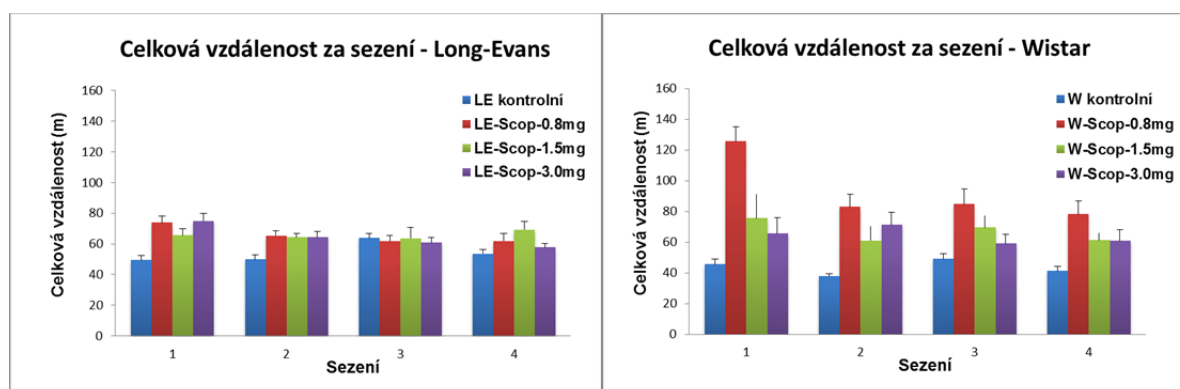
V úloze vyhýbání se místa jsme hodnotili dva prostorově specifické parametry a jeden kontrolní lokomoční. Počet vstupů do zakázaného sektoru (počet chyb) odráží celkovou výkonnost. Maximální čas vyhýbání v jednom sezení zase naznačuje maximální výkonnost v daném sezení. Celková dráha, kalkulovaná trekovacím programem jako součet vzdáleností bodů nahraných každou sekundu, je měřítkem lokomoce v úloze. Je namístě poznamenat, že všechny tyto tři parametry spolu výrazně korelují. Data z úlohy aktivního vyhýbání se místu byla odchýlena od normální distribuce, proto jsme nejprve provedli jejich logaritmickou (\ln) transformaci. Posléze byla analyzována trojfaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) (kmen x dávka skopolaminu x sezení). Kmen a dávka sloužily jako mezisubjektové faktory a opakovaná měření byla aplikována na faktor sezení. Data z MWM nebyla nikterak transformována a hodnocena byla dráha v metrech nezbytná k doplávání k ostrůvku (tento parametr není citlivý ke změnám rychlosti jako latence nalezení ostrůvku v sekundách). Data z MWM byla analyzována čtyřfaktorovou ANOVOU (kmen a dávka sloužily jako mezisubjektové faktory; sezení a plavby jako vnitrosubjektové faktory s opakováním). Data z viditelné platformy byla analyzována čtyřfaktorovou analýzou rozptylu (obecný lineární model; faktory: dávka x kmen x plavba x den). V *probe trialu* byla hodnocena preference cílového kvadrantu v prvních 30 sekundách volné plavy (citlivý interval) pomocí faktorové ANOVY (mezisubjektové faktory: dávka, kmen). Data v obrázcích jsou prezentována jako průměry původních hodnot a střední chyby průměrů (S.E.M., *standard error of the mean*). Hladina významnosti byla přijata na $p = 0,05$ a méně.

6. Výsledky

Pozorováním potkanů po aplikaci fyziologického roztoku či roztoku skopolaminu nebyly odhaleny žádné vážné senzomotorické poruchy. Postojové a somatické reflexy byly zachovány. Někteří potkani, kterým byl aplikován roztok skopolaminu, vykazovali mírnou hyperaktivitu, jež byla později potvrzena analýzou lokomoční aktivity.

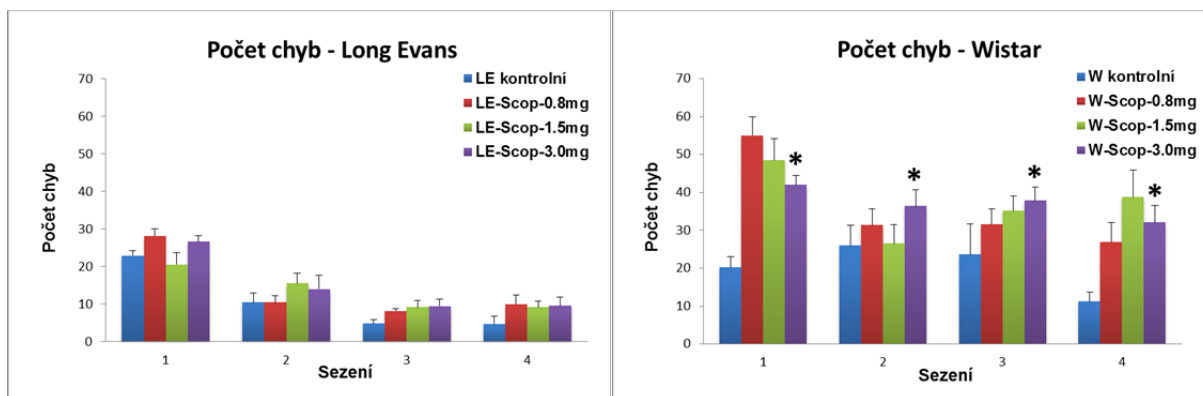
6.1. AAPA

Analýza celkové vzdálenosti ukázala statisticky významný efekt kmene a dávky ($P < 0,05$), ale nikoli interakci mezi kmenem a dávkou ($P > 0,05$) (**Obrázek 8**). To naznačuje, že mezi těmito dvěma kmeny neexistují statisticky významné rozdíly ve skopolaminem indukované hyperlokomoci.



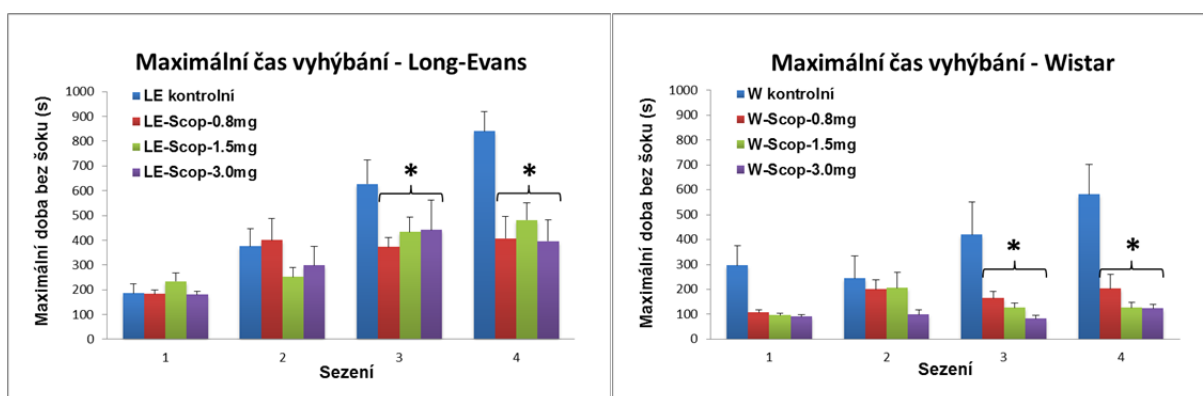
Obrázek 8 – Vliv skopolaminu na lokomoci (průměry \pm S.E.M.). Nejvýznamněji se pak projevila dávka 0,8 mg/kg u kmene Wistar. Přestože zvýšení celkové vzdálenosti za sezení bylo patrné hlavně u kmene Wistar, interakce mezi kmenem a dávkou neměla statisticky významný efekt.

Pokud jde o počet chyb, trojfaktorová analýza rozptylu (dávka \times kmen \times sezení s opakovanými měřeními na sezení) odhalila signifikantní hlavní efekt dávky, kmene a také sezení (všechna $P < 0,05$; **Obrázek 9**). Z hlediska efektu dávky působila signifikantně nejvyšší dávka ($P < 0,05$). Byla rovněž nalezena interakce mezi dávkou a kmenem ($P < 0,05$). To ukazuje, že v úloze aktivního vyhýbání se místu vykazují oba kmeny jak rozdílnou výkonnost, tak diferenciální citlivost na skopolamin.



Obrázek 9 – V počtu chyb byl kmen Wistar signifikantně horší než kmen Long–Evans (průměry ± S.E.M.). Statisticky významná byla dávka 1,5 mg/kg skopolaminu u kmene Wistar. Potkani kmene Wistar vykazovali jak horší výkonnost, tak i větší citlivost ke skopolaminu v úloze AAPA; * $P \leq 0,05$.

U maximálního času vyhýbání byl potvrzen efekt kmene a dávky ($P < 0,05$; **Obrázek 10**) a ač interakce mezi dávkou a kmenem nedosáhla signifikance, všechny dávky skopolaminu zhoršovaly tento parametr u obou kmenů. Jistý trend ke snížení citlivosti kmene Long-Evans je patrný na **Obrázku 10**.

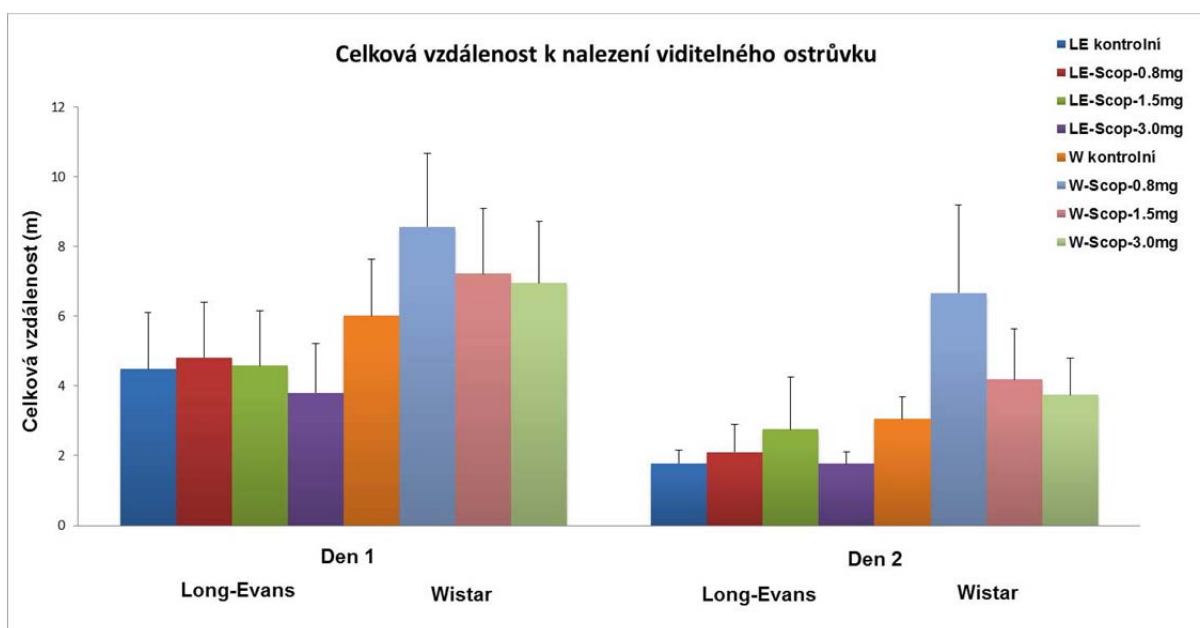


Obrázek 10 – Z maximálního času vyhýbání se sektoru je patrné, že potkani kmene Wistar se signifikantně méně vyhýbali zakázanému sektoru (průměry ± S.E.M.). Všechny dávky skopolaminu zhoršovaly maximální čas vyhýbání se u obou kmenů. Potkani kmene Long–Evans s aplikovaným skopolaminem se v průběhu sezení v AAPA do jisté míry zlepšovali; * $P \leq 0,05$.

6.2. Morrisovo vodní bludiště

6.2.1. Test viditelné platformy

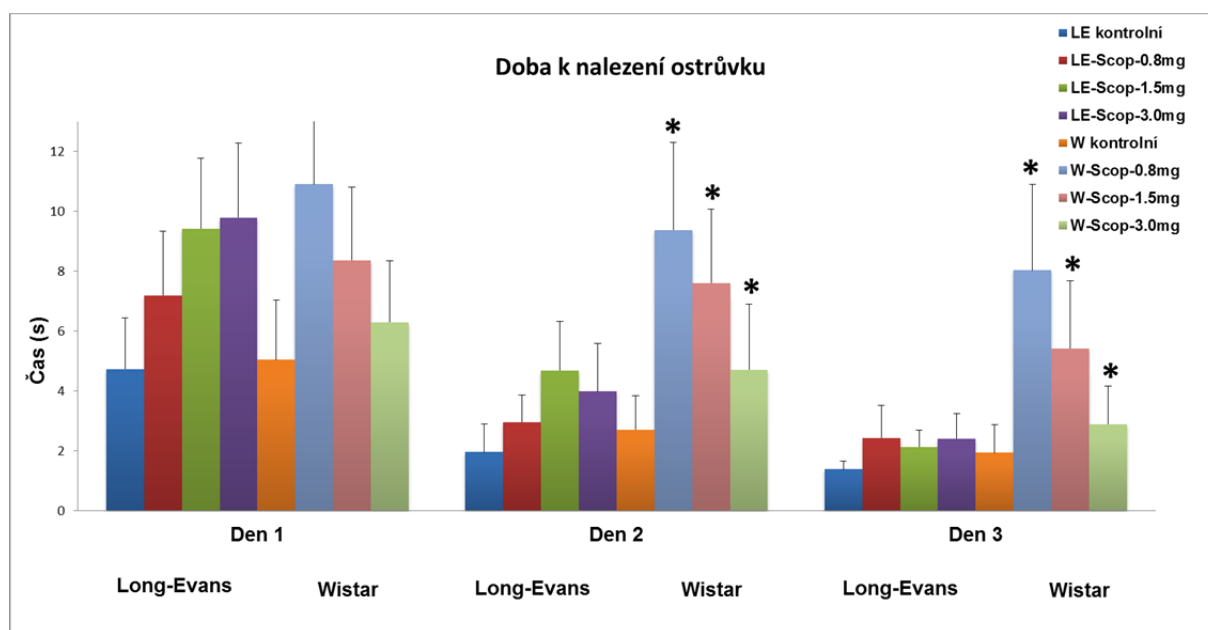
Čtyřfaktorová analýza rozptylu pro parametr celkové vzdálenosti k nalezení viditelného ostrůvku, obecný lineární model (dávka x kmen x denní sezení x plavba) ukázala signifikantní hlavní efekty kmene, dávky, sezení a plaveb ($P < 0,05$). Ukázala také signifikanci v interakci mezi dávkou a kmenem, a dávkou a plavbami ($P < 0,05$). Tyto výsledky naznačují, že vyšší citlivost na skopolamin byla přítomna také v této verzi úlohy a že nelze prokázat, že by skopolamin druhý den zcela zabraňoval navigaci na viditelný ostrůvek, protože celkově se průměrné vzdálenosti druhý den snížily (**Obrázek 11**).



Obrázek 11 – Ve verzi testování na viditelnou platformu v MWM byl nalezen signifikantní efekt kmene, dávky, sezení a plaveb; statisticky významná byla také interakce mezi kmenem a dávkou i interakce mezi dávkou a plavbami (průměry \pm S.E.M.). V obou sezeních vykazovali potkani kmene Wistar větší citlivost k podanému skopolaminu, jejich slabší výkony oproti potkanům kmene Long-Evans mohou naznačovat horší zrak albinotických jedinců. Celková vzdálenost k nalezení viditelného ostrůvku se v druhém sezení snížila, výkony potkanů se tedy zlepšovaly i přesto, že jim byl aplikován roztok skopolaminu, pouze u nejnižší dávky aplikované kmenu Wistar toto zlepšení nebylo patrné. Pro přehlednost zde nejsou signifikance interakcí a *post hoc* testů znázorněny, namísto toho jsou popsány v textu.

6.2.2. Test skryté platformy

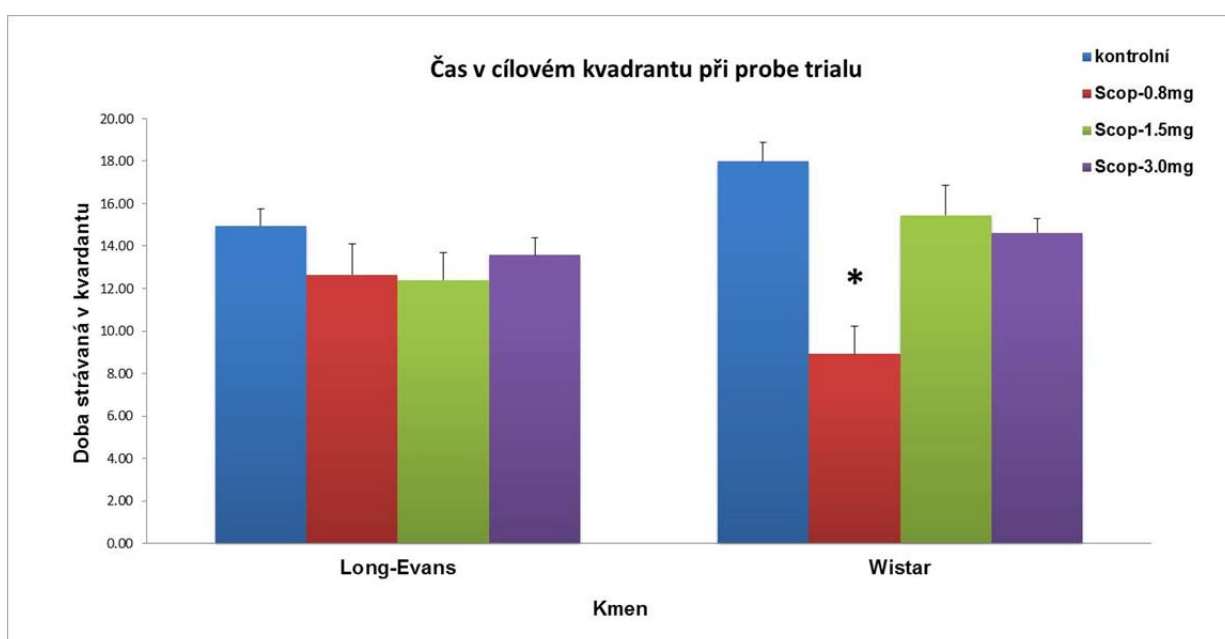
Čtyřfaktorová analýza rozptylu (obecný lineární model; kmen a dávka jako mezisubjektové faktory, dny a plavby jako vnitrosubjektové faktory) ukázala signifikantní hlavní efekt dávky, kmene (kmen Wistar vykazoval horší výkonnost) a také interakci mezi kmenem a dávkou, kdy byli jedinci kmene Wistar citlivější na skopolamin (všechna $P < 0,05$; **Obrázek 12**). Signifikantní faktor dne ukazuje, že se zvířata mezi jednotlivými sezeními zlepšovala a interakce mezi dny a kmenem ukazuje, že zlepšení bylo pomalejší u kmene Wistar ($P < 0,05$). Jak kmen Wistar obecně, tak všichni potkani, kterým byl aplikován roztok skopolaminu, se také hůře učili v průběhu jednotlivých plaveb v rámci jednoho dne (nevyobrazeno).



Obrázek 12 – Během sezení v testování na skrytou platformu v MWM se ukázal patrný signifikantní efekt dávky, kmene i interakce mezi dávkou a kmenem (průměry \pm S.E.M.). Potkani kmene Wistar s aplikovaným roztokem skopolaminu měli statisticky významně delší čas k nalezení skrytého ostrůvku, tato signifikance byla potvrzena u všech dávek skopolaminu. Obecně se potkani kmene Wistar učili hůře jednak oproti kontrolám, jednak i oproti potkanům kmene Long–Evans s podaným skopolaminem. Mezi jednotlivými sezeními se potkani obou kmenů průběžně zlepšovali (faktor dne), avšak toto zlepšení bylo menší u potkanů kmene Wistar; $*P \leq 0,05$.

6.2.3. Probe trial

Dvoufaktorová analýza rozptylu (mezisubjektové faktory: dávka x kmen) bez opakovaných měření ukázala signifikantní efekt dávky ($P < 0,05$), ale nikoli kmene ($P > 0,05$). Byla však nalezena interakce mezi dávkou a kmenem ($P < 0,05$). *Post hoc* analýza Tukeyho testem ukázala, že tento parametr paradoxně zhoršovala pouze dávka 0,8 mg/kg. *Post hoc* test interakce ukládal vyšší citlivost kmerne Wistar k dávce 0,8 mg/kg (**Obrázek 13**).



Obrázek 13 – V *probe trialu*, ve verzi testování v MWM bez platformy, kdy byla hodnocena doba strávaná v cílovém kvadrantu (průměry \pm S.E.M.), byl zjištěn statisticky významný efekt dávky a interakce mezi dávkou a kmenem, efekt kmene nebyl signifikantní. Pomocí *post hoc* analýzy Tukeyho testem interakce mezi dávkou a kmenem se prokázala vyšší citlivost kmene Wistar pouze k dávce 0,8 mg/kg; * $P \leq 0,05$.

7. Diskuze

Aplikace skopolaminu zhoršuje kognitivní výkon jak v testu aktivního vyhýbání se místu (AAPA), tak v Morrisově vodním bludišti (MWM). Tyto výsledky potvrzují předešlé nálezy, pokud jde o výše popsané účinky systémové aplikace skopolaminu nebo jiných muskarinových blokátorů na kognitivní funkce, jako je učení a paměť, rozhodování a výběr strategie (Buresova et al., 1986; von Linstow Roloff et al., 2007), ale také co se týče dalších typů behaviorálních a somatických funkcí (Klinkenberg a Blokland, 2010), které by potenciálně mohly ovlivnit výkon v úlohách AAPA a MWM (Vales a Stuchlik, 2005).

Pravděpodobně také v důsledku užití vyššího dávkování testované látky bylo možné pozorovat signifikantní zvýšení lokomoční aktivity v úloze AAPA. Efekt těchto vyšších dávek skopolaminu na řešení prostorových úloh v bludištích lze očekávat a je dnes považován za konečný důsledek spíše široké a nespecifické blokády muskarinových cholinergních receptorů v mozku (Deiana et al., 2011; Klinkenberg a Blokland, 2010).

V jedné z předešlých studií naší laboratoře byl testován vliv aplikace skopolaminu v dávkách 1,5 mg/kg a 2 mg/kg na výkon v úloze AAPA u potkanů kmene Long–Evans a bylo zjištěno, že výsledný deficit byl necitlivý k předtréninku v této úloze bez efektu podané látky (Vales a Stuchlik, 2005). Přestože dnes jsou povětšinou používány nižší dávky skopolaminu (Deiana et al., 2011; von Linstow Roloff et al., 2007) či centrální aplikace do mozkových struktur (Carli et al., 2000), je zde také několik studií ukazujících efekt vyšších dávek skopolaminu po systémovém podávání (např. Griebel et al., 2012).

Panuje všeobecně akceptovaný pohled, že non-kognitivní účinky skopolaminu mohou hrát roli v pozorovaných změnách chování (Klinkenberg a Blokland, 2010). Pro detekci subtilního a selektivního poškození prostorového učení je využívána časová *delayed-matching-to-place* varianta MWM (von Linstow Roloff et al., 2007).

Dalším zjištěním této studie je, že kontrolní potkani kmene Wistar vykazovali obecně horší výkony než potkani kmene Long–Evans v testování na viditelnou platformu v MWM. Tento výsledek je v souladu s daty v předešlých studiích (Prusky et al., 2002), představujících lepší výkon pigmentovaných potkanů oproti albinotickým potkanům ve vizuálně řízených (*visually guided*) úlohách. Rozdíl mezi kmeny byl pozorován i v úloze AAPA, kde potkani kmene Wistar také podávali horší výkony. Potkani kmene Wistar hůře řešili jak test skryté platformy, tak i test viditelné platformy, nikoli však *probe trial*.

Mezikmenové rozdíly ve schopnostech prostorové navigace v experimentu MWM byly zdokumentovány ve studii kanadských badatelů Troye K. Harkera a Iana Q. Whishawa (Harker a Whishaw, 2002), ale se současnými daty nelze vysvětlit, proč nebyl přítomen žádný rozdíl mezi kmeny v testování v *probe trialu* v experimentu MWM.

Zrak potkanů, především u kmene Wistar, mohl být také zhoršen vlivem skopolaminu v takové míře, aby narušil výkon v druhém dni testování na viditelnou platformu, kde se efekt látky objevil. Toto zjištění by však mělo být interpretováno s opatrností, protože byli první den obeznámeni s pravidly úlohy bez účinku látky.

Významné je, že zhoršení výkonu skopolaminem je závažnější u potkanů kmene Wistar než u potkanů kmene Long–Evans v úloze AAPA i v MWM. Toto naznačuje nižší senzitivitu potkanů kmene Long–Evans k této centrální muskarinové blokádě v prostorových úlohách. Mezikmenové rozdíly na centrální cholinergní blokádu byly studovány v několika předešlých studiích a současné výsledky z této studie naznačují, že zvýšená citlivost potkanů kmene Wistar k cholinergním antagonistům je s nimi ve všeobecné shodě.

Japonští vědci Akihiro Higashida a Norio Ogawa (Higashida a Ogawa, 1987) studovali efekt skopolaminu na výkon v bludišti s radiálními rameny u tří kmenů potkanů: Fisher 344, Sprague–Dawley a Wistar. Dokázali nejvyšší bazální aktivitu u potkanů kmene Wistar, a také to, že potkani kmene Wistar byli k podávání skopolaminu nejvíce senzitivní, zejména pokud jde o přesnost volby správného ramene v radiálním bludišti. Prostorová strategie byla ovlivněna u všech tří kmenů potkanů (Higashida a Ogawa, 1987). Bohužel jejich studie netestovala potkany kmene Long–Evans, není proto možné přímo porovnat jejich výsledky s výsledky z této studie.

Výzkumný tým nizozemského neurovědce Johna S. Andrewse (Andrews et al., 1995) studoval výkony potkanů kmenů Long–Evans, Wistar, Sprague–Dawley a S3–inbredního kmene v několika úlohách, jako je např. dvouobjektové rozlišování a vodní bludiště se dvěma ostrůvky, a zjistil, že potkani kmene Long–Evans byli více ovlivněni hemicholinem, látkou vyprázdňující zásobu acetylcholinu (tzv. deplece). Potkani kmene Wistar byli v této úloze nejvíce ovlivněni v rychlosti. Tato data se zdají být protichůdná s našimi výsledky, ačkoliv behaviorální (úlohy schopnosti učení) a farmakologické (testované látky) postupy byly v této a v citované studii rozdílné.

Nicméně studie americké neurofarmakoložky Theresy C. Gleason a její kolegů (Gleason et al., 1999) ukázala, že v rámci Morrisova vodního bludiště byli potkani kmene Wistar k podávání neuropeptidu galaninu, modulátoru septohipokampální dráhy ovlivňující

cholinergní neurotransmisi, senzitivnější než potkani kmene Long–Evans. Naše výsledky se s nimi zdají být v souladu, s tou výjimkou, že naše studie zjistila rozdílnou senzitivitu v jiné behaviorální úloze. Studie amerického neurotoxikologa Philipa J. Bushnella a jeho kolegů (Bushnell et al., 1995) neobjevila žádné rozdíly mezi potkany kmene Long–Evans a kmene Flinders v senzitivitě ke skopolaminu (nejvyšší dávka skopolaminu byla 1 mg/kg) v operantní úloze.

Nicméně jiná studie (van Goethem et al., 2012) srovnávala účinek stupňovaných dávek skopolaminu u potkanů kmene Long–Evans, Wistar a Sprague–Dawley a zjistila, že potkani kmene Wistar byli ovlivněni nejnižší použitou dávkou skopolaminu (0,03 mg/kg). Autoři však přímo nesrovnávají kmeny potkanů v jednotlivých dávkách. Navíc byly také zjištěny mezikmenové rozdíly v acetylcholinovém systému v mozku (Michalek et al., 1989), ačkoli mezi potkany kmene Fisher 344 a Wistar, které podporují mezikmenové rozdíly v senzitivitě k centrální muskarinové blokádě v naší studii.

8. Shrnutí

Tato studie potvrdila, že skopolamin ovlivňuje chování a pro dvě behaviorální úlohy ukázala, že existují rozdíly mezi kmeny potkanů Long–Evans a Wistar v prostorovém učení vyžadující jednak prostorovou reprezentaci a jednak požadující kognitivní koordinaci. Zároveň byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi těmito dvěma kmeny potkanů v senzitivitě k centrální cholinergní blokádě v úloze aktivního vyhýbání se místu, které naznačují, že by měli být přednostně používáni potkani kmene Wistar v budoucích farmakologických screeningových studiích používající cholinergní blokátory a prostorové testy. V současné době probíhají tyto studie v naší laboratoři. Podrobnější pohled na mezikmenové rozdíly v úloze aktivního vyhýbání se místu a jejich relevance pro preklinické testování potenciálně terapeutických látek si zaslouží další zkoumání.

9. Podpůrné publikace

Entlerova M, Lobellova V, Hatalova H, Zemanova A, Vales K, Stuchlik A.

Comparison of Long-Evans and Wistar rats in sensitivity to central cholinergic blockade with scopolamine in two spatial tasks: An active place avoidance and the Morris water maze. *Physiol Behav.* 2013 Jul 4. doi:pii: S0031-9384(13)00221-7. 10.1016/j.physbeh.2013.06.024.

IF = 3,160 (2012)

Lobellova V, **Entlerova M**, Svojanovska B, Hatalova H, Prokopova I, Petrasek T, Vales K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behav Brain Res.* 2013 Jun 1;246:55-62. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.006.

IF = 3,327 (2012)

10. Literatura

- Aggleton JP, Vann SD, Oswald CJ, Good M (2000) Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: a simple problem with a complex answer. *Hippocampus* 10, 466–474
- Alkondon M, Albuquerque EX (2004) The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145, 109–120
- Alonso A, Kohler C (1984) A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J Comp Neurol* 225, 327–343
- Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7041–7045
- Alves MN, Sortoratto A, Trigo JR (2007) Scopolamine in *Brugmansia Suaveolens* (Solanaceae): Defense, Allocation, Costs, and Induced Response. *Journal of Chemical Ecology* 33, 297–309
- Andersen P, Bland HB, Myhrer T, Schwartzkroin PA (1979) Septo–hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res* 165, 13–22
- Andrews JS, Jansen JH, Linders S, Princen A (1994) Effects of disrupting the cholinergic system on short–term spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 115, 485–494
- Andrews JS, Jansen JH, Linders S, Princen A, Broekkamp CL (1995) Performance of four different rat strains in the autoshaping, two-object discrimination, and swim maze tests of learning and memory. *Physiol Behav* 57(4), 785–90
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R (2002) Alzheimer’s disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta–amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 68, 209–245
- Bainbridge NK, Koselke LR, Jeon J, Bailey KR, Wess J, Crawley JN, et al. (2008) Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Behav Brain Res* 190, 50–58
- Ballard TM, McAllister KH (1999) The acetylcholinesterase inhibitor, ENA 713 (Exelon), attenuates the working memory impairment induced by scopolamine in an operant DNMTTP task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 146, 10–18
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93, 74–104
- Bartus RT, Dean 3rd RL, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408–414
- Baxter MG, Bucci DJ, Gorman LK, Wiley RG, Gallagher M (1995) Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav Neurosci* 109, 714–722
- Beatty WW, Butters N, Janowsky DS (1986) Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav Neural Biol* 45, 196–211
- Ben–Barak J, Dudai Y (1980) Scopolamine induces an increase in muscarinic receptor level in rat hippocampus. *Brain Res* 193(1), 309–313
- Benhamou S, Poucet B (1998) Landmark use by navigating rats (*Rattus norvegicus*): contrasting geometric and featural information. *J Comp Psychol* 112, 317–322
- Berger–Sweeney J, Heckers S, Mesulam MM, Wiley RG, Lappi DA, Sharma M (1994) Differential effects on spatial navigation of immunotoxin–induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *J Neurosci* 14, 4507–4519

- Bizon JL, Han JS, Hudon C, Gallagher M (2003) Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. *Hippocampus* 13, 676–684
- Bland BH, Oddie SD (1998) Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 259–273
- Blokland A (2005) Scopolamine-induced deficits in cognitive performance: A review of animal studies. *Scopolamine Rev*, 1–76
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527–532
- Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1, 403–410
- Bouffard JP, Jarrard LE (1988) Acquisition of a complex place task in rats with selective ibotenate lesions of hippocampal formation: combined lesions of subiculum and entorhinal cortex versus hippocampus. *Behav Neurosci* 102, 828–834
- Brandeis R, Dachir S, Sapir M, Levy A, Fisher A (1990) Reversal of age-related cognitive impairments by an M1 cholinergic agonist, AF102B. *Pharmacol Biochem Behav* 36, 89–95
- 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
- Brandner C, Schenk F (1998) Septal lesions impair the acquisition of a cued place navigation task: attentional or memory deficit? *Neurobiol Learn Mem* 69, 106–125
- Brankack J, Platt B, Riedel G (2009) Sleep and hippocampus: do we search for the right things? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 806–812
- Buccafusco JJ, Terry Jr AV, Webster SJ, Martin D, Hohnadel EJ, Bouchard KA et al. (2008) The scopolamine-reversal paradigm in rats and monkeys: the importance of computer-assisted operant-conditioning memory tasks for screening drug candidates. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 481–494
- Buckley NJ, Burnstock G (1986) Autoradiographic localization of peripheral M1 muscarinic receptors using [³H]pirenzepine. *Brain Res* 375, 83–91
- Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, Brann MR (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO – K1 cells. *Mol Pharmacol* 35, 469–476
- Bunce JG, Sabolek HR, Chrobak JJ (2003) Intraseptal infusion of oxotremorine impairs memory in a delayed–non–match–to–sample radial maze task. *Neuroscience* 121, 259–267
- Bunce JG, Sabolek HR, Chrobak JJ (2004) Intraseptal infusion of the cholinergic agonist carbachol impairs delayed–non–match–to–sample radial arm maze performance in the rat. *Hippocampus* 14, 450–459
- Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L (1997) Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 343–350
- Buresova O, Bolhuis JJ, Bures J (1986) Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial water maze. *Behav Neurosci* 100, 476–482
- Burgess N, Becker S, King JA, O’Keefe J (2001) Memory for events and their spatial context: models and experiments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1493–1503
- Bushnell PJ, Levin ED, Overstreet DH (1995) Spatial working and reference memory in rats bred for autonomic sensitivity to cholinergic stimulation: acquisition, accuracy, speed, and effects of cholinergic drugs. *Neurobiology of Learning and Memory* 63(2), 116–132
- Buxton A, Callan OA, Blatt EJ, Wong EH, Fontana DJ (1994) Cholinergic agents and delay-dependent performance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 49, 1067–1073
- Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325–340

- Bymaster FP, Heath I, Hendrix JC, Shannon HE (1993) Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 16–24
- Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez–Coria H, Fisher A, et al. (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD–like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671–682
- Cain DP, Saucier D (1996) The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Rev Neurosci* 7, 215–231
- Cain DP, Ighanian K, Boon F (2000) Individual and combined manipulation of muscarinic, NMDA, and benzodiazepine receptor activity in the water maze task: implications for a rat model of Alzheimer dementia. *Behav Brain Res* 111, 125–137
- Carli M, Balducci C, Samanin R (2000) Low doses of 8–OH–DPAT prevent the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine through 5–HT 1A receptors in the dorsal raphe. *British Journal of Pharmacology* 131(2), 375–381
- Cassel JC, Kelche C (1989) Scopolamine treatment and fimbria–fornix lesions: mimetic effects on radial maze performance. *Physiol Behav* 46, 347–353
- Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50, 279–290
- Clayton NS, Dickinson A (1998) Episodic–like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274
- Cobb SR, Bulters DO, Suchak S, Riedel G, Morris RG, Davies CH (1999) Activation of nicotinic acetylcholine receptors patterns network activity in the rodent hippocampus. *J Physiol* 518, 131–140
- Connor DJ, Langlais PJ, Thal LJ (1991) Behavioral impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid. *Brain Res* 555, 84–90
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350, 235–238
- Cozzolino R, Guaraldi D, Giuliani A, Ghirardi O, Ramacci MT, Angelucci L (1994) Effects of concomitant nicotinic and muscarinic blockade on spatial memory disturbance in rats are purely additive: evidence from the Morris water task. *Physiol Behav* 56, 111–114
- Crystal JD (2010) Episodic–like memory in animals. *Behav Brain Res* 215, 235–243
- Dashniani M, Burjanadze M, Beselia G, Maglakelidze G, Naneishvili T (2009) Spatial memory following selective cholinergic lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Georgian Med News* 174, 77–81
- Day LB, Schallert T (1996) Anticholinergic effects on acquisition of place learning in the Morris water task: spatial mapping deficit or inability to inhibit nonplace strategies? *Behav Neurosci* 110, 998–1005
- Deacon RM, Rawlins JN (2006) T–maze alternation in the rodent. *Nat Protocols* 1, 7 – 12
- Decker M, Curzon P, Brioni JD, Arnerić SP (1994) Effects of ABT–418, a novel cholinergic channel ligand, on place learning in septal–lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 261, 217 – 222
- Deiana S, Platt B, Riedel G (2011) The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res*, 221(2), 389–411
- De–Mello N, Souza–Junior IQ, Carobrez AP (2005) Pilocarpine prevents age–related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res* 158, 263–268
- Dennes RP, Barnes JC (1993) Attenuation of scopolamine–induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non–cholinomimetic drugs using a novel task in the 12–arm radial maze. *Psychopharmacology (Berl)* 111, 435–441
- Dere E, Kart–Teke E, Huston JP, De Souza Silva MA (2006) The case for episodic memory in animals. *Neurosci Biobehav Rev* 30, 1206–1224

- Devan BD, White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *J Neurosci* 19, 2789–2798
- Devan BD, McDonald RJ, White NM (1999) Effects of medial and lateral caudate–putamen lesions on place– and cue–guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 100, 5–14
- Didriksen M, Skarsfeldt T, Arnt J (2007) Reversal of PCP–induced learning and memory deficits in the Morris' water maze by sertindole and other antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 193, 225–233
- Dokla CP, Thal LJ (1988) Effect of cholinesterase inhibitors on Morris water task behavior following lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Neurosci* 102, 861–871
- Doods HN, Quirion R, Mihm G, Engel W, Rudolf K, Entzeroth M, et al. (1993) Therapeutic potential of CNS–active M2 antagonists: novel structures and pharmacology. *Life Sci* 52, 497–503
- Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30, 113–121
- Drever BD, Riedel G, Platt B (2011) The cholinergic system and hippocampal activity. *Behav Brain Res* 221, 505–514
- Dubois B, Mayo W, Agid Y, Le Moal M, Simon H (1985) Profound disturbances of spontaneous and learned behaviors following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Brain Res* 338, 249–258
- Dunnett SB, Everitt BJ, Robbins TW (1991) The basal forebrain–cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci* 14, 494–501
- Dunnett SB, Whishaw IQ, Jones GH, Bunch ST (1987) Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience* 20, 653–669
- Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* 75, 393–427
- Elvander E, Schott PA, Sandin J, Bjelke B, Kehr J, Yoshitake T, et al. (2004) Intraseptal muscarinic ligands and galanin: influence on hippocampal acetylcholine and cognition. *Neuroscience* 126, 541–557
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48, 649–684
- Fabian–Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, et al. (2001) Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholin receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21, 7993–8003
- Feasey–Truger KJ, Li BH, ten Bruggencate G (1992) Lesions of the medial septum which produce deficits in working/spatial memory do not impair long–term potentiation in the CA3 region of the rat hippocampus in vivo. *Brain Res* 591, 296–304
- Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* 17, 5747–5759
- Ferbinteanu J, Kennedy PJ, Shapiro ML (2006) Episodic memory – from brain to mind. *Hippocampus* 16, 691–703
- Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394, 186–189
- Fletcher BR, Baxter MG, Guzowski JF, Shapiro ML, Rapp PR (2007) Selective cholinergic depletion of the hippocampus spares both behaviorally induced Arc transcription and spatial learning and memory. *Hippocampus* 17, 227–234

- Fraser KA, Poucet B, Partlow G, Herrmann T (1991) Role of the medial and lateral septum in a variable goal spatial problem solving task. *Physiol Behav* 50, 739–744
- Frostcher M, Leranath C (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239, 237–246
- Frostcher M, Vida I, Bender R (2000) Evidence for the existence of nonGABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* 96, 27–31
- García-Alloza M, Zaldua N, Diez-Ariza M, Marcos B, Lasheras B, Javier Gil-Bea F, et al. (2006) Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: implications for learning and memory. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 1074–1081
- Ginn SR, Peterson GM (1992) Fate of septohippocampal neurons following intracerebroventricular injections of colchicine. *Brain Res Bull* 29, 635–642
- Givens BS, Olton DS (1990) Cholinergic, GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci* 104, 849–855
- Givens B, Olton DS (1994) Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J Neurosci* 14, 3578–3587
- Givens B, Olton DS (1995) Bidirectional modulation of scopolamine-induced working memory impairments by muscarinic activation of the medial septal area. *Neurobiol Learn Mem* 63, 269–276
- Givens B, Sarter M (1997) Modulation of cognitive processes by transsynaptic activation of the basal forebrain. *Behav Brain Res* 84, 1 – 22;
- Gleason TC, Dreiling JL, Crawley JN (1999) Rat strain differences in response to galanin on the Morris water task. *Neuropeptides* 33, 265–270
- Gold PE, McGaugh JL. A single-trace, two-process view of memory storage processes. In: Deutsch D, Deutsch JA, editors (1975) *Short-term memory*. New York: Academic Press, 355–378
- Goldman-Rakic P. Prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: the relevance of working memory. In: Carroll BJ, Barrett JE, editors (1992) *Psychopathology and the brain*. New York: Raven Press, 1–23
- Goodlett CR, Nichols JM, Halloran RW, West JR (1989) Long-term deficits in water maze spatial conditional alternation performance following retrohippocampal lesions in rats. *Behav Brain Res* 32, 63–67
- Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 363–396
- Grauer E, Kapon J (1996) Differential effects of anticholinergic drugs on paired discrimination performance. *Pharmacol Biochem Behav* 53, 463–467
- Griebel G, Pichat P, Pruniaux MP, Beeske S, Lopez-Grancha M, Genet E, Terranova JP, Castro A, Sanchez JA, Black M, Varty GB, Weiner I, Arad M, Barak S, De Levie A, Guillot E (2012) SAR110894, a potent histamine H₃-receptor antagonist, displays procognitive effects in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 102, 203–214
- Grodzinski U, Clayton NS (2010) Problems faced by food-caching corvids and the evolution of cognitive solutions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 977–987
- Guilherme N, Cooke SF, Bliss TVP (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 65–75
- Guo X, Lester RA (2007) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor desensitization by Ca²⁺. *J Neurophysiol* 97, 93–101
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806

- Hagan JJ, Verheijck EE, Spigt MH, Ruigt GS (1992) Behavioural and electrophysiological studies of entorhinal cortex lesions in the rat. *Physiol Behav* 51, 255–266
- Hagan JJ, Salamone JD, Simpson J, Iversen SD, Morris RG (1988) Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 27, 9–20
- Hagan JJ, Jansen JH, Broekkamp CL (1987) Blockade of spatial learning by the M1 muscarinic antagonist pirenzepine. *Psychopharmacology (Berl)* 93, 470–476
- Han CJ, Pierre-Louis J, Scheff A, Robinson JK (2000) a performance-dependent adjustment of the retention interval in a delayed non-matching-to-position paradigm differentiates effects of amnesic drugs in rats. *Eur J Pharmacol* 403, 87–93
- Hannila T, Sirvio J, Riekkinen PJ (1990) The effect of gamma-vinyl-GABA on the performance of nucleus basalis-lesioned rats in spatial navigation task. *Brain Res* 537, 363–366
- Harker KT, Whishaw IQ (2002) Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark^A Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway), *Behavioural Brain Research* 134, 467–477
- Hasselmo ME, Bodelon C, Wyble BP (2002) A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput* 14, 793–817
- Hasselmo ME, Schnell E, Barkai E (1995) Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci* 15, 5249–5262
- Hasselmo ME, McGaughy J (2004) High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res* 145, 207–231
- Herrera-Morales W, Mar I, Serrano B, Bermudez-Rattoni F (2007) Activation of hippocampal postsynaptic muscarinic receptors is involved in long-term spatial memory formation. *Eur J Neurosci* 25, 1581–1588
- Higashida A, Ogawa N (1987) Differences in the acquisition process and the effect of scopolamine on radial maze performance in three strains of rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 27(3), 483–9
- Hodges Jr DB, Lindner MD, Hogan JB, Jones KM, Markus EJ (2009) Scopolamine induced deficits in a battery of rat cognitive tests: comparisons of sensitivity and specificity. *Behav Pharmacol* 20, 237–251
- Hooge RD, Deyn PPD (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36, 60–90
- Huerta PT, Lisman JE (1993) Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364, 723–725
- Huerta PT, Lisman JE (1995) Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15, 1053–1063
- Chang Q, Gold PE (2003) Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci* 23, 3001–3005
- Changeux JP, Bertrand D, Corringier PJ, Dehaene S, Edelman S, Lena C, et al. (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res* 26, 198–216
- Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M (2006) alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology* 50, 254–268
- Cherkin A (1969) Kinetics of memory consolidation: role of amnesic treatment parameters. *Proc Natl Acad Sci USA* 63, 1094–1101

- Ikonen S, McMahan R, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H (2002) Cholinergic system regulation of spatial representation by the hippocampus. *Hippocampus* 12, 386–397
- Ishii M, Kurachi Y (2006) Muscarinic acetylcholin receptors. *Curr Pharm Des* 12(28), 3573–3581
- Jackson JJ, Soliman MR (1996) Effects of tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. *Life Sci* 58, 47–54
- Janis LS, Glasier MM, Fulop Z, Stein DG (1998) Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial–memory tasks. *Behav Brain Res* 90, 23–34
- Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60, 9–26
- Jarrard LE, Okaichi H, Steward O, Goldschmidt RB (1984) On the role of hippocampal connections in the performance of place and cue tasks: comparisons with damage to hippocampus. *Behav Neurosci* 98, 946–954
- Johnson DA, Zambon NJ, Gibbs RB (2002) Selective lesion of cholinergic neurons in the medial septum by 192 IgG–saporin impairs learning in a delayed matching to position T–maze paradigm. *Brain Res* 943, 132–141
- Jones RS (1993) Entorhinal–hippocampal connections: a speculative view of their function. *Trends Neurosci* 16, 58–64
- Kalin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 102–114
- Kesner RP (2013) A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 78 (7), 1–17
- Kim JS, Levin ED (1996) Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. *Brain Res* 725, 231–240
- Kinoshita H, Kameyama T, Hasegawa T, Nabeshima T (1992a) Effects of vinconate, a novel vinca alkaloid, on spatial learning deficits induced by the basal forebrain lesion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 42, 19–23
- Kinoshita H, Kameyama T, Hasegawa T, Nabeshima T (1992b) Effects of vinconate on spatial learning impairments induced by medial septal lesion in rats. *Life Sci* 51, 267–273
- Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2003) Impairment of reward–related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7965–7970
- Klinkenberg I, Blokland A (2010) The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1307–1350
- Koistinaho M (2001) Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta amyloid deposits but do not form plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(25), 14675–14680
- Kwo–On–Yuen PF, Mandel R, Chen AD, Thal LJ (1990) Tetrahydroaminoacridine improves the spatial acquisition deficit produced by nucleus basalis lesions in rats. *Exp Neurol* 108, 221–228
- Laczo J, Andel R, Vyhnalek M, Vlcek K, Magerova H, Varjassyova A, Nedelska Z, et al. (2011) From Morris Water Maze to Computer Tests in the Prediction of Alzheimer’s Disease. *Neurodegenerative Diseases* 10, 153–157
- Lachowicz JE, Duffy RA, Ruperto V, Kozlowski J, Zhou G, Clader J, et al. (2001) Facilitation of acetylcholine release and improvement in cognition by a selective M2 muscarinic antagonist, SCH 72788. *Life Sci* 68, 2585–2592
- Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 91–104

- Lane RM, Potkin SG, Enz A. (2006) Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 9, 101–124
- Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F (2003) Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* 9, 241–260
- Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R, Collier B (1989) Binding sites for [3H]AF-DX 166 and effect of AF-DX 166 on endogenous acetylcholine release from rat brain slices. *Brain Res* 496, 285–294
- Lavenex P, Amaral DG (2000) Hippocampal–neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 10, 420–430
- Lazaris A, Cassel S, Stemmelin J, Cassel JC, Kelche C (2003) Intrastratial infusions of methoctramine improve memory in cognitively impaired aged rats. *Neurobiol Aging* 24, 379–383
- Lehmann O, Grottick AJ, Cassel JC, Higgins GA (2003) A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur J Neurosci* 18, 651–666
- Leranth C, Frostcher M (1987) Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol* 261, 33–47
- Levin ED, Briggs SJ, Christopher NC, Auman JT (1994) Working memory performance and cholinergic effects in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Brain Res* 657, 165–170
- Luo L, Chen WH, Wang M, Zhu DM, She JQ, Ruan DY (2008) Modulation of long-term potentiation by individual subtypes of muscarinic acetylcholine receptor in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 18, 989–995
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2004) *Farmakologie a toxikologie. 2. čes. vydání (překlad 15. zcela přeprac. vyd.)*, Grada Publishing, a. s. Praha, 728 s., ISBN 80-247-0836-1
- Maaswinkel H, Whishaw IQ (1999) Homing with locale, taxon, and dead reckoning strategies by foraging rats: sensory hierarchy in spatial navigation. *Behavioural Brain Research* 99, 143–152
- MacVicar BA, Tse FW (1989) Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* 417, 197–212
- Mandel RJ, Chen AD, Connor DJ, Thal LJ (1989a) Continuous physostigmine infusion in rats with excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: effects on performance in the water maze task and cortical cholinergic markers. *J Pharmacol Exp Ther* 251, 612–619
- Mandel RJ, Gage FH, Thal LJ (1989b) Spatial learning in rats: correlation with cortical choline acetyltransferase and improvement with NGF following NBM damage. *Exp Neurol* 104, 208–217
- Mandel RJ, Thal LJ (1988) Physostigmine improves water maze performance following nucleus basalis magnocellularis lesions in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 96, 421–425
- Marighetto A, Micheau J, Jaffard R (1993) Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. *Behav Brain Res* 56, 133–144
- Markowska AL, Olton DS, Givens B (1995) Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. *J Neurosci* 15, 2063–2073
- Masuoka T, Kamei C (2009) The role of nicotinic receptors in the amelioration of cholinesterase inhibitors in scopolamine-induced memory deficits. *Psychopharmacology (Berl)* 206, 259–265
- McDonald MP, Overmier JB (1998) Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 99–120
- McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 107, 3–22
- McMahan RW, Sobel TJ, Baxter MG (1997) Selective immunolesions of hippocampal cholinergic input fail to impair spatial working memory. *Hippocampus* 7, 130–136

- McNamara RK, Skelton RW (1992) Assessment of cholinergic contribution to chlordiazepoxide-induced deficits of place learning in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 41, 529–538
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983a) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214, 170–197
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983b) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1 – Ch6). *Neuroscience* 10, 1185–1201
- Michalek H, Fortuna S, Pintor A (1989) Age-related differences in brain choline acetyltransferase, cholinesterases and muscarinic receptor sites in two strains of rats. *Neurobiology of aging*, 10(2), 143–8
- Micheau J, Marighetto A (2011) Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav Brain Res* 221(2), 424–429
- Micheau J, Riedel G, Roloff EVL, Inglis J, Morris RGM (2004) Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci* 118, 1022–1032
- Mishkin M, Petri H. Memories and habits: some implications for the analysis of learning and retention. In: Squire LR, Butters N, editors (1984) *Neuropsychology of memory*. New York: Guilford, 287–296
- Miyamoto M, Narumi S, Nagaoka A, Coyle JT (1989) Effects of continuous infusion of cholinergic drugs on memory impairment in rats with basal forebrain lesions. *J Pharmacol Exp Ther* 248, 825–835
- Monmaur P, Breton P (1991) Elicitation of hippocampal theta by intraseptal carbachol injection in freely moving rats. *Brain Res* 544, 150–155
- Morris MK, Bowers D, Chatterjee A, Heilman KM (1992) Amnesia following a discrete basal forebrain lesion. *Brain* 115, 1827–1847
- Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 260, 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 RG (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9, 3040–3057
- Morris RG (2001) Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1453–1465
- Morris RGM, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, et al. (2003) Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of the activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci* 358, 773–786
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683
- Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS (2006) The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 16, 179–190
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, et al. (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207, 35–66
- Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31, 69–89

- Mundy WR, Iwamoto ET (1988) Nicotine impairs acquisition of radial maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 30, 119–122
- Myhrer T (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews* 41, 268–287
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7, 217–227
- Nai Q, McIntosh JM, Margiotta JF (2003) Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Mol Pharmacol* 63, 311–324
- Natsume K, Kometani K (1997) Theta-activity-dependent and -independent muscarinic facilitation of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Res* 27, 335–341
- Nieto-Escamez FA, Sanchez-Santed F, de Bruin JP (2002) Cholinergic receptor blockade in prefrontal cortex and lesions of the nucleus basalis: implications for allocentric and egocentric spatial memory in rats. *Behav Brain Res* 134, 93–112
- Niewiadomska G, Baksalerska-Pazera M, Riedel G (2009) The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 791–805
- O'Keefe J, Recce ML (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3, 317–330
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press, 1–561
- Olton DS, Walker JA, Gage FH (1978) Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res* 139, 295–308
- Ordy JM, Thomas GJ, Volpe BT, Dunlap WP, Colombo PM (1988) An animal model of human-type memory loss based on aging, lesion, forebrain ischemia, and drug studies with the rat. *Neurobiol Aging* 9, 667–683
- Packard MG (1999) Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12881–12886
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65, 65–72
- Page KJ, Everitt BJ, Robbins TW, Marston HM, Wilkinson LS (1991) Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA- and ibotenic acid- induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss. *Neuroscience* 43, 457–472
- Parsons SM (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* 14, 2423–2434
- Paul CM, Magda G, Abel S (2009) Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203, 151–164
- Pepeu G, Casamenti F, Pedata F, Cosi C, Pepeu IM (1986) Are the neurochemical and behavioral changes induced by lesions of the nucleus basalis in the rat a model of Alzheimer's disease? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10, 541–551
- Pitsikas N (2007) Effects of scopolamine and L-NAME on rats' performance in the object location test. *Behav Brain Res* 179, 294–298
- Platt B, Riedel G (2011) The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav Brain Res* 221(2), 499–504
- Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ (2002) Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136, 339–348
- Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, et al. (1995) Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired. *J Neurosci* 15, 1455–1462

- Quirion R, Richard J, Wilson A (1994) Muscarinic and nicotinic modulation of cortical acetylcholine release monitored by in vivo microdialysis in freely moving adult rats. *Synapse* 17, 92–100
- Ragozzino ME (2003) Acetylcholine actions in the dorsomedial striatum support the flexible shifting of response patterns. *Neurobiol Learn Mem* 80, 257–267
- Ragozzino ME, Choi D (2004) Dynamic changes in acetylcholine output in the medial striatum during place reversal learning. *Learn Mem* 11, 70–77
- Ragozzino ME, Jih J, Tzavos A (2002) Involvement of the dorsomedial striatum in behavioral flexibility: role of muscarinic cholinergic receptors. *Brain Res* 953, 205–214
- Ridley RM, Timothy CJ, Maclean CJ, Baker HF (1995) Conditional learning and memory impairments following neurotoxic lesion of the CA1 field of the hippocampus. *Neuroscience* 65, 263–275
- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, et al. (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2, 898–905
- Riedl O, Vondráček V et al. (1971) *Klinická toxikologie*. Avicenum Praha, 680 s., ISBN 08-044-71
- Riekkinen Jr P, Kuitunen J, Riekkinen M (1995) Effects of scopolamine infusions into the anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res* 685, 46–54
- Riekkinen Jr P, Sirvio J, Riekkinen P (1990) Similar memory impairments found in medial septal–vertical diagonal band of Broca and nucleus basalis lesioned rats: are memory defects induced by nucleus basalis lesions related to the degree of non-specific subcortical cell loss? *Behav Brain Res* 37, 81–88
- Robinson L, Platt B, Riedel G (2011) Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual learning. *Behav Brain Res* 221, 443–465
- Rogers JL, Kesner RP (2003) Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 80, 332–342
- Rouse ST, Thomas TM, Levey AI (1997) Muscarinic acetylcholine receptor subtype, m2: diverse functional implications of differential synaptic localization. *Life Sci* 60, 1031–1038
- Rowe WB, O'Donnell JP, Pearson D, Rose GM, Meaney MJ, Quirion R (2003) Long-term effects of BIBN-99, a selective muscarinic M2 receptor antagonist, on improving spatial memory performance in aged cognitively impaired rats. *Behav Brain Res* 145, 171–178
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH (1987) Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J Comp Neurol* 259, 483–528
- Salamone JD (1986) Behavioural functions of nucleus basalis magnocellularis and its relationship to dementia. *Trends Neurosci* 9, 256–258
- Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomez J, et al. (2004) M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci* 24, 10117–10127
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13, 596–604
- Shannon HE, Bemis KG, Hendrix JC, Ward JS (1990) Interactions between scopolamine and muscarinic cholinergic agonists or cholinesterase inhibitors on spatial alternation performance in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 255, 1071–1077
- Shen J, Barnes CA, Wenk GL, McNaughton BL (1996) Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci* 110, 1181–1186

- Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M (2000) Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci* 20, 8462–8473
- Schacter DL (1987) Implicit memory: history and current status. *J Exp Psychol: Learn Mem Cogn* 13, 501–518
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221(2), 555–563
- Smythe JW, Murphy D, Bhatnagar S, Timothy C, Costall B (1996) Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black–white box. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 57 – 63;
- Sokolowski K, Corbin JG (2012) Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol Neurosci* 5(5), 1–15
- Squire LR (1982) The neuropsychology of human memory. *Annu Rev Neurosci* 5, 241–273
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Physiol Rev* 99, 195–231
- Stewart M, Fox SE (1990) Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci* 13, 163–168
- Stillman MJ, Shukitt–Hale B, Galli RL, Levy A, Lieberman HR (1996) Effects of M2 antagonists on in vivo hippocampal acetylcholine levels. *Brain Res Bull* 41, 221–226
- 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. *Neuroscience Letters*, 366(2), 162–166
- Stuchlik A, Vales K (2008) Role of alpha1– and alpha2–adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active place avoidance task: a dose-response study. *Neuroscience Letters*, 433(3), 235–240
- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K (2008) Dopamine D2 receptors and alpha1–adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behavioural brain research*, 189(1), 139–144
- Stuchlik A, Petrasek T, Hatalova H, Rambousek L, Nekovarova T, Vales K. Behavioral tests for evaluation of information processing and cognitive deficits in rodent animal models of neuropsychiatric disorders. In: Burne THJ, editor (2012) *Schizophrenia in the 21st century*. Rijeka, Croatia: InTech, 1–194
- Sutherland RJ, Whishaw IQ, Regehr JC (1982) Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 96, 563–573
- Sutherland RJ, McDonald RJ, Hill CR, Rudy JW (1989) Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. *Behav Neural Biol* 52, 331–356
- Todman D (2008) Henry Dale and the discovery of chemical synaptic transmission. *Eur Neurol* 60(3), 162–164
- Tohyama M, Takatsuji K, Katsuji K (1998) Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. Oxford: Oxford University Press, 1 – 354
- Torres EM, Perry TA, Blockland A, Wilkinson LS, Wiley RG, Lappi DA, et al. (1994) Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* 63, 95–122
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, et al. (2007) Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer’s disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 851–871
- Traub RD, Bibbig A, LeBeau FE, Buhl EH, Whittington MA (2004) Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu Rev Neurosci* 27, 247–278

- Tulving E (2002) Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53, 1–25
- Tulving E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W, editors (1972) *Organisation of memory*. New York: Academic Press, 381–403
- Umbriaco D, Garcia S, Beaulieu C, Descarries L (1995) Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* 5, 605–620
- Vales K, Stuchlik A (2005) Central muscarinic blockade interferes with retrieval and reacquisition of active allothetic place avoidance despite spatial pretraining. *Behavioural Brain Research*, 161(2), 238–244
- van der Staay FJ, Bouger P, Lehmann O, Lazarus C, Cosquer B, Koenig J, et al. (2006) Long-term effects of immunotoxic cholinergic lesions in the septum on acquisition of the cone-field task and noncognitive measures in rats. *Hippocampus* 16, 1061–1079
- van der Staay FJ, Bouger PC (2005) Effects of the cholinesterase inhibitors donepezil and metrifonate on scopolamine-induced impairments in the spatial cone field orientation task in rats. *Behav Brain Res* 156, 1–10
- van der Zee EA, Keijser JN (2011) Localisation of pre- and post- synaptic cholinergic markers in rodents forebrain: a brief history and comparison of rat and mouse. *Behav Brain Res* 221, 356–366
- van der Zee EA, Luiten PG (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58, 409–471
- van Goethem NP, Rutten K, van der Staay FJ, Jans LAW, Akkerman S, Steinbusch HWM, Blokland A, et al. (2012) Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 323–334
- Vanover KE, Veinbergs I, Davis RE (2008) Antipsychotic-like behavioral effects and cognitive enhancement by a potent and selective muscarinic M₁ receptor agonist, AC-260584. *Behav Neurosci* 122, 570–575
- Volpicelli LA, Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145, 59–66
- von Linstow Roloff E, Harbaran D, Micheau J, Platt B, Riedel G (2007) Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience* 146, 875–889
- Voytko ML, Olton DS, Richardson RT, Gorman LK, Tobin JR, Price DL (1994) Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci* 14, 167–186
- Vuckovich JA, Semel ME, Baxter MG (2004) Extensive lesions of cholinergic basal forebrain neurons do not impair spatial working memory. *Learn Mem* 11, 87–94
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, et al. (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284, 314–335
- Walsh TJ, Herzog CD, Gandhi C, Stackman RW, Wiley RG (1996) Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res* 726, 69–79
- Wang RH, Bejar C, Weinstock M (2000) Gender differences in the effect of rivastigmine on brain cholinesterase activity and cognitive function in rats. *Neuropharmacology* 39, 497–506
- Wevers A (2011) Localization of pre- and post- synaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav Brain Res* 221, 341–355
- Whishaw IQ (1985) Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci* 99, 979–1005

- Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB (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
- Whishaw IQ, Cassel JC, Jarrard LE (1995) Rats with fimbria–fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *J Neurosci* 15, 5779–5788
- Whitlock JR, Heyen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long–term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097
- Williams JH, Kauer JA (1997) Properties of carbachol–induced oscillatory activity in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 78, 2631–2640
- Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201, 160–163
- Witter MP, Naber PA, van Haefen T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, et al. (2000) Cortico–hippocampal communication by way of parallel parahippocampal–subicular pathways. *Hippocampus* 10, 398–410
- Xiong ZQ, Tang XC (1995) Effect of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on radial maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 51, 415–419
- Yaguchi T, Nagata T, Nishizaki T (2009) Dilinoleoylphosphatidylcholine ameliorates scopolamine–induced impairment of spatial learning and memory by targeting alpha7 nicotinic ACh receptors. *Life Sci* 84, 263–266
- Zarei MM, Radcliffe KA, Chen D, Patrick JW, Dani JA (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88, 755–764
- Zimmer HG. (2006) Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart. *Clin Cardiol.* 29(3), 135–136

11. Přílohy