

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Veronika Bláhová

Neurální substrát magnetické kompasové orientace u myši C57BL/6J

Neural basis of magnetic compass orientation in C57BL/6J mice

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Němec, PhD.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2014

.....

Veronika Bláhová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Pavlovi Němcovi, PhD. za pomoc a finanční podporu práce, Bc. Lucii Štefanské za pomoc v průběhu experimentu a při analýze získaných dat a Mgr. Robertovi Černému, PhD. za podporu a pomoc v začátcích laboratorní praxe. Největší dík však patří mým nejbližším, kteří mi vždy pomohli a podpořili mě v mojí dosavadní činnosti.

Tato práce byla součástí projektu podpořeného GA UK, č. 116510/2010.

Obsah:

1. Úvod	6
1.2 Magnetické pole Země.....	7
1.3 Kompasová směrová orientace.....	8
1.4 Fyziologie magnetického smyslu.....	9
Role vestibulárního systému	
Role trigeminálního systému	
Role hipokampo-entorhinálního systému	
Role zrakového systému	
1.5 Cíle práce.....	15
2. Materiál a metodika	16
2.1 Magnetická stimulace.....	16
2.2 Imunocytochemie.....	17
2.3 Kvantifikace imunopozitivních neuronů.....	19
2.4 Statistická analýza.....	21
3. Výsledky	27
3.1 Vestibulární systém.....	27
3.2 Trigeminální systém.....	30
3.3 Hipokampo-entorhinální systém.....	37
3.4 Zrakový systém.....	44
3.5 Shrnutí výsledků.....	52
4. Diskuse	54
4.1 Lokalizace aktivitních markerů Egr1 a c-Fos.....	55
4.2 Magnetoresponsivní neurony ve vestibulárním systému.....	57
4.3 Magnetoresponsivní neurony v trigeminálním systému.....	58
4.4 Magnetoresponsivní neurony v hipokampo-entorhinálním systému.....	58
4.5 Magnetoresponsivní neurony ve zrakovém systému.....	59
4.6 Navazující výzkum.....	60
5. Závěr	62
6. Literatura	63
7. Příloha	76

Abstrakt:

Schopnost vnímat magnetické pole Země byla prokázána u řady živočichů, včetně zástupců všech pěti tříd obratlovců. O fyziologických mechanismech tohoto smyslu však víme jen velmi málo. Behaviorální, neuroetologické, fyziologické studie a studie používající jako markery neuronální aktivace genů časné odpovědi naznačily, že zásadní roli v percepci a zpracování magnetické informace hrají trigeminální, vestibulární a zrakový systém. Magnetická informace je pravděpodobně následně integrována s ostatními sensori-motorickými informacemi na úrovni hipokampo-entorhinálního systému. V naprosté většině studií však byli modelovými organismy ptáci. V této práci jsem analyzovala neurální substrát magnetické kompasové orientace u myši kmene C57BL/6J pomocí markerů c-Fos a Egr1. Ve všech výše zmíněných systémech jsem identifikovala neuronální populace reagující na experimentální změnu magnetického pole. Výsledky této studie demonstrují komplexní zpracování magnetické informace na úrovni centrálního nervového systému.

Klíčová slova: magnetorecepce, magnetická kompasová orientace, vestibulární systém, trigeminální systém, hipokampo-entorhinální systém, zrakový systém, hlodavci, myš, geny časné odpovědi

Abstract:

The ability to perceive the Earth's magnetic field has been demonstrated in a variety of animals, including representatives of all five classes of vertebrates. The physiological mechanisms underlying magnetic field sensation, however, remain largely unknown. Behavioral, physiological, neuroethological studies and studies using early response genes as neuronal activation markers indicated that a major role in the perception and processing of magnetic information play trigeminal, vestibular and visual systems. Subsequently, magnetic information seem to be integrated with multimodal sensory and motor information within the hippocampal-entorhinal system. In the majority of studies, however, birds have been used as model organisms. In this work I analyzed the neural substrate of magnetic compass orientation in the mouse strain C57BL/6J using markers c-Fos and Egr1. I found that all the aforementioned systems contain neurons responsive to the experimental magnetic fields. This finding demonstrates a complex processing of the magnetic information at level of the central nervous system.

Key words: magnetoreception, magnetic compass orientation, vestibular system, trigeminal system, hippocampal-entorhinal system, visual system, rodents, mouse, immediate early genes

1. Úvod

Magnetorecepce je –iroce roz-í eným, ale enigmatickým smyslem. Schopnost poufívat magnetické pole Zem jako vodítko pro orientaci v prostoru jifl byla dokázána u ady flivo ich , v etn mnoha obratlovc (review viz Wiltschko a Wiltschko 1995, 2005, 2012; Freae a kol. 2006; Lohmann a kol. 2007, 2010; Winklhofer 2010). Poznatky ze studií zam ených na orientaci a migraci pták umofnily vytvo it hypotézy o mechanismech magnetorecepce (nap . Gould 1982; Lednor a Walcott 1984; Mouritsen a kol. 2004b; Walcott 1974,1977; Wiltschko a Wiltschko 1972). Receptory magnetického pole v–ak stále nebyly spolehliv lokalizovány (nap . Kirschvink a kol. 2001; Ritz a kol. 2002, 2004; Wiltschko a kol. 2002). Poufítí magnetického pole pro orientaci bylo u skupiny savc pozorováno u netopýr (Holland a kol. 2006; Wiltschko a Wiltschko 1995), dvou eledí podzemních hlodavc (Burda a kol. 1990; Kimchi a Terkel 2001; Oliveriusová a kol. 2012) i u zástupc epigeických hlodavc (Deutschlander a kol. 2003; Muheim a kol. 2006; Painter a kol. 2013; Phillips a kol. 2013). Magnetické podmínky jsou pravd podobn vnímány i v t–ími savci. Jako modely výzkumu magnetorecepce sloufily také psovitě –elmy, vysoká zv nebo skot, u kterých byla pozorována preferovaná orientace t la (alignment) ve sm ru severojifní osy magnetického pole (Begall a kol. 2008; Burda a kol. 2009; ervený a kol. 2011). Fyziologické mechanismy magnetické orientace v–ak stále z stávají stále neobjasn é. Biofyzikální mechanismy transdukce magnetických parametr v elektrický signál jsou nejasné a rovn fl víme jen velmi málo o neurofyziologickém zpracování magnetické informace (Burger a kol. 2010; Johnsen a Lohmann 2005; Mouritsen a Ritz 2005a; Rodgers a Hore 2009; Wiltschko a Wiltschko 2005, 2006; Wu a Dickman 2011). Studie zam ené na migra ní chování pták p inesly adu doklad o tom, fle magnetický kompas je u pták závislý na sv tle (review viz Deutschlander a kol. 1999; Wiltschko and Wiltschko 2005) a jeho funk nost je mofné zásadn ovlivnit velmi slabým radiofrekven ním polem (Kavokin a kol. 2009; Ritz a kol. 2004; Wiltschko a kol. 2007). Behaviorální studie zam ené na hlodavce p inesly p esv d ivé výsledky o poufívání magnetické informace u zástupc subteránních hlodavc , nap íklad *Fucomys anselli* z eledi Bathyergidae (Burda a kol. 1990) a *Spalax ehrenbergi* z eledi Spalacidae (Kimchi a a Terkel 2001), a zástupc epigeických hlodavc z eledi Muridae, k e íka dflungarského *Phodopus sungorus*, norníka rudého *Clethrionomys glareolus* (Oliveriusová a kol. 2014) a my-i inbredního kmene C57BL/6J (Muheim a kol. 2006; Phillips a kol. 2013). Pro hlub-í analýzu mechanism magnetické orientace v–ak bylo nutno zavést neurobiologické

nástroje umožní určit identifikovat oblasti CNS zapojené do procesování magnetické informace.

Kombinace behaviorální studie a imunocytochemické vizualizace byla poprvé použita u ryby *Fucomys anselli* (N. M. a kol. 2001). Díky markeru c-Fos ze skupiny indukovatelných transkripčních faktorů (inducible transcription factors, ITFs) byly detekovány magnetoresponsevní neurony v superior colliculus. Další studie vyvíjející jako markery IEGs přinesly výsledky, které vypovídají o možném zapojení thalamofugálního zrakového systému (Mouritsen a Ritz 2005a; Heyers a kol. 2007; Liedvogel a kol. 2007) a hipokampu (Burger a kol. 2010; Shimizu a kol. 2004) do zpracování informací o magnetickém poli. Jak u savců, tak u ptáků jsou neustále testovány další druhy. Tyto experimenty přináší i velmi zajímavé variace projevu schopnosti vnímat magnetické pole Země. Pro studii fyziologické podstaty magnetického smyslu se jeví vhodné vybrat snadno komerčně dostupný druh živočicha, který má zároveň předpoklady pro to stát se modelovým organismem magnetorecepce. Zvíře, které se ukázalo jako perspektivní modelový organismus pro výzkum prostorové a magnetické orientace, je myš domácího kmene C57BL/6J. Reakce a schopnosti myši absolvovat úlohy v modifikovaném Morrisově vodním bludišti byly již předtím otestovány (Gerlai 2002) a nyní byla také prokázána její schopnost naučit se orientovat ve čtyřramenném vodním bludišti podle magnetických vodiček (Phillips a kol. 2013). V behaviorálních magnetorecepčních experimentech projevuje schopnost stavět hnízdo v naučeném i spontánně orientovaném směru (Muheim a kol. 2006). Navíc je výhodou dostupnost knockoutované varianty bez funkčního kryptochromu, díky čemuž lze pro funkční magnetickou orientaci (Gegear a kol. 2008; Liedvogel a kol. 2007; Möller a kol. 2004; Mouritsen a kol. 2004a). O mechanismu magnetické orientace u myši se však zatím nic neví. Podle fylogenetické příbuznosti by měla mít mechanismus magnetického kompasu shodný s rybou, tj. permanentně magnetický materiál i biogenní magnetit (Marhold a kol. 1997).

1.2 Magnetické pole Země

Planeta Země je zjednodušeně obrovský dipólový magnet. Magnetický vektor je možné rozložit na vertikální a horizontální komponentu. Úhel, který svírají se zemským povrchem, nazýváme magnetická inklinace. Nabývá hodnot od -90° do $+90^\circ$ od jižního k severnímu pólu, podobně i intenzita magnetického pole dosahuje nejvyšších hodnot na pólech. Intenzita magnetického pole vykazuje nepravidelné lokální změny. Tyto anomálie

mohou být způsobeny například elektromagnetickým zářením ze Slunce nebo specifickým geologickým podložím. Vlastnosti magnetického pole podrobně popisuje mnoho monografických publikací (např. Merrill a McElhinny 1983; Skiles 1985). Navigace pomocí magnetického pole je možná díky informaci, kterou poskytuje gradient absolutní intenzity a inklinace magnetického pole. Magnetický kompas využívají k orientaci nejen taštní ptáci (review viz Wiltschko a Wiltschko 2002), ale i ryby (Quinn 1981), obojživelníci (Phillips 1986), mořské řelvy (Lohmann 1991) a již zmíněná hlodavci (např. Marhold 1997). Z bezobratlých živočichů byla zjištěna existence magnetického smyslu u včel (DeJong 1982), termity (Duelli a kol. 1978) a langust (Lohmann a kol. 1995).

1.3 Kompasová směrková orientace

Z behaviorálních experimentů je patrné, že existuje více možných využití informací získaných z parametrů magnetického pole. Schopnost kompasové směrkové orientace byla již mnohokrát testována, a i emfí závěry experimentů demonstrují existenci 2 typů mechanismů magnetického kompasu - inklinací a polaritní. Inklinací kompas je založen na měření inklinace indukovaných magnetického pole. Pomocí něj jsou živočišné schopni pouze určit, zda směřují k pólu, ale nerozliší ke kterému. Vyskytuje se například u ptáků (Wiltschko a Wiltschko 1972), řelvy (Lohmann a Lohmann 1994) a obojživelníků (Phillips a Borland 1994). Druhý typ kompasu je polaritní kompas, který umožňuje rozlišit směr již-sever. Tento typ kompasu byl zjištěn například u lososů (Quinn a Brannon 1982) a některých hlodavců (Marhold 1997). Kromě kompasové orientace je možné parametry magnetického pole využít pro navigaci pomocí tzv. "mapového smyslu". Pozitivní informaci zvíře získává z gradientu absolutní intenzity a inklinace magnetického pole. Tyto parametry magnetického pole umožňuje, aby byl živočich schopen si vytvořit "magnetickou mapu", díky níž je schopen "pravé navigace" (Bingman a Cheng 2005; Lohmann a Lohmann 2006; Pfuhr a kol. 2011; Phillips a kol. 2006; Putman a kol. 2011; Walker a kol. 2002; Wiltschko a Wiltschko 1995, 2005, 2006; Wyeth 2010). Pravé navigace jsou schopni ptáci (např. Fisher a kol. 2003; Keeton a kol. 1974; Walcott 1974), řelvy (Lohmann a kol. 2004), olci (Phillips a kol. 2002) a z bezobratlých například langusty *Palinurus argus* (Boles a Lohmann 2003).

1.4 Fyziologie magnetického smyslu

Podstata magnetorecepce je stále velkou záhadou smyslové biologie. Teoretické modely, stejně jako experimentální data naznačují, že existují dva odlišné způsoby detekce magnetického pole Země. Prvním z nich je mechanismus založený na součinnosti feromagnetických částic a jednoduchých nebo superparamagnetických krystalků biogenního magnetitu a mechanoreceptorů (např. Davila a kol. 2005; Kirschvink a Gould 1981; Shcherbakov a Winklhofer 1999; Solov'ov a Greiner 2007; Tian a kol. 2010; Wiltschko a kol. 2010a). Jako druhý je navrhován mechanismus založený na magnetickým polem modulovaných reakcích radikálových párů. Tento mechanismus je spojen s fotorepcí a patří k nim dochází ve specializovaných fotoreceptorech (např. Dodson a kol. 2013; Hogben a kol. 2009; Mouritsen a kol. 2012; Ritz a kol. 2000, 2010; Rodgers a Hore 2009).

Magnetitová hypotéza byla testována v experimentech s pulzní magnetizací. Krátký, silný magnetický pulz (5 ms, 0,5 T) má výrazný, dlouhotrvající efekt na orientaci ptáků (Holland a kol. 2013; Munro a kol. 1997; Wiltschko a kol. 2002; Wiltschko a kol. 2007) a podzemních hlodavců (Marhold a kol. 1997). Pravděpodobně, na biogenním magnetitu založené magnetoreceptory byly identifikovány v jejich epitelu pstruha duhového, *Oncorhynchus mykiss* (Diebel a kol. 2000; Walker a kol. 1997). Podobné struktury byly identifikovány ve spodní části horní poloviny zobáku ptáků (Fleissner a kol. 2003, 2007; Hanzlik a kol. 2000). V obojživelnících jsou tyto kandidátní magnetoreceptory inervovány oftalmickou větví trigeminálního nervu. Teorie o lokalizaci magnetitových magnetoreceptorů v zobáku ptáků byla recentně zpochybněna (Treiber a kol. 2012).

Naopak existuje rozsáhlá evidence, že magnetický kompasový smysl je založen na mechanismu radikálových párů. Magnetická kompasová orientace ptáků a obojživelníků je komplexním způsobem závislá na intenzitě a vlnové délce světla (Deutschlander a kol. 1999; Wiltschko a Wiltschko 2002; Wiltschko a kol. 2009; Wiltschko a kol. 2010b). V recentních publikacích bylo také použito oscilující radiofrekvenční pole jako diagnostický nástroj, které specificky ruší reakce radikálových párů, což bylo opakovaně demonstrováno desorientací ptáků (Keary a kol. 2009; Ritz a kol. 2004, 2009; Thalau a kol. 2005; Wiltschko a kol. 2007) i hmyzu (Vácha a kol. 2009). Kryptochromy jsou dosud jediné popsané fotopigmenty přítomné v sítnici, schopné generovat radikálové páry (Giovani a kol. 2003). Přítomnost kryptochromů v sítnici ptáků byla mnohokrát popsána (Bailey a kol.

2002; Fu a kol. 2002; Haque a kol., 2002; Möller a kol. 2004; Mouritsen a kol. 2004a; Yamamoto a kol. 2001). Bylo prokázáno, že v sítnici pták orientujících se magnetickým polem Země v Emlenových orientačních klecích kolokalizují markery neuronální aktivity *c-Fos* a *ZENK* s expresí *Cry1* (Mouritsen a kol. 2004a). Navíc bylo recentně prokázáno, že magnetosensitivita je u octomilek, *Drosophila melanogaster* závislá na přítomnosti funkčního genu pro kryptochrom (Gegeer a kol. 2008, 2010). Zatímco wild-type octomilky vykazují v T-bleditě jasnou reakci v i experimentálnímu magnetickému poli, cry deficientní (cry⁰ knock-out a cry^b mutant) kmeny nikoli. Kryptochromy tedy velmi pravděpodobně hrají klíčovou roli nejen v magnetické kompasové orientaci ptáků, ale v magnetosenzitivitě živočichů obecně.

O procesování magnetické informace v centrálním nervovém systému mnoho nevíme. Protože magnetorecepce slouží především k orientaci a k navigaci, předpokládá se zapojení struktur zapojených do zpracovávání informací potřebných pro používání map prostoru a dalších kooperujících neuronálních populací.

Role vestibulárního systému. Vestibulární systém je zapojen do procesování vstupních informací o poloze těla a podílí se na schopnosti orientace v prostoru. Komplex vestibulárních jader dostává vstupy z mozečku, ale kromě toho jsou zde přijímány informace z dalších smyslových orgánů včetně proprioceptivních vstupů (Vidal a Sans 2004). Vestibulární jádra jsou zpravidla dělena na 4 hlavní jádra (superior - SuVe, lateral - LVe, medial - MVe, spinal - SpVe) a topograficky poblíž umístěné skupiny menších jader. Vestibulární nerv vede hlavní sluchový vstup do lateral vestibular nucleus, kde se rozděluje na vzestupné a sestupné větve. Vzestupné větve nervu projikují do superior + medial + lateral vestibular nuclei. Sestupné větve nervu pak projikují do lateral + spinal vestibular nuclei. Každá vlákna z větví vestibulárního nervu kromě toho vytváří více paralelních spojení projikujících do 4 hlavních vestibulárních jader a vytváří tak spojení 2. řádu. Tyto neuronální populace přes toto spojení přijímají buď vstupy jednoho typu (například pouze informace z horizontální i vertikální *crista ampullaris*, *maculae staticae*), nebo jsou naopak multikonvergentní a přijímají různé typy informací (Angelaki a Perachio 1993; Graf a Ezure 1986; Kubo a kol. 1977; Lannou a kol. 1980). Vestibulární struktury tedy musí být posuzovány jako dobře informovaně spojené přijímající nejen jednu informaci (zrakové, proprioceptivní, vestibulární), které kombinuje tyto vstupy pro kalibraci udržení rovnováhy a vyváženosti celého těla. Vestibulární systém projikuje do dorzálního

tegmentálního jádra a to dále přes laterální mammilární jádro do thalamu, kam se dostává informace i ze zrakového systému (Vidal a Sans 2004).

Možnost zapojení vestibulárního systému byla zmiňována v několika publikacích zaměřených především na holuby (např. Semm 1984). V současné době se u ptáka a v obecně u obratlovců předpokládá zapojení vestibulárního systému do neurálního okruhu navrženém Wu a Dickmanem (2011), kteří předpokládají ústřední vestibulární vstup z lagény na zpracovávání magnetické informace. K tomuto tvrzení přispívá objev ferritinových částic obsažených ve vláskových buňkách vnitřního ucha (Lauwers a kol. 2013). Kromě toho bylo demonstrováno, že funkce vestibulárního systému u potkana je důležitá pro funkce mapy prostoru vytvářené v hipokampu a především zde ovlivňuje aktivitu head direction cells (Stackmann a kol. 1997, 2002).

Role trigeminálního systému. Celý trigeminální systém je možné rozdělit na část motorickou a sensorickou. V souvislosti s magnetorecepcí je velmi často zmiňován hlavně sensorický trigeminální systém, jehož součástí je trigeminální nerv inervující obličejovou část těla. Tento nerv se rozděluje do tří v tví: maxilární, mandibulární a oftalmické. Sensorické a motorické vstupy z trigeminálních ganglií vstupují do mozkového kmene společně, poté se rozdělí a část projikuje rostromediálně do mesecephalic nucleus a část vstupuje do trigeminálního traktu laterálního. Část vstup se dostává do principal trigeminal nucleus (Pr5) a druhá část vstup směřuje do spinálního traktu, na které vstupy jsou zde filtrovány. Trigeminální sensorická jádra vytváří několik skupin jader prodlužujících se směrem ze středního mozku do spinální části míchy. Hlavní komplex jader sestává z principal trigeminal nucleus a spinal trigeminal nuclei (oral + interpolar + caudal part). Z principal trigeminal nucleus je informace dále přenášena do thalamu (Waite 2004). Sensorický trigeminální systém je často zmiňován v souvislosti s magnetickým smyslem, protože u ryb a ptáka byla elektrofyziologickými metodami prokázána přítomnost magnetoresponsivních jednotek v trigeminálním gangliu nebo v oftalmické v tví trojklaného nervu (Semm a Beason 1990, Walker a kol. 1997). U ptáka se předpokládalo přítí informací magnetické informace v horní části zobáku (Fleissner a kol. 2003, 2007; Hanzlik a kol. 2000; Wiltschko a kol. 2010a), která je inervována oftalmickou v tví trigeminálního nervu, nicméně předpoklad ústřední ferritinových částic obsažených v horní části zobáku byl zpochybněn (Treiber a kol. 2012). Neuroetologické experimenty využívající senzitivitu *nervus ophthalmicus* pomocí lokální anestézie nebo bilaterální transektce nervu přesto přinášely výsledky, které naznačují zapojení trigeminálního nervu do

přenosu magnetické informace do mozku (Beason a Semm 1996; Mora a kol. 2004). Byly zde identifikovány magneto-responzivní jednotky, jejichž frekvence akčních potenciálů je ovlivována změnami v intenzitě magnetického pole. Stejně tak experimenty založené na operantním podmínění naznačují, že magnetoreceptory asociované s trigeminálním systémem jsou sensory intenzity magnetického pole (Mora a kol. 2004; Walker a kol. 1997). Všeobecně se tedy předpokládá, že hrají roli v magnetickém mapovém smyslu (informace o geografické poloze).

Role hipokampo-entorhinálního systému. Magnetická informace je součástí vstupních informací o okolním prostředí. Lze tedy předpokládat, že bude zpracovávána společně s ostatními navigačními daty v tzv. "rodent navigation circuit" (Burger a kol. 2010; Touretzky a kol. 2002), a to nejen o hlodavce, ale pravděpodobně i u ptáka. Magneto-responzivní neurony byly identifikovány v hipokampu ptáka (Shimizu a kol. 2004; Vargas a kol. 2006), u rybožravce Bathyergidae v superior colliculus, hipokampu, subikulu, entorhinální kůře a korových i podkorových centrech (Burger a kol. 2010; Nemeš a kol. 2001).

"Rodent navigation circuit" je možné zjednodušeně rozdělit na hipokampo-entorhinální systém (Moser a kol. 2008) a systém jader obsahujících tzv. head direction cells - neurony směru hlavy (Taube 2007). Anatomicky je entorhino-hipokampální systém tvořen hipokampální a parahipokampální formací (Witter and Amaral 2004). Parahipokampální formaci tvoří entorhinální, postrhinální a perirhinální kůra. Hipokampální formaci tvoří *gyrus dentatus*, vlastní hipokampus sestávající z *cornu Ammonis* 1-3 (CA1-3), a subikulum. "Rodent navigation circuit" je systém tvořený strukturami, které obsahují neurony nazvané podle informace, kterou kódují. Změna jejich akčního potenciálu na specifických místech v prostoru tvoří informaci, která se podílí na spoluutváření mapy prostoru v etní pozici v ní. Place cells (O'Keefe a Dostrovsky 1971; O'Keefe 1976), grid cells (Moser a kol. 2008), head direction cells (Taube 2007) a border cells spolupracují jako jednotky účastnící se navigace v prostoru (McNaughton a kol. 2006; Sharp a kol. 2001; Samu a kol. 2009). Place cells reagují intenzivní palbou akčních potenciálů, pokud se zvíře dostane na určité konkrétní místo alocentrického prostoru, tzv. místové pole (šplace field). Vlastnosti place cells mají pyramidální neurony CA1 a 3, granulózní buňky *gyrus dentatus* hipokampu, a také některé neurony v subikulu. Jednotlivým place cells odpovídají různá místová pole, populace place cells tedy vytváří vnitřní reprezentaci okolí zvířete (Muller a kol. 1991). Place place cells hipokampu mají

například významnou roli ve formování a konsolidaci kontextové specifické episodické paměti (Ferbinteanu a Shapiro 2003; Leutgeb a kol. 2005; Moita a kol. 2003; Wood a kol. 2000). Head direction cells, neurony reagující na změnu polohy hlavy, byly popsány v několika podkorových centrech, postsubikulu, retrosplenální a entorhinální kůře (Taube 2007). Posledním objeveným typem neuronů jsou hraniční neurony (šborder cells). Vyskytují se spolu s grid cells, place cells a head direction cells v mediální entorhinální kůře a parasubikulu. K jejich aktivaci dochází při přiblížení k okraji experimentálního prostoru. O jejich existenci uvažoval Burgess a kolegové již v roce 2000, ale popsány byly až v nedávné době (Solstad a kol. 2008). Grid cells objevil recentně Hafting a kol. (2005). Tyto typy neuronů se vyskytují v entorhinální kůře spolu s place cells a head direction cells (Fyhn a kol. 2004), dále také v presubikulu a parasubikulu smíšeně s head direction cells a border cells (Boccaro a kol. 2010). Grid cells mají pravděpodobně zásadní význam pro odhad vzdáleností, podílí se na integraci dráhy a výrazně ovlivňují aktivitu place cells (Moser a kol. 2008). Na tomto místě je třeba zmínit, že některá centra navigačního systému, jakými jsou hipokampus, anteriorní jádra talamu, mammilární jádra a retrosplenální kortex hrají rovněž zásadní roli v kontextuálním učení a paměti (Aggleton a Pearce, 2001).

Role zrakového systému. Zrakový systém je uvažován v souvislosti s vnímáním magnetického pole pomocí kryptochromů v sítnici, které jsou hlavními kandidáty na magnetoreceptory zprostředkovávající kompasový smysl (Giovani a kol. 2003). Jsou exprimovány nejen v sítnici, ale například i v epifyze savců (Miyamoto a Sancar 1998; Nakamura a kol. 2001) a ptáků (například Mouritsen a kol. 2004; Moller a kol. 2004). Mezi jejich vlastnosti patří schopnost po excitaci fotony vytvářet radikálové páry schopné interagovat s magnetickým polem Země (Rodgers a Hore 2009). Předpokládá se, že magnetický smysl ptáků je závislý na svlehu (Wiltschko a Wiltschko 1981), resp. jeho vlnové délce a intenzitě (viz výše). Naopak u řelv (Light a kol. 1993; Lohmann 1991; Lohmann a kol. 2001) a rypů (Marhold 1997) byla demonstrována schopnost orientace v naprosté tmě.

Projekce ze sítnice do mozku jsou organizovány do paralelních drah. Optický trakt projikuje do pěti hlavních podkorových zrakových oblastí - suprachiasmatic nucleus (SCN), lateral geniculate (LG), pretectum, superior colliculus a accesoric optic system (AOS). Role některých oblastí zrakového systému v magnetické orientaci ptáků byla již potvrzena elektrofyziologicky (Semm a kol. 1984; Semm a Demaine 1986),

neuroanatomicky (Liedvogel a kol. 2007; Mouritsen a kol. 2004a, 2005; Heyers a kol. 2007) a neuroetologickými studiemi (Zapka a kol. 2009). Elektrofyziologické studie prokázaly přítomnost magnetoresponsevních neuronů v centrech zrakového systému - tectum opticum a v nucleus of the basal optic root (nBOR), které je součástí akcesorického optického systému. Tyto struktury obsahují jednotky reagující na změnu magnetické inklinace, takže se pravděpodobně účastní kompasové orientace (Semm a Demain 1986; Semm a kol. 1984).. Studie aplikující ITFs jako markery neuronální aktivity přinesly výsledky napovídající o zapojení thalamofugálního zrakového systému do magnetorecepce u ptáků (Liedvogel a kol. 2007; Mouritsen a kol. 2005). Výsledky těchto studií byly potvrzeny experimenty s lézemi ve zrakovém systému ptáků (Zapka a kol. 2009) i elektrofyziologicky (Vargas a kol. 2006). U savců byly magnetoresponsevní neurony detekovány zatím pouze v superior colliculus pomocí aktivního markeru c-Fos (Nemeš a kol. 2001). Tato struktura je nezbytná pro schopnost orientace v rámci sensorickým stimulů. Dochází zde k integraci motorické a sensorické informace přicházející ze zrakového a vestibulárního systému, dále vstupy somatosensorické, striatonigrální a cerebelární (Huerta a Harting 1984; Vanegas 1984).

1.5 Cíle práce

Cílem mé práce je identifikace populací magnetoresponsevních neuronů u myši C57BL/6J pomocí detekce aktivace nebo inaktivace kandidátních oblastí mozku v souvislosti se změnami vlastností magnetického pole v experimentální aréně. Projekt si klade za cíl analyzovat neurální substrát magnetické orientace u myši kmene C57BL/6J s použitím indukovatelných transkripčních faktorů (ITFs) jako marker neuronální odpovědi.

Analýza bude zaměřena na zrakový, trigeminální, vestibulární systém a hipokampo-entorhinální systém, který je součástí navigačního systému (tzv. "rodent navigation circuit").

Pokud budou identifikována mozková centra obsahující magneto-responzivní neurony, výsledné poznatky budou sloužit pro zacílení navazujících experimentů na konkrétní oblasti mozku zapojené do procesování magnetického smyslu u hlodavců.

2. Materiál a metodika

V experimentu jsme použili laboratorní my–inbredního kmene C57BL/6J. U tohoto kmene laboratorní my–i byla opakovaně demonstrována schopnost magnetické kompasové orientace (viz Úvod). Perspektivita tohoto kmene spočívá také v dostupnosti genetických knock-outů pro kryptochromy (Sancar 2004), které podle dosavadních výsledků hrají zásadní roli v transdukcii magnetické informace na elektrický signál (viz Úvod). Navíc je tento kmen je vysoce kompetentní v úlohách zahrnujících prostorovou orientaci a paměť (např. Wahlsten a kol. 2005).

Experiment byl zaměřen na stimulaci kandidátních oblastí mozku, které by mohly reagovat na změny magnetického pole. K identifikaci populací neuronů, které jsou změny magnetického pole nebo aktivní orientací pomocí magnetického kompasu specificky aktivovány, bylo použito funkční neuroanatomické mapování založené na monitorování exprese indukovatelných transkripčních faktorů c-Fos a Egr-1.

2.1 Magnetická stimulace

Pro potřeby tohoto experimentu bylo testováno 39 jedinců (60–80 dní staré samice) rozdělených do pěti experimentálních skupin. Všechna zvířata byla před experimentem 4 týdny umístěna v prostředí se světelným režimem 12L:12D, ve kterém bylo odstíněno nízkofrekvenční a radiofrekvenční elektromagnetické pole. Potrava byla dostupná ad libitum. Během této doby bylo se zvířaty pravidelně manipulováno (handling) a zvířata byla seznámena s experimentálním prostředím kvůli minimalizaci stresu, který ovlivňuje chování i mozkovou aktivitu. Na začátku samotného experimentu byla každá myš umístěna do kruhové arény s hoblinami (open field test, průměr arény 82 cm), kde mohla volně exploraovat 75 minut. Byl pořízen videozáznam chování zvířete. Během této doby bylo triaxiální Merrittovo cívkou (velikost 1.8m x 1.8m x 1.8m) měněno magnetické pole uvnitř arény podle definovaných parametrů příslušného stimulu:

- 1) lokální geomagnetické pole ($B=46 \mu\text{T}$, 66° inklinace) ($N=8$)
- 2) šumové pole ($B < 500 \text{ nT}$) ($N=8$)
- 3) experimentální pole, jehož intenzita se měnila každé 2 s ($B = 0 \quad 25 \quad 50 \quad 75 \quad 100 \quad 125 \quad 150 \quad 0 \text{ T}$) ($N=9$)
- 4) experimentální pole komplexně měněné v rozsahu $B = 50 \text{ a } -50 \mu\text{T}$ ($N=8$)

5) experimentální pole komplexně se mění v rozsahu $B = 250$ až -250 T (N=6)

Parametry magnetického pole byly pro kontrolu během experimentu snímány trojosým magnetometrem GeoMag se sondou Honeywell HMR2300 (Edis vvd., Košice, Slovensko). Celý systém pro manipulaci s magnetickým polem byl ovládán pomocí počítačově řízených zdroj stejnosměrného proudu (Hamann Hardware & Software Development, Plön, Germany).

Po administrativním stimul bylo náhodně. Každé zvíře prošlo vybraným stimulem pouze jednou. Ihned po ukončení experimentu bylo usmrceno předávkováním haloethanem (Sigma-Aldrich spol. s r.o.) a byla provedena transkardiální perfuze pufovaným fyziologickým roztokem (dále PBS) a 4% paraformaldehydem (PFA). Následně byl mozek zvířete vypreparován a postfixován v 4% PFA po 12 hodin, poté byla tkáň převedena do fosfátového pufru (dále PB). Před imunohistologickým zpracováním byla tkáň skladována ve 4°C. Se zvířaty se během experimentu zacházelo v souladu s platnými předpisy podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb..

2.2 Imunohistochemie

Postfixované mozky myši byly uskladněny v PB (20ml PB + 10μl NaN_3). Kryoprotekce byla zajištěna prosycením tkáň 30% roztokem sacharózy v PBS. Poté byl mozek zalit do fletatiny (300 BLOOM) a bloková fixován v roztoku 30% sacharózy v 4% PFA přes noc. Následující den byl blok zmražen na -80°C na 12 hodin a poté nakrájen na kryostatu Leica CM 3050S na 40 μm silné řezy. Během krájení byly řezy postupně ukládány do rozděleného boxu s PB kvůli zachování rovnoměrného rozdělení rezů do skupin. Celkem byly řezy každého mozku rozděleny do 18 skupin. Na každý marker byl poufity každý třetí rez (pro přehlednost viz schéma 1).

Vybrané skupiny rezů byly imunohistologicky značeny dle standardního protokolu používaného v naší laboratoři. Pro detekci exprese byly poufity primární protilátky egr-1, 1:2000 (C-19, made in rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a anti-c-fos, 1:20000 (Ab-5, 4-17, rabbit Ab, PC38, Calbiochem); sekundární protilátka anti-rabbit biotinylovaná IgG, 1:200 (H+L, Vector Laboratories, BA-1000), k detekci sekundární protilátky byla z důvodu stability značení poufita peroxidázová reakce s

3,3'diaminobenzidinem (DAB) s využitím VECTASTAIN Elite ABC kitu (PK-6100, Vector Laboratories, Inc.).

c-fos	egr1	konzervace -25°C	c-fos	egr1	konzervace -25°C
c-fos	egr1	konzervace -25°C	c-fos	egr1	konzervace -25°C
c-fos	egr1	konzervace -25°C	c-fos	egr1	konzervace -25°C

Schéma .1

Protokol barvení:

1. 3% H₂O₂ 30 min
2. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
3. NGS (normal goat serum)
4. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
5. Avidin blocking 15 min
6. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
7. Biotin blocking 15 min
8. inkubace - primární protilátka v SAPJE - přes noc

druhý den:

1. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
2. 2°AB 90 min
3. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
4. ABC kit 2 hod
5. PBS 3 x promytí (3 x 10 min)
6. DAB vizualizace

Obarvené ezy byly nakonec cca 5x promyty v PB, uskladn ny ve 4°C a poté namontovány se azené v rostrokaudálním po adí na podlovní skla potažená 0,5% fletinou. Jako zalévací médium byl pouffit DPX (Sigma-Aldrich spol s r. o.).

Poufíté roztoky:

PB: 1000 ml dest. H₂O + 2,16 g KH₂PO₄ (Merck spol. sr.o.)+ 11,56 g Na₂HPO₃ (Merck spol sr.o.)

PBS: 1000 ml PB + 9 g NaCl

30% sacharoza: 70 ml PB + 30 g sacharozy

4% PFA: 1000 ml PB + 40g paraformaldehydu (Sigma-Aldrich sr.o.)

PFA sacharoza: 70 ml PFA + 30 g sacharozy

SAPJE: 200 ml PBS + 0,2g BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich sr.o.) + 1 ml TRITON X-100 (Sigma-Aldrich sr.o.)

fletina (blo ky): 200 ml H₂O + 20 g fletiny (300 BLOOM, Sigma-Aldrich sr.o.) + 60 g sacharozy + 200µl NaN₃

fletina (skla): 1000 ml H₂O + 5 g fletiny (75-100 BLOOM, Sigma-Aldrich sr.o.) + 0,5 g CrK(SO₄)₂ (Sigma-Aldrich sr.o.)

2.3 Kvantifikace imunopozitivních neuron

Pro srovnání a morfologické ur ení mozkových jader sloufily ezy my-ího mozku obarvené kresylovou violetí a stereotaktický atlas my-ího mozku (Paxinos a Franklin 2001). Struktury vestibulárního systému byly m eny na v-ech dostupných ezech, tj. u každého markeru každý t etí ez. U trigeminálního, zrakového a hipokampo-entorhinálního systému byly m eny vybrané roviny definované interaurální vzdáleností. U trigeminálního systému byly vybrány roviny: -1,22; -1,54; -1,88; -2,00; -2,20; -2,44; -2,68; -2,92; -3,16; -3,52; -3,76; -3,96; -4,32. Hipokampo-entorhinální systém byl analyzován v rovinách: 2,34; 1,98; 1,62; 0,52; 0,28; 0,00; -0,68; -0,92; -1,16. Zrakový systém byl analyzován v rovinách: 1,98; 1,50; 1,34; 1,00; 0,64; 0,28; -0,08; -0,44; -0,80. Pro analýzu m ení byly získány u každé struktury 3 a více hodnot ze stejn vzdálených ez . Data nebyla zahrnuta do analýzy v p ípad , fle byly z d vodu po-kození tkán k dispozici mén nefl 3 analyzovatelné ezy na strukturu a zví e. Struktury byly nafoceny kamerou SPOT RT Slider 2.3.1.1 (Diagnostic Instruments, Inc.) na mikroskopu Olympus BX51TF (Olympus Optical Co, Ltd.). Snímaný obraz byl zaznamenán programem SPOT Advanced 5.0.

Měření dat bylo prováděno v programu CellP (Olympus Optical Co, Ltd.). Analyzované struktury byly foceny při zvětšení 100x nebo 200x.

Analýzu jsem zaměřila na funkční systémy, jejichž hlavní role v magnetorecepci a magnetické orientaci je uvažována v recentní literatuře. Ve své diplomové práci používám nomenklaturu zavedenou Paxinosem a Franklinem (2001), přidávám se proto anglických názvů.

Analyzované struktury vestibulárního systému (Obr. I-II):

medial vestibular nucleus, parvicellular (MVePC)
lateral vestibular nucleus (LVe)
vestibulocerebellar nucleus (VeCb)
spinal vestibular nucleus (SpVe)
medial vestibular nucleus (MVe)
medial vestibular nucleus, magnocellular (MVeMC)
superior vestibular nucleus (SuVe)

Analyzované struktury trigeminálního systému (Obr. III-V):

principal sensoric trigeminal nucleus, dorsomedial part (Pr5DM)
principal sensoric trigeminal nucleus, ventrolateral part (Pr5VL)
dorsomedial spinal trigeminal nucleus (DMSp5)
spinal trigeminal nucleus, oral part (Sp5O)
spinal trigeminal nucleus, interpolar part (Sp5I)
spinal trigeminal nucleus, caudal part (Sp5C)

Analyzované struktury zrakového systému (Obr. VI-VIII):

dorsal lateral geniculate (DLG)
ventral lateral geniculate (VLG)
secondary visual cortex, mediolateral area (V2MM)
secondary visual cortex, mediomedial area (V2ML)
primary visual cortex (V1)
secondary visual cortex, lateral area (V2L)
superficial gray layer of superior colliculus (SCSuG)
optic nuclear layer of superior colliculus (SCOp)
zonal layer of superior colliculus (SCZo)

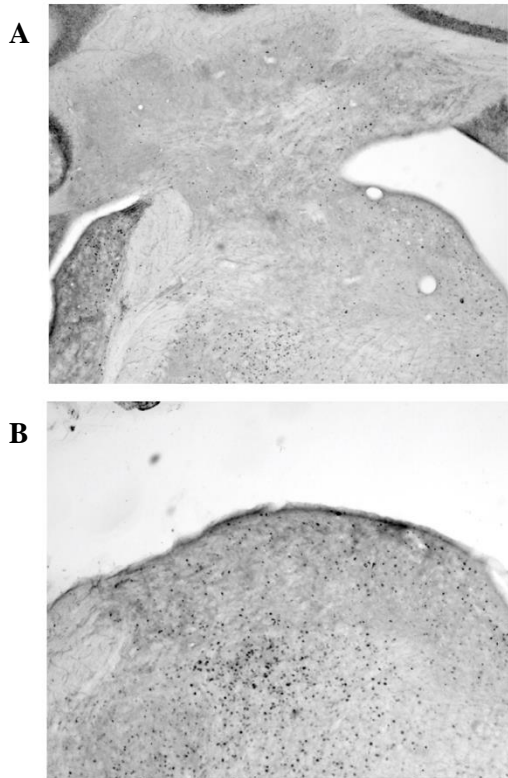
Analyzované struktury hipokampo-entorhinálního systému (Obr. VIII-X):

cornu Ammonis (CA1)
cornu Ammonis (CA3)
dentate gyrus, granular layer (GrDG)
dentate gyrus, polymorph layer (PoDG)
dorsal subiculum (Sd)
ventral subiculum (Sv)
medial entorhinal cortex (MEnt)
lateral entorhinal cortex (LEnt)

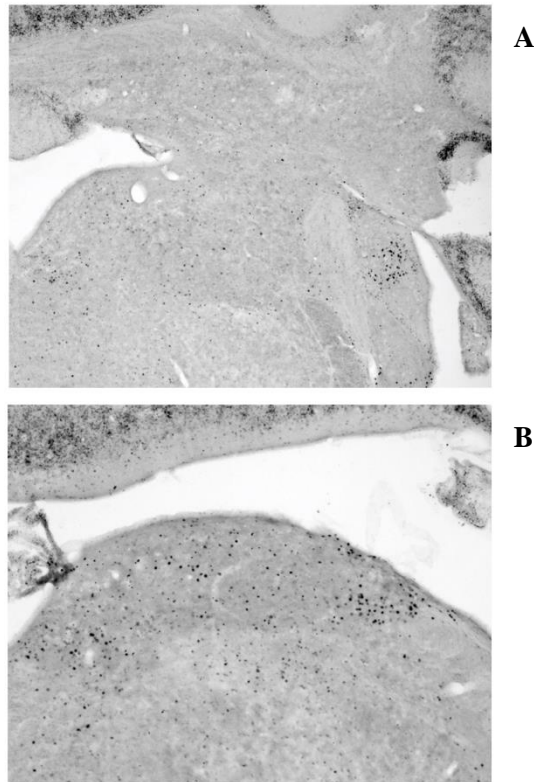
2.4 Statistická analýza

Dle technických možností byly u každé struktury kvantifikovány neurony vztažené na plochu celé struktury (pop. délku struktury) nebo byly kvantifikovány neurony v definovaném poítačím rámci. V jádrech byla měřena analyzovaná plocha, u hipokampálních struktur byl počet neuronů vztažen na délku měřené oblasti. Do analýzy byly zahrnuty takové imunopozitivní neurony, které dosahovaly silného kontrastního zbarvení jádra neuronu s exprimovaným imunohistologicky známým proteinem. Měření bylo prováděno pro levou a pravou stranu mozku zvlášť. Poté byly naměřené hodnoty zpracovány pro každou stranu mozku (dále jako "L" - levá strana mozku, "P" - pravá strana mozku, "LP" - zpracovaná data pro levou a pravou stranu mozku). Pro každou strukturu byla provedena analýza variance - jednocestná ANOVA. V případě signifikantních rozdílů byl následně proveden post hoc Tukey test - mnohonásobná porovnávání pro zjištění rozdílů mezi skupinami. Pro struktury se signifikantním rozdílem imunopozitivity byly vytvořeny krabicové grafy ("box and whisker plot"). Analýza všech struktur byla provedena jako slepý test, tj. neměla jsem k dispozici informaci o zařazení zvířete do experimentální skupiny. Aby měření bylo objektivní a bylo možné provést další navazující studii materiálu, přípravu a rozdělení dat pro analýzu provedla kolegyně Bc. Lucie Trefanská. Data byla analyzována v programu R (ver.3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing), grafické úpravy byly provedeny v Corel Photo Paint 5 (Corel Corp.).

Ukázka exprese Egr1 ve
vestibulárním systému (100x)



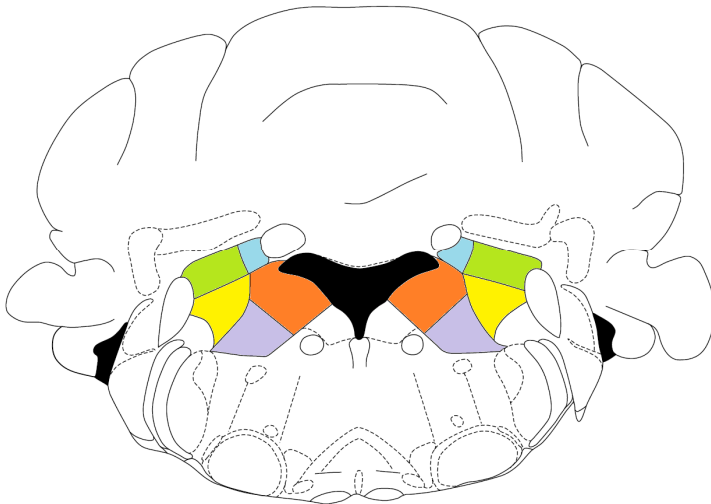
Ukázka exprese c-Fos ve
vestibulárním systému (100x)



shora dolů:

Obr. A: MVePC, MVeMC, LVe, VeCb, SuVe

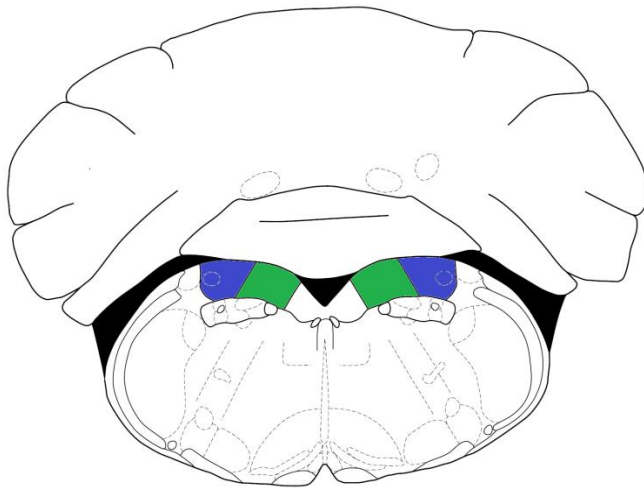
Obr. B: SpVe, MVe



Obr. I
Analyzované struktury vestibulárního systému

- MVePC
- MVeMC
- LVe
- VeCb
- SuVe

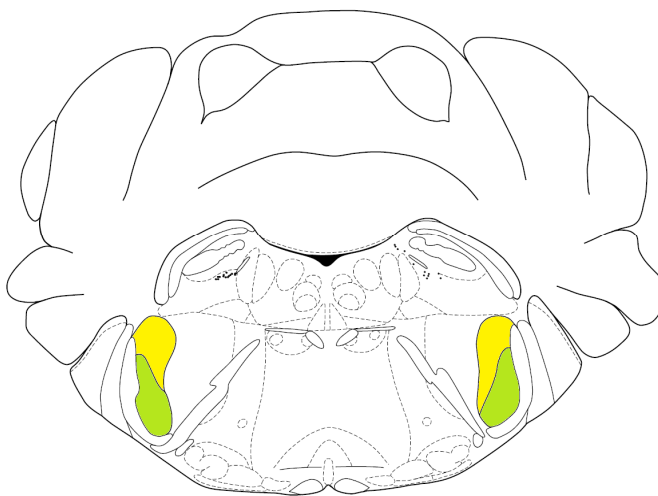
(Podle atlasu Paxinose a Franklina, 2001)



Obr. II
Analyzované struktury vestibulárního systému

- SpVe
- MVe

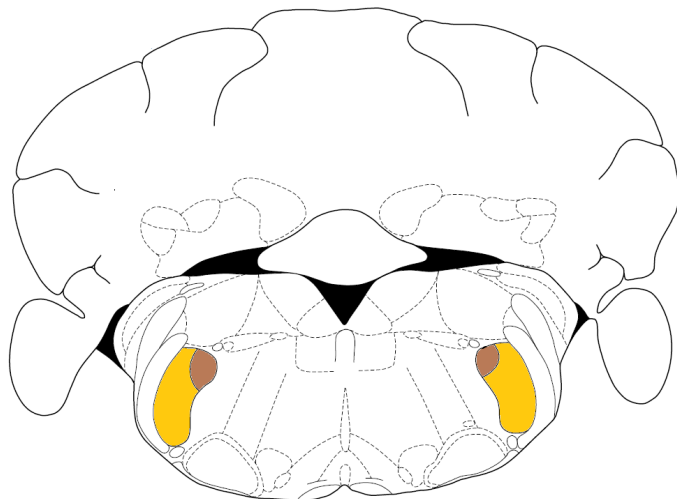
(Podle atlasu Paxinose a Franklina, 2001)



Obr. III
Analyzované struktury trigeminálního systému

- Pr5DM
- Pr5VL

(Podle atlasu Paxinose a Franklina, 2001)

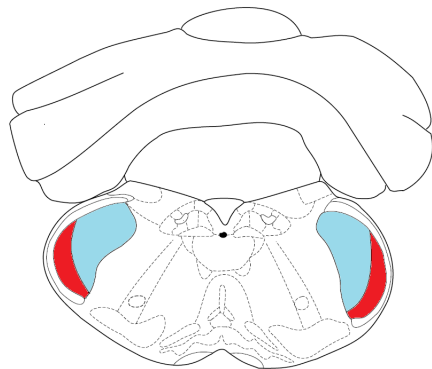


Obr. IV
*Analyzované struktury
 trigeminálního systému*

Sp5O ■

DMSp5 ■

(Podle atlasu Paxinose
 a Franklina, 2001)

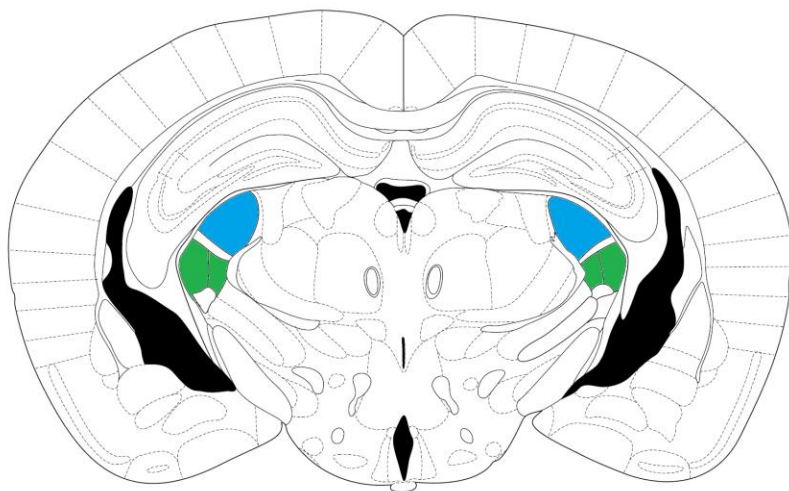


Obr. V
*Analyzované struktury
 trigeminálního systému*

Sp5I ■

Sp5C ■

(Podle atlasu Paxinose a
 Franklina, 2001)

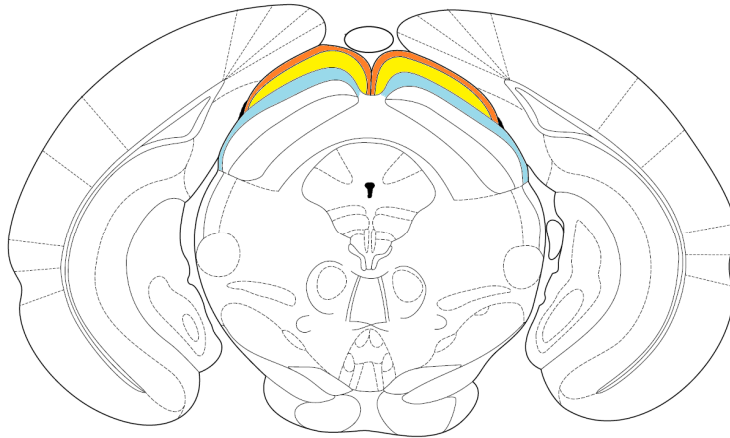


Obr. VI
*Analyzované struktury
 zrkového systému*

DLG ■

VLG ■

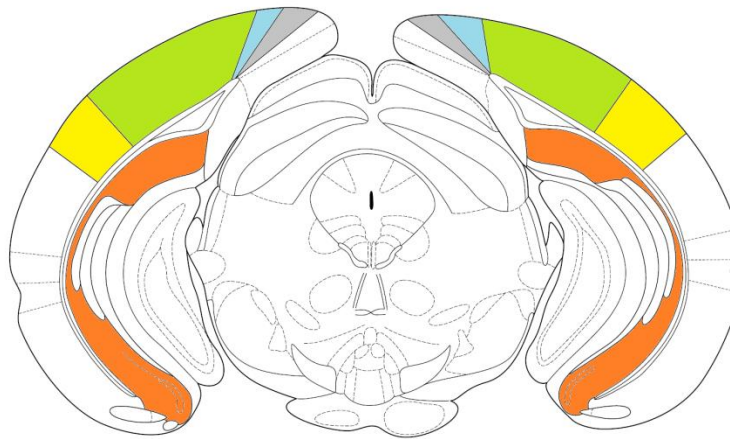
(Podle atlasu Paxinose a
 Franklina, 2001)



Obr. VII
*Analyzované struktury
 zrakového systému*

- SCZo
- SCSuG
- SCOp

(Podle atlasu Paxinose
 a Franklina, 2001)



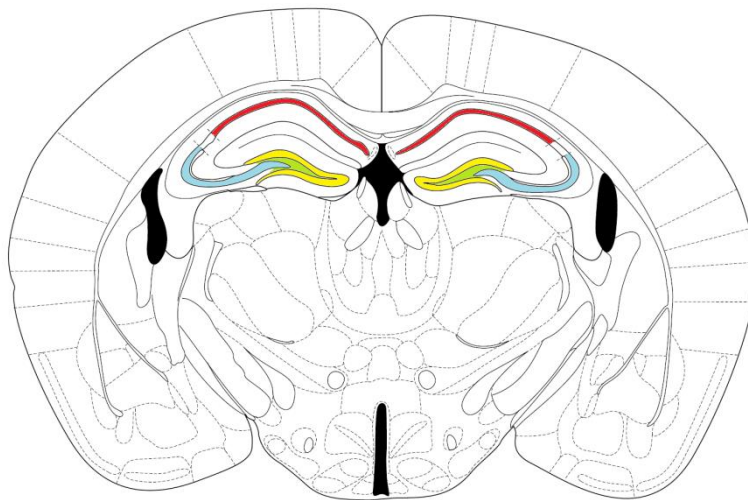
Obr. VIII
*Analyzované struktury
 zrakového systému*

- V2MM
- V2ML
- V1
- V2L

*Analyzované struktury
 hipokampo-
 entorhinálního systému*

- Sd + Sv

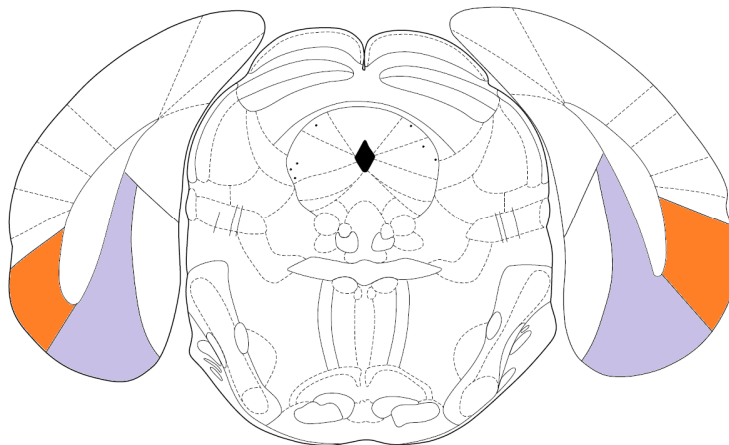
(Podle atlasu Paxinose a
 Franklina, 2001)



Obr. IX
*Analyzované struktury
 hipokampo-
 entorhinálního systému*

- CA1
- CA3
- GrDG
- PoDG

(Podle atlasu Paxinose a
 Franklina, 2001)



Obr. X
*Analyzované struktury
 hipokampo-
 entorhinálního systému*

- LEnt
- MEnt

(Podle atlasu Paxinose a
 Franklina, 2001)

3. Výsledky

V této práci jsem analyzovala změny v expresi genů odpovědi Egr1 a c-Fos, které signalizují změny aktivity neuronálních populací při změnách magnetického pole. Imunopozitivní neurony jsem analyzovala ve vybraných strukturách tý mozkových systémů. Porovnávala jsem rozdíly mezi expresí markerů a testovala rozdílný efekt při experimentálních změnách magnetických polí - stimulů. Použití těchto stimulů s různými parametry umožnilo zjistit, jaký podíl má na změnu aktivace dané struktury vliv. Jako kontrolní skupina byla stanovena pátá skupina s působením magnetickým polem.

Výsledky je možné rozdělit do čtyř kapitol dle analyzovaných systémů a každá kapitola je věnována do částí dle analyzovaných struktur. Z důvodu rozsáhlých dat v této části práce zmíní pouze struktury, u kterých byly zaznamenány signifikantní změny exprese. Pouze v grafických schématech jsou pro porovnání záznamy změny exprese obou markerů dostupné pro danou strukturu včetně nesignifikantních dat. V následujícím textu jsou data pro levou stranu mozku značena "L", pro pravou stranu mozku "P" a zprůměrované hodnoty obou stran "LP".

3.1 Vestibulární systém

Výsledky analýzy vestibulárního systému ukázaly signifikantní změny neuronální aktivity ve strukturách superior vestibular nucleus (SuVe) a v magnocellular medial vestibular nucleus (MVeMC).

Superior vestibular nucleus (SuVe). Počet imunopozitivních neuronů jsou shrnuty v Obr. 1, výsledky statistické analýzy v Tab. 1 a v příloze Tab. S1. Hodnoty počtu imunopozitivních neuronů v datech pro Egr1 celkově dosahovaly vysokých hodnot rozptylu a celková imunopozitivita se pohybovala v rozmezí 0-40 neuronů/mm². Signifikantní rozdíl exprese Egr1 byl demonstrován na pravé straně mozku (ANOVA: $p=0,047$). Počet imunopozitivních neuronů byl u zvířat vystavených komplexní směsí nízkému poli o intenzitách $B = 250 \mu T$ a $-250 \mu T$ (K-MAX) signifikantně vyšší než u zvířat vystavených magnetickému poli s proměnlivou intenzitou (INT) (Tukey post hoc test: $p=0,027$). Výsledky analýzy exprese markeru c-Fos nepřednesly signifikantní rozdíl mezi skupinami. Z grafu pro c-Fos je patrný malý počet imunopozitivních neuronů v rozmezí 0-10 neuronů/mm².

Tabulka . 1

SuVe - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
SuVe/Egr1	L	0,629	0,646
SuVe/Egr1	P	2,815	0,047
SuVe/Egr1	LP	1,527	0,225
SuVe/c-Fos	L	0,196	0,938
SuVe/c-Fos	P	1,940	0,139
SuVe/c-Fos	LP	0,690	0,606

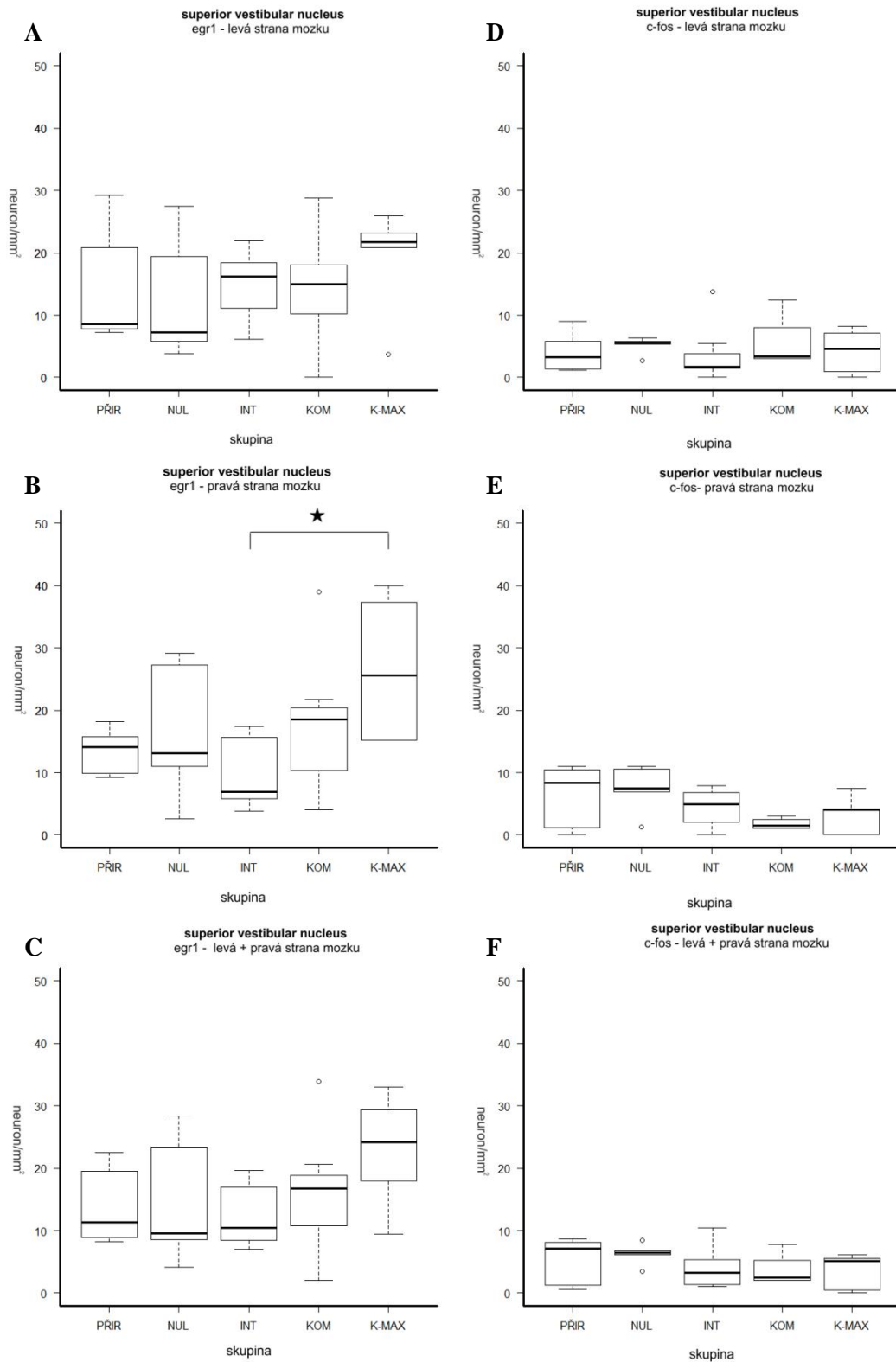
Magnocellular medial vestibular nucleus (MVeMC). Výsledky statistické analýzy jsou shrnuty v Tab. . 2 a v p íloze Tab. S2. Analýzou variance zde byla zji-t na signifikantní zm na v expresi markeru c-Fos v datech zpr m rovaných pro pro levou a pravou stranu (ANOVA: $p=0,040$), ale post hoc test nepotvrdil statistickou významnost rozdíl exprese mezi skupinami. Na pravé i levé stran byly pozorovány nesignifikantní trendy (viz Tab. S2). Z porovnání výsledk v-ech skupin je patrná celkov vy-í úrove exprese markeru Egr1 neřl markeru c-Fos, u kterého se rozdílly mezi skupinami pohybovaly v ádu jednotlivých neuron (max. 10 neuron /mm²).

Tabulka . 2:

MVeMC - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
MVeMC/Egr1	L	0,444	0,776
MVeMC/Egr1	P	0,228	0,921
MVeMC/Egr1	LP	0,255	0,904
MVeMC/c-Fos	L	2,499	0,061
MVeMC/c-Fos	P	2,261	0,083
MVeMC/c-Fos	LP	2,819	0,040

Medial vestibular nucleus - parvicellular (MVePC), lateral vestibular nucleus (LVe), vestibulocerebellar nucleus (VeCb), spinal vestibular nucleus (SpVe), medial vestibular nucleus (MVe). U t chto analyzovaných struktur nebyly pozorovány řládne signifikantní zm ny exprese aktivitních marker ani viditelné trendy exprese t sn nad hranicí signifikance ($p=0,05-0,1$).



Obrázek . 1 Superior vestibular nucleus (SuVe) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám.

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - obojí pole, jehož intenzita se mění každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 50 \text{ a} \mu\text{T} - 50 \text{ T}$; K-MAX - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 250 \text{ a} \mu\text{T} - 250 \text{ T}$; kódy signifikance: $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05$

3.2 Trigemální systém

Signifikantní změna exprese aktivitních marker byla zaznamenána v podjádrech spinálního trigeminálního jádra (spinal trigeminal nucleus, oral part - Sp5O, spinal trigeminal nucleus, interpolar part - Sp5I, spinal trigeminal nucleus, caudal part - Sp5C). Trendy na hranici prokazatelnosti byly detekovány v dorsomedial spinal trigeminal nucleus (DMSp5) a principal trigeminal nucleus, ventrolateral part (Pr5VL).

Spinal trigeminal nucleus, oral part (Sp5O). U orálního podjádra (Sp5O) byly signifikantní rozdíly exprese Egr1 zaznamenány na obou stranách i u dat pro srovnání levé a pravé strany (ANOVA: L - $p=5,18 \cdot 10^{-6}$; P - $p=0,002$; L+P - $p=1,9 \cdot 10^{-5}$). Ve všech případech byla zaznamenána signifikantní zvýšená exprese Egr1 u zvířat vystavených magnetickému poli komplexně se měnícímu v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) (výsledky post hoc testu viz příloha, Tab. S4-S6). Počet imunopozitivních neuronů se zde přibližně zdvojnásobil ve srovnání s kontrolními zvířaty vystavenými přirozenému poli (viz Obr. 2). Výsledky získané analýzou exprese markeru c-Fos vykazují podobné trendy, avšak signifikantní rozdíl byl pozorován pouze na pravé straně mozku (ANOVA: $p=0,002$) a u dat srovnávaných pro levou a pravou stranu (ANOVA: $p=0,001$). Zvířata vystavená magnetickému poli komplexně se měnícímu v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) vykazovala signifikantní zvýšenou expresi ve srovnání se zvířaty vystavenými magnetickým stimulům NUL, INT a KOM, nikoli však ve srovnání s kontrolními zvířaty vystavenými přirozenému poli (výsledky post hoc testu viz příloha, Tab. S7, S8).

Tabulka 3
Sp5O - výsledky analýzy variance pro počet imunopozitivních neuronů

struktura/marker	dataset	F	p
Sp5O/Egr1	L	11,500	$5,18 \cdot 10^{-6}$
Sp5O/Egr1	P	5,279	0,002
Sp5O/Egr1	LP	9,970	$1,9 \cdot 10^{-5}$
Sp5O/c-Fos	L	2,437	0,066
Sp5O/c-Fos	P	5,261	0,002
Sp5O/c-Fos	LP	5,808	0,001

Spinal trigeminal nucleus, interpolar part (Sp5I). U tohoto podjádra došlo k statisticky významnému zvýšení exprese Egr1 na pravé straně mozku u zvířat vystavených magnetickému poli komplexně se měnícímu v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) (ANOVA: $p=0,029$). Exprese Egr1 u těchto zvířat byla signifikantně vyšší než u kontrolních zvířat vystavených přirozenému poli.

zví at vystavených stimul m NUL a INT (post hoc Tukey test: $p=0,032$, resp. $p=0,036$). Na levé stran se exprese Egr-1 mezi skupinami zví at vystavenými r zným magnetickým podmínkám neodli-ovala (viz. Obr. 3, Tab. . 4). V expresi transkrip ního faktoru c-Fos nebyly pozorovány fládné signifikantní zm ny (viz Obr. . 3, Tab. . 4).

Tabulka . 4
Sp5I- výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
Sp5I/Egr1	L	1,496	0,226
Sp5I/Egr1	P	3,094	0,029
Sp5I/Egr1	LP	2,266	0,083
Sp5I/c-Fos	L	1,330	0,279
Sp5I/c-Fos	P	1,107	0,369
Sp5I/c-Fos	LP	1,375	0,263

Spinal trigeminal nucleus, caudal part (Sp5C). U tohoto podjádra byly zm ny exprese Egr1 výrazn j-í neř u p edchozího jádra. Analýza variance dosahovala hodnot $p=0,0001$ pro levou stranu mozku, $p=0,016$ pro pravou stranu mozku a u zpr m rovaných výsledk pro levou a pravou ást $p=0,001$. Na pravé stran mozku byly pozorovány signifikantn zvý-ené po ty imunopozitivních neuron u zví at vystavených magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 250$ ařl -250 T (K-MAX) v í v-em ostatním experimentálním skupinám, a rovn řl tak u zví at vystavených magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 50$ ařl -50 T (KOM), zde v-ak pouze v í zví at m vystaveným magnetickým stimul m NUL a INT (výsledky post hoc Tukey testu viz p řloha, Tab. S10). Na levé stran mozku byla signifikantn zvý-ená exprese Egr1 zaznamenána pouze u zví at vystavených stimulu K-MAX a to ve srovnání se zví aty vystavenými nulovému magnetickému poli (NUL) (viz Obr. . 4, Tab. S9). Exprese transkrip ního faktoru c-Fos byla obecn níř-í, dosahovala po tu maximáln 30 neuron /mm². Byl zji-t n signifikantní rozděl po tu imunopozitivních neuron v pravé ásti mozku (ANOVA: $p=0,016$), který podle post hoc testu dosahoval statistické významnosti na úrovni $p=0,014$ mezi zví aty vystavenými magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 50$ ařl -50 T (KOM) a komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 250$ ařl -250 T (K-MAX).

Tabulka . 5

Sp5C - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
Sp5C/Egr1	L	8,018	0,0001
Sp5C/Egr1	P	3,544	0,016
Sp5C/Egr1	LP	5,652	0,001
Sp5C/c-Fos	L	0,271	0,894
Sp5C/c-Fos	P	3,539	0,016
Sp5C/c-Fos	LP	0,844	0,507

Dorsomedial spinal trigeminal nucleus (DMSp5). Analýzou variance zde nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v počtu imunopozitivních neuronů (viz Tab. . 6). Nicméně data zprůměrovaná pro levou a pravou stranu mozku vykazují změny v počtu imunopozitivních neuronů pro c-Fos na hranici statistické významnosti (ANOVA: $p=0,056$).

Tabulka . 6

DMSp5 - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
DMSp5/Egr1	L	0,684	0,608
DMSp5/Egr1	P	0,844	0,508
DMSp5/Egr1	LP	0,757	0,561
DMSp5/c-Fos	L	2,040	0,111
DMSp5/c-Fos	P	1,472	0,232
DMSp5/c-Fos	LP	2,569	0,056

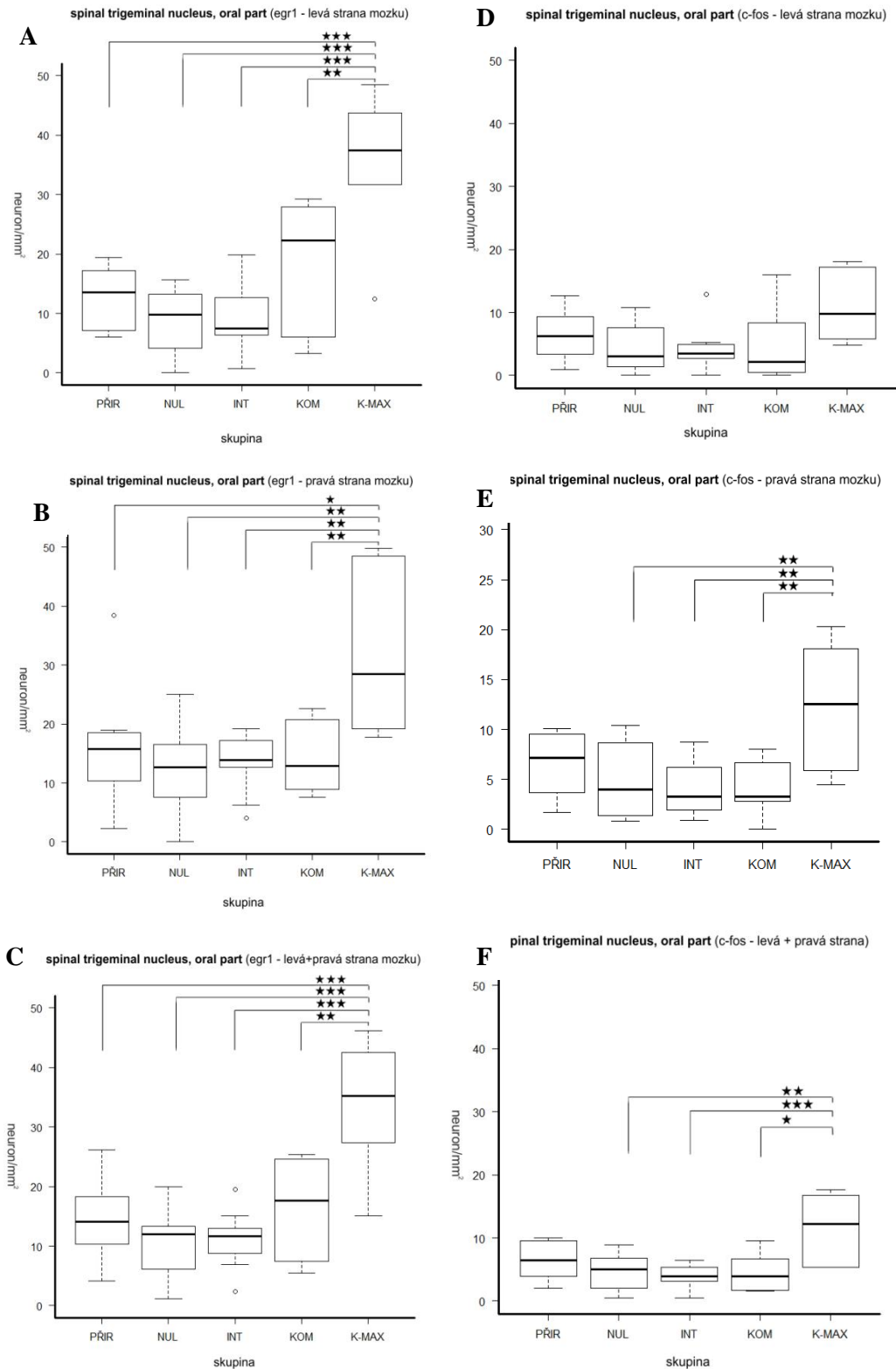
Principal trigeminal nucleus, ventrolateral part (Pr5VL). Magnetické podmínky během experimentu neměly významný vliv na expresi použitých aktivních markerů v tomto podjádění (viz Tab. . 7).

Tabulka . 7

Pr5VL - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

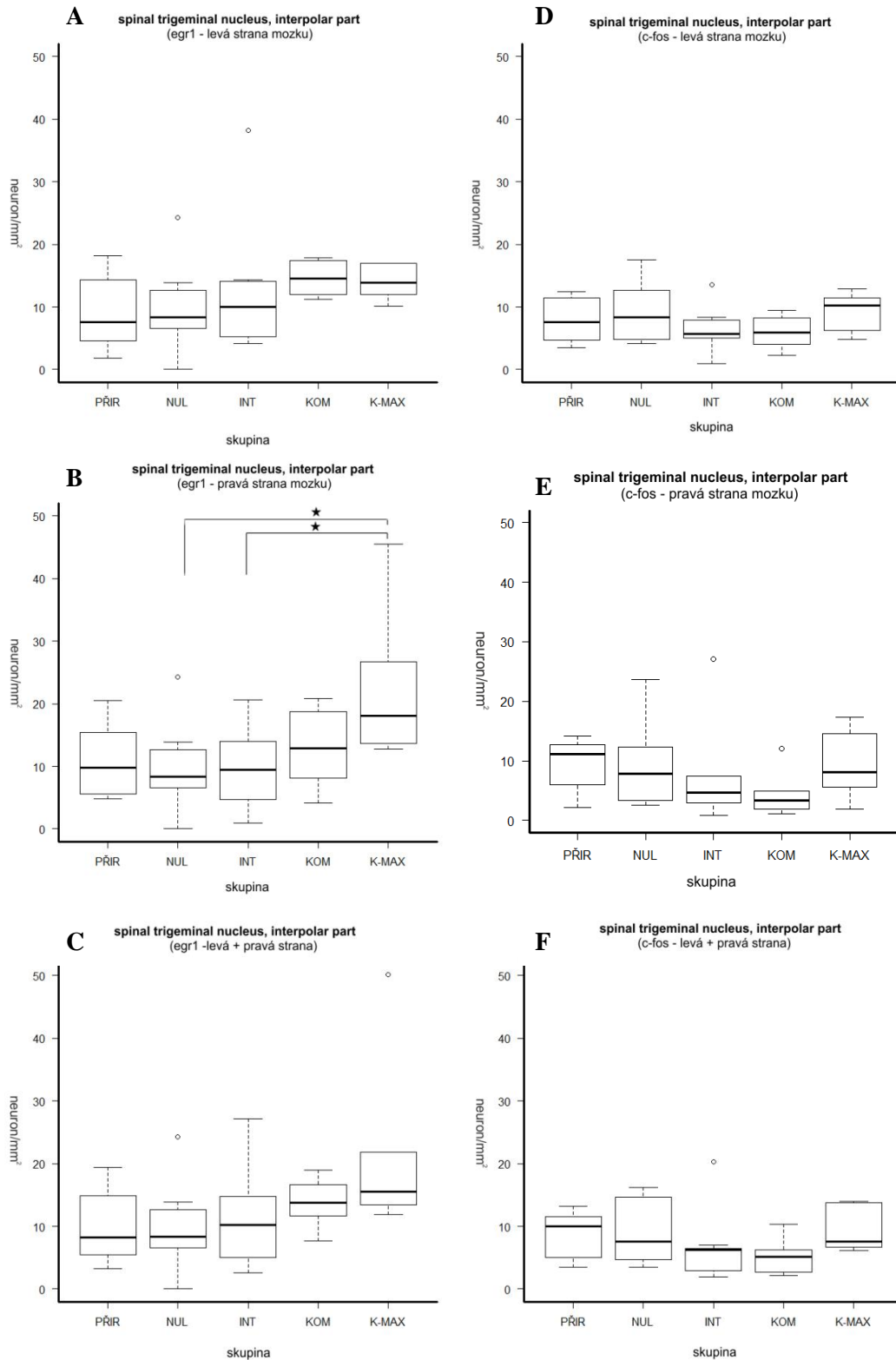
struktura/marker	dataset	F	p
Pr5VL/Egr1	L	1,731	0,166
Pr5VL/Egr1	P	1,757	0,160
Pr5VL/Egr1	LP	2,190	0,091
Pr5VL/c-Fos	L	0,907	0,471
Pr5VL/c-Fos	P	0,879	0,487
Pr5VL/c-Fos	LP	1,184	0,335

Principal sensoric trigeminal nucleus, dorsomedial part (Pr5DM). U této analyzované struktury nebyly pozorovány žádné signifikantní změny exprese aktivních markerů ani viditelné trendy exprese těsně nad hranicí signifikance ($p=0,05-0,1$).



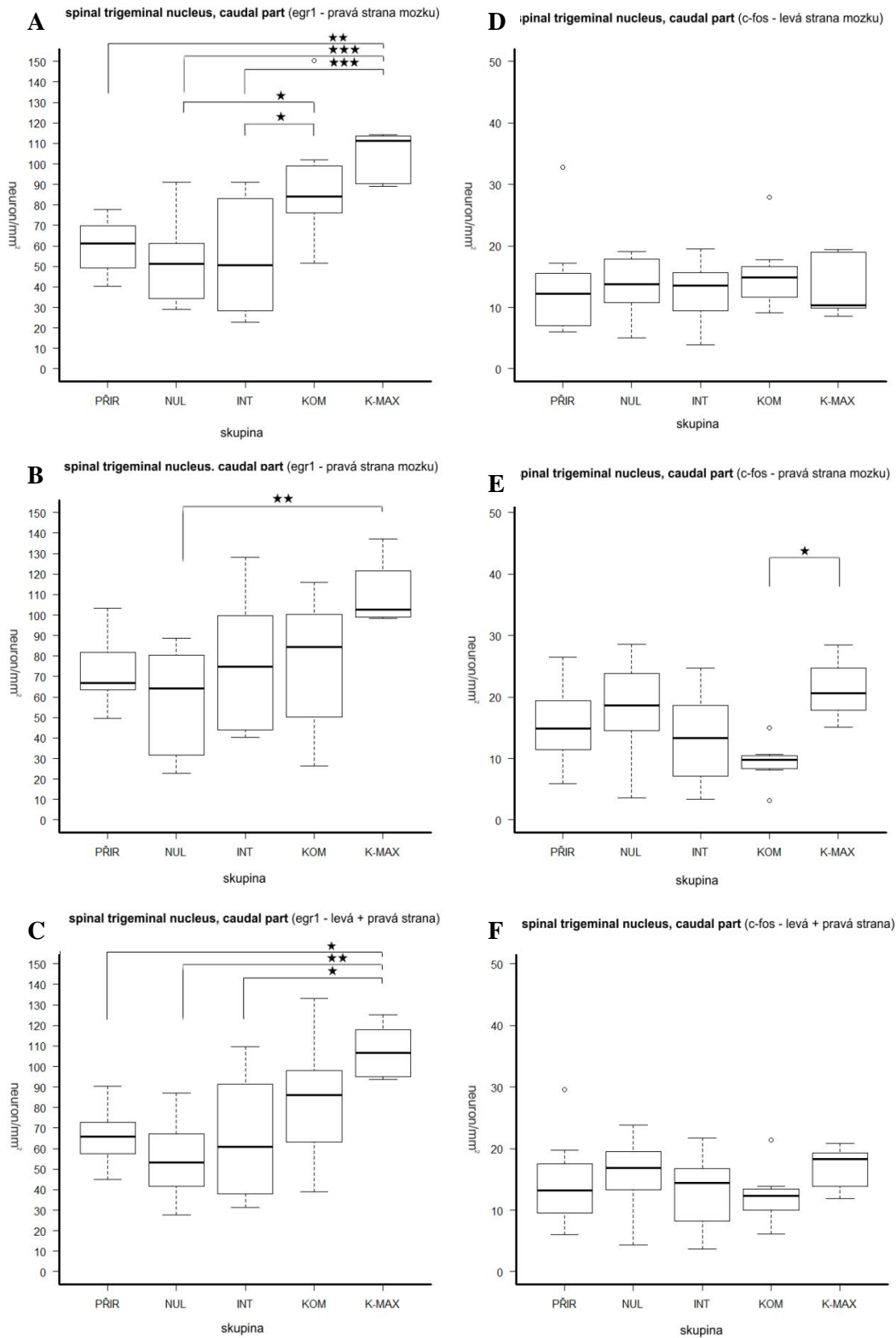
Obrázek 2. Spinal trigeminal nucleus, oral part (Sp50) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - pole, jehož intenzita se měnila každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 50 \text{ a} \mu\text{T} - 50 \text{ nT}$; K-MAX - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 250 \text{ a} \mu\text{T} - 250 \text{ nT}$; kódy signifikance: $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05$



Obrázek 3 Spinal trigeminal nucleus, interpolar part (Sp5I) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: P-IR - pirozené pole; NUL - nulové pole; INT - pole, jehož intenzita se měnila každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se mění v rozsahu B = 50 až -50 T; K-MAX - mag. pole komplexní se mění v rozsahu B = 250 až -250 T; kódy signifikance: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05



Obrazek . 4 Spinal trigeminal nucleus, caudal part (Sp5C) - po et imunopozitivních neuron u zví at vystavených r zným magnetickým podmínkám

A-C: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem Egr1 (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); D-F: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem c-Fos (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); Zkratky: P-IR - p irožené pole; NUL - nulové pole; INT - pole, jehož intenzita se m nila každé 2s; KOM - mag. pole komplexn se m níčí v rozsahu B = 50 ařl-50 T; K-MAX - mag. pole komplexn se m níčí v rozsahu B = 250 ařl-250 T; kódy significance: 0 <***<0.001 <*<0.01 <*<0.05

3.3 Hipokampo-entorhinální systém

V rámci hipokampo-entorhinálního systému byly signifikantní rozdíly exprese aktivitních marker mezi skupinami zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám nalezeny ve strukturách: cornu Ammonis 1 (CA1), ventral subiculum (Sv), medial entorhinal cortex (MEnt) a lateral entorhinal cortex (LEnt).

Cornu Ammonis 1 (CA1). Magnetické podmínky měly signifikantní vliv na expresi Egr1 v oblasti CA1 (ANOVA: L - $p=0,009$; P - $p=0,015$; LP - $0,010$). U zvířat vystavených magnetickému poli komplexně se měnícím v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) byl zjištěn statisticky významný pokles exprese Egr1 ve srovnání s tímto zvířat vystavených přirozenému poli (PIR) (Tukey post hoc test: L - $p=0,006$; P - $p=0,008$; LP - $p=0,006$) a poli nulovému (NUL) (Tukey post hoc test: L - $p=0,024$; P - $p=0,035$; LP - $p=0,026$). Rozptýlením imunopozitivních neuronů byl neobvykle vysoký u zvířat vystavených magnetickým stimulům INT a KOM, neodlišoval se proto signifikantně od těchto u kontrolní skupiny vystavené přirozenému poli. (viz Obr. 5, příloha Tab.S13-S15). Magnetické podmínky během experimentu neovlivnily signifikantně expresi transkripčního faktoru c-Fos (viz Obr.5, Tab. . 8).

Tabulka . 8

CA1 - výsledky analýzy variance pro jednotlivé imunopozitivní neurony

struktura/marker	dataset	F	p
CA1/Egr1	L	3,997	0,009
CA1/Egr1	P	3,612	0,015
CA1/Egr1	LP	3,920	0,010
CA1/c-Fos	L	0,819	0,522
CA1/c-Fos	P	0,843	0,508
CA1/c-Fos	LP	0,888	0,481

Ventral subiculum (Sv). V této struktuře byl pozorován obecný trend k nižší expresi aktivitních markerů u zvířat vystavených nulovému i proměnlivým polím ve srovnání s tímto zvířat vystavených přirozenému poli. Nejvýraznější změny byly pozorovatelné u zvířat vystavených nulovému magnetickému poli (NUL), kde došlo k signifikantnímu poklesu exprese obou použitých aktivitních markerů v levé části mozku (viz Obr. . 6, příloha Tab. S15-S17). Data zprůměrovaná pro levou a pravou stranu mozku dosahovala statisticky významného poklesu u Egr1 v porovnání s imunopozitivními neurony u zvířat vystavených nulovému (NUL) a oběma komplexně se měnícím magnetickým polím (KOM, K-MAX).

Tabulka . 9

Sv - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
Sv/Egr1	L	3,699	0,013
Sv/Egr1	P	1,968	0,122
Sv/Egr1	LP	3,534	0,016
Sv/c-Fos	L	3,550	0,016
Sv/c-Fos	P	1,227	0,318
Sv/c-Fos	LP	2,482	0,062

Medial entorhinal cortex (MEnt). Stejn jako u předchozí struktury i zde byl pozorován obecný trend k nižší expresi aktivních marker u zvíat vystavených nulovému i proměnlivým polím. U zvíat vystavených magnetickému poli komplexní se měnícímu v rozsahu B = 250 až -250 T (K-MAX) (Tukey post hoc test: $p=0,033$) a magnetickému poli se změnou intenzity každé 2s; (INT) (Tukey post hoc test: $p=0,020$) došlo k významnému poklesu exprese transkripčního faktoru Egr1 na levé straně mozku ve srovnání s kontrolními zvíaty vystavenými přirozenému magnetickému poli (P IR). Zajímavá je také nesignifikantní změna exprese markeru Egr1 u zvíat vystavených nulovému poli (NUL), kde změna aktivace neuronů MEnt dosahovala značné individuálních rozdílů projevující se velkým rozptylem naměřených hodnot (viz Obr. . 7). Počet c-Fos imunopozitivních neuronů se významně lišil v pravé straně mozku (ANOVA: $p=0,019$), u zvíat vystavených nulovému poli (NUL) (Tukey post hoc test: $p=0,017$) a poli komplexní se měnícímu v rozsahu B = 50 až -50 T (KOM) (Tukey post hoc test: $p=0,029$) byl významně nižší nežli u kontrolních zvíat.

Tabulka . 10

MEnt - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
MEnt/Egr1	L	3,992	0,010
MEnt/Egr1	P	1,088	0,380
MEnt/Egr1	LP	2,839	0,042
MEnt/c-Fos	L	1,017	0,414
MEnt/c-Fos	P	3,438	0,019
MEnt/c-Fos	LP	2,552	0,059

Lateral entorhinal cortex (LEnt). Tato struktura vykazovala podobnou změnu exprese obou markerů jako Sv a MEnt (viz příloha Tab. . S15 - S24). V pravé i levé části mozku se počet imunopozitivních neuronů pro Egr1 významně lišil u zvíat vystavených magnetickému poli komplexní se měnícímu v rozsahu B = 250 až -250 T (K-MAX) od

zví at vystavených kontrolnímu p írozenému magnetickému poli (P IR) (Tukey post hoc test viz p íloha, Tab .S21, S22). Statisticky významný rozdíl po tu imunopozitivních neuron by zji-t n také v pravé ásti mozku (ANOVA: $p=0,019$) u zví at vystavených nulovému magnetickému poli (NUL) oproti hodnotám nam eným u zví at vystavených magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 250$ a -250 T (K-MAX). Stejný vzor exprese jsem zaznamenala u dat zpr m rovaných pro levou a pravou stranu mozku (Tukey post hoc test viz p íloha, Tab. S23). Exprese c-Fos dosáhla statisticky významných rozdíl pouze na pravé stran mozku (ANOVA: $p=0,013$), kde byl zji-t n signifikantní rozdíl po tu imunopozitivních neuron mezi zví aty vystavenými magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 50$ a -50 T (KOM) a zví aty vystavenými magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 250$ a -250 T (K-MAX) (Tukey post hoc test: $p=0,045$). Statisticky významný rozdíl exprese c-Fos byl zji-t n také mezi zví aty vystavenými magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 50$ a -50 T (KOM) a zví aty vystavenými p írozenému magnetickému poli (P IR) (Tukey post hoc test: $p=0,038$). Tyto rozdíly nabývají signifikantních hodnot, ale výskyt odlehých hodnot snižuje váhu t chto statistických výsledk .

Tabulka . 11

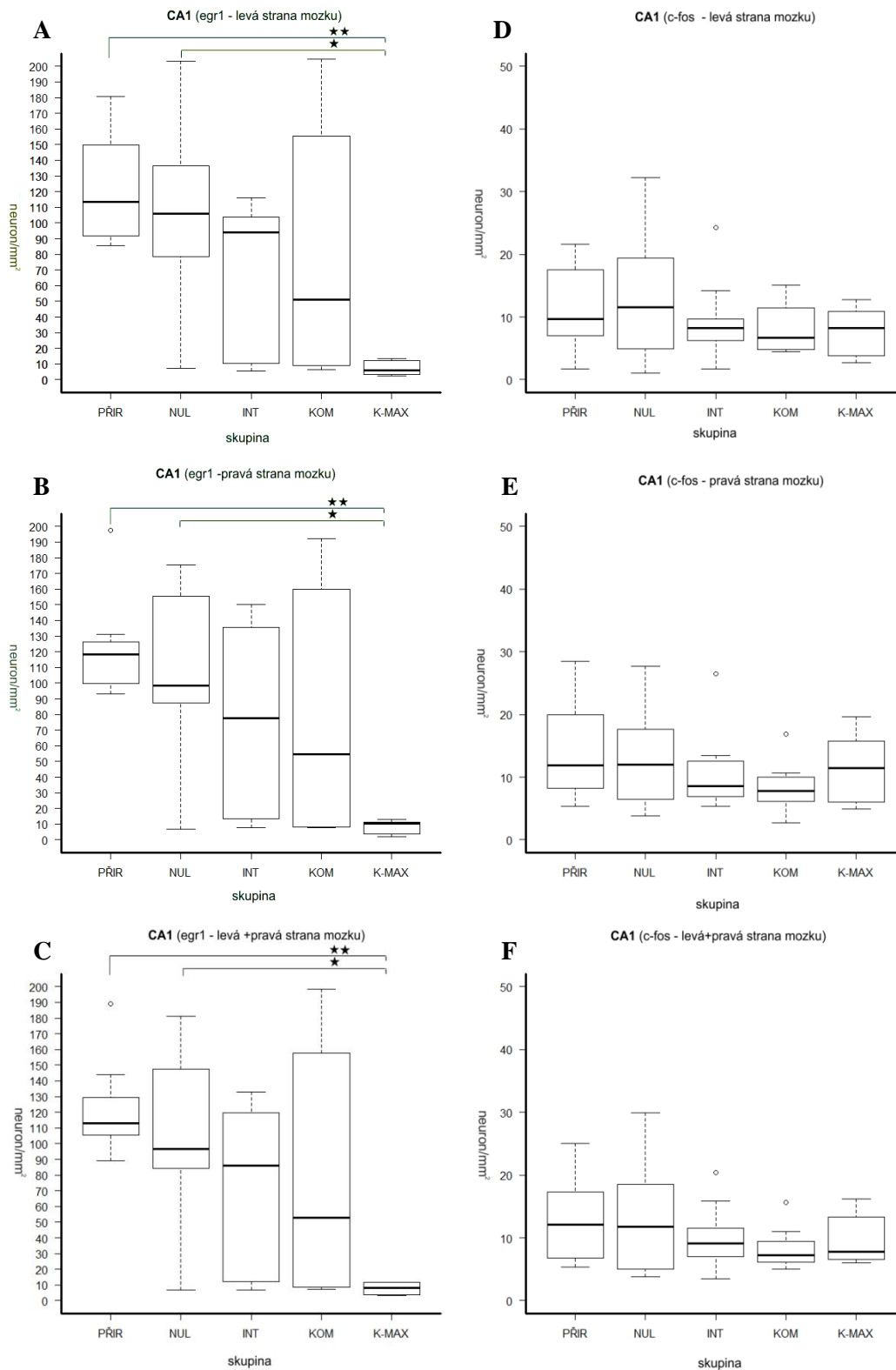
MEnt - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
LEnt/Egr1	L	3,905	0,011
LEnt/Egr1	P	3,459	0,019
LEnt/Egr1	LP	4,399	0,007
LEnt/c-Fos	L	0,837	0,512
LEnt/c-Fos	P	3,805	0,013
LEnt/c-Fos	LP	1,673	0,182

Cornu Ammonis (CA3), dentate gyrus - granular layer (GrDG), dorsal subiculum (Sd).

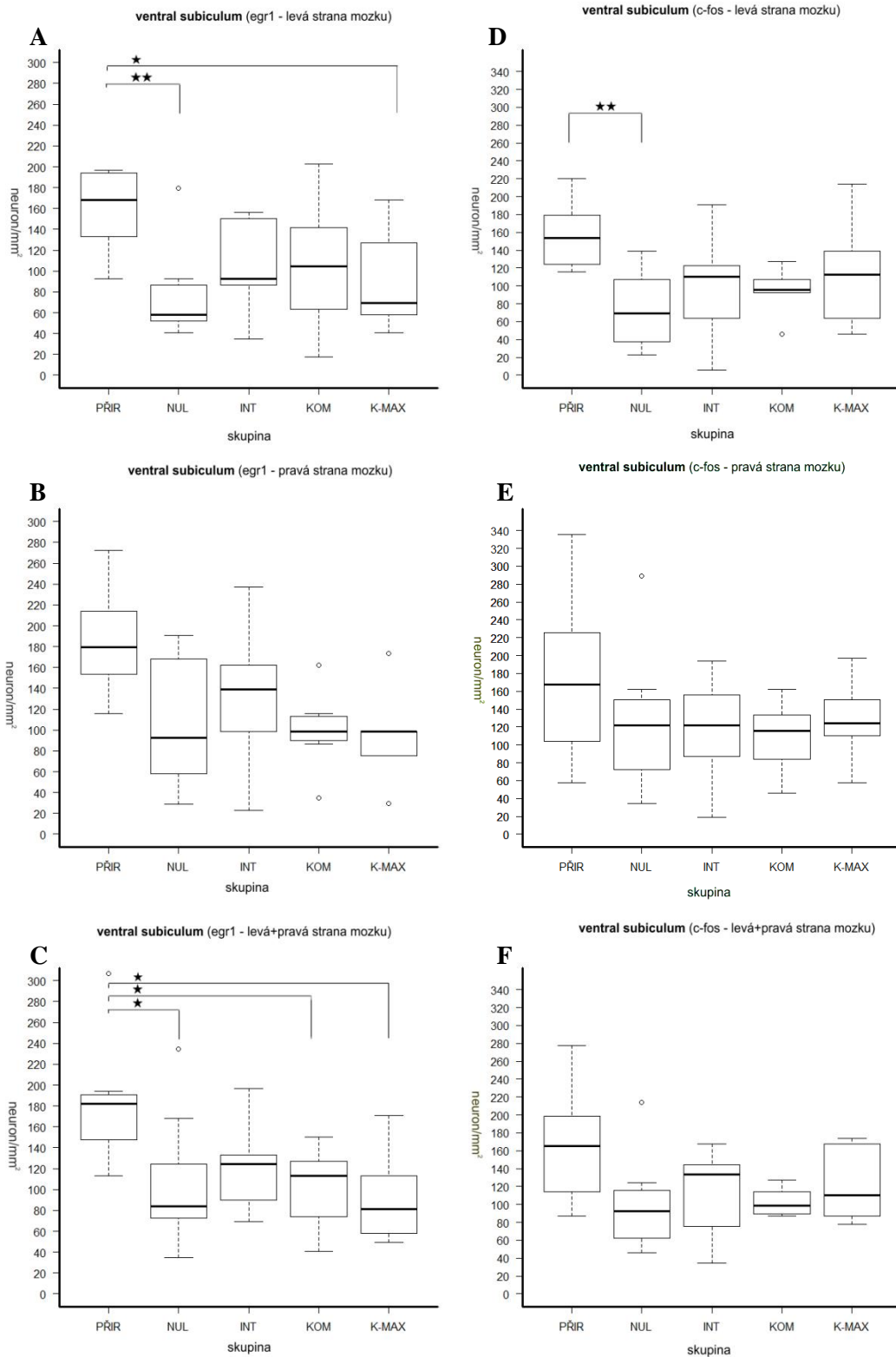
U t chto analyzovaných struktur nebyly zji-t ny fládné signifikantní zm ny exprese poufítých marker .

Dentate gyrus - polymorph layer (PoDG). Data nebyla zahrnuta do statistické analýzy z d vodu nízkého po tu imunopozitivních neuron ve struktu e.



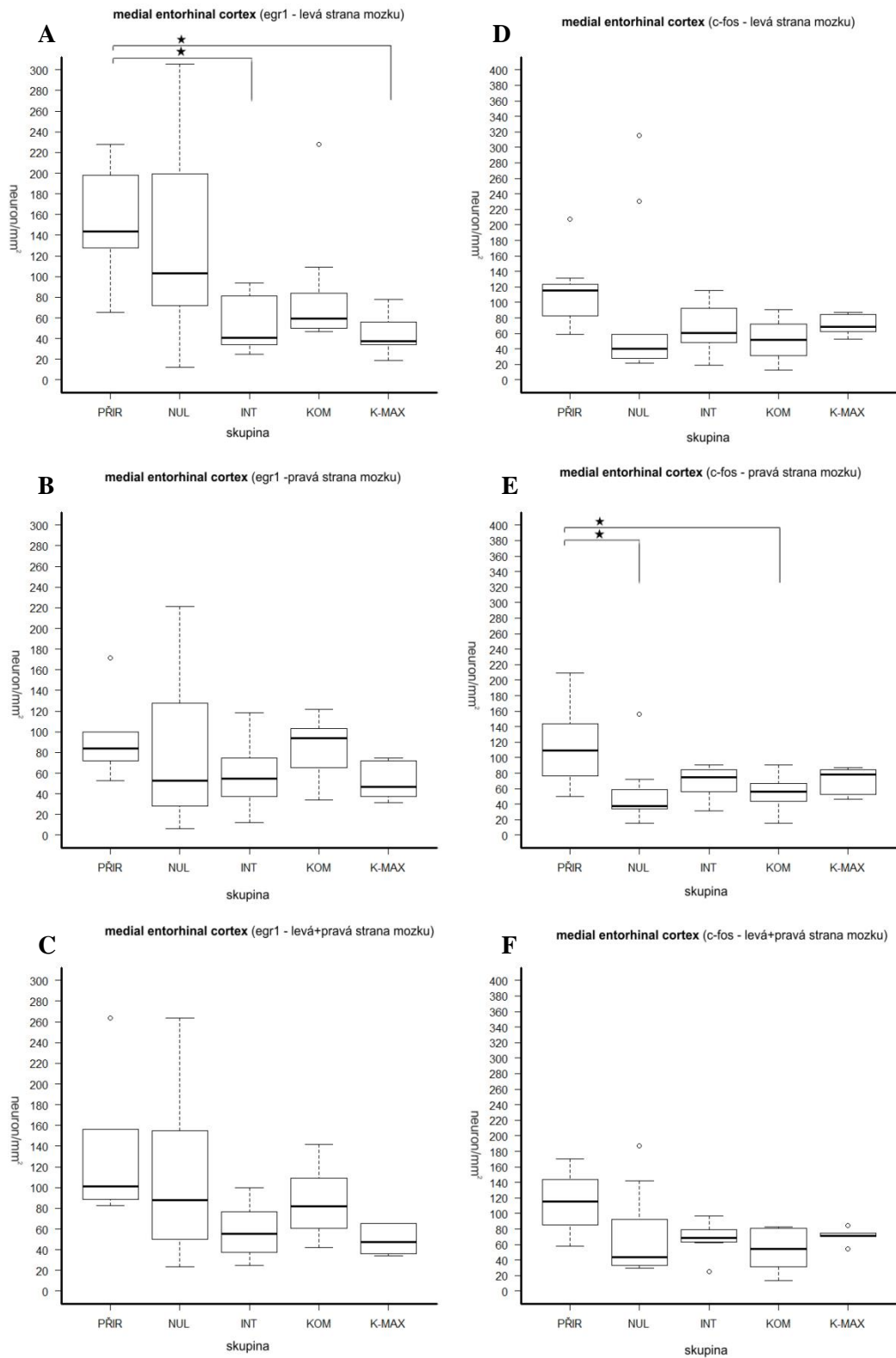
Obrázek 5. Cornu Ammonis (CA1) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - olovo, jehož intenzita se mění každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se mění v rozsahu B = 50 až -50 T; K-MAX - mag. pole komplexní se mění v rozsahu B = 250 až -250 T; kódy significance: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05



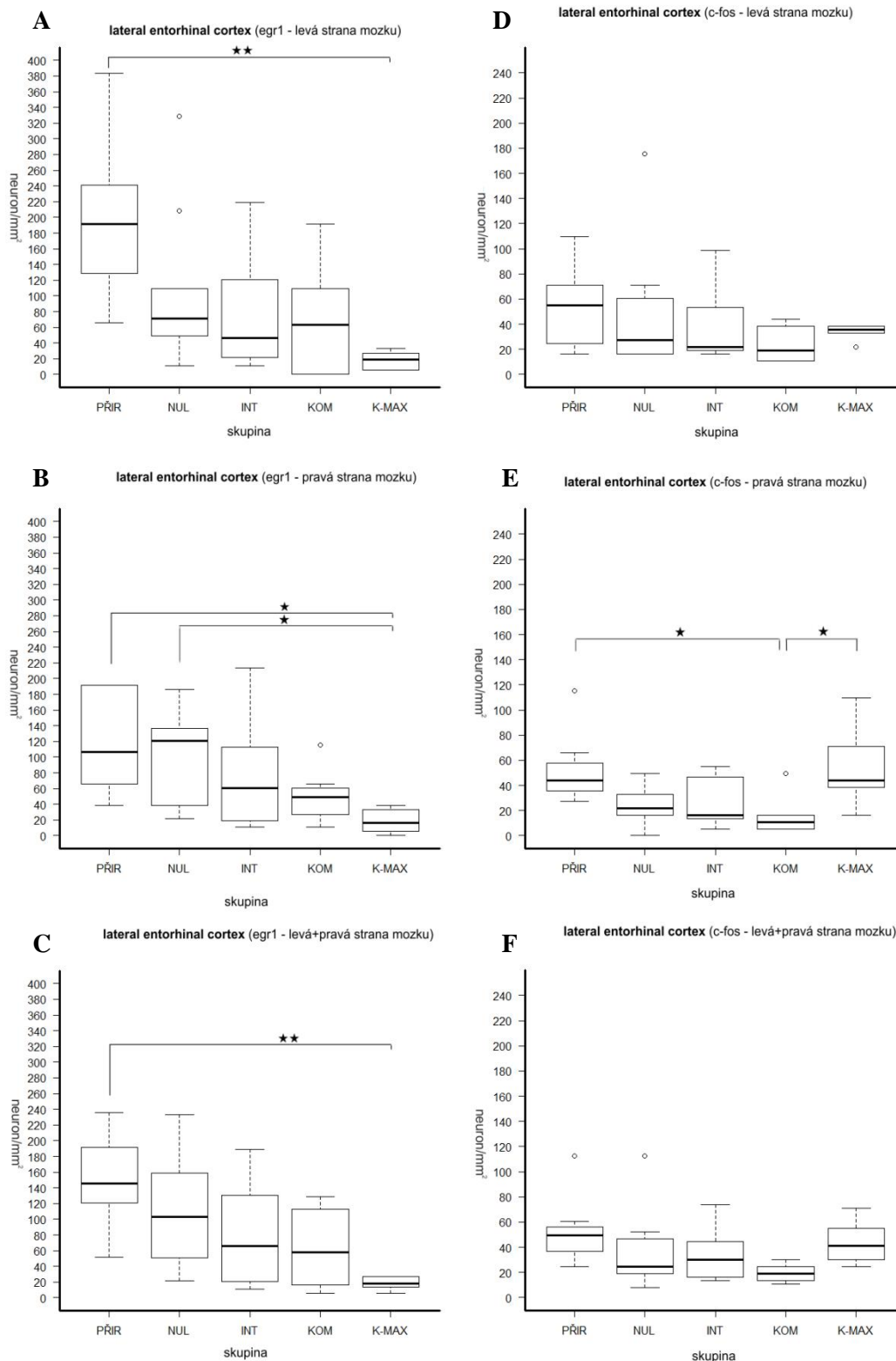
Obrázek . 6 Ventral subiculum (Sv) - po et imunopozitivních neuron u zví at vystavených r zným magnetickým podmínkám

A-C: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem Egr1 (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); D-F: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem c-Fos (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); Zkratky: P IR - p irožené pole; NUL - nulové pole; INT ó pole, jehož intenzita se m nila kařdř 2s; KOM - mag. pole komplexn se m níci v rozsahu B = 50 ařl-50 T; K-MAX - mag. pole komplexn se m níci v rozsahu B = 250 ařl-250 T; kódy significance: 0 <***<0.001 <*<0.01 <*<0.05



Obrázek 7 Medial entorhinal cortex (MEnt) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: PŘIR - prázdné pole; NUL - nulové pole; INT - intenzivní pole; KOM - komplexní pole; K-MAX - maximální pole; kódy significance: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05



Obrázek 8 Lateral entorhinal cortex (LEnt) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměr obou hodnot); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměr obou hodnot); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - intenzivní pole, jehož intenzita se měnila každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se měnící v rozsahu $B = 50 \text{ a} \mu\text{T} - 50 \text{ T}$; K-MAX - mag. pole komplexní se měnící v rozsahu $B = 250 \text{ a} \mu\text{T} - 250 \text{ T}$; kódy signifikance: $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05$

3.4 Zrakový systém

Signifikantní změny exprese použitých aktivních marker mezi jednotlivými experimentálními skupinami byly pozorovány v následujících strukturách: dorsal lateral geniculate, ventral lateral geniculate, zonal layer a superficial gray layer of superior colliculus. Změny exprese na hranici prokazatelnosti byly detekovány v optic nuclear layer of superior colliculus.

Dorsal lateral geniculate (DLG). Signifikantní rozdílné změny exprese byly zjištěny pouze u transkripčního faktoru c-Fos (ANOVA: L - $p=0,024$; R - $p=0,033$; LR - $p=0,011$). Statisticky významný byl rozdíl v počtu imunopozitivních neuronů v levé části mozku u zvířat vystavených magnetickému poli komplexní směrnici v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) (Tukey post hoc test: $p=0,033$) a magnetickému poli se změnou intenzity každé 2s (INT) (Tukey post hoc test: $p=0,032$), v obou případech byla exprese signifikantně nižší než u zvířat vystavených přirozenému magnetickému poli (P-IR). Tyto rozdíly se signifikantně projeví u dat zprůměrovaných pro levou a pravou stranu, kde byl navíc zjištěn statisticky významný rozdíl mezi počtem imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených magnetickému poli komplexní směrnici v rozsahu $B = 50$ až -50 T (KOM) a u zvířat vystavených přirozenému magnetickému poli (P-IR) (Tukey post hoc test: $p=0,039$).

Tabulka 12
DLG - výsledky analýzy variance pro počet imunopozitivních neuronů

struktura/marker	dataset	F	p
DLG/Egr1	L	1,177	0,338
DLG/Egr1	P	0,665	0,621
DLG/Egr1	LP	1,033	0,404
DLG/c-Fos	L	3,213	0,024
DLG/c-Fos	P	2,977	0,033
DLG/c-Fos	LP	3,84	0,011

Ventral lateral geniculate (VLG). Statisticky významný rozdíl v expresi c-Fos byl pozorován na pravé straně mozku (ANOVA: $p=0,009$) u zvířat vystavených magnetickému poli komplexní směrnici v rozsahu $B = 50$ až -50 T (KOM), kde došlo k poklesu počtu imunopozitivních neuronů oproti hodnotám u zvířat vystavených přirozenému poli (P-IR) (Tukey post hoc test: $p=0,008$). Tento signifikantní rozdíl byl patrný také v datech

zprůměrovaných pro levou a pravou stranu (ANOVA: $p=0,027$; Tukey post hoc test: $p=0,015$). Expres Egr1 nedosahovala statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými experimentálními skupinami.

Tabulka . 13

VLG - výsledky analýzy variance pro počet imunopozitivních neuronů

struktura/marker	dataset	F	p
VLG/Egr1	L	1,103	0,371
VLG/Egr1	P	1,216	0,323
VLG/Egr1	LP	1,165	0,344
VLG/c-Fos	L	1,884	0,136
VLG/c-Fos	P	3,985	0,009
VLG/c-Fos	LP	3,129	0,027

Superior colliculus - superficial gray layer (SCSuG). Signifikantní změny exprese byly zjištěny u obou markerů. V případě Egr1 byla statisticky významná změna exprese detekována na pravé straně mozku (ANOVA: $p=0,017$) a u dat zprůměrovaných pro levou a pravou stranu (ANOVA: $p=0,028$). V případě c-Fos byly změny signifikantní na obou stranách mozku (ANOVA: L - $p=0,0012$; P - $p=0,011$; LP - $p=0,008$).

Statisticky významný rozdíl exprese Egr1 byl pozorován mezi zvířaty vystavenými magnetickému poli komplexně se měnícím v rozsahu $B = 50$ až -50 T (KOM) a zvířaty vystavenými magnetickému poli komplexně se měnícím v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) (Tukey post hoc test: P - $p=0,009$; LP - $p=0,020$). Expres markeru c-Fos vykazuje sestupnou tendenci od přirozeného pole, přes pole nulové k polím proměnným (viz Obr. . 11). Statisticky významný rozdíl počtu c-Fos imunopozitivních neuronů byl zjištěn u zvířat vystavených magnetickému poli komplexně se měnícím v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) a u zvířat vystavených komplexně se měnícím v rozsahu $B = 50$ až -50 T (KOM), v obou případech došlo k výraznému poklesu exprese ve srovnání s hodnotami u zvířat vystavených přirozenému magnetickému poli (PIR) (Tukey post hoc test viz příloha Tab. . S32 - S34).

Tabulka . 14

SCSuG - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
SCSuG/Egr1	L	1,622	0,191
SCSuG/Egr1	P	3,479	0,017
SCSuG/Egr1	LP	3,115	0,028
SCSuG/c-Fos	L	3,815	0,012
SCSuG/c-Fos	P	3,824	0,011
SCSuG/c-Fos	LP	4,149	0,008

Superior colliculus - zonal layer (SCZo). Magnetické podmínky nemly signifikantní vliv na expresi transkripčního faktoru Egr-1. Expres faktorů c-Fos se signifikantně lišila mezi skupinami vystavenými různým magnetickým polím na levé straně stran mozku ($p=0,033$) a v datech zprůměrovaných pro levou a pravou stranu ($p=0,029$). V obou případech došlo k signifikantnímu poklesu c-Fos imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených magnetickému poli komplexně směrnému v rozsahu $B = 250$ až -250 T (K-MAX) ve srovnání s hodnotami u zvířat vystavených přirozenému magnetickému poli (P IR) (Tukey post hoc test: L - $p= 0,030$; LP - $p=0,026$). Z grafických porovnání je patrný podobný trend exprese, jaký byl zaznamenán v ScSuG.

Tabulka . 15

SCZo - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
SCZo/Egr1	L	2,076	0,106
SCZo/Egr1	P	1,450	0,239
SCZo/Egr1	LP	1,478	0,231
SCZo/c-Fos	L	2,973	0,033
SCZo/c-Fos	P	2,062	0,108
SCZo/c-Fos	LP	3,083	0,029

Superior colliculus - optic nuclear layer (SCOp). V této vrstvě nebyly zaznamenány signifikantní změny exprese aktivních markerů. Je však třeba říci, že trendy v expresi c-Fos byly na levé i pravé straně mozku na hranici statistické významnosti (ANOVA: L - $p=0,052$; P - $p=0,052$; LP - $p=0,059$).

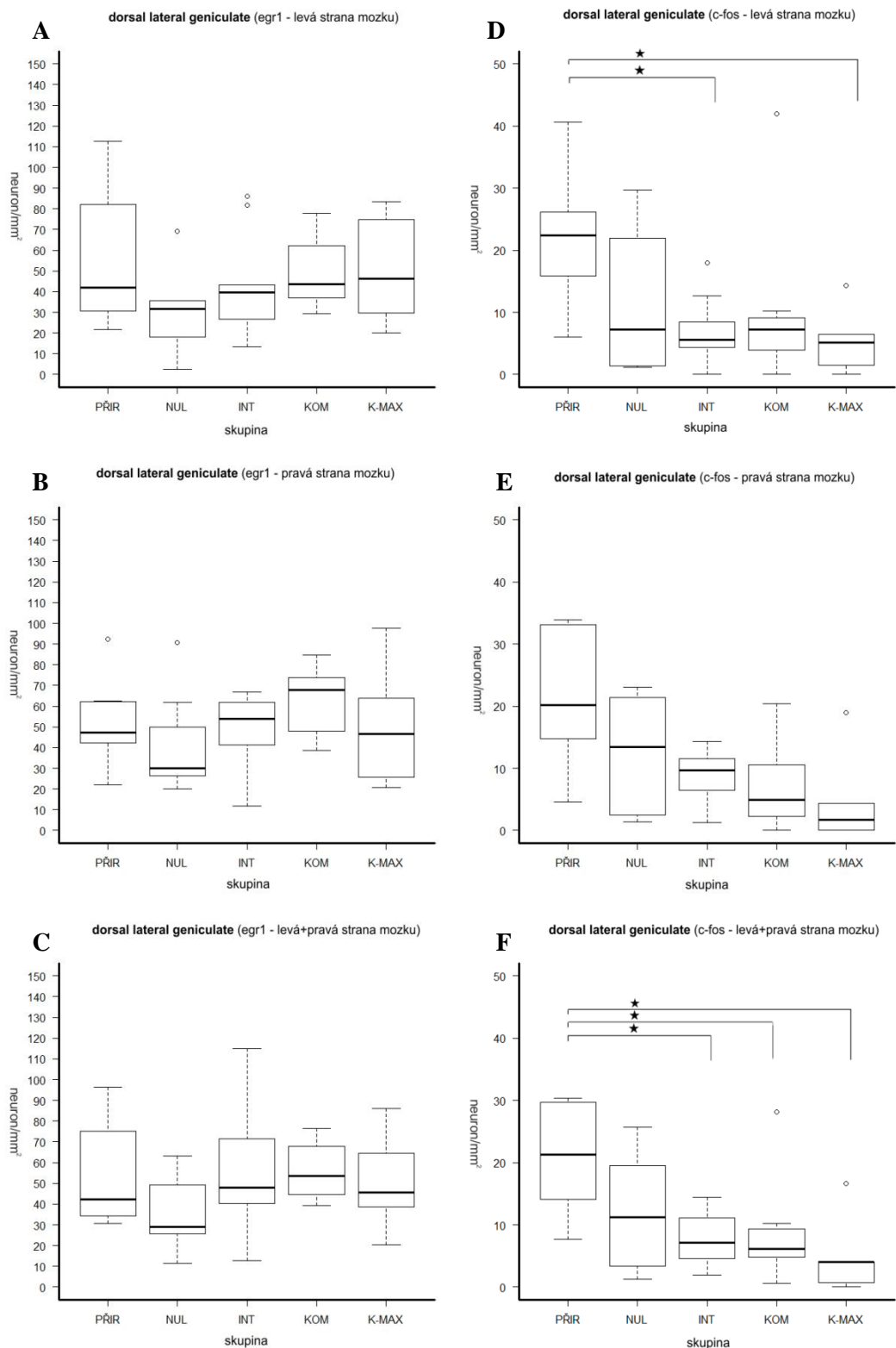
Tabulka . 16

SCOp - výsledky analýzy variance pro po et imunopozitivních neuron

struktura/marker	dataset	F	p
SCOp/Egr1	L	2,078	0,105
SCOp/Egr1	P	1,157	0,347
SCOp/Egr1	LP	1,316	0,284
SCOp/c-Fos	L	2,615	0,052
SCOp/c-Fos	P	2,625	0,052
SCOp/c-Fos	LP	2,522	0,059

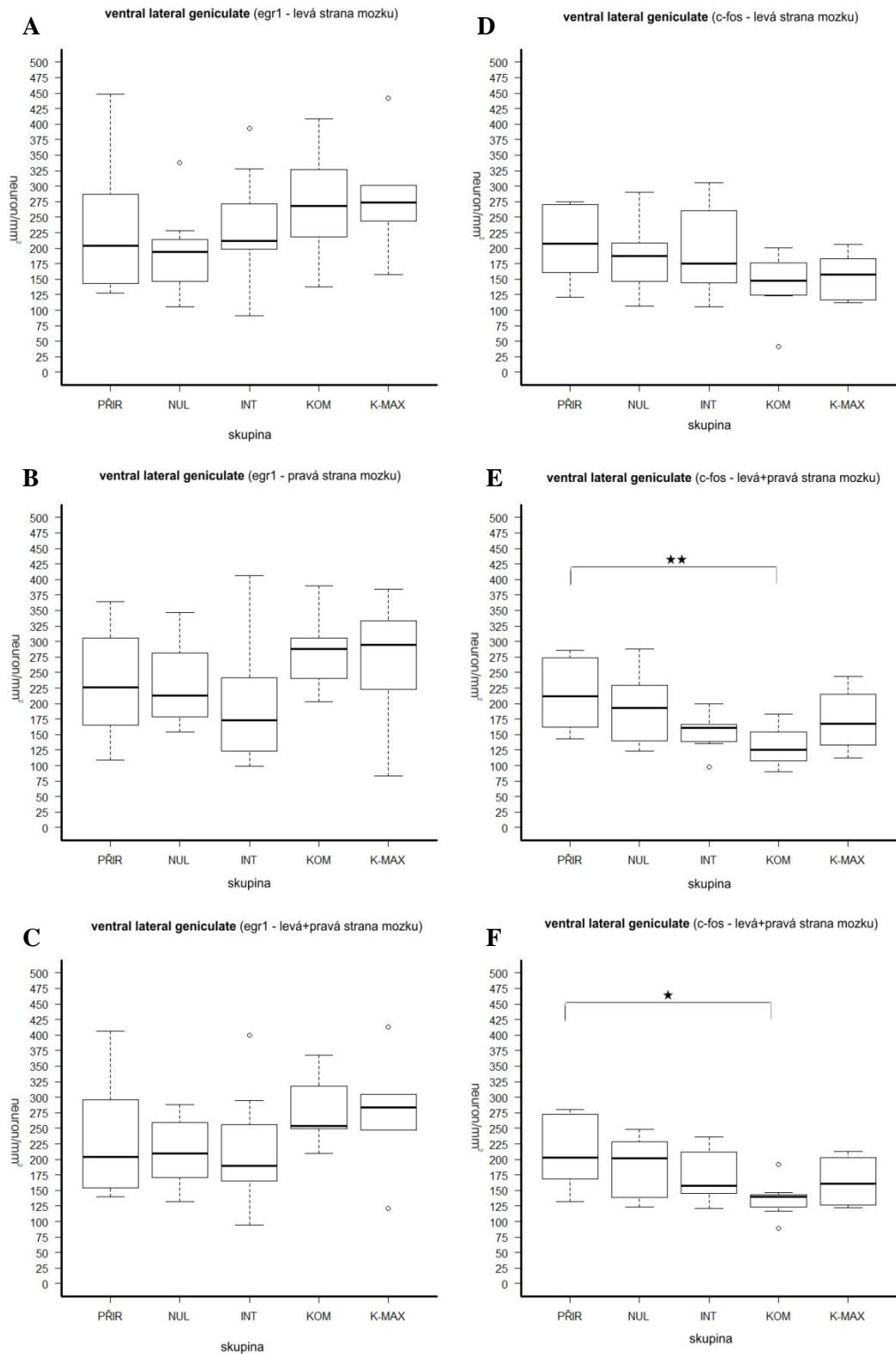
Primary visual cortex (VI), secondary visual cortex - lateral area (V2L). U t chto analyzovaných struktur nebyly zji-t ny fládné signifikantní zm ny exprese aktivitních marker ani viditelné trendy t sn za hranicí signifikance ($p=0,05-0,1$).

Secondary visual cortex, mediomedial area (V2MM). Data nebyla zahrnuta do statistické analýzy z dvodu nízkého po tu imunopozitivních neuron ve struktu e.



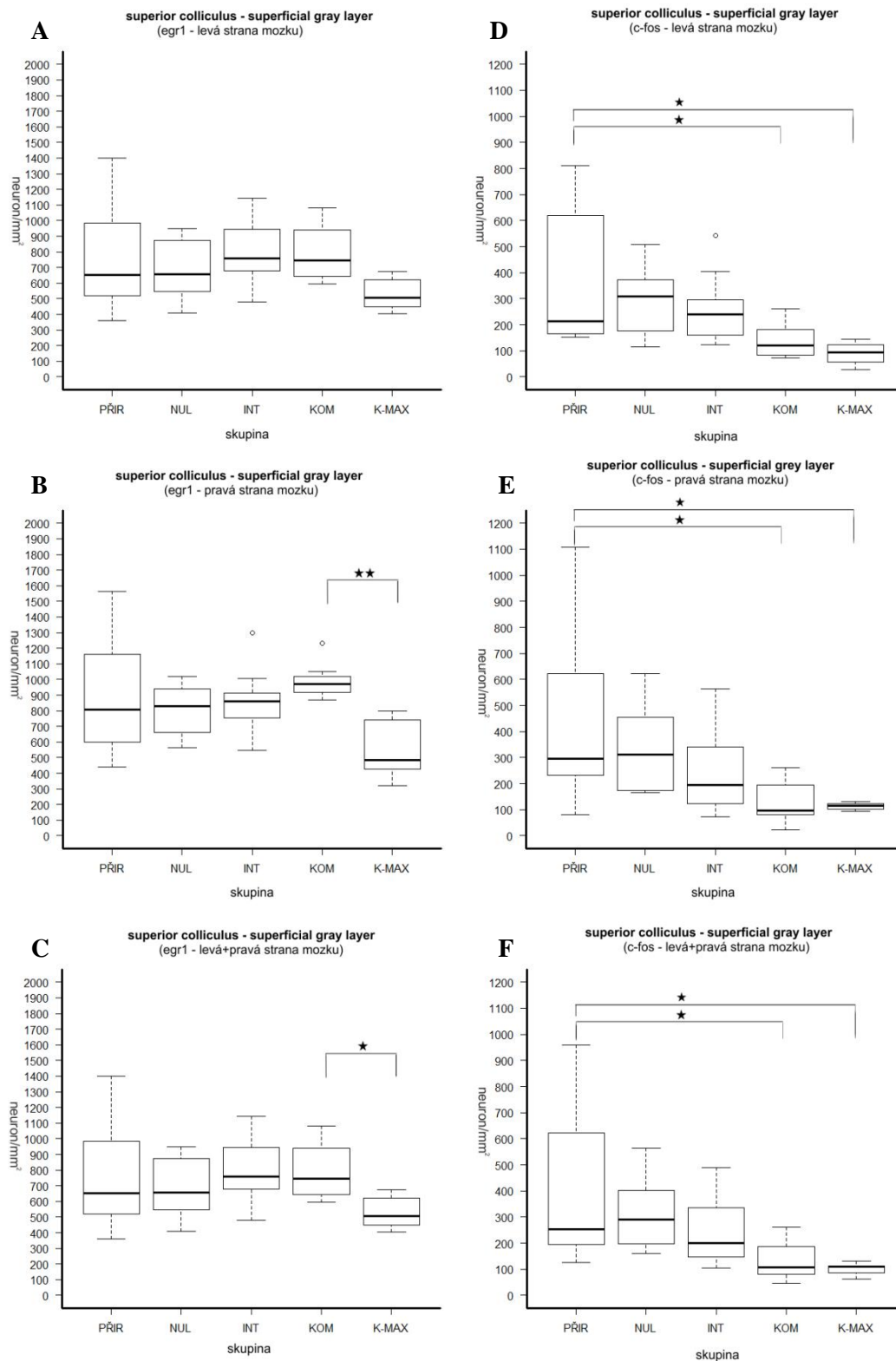
Obrázek . 9 Dorsal lateral geniculate (DLG) - počet imunopozitivních neuronů u zvířat vystavených různým magnetickým podmínkám

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměr obou hodnot); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměr obou hodnot); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - o pole, jehož intenzita se měnila každé 2s; KOM - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 50 \text{ a} \mu\text{T} - 50 \text{ T}$; K-MAX - mag. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 250 \text{ a} \mu\text{T} - 250 \text{ T}$; kódy signifikance: $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05$



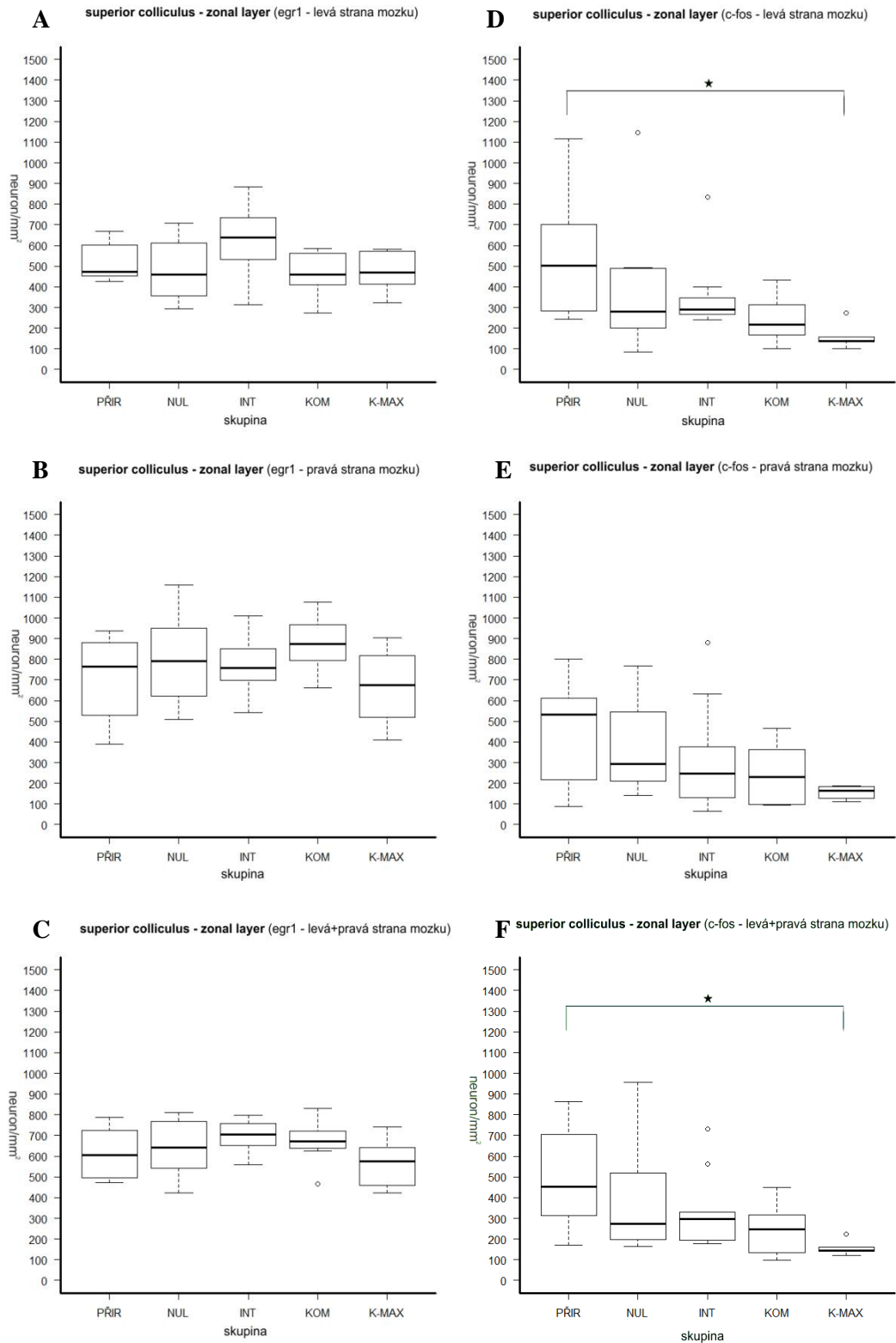
Obrázek . 10 Ventral lateral geniculate (VLG) - po et imunopozitivních neuron u zví at vystavených r zným magnetickým podmínkám

A-C: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem Egr1 (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); D-F: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem c-Fos (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); Zkratky: P IR - p irozené pole; NUL - nulové pole; INT ó pole, jehořl intenzita se m nila kařdē 2s; KOM - mag. pole komplexn se m nící v rozsahu B = 50 ařl -50 T; K-MAX - mag. pole komplexn se m nící v rozsahu B = 250 ařl -250 T; kódy signifikance: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05



Obrázek . 11 Superior colliculus -superficial gray layer (SCSuG) - po et imunopozitivních neuron u zví at vystavených r zným magnetickým podmínkám

A-C: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem Egr1 (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); D-F: po et imunopozitivních neuron detekovaných markerem c-Fos (shora dol : pravá, levá strana a pr m r obou hodnot); Zkratky: P IR - p irozené pole; NUL - nulové pole; INT ó pole, jehoř intenzita se m nila kařdē 2s; KOM - mag. pole komplexn se m nící v rozsahu B = 50 ařl-50 T; K-MAX - mag. pole komplexn se m nící v rozsahu B = 250 ařl-250 T; kódy signifikance: 0 <***<0.001 <*<0.01 <*<0.05



Obrázek 12 Superior colliculus - zonal layer (SCZo) - počet imunopozitivních neuronů v závislosti na vystavených různých magnetických podmínkách

A-C: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem Egr1 (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); D-F: počet imunopozitivních neuronů detekovaných markerem c-Fos (shora dolů: pravá, levá strana a průměrná hodnota); Zkratky: PŘIR - přirozené pole; NUL - nulové pole; INT - intenzivní pole, jehož intenzita se mění každé 2s; KOM - magnet. pole komplexní se K-MAX - magnet. pole komplexní se mění v rozsahu $B = 250 \text{ a} \pm 250 \text{ T}$; kódy signifikance: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05

3.5 Shrnutí výsledk

Nam ená data p inesla statisticky významné rozdílly exprese marker Egr1 a c-Fos mezi experimentálními skupinami zví at. Každý systém obsahoval struktury, ve kterých byla nalezena signifikantní zm na exprese jako reakce na zm n né magnetické pole. Zde je shrnutí nejzajímav j-ích výsledk studie:

Vestibulární systém:

Superior vestibular nucleus (SuVe) - nár st exprese Egr1 u zví at vystavených p sobení magnetického pole komplexn se m níčího v rozsahu $B = 250$ afl -250 T (K-MAX).

Trigeminální systém:

Spinal trigeminal nucleus (Sp5) - v v-ech 3 podjádrech byl pozorován podobný vzor exprese Egr1, tj. nár st exprese hlavn u zví at vystavených p sobení magnetického pole komplexn se m níčího v rozsahu $B = 250$ afl -250 T (K-MAX). Tyto zm ny dosahovaly vysoce signifikantních hodnot hlavn u Sp5O a Sp5C.

Hipokampo-entorhinální systém:

Cornu Ammonis (CA1) - byl zji-t n velký pokles exprese markeru Egr1 u zví at vystavených magnetickému poli komplexn se m nícímu v rozsahu $B = 250$ afl -250 T (K-MAX)

Lateral + medial entorhinal cortex (LEnt + MEnt) - byl pozorován podobný vzor poklesu exprese markeru Egr1 jako u CA1.

Ventral subiculum (Sv) - pokles exprese Egr1 u v-ech experimentálních skupin oproti skupin kontrolní s p irozeným magnetickým polem, av-ak signifikantn pouze u skupiny s nulovým polem

Zrakový systém:

Superior colliculus - ve vrstvách ScSuG a SCZo byl patrný podobný pokles exprese markeru c-Fos jako reakce na magnetické pole komplexn se m níčí v

rozsahu B = 250 afl -250 T(K-MAX), celkový pattern podobný jako u dat markeru Egr1 ve výše zmíněných strukturách hipokampo-entorhinálního systému.

Dorsal + ventral lateral geniculate (DLG + VLG) - v DLG došlo k poklesu exprese c-Fos u zvířat vystavených magnetickému poli se změnou intenzity každé 2s (INT), podobně jako u stimulu komplexního magnetického pole v rozsahu B = 250 afl -250 T (K-MAX), ve VLG došlo k poklesu exprese u zvířat vystavených komplexnímu magnetickému poli v rozsahu B = 50 afl -50 T (KOM).

4. Diskuse

B hem n kolika posledních dekád bylo jednozna n experimentáln prokázáno, že mnoho druh živo ich je schopno vnímat magnetické pole a pouívat jeho parametry k prostorové orientaci a navigaci. Biofyzikální podstata transdukce magnetické informace v elektrický signál z stává nejasná (Wiltschko a Wiltschko 1995, 2005), neurální substrát magnetického smyslu není jasn definován a magnetoreceptory nebyly dosud p esn lokalizovány (Eder a kol. 2012; Ritz a kol. 2010; Winklhofer a Kirschvink 2010; Wiltschko a kol. 2010).

V této práci jsem analyzovala ty i funk ní systémy centrální nervové soustavy, jejichž zapojení do zpracování magnetické informace nazna ují recentní studie zabývající se touto tematikou (nap . Burger a kol. 2010; N mec a kol. 2005; Wiltschko a Wiltschko 2005; Wu a Dickman 2011, 2012). Výsledky t chto studií ukazují na možné zapojení vestibulárního (Wu a Dickman 2011), trigeminálního (Beason a Semm 1996; Mora a kol. 2008; Semm a Beason 1990; Walker a kol. 1997) a zrakového systému (Heyers a kol. 2007; Liedvogel a kol. 2007; Semm a kol. 1984; Semm a Demaine 1986; Mouritsen a kol. 2004a, 2005; Zapka a kol. 2009) do ítí magnetického pole. Vestibulární systém se m fle rovn fl i alternativn podílet na integraci magnetické a gravita ní informace, což je nutný p edpoklad pro spolehlivé ur ení inklinace magnetického pole (Semm a kol. 1984; Wu a Dickman 2012). Studie popisující magnetoresponzivní neurony v hipokampo-entorhinálního systému (Burger a kol. 2010; Shimizu a kol. 2004; Vargas a kol. 2006) siln nazna ují, že na úrovni tohoto systému je magnetická informace integrována s motorickou a senzoricou informací z ostatních modalit do obecné reprezentace prostoru, tzv. kognitivní mapy (O'Keefe and Nadel 1978). Tyto p edpoklady jsem se pokusila experimentáln testovat u my-í ibredního kmene C57BL/6J. S pouíitím detekce indukovatelných transkrip ních faktor (ITFs), aktivních marker c-Fos a Egr1, jsem studovala vliv zm ny magnetického pole na aktivaci neuronálních populací. P edložená práce p iná-í nové poznatky o neurálním substrátu magnetického kompasového smyslu, které p íspívají k výsledk získaným elektrofyziologickými a behaviorálními metodami. V t-ina elektrofyziologických studií byla provád na u pták (nap . Wu a Dickman 2011). P í studiu magnetorecepce savc byly uplatn ny ast ji behaviorální metody (nap . Muheim a kol. 2006).

Tato práce navazuje na studie N mce a kol. (2001) a Burgera a kol. (2010) , ve kterých byla aplikována kombinace behaviorálního experimentu a imunohistologické

detekce ITFs na studium neurálního substrátu magnetorecepce striktně podzemních savců. V dalších publikacích zaměřených na magnetorecepci ptáků byly použity detekce markerů ITFs v kombinaci s behaviorální analýzou (Heyers a kol. 2007; Liedvogel a kol. 2007; Mouritsen a kol. 2004a, 2005) i elektrofyziologickým přístupem (Wu a Dickman 2011, 2012). Zmiňované studie sloužily k porovnání s výsledky mé práce, protože srovnatelnost dat je možná pouze omezeně především z důvodu odlišného designu experimentu. Navíc porovnání s výsledky publikací zaměřených na magnetorecepci ptáků je možné pouze v určitých souvislostech z důvodu dosud nejasných mechanismů magnetorecepce a jejich možné odlišnosti u různých skupiny ptáků (Thalau a kol. 2006). Kromě toho se jedná o experiment, ve kterém zvířete bylo umístěno v open field testu, tj. jeho úkolem byla pouze volná explorace bez jakékoli smyslové preference. Srovnání se studii zaměřenými na schopnost orientace je tedy možné pouze omezeně, protože je jasné, že aktivace různých oblastí mozku se liší u zvířat volně explorujících a zvířat zaměřených plněním dané úlohy.

Obsahem této práce je systematická analýza funkčních systémů, které v takovém rozsahu dosud nebyly testovány. V diskusi neurálního substrátu jsem informace čerpal primárně z literatury zaměřené na studium magnetorecepce. Publikace analyzující neurální podstatu magnetorecepce se obvykle zabývají pouze několika kandidátními strukturami, naproti tomu dosud publikovaných studií navíc používá různé modely (např. Heyers a kol. 2007, Liedvogel a kol. 2007; Mouritsen a Ritz 2005a; Shimizu a kol. 2004). Srovnání s dosavadními poznatky a analýza výsledků budou náplní následujících kapitol.

4.1 Lokalizace aktivitních markerů Egr1 a c-Fos

Nefl přistoupím k samotné diskusi získaných výsledků, považuji za důležité se zmínit o výhodách a limitech použití indukovatelných transkripčních faktorů (inducible transcription factors - ITFs) jako nástroje pro studium magnetorecepce. ITFs jsou běžně používány jako markery neuronální aktivity. Jedná se o genomickou odpověď neuronu na podnět, který vyžaduje přenastavení exprese cílových genů. Tato odpověď bývá střednědobou a dlouhodobou adaptací neuronu, která nastává během minut až desítek minut po stimulaci. Výsledný efekt tedy může být detekovatelný až po určité době, tj. absence exprese ITF neznámá absenci neuronální aktivity, z čehož vyplývá i obtížnost detekce neuronální inhibice. Navíc se různé populace neuronů v mozku liší prahem intenzity stimulu nutným pro spuštění exprese daného ITF i spektrem podnětů, které vedou

k expresi daného ITF v konkrétním neuronálním systému (podrobná diskuse viz. Harris a kol. 1998; Herdegen 1996; Hoffmann a kol. 1993). Metoda navíc nemá časové rozlišení, které by umožnilo studium dynamiky stimulu a odpovědi. Proto poskytuje pouze korelativní data a nemůže tedy plnohodnotně nahradit studie elektrofyziologické. Na rozdíl od elektrofyziologických metod však umožní uje neuroanatomické funkční mapování pomocí ITFs studium chování intaktních zvířat a analýzu vzor neuronální aktivity v celém nervovém systému.

V této práci byly k detekci neuronální aktivity použity v jednom experimentu dva různé ITFs, resp. jejich produkty - Egr1 (známý také jako zif268, krox-24, NGFI-A, tis 8 a ZENK) a c-Fos. Výhodou jsou jejich rozdílné expresní křivky (Kaczmarek a Chaudhuri 1997; Zangenehpour a Chaudhuri 2002), což je velmi vhodným nástrojem screeningu struktur, u kterých se neví nic o dynamice reakce na změnu magnetického pole. Nicméně při analýze výsledků bylo třeba mít na paměti, že různé oblasti mozku vykazují rozdílnou expresi těchto dvou ITFs při stejné stimulaci. Navíc Egr1 na rozdíl od c-Fos nepodléhá negativní zpětné vazbě (Kaczmarek and Chaudhuri 1997), tím pádem je jeho kumulace v buňkách dlouhodobější a díky tomu je vhodným markerem v tomto experimentu s dlouhodobější stimulací. Tato skutečnost byla patrná v porovnání exprese obou markerů v jednotlivých systémech, kde například hladina exprese Egr1 v některých strukturách výrazně převýšovala hladinu exprese c-Fos (např. superior vestibular nucleus; spinal trigeminal nucleus, caudal part), což ale nebylo pozorováno v absolutním množství u všech struktur. Expresí ITFs mohly ovlivnit také jiné podněty, které jsou součástí standardního projevu chování zvířete. Vzhledem k tomu, že zvířata byla umístěna do nového prostředí, očekávali jsme nárůst exprese námi použitých markerů. Tato tendence měla být ovlivněna změnou magnetickým polem. Další vlivy jako motorická aktivita a činnost jednotlivých prvků chování asociovaných s exploračními byly hodnoceny behaviorální analýzou. Výsledky naznačují jen velmi subtilní vliv magnetických polí na chování myšičky kmene C57BL/6J v open field testu (Třetáková, 2014). Lze tedy předpokládat, že v těmto mnou zaznamenaných rozdílech v aktivitě jednotlivých funkčních systémů mozku je specificky asociována s percepcí a zpracováním magnetické informace, tj. nespojuje se změnou v aktivitě ani chování během open field testu.

4.2 Magnetoresponsevní neurony ve vestibulárním systému

Ve vestibulárních jádrech jsme předpokládali silnou změnu exprese ITFs v reakci na komplexní se smíšenou magnetickou, protože tato by měla vyvolat silný konflikt mezi magnetickou a vestibulární informací. Ve shodě s tímto předpokladem byla prokázána signifikantní zvýšená exprese Egr1 v superior vestibular nucleus (SuVe) u zvířat vystavených působení komplexní se smíšenou magnetickému poli v rozsahu $B = 250 \text{ a} -250 \text{ T}$. Toto zjištění je v souladu s elektrofyziologickou studií (Semm a kol. 1984), ve které byly demonstrovány reakce neuronálních populací superior vestibular nucleus u holuba (*Columba livia*) na změny horizontální složky magnetického stimulu. Senzitivitu analyzovaných vestibulárních neuronů zdůvodní Semm a spoluautoři nepřímou projekcí z nucleus of basal optic root (nBOR), které ipsilaterálně přenáší retinální vstupy. Druhým možným vysvětlením námi evidované změny exprese v SuVe je možné také přímé vstupní přímé z lageny vnitřního ucha. Ta je považována za možné centrum výskytu primárních magnetoreceptorů u ptáků (Wu a Dickman 2011; 2012). Totéž lze předpokládat i u savců. V souladu s touto hypotézou jsou výsledky demonstrující vliv vysoce intenzivního magnetického pole (14,1 T) na reakce potkanů, které jsou u zvířat s intaktním vestibulárním aparátem (Haupt a kol. 2007). Kromě toho je vstup z lageny pravděpodobně nezbytný pro funkci head direction cells a tedy pro korektní reprezentaci prostoru (Stackman a kol. 1997; 2002). Získaná data tedy naznačují zapojení superior vestibular nucleus do procesování magnetických informací potřebných pro prostorovou orientaci. Ažli obdobná studie provedená Burgerem a kol. (2010) demonstrovala výskyt magnetoresponsevních neuronů v jádrech obsahujících head direction cells, elektrofyziologické studie vliv magnetického pole na aktivitu těchto neuronů zatím neprokázaly (Brown a kol. 2002; Tryon et al. 2012). U ostatních stimulu nebyly pozorovány výrazné změny exprese aktivních markerů. Předchozí studie demonstrovala u holuba magnetoresponsevní neurony v několika strukturách vestibulárního systému (Wu a Dickman 2011), což se tedy v této práci podařilo ověřit jen částečně. Nepřekážkou změny exprese svědčí o možných nedostatcích stimulačních potřebných pro aktivaci všech populací magnetoresponsevních neuronů ve vestibulárním systému myši. Nelze však vyloučit ani fakt, že u myši zpracování magnetické informace ve vestibulárním systému liší od téhož u holuba.

4.3 Magnetoresponsevní neurony v trigeminálním systému

U trigeminálního systému jsme předpokládali změny aktivace jak v principiálním jádru, tak ve spinálních jádrech (Dubbeldam a kol. 1998). Trigeminální systém byl dříve zmiňován v souvislosti s možností výskytu potenciálních magnetoreceptorů v zobáku ptáků (Fleissner a kol. 2003) a ryb (Diebel et al. 2000; Eder et al. 2012; Walker et al. 1997). Domnělé magnetoreceptory holubů se sice ukázaly být ferozito obsahující makrofágy (Treiber a kol. 2012), ale vliv transektce i anestezie ophthalmické v tře trigeminálního nervu na schopnost zvládat úlohy založené na operantním podmínění pomocí magnetických stimulů byl opakovaně demonstrován (Beason a Semm 1996; Gagliardo a kol. 2006; Heyers a kol. 2010; Mora a kol. 2004; Walker a kol. 1997). Mnou provedená analýza skutečně potvrdila oekávané signifikantní změny exprese ve všech podjádrech spinálního jádra - oral part, caudal part a interpolar part. U spinal nucleus - oral part byla pozorována zvýšená exprese Egr1 u zvířat vystavených působení komplexního magnetického pole v rozsahu $B = 250$ až -250 T. Tento nárůst exprese byl výrazný v tře i u všech ostatních experimentálních skupin zvířat. Podobný trend byl pozorován i u spinal trigeminal nucleus - caudal part, méně u spinal trigeminal nucleus - interpolar part. U markeru c-Fos byly podobné změny exprese pozorovány především u spinal trigeminal nucleus, méně u ostatních podjader, kde exprese dosahovala víceméně podobných hladin. U principálních struktur se nepodařilo detekovat výrazné rozdíly mezi experimentálními skupinami. Obecně se předpokládá, že trigeminální systém hraje roli při vnímání intenzity magnetického pole (Beason a Semm 1987, Walker a kol. 1997) a je tedy spíše součástí magnetického mapového smyslu než magnetického kompasového smyslu (review viz například Wiltschko a Wiltschko 2005).

4.4 Magnetoresponsevní neurony v hipokampo-entorhinálním systému

Hipokampo-entorhinální systém je součástí navigačního okruhu hlodavců (Touretzky 2002). Ve strukturách tohoto systému byly identifikovány populace magnetoresponsevních neuronů u striktně podzemních, mikroftalmických ryboželeď Bathyergidae (Burger a kol. 2010). Účast behaviorálních studií zaměřených na magnetickou orientaci je spojena s vykonáváním konkrétní úlohy ve zmném magnetickém poli, což souvisí s navigačním okruhem, ale i s učením a obecně prostorovou orientací. Neurální substrát magnetické orientace se tedy pravděpodobně účastní vytváření map prostoru (Semm a kol. 1984). Hlavním centrem generování map prostoru je mimo jiné hipokampální oblast a aferentní i

eferentní s ní spojené struktury (O'Keefe and Nadel 1978). Bohužel studie zaměřené na magnetorecepci hlodavců se s výjimkou několika málo prací (Burger a kol. 2010; Nemeš a kol. 2001; Tryon et al. 2012) neuronálním substrátem dosud nezabývaly, několik poznatků však přinesly studie ptáčích modelů (Vargas 2006, Wu a Dickman 2011). V oblasti CA1 byl pozorován velký pokles exprese markeru Egr1 u zvířat vystavených působení komplexního magnetického pole v rozsahu $B = 250$ až -250 T. Tato skutečnost byla pozorována in vitro na histologických řezech hipokampu myši (Trabulsi a kol. 1996; Ahmed a Wieraszko 2008) V těchto studiích neuronální populace reagovaly v prvním případě na změny intenzity magnetického pole (2-3mT vs. 8-10mT) a v druhém na pulzní magnetické pole (0.16 Hz, 15 mT). Tyto stimulační ovlivnily biochemické procesy neuronálních buněk do té míry, že navodily stav dlouhodobé potenciace i deprese spojované s učním. Ve strukturách lateral entorhinal cortex a medial entorhinal cortex byl pozorován podobný vzor poklesu exprese markeru Egr1 jako u CA1, což plně odpovídá skutečnosti, že tyto oblasti jsou s CA1 propojeny. Entorhinální kora projikuje do všech oblastí hipokampu primárně však do dentate gyrus. Zde oproti očekávání nebyly pozorovány signifikantní změny exprese. Samotný medial entorhinal cortex vytváří dynamickou neuronální síť přijímající zprostředkované i přímé vstupní informace potřebné pro kontinuální aktualizaci reprezentací prostoru (Witter and Moser 2006). CA1 projikuje do subikula a subikulum projikuje zpět do entorhinální kory. Jako náznak této projekce lze považovat změny exprese markeru Egr1 v oblasti ventral subiculum, ale velký rozptyl naměřených hodnot snižuje její statistický význam.

4.5 Magnetoresponsevní neurony ve zrakovém systému

Zrakový systém je spojován s magnetorecepcí z mnoha důvodů, především proto, že magnetická kompasová orientace ptáků a obojživelníků je komplexně závislá na světle (review viz Deutschlander a kol. 1999; Wiltschko a Wiltschko 2002, 2010). Dokonce se uvažuje o lokalizaci magnetoreceptorů přímo v sítnici ptáků (Ritz a kol. 2000) i epifýze obojživelníků (Deutschlander a kol. 1999; Wiltschko a kol. 2002). Je však důležité poznamenat, že u některých dalších skupin obratlovců (ryby, mořské řelvy, rypoši) se magnetická kompasová orientace zdá být na světlo nezávislá (Lohmann a Lohmann 1993; Marhold a kol. 1997; Quinn a kol. 1981).

V této práci jsem analyzovala také korové zrakové oblasti, ale exprese námi poufitych ITFs nedosahovala signifikantních hladin. Do analýzy zrakového systému byl zahrnut také superior colliculus, a koli jeho vstupy jsou multimodální. Nicmén v této práci jsem se zam ěla na analýzu exprese ITFs v prvních t ech vrstvách, které získávají dominantní aferentaci ze sítnice. Signifikantní rozdíl hladin exprese Egr1 a c-Fos byl pozorován v superficial gray layer (SCSuG) a zonal layer (SCZo). Byl patrný pokles exprese markeru c-Fos jako reakce na magnetické pole komplexn ě sm ěn ě v rozsahu $B = 250$ a -250 T. Celkový pattern byl podobný jako u dat markeru Egr1 ve vý- ě zmi ovaných strukturách hipokampo-entorhinálního systému. V dorsal lateral geniculate (DLG) a ěste n ě ve ventral lateral geniculate (VLG) byl pozorován pokles exprese c-Fos u skupin se zm ěnami magnetického pole (m ěnila se ěntenzita ě orientace magnetických vektor ě). Tento trend je v souladu s teorií navrženou Thorstenem Ritzem (viz nap ě Mouritsen a Hore 201; 2Ritz 2000), ěle magnetorecepce je t ěsn ě sp ěřena s fotorepceí a magnetoreceptory zodpov dné za kompasovou orientaci jsou lokalizovány v sítnici. Citlivost t ěchto dvou genikulálních jader na zm ěny v magnetickém poli do b ě odpovídá této p ědstav ě. DLG a VLG jsou sou ěstí thalamofugálního okruhu zrakového systému, ve kterém byly u pták ě rovn ě nalezeny magnetoresponzivní neurony (Heyers a kol. 2007; Mouritsen a kol. 2005) a chemická leze jednoho zrakového jadra, jeěl je sou ěstí tohoto systému, vedla k neschopnosti pták ě orientovat se magnetický kompasem (Zapka a kol. 2009).

4.6 Navazující výzkum

Výsledky této diplomové práce významn ě p ěisp ěly k poznatk ěm získaným n ěkolikaletým výzkumem magnetorecepce v na- ěí laborato ěi. Jak jěil bylo zm ěn ěno, studie N ěmce a kol. (2001) p ěinesla zajímavé výsledky výskytu magnetoresponzivních neuron ě v superior colliculus u rypo- ě druhu *Fukomys anelli*. Ve vrstv ě *stratum griseum intermedium* byla identifikována populace sm ěrov ě selektivních magnetoresponzivních neuron ě. V této diplomové práci byly z ěsrových d ěvod ě analyzovány první t ěi vrstvy superior colliculus procesující zrakovou informaci. Hloub ěji uloěené vrstvy superior colliculus budou sou ěstí navazujících analýz. Bude tedy zajímavé porovnat zástupce subterrálních hlodavc ě a my- ě jako zástupce epigeických hlodavc ě, protoěle zde prezentované výsledky analýz prvních t ěí vrstev vypovídají o sensitivit ě superior colliculus u my- ěi.

Navigační okruh hlodavce popisovaný v publikaci Burgera a kol. (2010) přinesl výsledky naznačující, že magnetická informace je integrována v place cells, head direction cells a grid cells, vytvářejících propojený systém dleňitý pro prostorovou orientaci a navigaci hlodavce. V této diplomové práci jsem se zabývala pouze částí navigačního okruhu, tj. hipokampo-entorhinálním systémem. I zde byly identifikovány magnetoresponsivní neurony, a do značné míry jsem tak potvrdila závěry výše uvedené práce. Tyto výsledky naznačují, že magnetická informace může na úrovni hipokampo-entorhinálního systému integrována a přispívat tak k reprezentaci alocentrického prostoru i u hlodavce s nadzemní aktivitou a normálně vyvinutým zrakovým systémem. V následujících studiích plánuji rozšířit analýzu exprese aktivních markerů na celý navigační okruh. Získaná data vypovídají o zapojení všech těchto systémů do procesování magnetické informace. Jak již bylo na začátku diskuse zmínováno, data jsou pouze korelativní. Na základě pouhých porovnání s imunopozitivními neurony tedy není možné vytvořit konečný závěr týkající se tak dynamického procesu jako je prostorová orientace a neurální dleň s ní spojené. V sérii návazných experimentů budou proto provedeny deafferentační experimenty inhibující vestibulární vstupy, souasně budou probíhat elektrofyziologické studie. Pravděpodobně budou do experimentů zahrnuty také myšičky knockouty pro Cry1, Cry2 a pro Cry1 & Cry2 a srovnáme jejich magneticky indukovanou ITFs expresi s tímto u wild-type C57BL/6J myšičky.

5. Závěr

V této práci jsem analyzovala neurální substrát magnetické kompasové orientace u myši kmene C57BL/6J s použitím indukovatelných transkripčních faktorů (ITFs) jako marker neuronální odpovědi. Pomocí detekce exprese markerů c-Fos a Egr1 jsem identifikovala populaci magnetoresponsevních neuronů ve všech analyzovaných funkčních systémech. Změna exprese výše zmíněných markerů jako pravděpodobná genomická odpověď neuronů na magnetickou stimulaci byla demonstrována v těchto strukturách: superior vestibular nucleus, spinal trigeminal nucleus, CA1, medial entorhinal cortex, lateral entorhinal cortex, ventral subiculum, dorsal lateral geniculate, ventral lateral geniculate, superficial gray layer of superior colliculus, zonal layer of superior colliculus. Tyto výsledky představují první přímou experimentální podporu zapojení většiny těchto struktur do percepce magnetického pole i magnetického pole u savců (Burger a kol. 2010). Zdá se být pravděpodobné, že trigeminální a zrakový systém se podílí na vlastním zpracování magnetické informace. Vestibulární systém zejména integruje magnetickou a gravitační informaci - tíhový vektor slouží jako reference pro určení inklinace magnetického pole. Hipokampo-entorhinální systém nejspíše integruje magnetickou informaci za účelem vytváření a obecné reprezentace alocentrického prostoru (kognitivní mapy). Protože jsou výsledky experimentu pouze korelativní, plánujeme na tuto studii navázat deafferentními a elektrofyziologickými experimenty.

6. Literatura

- Aggleton JP, Pearce JM** (2001) Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 356 (1413):1467-1482
- Ahmed Z, Wieraszko A** (2008) The mechanism of magnetic field-induced increase of excitability in hippocampal neurons. *Brain Research* 1221:30-40
- Angelaki D, Perachio A** (1993) Contribution of irregular semicircular canal afferents to the horizontal vestibuloocular response during constant velocity rotation. *Journal of Neurophysiology* 69 (3):996-999
- Bailey MJ, Chong NW, Xiong J, Cassone VM** (2002) Chickens' Cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. *Febs Letters* 513 (2-3):169-174. doi:10.1016/s0014-5793(02)02276-7
- Beason RC, Semm P** (1987) Magnetic responses of the trigeminal nerve system of the bobolink (*Dolichonyx oryzivorus*). *Neuroscience Letters* 80 (2):229-234
- Beason RC, Semm P** (1996) Does the avian ophthalmic nerve carry magnetic navigational information? *Journal of Experimental Biology* 199 (5):1241-1244
- Begall S, Červený J, Neef J, Vojtech O, Burda H** (2008) Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36):13451-13455. doi:10.1073/pnas.0803650105
- Bingman VP, Cheng K** (2005) Mechanisms of animal global navigation: comparative perspectives and enduring challenges. *Ethology Ecology & Evolution* 17 (4):295-318
- Boccarda CN, Sargolini F, Thoresen VH, Solstad T, Witter MP, Moser EI, Moser MB** (2010) Grid cells in pre- and parasubiculum. *Nature Neuroscience* 13 (8):987-U112. doi:10.1038/nn.2602
- Boles LC, Lohmann KJ** (2003) True navigation and magnetic maps in spiny lobsters. *Nature* 421 (6918):60-63. doi:10.1038/nature01226
- Brown JE, Yates BJ, Taube JS** (2002) Does the vestibular system contribute to head direction cell activity in the rat? *Physiology & Behavior* 77 (4-5):743-748. doi:10.1016/s0031-9384(02)00928-9
- Burda H, Begall S, Červený J, Neef J, Němec P** (2009) Extremely low-frequency electromagnetic fields disrupt magnetic alignment of ruminants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14):5708-5713. doi:10.1073/pnas.0811194106

- Burda H, Marhold S, Westenberger T, Wiltchko R, Wiltchko W (1990)** Magnetic compass orientation in the subterranean rodent *Cryptomys hottentotus* (Bathyergidae). *Cellular and Molecular Life Sciences* 46 (5):528-530. doi:10.1007/bf01954256
- Burger T, Lucova M, Moritz RE, Oelschlager HHA, Druga R, Burda H, Wiltchko W, Wiltchko R, N mec P (2010)** Changing and shielded magnetic fields suppress c-Fos expression in the navigation circuit: input from the magnetosensory system contributes to the internal representation of space in a subterranean rodent. *Journal of the Royal Society Interface* 7 (50):1275-1292. doi:10.1098/rsif.2009.0551
- Burgess N, Jackson A, Hartley T, O'Keefe J (2000)** Predictions derived from modelling the hippocampal role in navigation. *Biological Cybernetics* 83 (3):301-312
- ervený J, Begall S, Koubek P, Nováková P, Burda H (2011)** Directional preference may enhance hunting accuracy in foraging foxes. *Biology Letters* 7 (3):355-357. doi:10.1098/rsbl.2010.1145
- Davila AF, Winklhofer M, Shcherbakov VP, Petersen N (2005)** Magnetic pulse affects a putative magnetoreceptor mechanism. *Biophysical Journal* 89 (1):56-63. doi:10.1529/biophysj.104.049346
- De Jong D (1982)** Orientation of comb building by honeybees. *Journal of comparative physiology* 147 (4):495-501
- Deutschlander ME, Freake MJ, Borland SC, Phillips JB, Madden RC, Anderson LE, Wilson BW (2003)** Learned magnetic compass orientation by the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*. *Animal Behaviour* 65:779-786. doi:10.1006/anbe.2003.2111
- Deutschlander ME, Phillips JB, Borland SC (1999)** The case for light-dependent magnetic orientation in animals. *Journal of Experimental Biology* 202 (8):891-908
- Diebel CE, Proksch R, Green CR, Neilson P, Walker MM (2000)** Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406 (6793):299-302. doi:10.1038/35018561
- Dodson CA, Hore P, Wallace MI (2013)** A radical sense of direction: signalling and mechanism in cryptochrome magnetoreception. *Trends in biochemical sciences* 38 (9):435-446
- Dubbeldam JL (1998)** The Sensory Trigeminal System in Birds: Input, Organization and Effects of Peripheral Damage. A Review. *Archives Of Physiology And Biochemistry* 106 (5):338-345. doi:doi:10.1076/apab.106.5.338.4367
- Duelli P, Duelli-Klein R (1978)** magnetische nestausrichtung der australischen kompasstermite amitermes meridionalis. *Mitteilungen Bulletin*
- Eder SHK, Cadiou H, Muhamad A, McNaughton PA, Kirschvink JL, Winklhofer M (2012)** Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (30):12022-12027. doi:10.1073/pnas.1205653109

- Ferbinteanu J, Shapiro ML** (2003) Prospective and retrospective memory coding in the hippocampus. *Neuron* 40 (6):1227-1239. doi:10.1016/s0896-6273(03)00752-9
- Fischer JH, Munro U, Phillips JB** (2003) Magnetic navigation by an avian migrant? In: *Avian migration*. Springer, pp 423-432
- Fleissner G, Holtkamp - Rötzer E, Hanzlik M, Winklhofer M, Fleissner G, Petersen N, Wiltshko W** (2003) Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *Journal of Comparative Neurology* 458 (4):350-360
- Fleissner G, Stahl B, Thalau P, Falkenberg G** (2007) A novel concept of Fe-mineral-based magnetoreception: histological and physicochemical data from the upper beak of homing pigeons. *Naturwissenschaften* 94 (8):631-642. doi:10.1007/s00114-007-0236-0
- Freake MJ, Muheim R, Phillips JB** (2006) Magnetic maps in animals: A theory comes of age? *Quarterly Review of Biology* 81 (4):327-347. doi:10.1086/511528
- Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H** (2002) Molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Biological Rhythms* 17 (1):14-27
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB** (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305 (5688):1258-1264. doi:10.1126/science.1099901
- Gagliardo A, Ioale P, Savini M, Wild JM** (2006) Having the nerve to home: trigeminal magnetoreceptor versus olfactory mediation of homing in pigeons. *Journal of Experimental Biology* 209 (15):2888-2892. doi:10.1242/jeb.02313
- Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM** (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454 (7207):1014-U1061. doi:10.1038/nature07183
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, Reppert SM** (2010) Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature* 463 (7282):804-U114. doi:10.1038/nature08719
- Gerlai R** (2002) Hippocampal LTP and memory in mouse strains: Is there evidence for a causal relationship? *Hippocampus* 12 (5):657-666. doi:10.1002/hipo.10101
- Giovani B, Byrdin M, Ahmad M, Brettel K** (2003) Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature structural biology* 10 (6):489-490
- Gould JL** (1982) The map sense of pigeons. *Nature* 296 (5854):205-211. doi:10.1038/296205a0
- Graf W, Ezure K** (1986) Morphology of vertical canal related second order vestibular neurons in the cat. *Experimental Brain Research* 63 (1):35-48

- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI** (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436 (7052):801-806. doi:10.1038/nature03721
- Hanzlik M, Heunemann C, Holtkamp-Rotzler E, Winklhofer M, Petersen N, Fleissner G** (2000) Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *Biometals* 13 (4):325-331. doi:10.1023/a:1009214526685
- Haque R, Chaurasia SS, Wessel III JH, Iuvone PM** (2002) Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *NeuroReport* 13 (17):2247-2251
- Harris JA** (1998) Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Research Bulletin* 45 (1):1-8. doi:10.1016/s0361-9230(97)00277-3
- Herdegen T** (1996) Jun, Fos, and CREB/ATF transcription factors in the brain: Control of gene expression under normal and pathophysiological conditions. *Neuroscientist* 2 (3):153-161. doi:10.1177/107385849600200310
- Heyers D, Manns M, Luksch H, Gunturkun O, Mouritsen H** (2007) A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *Plos One* 2 (9). doi:e93710.1371/journal.pone.0000937
- Heyers D, Zapka M, Hoffmeister M, Wild JM, Mouritsen H** (2010) Magnetic field changes activate the trigeminal brainstem complex in a migratory bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20):9394-9399. doi:10.1073/pnas.0907068107
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG** (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology* 14 (3):173-213
- Hogben HJ, Efimova O, Wagner-Rundell N, Timmel CR, Hore P** (2009) Possible involvement of superoxide and dioxygen with cryptochrome in avian magnetoreception: Origin of Zeeman resonances observed by *in vivo* EPR spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 480 (1):118-122
- Holland RA, Helm B** (2013) A strong magnetic pulse affects the precision of departure direction of naturally migrating adult but not juvenile birds. *Journal of the Royal Society Interface* 10 (81)
- Holland RA, Thorup K, Vonhof MJ, Cochran WW, Wikelski M** (2006) Navigation - Bat orientation using Earth's magnetic field. *Nature* 444 (7120):702-702. doi:10.1038/444702a
- Haupt TA, Cassell JA, Riccardi C, DenBleyker MD, Hood A, Smith JC** (2007) Rats avoid high magnetic fields: Dependence on an intact vestibular system. *Physiology & Behavior* 92 (4):741-747. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.062
- Huerta MF, Harting JK** (1984) Connectional organization of the superior colliculus. *Trends in Neurosciences* 7 (8):286-289

- Johnsen S, Lohmann KJ** (2005) The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nature Reviews Neuroscience* 6 (9):703-712. doi:10.1038/nrn1745
- Kaczmarek L, Chaudhuri A** (1997) Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research Reviews* 23 (3):237-256
- Kavokin KV** (2009) The puzzle of magnetic resonance effect on the magnetic compass of migratory birds. *Bioelectromagnetics* 30 (5):402-410. doi:10.1002/bem.20485
- Keary N, Ruploh T, Voss J, Thalau P, Wiltshko R, Wiltshko W, Bischof H-J** (2009) Oscillating magnetic field disrupts magnetic orientation in Zebra finches, *Taeniopygia guttata*. *Front Zool* 6:25
- Keeton WT, Larkin TS, Windsor DM** (1974) Normal fluctuations in the earth's magnetic field influence pigeon orientation. *Journal of comparative physiology* 95 (2):95-103
- Kimchi T, Terkel J** (2001) Magnetic compass orientation in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*. *Journal of Experimental Biology* 204 (4):751-758
- Kirschvink JL, Gould JL** (1981) Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Biosystems* 13 (3):181-201. doi:10.1016/0303-2647(81)90060-5
- Kirschvink JL, Walker MM, Diebel CE** (2001) Magnetite-based magnetoreception. *Current Opinion in Neurobiology* 11 (4):462-467. doi:10.1016/s0959-4388(00)00235-x
- Kubo T, Matsunaga T, Matano S** (1977) Convergence of ampullar and macular inputs on vestibular nuclei unit of the rat. *Acta Oto-Laryngologica* 84 (1-6):166-177
- Lannou J, Cazin L, Hamann K-F** (1980) Response of central vestibular neurons to horizontal linear acceleration in the rat. *Pflügers Archiv* 385 (2):123-129
- Lauwers M, Pichler P, Edelman NB, Resch GP, Ushakova L, Salzer MC, Heyers D, Saunders M, Shaw J, Keays DA** (2013) An iron-rich organelle in the cuticular plate of avian hair cells. *Current Biology* 23 (10):924-929
- Lednor AJ, Walcott C** (1984) The orientation of pigeons at gravity anomalies. *Journal of Experimental Biology* 111 (JUL):259-263
- Leutgeb S, Lettgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB** (2005) Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science* 309 (5734):619-623. doi:10.1126/science.1114037
- Liedvogel M, Feenders G, Wada K, Troje NF, Jarvis ED, Mouritsen H** (2007) Lateralized activation of Cluster N in the brains of migratory songbirds. *European Journal of Neuroscience* 25 (4):1166-1173. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05350.x
- Light P, Salmon M, Lohmann KJ** (1993) Geomagnetic orientation of loggerhead sea turtles: Evidence for an inclination compass. *Journal of Experimental Biology* 182:1-9

- Lohmann KJ** (1991) Magnetic orientation by hatchling loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Experimental Biology* 155 (1):37-49
- Lohmann KJ** (2010) Magnetic-field perception. *Nature* 464 (7292):1140-1142. doi:10.1038/4641140a
- Lohmann KJ, Cain SD, Dodge SA, Lohmann CMF** (2001) Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles. *Science* 294 (5541):364-366. doi:10.1126/science.1064557
- Lohmann KJ, Lohmann CMF** (2006) Sea turtles, lobsters, and oceanic magnetic maps. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39 (1):49-64. doi:10.1080/10236240600563230
- Lohmann KJ, Lohmann CMF, Ehrhart LM, Bagley DA, Swing T** (2004) Animal behaviour - Geomagnetic map used in sea-turtle navigation. *Nature* 428 (6986):909-910. doi:10.1038/428909a
- Lohmann KJ, Lohmann CMF, Putman NF** (2007) Magnetic maps in animals: nature's GPS. *Journal of Experimental Biology* 210 (21):3697-3705. doi:10.1242/jeb.001313
- Lohmann KJ, Pentcheff ND, Nevitt GA, Stetten GD, Zimmerfaust RK, Jarrard HE, Boles LC** (1995) Magnetic orientation of spiny lobsters in the ocean: Experiments with undersea coil systems. *Journal of Experimental Biology* 198 (10):2041-2048
- Marhold S, Wiltshko W, Burda H** (1997) A magnetic polarity compass for direction finding in a subterranean mammal. *Naturwissenschaften* 84 (9):421-423. doi:10.1007/s001140050422
- McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB** (2006) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nature Reviews Neuroscience* 7 (8):663-678. doi:10.1038/nrn1932
- Merrill RT, McElhinny MW** (1983) *The Earth's magnetic field: Its history, origin and planetary perspective*, vol 401. Cambridge Univ Press
- Miyamoto Y, Sancar A** (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11):6097-6102. doi:10.1073/pnas.95.11.6097
- Moita MAP, Rosis S, Zhou Y, LeDoux JE, Blair HT** (2003) Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning. *Neuron* 37 (3):485-497. doi:10.1016/s0896-6273(03)00033-3
- Möller A, Sagasser S, Wiltshko W, Schierwater B** (2004) Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* 91 (12):585-588. doi:10.1007/s00114-004-0578-9

- Mora CV, Davison M, Wild JM, Walker MM** (2004) Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature* 432 (7016):508-511. doi:10.1038/nature03077
- Moser EI, Kropff E, Moser MB** (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. In: *Annual Review of Neuroscience*, vol 31. Annual Review of Neuroscience. pp 69-89. doi:10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723
- Mouritsen H, Feenders G, Liedvogel M, Kropp W** (2004b) Migratory birds use head scans to detect the direction of the Earth's magnetic field. *Current Biology* 14 (21):1946-1949. doi:10.1016/j.cub.2004.10.025
- Mouritsen H, Feenders G, Liedvogel M, Wada K, Jarvis ED** (2005) Night-vision brain area in migratory songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23):8339-8344. doi:10.1073/pnas.0409575102
- Mouritsen H, Hore P** (2012) The magnetic retina: light-dependent and trigeminal magnetoreception in migratory birds. *Current Opinion in Neurobiology* 22 (2):343-352
- Mouritsen H, Janssen-Bienhold U, Liedvogel M, Feenders G, Stalleicken J, Dirks P, Weiler R** (2004a) Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39):14294-14299. doi:10.1073/pnas.0405968101
- Mouritsen H, Ritz T** (2005) Magnetoreception and its use in bird navigation. *Current Opinion in Neurobiology* 15 (4):406-414. doi:10.1016/j.conb.2005.06.003
- Muheim R, Edgar NM, Sloan KA, Phillips JB** (2006) Magnetic compass orientation in C57BL/6J mice. *Learning & Behavior* 34 (4):366-373
- Muller RU, Kubie JL, Bostock E, Taube J, Quirk G** (1991) Spatial firing correlates of neurons in the hippocampal formation of freely moving rats.
- Munro U, Munro JA, Phillips JB, Wiltschko W** (1997) Effect of wavelength of light and pulse magnetisation on different magnetoreception systems in a migratory bird. *Australian Journal of Zoology* 45 (2):189-198. doi:10.1071/zo96066
- Nakamura TJ, Shinohara K, Funabashi T, Mitsushima D, Kimura F** (2001) Circadian and photic regulation of cryptochrome mRNAs in the rat pineal gland. *Neuroscience Research* 41 (1):25-32. doi:10.1016/s0168-0102(01)00255-3
- N mec P, Altmann J, Marhold S, Burda H, Oelschlager HHA** (2001) Neuroanatomy of magnetoreception: The superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science* 294 (5541):366-368. doi:10.1126/science.1063351
- N mec P, Burda H, Oelschlager HHA** (2005) Towards the neural basis of magnetoreception: a neuroanatomical approach. *Naturwissenschaften* 92 (4):151-157. doi:10.1007/s00114-005-0612-6

- O'Keefe J** (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology* 51 (1):78-109
- O'Keefe J, Dostrovsky J** (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34 (1):171-175
- O'Keefe J, Nadel L** (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press.
- Oliveriusová L, Nmec P, Králová Z, Sedláček F** (2012) Magnetic compass orientation in two strictly subterranean rodents: learned or species-specific innate directional preference? *The Journal of Experimental Biology* 215 (20):3649-3654
- Oliveriusová L, Nmec P, Pavelková Z, Sedláček F** (2014) Spontaneous expression of magnetic compass orientation in an epigeic rodent: the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Naturwissenschaften* 101 (7):557-563
- Painter MS, Dommer DH, Altizer WW, Muheim R, Phillips JB** (2013) Spontaneous magnetic orientation in larval *Drosophila* shares properties with learned magnetic compass responses in adult flies and mice. *The Journal of Experimental Biology* 216 (7):1307-1316
- Paxinos G, Franklin K** (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Academic, San Diego). Ed,
- Pfuhl G, Tjelmeland H, Biegler R** (2011) Precision and reliability in animal navigation. *Bulletin of Mathematical Biology* 73 (5):951-977. doi:10.1007/s11538-010-9547-y
- Phillips JB** (1986) Two magnetoreception pathways in a migratory salamander. *Science* 233 (4765):765-767. doi:10.1126/science.3738508
- Phillips JB, Borland SC** (1994) Use of a specialized magnetoreception system for homing by the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Biology* 188:275-291
- Phillips JB, Borland SC, Freake MJ, Brassart J, Kirschvink JL** (2002) 'Fixed-axis' magnetic orientation by an amphibian: non-shoreward-directed compass orientation, misdirected homing or positioning a magnetite-based map detector in a consistent alignment relative to the magnetic field? *Journal of Experimental Biology* 205 (24):3903-3914
- Phillips JB, Schmidt-Koenig K, Muheim R** (2006) True navigation: sensory bases of gradient maps. Brown MF, Cook R, G, editors *Animal Spatial Cognition: Comparative, Neural & Computational Approaches*: Comparative Cognition Society
- Phillips JB, Youmans PW, Muheim R, Sloan KA, Landler L, Painter MS, Anderson CR** (2013) Rapid Learning of Magnetic Compass Direction by C57BL/6 Mice in a 4-Armed Plus-Maze. *PLoS ONE* 8 (8):e73112

- Putman NF, Endres CS, Lohmann CMF, Lohmann KJ** (2011) Longitude perception and bicoordinate magnetic maps in sea turtles. *Current Biology* 21 (6):463-466. doi:10.1016/j.cub.2011.01.057
- Quinn TP, Brannon EL** (1982) The use of celestial and magnetic cues by orienting sockeye salmon smolts. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 147 (4):547-552. doi:10.1007/bf00612020
- Quinn TP, Merrill RT, Brannon EL** (1981) Magnetic field detection in sockeye salmon. *Journal of Experimental Zoology* 217 (1):137-142. doi:10.1002/jez.1402170114
- Ritz T, Adem S, Schulten K** (2000) A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophysical Journal* 78 (2):707-718
- Ritz T, Ahmad M, Mouritsen H, Wiltschko R, Wiltschko W** (2010) Photoreceptor-based magnetoreception: optimal design of receptor molecules, cells, and neuronal processing. *Journal of the Royal Society Interface* 7:S135-S146. doi:10.1098/rsif.2009.0456.focus
- Ritz T, Dommer DH, Phillips JB** (2002) Shedding light on vertebrate magnetoreception. *Neuron* 34 (4):503-506. doi:10.1016/s0896-6273(02)00707-9
- Ritz T, Thalau P, Phillips JB, Wiltschko R, Wiltschko W** (2004) Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature* 429 (6988):177-180. doi:10.1038/nature02534
- Ritz T, Wiltschko R, Hore PJ, Rodgers CT, Stapput K, Thalau P, Timmel CR, Wiltschko W** (2009) Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophysical Journal* 96 (8):3451-3457. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.072
- Rodgers CT, Hore PJ** (2009) Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2):353-360. doi:10.1073/pnas.0711968106
- Samu D, Eros P, Ujfalussy B, Kiss T** (2009) Robust path integration in the entorhinal grid cell system with hippocampal feed-back. *Biological Cybernetics* 101 (1):19-34. doi:10.1007/s00422-009-0311-z
- Sancar A** (2004) Regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry* 279 (33):34079-34082. doi:10.1074/jbc.R400016200
- Semm P, Beason RC** (1990) Responses to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. *Brain Research Bulletin* 25 (5):735-740
- Semm P, Demaine C** (1986) Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 159 (5):619-625. doi:10.1007/bf00612035

- Semm P, Nohr D, Demaine C, Wiltschko W** (1984) Neural basis of the magnetic compass: interactions of visual, magnetic and vestibular inputs in the pigeon's brain. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 155 (3):283-288. doi:10.1007/bf00610581
- Sharp PE, Blair HT, Cho JW** (2001) The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal. *Trends in Neurosciences* 24 (5):289-294
- Shcherbakov VP, Winklhofer M** (1999) The osmotic magnetometer: a new model for magnetite-based magnetoreceptors in animals. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 28 (5):380-392. doi:10.1007/s002490050222
- Shimizu T, Bowers AN, Budzynski CA, Kahn MC, Bingman VP** (2004) What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of ZENK expression. *Behavioral Neuroscience* 118 (4):845-851. doi:10.1037/0735-7044.118.4.845
- Skiles DD** (1985) The geomagnetic field its nature, history, and biological relevance. In: *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms*. Springer, pp 43-102
- Solov'yov IA, Greiner W** (2007) Theoretical analysis of an iron mineral-based magnetoreceptor model in birds. *Biophysical Journal* 93 (5):1493-1509. doi:10.1529/biophysj.107.105098
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser MB, Moser EI** (2008) Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science* 322 (5909):1865-1868. doi:10.1126/science.1166466
- Stackman RW, Clark AS, Taube JS** (2002) Hippocampal spatial representations require vestibular input. *Hippocampus* 12 (3):291-303. doi:10.1002/hipo.1112
- Stackman RW, Taube JS** (1997) Firing properties of head direction cells in the rat anterior thalamic nucleus: Dependence on vestibular input. *Journal of Neuroscience* 17 (11):4349-4358
- Štefanská L** (2014) Vliv magnetického pole na exploraci chování hlodavců. Diplomová práce. Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Taube JS** (2007) The head direction signal: Origins and sensory-motor integration. In: *Annual Review of Neuroscience*, vol 30. Annual Review of Neuroscience. pp 181-207. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854
- Thalau P, Ritz T, Burda H, Wegner RE, Wiltschko R** (2006) The magnetic compass mechanisms of birds and rodents are based on different physical principles. *Journal of the Royal Society Interface* 3 (9):583-587. doi:10.1098/rsif.2006.0130
- Thalau P, Ritz T, Stapput K, Wiltschko R, Wiltschko W** (2005) Magnetic compass orientation of migratory birds in the presence of a 1.315 MHz oscillating field. *Naturwissenschaften* 92 (2):86-90. doi:10.1007/s00114-004-0595-8

- Tian LX, Lin W, Zhang SY, Pan YX** (2010) Bat head contains soft magnetic particles: Evidence from magnetism. *Bioelectromagnetics* 31 (7):499-503.
doi:10.1002/bem.20590
- Touretzky DS** (2002) The rodent navigation circuit. In: *The Neural Basis of Navigation*. Springer, pp 217-233
- Trabulsi R, Pawlowski B, Wieraszko A** (1996) The influence of steady magnetic fields on the mouse hippocampal evoked potentials in vitro. *Brain Research* 728 (1):135-139
- Treiber CD, Salzer MC, Riegler J, Edelman N, Sugar C, Breuss M, Pichler P, Cadiou H, Saunders M, Lythgoe M, Shaw J, Keays DA** (2012) Clusters of iron-rich cells in the upper beak of pigeons are macrophages not magnetosensitive neurons. *Nature* 484 (7394):367-370.
doi:http://www.nature.com/nature/journal/v484/n7394/abs/nature11046.html#supplementary-information
- Tryon VL, Kim EU, Zafar TJ, Unruh AM, Staley SR, Calton JL** (2012) Magnetic field polarity fails to influence the directional signal carried by the head direction cell network and the behavior of rats in a task requiring magnetic field orientation. *Behavioral Neuroscience* 126 (6):835
- Vacha M, Kvicalova M, Puzova T** (2010) American cockroaches prefer four cardinal geomagnetic positions at rest. *Behaviour* 147 (4):425-440.
doi:10.1163/000579509x12580965484148
- Vacha M, Puzova T, Kvicalova M** (2009) Radio frequency magnetic fields disrupt magnetoreception in American cockroach. *Journal of Experimental Biology* 212 (21):3473-3477. doi:10.1242/jeb.028670
- Vanegas H** (1984) *Comparative neurology of the optic tectum*. Plenum Pub Corp.
- Vargas JP, Siegel JJ, Bingman VP** (2006) The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. *Brain Research Bulletin* 70 (2):158-164. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.03.018
- Vidal P, Sans A** (2004) Vestibular system. *The rat nervous system* 3:965-996
- Wahlsten D, Cooper SF, Crabbe JC** (2005) Different rankings of inbred mouse strains on the Morris maze and a refined 4-arm water escape task. *Behavioural Brain Research* 165 (1):36-51
- Waite PME** (2004) Trigeminal sensory system. In: *The rat nervous system*. pp 815-834
- Walcott C** (1977) Magnetic fields and orientation of homing pigeons under the sun *Journal of Experimental Biology* 70 (OCT):105-123

- Walcott C, Green RP** (1974) Orientation of homing pigeons altered by a change in direction of an applied magnetic field *Science* 184 (4133):180-182.
doi:10.1126/science.184.4133.180
- Walker MM, Dennis TE, Kirschvink JL** (2002) The magnetic sense and its use in long-distance navigation by animals. *Current Opinion in Neurobiology* 12 (6):735-744.
doi:10.1016/s0959-4388(02)00389-6
- Walker MM, Diebel CE, Haugh CV, Pankhurst PM, Montgomery JC, Green CR** (1997) Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* 390 (6658):371-376.
doi:10.1038/37057
- Wallraff HG** (1982) The homing mechanism of pigeons. *Nature* 300 (5889):293-293.
doi:10.1038/300293a0
- Wiltschko R, Schiffner I, Fuhrmann P, Wiltschko W** (2010a) The role of the magnetite-based receptors in the beak in pigeon homing. *Current Biology* 20 (17):1534-1538.
doi:10.1016/j.cub.2010.06.073
- Wiltschko R, Stapput K, Bischof H-J, Wiltschko W** (2007) Light-dependent magnetoreception in birds: increasing intensity of monochromatic light changes the nature of the response. *Frontiers in Zoology* 4 (1):5
- Wiltschko R, Stapput K, Thalau P, Wiltschko W** (2010b) Directional orientation of birds by the magnetic field under different light conditions. *Journal of the Royal Society Interface* 7:S163-S177. doi:10.1098/rsif.2009.0367.focus
- Wiltschko R, Wiltschko W** (1995) *Magnetic Orientation in Animals*. 1st edition edn. Springer Verlag, New York
- Wiltschko R, Wiltschko W** (2006) Magnetoreception. *Bioessays* 28 (2):157-168.
doi:10.1002/bies.20363
- Wiltschko R, Wiltschko W** (2009) Avian navigation. *Auk* 126 (4):717-743.
doi:10.1525/auk.2009.11009
- Wiltschko R, Wiltschko W** (2012) Magnetoreception. In: *Sensing in Nature*. Springer, pp 126-141
- Wiltschko W, Möller A, Gesson M, Noll C, Wiltschko R** (2004) Light-dependent magnetoreception in birds: analysis of the behaviour under red light after pre-exposure to red light. *Journal of Experimental Biology* 207 (7):1193-1202.
doi:10.1242/jeb.00873
- Wiltschko W, Traudt J, Gunturkun O, Prior H, Wiltschko R** (2002) Lateralization of magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* 419 (6906):467-470.
doi:10.1038/nature00958
- Wiltschko W, Wiltschko R** (1972) Magnetic compass of european robins. *Science* 176 (4030):62-&. doi:10.1126/science.176.4030.62

- Wiltschko W, Wiltschko R** (1981) Disorientation of inexperienced young pigeons after transportation in total darkness.
- Wiltschko W, Wiltschko R** (2002) Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften* 89 (10):445-452. doi:10.1007/s00114-002-0356-5
- Wiltschko W, Wiltschko R** (2005) Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology* 191 (8):675-693. doi:10.1007/s00359-005-0627-7
- Winklhofer M, Kirschvink JL** (2010) A quantitative assessment of torque-transducer models for magnetoreception. *Journal of the Royal Society Interface* 7:S273-S289. doi:10.1098/rsif.2009.0435.focus
- Witter M, Amaral D** (2004) The hippocampal region. *The rat nervous system*:637-703
- Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H** (2000) Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron* 27 (3):623-633. doi:10.1016/s0896-6273(00)00071-4
- Wu LQ, Dickman JD** (2011) Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena. *Current Biology* 21 (5):418-423. doi:10.1016/j.cub.2011.01.058
- Wu LQ, Dickman JD** (2012) Neural Correlates of a Magnetic Sense. *Science* 336 (6084):1054-1057. doi:10.1126/science.1216567
- Wyeth R** (2010) Should animals navigating over short distances switch to a magnetic compass sense? *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4. doi:10.3389/fnbeh.2010.00042
- Yamamoto K, Okano T, Fukada Y** (2001) Chicken pineal Cry genes: Light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts. *Neuroscience Letters* 313 (1-2):13-16. doi:10.1016/s0304-3940(01)02227-3
- Zangenehpour S, Chaudhuri A** (2002) Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Molecular Brain Research* 109 (1-2):221-225. doi:10.1016/s0169-328x(02)00556-9
- Zapka M, Heyers D, Hein CM, Engels S, Schneider NL, Hans J, Weiler S, Dreyer D, Kishkinev D, Wild JM, Mouritsen H** (2009) Visual but not trigeminal mediation of magnetic compass information in a migratory bird. *Nature* 461 (7268):1274-U1108. doi:10.1038/nature08528