

# 1 Obsah

1	Obsah .....	1
2	Seznam zkratek .....	3
3	Úvod .....	4
4	Literární přehled .....	4
4.1	Hipokampus, paměť a prostorová orientace .....	4
4.1.1	Anatomie a zapojení .....	5
4.1.2	Episodická paměť.....	6
4.1.3	Prostorová orientace .....	8
4.1.4	Vybrané úlohy testující prostorovou orientaci.....	10
4.1.5	Paměť na uspořádání událostí v čase .....	12
4.1.6	„Time cells“ .....	12
4.2	Percepce času.....	13
4.2.1	Intervalové časování .....	14
4.2.2	Neuroanatomie.....	18
4.2.3	Neurální mechanismy .....	20
4.3	Časoprostorová integrace.....	22
4.3.1	Experimenty sledující integraci časové a prostorové informace.....	23
4.3.2	Interakce prostorového a časového kódování .....	23
4.3.3	Možné zapojení hipokampu v SBF okruhu .....	24
5	Experimentální část.....	26
5.1	Cíle .....	26
5.2	Metodika.....	27
5.2.1	Zvířata .....	27
5.2.2	Aplikace látek.....	27
5.2.3	Aparatura .....	28
5.2.4	Design experimentu.....	31
5.2.5	Analýza dat .....	35
5.3	Výsledky.....	36
5.3.1	Experiment 1 .....	36
5.3.2	Experiment 2 .....	37

6	Diskuse .....	43
7	Závěr.....	46
8	Literatura .....	47
9	Dodatky .....	55
9.1	Aparatura Arénomat.....	55
9.1.1	Technické specifikace.....	55
9.1.2	Přehled možných akcí a naprogramování úloh .....	56
9.2	Publikované práce .....	58

## **2 Seznam zkratek**

AAPA - aktivní alothetické vyhýbání se místu

AMPT - Alpha-methyl-p-tyrosine

ANOVA – Analýza rozptylu

CA - Cornu Amonis

GLM - Zobecněný lineární model

L-DOPA - L-3,4-dihydroxyphenylalanine

MSN - striatální ostnaté neurony

NMDA -N-methyl-D-asparagová kyselina

PFC- prefrontální kůra

PI - peak interval

SBF - striatal beat frequency

SET- scalar expectancy theory

THC- delta-9-tetrahydrocannabinol

### **3 Úvod**

Systém pro orientaci v prostoru tvoří důležitou složku stejně jako systém pro vnímání času. Jedinec se nemůže pohybovat v prostoru, aniž by se zároveň nepohyboval i v čase. Hlavní oblastí, díky které vnímáme intervaly v rámci sekund až desítek sekund je striatum a prefrontální kůra. Kromě nich jsou v poslední době předmětem zájmu hipokampální „time cells“ a jejich úloha v sekvenčním časování. Hipokampus tvoří centrum prostorové orientace a episodické paměti a proto je objev těchto neuronů zajímavým rozšířením možných funkcí této části mozku. Pyramidální neurony této oblasti mohou reagovat buďto na čas samotný, některé reagují na časovou i prostorovou informaci zároveň a poslední typ tvoří neurony aktivující se pouze při pohybu v prostoru, což jsou již dlouho známe „place cells“. Hipokampus je tedy klíčový pro sjednocení informace „co“, „kde“ a „kdy“ a pro následné ukládání těchto vzpomínek do dlouhodobé paměti v jiných oblastech (Tulving, 1983).

### **4 Literární přehled**

#### **4.1 Hipokampus, paměť a prostorová orientace**

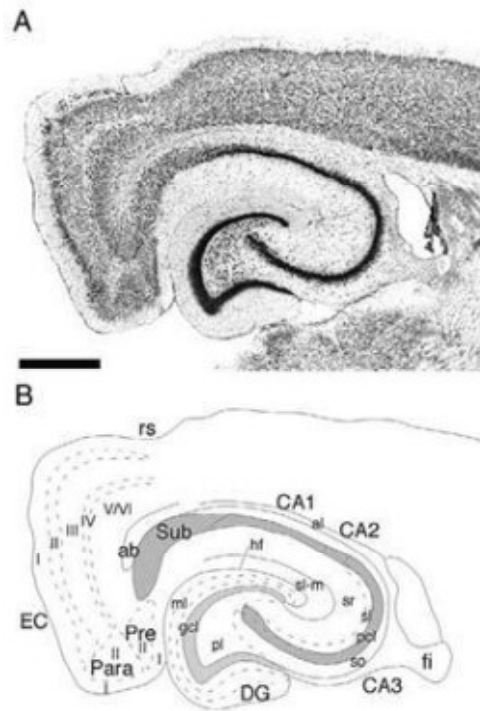
V proměnlivém prostředí, které tvoří okolní svět, musí pro své přežití být každý živočich schopný tvořit a ukládat vzpomínky, které se týkají jak samotné události, tak informace o tom, kdy a kde se daná událost stala. Tyto vzpomínky pak musí být schopný vyhodnocovat a následně s nimi dále pracovat. Oblastí, která integraci těchto informací zajišťuje, je právě hipokampus.

Jeden z prvních důležitých objevů vychází ze studií Scovilleho a Milnerové (1957). Týkala se pacientů s bilaterální resekci čelního laloku, u kterých bylo jedním z následků operace vytvoření anterográdní amnézie, tedy neschopnosti dlouhodobě si zapamatovat nově získané vzpomínky. Toto zjištění bylo v rozporu s dosavadními teoriemi, neboť hipokampus byl obecně brán jako oblast, kde se vzpomínky skladují, nikoliv tvoří. Od tohoto objevu proběhl nespočet dalších pokusů a pozorování, která byla prováděna zpočátku hlavně na pacientech, u kterých byla odebrána tato část mozku, a objasnila se tak díky tomu i jeho role v emočních procesech, kde je jeho funkcí porovnávat přijaté smyslové informace s naučenými modely a napomáhat pak modulaci následné reakce (Cahill and McGaugh, 1998).

Značnou pozornost si získala také další z těchto studií a to pohled na hipokampus jako na oblast tvorby vlastních prostorových map (O'Keefe and Dostrovsky, 1978), která navazovala na dřívější studii sledující aktivitu neuronů hipokampu u volně se pohybujících potkanů (O'Keefe and Nadel, 1971). Kromě těchto prací, které prokázaly jak jeho zapojení v paměťových procesech, tak v prostorové orientaci, určitě stojí za zmínku ještě studie nejnovější, které se věnují hipokampu a schopnosti jeho neuronů reprezentovat časové úseky (Pastalkova et al., 2008; Eichenbaum, 2014 a jiné).

#### **4.1.1 Anatomie a zapojení**

Za svůj název hipokampus vděčí mořskému koníkovi (latinsky *hippocampus*) jehož u lidí svým tvarem připomíná. U potkana poměrově zabírá větší část mozku než u lidí, liší se také tvarem či umístěním svých oblastí. Hipokampus, který vývojově tvoří jednu z nejstarších částí mozku, anatomicky leží pod neocortexem a tvoří část limbického systému spolu s cingulárním závitem, septem a amygdalou. Anatomicky se dá rozdělit na Ammonův roh (*Cornu Ammonis*, CA), který se dále dělí na oblasti CA1 až CA3 a dentální gyrus (Duvernoy, 2005) (obr. 1). Tyto CA oblasti se liší hlavně charakteristikou neuronů a propojením s okolními oblastmi. Dále také dohromady se subikulem, gyrem dentatem a entorhinální oblastí utváří hipokampální formaci. Entorhinální kůra je zde hlavním zdrojem korových informací z ostatních oblastí (frontální, temporální a parietální laloky spolu s retrosplenální kůrou) jdoucích dále do hipokampu (Witter, 1993). Ten má uspořádání laminární struktury a je tvořen čtyřmi vrstvami, kde každá z nich obsahuje jiný typ pyramidálních neuronů, mezi které mimo jiné patří tzv. místové neurony (place cells) či časové neurony (time cells). Oproti tomu přilehlý gyrus dentatus a subikulum jsou struktury třívrstevné.



**Obr 1. Horizontální řezy hipokampální formace u potkana. (A)** Hipokampální formace. **(B)** Schéma hipokampální formace vyznačující části, vrstvy a dráhy. ag – angulare bundle, al- alveus, CA1- CA1 oblast Ammonova rohu, CA2 –CA2 oblast Ammonova rohu, CA3- CA3 oblast Ammonova rohu, DG- gyrus dentatus, EC-entorhinální kůra, fi – fimbria, glc – granulární vrstva gyru dentatu, hf – hipokampální fisura, ml – molekulární vrstva gyru dentatu, para – parasubikulum, pcl – pyramidová vrstva hipokampu, pl – polymorfnní vrstva gyru dentatu, pre – presubikulum, sr-stratum radiatum hipokampu, sl-m – striatum lakumosum molekulare hipokampu

(upraveno podle Andersen a kol., 2006)

#### 4.1.2 Episodická paměť

Paměť a tvorba paměťové stopy tvoří jednu z hlavních funkcí mozku, bez které by žádný živočich nebyl schopen přežít. Formování paměťové stopy je hlavní a nejznámější funkcí hipokampu, jak bylo již v roce 1957 prokázáno sledováním výskytu anterográdní amnésie po odejmutí větší části temporálního laloku u známého pacienta H. M. (Scoville and Milner, 1957). Je klíčový i pro ukládání těchto paměťových stop do dalších oblastí, které tvoří úložiště dlouhodobé paměti. Hipokampus se spojuje konkrétně s pamětí epizodickou, která je součástí paměti deklarativní (Tulving, 1983) a která zpracovává a uchovává osobní zkušenosti. Pod tím si můžeme představit cokoliv od vzpomínky na dovolenou až po

vzpomínku na to, co člověk měl včera k obědu. Ukládání nových paměťových stop pomocí hipokampu dále do korových oblastí se nazývá konsolidace a tvoří ji plynulý proces. Prokázání této důležité funkce vychází z četných studií, které zkoumaly vliv lézí hipokampu před vytvořením paměťové stopy nebo jejich dopad s určitým časovým odstupem po zformování této stopy. Pokud byla léze vykonána po době potřebné ke konsolidaci, tato paměťová stopa ovlivněna nebyla (O'Reilly, 1995). Všechna tato zjištění potvrzují fakt, že se vzpomínky po určité době 'přemístí' do jiných oblastí a stanou se na hipokampu nezávislé. Při tvorbě paměťové stopy neokortikální struktury vysílají informace, které se spojí v jedné nebo více oblastech parahipokampálního regionu (perirhinální, postrhinální a entorhinální kůře). Tato informace je pak dále promítnuta do částí hipokampu, které vycházejí z dentálního gyru do CA3 oblasti, dále do CA1 oblasti a jako poslední do subikula. Odsud se informace zase navrací zpět do parahipokampální oblasti a nakonec doputuje až do kůry mozečku (Eichenbaum, 2000). Organizace tvorby vzpomínek tímto způsobem byla prokázána jak u potkanů, tak u primátů a lidí (Dickerson and Eichenbaum, 2010).

#### **4.1.2.1 "Episodic-like" paměť u zvířat**

Dlouhou dobu se uvažovalo o tom, že episodická paměť je specifická rysem pouze pro lidi. U zvířat totiž nemůžeme mluvit přímo o paměti epizodické, ale pouze o „episodic-like“ paměti. Ta je srovnatelná s epizodickou pamětí lidí, ale projevuje se odlišným typem reprezentací. Tulving (1983) ji u lidí definoval jako paměť, 'která získává a uchovává informace o tom, kdy a v jakém pořadí se události staly a zároveň uchovává i časově prostorové vztahy mezi nimi'. U zvířat zde ale chybí jedna klíčová složka - nedokážeme zjistit, jestli v jejich mozku probíhá vědomé vybavení těchto vzpomínek, což bylo popsáno v Tulvingově teorii jako jedna z hlavních složek. Jedná se zde tedy o výzkum vzpomínek v rámci objektů (co?), jejich prostorové lokalizace (kde?) a jejich časové složky (kdy?) (Eacott and Norman, 2004), což tvoří jednu z klíčových komponent pro zařazení těchto vzpomínek do „episodic-like“ paměti. Mezi další kritéria patří utváření a propojení těchto tří aspektů (Co? Kdy? Kde?) a také zde nesmí chybět flexibilita, která umožňuje použití této vzpomínky.

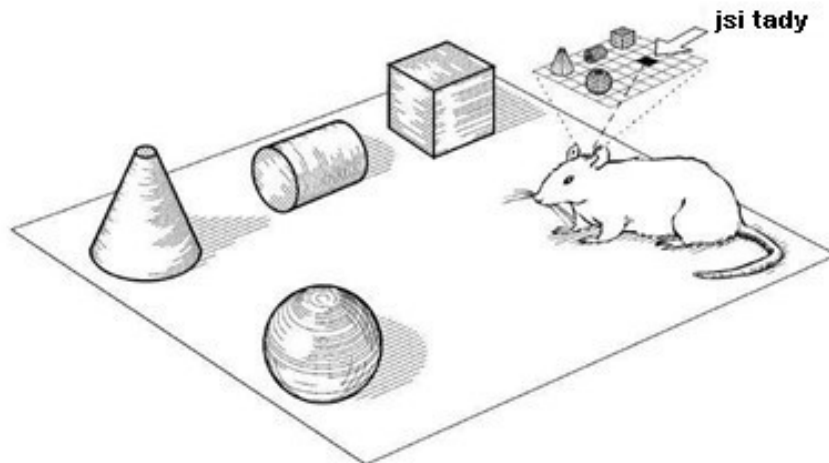
Jeden ze známých příkladů „episodic-like“ paměti u zvířat je dlouhodobější ukládání zásob potravy u ptáků. Od normální lidské episodické paměti se liší právě tím, že zde není možné posoudit osobní zkušenosti (Clayton and Dickinson, 1998; Clayton, Bussey and Dickinson, 2003). Sojky si v jedné z těchto úloh zapomatovaly, kde si který typ potravy

uschovaly a kdy si ho uschovaly a podle toho pak tyto skrýše vybíraly. Pokud jim byl k těmto zásobám na určitou dobu znemožněn přístup, tak se již k těm, které byly zkažené, nevrátily (Pravosudov and Clayton, 2002). U potkanů byl prokázán tento typ paměti například na pokusech s diskriminací různých typů potravy (Melcer and Timberlake, 1985) či u úloh s radiálním osmiramenným bludištěm, kde se sledovala schopnost rozlišení mezi informacemi 'co, kdy, kde' pomocí časových intervalů a s nimi spojených různých typů odměn v určitých ramenech bludiště. Potrava v různých ramenech byla doplňována podle toho, jestli uběhl krátký nebo dlouhý interval a potkani zde byli schopni si zapamatovat, který z intervalů uběhl a které rameno tedy mají navštívit, aby získali odměnu. Další částí bylo spárování jedné z lepších odměn, v tomto případě čokolády, s averzivním stimulem v první části. Zvířata pak po uplynutí dlouhého intervalu toto rameno navštěvovala mnohem méně, byť bez averzivního stimulu bývalo jejich nejčastější volbou (Babb and Crystal, 2005).

### **4.1.3 Prostorová orientace**

Již od antiky se vnímání prostoru snažili popsat velcí filosofové jako je Aristoteles. Ve 20. století se jako první o možné existenci tvorby kognitivních map zmiňuje Edward C. Tolman (1948), který trénoval potkany v bludištích na nalezení potravy. V této úloze ji byla zvířata schopna řešit nalezením jiné trasy i přesto, že jim byla umístěna překážka do původní trasy. Tímto byla poprvé demonstrována schopnost vnitřní reprezentace prostoru, díky které potkan byl schopný úlohu vyřešit i přes to, že znal pouze bludiště samotné bez přesně naučených tras. Avšak až roku 1978 byla na toto téma vydána studie, jenž byla sepsána na základě výzkumů kognitivních poruch u poškození hipokampu či pozorování aktivity hipokampálních neuronů při průzkumu prostředí (O'Keefe and Nadel, 1978). Tento koncept popisuje způsob neurální reprezentace fyzického prostoru v hipokampu a tedy i vlastní tvorbu kognitivní mapy (obr. 2) (O'Keefe and Nadel, 1978). Dalším důkazem zásadní role hipokampu v prostorové orientaci byl vliv lézí dorzální části hipokampu na výkon potkanů v Morrisově vodním bludišti. V této úloze jsou zvířata na určitou dobu dána do malého bazénu a musejí při plavbě nalézt ostrůvek, který je skrytý lehce pod hladinou a tedy pro ně neviditelný. Oproti zdravým potkanům byla u zvířat s lézí narušena schopnost nalézt tento skrytý ostrůvek (Morris, 1981).





Obr. 2. Model hipokampální reprezentace kognitivní mapy.

Upraveno podle Eichenbaum et al., 1999.

Nález **místních neuronů** velmi dobře vysvětlil zjištění poruch spojených s poškozením hipokampu (Eichenbaum et al., 1999). Díky nim a ostatním neuronům, které budou popsány níže, je potkan schopen se s použitím vizuálních vodítek v prostoru navigovat (navigace alothetická) a také díky spolupráci s entorhinální kůrou sledovat svoji trasu či pozici skrze vestibulární a proprioceptivní informace (navigace idiothetická) (Knierim, Kudrimoti and McNaughton, 1995). Pokud se zvíře navrací do stejného místa v prostoru, aktivuje se zde přesně ten samý neuron. Avšak i při absenci distálních prostorových vodítek tyto neurony vykazují určitou aktivitu (O'Keefe and Speakman, 1987) a proto se o reprezentaci prostoru přemýšlí jako o abstraktním konceptu, který není přímo závislý na určitém smyslovém vjemu (Knierim and Hamilton, 2011, review).

Všechny prostorové informace přichází do hipokampu skrze mediální entorhinální kůru a díky nim může potkan upravovat svoji představu o pozici v prostoru. Naopak skrze laterální entorhinální kůru získává informace o jednotlivých věcech z externího prostoru. Obě tyto informace se setkávají v dentálním gyru a dále pokračují do oblasti CA3, kde jsou sjednoceny právě do známé reprezentace 'Kde? Kdy? Co?' (McNaughton and Morris, 1987; McNaughton et al., 1989). Při změně určitých částí prostoru dojde k tzv. "přemapování", kdy se aktivita určitých neuronů reprezentujících tuto změněnou část upraví či třeba i úplně ustane a zaktivují se v tomto místě naopak neurony jiné (Muller and Kubie, 1987).

Obrovský nárůst aktivity místních neuronů se objevuje vždy v určité části prostředí, hlavně tedy u objektů, které tvoří důležité orientační body. Kromě polohy v prostoru také mohou tyto neurony reprezentovat rychlost pohybu, která je s informací o poloze v prostoru úzce spojena (McNaughton et al., 1983). Aktivita místních neuronů se obvykle sleduje pomocí vnořených elektrod extracelulárním nahráváním akčních potenciálů pyramidálních neuronů v oblastech CA1 a CA3 u volně se pohybujících potkanů (Fox and Ranck, 1975). Jejich distribuce je nezávislá a tak mohou dvě u sebe ležící buňky reprezentovat jak přilehlé, tak vzdálené prostorové body (O'Keefe et al., 1998).

Jako další mají svoji nezastupitelnou roli v prostorové orientaci **neurony směru hlavy** („head-direction cells“). Ty nereagují na samotnou polohu v prostoru, ale pouze na směr, kterým se hlava zvířete otočí a fungují tedy jako jakýsi kompas (který ovšem nereaguje na magnetické pole Země). Tato informace je pouze alocentrická a sama o sobě k navigaci nepostačuje. S místními buňkami jsou úzce propojeny a jejich společnou aktivitu je možné sledovat v některých případech dokonce i při remapování (Knierim, Kundrimoti and McNaughton, 1995). Nalezneme je hlavně v postsubikulu, nucleu anterodorsalis thalamu, corpora mammillaria a posteriorním neokortexu (Taube, 1998).

Další ze složek podílejících se na tvorbě kognitivních map je entorhinální kůra a její **mřížkové buňky** („grid cells“). Prostorová orientace byla dlouho spojována pouze s aktivitou uvnitř hipokampu. Až při nahrávání projekčních neuronů projikujících do II. a III. vrstvy pomocí implantovaných elektrod v entorhinální kůře zde tato aktivita při exploraci prostoru tvořila pravidelnou šestihrannou mřížku (Fyhn et al., 2004). Tento vzor, který signál buněk tvořil, svědčí o tom, že slouží jako metrický systém prostorové orientace a tvoří charakteristiku testovaného prostoru (Hafting et al., 2005). Charakteristika této reprezentace byla definována podle tří parametrů, mezi které patří rozestupy mezi jednotlivými poli, sklon mřížky vůči referenční ose neboli orientace a jako poslední prostorová fáze, kterou tvoří posun po osách x nebo y vůči danému referenčnímu bodu.

#### **4.1.4 Vybrané úlohy testující prostorovou orientaci**

Jednou z hlavních úloh pro testování prostorové orientace je Morrisovo vodní bludiště (Morris, 1981). V této úloze musí potkan nalézt skrytý ostrůvek v bazénu naplněném zakalenou vodou s použitím prostorových vodítek v okolí. Zdravý jedinec se velmi rychle

naučí, kde se ostrůvek nachází, a ať už je vypuštěn z jakéhokoliv místa, tak plave přímo k ostrůvku. Tento typ testování prostorové navigace umožňuje zkoumat jak krátkodobou pracovní paměť (zvířatům se mění poloha ostrůvku každý den) tak paměť dlouhodobou (neměnná poloha ostrůvku po celou dobu testování). Silná závislost této úlohy na prostorových komponentách byla prokázána například na testech potkanů s oboustrannou lézí hipokampu, kdy zvířata tuto úlohu nebyla schopna řešit, což podporuje teorii kognitivních map (Morris, 1982). Tento typ úlohy byl dokonce přizpůsoben i pro lidi a je znám pod názvem „Blue velvet arena“.

Mezi další z využívaných testů patří otáčející se kruhová aréna (neboli Kolotočové bludiště), která slouží také převážně pro testování potkanů (Bureš et al., 1997). Je analogem situací, kdy musíme rozlišit mezi pohybujícím se okolím a prostředím okolo nás, které je vůči nám stabilní, jako je tomu například při letu letadlem či při řízení auta. Orientační body jsou zde rozděleny na dvě části - část v rámci arény (prostorová vodítka která se otáčí spolu s arénou) a část v rámci místnosti (stálá prostorová vodítka, která jsou stabilní). Zvíře se zde musí aktivně pohybovat a naučit se rozlišovat mezi těmito dvěma skupinami prostorových vodítek, aby se vyhnulo averzivnímu stimulu (Cimadevilla et al., 2000b). Část této arény (obvykle 60 stupňů široká výseč), která je pro zvířata neviditelná, se značí jako averzivní sektor a při vstupu do něj potkan obdrží slabý elektrický šok. To ho nutí se zorientovat v prostoru, vymezit si polohu tohoto sektoru a aktivně se mu vyhýbat. Tato oblast může být stabilní v rámci místnosti, otáčet se spolu s arénou a u některých modifikací úloh dokonce může být kombinace těchto dvou typů sektorů.

Jeden z často používaných typů úloh na této aparatuře se nazývá „aktivní alothetické vyhýbání se místu“ neboli AAPA („active allothetic place avoidance“). Tato úloha se využívá k testování prostorového učení a schopnosti segregace informací. Zde je averzivní sektor stabilní v rámci místnosti, aréna se otáčí a tak potkan vždy jednou za čas musí popoběhnout, aby se vyhnul averzivnímu stimulu. V rámci prostoru se musí řídit pouze distálními vodítky, které tvoří objekty v místnosti a musí ignorovat vodítka uvnitř arény (své vlastní pachové stopy). Na této aparatuře jsou testovány rozsahy kognitivních poškození u lézí konkrétních mozkových oblastí (Cimadevilla, Wesierska, et al., 2001; Wesierska et al., 2009) či vlivy aplikací různých agonistů či antagonistů (Stuchlik et al., 2008; Stuchlik and Vales, 2009; a další).

#### **4.1.5 Paměť na uspořádání událostí v čase**

Zapojení hipokampu v časovém uspořádání událostí vychází z jedné z jeho základních funkcí - tvorby a znovuvybavení vzpomínek (Eichenbaum et al., 2007). Jeho role v časovém uspořádání byla zkoumána na dvou hlavních modelech a to na paměti pro pořadí a na schopnosti rozdělit a správně zařadit překrývající se události (Eichenbaum, 2012). Hipokampus se aktivuje při učení sériového pořadí v čase bez ohledu na to, jestli si je zvíře vědomo své paměti pro sekvence. Tato skutečnost svědčí o tom, že aktivace hipokampu odráží proces tvorby časové organizace událostí (Schendan et al., 2003). Jednou z testovaných úloh u potkanů bylo naučení pořadí, ve kterém mají strkat čumák do určitých míst, aby zde získala odměnu v podobě trošky vody. V této úloze selektivní poškození hipokampu narušilo tento naučený komplex sekvencí (Ergogul and Eichenbaum, 2006).

Kromě toho, že se v hipokampu paměť na pořadí tvoří, máme důkazy také o následném přehrávání této informace. Pokud potkan opakovaně prochází stejným prostředím, kdy se vždy popořadě aktivovaly stejné místové neurony, je dokázáno přehrávání těchto sekvencí jak ve spánku tak při plné bdělosti (Karlsson and Frank, 2009). Toto přehrávání v hipokampu je rovněž synchronizováno s přehráváním v kortikálních částech (Ji and Wilson, 2007).

Existují dva možné modely organizace událostí v čase. Soubory neuronů mohou reprezentovat pořadí v čase tvorbou řetězců tvořících signál. To se děje pomocí zvyšování počtu přímých spojů mezi neurony, které představují podobné časové události (Jensen and Lisman, 2005; Mehta et al., 2000). Druhý model představuje hipokampus jako strukturu, k jejíž neuronální souborům, které vždy reprezentují daný časový úsek, se vždy vzpomínky z dané doby navážou (Levy, 1989; Wallenstein et al., 1998).

#### **4.1.6 „Time cells“**

Tyto neurony vykazují aktivitu založenou na podobném principu jako „place cells“ avšak detekují čas generováním signálu v určitých momentech časového úseku stejně jako místové neurony generují signál v určitém místě. Tím reprezentují plynutí času a pořadí u specifických vzpomínek (Eichenbaum, 2014). Jejich aktivita je spojena s aktivitou místových buněk, některé neurony se dokonce aktivují jak v rámci časové, tak i prostorové informace. Podobně u nich můžeme pozorovat tzn. „re-timing“ což je proces podobný „re-mapping“ u

místových neuronů a dochází při něm k upravení aktivity při změně sekvence (MacDonald et al., 2011). Jejich funkce byla testována u úloh s běhacím kolem v úloze prostorové alternace (Pastalkova et al., 2008). Sledovala se zde aktivita neuronů, které kódovaly ubíhající čas i při stabilní poloze potkana. Testování prokázalo hlavní roli oblasti CA1, která propojuje časové úseky. V jednom z těchto testů se potkani učili spojení mezi specifickými objekty a pachy, které od sebe byly odděleny 10 sekundovým intervalem. K propojení těchto asociací s časovým oknem je vyžadována aktivita oblasti CA1, ale ne CA3 (Kesner et al., 2005). Na to navázala studie McDonalda et al. (2011) a prokázala, že se tyto neurony aktivují na krátké momenty v sekvencích a dohromady vyplňují tento prázdný interval mezi dvěma objekty.

Určitá role hipokampu v časování se spojuje se "Striatal beat frequency" (SBF) modelem intervalového časování. Zde se jeho role popisuje jako zpětnovazebný kontrolní mediátor (Meck, 1988), který neustále aktualizuje funkci paměti v rámci specifických intervalů. Na to poukazuje například zrychlené vnímání času u potkanů s lézemi hipokampu (Buhusi et al., 2004). Druhá možná funkce hipokampu v tomto modelu je jeho schopnost regulovat určité populace striatálních ostnatých neuronů (Matell and Meck, 2004) na což poukazují i prokázaná četná propojení těchto oblastí.

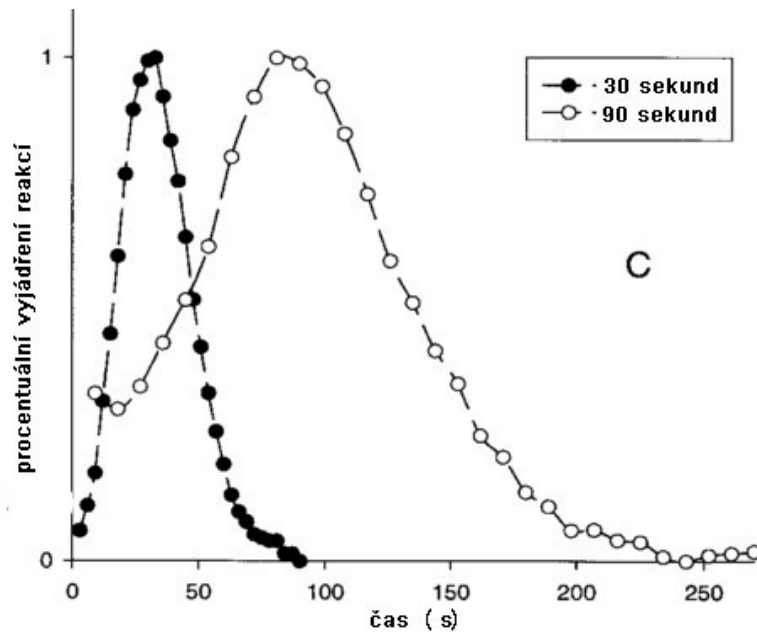
## **4.2 Percepce času**

U každého živočicha se v průběhu evoluce vyvinuly různé neurobehaviorální mechanismy umožňující vnímání času. Pohybují se od měření času v rámci milisekund, které je spíše perceptivní a automatické, až po vnímání časových úseků v rámci několika let, mnohdy také fungují i jako stopky. Díky tomuto obrovskému rozmezí se vnímání rozdělilo podle délky intervalů a každý typ zde zařizují odlišné mechanismy (Hinton and Meck, 1997). U intervalů trvajících roky či měsíce má živočich možnost využít periodického střídání teplot, světla či třeba délky dne, ale pro kratší intervaly, které již takto reprezentovány být nemohou, se vyvinuly tzn. vnitřní hodiny. Díky nim vnímáme plynutí času a napomáhají nám při jakékoliv každodenní činnosti. Typ časování, který tento systém zajišťuje, se nazývá intervalové časování a zpracovává sekundové až minutové intervaly. Jako poslední můžeme ještě zmínit časování milisekundové, které ovlivňuje hlavně motorické schopnosti, řeč či vnímání hudby (Buhusi and Meck, 2005).

### 4.2.1 Intervalové časování

Tento typ časování se zabývá konkrétně intervaly od stovek milisekund až po minuty. Stále se ovšem přesněji neví, jak tento systém funguje a jeho lokalizace v mozku na rozdíl od milisekundového a cirkadiálního časování také není přesná. U zvířat v přírodě napomáhá různým činnostem od shánění potravy na konkrétních místech v určitou dobu až po lov kořisti, kdy je potřeba přesné načasování reakcí (Gibbon et al., 1997).

Pozorované chování v laboratoři se spojuje hlavně s asociativním učením, které definujeme jako tvorbu asociací mezi událostmi, které jsou nějak spojené. Studium intervalového časování u zvířat je zaměřeno hlavně na operantní úlohy používající fixní interval s následnou odměnou. Zde musí zvíře po uplynutí určitého časového intervalu, jehož začátek je obvykle reprezentován vizuálním či auditorním signálem, vykonat určitou činnost (např. zmáčknutí páčky) a po jejím vykonání přichází odměna. Podobným experimentálním designem je "peak interval" (PI) procedura, kde po naučení zvířete na odměnu za zmáčknutí páčky po daném časovém úseku je tato odměna odstraněna. Pak se zde na grafu sleduje zakřivení křivky počtu reakcí zvířete v době původního naučeného intervalu na odměnu (obr.3) (Meck and Buhusi, 2010). Kromě klasických úloh sledujících jeden interval se využívá i překrývajících se intervalů. Dokonce i v tomto případě jsou zvířata schopna aktivovat vnitřní hodiny kdykoliv, kdy jsou vystavena důležitému signálu značícímu začátek dalšího intervalu i přesto, že již sledují interval jiný. Testují se i typy úloh s přerušením tohoto intervalu (tzn. gap trials) u kterých potkani využívají toho, že 'zastaví' své vnitřní hodiny a po ukončení mezery je zase obnoví. Těchto procedur se může využívat i při testování lidí, u kterých se narušení tohoto typu časování prokazuje v souvislosti s určitými neurodegenerativními onemocněními jako je Parkinsonova choroba či se může vyskytovat u stárnoucích jedinců (Lustig and Meck, 2001; Harrington and Haaland, 1991).



Obr. 3. Graf naučené odpovědi potkanů na signál v kontrolní části PI procedury, která je bez odměny. Zobrazena je zde křivka naučené odpovědi na odměnu po 30 s a 90 s.

Upraveno podle Mattel and Meck, 2000.

Velkou roli při testování a všeobecně u fungování vnitřních hodin hrají různé fyziologické faktory. Každý určitě zažil situaci, která byla nějakým způsobem nebezpečná a kterou si pomatuje, jako kdyby se udála zpomaleněji, než tomu bylo doopravdy. Zkreslení odhadu času také může vytvořit zpomalené přehrávání scén. Intervaly pak vnímáme jinak, než je náš systém zvyklý. Tento fakt svědčí pro existenci a konstantní kalibraci vnitřních hodin vůči dění v okolním prostředí (Eagleman, 2004).

U intervalů, které jsou značeny vizuálně, závisí na místě, kde se tento signál objeví a tedy pak i na zrakovém poli, ve kterém je prezentován. Jedná se zde o rozdíl mezi levostranným a pravostranným zrakovým polem, neboť v prvním je stimul a následný časový úsek podhodnocovaný a ve druhém naopak (Vicario et al., 2008).

#### 4.2.1.1 Vybrané teorie intervalového časování

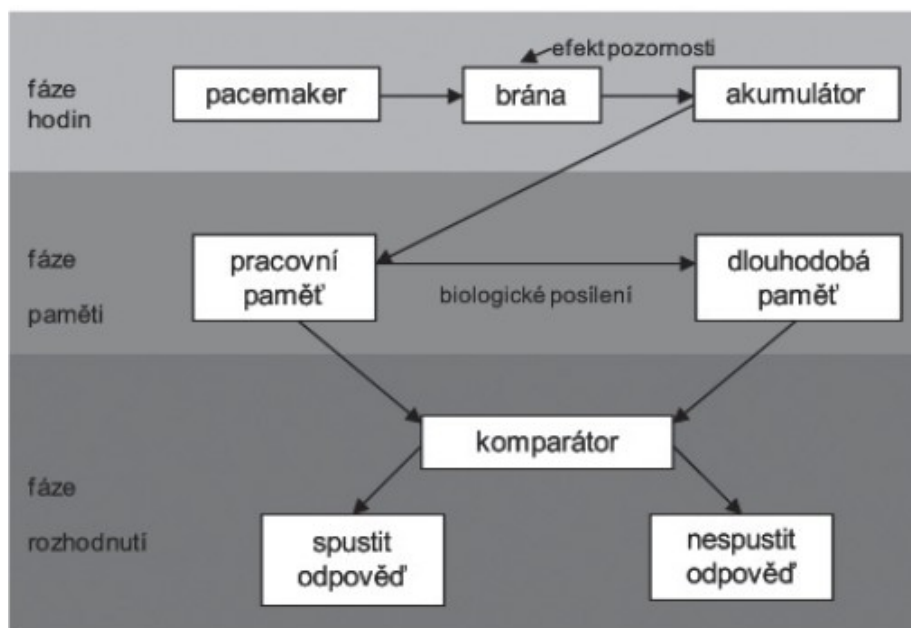
V dnešní době nalezneme mnoho teorií o tom, jak přesně intervalové časování funguje. Zde jsou představeny pouze některé z nich. Všechny zde blíže popsání teorie patří do tzn. teorií se zapojením vnitřních hodin, avšak v literatuře je možné nalézt i několik teorií,

kteře s existencí vnitřních hodin nepracují. Mezi ně patří například model měření času dle vývoje stavu neurálních sítí či různé paměťově založené modely.

Vnitřní hodiny zde slouží k posouzení délky určité události nebo intervalu mezi nimi. Mohou je ovlivnit emoce daného jedince, hlubké soustředění nebo soustředění se na zrychlené či zpomalené tikání. Proto nám v určitých momentech čas běží jako splašený nebo se naopak táhne, jak kdyby daný okamžik nikdy neměl zkončit.

Mezi jednu z nejranějších teorií, která předpokládá existenci vnitřních hodin, můžeme zařadit **teorii neuronálních oscilátorů** (tzv. scalar expectancy theory, SET). Ta je založena na aktivitě neuronů a jejich fixních hodnotách, které slouží jako měřítko pro ostatní funkce. Původně sloužila tato teorie jako rozšíření Weberova pravidla o smyslovém vnímání k vysvětlení časováním ovládaných akcí (Gibbon 1977). Tato teorie vychází z předpokladu spolupráce tři abstraktních částí - pacemakeru (vnitřních hodin), akumulátoru (reprezentující paměť) a komparátoru (reprezentující rozhodnutí) neboli porovnávače. Hodiny zde generují pulzy, které reprezentují časové intervaly, které pak akumulátor uskladňuje v pracovní paměti do té doby, než se určitá část pulzů z pacemakeru převede z pracovní paměti do dlouhodobé (obr. 4). To se děje po dalším vystavení stejnému signálu. Odpověď zajišťuje komparátor tím, že porovná tento interval uschovaný v referenční paměti (v podobě počtu pulzů) s intervalem v akumulátoru (Oprisan and Buhusi, 2014). Ve chvíli, kdy vnější čas, neboli počet pulzů, je stejný s časem dříve zapomatovaným, nastává fáze rozhodnutí, tj. behaviorální odpovědi. Části tohoto systému fungují odlišně a tím tvoří zdroj variability. Pravděpodobnost těchto variabilit není stejná pro různé části systému a díky tomu se tvoří jejich skalární vlastnosti (Gibbon et al., 1984). Při nižším soustředění či při věnování pozornosti jiné činnosti se může odhad času také o něco změnit. V důsledku interference, kdy se jedinec věnuje více podnětům najednou, některé pulzy nejsou zaznamenány a tak se nahromadí menší počet pulzů a časový interval je hodnocen jako kratší (Brown, 1997; Brown and Boltz, 2002).





Obr. 4. **Model vnitřních hodin.** Znárodnění modelu funkce vnitřních hodin. Měření času v tomto modelu je zajišťováno generátorem pulzů (pacemakerem) a akumulátorem, které v pravidelných intervalech vysílají a počítají pulzy. Pokud počet pulzů dosáhne určité zapamatované (v minulosti posílené a naučené) hodnoty, spustí se behaviorální odpověď.

Převzato z Dusek and Jech, 2011.

Mezi novější teorie založené na existenci vnitřních hodin patří například “**Behavioural timing theory**” (Killeen and Fettermann, 1988). Pulzy z pacemakera zde zajišťují přechody mezi stavy, které mají vztah k určitému přídatnému chování. To slouží jako diskriminační stimul, který může odpověď pozastavit, poslat dál nebo přerušit. Každý tento stav je asociovaný s různou délkou trvání. Díky tomu pak jedinec v rámci vhodného prostředí nastavuje odpověď. V praxi to vypadá tak, že pokud je zvíře zastaveno a má se rozhodnout mezi krátkým či dlouhým intervalem, tak vybere ten, který byl při minulých pokusech v dobu zastavení zvířete více posilován (Bizo and White, 1994).

Populární teorie intervalového časování jsou založeny na opakování vzorců aktivity neurální sítě, což umožňuje identifikaci uběhlého času. Jednou z prvních takto pojatých teorií byla navržena Maukem a jeho spolupracovníky ve spojení s mozečkem. Tento model předpokládá zapojení několika vrstev, které jsou propojeny a kde mohou neurony nepřímo zpětně ovlivňovat samy sebe (Buonomano and Laje, 2010).

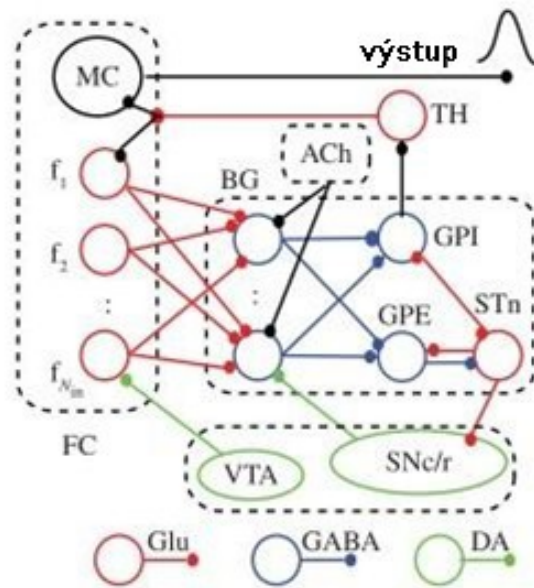
Další z novějších odlišných teorií pochází od prof. Mecka a jeho spolupracovníků, kteří zavedli tzv. „**Striatal beat frequency model**“ (SBF model). Časování kóduje náhodná aktivace striatálních neuronů, neboli tzv. pulzy, které překrývají větší rozmezí trvání než jednotlivé neurony (Miall, 1989). Aktivaci zde zajišťuje kortikální neurální oscilátor. Tento typ vnímání času je brán jako produkt rozmanitých a vzájemně se doplňujících mechanismů a stejné neuroanatomické struktury pak tedy mohou využívat rozdílné mechanismy intervalového časování.

Za zmínku určitě stojí i teorie, které předpokládají existenci vnitřních hodin, ale systémy zde fungují na základě oscilátorů, ne akumulátorů, jako bylo popisováno výše. Pro popis všech teorií intervalového časování by ovšem bylo třeba vypracovat samostatnou práci, proto zde byly uvedeny jen některé.

#### **4.2.2 Neuroanatomie**

Časování různě dlouhých intervalů zajišťují odlišné mechanismy a existuje mnoho teorií o tom, jak přesně vlastně tyto systémy fungují. Na úrovni milisekund tvoří hlavní oblast intervalového časování mozeček a další specializované systémy po celém mozku, na úrovni sekund až minut je hlavní kortikostriatální a nigrostriatální okruh a časování nejdelších cirkadiálních intervalů zajišťuje hlavně autoregulace genových cyklů. Mechanismy vnímající intervaly od milisekund až po minuty se ovšem mohou doplňovat a tak určitý časový úsek může být reprezentován více jak jedním systémem (Meck, 2005). Zde je dobrým příkladem časování motorických akcí. Po provedení cerebrální léze bylo vnímání milisekundových intervalů narušeno vždy, avšak i u jedinců s lézi provedenou v částech mozku, které s tímto časováním nejsou spojovány, byly výsledky rozporuplné a i tyto léze určitý vliv na toto časování měly.

Hlavní částí, která zajišťuje intervalové časování, jsou **bazální ganglia** (obr. 5). Jejich léze jako jediná z lézí zcela vyřadí schopnost intervalového časování (Meck, 2006). Také nedávné experimenty zabývající se propojením bazálních ganglií se substantia nigra pars compacta prokázaly jejich stěžejní roli jak pro produkci časových intervalů, tak pro jejich percepci (Meck, 1996; Matell and Meck, 2004). V těchto studiích nebyli potkani s exitotoxicky navozenými lézemi striata či se selektivními dopaminergními lézemi schopni regulovat své odpovědi v rámci časování.



Obr. 5. **Neurální struktury zapojené v intervalovém časování podle SBF modelu.** Dvě hlavní části tvoří bazální ganglia a frontální kůra. Barevné spoje mezi oblastmi znázorňují dané neuromodulační cesty. MC - motorická kůra, FC - frontální kůra, BG - bazální ganglia, TH - thalamus, GPE - globus pallidus external, GPI - globus pallidus internal, STn - subthalamická jádra, SNc/r - substantia nigra pars compacta/reticulata, VTA - ventrální tegmentální oblast, Glu - glutamát, DA- dopamin, GABA - kyselina gaba-aminomáselná, Ach - acetylcholin

Upraveno podle Oprisan and Buhusi, 2014.

U SBF teorie je brán jako hlavní okruh zajišťující intervalové časování právě prefrontální kůra (PFC), striatum a thalamus (Matell, Meck and Nicolelis, 2003). Klíčovou komponentu zde tvoří **striatální ostnaté neurony** (medium spiny neurons, MSN). Ty mají mezi 10 000- 30 000 dendritickými trny, každý má nesmírné množství korových či thalamických afferentních spojů a jejich membránový potenciál závisí na míře těchto vstupů (Beiser and Houk, 1998). Shoda jejich získaných signálů se zapomatovaným intervalem v referenční paměti spouští signál, který pak putuje dále (Oprisan and Buhusi, 2014). Kromě těchto neuronů zde nalezneme také tři typy interneuronů, které modulují pravděpodobnost aktivity MSN (Coull, Cheng and Meck, 2011). Dorsální striatum slouží jako spojnice dopaminergních a glutamátergních vstupů a na jeho důležitou roli také poukazují výsledky elektrofyziologických studií, kdy se ukázala zvýšená aktivita striatálních neuronů v čase

očekávané odměny a po uplynutí tohoto času se zase snižovala (Matell et al., 2003). Poté, co je neurální výpočet proveden, vyšle dorsální striatum signál dalším oblastem bazálních ganglií a ty pošlou signál zpět do frontální kůry (např. motorické kůry) skrze thalamus. Tato kortiko-striatálně-thalamicko-kortikální smyčka tedy může být kritická pro intervalové časování, temporální integraci (Dale et al., 2010), plánování motorických akcí či pro pracovní paměť (Harrington et al., 2010). Léze další části tohoto okruhu, prefrontální kůry, pouze narušily temporální zpracování informace a zpomalily tak vnímání intervalů (Meck, 1984).

Hipokampus a jeho zapojení v intervalovém časování popisují studie s lézemi hlavních spojů hipokampu s ostatními strukturami- fimbrie a fornixu. Zde se prokázal pouze snížený čas vrcholu křivky v PI proceduře, variabilita časování ovšem zasažena nebyla (Meck, Church and Olton, 1984; Olton et al., 1987). To ukazuje na vliv hipokampu při ukládání reprezentace času do paměti.

Při studiu časování na úrovni milisekund je považován za hlavní a nejdůležitější strukturu mozeček. Avšak ne všechny studie na něj zaměřené toto prokázaly (např. Harrington et al., 2004) a tak se o přesném zapojení v časových procesech vedou četné diskuse. Déle známé je spíše jeho zapojení ve vnímání kratších sekundových intervalů, jak prokazuje větší část pokusů (Gooch et al., 2009; Mangels et al., 1998 a další). Hlavní aspekt, mající nejdůležitější vliv na výsledky experimentů, je vždy typ úlohy a způsob reprezentace signálu, který udává začátek časového intervalu.

### **4.2.3 Neurální mechanismy**

**Dopaminergní systém** má u intervalového časování svoji nezastupitelnou roli. Jedná se zde hlavně o aktivitu samotného D2 receptoru spíše než o proces syntézy dopaminu, neboť podávání prekursoru dopaminu L-DOPY či AMPT, což je naopak blokátor přeměny tyrosinu na L-DOPU, nemělo vliv ani na subsekundové ani na suprasekundové časování (Rammsayer 1989 a,b; Rammsayer and Vogel, 1992). Rozdílné výsledky s podáváním různých antagonistů D2 receptorů poukazuje na zapojení především nigrostriatálního okruhu. Sulpirid či remoxiprid blokují výhradně D2 receptory mezolimbického systému a měly tedy nepatrný vliv na intervalové časování. Oproti nim haloperidol, který blokuje všechny dopaminergní dráhy včetně nigrostriatálního systému, tento typ časování ovlivnil (MacDonald and Meck, 2005).

U potkanů byl v časových pokusech prokázán efekt DA agonistů (např. metamfetaminu či kokainu) zrychlením vnímání času. Zde jejich vliv zapříčiní to, že se nahromadí stejné množství pulzů v kratším intervalu a vnitřní hodiny pak vnímají stejný interval rychleji. U PI procedur se tedy v grafu projeví posunem křivky reakcí vlevo (Matell, King and Meck, 2004). Naopak DA antagonisté měli vliv zpomalující (Coull, Cheng and Meck, 2011). Míra zpomalení zde závisí hlavně na afinitě farmaka k D2 receptorům. Manipulace pomocí těchto látek tedy ovlivňují chování na úrovni vnitřních hodin. Vliv těchto farmak je ovšem viditelný pouze při akutnímu vystavení látce, při chronickém podávání se systém přizpůsobí novému vnímání, upraví počet pulzů pro daný interval a ty jsou pak v rámci vlivu dané látky nastaveny správně. Po ukončení chronické expozice se naopak křivka grafu posune opačným směrem, než organismus přenastaví své vnitřní hodiny podle normálního vnímání intervalů bez vlivu látky. Dalším důkazem vlivu dopaminergního systému na intervalové časování u myši s delecí genu pro dopaminový transportér je jejich neschopnost časové reprezentace (Meck et al., 2011).

Oproti tomu **cholinergní systém** ovlivňuje spíše ukládání do paměti a aktivitu bazálních ganglií než samotné vnitřní hodiny. Změna zde není patrná ihned po podání látky jako u dopaminergních D2 agonistů či antagonistů, ale až u chronického podávání. Cholinergní látky snižující synaptickou účinnost acetylcholinu, zpomalují tedy vnímání času a naopak. Antagonisté jako je například atropin posunou v grafu křivku vnímání času doprava a naopak agonisté jako physostigmin způsobí její posun doleva (Meck, 1983; Meck and Church, 1987). Naruší se zde rychlost přenosu informace z akumulátoru nebo z pracovní paměti což způsobí toto zrychlení či zpomalení (Meck and Church, 1987). Podobná narušení mohou způsobit i neuropatologická onemocnění či změny v mozku způsobené stárnutím (Lustig and Meck, 2001).

Ač toto propojení není stále přesně objasněno, některé studie pracují s kombinacemi agonisty dopaminu a antagonisty NMDA receptorů. Po přetrénování zvířat a vytvoření zvyku se tvoří snížená reakce na modulaci dopaminergního systému. Avšak při použití výše popsané kombinace se tato necitlivost sníží a ukáže se mnohem viditelnější posun křivky. To poukazuje na spolupráci dopaminergních a glutamatergních systému a vzniku stavů snížené citlivosti na dopamin a také na zapojení glutamatergního systému při tvorbě zvyku, závislosti či právě také u intervalového časování (Cheng et al., 2006; Kalivas, 2009).

V úlohách testujících intervalové časování se také často můžeme setkat s použitím halucinogenů. Tyto studie se provádějí převážně na lidských subjektech, četné jsou například studie s psilocybinem či tetrahydrocannabinolem (THC). V animálních studiích THC jakožto aktivní látka marihuany například u holubů způsobila posun křivky grafu PI procedury doprava. Chování sledované u potkanů v jiném pokusu s PI procedurou prokázalo stejný posun křivky grafu a prokázalo se zde tedy prodloužení reakčního času. V tomto samém pokusu se prokázal i opačný vliv antagonisty kanabinoidních receptorů a posun křivky grafu byl tedy naopak více doleva oproti původní křivce (Han and Robinson, 2001).

### **4.3 Časoprostorová integrace**

Podobně jako se jedinec musí orientovat v prostoru se musí orientovat také v čase. Tato orientace tvoří nezbytný aspekt 'Co? Kdy? Kde?' pro formování episodické paměti (Tulving, 1983). Kromě prokázaných spojů striata a hipokampu patří mezi hlavní objevy v integraci těchto dvou informací časových neuronů v hipokampu. To jsou neurony podobné místovým neuronům, které na rozdíl od nich kódují specifický moment v prostoru. Některé mají dokonce schopnost vnímat jak časovou, tak prostorovou informaci. Tímto se utváří spojnice mezi pamětí, časovou organizací vzpomínek v čase a prostorovou orientací. Hipokampus tedy tvoří časoprostorový základ vzpomínek svoji schopností tvořit prostorová a časová pole vznikající při učení (Eichenbaum, 2012). „Place cells“ mimo funkce popsané výše mají schopnost začlenit do své aktivity informace o budoucnosti či minulosti (Frank et al., 2000) a také „time cells“ jsou schopny kódovat i prostorovou informaci.

Poškození hipokampu a jeho vliv na prostorovou orientaci je relativně přesně popsány. Ohledně časování se však tyto výsledky jeví často rozporuplně. U skupiny potkanů s lézemi hipokampu se projevil posun křivky grafu v PI proceduře doleva (Meck et al., 1984; Buhushi et al., 2004) avšak u skupiny, která zahrnovala rozsáhlé učení až po vytvoření léze, se tento efekt neprokázal (Dietrich, Allen and Bunnell, 1997; Dietrich and Allen, 1998). Tento rozdíl ale může být způsoben právě tímto rozsáhlým tréninkem, neboť je zde možné vytvoření zvyku a tedy tzv. 'uzamčeného' stavu. Tento případ byl popsán už u pokusů s farmaky, kdy v tomto stavu farmaka neměla svůj obvyklý účinek, neboť se tato funkce, kterou obvykle vykonává hipokampus, přesunula do jiných částí mozku jako je třeba kůra (Wiltgen and Silva, 2007; Wiltgen et al., 2010).

#### **4.3.1 Experimenty sledující integraci časové a prostorové informace**

Experimentální pozorování těchto dvou neoddělitelných složek je hlavně u zvířat relativně novou záležitostí. Více pokusů se na něj zaměřuje teprve od objevu „time cells“ v hipokampu, do té doby se vědělo pouze o jeho funkci při časovém řazení událostí. Mezi jeden z nejčastěji zmiňovaných pokusů patří experiment Krause et al., který sledoval aktivitu hipokampálních neuronů u potkanů, kteří běží na pohybujiícím se pásu. Zde pozoroval zvýšenou aktivitu hlavně při integraci časové informace s uběhlou vzdáleností (tvořící prostorovou část). Prokázala se rozdílná aktivita určitých neuronů - některé skupiny reagovaly spíše na informaci o uběhlé vzdálenosti, jiné naopak reagovaly na informaci časovou a objevila se zde i skupina, která reagovala přibližně stejně na obě dvě informace (Kraus et al., 2013).

V jiné studii byla nahrávána aktivita hipokampálních neuronů při pohybu potkana v bludišti. Také zde je možné pozorovat prostorovou i časovou aktivitu neuronů. Při „off-line“ periodě, mezi které patří například spánek, můžeme u místových neuronů pozorovat přehrávání sekvencí aktivity, které je časově řazeno. Přerušování tohoto přehrávání má za následek zhoršení prostorové paměti z dané přehrávané vzpomínky (Jadhav et al., 2012).

Odlíšný typ těchto úloh naopak testuje zapojení jednoho či druhého kódování v situacích, kdy spolu tyto dva typy soutěží. Myši zde plnily úlohu v bludišti, kde při hledání alternativní cesty k odměně buďto využívaly vzdálených prostorových ukazatelů či musely zopakovat přesné pořadí otoček svého těla. Aby se zjistilo, kterou ze strategií dané zvíře používá, umístilo se do nového bludiště a sledovalo se, jakou strategii v tuto chvíli využije. Tato studie prokázala, že aktivita hipokampálních neuronů může signalizovat buďto sérii známých pozic či naopak replikovat přesnou sekvenci akcí podle toho, jakou strategii zvíře zvolí (Cabral et al., 2014).

#### **4.3.2 Interakce prostorového a časového kódování**

Místové buňky stejně jako „time cells“ mohou kódovat i jiné důležité zkušenosti. Při odlišných podmínkách, které jsou důležité pro konkrétní chování, „place cells“ reagují nejenom na prostorové informace (vzdálenost, směr, poloha v prostoru), ale také na neprostorové podněty (například pach v určitém místě) či na různé podněty vyžadující akci (Ravassard et al., 2013; Komorowski, Manns and Eichenbaum, 2009; Lenck-Santini, Fenton

and Muller, 2008). Proto je třeba o neuronech hipokampu smýšlet jako o multisenzorických, tedy že kódují nejenom prostor a čas, ale také ostatní důležité vlastnosti dané události, které jsou základem epizodické paměti.

Pokud se potkan pohybuje v bludišti a tedy v prostoru a čase, aktivují se hipokampální neurony na obě tyto informace. Stejně jako již bylo popsáno výše, je možné sledovat aktivitu „place cells“, které si v klidové fázi ‘opakují’ v určitých časových frekvencích dané lokace, který ten den navštívilo (Jadhav et al., 2012). Stejně tak mohou tyto neurony volit mezi tím, kterou informaci v dané úloze budou vnímat, jako tomu bylo u volby mezi naučenou trasou a mezi určitým počtem obrátů těla v bludišti při hledání alternativní cesty (Cabral et al., 2014). Všechny tyto nálezy, včetně schopnosti organizovat události v čase, prokázaly zapojení hipokampálních neuronů v organizaci časových i prostorových aspektů zkušeností (Eichenbaum, 2014).

### **4.3.3 Možné zapojení hipokampu v SBF okruhu**

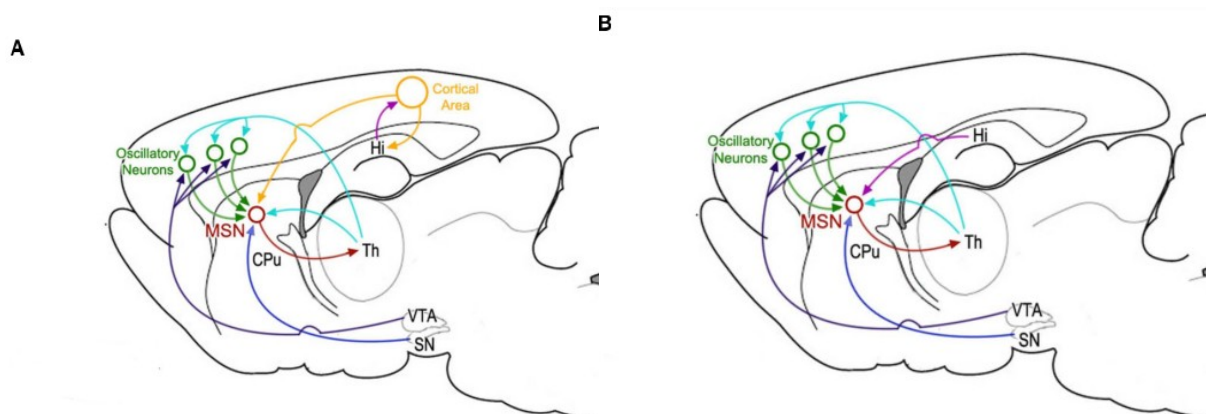
Jedním z novějších teorií mechanismů fungování intervalového časování je právě SBF model. Vzhledem k výše popsané důležitosti hipokampu v časových událostech a propojení těchto událostí s prostorovou informací se k tomuto modelu váže několik teorií, jakou roli zde vlastně hipokampus má a jakým způsobem tento okruh může ovlivňovat. První možnou funkci může zastávat tím, že kontroluje skrze zpětnou vazbu. Víme zde o existenci určitých korových oblastí, které mají své zapojení jak v kortikostriatálním, tak v frontohipokampálním okruhu. Ty regulují paměť a zároveň jsou propojeny se striatálními MSN (obr. 6A). Toto možné propojení podporuje i fakt, že hipokampální léze povětšinou způsobují posun křivky grafu PI procedury doleva, zatím co léze v popisovaných korových oblastech mají vliv na tento posun opačný (Meck et al., 1978; MacDonald and Meck, 2004).

Další možnou funkcí, kterou může hipokampus v rámci časování vykonávat, je funkce regulační. Vzhledem k již dříve prokázanému propojení hipokampu a striata zde jeho signál může regulovat práh aktivace MSN (Matell and Meck, 2004). Tyto neurony zaujímají dva stavy - jeden z těchto stavů skoro nedovoluje neuronům tvořit signál a druhý má funkci opačnou a tvorbu signálu podporuje. Z jednoho do druhého stavu se přechází právě díky excitačním vstupům těchto neuronů (Carter, Soler-Llavina and Sabatini, 2007). Hipokampus zde může desenzibilizovat membránu AMPA receptorů MSN například při začátku nového



signálu, který je potřeba vnímat v čase. Druhou možnou cestou je tonická inhibice a následné snížení prahu membránového potenciálu MSN (obr. 6B). V tomto případě by se při absenci hipokampální inhibice vnímání času zrychlilo a křivka grafu by se posunula doleva (Yin and Troger, 2011).

Poslední z teorií popisuje hipokampus jako regulátor jak rozhodování, tak i jako regulátor následných motorických reakcí. Vykonání motorické akce je zde závislé na výstupech vycházejících z vnitřních hodin, v případě SBF modelu se jedná o závislost na míře aktivity striatálních neuronů, a také na prahových hodnotách aktivit jiných částí mozku (Gibbon et al., 1997; Jin et al., 2009). Mezi ty může patřit ventrální či dorsomediální striatum, orbitofrontální kůra či hipokampus (Johnson et al., 2007). Bylo také prokázáno, že hipokampální theta rytmus synchronizuje aktivitu určitých neuronů striata (Berke et al., 2004). Mohl by tedy tímto způsobem, nejpravděpodobněji skrze inhibice, kontrolovat sled akcí (Yin and Troger, 2011).



Obr. 6. Grafické znázornění prvních dvou možných funkčních propojení hipokampu v rámci SBF modelu intervalového časování: **(A)** Modulace přes frontohipokampální okruh. Hipokampus aktualizuje a zpřesňuje časové očekávání v jednotlivých korových oblastech a poté tuto informaci předává striatálním neuronům. **(B)** Hipokampus ovlivňuje práh aktivace MSN buďto tonickou inhibicí nebo fázickou aktivací.

Převzato z Yin and Troger, 2011.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Cíle

Cílem této práce bylo:

- Vyvinout úlohu, která umožní v určité míře disociovat časové a prostorové strategie a manipulovat s nimi.
- Studovat strategie, kterou zvířata používala v úloze AAPA v 'temné' části pokusu.
- Studovat vliv látek na časovací strategii a zjistit optimální dávky tak, aby ovlivnily primárně časové systémy, zatímco prostorová strategie zůstane intaktní.

## **5.2 Metodika**

### **5.2.1 Zvířata**

Pro experiment 1, který byl pokusem pilotním, bylo použito 8 samců kmene Long-Evans a v experimentu 2 bylo použito 16 samců kmene Long-Evans. Potkani pocházejí z akreditovaného chovu Fyziologického ústavu Akademie Věd České Republiky v.v.i. Po 2. měsíci věku byli potkani přesunuti do zvěřince laboratoře Neurofyziologie paměti, ve které probíhal experiment, a následovalo 14 dní navykací periody. Samotný pokus byl u obou skupin prováděn ve věku 3-4 měsíců. Potkani byli rozděleni do boxů po třech, případně po čtyřech zvířatech. Potkani měli po celou dobu experimentu neomezený přístup k vodě a krmení (standardní krmivo). Vlhkost a teplota (22 °C) byly konstantní. Fáze světla a tmy se střídaly po 12 hodinách (světelná fáze v 6:00-18:00). Po uplynutí 14denní periody bylo každé zvíře 5 minut denně navykáno na manipulaci experimentátorem a to po dobu tří dnů. Pokus i veškeré další manipulace se zvířaty (vážení, kontrola zdravotního stavu, aplikace látek) probíhala ve světelné fázi dne přibližně ve stejnou dobu. Vážení proběhlo na začátku pokusu a v den habituační aplikace látek z důvodu určení přesné dávky.

V průběhu experimentu 1 dvě zvířata uhynula (v den druhé aplikace látek) a jedno bylo vyřazeno z toho důvodu, že si osvojilo pasivní strategii, která neumožňuje analýzu dat. Z pokusu 2 byla v průběhu testování vyřazena dvě zvířata - jedno vyskakovalo z arény, takže nebylo možné získat relevantní data o trajektorii zvířete, a druhé úlohu řešilo pasivní strategií (Carr et al., 2011) a také tedy nebyla možnost průkazné analýzy.

Veškerá manipulace se zvířaty byla v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (246/1992 Sb. ve znění pozdějších předpisů) a podle direktiv rady EU (2010/63/EC).

### **5.2.2 Aplikace látek**

Potkani byli v obou experimentech rozděleni do 4 skupin pro aplikaci jednotlivých látek. Jejich rozdělení bylo pseudonáhodné – byli rozděleni podle výkonu v úloze na konci tréninkové fáze, ale zohlednili jsme i umístění v boxech (tak, aby všechna zvířata v jednom boxu nebyla ve stejné skupině pro aplikaci látky). Snahou bylo mít v každé skupině podobné rozložení zvířat, co se týče jejich výkonu v úloze.

Všechny látky byly aplikovány intraperitonálně. Den před samotnou aplikací všechna zvířata dostala habituační aplikaci fyziologického roztoku (B Braun) v dávce 1 ml/kg 30 minut před začátkem sezení. Poté následovaly 4 dny, kdy byly aplikovány zvolené látky. První skupina sloužila jako kontrolní, 30 minut před pokusem byl všem potkanům z této skupiny aplikován **fyziologický roztok** v dávce **1ml/kg**. Druhé skupině byl 30 min před pokusem aplikován **haloperidol**. Haloperidol byl předtím rozpuštěn v kyselině octové (15 µl kyseliny na 1 ml roztoku), následně namíchan do 5% roztoku glukózy na koncentraci **0,5 mg/kg**. Třetí skupina obdržela vždy 30 min před pokusem **D-amfetamin sulfát (0,5 mg/kg)** rozpuštěný ve fyziologickém roztoku. Čtvrté skupině byl podán 60 minut před začátkem daného sezení **D9-tetrahydrocannabinol (THC)** rozpuštěný v 1% TWEENu v dávce **1 mg/kg** u experimentu 1, u experimentu 2 se ovšem tato dávka druhé dva dny zvýšila na **2 mg/kg** kvůli možné habituaci na tuto látku.

### 5.2.3 Aparatura

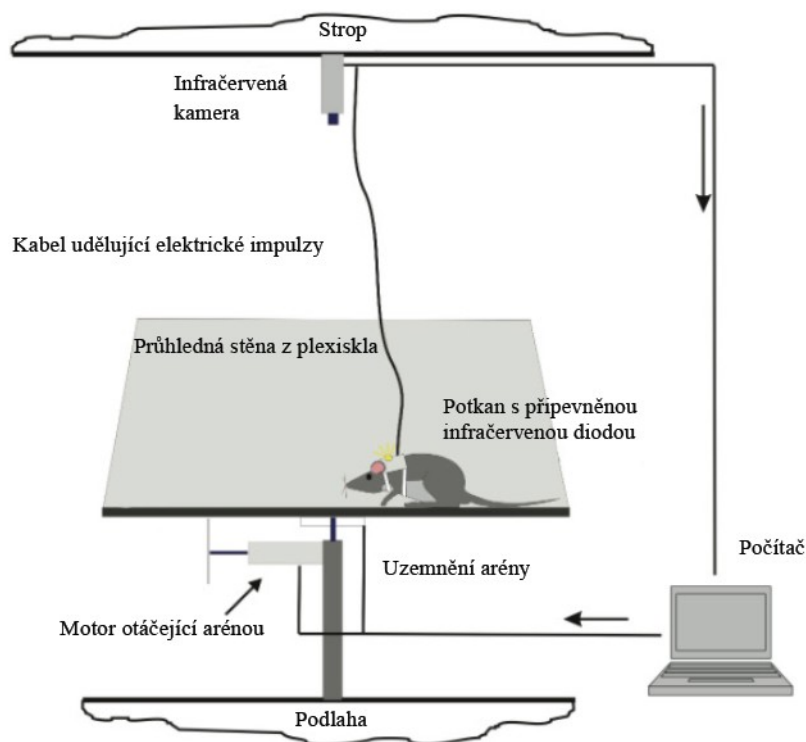
K oběma experimentům jsme použili behaviorální úlohu „Aktivní vyhýbání se místu“ a aparaturu nazvanou Kolotočové bludiště (Carousel maze). To je tvořeno kovovou arénou o průměru 82 cm s průhledným, 30 cm vysokým, plexisklem (obr.7), která tvoří bariéru po obvodu arény. To zabraňuje vyskakování zvířat z aparatury, ale zároveň nebrání výhledu do místnosti. Celá tato aparatura je umístěna jeden metr nad podlahou v místnosti s jasně viditelnými prostorovými distálními vodítky (značka na stěně, tmavá zástěna, dveře apod.), tyto ukazatele se v průběhu experimentu nemění, ani nemění svou pozici. Aréna rotuje za standardních okolností 1 za 55 sec. V průběhu experimentu jsme rychlost někdy zvyšovali na 1 otočku za 45 sec. Rotaci zajišťuje elektromotor umístěný pod arénou tak, aby se minimalizovala možnost, že potkani mohou použít jeho zvuk jako prostorové vodítko i za tmy. Rychlost otáček je možné ovládat díky napětí elektromotoru z vedlejší místnosti.

K zatemnění místnosti v „temné části“ experimentu byl použit tmavý závěs na dveře a utěsnění rámu, překrytí klimatizace. Místnost neměla žádná okna. Vypnutí a zapnutí světla se kontrolovalo manuálně z vedlejší místnosti, stejně jako rychlost rotace a el. šoky. Všechny diody svítily infračerveným (IF) světlem a pro potkana tedy byly neviditelné.

Nad arénou je kamera, reagující na infračervené světlo, která snímá pohyb arény přes referenční IF diodu na okraji disku. Na začátku pokusu umístíme na záda potkana „batůžek“, který má na sobě druhou IF diodu, která monitoruje polohu a rychlost potkana a také slouží k

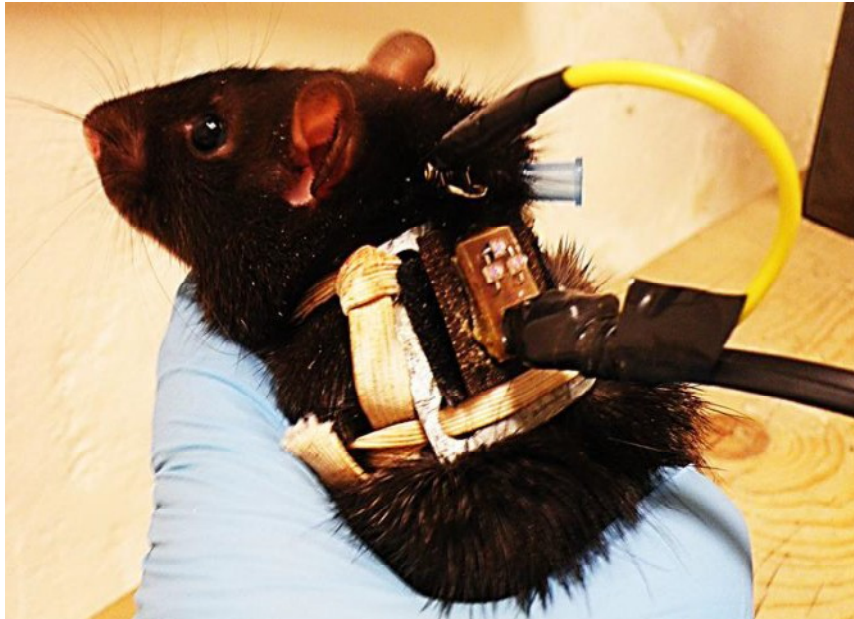
udílení šoků (obr.8). K tomuto účelu byla potkanovi den před pokusem aplikována jehla do volného kožního záhybu nad lopatkami, její ostrý konec byl odstraněn a následně zahnut, aby nedošlo k její ztrátě. K jehle se potom připevní kovový krokodýlek, propojený se systémem a udílející mírné elektrické ranky (v možném rozmezí 0,2 mA až 0,7 mA), když potkan vstoupí do zakázaného sektoru na dobu delší než je 300 ms (obr.9). Tyto averzivní stimuli se opakují, pokud zvíře neopustí danou oblast do 900 ms od předchozí elektrické ranky.

Program použitý pro tento experiment je iTrack (tracker, BioSignal Group, USA). Umožňuje sledování potkana a jeho polohu, určení sektoru na aréně, sílu elektrické ranky a periodu opakování. Rotace arény vždy byla zapnuta manuálně zároveň se spuštěním programu. Záznam se po ukončení pokusu automaticky ukládá a obsahuje všechna data potřebná k další analýze. Ta je následně prováděna v open-source programu Carousel Maze Manager (Verze 0.3.5.) (Bahnik, 2013).

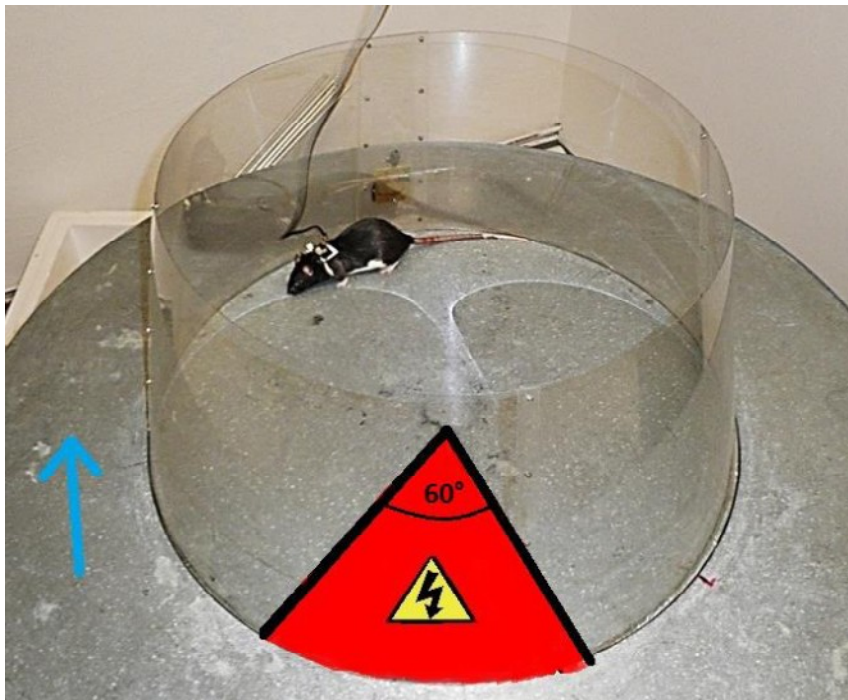


Obr.7. **Aparatura „kolotočové bludiště“.** Potkan s připevněnou infračervenou LED diodou se volně pohybuje po ploše rotující arény.

Převzato z Stuchlík et al., 2013



Obr. 8. Batůžeks IF diodou připevněný na zádech potkana. Krokodýlek vedoucí k subkutánně aplikované jehle slouží k udílení elektrických šoků.



Obr. 9. Vymezení averzivního sektoru na aréně, obvykle v úhlu 60 stupňů. Sektor je pro potkana neviditelný, rspektive není vyznačen žádnými přímými vizuálními zbnáčkami. Pozice sektoru je definována programem iTrack (Tracker, BioSignal Group, USA). Šipka znázorňuje směr rotaci arény.

## 5.2.4 Design experimentu

Cílem těchto experimentů bylo podrobnější studium strategií, které potkan používá na aréně za světla a za tmy a výzkum vlivu daných látek v obou těchto úsecích. Aplikované látky byly celkem čtyři (fyziologický roztok, haloperidol 0,5 mg/kg, amfetamin 0,5 mg/kg a THC 1 mg/kg a v experimentu 2 druhé dva dny 2 mg/kg), každá byla podávána stejné skupině po dobu 3 dnů (4 dnů u exp. 2) a všechny tyto skupiny měly schéma úlohy stejné.

### 5.2.4.1 Habituační

První den měla zvířata 10 minut dlouhou habituaci na aparaturu. El. šoky nebyly zapnuté a zvířata pouze volně zkoumala nový prostor. Při této habituaci se aréna pohybovala, aby si zvíře na tuto situaci přivyklo a snížil se tak stres z neznámého prostředí. Nahrávána byla pouze lokomoční aktivita zvířat. Po dobu celého pokusu byla aréna po každém zvířeti umývána, aby se zabránilo tvorbě pachových stop.

### 5.2.4.2 Fáze učení

Druhý a třetí den zvířata v obou experimentech řešila AAPA úlohu (viz. kapitola 4.1.4), tedy stabilní sektor vůči místnosti (určený mimoarénovými ukazateli) a rotující arénu, to vše každý den 20 minut za světla. Vzhledem k rychlému učení zvířat nebylo třeba přidávat třetí den a rovnou jsme začali s postupným zhasínáním, design samotné úlohy zůstával stejný. To trvalo dalších osm dní a začínalo se zhasnutím po dobu 1 minuty třikrát za jedno sezení, aby si zvířata navykla a postupně si začala osvojovat novou strategii. Poslední den zhasnutí trvalo již 10 minut v kuse, před i po něm byl 5 minut dlouhý úsek za světla.

12. až 14. den se zvířatům stále zhasínalo na určitou část pokusu, ale každý den byla přidána i jedna či dvě ze změn (zrychlená rotace či vypnutý šok). Testovaly se zde rozdíly kognitivních strategií za světla a za tmy. (Podrobnější schéma experimentu viz. obr. 11 a 12)

### 5.2.4.3 Aplikace látek

14. den následovala habituální aplikace fyziologického roztoku, aby se zmírnil stres z nové situace. U experimentu 1 byly látky aplikovány 15. až 17. den a tento pokus tímto končil, u experimentu 2 byly látky aplikovány 15. až 18. den. Aplikace probíhala vždy danou dobu před pokusem jednotlivce, a testovala se jak změna chování ve 'světlé' i 'tmavé' části pokusu, tak reakce na změnu rotace či na vypnutí šoku. U experimentu 2 byl posledním dnem den 19., kdy se již látky neaplikovaly a sezení sloužilo pouze jako testovací.

Kromě samotného zhasnutí byl v určitých částech pokusu vypnut el.šok, jak za světla, tak za tmy, neboť hlavně za tmy elektrická ranka může sloužit jako synchronizační informace (pomáhá potkanovi určit jeho polohu na aréně). To proběhlo jednou bez aplikace látek a jednou s aplikovanými látkami. Dále jsme manipulovali s rychlostí rotace, abychom mohli u zvířat s už rozvinutou strategií určit, nakolik je tato strategie závislá na časování a informaci o rychlosti arény a nakolik závisí jen na prostorových vizuálních u naučených zvířat dala lépe posoudit používaná strategie, také ve dvou dnech (jeden den před aplikací látek a jeden den s aplikovanou látkou).

#### **5.2.4.4 Experiment 3 se změnou aplikovaných látek**

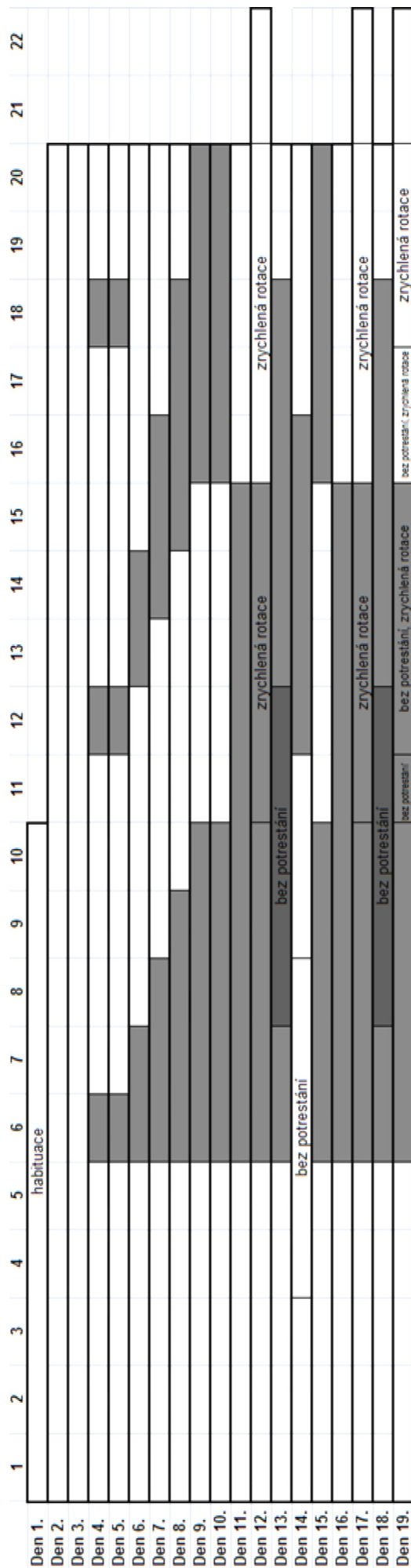
Se stejnou skupinou potkanů, jako byla v exp. 2, jsme po dvouměsíční pauze provedli navazující pokus, který sloužil hlavně k určení/potvrzení dávky jednotlivých látek tak, aby byla ovlivněna především časová strategie, zatímco prostorová strategie by zůstala nezasažena. V této dodatečné úloze budou látky aplikovány postupně všem zvířatům, což nám umožní nejen meziskupinové, ale i intraindividuální srovnání efektu látek. Byl použit co nejjednodušší design, abychom vyloučili možné ovlivnění dalšími manipulacemi v experimentu (rychlost rotace, el. šoky). Nejdříve potkani podstoupili dva dny opakovacího sezení a hned poté následovaly tři testovací dny. Během nich se rozložení 'tmavých' a 'světlych' úseků neměnilo a zůstalo v poměru 1:1. Látky se zde aplikovaly pouze druhý den, den před tím i den poté byl potkanům aplikován fyziologický roztok, aby se předešlo změně výkonu kvůli stresu ze samotné aplikace. Tento experiment stále ještě probíhá a proto zde jsou prezentovány pouze předběžné výsledky.



Obr. 10. **Design experimentu 1 v jednotlivých dnech.** Jednotlivé sloupce znázorňují jednotlivé minuty úlohy v daný den. Průhledná výplň značí část pokusu s rozsvíceným světlem, šedé části značí úseky se zhasnutým světlem. Aplikace látek probíhala den 15. až 17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Den 1.																							
Den 2.																							
Den 3.																							
Den 4.																							
Den 5.																							
Den 6.																							
Den 7.																							
Den 8.																							
Den 9.																							
Den 10.																							
Den 11.																							
Den 12.																							
Den 13.																							
Den 14.																							
Den 15.																							
Den 16.																							
Den 17.																							

Obr.11. **Design experimentu 2 v jednotlivých dnech.** Jednotlivé sloupce znázorňují jednotlivé minuty úlohy v daný den. Průhledná výplň značí část pokusu s rozsvíceným světlem, šedé části značí úseky se zhasnutým světlem. . Aplikace látek probíhala den15. až 18.



### 5.2.5 Analýza dat

Základním parametrem, který u této aparatury určuje výkonost potkana, je **počet vstupů** do averzivního sektoru. To nám ukazuje na schopnost potkana naučit se úlohu a vyhýbat se danému místu. Počet **elektrických šoků v poměru k počtu vstupů** poukazuje na schopnost potkana včas vybavit únikovou reakci a její nízká hodnota poukazuje na dobrou schopnost učení se kognitivních dovedností (Dockery et al., 2010). O aktivitě potkana vypovídá jeho celková ušlá dráha, neboli **rychlost**, za dané sezení. To může být ovlivněno určitými dávkami farmak, které mohou zvíře sedovat či naopak zapříčinit hyperlokomoci zvířete, což pak znemožní správné řešení úlohy i přesto, že kognice zvířete je v pořádku (Petrásek et al., 2009). **Čas do prvního vstupu** do sektoru od začátku daného sezení může vypovídat o více faktorech, například o pozornosti zvířete či o jeho dlouhodobé paměti. Často sledovaným fenoménem, který ovšem nezhoršuje výkon zvířat, je **thigmotaxe**, což je přirozené chování potkana, kdy se po většinu pokusu drží u stěny arény. Dále lze v analýze sledovat čas strávený v jednotlivých sektorech nebo maximální čas mezi jednotlivými vstupy do averzivního sektoru.

Jako kritérium úspěšnosti v této úloze jsme analyzovali počet vstupů do averzivního sektoru za minutu odděleně během 'světlé' i 'temné' fáze experimentu a pro porovnání používaných strategií v jednotlivých částech jsme posuzovali také rychlost.

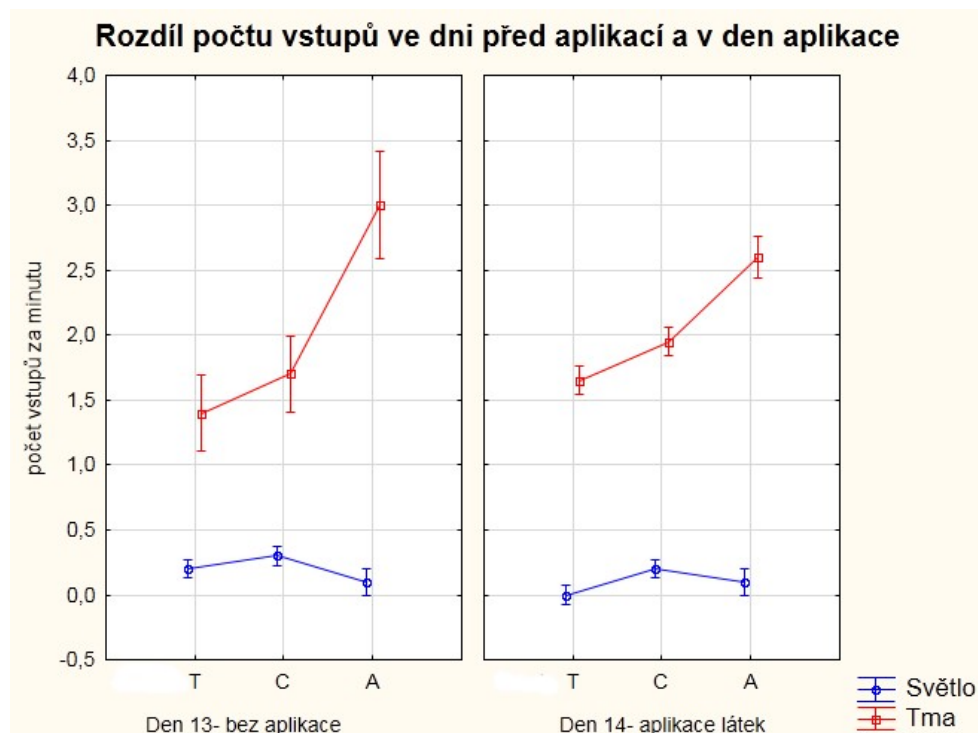
Soubory z programu iTrack byly převedeny do programu CM Manager, ve kterém můžeme vyhodnotit i jednotlivé časové úseky dle libovolného nastavení uživatele, což je pro tento design pokusu nezbytné. Tento program pak do tabulky vypočítal výše popsané hodnoty. Následná analýza těchto údajů probíhala v programu GrafPad Prism 6 a Statistica 10 (StatSoft). Pro porovnání výkonu během jednotlivých dní ve fázi za světla za tmy byl použit GLM (zobecněný lineární model) v programu Statistica. U jednotlivých fází se změnami, které byly porovnány mezi sebou, byla použita jednocestná ANOVA s opakovaným měřením v programu GrafPad a následně byly mezi sebou porovnány jednotlivé změny pomocí Tukeyho testu s mnohonásobným porovnáním. Pro porovnání více dní byla použita dvojcestná ANOVA s opakováním. Hladina signifikance byla  $p < 0,05$ .

## 5.3 Výsledky

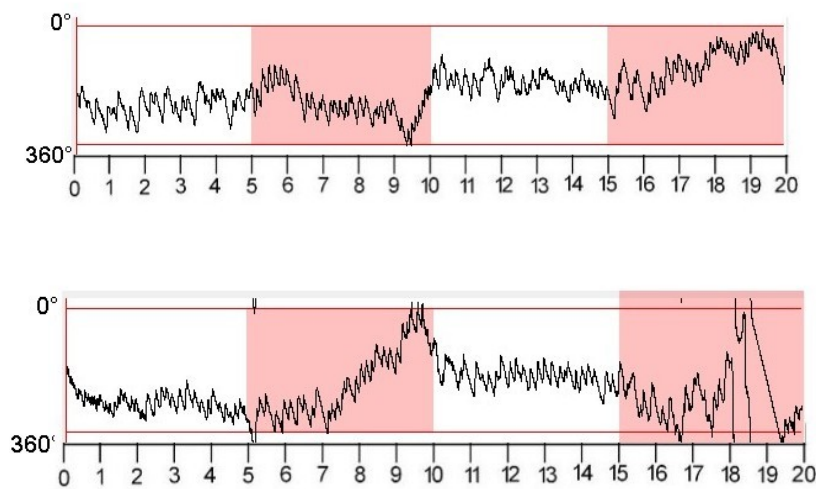
### 5.3.1 Experiment 1

Tento experiment sloužil jako pilotní (původní  $n=8$ ) avšak kvůli úhynu a vyřazení zvířat zde k celkové analýze zůstala jen malá skupina s  $n=5$ . Detailní analýza je proto provedena pro data z experimentu 2.

Pro experiment 1 ukazujeme zde tabulku se vstupy za světla a za tmy v den před aplikací a v den první aplikace (obr.12). Signifikantní byla pouze interakce vstupů za světla a za tmy ( $F = 245,2075$ ,  $p < 0,01$ ).



Obr. 12. Grafy zobrazující počet vstupů ( $\pm$  SD) jednotlivých skupin den před aplikací a v den aplikace látek. Signifikantní je zde pouze rozdíl ve vstupech do sektoru v částech za světla a za tmy. T – THC skupina ( $n = 2$ ); C – kontrolní skupina ( $n = 2$ ); A – skupina s amfetaminem ( $n = 1$ ).



Obr. 13. Změna dráhy potkana vůči averzivnímu sektoru bez aplikované látky a po její aplikaci.

Schéma ukazuje angulární trajektorii zvířete na aréně znázorněnou jako grafická reprezentaci dráhy. Averzivní sektor je vyznačen červenými horizontálními linkami. Aktivní pohyb zvířete je směrem od 360° k 0°, směrem opačným je zvíře pasivně vezeno otáčivým pohybem arény. Spodní číselná osa značí čas pokusu (v minutách), červená výplň značí úseky se zhasnutým světlem.

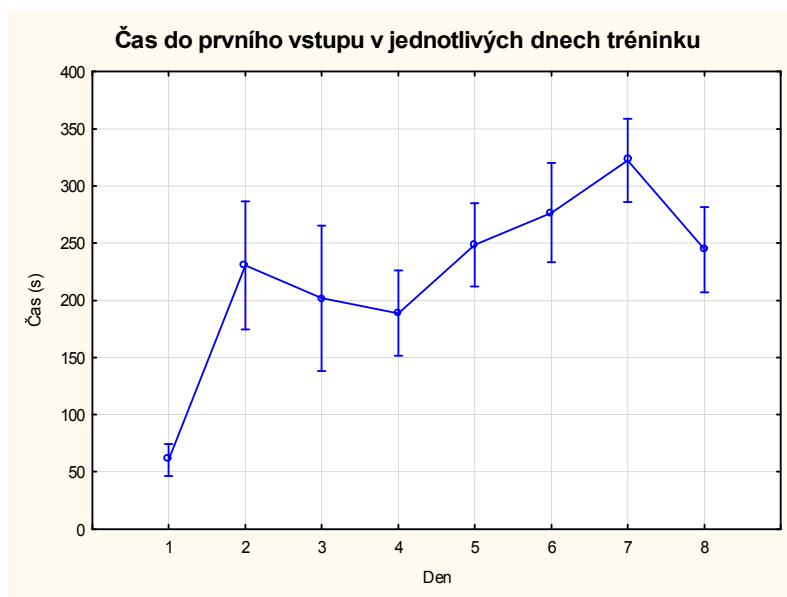
Horní obrázek znázorňuje dráhu potkana bez aplikované látky. Pokud se dráha potkana „dotkne“ červené linie zespodu, znamená to, že se potkan aktivně nepohyboval a do sektoru vjel. Pokud se jí trajektorie dotkne zezhora, znamená to, že do averzivního sektoru potkan aktivně vběhl. Dolní obrázek ukazuje stejné zvíře, avšak po aplikaci THC (1 mg/kg). Potkan je za tmy viditelně zpomalený, vjíždí do sektoru, avšak za světla je úlohu schopen i nadále řešit.

## 5.3.2 Experiment 2

### 5.3.2.1 Fáze učení

V první části experimentu byli potkani trénováni k řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu. Během prvních dvou dnů byli trénováni za standardních podmínek (světlo během celého sezení, standardní rychlost rotace a negativní stimuly po vstupu do averzivního sektoru, který byl stabilní v rámci místnosti). Během druhého dne tréninku byl průměrný počet vstupů  $0,85 \pm 0,1$  a průměrná rychlost  $3,54 \pm 0,13$  m/min. Dvojcestná ANOVA s opakovaným měřením na faktoru ‘den’ ukázala, že výkon jednotlivých zvířat se signifikantně neliší.

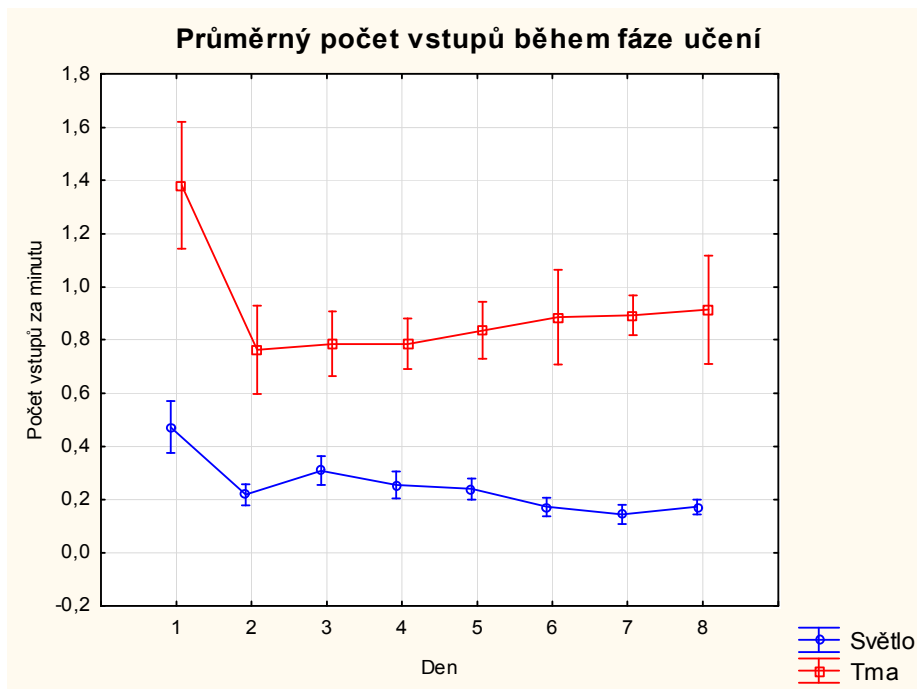
Během dalších devíti dnů se během sezení střídalo světlo a tma, přičemž podíl této ‘temné’ fáze se postupně zvyšoval (Během sedmého až devátého dne byl podíl ‘temné’ fáze 50%). Signifikantní zde byl rozdíl mezi dny v čase do prvního vstupu do averzivního sektoru (dvojcestná ANOVA s opakovaním,  $F = 3,95582$ ,  $p < 0,01$ ) (obr. 14).



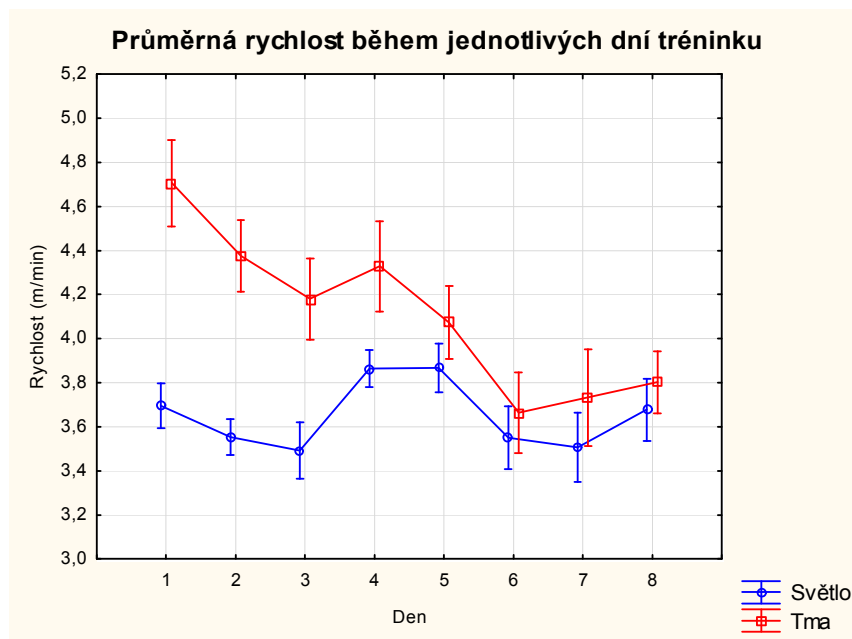
Obr. 14. Graf času do prvního vstupu ( $\pm$  SD) do averzivního sektoru od začátku daného sezení. Při správném učení potkana se tyto hodnoty v průběhu tréninku zvyšují.

Dále jsme analyzovali počet vstupů do averzivního sektoru za minutu odděleně během 'světlé' i 'temné' fáze experimentu během celé tréninkové fáze (den 3 – den 11). Během posledního dne byl za světla průměrný počet vstupů za minutu  $0,17 \pm 0,03$  a průměrná rychlost  $3,68 \pm 0,14$  m/min. Během stejného dne za tmy byl průměrný počet vstupů za minutu  $0,91 \pm 0,21$  a průměrná rychlost  $3,80 \pm 0,14$  m/min. Analýza ukázala, že je signifikantní rozdíl mezi výkonem ve tmě a ve světle (GLM,  $F = 95,1110$ ,  $p < 0,01$ ) a je zde i signifikantní vliv dne ( $F = 2,8635$ ,  $p < 0,01$ ). Mezi těmito faktory (den vs. světlo/tma) není signifikantní interakce (Obr. 15).

Při analýze rychlosti ve stejných dnech jsme ukázali, že je také signifikantní vliv dne (GLM,  $F = 6,229$ ,  $p < 0,01$ ) a signifikantní rozdíl mezi částmi pokusu za světla a za tmy ( $F = 64,070$ ,  $p < 0,01$ ). Zde se ovšem prokázala i signifikantní interakce mezi těmito faktory (den vs. světlo/tma) ( $F = 9,338$ ,  $p < 0,01$ ) (Obr. 16).



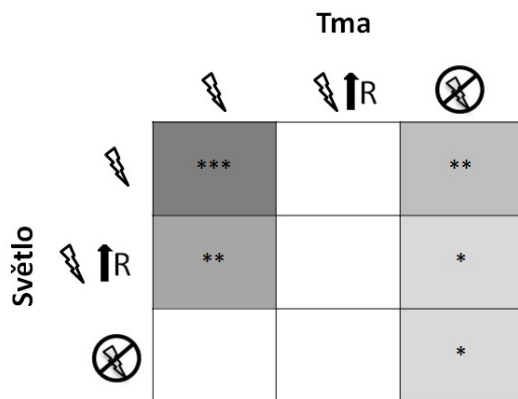
Obr. 15. Počet vstupů do averzivního sektoru v jednotlivých dnech učení za světla a za tmy. Zobrazen je průměrný počet vstupů ( $\pm$  SD) pro jednotlivé dny. Můžeme pozorovat výraznou změnu během prvního a druhého dne tmy.



Obr.16. Rychlost v jednotlivých dnech tréninku za světla a za tmy. Zobrazena je průměrná rychlost pro všechny testované potkany ( $\pm$  SD) v jednotlivých dnech. Rychlost v 'tmavé' části sezení se postupně v rámci jednotlivých dní snižuje k rychlosti za světla.

### 5.3.2.2 Kontrolní sezení bez aplikace látek

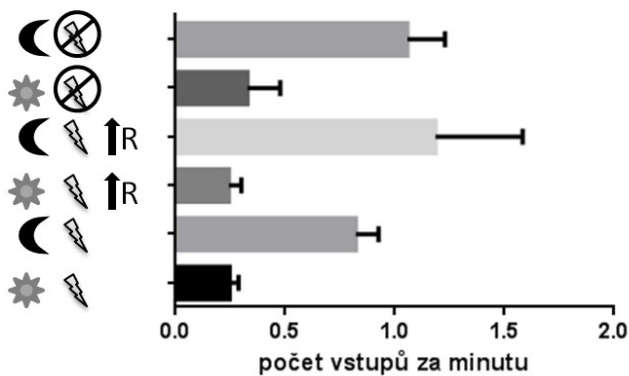
Během další tří dnů podstoupili potkani tři kontrolní sezení, během kterých jsme postupně měnili faktory: světlo/tma; rychlost rotace a vypnutí šoků v averzivním sektoru (Obr. 11 se schématem experimentu). Analýza (Jednocestná ANOVA s opakovaným měřením a následný Tukeyho test pro mnohonásobné porovnání) ukázala, že se signifikantně liší počet vstupů během standardní fáze za světla a za tmy. Při zrychlené rotaci se liší signifikantně počet vstupů za světla a za tmy. Pokud byl vypnutý el. šok během 'temné' fáze, lišil se počet vstupů signifikantně od počtu vstupů během standardní světlé fáze i během světla se zvýšenou rotací nebo vypnutým šokem (Obr. 17 a 18).



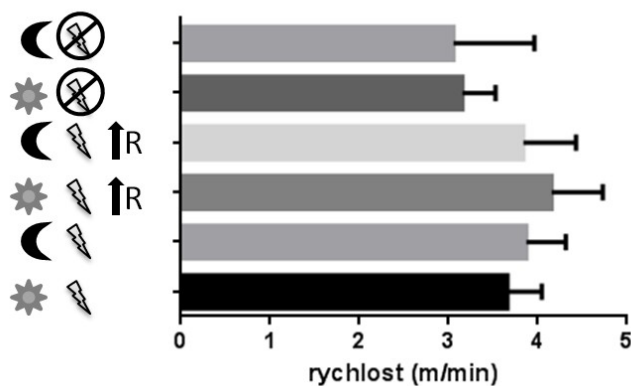
Obr. 17. Tabulka signifikantních interakcí mezi jednotlivými změnami.

zaplý šok, vyplý šok  
zrychlená rotace

#### Vstupy do sektoru v jednotlivých úsecích



#### Rychlost v jednotlivých úsecích



Obr. 18. Výsledná rychlost a průměrný počet vstupů do sektoru v jednotlivých fázích. Zobrazen je průměr všech potkanů se směrodatnou odchylkou. Změny oproti normálním úsekům za světla a za tmy byly měřeny v jednotlivých dnech, hodnoty bez změn jsou průměrem všech těchto měřených dní.

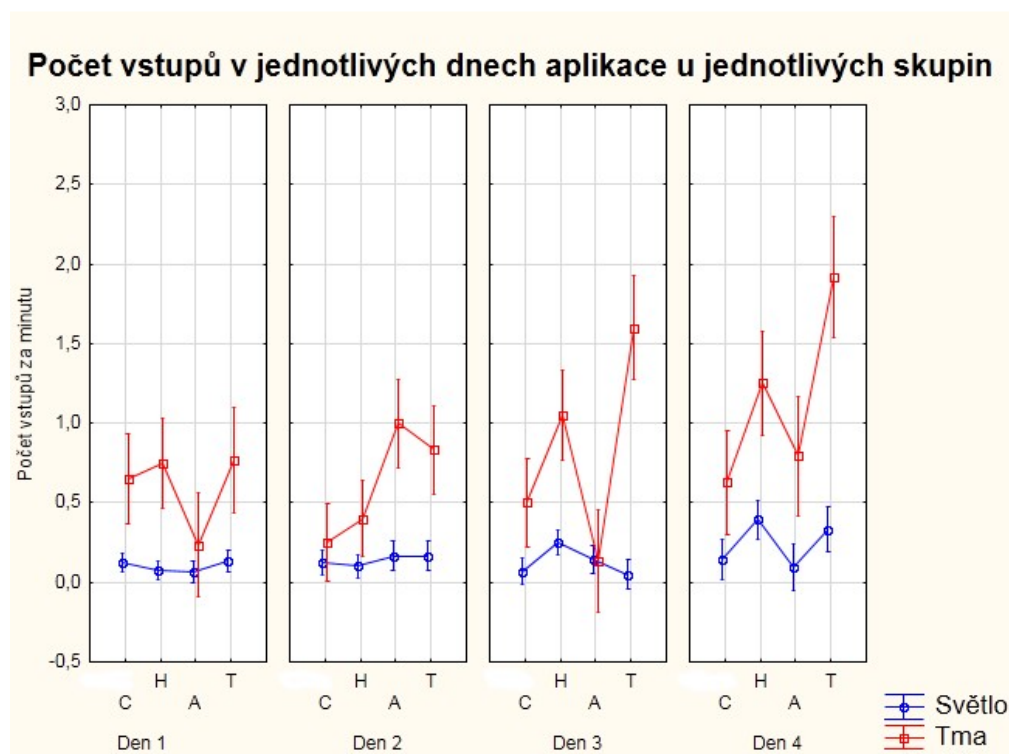
☾ - tma, ☼ - světlo  
zaplý šok, vyplý šok  
↑R - zrychlená rotace



### 5.3.2.3 Fáze aplikací látek

Během této fáze byli potkani rozděleni pseudonáhodně do čtyř skupin a byly jim aplikovány látky: fyziologický roztok, haloperidol, THC a amfetamin po dobu 4 dní. Během této fáze se v každém sezení střídala fáze světla a tmy, v některých sezeních jsme navíc manipulovali s rychlostí rotace a nebo jsme vypínali el. šoky v averzivním sektoru. Design experimentu byl stejný jako ve dnech 10. až 13., kdy nebyly podávány látky (obr. 11). Analyzovali jsme průměrný počet vstupů daného zvířete do averzivního sektoru za minutu odděleně během 'světlé' i 'temné' fáze experimentu. V sezeních, kdy docházelo ke změnám rotace a el. šoků, jsme průměrovali jen hodnoty ze standardních částí sezení.

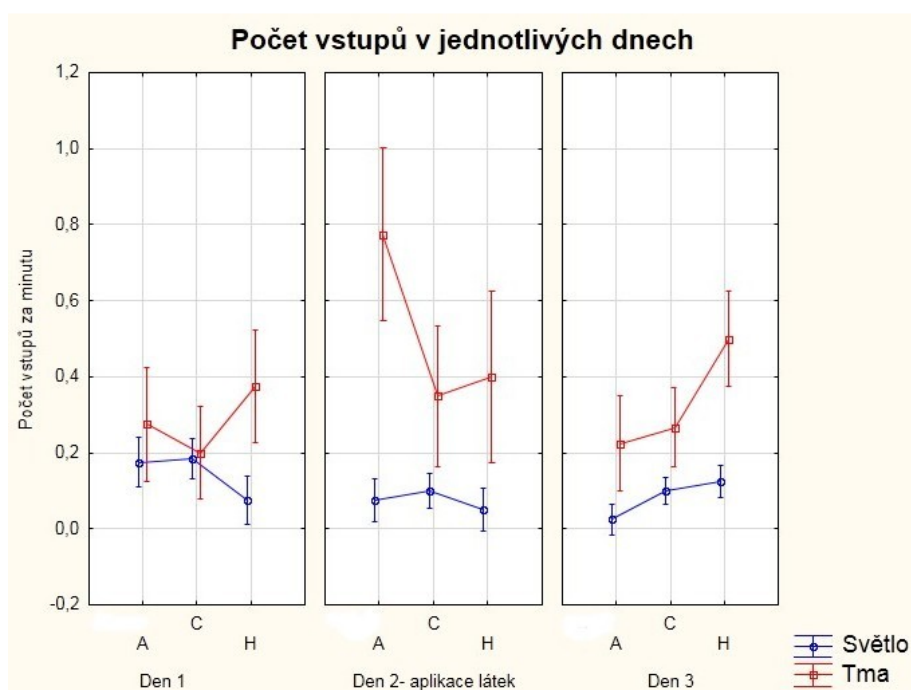
Analýza ukázala, že během čtyřdenní fáze je signifikantní efekt dne (GLM,  $F = 6,09763$ ,  $p < 0,01$ ) a signifikantní efekt světla/tmy (GLM,  $F = 37,84196$ ,  $p < 0,01$ ), analýza však neprokázala signifikantní efekt látky. Během světlé fáze byl počet vstupů stabilní, ke změnám docházelo především během fáze za tmy. Analýza však ukázala signifikantní interakci mezi látkou a dnem (GLM,  $F = 2,49671$ ,  $p = 0,029$ ) (obr.19).



Obr.19. **Grafy počtu vstupů jednotlivých skupin v jednotlivých dnech s aplikací látek.** Každý jednotlivý den tvoří samostatný graf, který zobrazuje výkon jednotlivých skupin ( $\pm$  SD). C - kontrolní skupina; H – skupina s aplikovaným haloperidolem; A – skupina s aplikovaným amfetaminem; T – skupina s aplikací THC.

### 5.3.2.4 Experiment 3 se změnou aplikovaných látek

V dodatečné části experimentu byly sledovány pouze tři následující dny, pokaždé s aplikací jiné látky. Během těchto tří dnů byly druhý den aplikovány látky (amfetamin v dávce 0,5 mg/kg, n = 4; haloperidol ve stejné dávce, n = 4; fyziologický roztok, n = 6). Signifikantní byla interakce dne se skupinami ( $F = 2,91419$ ,  $p = 0,044$ ) a na poměr vstupů za světla a za tmy ( $F = 5,30973$ ,  $p = 0,013$ ) (obr. 20).



Obr. 20. **Počet vstupů v jednotlivých dnech s jednodenní aplikací látek.** Druhý den byly aplikovány látky. Každý jednotlivý graf zobrazuje daný den a průměrný počet vstupů pro jednotlivé skupiny v tomto dni ( $\pm$  SD). A - skupina s aplikací amfetaminu; C – kontrolní skupina (aplikace fyziologického roztoku); H- skupina s aplikací haloperidolem.

## 6 Diskuse

V experimentu 2 jsme zkoumali kognitivní strategie potkana zapojené za 'světelné' a za 'temné' části pokusu. Dále jsme studovali efekt vybraných farmak na strategii používanou za tmy, o které předpokládáme, že je převážně časová. Poté, co si zvířata osvojila úlohu a dokázala ji řešit jak za světla, tak za tmy, jsme vybraným skupinám zvířat aplikovali haloperidol v dávce 0,5 mg/kg, amfetamin sulfát v dávce 0,5 mg/kg a THC první dva dny v dávce 1 mg/kg a u druhé dva dny v dávce 2 mg/kg.

Výsledky pokusu ukazují, že zvířata používají rozdílné strategie za světla a za tmy. Aplikace látek v těchto dávkách však neukázala signifikantní narušení časové strategie, i když určitý trend byl pozorovatelný.

První dva dny, kdy potkani pouze řešili klasickou AAPA úlohu za světla, se učili bez problémů, ve druhém dni tréninku byl počet vstupů signifikantně nižší, než první den, a zároveň se neprokázal signifikantní rozdíl mezi jednotlivými zvířaty. Následovalo dalších osm dní, kdy jsme potkanům začli na určitou dobu daného sezení zhasínat. Tyto intervaly za tmy se postupně prodlužovaly, až byly poslední tři dny v poměru 1:1 k úsekům za světla. To mohlo být důvodem, proč se od druhého dne neukazuje výraznější snížení průměrných počtů vstupů za tmy, neboť zároveň s tím, jak se potkani učí, tak se úloha stává složitější. Tuto hypotézu podporuje také fakt, že i přes málo výrazné zlepšení v počtu vstupů se potkani zlepšovali v čase do prvního vstupu. To, že si osvojili efektivní strategii ve 'tmavých' úsecích, prokazuje i navazující experiment 3 se stejnými zvířaty (viz. kapitola 5.3.4) po dvouměsíční pauze. Výkon těchto potkanů je stabilní a v rámci dní se již nemění.

Během iničiálního tréninku se počet vstupů při zhasnutí a ve světle signifikantně liší, což ukazuje na použití odlišných kognitivních strategií. Rychlost potkana na aréně v jednotlivých úsecích se lišila hlavně na začátku pokusu, kdy zvířata ve tmě neměla dosud vyvinutou strategii, a postupně se tato rychlost blížila rychlosti za světla (ta byla v rámci jednotlivých dní více konstantní), což také svědčí pro naučení efektivní strategie.

V další části experimentu 2, která trvala tři dny, jsme zkoumali výkon potkanů při různě změněných podmínkách. To v obou částech pokusu (za světla i za tmy) zahrnovalo zrychlení rotace arény a v jiných úsecích naopak vypnutí šoku. Tyto manipulace jsme prováděli, abychom mohli ověřit, jaké informace potkani pro řešení úlohy za jednotlivých podmínek (světlo/tma) používají. Výsledky nám potvrdily, že zvířata za světla využívají hlavně prostorová vodítka v rámci místnosti a na časové složce a alternativních strategiích jsou závislá minimálně, neboť při zrychlení rotace a stejně tak při vypnutí el. šoku nebyl signifikantní rozdíl od standardních úseků. Samotný šok pro ně tedy není synchronizační informací pro řešení úlohy za světla, ale základním vstupem je prostorová informace.

Signifikantní rozdíl se prokázal mezi 'světelnou' a 'temnou' fází při vypnutí šoku (v obou případech), což naznačuje, že šok byl pro potkany během temné fáze důležitým synchronizačním faktorem a umožnil tak lepší použití časové strategie, narozdíl od části za světla.

Počet vstupů za tmy se zvýšenou rotací arény byl vyšší (obr. 14), i když zde nebyl prokázán signifikantní rozdíl. To mohlo být způsobeno i větším rozptylem hodnot v 'tmavé' části se zvýšenou rotací.

Tato zjištění dohromady ukazují, že změněná rychlost rotace či vypnutý šok naruší kognitivní strategii, kterou si potkan osvojil pro řešení úlohy ve tmě. Je zde tedy patrné použití rozdílných strategií za světla a za tmy a také to, že strategie za tmy je na rozdíl od strategie za světla mnohem více závislá na časování, než na prostorových vodítkách, jak je tomu právě u 'světlé' části.

Další fází pokusu 2 byla aplikace farmak. Naším cílem bylo určit dávky tak, aby ideálně narušily pouze časovací strategie, ale ne strategii založenou na prostorových ukazatelích. Jednalo se o haloperidol v dávce 0,5 mg/kg, D-amfetamin sulfát v dávce 0,5 mg a THC první dva dny v dávce 1 mg/kg a druhé dva dny v dávce 2 mg/kg. Dávky jsme určili na základě dřívějšího pokusu (viz. obr. 13) a také na základě rešerše prací, které se zabývají těmito látkami v souvislosti s intervalovým časováním či prostorovou orientací. Pouze místo metamfetaminu, kterému se většina prací na toto téma věnuje, byl zvolen D-amfetamin sulfát, neboť má stejný účinek a pro naší laboratoř byl v době pokusu dostupnější.

Naším předpokladem bylo, že dojde ke zpomalenému vnímání času za tmy u zvířat s aplikovaným haloperidolem a THC a naopak ke zrychlenému vnímání času u skupiny s aplikovaným amfetaminem. Avšak analýza počtu vstupů prokázala pouze signifikantní efekt dne a signifikantní interakci mezi dny a jednotlivými skupinami látek, interakce vstupů za světla/tmy a skupin látek signifikantní nebyla. To mohlo být způsobeno různými faktory: například značné změny (zrychlená rotace, vyplý šok) v jednotlivých dnech před aplikací i v rámci dvou dní s aplikací farmak, což mohlo ovlivnit výkon i ve standardních časových úsecích pokusu. Mohl se lišit i efekt dané dávky. Účinek látky a její dávkování se může lišit i podle kmene laboratorních potkanů, kterým je aplikována, což může být jeden z důvodů, proč se účinky mírně liší od výsledků popaných v literárních pramenech.

Rozhodli jsme se proto po dvouměsíční pauze ověřit efekt vybraných látek (experiment 3). Použili jsme původní, již natrénovaná zvířata, která už mají vyvinuté funkční strategie, a během experimentu je každý den stejný poměr 'světlé' a 'tmavé' části pokusu, nedochází k žádným modifikacím (změna rychlosti, vypnutí šoků). Testují se zde různé dávky a jejich vliv na jedince. Tento dodatečný pokus stále probíhá, proto zde prezentujeme jen předběžné výsledky.

Kromě zmíněných faktorů mohlo nerovnoměrné výsledky zapříčinit i malé odhlučnění místnosti a občasný pronikající hluk z chodby. Míra zatemnění od jakýchkoliv světelných artefaktů byla kontrolována fotoaparátem s vysokou clonou, místnost neměla žádná okna a dveře byly krom utěsnění rámu překryty tmavým závěsem. Všechny diody na aparatuře byly infračervené a tedy pro potkana neviditelné. Vliv látek na motoriku a ovlivnění prostorových strategií bylo testováno během úseků za světla. Nemůžeme zcela vyloučit, že si během 'temné' části experimentu potkani neosvojili ještě další vodítka (například stálý, pro nás neslyšitelný hluk, který vydává aparatura), nicméně kontrolní sezení ukázala, že předpokládané informace – tedy rychlost rotace a šoky, coby synchronizační vstupy, měly na řešení zásadní vliv.

## 7 Závěr

Zpracování časové a prostorové informace sice v mozku zajišťují odlišné oblasti a mechanismy, avšak nalezneme mezi nimi četná spojení. Testování této interakce a vývoj vhodných úloh, které pomohou tyto složky testovat jak odděleně, tak společně, mohou zefektivnit budoucí výzkum řady neurodegenerativních či psychiatrických onemocnění. Proto je naší snahou vytvořit vhodnou úlohu k testování různých animálních modelů.

V experimentální části jsme demonstrovali, že střídání tmy a světla při řešení AAPA úlohy je plausibilní model pro studium prostorové a časové strategie v jedné úloze. Prostorová vodítka jsou hlavním prvkem strategie používané za světla, avšak za tmy již ztrácejí na své důležitosti. V této fázi nejpravděpodobněji hraje hlavní roli časování a ušlá dráha, neboť zvíře nemá možnost orientovat se podle distálních prostorových vodítek, ale zároveň je schopno i v této fázi udržovat poměrně stabilní a funkční strategii. Dále jsme ukázali, že časová strategie je náchylnější k ovlivnění řadou látek, zatímco prostorová strategie je při stejných dávkách stabilní. Předmětem dalšího zkoumání je tedy přesná titrace dávek a nastavení optimálního tréninkového protokolu.

## 8 Literatura

- Babb S.J., Crystal J.D., 2005. Discrimination of what, when, and where: implications for episodic-like memory in rats. *Learning & Motivation* 36, 177–189.
- Basso G. et al. (1996). Time perception in a neglected space. *Neuroreport*. 7, 2111-2114.
- Beiser D. G., Houk J. C. (1998). Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol.* 79 (6), 3168-3188.
- Berke J.D., Okatan M., Skurski J., Eichenbaum H.B. (2004). Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43, 883-896.
- Bizo L. A., White K. G. (1994). The behavioral theory of timing: reinforcer rate determines pacemaker rate. *J. Exp. Anal. Behav.* 61 (1), 19-33.
- Buhusi C. V., Meck W. H. (2005). What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat Rev Neurosci* 6 (10), 755-765.
- Buhusi C. V., Mocanu M., and Meck W. H. (2004). Abnormal memory consolidation of interval timing in rats with ibotenic lesions of the hippocampus. *Abstr. Soc. Neurosci.* 550, 18.
- Bureš J., Fenton A. A., Kaminsky Y., Rossier J, Sacchetti B., Zinyuk L. (1997). Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1), 343-350.
- Buonomano D. V., Laje R. (2010). Population clocks: motor timing with neural dynamics. *Trends Cogn. Sci.* 14, 520-527.
- Brown S. W. (1997). Attentional resources in timing: interference effects in concurrent temporal and nontemporal working memory tasks. *Perception & psychophysics* 59, 1118-1140.
- Brown S. W., Boltz, M. G. (2002). Attentional processes in time perception: effects of mental workload and event structure. *Journal of experimental psychology. Human perception and performance* 28, 600-615.
- Cabral H.O. et al. (2014). Oscillatory dynamics and place field maps reflect hippocampal ensemble processing of sequence and place memory under NMDA receptor control. *Neuron* 81, 402-415.
- Carr Z.J., Torjman M.C., Manu K., Dy G., Goldberg M.E. (2011). Spatial Memory Using Active Allothetic Place Avoidance in Adult Rats After Isoflurane Anesthesia: A Potential Model for Postoperative Cognitive Dysfunction. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 23 (2), 138-145.
- Carter A.G., Soler-Llavina G.J., Sabatini B.L. (2007). Timing and location of synaptic input determinate modes of subthreshold integration in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 27, 8967-8977.
- Cimadevilla J.M., Kaminsky Y., Fenton A. et al.(2000b) Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *Neurosci. Methods* 102, 155-164.

Cimadevilla J. M., Wesierska M., Fenton A. A., Bures J. (2001).

Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3531-3536.

Clayton N.S., Dickinson A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395 (6699), 272-274.

Clayton N.S., Bussey T.J., Dickinson A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 685–691.

Clayton N.S., Salwiczek L.H., Dickinson A. (2007). "Episodic memory". *Current Biology* 17 (6), 189–191.

Coull, J. T., Cheng, R.K., Meck, W. H. (2011). Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. *Neuropsychopharmacology*, 36. 3-25.

Crystal J. D. et al. (2003). Cannabinoid modulation of sensitivity to time. *Behavioural brain research*. 144, 57-66.

Dale C.L., Findlay A.M., Adcock R.A., Vertinski M., Fisher M., Genevsky A. et al. (2010). Timing is everything: neural response dynamics during syllable processing and its relation to higher-order cognition in schizophrenia and healthy comparison subjects. *Int. J. Psychophysiol.* 75, 183-193.

Dickerson B., Eichenbaum H. (2010). The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* 35 (1), 86–104.

Dietrich A., Allen J.D. (1998). Functional dissociations of the prefrontal cortex and the hippocampus in timing behavior. *Behav, Neurosci.* 112, 1043-1047.

Dietrich A., Allen J.D., Bunnell B.N. (1997). Is the hippocampus involved in temporal discrimination and the memory of short intervals? *Int. J. Neurosci.* 90, 255-269.

Dockery C. A., Wesierska M.J. (2010). A spatial paradigm, the allothetic place avoidance alternation task, for testing visuospatial working memory and skill learning in rats. *Journal of neuroscience methods* 191 (2), 215-221.

Dusek P, Jech R. (2011). Time perception and its disturbances. *Psychiatrie* 15 (4), 199-207.

Duvernoy H.M., Cattin F. (2005). *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI*. Springer, 3rd ed.

Eacott M. J., Norman G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: A possible model of episodic-like memory? *The Journal of Neuroscience* 24 (8), 1984-1953.

Eagleman D. M. (2004). Neuroscience. The where and when of intention. *Science*. 303, 1144-6.

Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience* 1: 41–50.

Eichenbaum H. (2012). Memory on time. *Trends in Cognitive Neuroscience* 17 (2), 81-88.



- Eichenbaum H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nat Rev Neurosci.* 15 (11), 732-744.
- Eichenbaum H. et al (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 123-152.
- Eichenbaum H., Dudchenko P., Wood E., Shapiro M., Tanila H. (1999). The Hippocampus, memory and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23, 209-226.
- Ergogul C., Eichenbaum H. (2006). Essential role of the hippocampal formation in rapid learning of higher-order sequential associations. *J. Neurosci.* 26, 4111-4117.
- Frank L.M., Brown E.N., Wilson M., 2000. Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron*, 27(1), 169–178
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser M-B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305, 1258–1264
- Fox S.E., and Ranck J.B., Jr. (1975). Localization and anatomical identification of theta and complex spike cells in dorsal hippocampal formation of rats. *Exp. Neurol.* 49, 299–313.
- Gibbon J. (1977). Scalar expectancy theory and Weber's law in animal timing. *Psychological Review* 84 (3), 279-325.
- Gibbon J., Church R. M., Meck W. H. (1984). Scalar timing in memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 423, 52-77.
- Gibbon J., Malapani C., Dale C.L., Gallistel C.R. (1997). Toward a neurobiology of temporal cognition: advances and challenges. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (2), 170-184.
- Gooch C.M., Wiener M., Wencil E.B., Coslett H.B. (2009). Interval timing disruptions in subjects with cerebellar lesions. *Neuropsychologia* 48 (4), 1022-1031.
- Hafting T., Fyhn M., Molden S., Moser M.-B., Moser EI. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806.
- Han C.J., Robins J.K. (20010). Cannabinoid modulation of time estimation in the rat. *Behav. Neurosci.* 115 (1), 243-246.
- Harrington D. L., Haaland K. Y. (1991). Sequencing in Parkinson's disease. Abnormalities in programming and controlling movement. *Brain Res.* 114, 99–115.
- Harrington D.L., Lee R.R., Boyd L.A., Rapcsak S.Z., Knight R.T. (2004) Does the representation of time depend on the cerebellum? Effect of cerebellar stroke. *Brain* 127 (3), 561-574.
- Harrington D.L., Zimelman J.L., Hinton S.C., Rao S.M. (2010). Neural modulation of temporal encoding, maintenance, and decision processes. *Cereb. Cortex* 20, 1274-1285.
- Hinton S. C., Meck W. H. (1997). The 'internal clock' of circadian and interval timing. *Endeavour* 21(2), 82-87.

- Cahill L., McGaugh J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.* 21, 294–299.
- Cheng R.K., MacDonald C.J., Meck W.H. (2006). Differential effects of cocaine and ketamine on time estimation: implications for neurobiological models of interval timing. *Pharm. Biochem. Behav.* 85, 114-122.
- Jadhav S.P., Kemere C., German P.W., Frank L.M. (2012). Awake hippocampal sharp-wave ripples support spatial memory. *Science* 336, 1454-1458.
- Jensen O., Lisman J.E. (2005). Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. *Trends Neurosci.* 28, 67-72.
- Ji D., Wilson M.A. (2007). Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nat. Neurosci.* 10, 100-107.
- Jin D.Z., Fujii N., Graybiel A. M. (2009). Neural representation of time in cortico-basal ganglia circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19156-19161.
- Johnson A., van der Meer M.A., Redish A.D. (2007). Integrating hippocampus and striatum in decision-making. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 692-697.
- Kalivas P.W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561-572.
- Karlsson M.P., Frank L.M. (2009). Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 12, 913-918.
- Kesner R.P. et al. (2005). The role of CA1 in the acquisition of an object-trace-odor paired associate task. *Behav. Neurosci.* 119, 781-786.
- Killeen P. R., Fetterman J.G. (1988). A behavioral theory of timing. *Psychol. Rev.* 95, 274-295.
- Knierim J.J., Hamilton D.A. (2011). Framing spatial cognition: neural representations of proximal and distal frames of reference and their roles in navigation. *Physiol. Rev.* 9 (4), 1245-1279.
- Knierim J.J., Kudrimoti H.S., McNaughton B.L. (1995). Place cells, head direction cells, and the learning of landmark stability. *The Journal of Neuroscience* 15 (3), 1648-1659.
- Kraus B.J., Robinson R.J., White J.A., Eichenbaum H., Hasselmo M.E. (2013). Hippocampal “time cells”: time versus path integration. *Neuron* 78, 1090-1101.
- Komorowski R.W., Manns J.R., Eichenbaum H. (2009). Robust conjunctive item-place coding by hippocampal neurons parallels learning what happens. *J. Neurosci.* 29, 9918-9929.
- Koch, G. et al. (2009). Neural networks engaged in milliseconds and seconds time processing: evidence from transcranial magnetic stimulation and patients with cortical or subcortical dysfunction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364, 1907- 1918.
- Lenck-Santini P.P., Fenton A.A., Muller R.U. (2008). Discharge properties of hippocampal neurons during performance of a jump avoidance task. *J. Neurosci.* 28, 6773-6786.

Levy W.B. (1989). A computational approach to hippocampal function. *Computation Models of Learning in Simple Neural Systems*, 243-305.

Lustig C. and Meck, W. H. (2001). Paying attention to time as one gets older. *Psychol Sci* 12(6), 478-484.

MacDonald C. J., Lepage K. Q., Eden U. T., Eichenbaum H. (2011). Hippocampal "Time cells" bridge the gap in memory for discontinuous events. *Neuron* 71 (4), 737-749.

MacDonald C.J., Meck W.H. (2004). System-level integration of interval timing and reaction time. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 747-769.

MacDonald C.J., Meck W.H. (2005). Differential effects of clozapine and haloperidol on interval timing in the supraseconds range. *Psychopharmacology* 182, 232-244.

Mangels J.A., Ivry R.B., Shizimu N. (1998). Dissociable contributions of the prefrontal and neocerebellar cortex to time perception. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 7, 15–39.

McNaughton B. L., Barnes C. A., O'Keefe J. (1983). The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp. Brain Res.* 52, 41-49.

McNaughton B.L., Morris R.G.M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 10, 408-415.

McNaughton B.L., Nadel L., Cooper L., Culicover P., Hamish R.M. (1989). Neuronal mechanisms for spatial computation and information storage. *Neural Connections, Mental Computation* 9, 285-350.

Matell M. S., Meck W. H. (2004). Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 21, 139–170.

Matell M.S., King G.R., Meck W.H. (2004). Differential modulation of clock speed by the administration of intermittent versus continuous cocaine. *Behavioral Neuroscience* 118 (1), 150-156.

Matell M. S., Meck W. H., Nicolelis M. A. L. (2003). Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. *Behavioral neuroscience* 117, 760-773.

Miall R. C. (1989). The storage of time intervals using oscillating neurons. *Neural Comput.* 1, 359-371.

Meck W.H. (1983). Selective adjustment of the speed of internal clock and memory processes. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 9, 171-201.

Meck W.H. (1996). Neuropharmacology of timing and time perception. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 3, 227–242.

Meck W. H. (2006). Neuroanatomical localization of an internal clock: a functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. *Brain research* 1109, 93- 107.

Meck W.H., Buhushi C.V. (2010). Peak-interval procedure. *Encyclopedia of Psychopharmacology*, 977.

Meck W. H., Cheng R.-K., Macdonald C. J., Gainetdinov R. R., Caron M. G., Cevik M. Ö. (2011). Gene-dose dependent effects of methamphetamine on interval timing in dopamine-transporter knockout mice. *Neuropharmacology* 62(3), 1221-1229.

- Meck W. H., Church R. M. (1987). Cholinergic modulation of the content of temporal memory. *Behavioral neuroscience*, 101, 457-464.
- Meck W. H., Church R. M. , Olton D. S. (1984). Hippocampus, time, and memory. *Behavioral neuroscience* 98, 3-22.
- Mehta M.R. et al. (2000). Experience-depend asymmetric shape of hippocampal receptive fields. *Neuron* 25, 707-715.
- Melcer T., Timberlake W. (1985). Poison avoidance and patch (location) selection in rats. *Anim. Learn. Behav.* 13, 60–68.
- Morris R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues . *Learn. Motiv.* 12, 239- 261.
- Morris R.G.M., Garrud., Rawlins J.N.P., O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Muller R.U., Kubie J.L. (1987). The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *The journal of neuroscience* 7, 1951-1968.
- O'Keefe J. et al. (1998). Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 353 (1373), s.1333–1340.
- O'Keefe J., Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- O'Keefe J.A., Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map* (New York: Oxford University Press).
- O'Keefe J., Speakman A. (1987). Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *.Exp Brain Res.* 68 (1), 1-27.
- O'Reilly R. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connections models of learning and memory. *Psychological Review* 102 (3), 419-457.
- Olton D. S., Meck W. H. , Church R. M. (1987). Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory dysfunctions. *Brain research*, 404, 180-188.
- Oprisan S. A., Buhusi C. V. (2014). What is all the noise about in interval timing? *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369.
- Pastalkova E. et al. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321, 1322-1327.
- Petrásek et al. (2009). Navigační úloha aktivního algoritického vyhýbání se místu (AAPA); užitečná metoda pro hodnocení prostorové kognice a chování laboratorních zvířat. *Psychiatrie*, 13.4, 195- 200.

- Pravosudov V. V., Clayton N. S. (2002). A test of the adaptive specialization hypothesis: Population differences in caching, memory, and the hippocampus in black-capped chickadees (*Poecile atricapilla*). *Behavioral Neuroscience* 116, 515–522.
- Rammsayer T. (1989a). Dopaminergic and serotonergic influence on duration discrimination and vigilance. *Pharmacopsychiatry* 22 (1), 39-43.
- Rammsayer T. (1989b). Is there a common dopaminergic basis of time perception and reaction time? *Neuropsychobiology* 21, 37-42.
- Rammsayer T.H., Vogel W.H. (1992). Pharmacologic properties of the internal clock underlying time perception in humans. *Neuropsychobiology* 26, 71-80.
- Ravassard P. et al. (2013). Multisensory control of hippocampal spatiotemporal selectivity. *Science* 340, 1342-1346.
- Schendan H.E. et al. (2003). An fMRI study of the role of the medial temporal lobe in implicit and explicit sequence learning. *Neuron* 37, 1013-1025.
- Scoville W. B., Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20, 11-21.
- Stuchlik A., Petrasek T., & Vales K. (2008). Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behavioural Brain Research* 189, 139-144.
- Stuchlik A., Vales K. (2009). Baclofen dose-dependently disrupts learning in a place avoidance task requiring cognitive coordination. *Physiology & Behavior* 97, 507-511.
- Taube J. S., Muller R. U. (1998). Comparisons of head direction cell activity in the postsubiculum and anterior thalamus of freely moving rats. *Hippocampus* 8 (2), 87-108.
- Tolman E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *The Psychological Review* 55 (4), 189-208.
- Tulving E. (1983). *Elements of episodic memory*. New York: Oxford University Press.
- Vicario C. M. et al. (2008). Relativistic compression and expansion of experiential time in the left and right space. *PLoS one* 3, e1716.
- Wallenstein G.V. et al. (1998). The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci.* 21, 317-323.
- Wiltgen B.J., Silva A.J. (2007). Memory for context becomes less specific with time. *Learn. Mem.* 14, 313-317.
- Wiltgen B.J., Zhou M., Cai Y., Balaji J., Karlsson M.G., Parivash S.N., Li W., Silva A.J. (2010). The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr. Biol.* 20, 1336-1344.
- Witter M. P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3, 33-44.

Wesierska M., Adamska I., Malinowska M. (2009). Retrosplenial cortex lesion affected segregation of spatial information in place avoidance task in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 41-49.

Yin B., Troger A.B. (2011). Exploring the 4th dimension: hippocampus, time, and memory revisited. *Frontiers in integrative Neuroscience* 5 (36).

## 9 Dodatky

### 9.1 Aparatura Arénomat

Vzhledem ke komplexnosti časoprostorových úloh byl v laboratoři Fyziologie paměti Akademie věd České Republiky v.v.i. vytvořen nový program umožňující snadnou manipulaci s řadou parametrů na kruhové aréně jak v rámci prostorovém, tak v rámci časovém (střídání světla a tmy, změna rychlosti rotace arény, manipulace s pozicí a velikostí averzivního sektoru, změna intenzity el. šoků). U programu iTrack, který je v laboratoři obvykle využíván, je možné nastavit pouze sektory (stabilní či rotující) a jejich velikost, sílu elektrické ranky či její úplné vypnutí a délku pokusu. Avšak rotace arény a rychlost otáček, zapnutí a vypnutí světla či vhadzování pelet již bylo nutné spouštět ručně. Aparatura Arénomat umožňuje sjednocení všech těchto akcí do jednoduchého programu a dává tak možnost složitějších nastavení designu úloh a větší přesnost všech úkonů. Autorem tohoto programu je Tomáš Mládek, autorka diplomové práce programuje a designuje nové experimenty, úzce spolupracuje na vývoji aparatury a testuje její funkčnost pro budoucí použití v časoprostorových experimentech.

#### 9.1.1 Technické specifikace

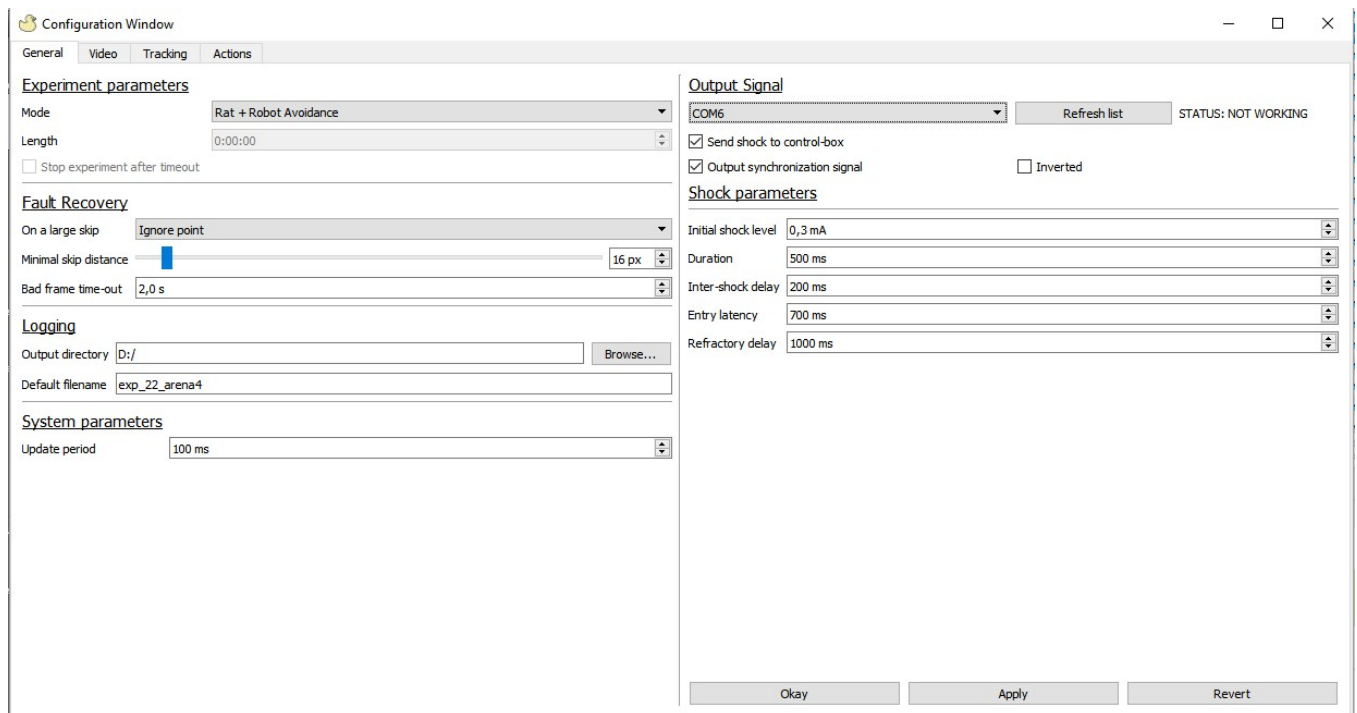
Program zajišťující nastavení úkonů na aréně a sledování zvířete je psán v programovacím jazyce C++ s použitím frameworku Qt a knihovny OpenCV, díky které je zpracováván obraz. Z této knihovny byl jeden algoritmus (sloužící k detekci černobílých bodů) přejet a druhý autor programu napsal sám. Autorův algoritmus umožňuje detekci barevných bodů pro vypočítávání orientace sledovaného objektu a je založen na filtrování obrazu v barevném prostoru podle saturace a hodnoty. Pokud se tedy v obrázku najdou dost velké spojitě plochy, tak se zprůměruje jejich velikost a zjistí se jejich barva. Následně jsou rozlišeny 4 různé body v aréně a tímto se vypočítá orientace sledovaného objektu. Detekce potkana je zajišťována stejně jako u programu iTrack srze infračervenou diodu.

Součástí zajišťující komunikaci programu s periferními úkony je Arduino, což je hardwarová komponenta, která vysílá příkazy na periférii (v našem případě ovládání rotace arény, světla apod.). Jeho naprogramování bylo přizpůsobeno potřebám dané aparatury. S programem Arénomat komunikuje přes 3-bytový binární protokol, přes který probíhají

všechny příkazy pro ovládání úkonů na periférii. Veškerý software je volně dostupný na stránkách github (<https://github.com/fgu-cas/kachna-tracker>).

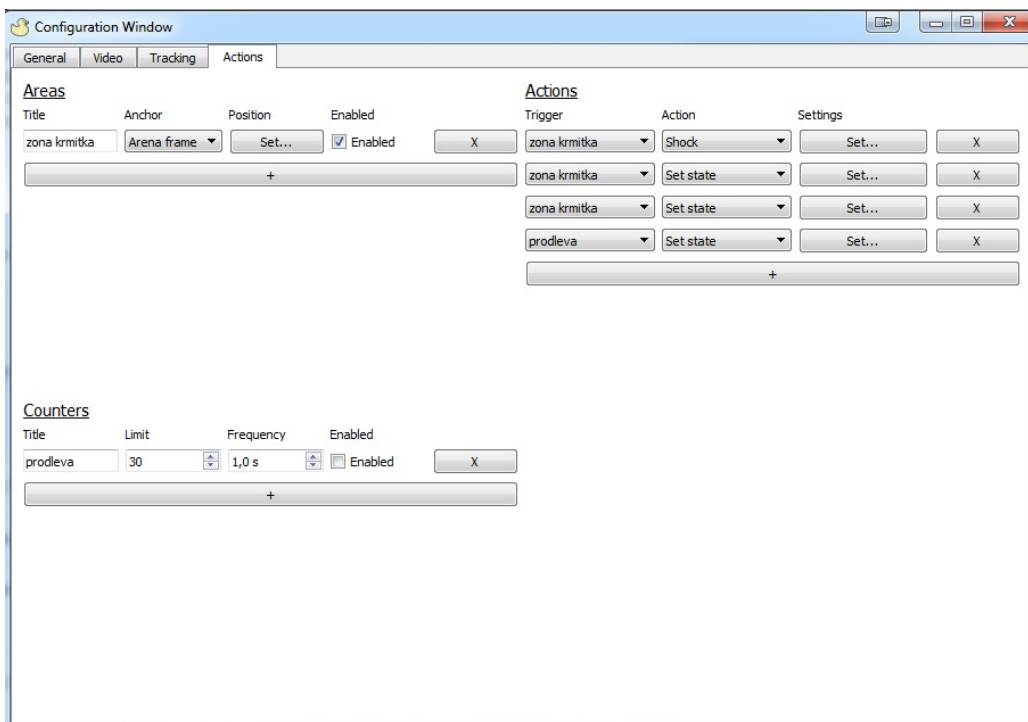
### 9.1.2 Přehled možných akcí a naprogramování úloh

První ze záložek programu umožňuje nastavení parametrů experimentu (obr. 21). To zahrnuje vše od typu úlohy, délky pokusu, nastavení averzivního stimulu či nastavení jména souboru. Jako další je potřeba v záložce „Actions“ nastavit samotný design úloh (obr. 22). Toto umožňují tři oblasti – „Areas“ sloužící k naprogramování daných sektorů, „Actions“ zajišťující libovolné akce od šoků v averzivním sektoru po vypuštění pelety z krmítka a jako poslední je zde část „Counters“, která umožňuje nastavit časové parametry a různá počítadla pro daný pokus. Samotný experiment se pak spustí v záložce „Tracking“, kde v reálném čase vidíme pohyb potkana po aréně, počet vstupů do daného sektoru a čas od začátku pokusu do prvního vstupu do sektoru (obr. 23). Intenzita elektrického šoku je zde v průběhu celého pokusu nastavitelná. Pokud program špatně snímá diodu zvířete, začne přibývat počet špatných obrazů (bad frame). Výsledky budou zapsány do textového souboru, s kterým je možné dále pracovat přes program Carousel Maze manager.

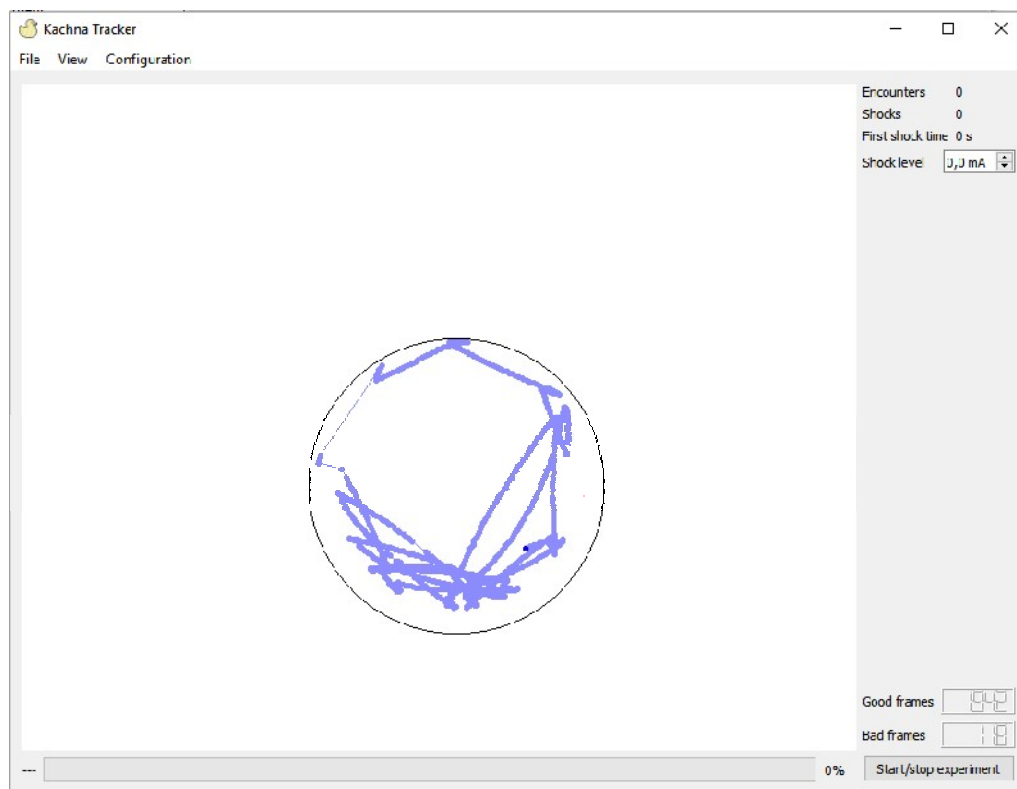


Obr. 21. Hlavní záložka „General“. Zde probíhá základní nastavení parametrů pokusu. Samotný design úloh pak probíhá v záložce „Actions“.





Obr. 22. Záložka „Actions“ zobrazující jedno z možných nastavení časoprostorových úloh.



Obr. 23. Sledování potkana při pokusu. Kamera zjednodušeně zobrazuje arénu a dráhu potkana, ale je možné ji přepnout i na reálný obraz z kamery. V této části je možné během pokusu přenastavit intenzitu el. šoku a sledovat počet chybných obrazů, což nás informuje o správnosti nastavení intenzity diody potkana.

## 9.2 Publikované práce

Petrásek T., Skurlová M., **Maleninská K.**, Vojtechová I., Kristofíková Z., Matusková H., Sirová J., Vales K., Rípková D., Stuchlík A. (2016) A rat model of Alzheimer's disease based on A $\beta$ 42 and pro-oxidative substances exhibits cognitive deficit and alterations in glutamatergic and cholinergic neurotransmitter systems. *Front Aging Neurosci.* 8 (83).