

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Mariia Lebedeva

**Role hipokampálních neuronů při tvorbě kognitivních schémat a
prostorových vztahů vyššího řádu**

**Role of hippocampal neurons in creation of cognitive schemas and
higher-order spatial relationships**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eduard Kelemen, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze, 19. 12. 2019

Mariia Lebedeva

Poděkování

Touto cestou bych chtěla vyjádřit poděkování svému vedoucímu diplomové práce, RNDr. Eduardu Kelemenovi, Ph.D., za teoretické a praktické znalosti v oblasti elektrofyziologie a neurobiologie prostorové paměti, spánku a kognice. Děkuji také za cenné rady a čas věnovaný pro zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své kolegyni, Mgr. Ewě Szczurowské, Ph.D., za podporu a pomoc při naučení metody elektrofyziologického nahrávání hipokampálních neuronů a jejich skupin *in vivo*. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

Abstrakt

Hipokampus je považován za klíčovou strukturu při tvorbě reprezentace prostoru (kognitivních map) u potkanů. Vytváření prostorových reprezentací jednoduchých prostředí bylo podrobně popsáno dříve, v této práci jsme se zaměřili na otázku vzniku prostorové mapy komplexního prostředí z jednotlivých jednoduchých map.

K imitování složitého prostředí jsme navrhli a následně vyrobili radiální bludiště, kde je každé rameno obklopeno unikátním vzorem proximálních vizuálních značek. Potkani kmene *Long Evans* postupně během tří sezení zkoumali 4 různá ramena. Během prvního a druhého sezení byli potkani seznámeni zvláště s dvěma páry sousedících ramen (ramena 1 a 2 v prvním sezení, ramena 3 a 4 ve druhém) představujících pro ně nové prostředí. Během třetího sezení potkani navštívili novou kombinaci již známých ramen (ramena 2 a 3). Tento krok umožňoval prostudovat integrování dvou jednoduchých původně na sobě nezávislých hipokampálních map v době, když se jedinec teoreticky musel dozvědět o jejich prostorovém vztahu. Potkani byli vystaveni této sekvenci tří sezení dvakrát – před spánkem a po něm. Aktivita hipokampálních neuronů byla zaznamenávána pomocí mikroelektrodeového systému jak při zkoumání bludiště, tak i během spánku.

Naše první výsledky naznačují, že reprezentace složitého prostředí není jednoduchou kombinací dříve vytvořených jednotlivých map a také se neformuje zcela *de novo*. Místo toho probíhá postupná modifikace již existujících map, což zabírá více času než jednu expozici prostředí.

Klíčová slova: hipokampus, spánek, místové neurony, prostorová paměť.

Abstract

The hippocampus is the key structure in formation of representations of space (cognitive maps) in rats. Formation of spatial representations of simple environments has been described in details, in this work we focused on emergence of a spatial map of a complex environment from individual simple maps.

A radial-arm maze was used to model a complex environment, where each arm was surrounded by unique pattern of proximal visual landmarks. *Long Evans* rats were allowed to explore gradually four different arms of the maze in a sequence of three sessions. During the first and second sessions rats separately visited two novel pairs of neighboring arms (arms 1 and 2 in the first session, arms 3 and 4 in the second session). In the third session rats were exposed to a new combination of already familiar arms (arms 2 and 3) to study how the two hippocampal maps, acquired originally as independent of each other, are integrated as the rat learns about their spatial relationship. Rats were exposed to this sequence of three sessions twice – before and after sleep. The activity of hippocampal neurons was recorded using a microelectrode system during the maze exploration and sleep.

Our first observations suggest that representation of a complex environment neither is a simple combination of preexisting individual maps, nor is it created completely *de novo*. Instead, it involves gradual modification of pre-existing maps that takes more time than a single exposure to the environment.

Keywords: hippocampus, sleep, place cells, spatial memory.

Obsah	
Seznam použitých zkratk	8
Úvod	9
1. Literární přehled	11
1.1. Prostorová navigace	11
1.1.1. Typy navigačních strategií	11
1.1.1.1. Allothetická (allocentrická) navigace	12
1.1.1.2. Idiothetická (egocentrická) navigace	12
1.1.1.3. Integrace dráhy	13
1.1.2. Kognitivní mapa	13
1.2. Hipokampus a jeho úloha v prostorové navigaci	15
1.2.1. Anatomie hipokampální formace	15
1.2.1.1. Ammonův roh	15
1.2.1.2. Vroubkový závit	17
1.2.1.3. Subikulum	18
1.2.2. Funkce hipokampu v prostorové navigaci	18
1.3. Neuronální mechanizmy prostorové paměti	20
1.3.1. Neurony místa	20
1.3.1.1. Základní informace	20
1.3.1.2. Stabilita aktivačních míst a přemapování	21
1.3.1.3. Théta fázová precese	21
1.3.2. Mřížkové buňky	23
1.3.3. Buňky směru hlavy	25
1.4. Spánek	28
1.4.1. Architektura spánku a elektrofyziologické charakteristiky spánkových fází	28
1.4.2. Reaktivace hipokampálních neuronů během spánku	30
2. Cíle práce	32
3. Metodika	33
3.1. Aparatura	33
3.2. Experimentální design	35
3.3. Experimentální zvířata	37
3.3.1. Manipulace se zvířaty	37
3.3.1.1. Handling	37
3.3.1.2. Úloha sbírání pelet	37
3.3.1.3. Habituační na spánkový koš	37
3.3.1.4. Stereotaktická operace	37
3.4. Elektrofyziologické nahrávání hipokampálních neuronů a jejich	

skupin <i>in vivo</i>	39
3.4.1. Výroba implantátů	39
3.4.2. Nahrávání jednotkové aktivity	39
3.5. Analýza dat	41
3.5.1. Shluková analýza	41
3.5.2. Analýza aktivity hipokampálních neuronů během behaviorální úlohy a spánku	41
4. Výsledky	42
4.1. Aktivita hipokampálních neuronů při tvorbě prostorové mapy složitého prostředí	42
4.1.1. Aktivita neuronu A během behaviorální úlohy	42
4.1.2. Aktivita neuronu B během behaviorální úlohy	43
4.1.3. Aktivita neuronu C během behaviorální úlohy	45
4.1.4. Aktivita neuronu D během behaviorální úlohy	46
4.2. Aktivita hipokampálních neuronů během spánku	48
5. Diskuze	50
5.1. „Complex-spike“ buňky a „theta“ buňky	50
5.2. Stabilita aktivačních polí a přemapování neuronů místa	51
5.3. Vznik prostorové mapy složitého prostředí z jednotlivých jednoduchých map	52
Závěr	54
Literatura	55
Přílohy	63

Seznam použitých zkratek

AP	akční potenciál orig. <i>action potential</i>
CA	Ammonův roh, orig. <i>cornu Ammonis</i>
DG	vroubkový závit orig. <i>gyrus dentatus</i>
LFP	potenciál blízkého pole orig. <i>local field potential</i>
LTP	dlouhodobá potenciace orig. <i>long-term potentiation</i>
MEC	mediální entorhinální kůra orig. <i>medial entorhinal cortex</i>
NREM	spánek bez rychlých očních pohybů orig. <i>non-rapid eye movement</i>
PGO	ponto-genikulookcipitální vlny orig. <i>ponto-geniculo-occipital waves</i>
REM	spánek s rychlými očními pohyby orig. <i>rapid eye movement</i>
SWS	spánek pomalých vln orig. <i>slow wave sleep</i>

Úvod

Otázka fungování systému mozku umožňujícího orientaci v prostoru zajímala biology a filosofy mnoho let. V první polovině 20. století psycholog Edward Tolman na základě svých experimentů navrhl hypotézu, že v mozku existuje „kognitivní mapa“ – vnitřní reprezentace prostředí, ve kterém se subjekt pohybuje (Tolman, 1948). V té době tento názor nemohl být ověřen, takže byl podroben kritice. Avšak studie druhé poloviny století dokázaly potvrdit myšlenku Tolmana. Tak v roce 1971 John O'Keefe a Jonathan Dostrovsky objevili neurony místa (orig. *place cells*), což jsou hipokampální neurony považované za ukazatele momentální polohy zvířete (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Různé neurony místa jsou aktivní v různých místech a společně tak tvoří mapu celého prostředí. Dále v roce 1984 James Ranck objevil buňky směru hlavy (orig. *head direction cells*), jejichž aktivita působí jako vnitřní kompas. Nacházejí se v několika mozkových strukturách spojených s hippokampem a jsou aktivní, když je hlava orientována určitým směrem v horizontální rovině (Taube, 1990). V roce 2005 v laboratoři Edvarda a May-Britt Moserových byly objeveny mřížkové buňky (orig. *grid cells*), které jsou dalším druhem neuronů spojených s prostorovou orientací. Tyto buňky kódují prostor v podobě souřadnicového systému se nacházejí v mediální entorhinální kůře. Dohromady jejich aktivita vytváří trojúhelníkovou mřížku, která pokrývá celé prostředí (Hafting et al., 2005). Hipokampální místové neurony interagují s buňkami směru hlavy a jsou v kontaktu s mřížkovými buňkami. Spolu výše zmíněné typy nervových buněk vytvářejí systém umožňující formování prostorové mapy okolního prostředí (Moser et al., 2008).

V roce 1994 bylo objeveno, že hipokampální neurony místa, které pálí při zkoumání nového prostředí nebo při plnění jednoduchých prostorových úkolů, se znovu aktivují během následujícího spánku. Navíc v stejném pořadí, jako během provedení pokusu. K reaktivaci dochází ve spánku pomalých vln (SWS) a během prvních hodin po učení (Wilson and McNaughton, 1994). To ukazuje, že spánek přispívá k ukládání a uchování informace o prostoru.

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat formování prostorové mapy složitého prostředí v hipokampu a popsat role hipokampálních neuronů v tomto procesu. Výsledky

tohoto experimentu by měly prohloubit naše porozumění neuronálním procesům, které se podílí na tvorbě kognitivních schémat a prostorových vztahů vyššího řádu.

1. Literární přehled

1.1. Prostorová navigace

1.1.1. Typy navigačních strategií

Pro všechny pohyblivé organismy, zejména pro savce, je schopnost určit vlastní polohu v okolním prostředí a orientovat se v něm nezbytnou kognitivní schopností přispívající k vyhledávání cesty domů, potravy, partnera k páření apod. K dosažení výše uvedených cílů používají živočichy různé navigační mechanismy a strategie, klasifikace kterých je založena na odlišných aspektech.

Podle geografického měřítka se navigace dělí na geografickou a topografickou. Geografická navigace je hlavním mechanismem uplatňovaným při pohybu na velké vzdálenosti a tím představuje nedílnou součást života migrujících druhů živočichů, jako jsou například tažní ptáci a mořské želvy. Při migraci se spoléhají na rozličné ukazatele – na pozici Slunce (sluneční kompas), hvězd (stelární kompas), polarizovaného světla a také na magnetické pole Země. Topografická navigace se používá během orientace subjektu v lokálním prostředí v rozhraní svého habitatu, a jako ukazatele k určení své polohy zde slouží familiární prostorové značky (Stuchlík, 2003). Topografická navigace je velice důležitá z experimentálního hlediska, protože tento typ navigace se zkoumá v laboratorních podmínkách za použití různých typů bludišť.

V rámci topografické navigace John O'Keefe a Lynn Nadel vyčlenili 2 strategie – navigace trasou a navigace mapou (O'Keefe and Nadel, 1978). Navigace trasou neboli taxonová navigace (*orig. route navigation*) se většinou používá v málo známém prostředí a představuje jednoduchý řetězec typu podnět - odpověď. Jako příklad může sloužit následující sekvence instrukcí: "Jdi rovně k zelenému domu, pak zaboč vpravo, a když uvidíš velký strom, zahni vlevo". I když je taková strategie v některých případech efektivní a rychlá, má velké nevýhody. Zaprvé není flexibilní, tzn., že ji lze použít pouze pro jedinou trasu, pro kterou byl návod vytvořen. Zadruhé není odolná vůči změnám v prostředí – pokud nějaké orientační body ze sekvence chybějí, nepodaří se najít konečný bod trasy (Stuchlík, 2003). Při pohybu subjektu v známém prostředí se uplatňuje navigace mapou (*orig. mapping navigation*), která vyžaduje existenci reprezentace prostoru, ve kterém se zvíře pohybuje, jakési kartografické mapy s orientačními body v ní. Orientace se uskutečňuje na základě znalostí těchto

prostorových ukazatelů a vzájemných geometrických vztahů mezi nimi. Na rozdíl od trasové navigace tato strategie je flexibilní a rezistentní vůči změnám v okolí – při ztrátě nebo změně nějaké orientační značky, je nízká pravděpodobnost dezorientace, protože zvíře disponuje i dalšími.

V rámci mapové navigace existují další 2 podtypy na základě odlišnosti orientačních bodů a to navigace allocentrická a egocentrická. Při allocentrické navigaci se zvíře orientuje podle ukazatelů vnějšího světa, zatímco při egocentrické – pomocí signálů vygenerovaných vlastním tělem během pohybu (Klatzky, 1998). Výše zmíněné dělení je často nahrazováno dělením na allotheticou a idiotheticou formu orientace, což je v podstatě to samé, ale idiothetické procesy zahrnují nejen podněty vycházející z vlastní lokomoce, ale i informace přímo s ní spojené, jako je například optický nebo hmatový tok (Mittelstaedt and Mittelstaedt, 1980 podle Stuchlík, 2003). Za běžných podmínek obě dvě strategie interagují mezi sebou a jsou využívány současně.

1.1.1.1. Allotheticá (allocentrická) navigace

Allothetické procesy představují metodu zpracování prostorových informací z vnějšího prostředí. Prostorové informace jsou zde integrovány ve formě mapy, která obsahuje důležité externí body a charakterizuje vzájemné prostorové vztahy mezi nimi. Takovými vnějšími navigačními ukazateli jsou exteroceptivní vjemy: vizuální, taktilní, olfaktorické (Whishaw and Brooks, 1999). Allotheticá mapa umožňuje snadnou manipulaci se získanými informacemi, které lze použít k nalezení alternativních tras v případě, že trajektorie k cíli je zablokována. Rovněž přispívá k vytvoření zkratk nebo oklik. Klíčovou strukturou účastníci se tohoto procesu je hipokampus (Wesierska et al., 2005).

1.1.1.2. Idiotheticá (egocentrická) navigace

Při idiothetické navigaci nepostradatelnou roli hrají signály vycházející bezprostředně z pohybu subjektu (jak z aktivního, tak i z pasivního), což jsou signály generované vestibulárním a somatosenzorickým systémem a eferentní kopie motorických příkazů. Patří sem také optický a hmatový tok, což jsou externí ukazatele, ale těsně spojené s lokomocí jedince (Whishaw and Brooks, 1999).

Idiotheticá navigace se dále člení na substrátovou a inerciální. Substrátová idiotheze dostává informace z proprioreceptorů, což jsou smyslové receptory v svalech, šlachách a

kloubech, a porovnává je s eferentními kopiemi motorických příkazů. Takovým způsobem je subjekt informován o vlastní lokomoci vzhledem k podkladu. Inerciální idiotheze zpracovává informace ze statokinetického ustrojí ve středním uchu a detekuje uhlové a lineární zrychlení hlavy. Substrátová a inerciální navigace za normálních okolností v reálných situacích pracují spolu (Stuhlik, 2003).

1.1.1.3. *Integrace dráhy*

Integrace dráhy je proces, kdy zvíře během své cesty průběžně aktualizuje informaci o aktuálním směru a vzdálenosti vlastní polohy vzhledem k nějakému referenčnímu bodu, jímž může být, například, hnízdo nebo bezpečný úkryt. Výsledkem je obdržení vektoru (orig. *homing vector*), který bude vést jedince z jakéhokoliv místa přímo zpět do výše popsaného referenčního bodu (Etienne and Jeffery, 2004). Tato schopnost je užitečná, když subjekt, například, exploruje prostředí nebo hledá potravu vzdáleně od svého domova, setká se s predátorem a bude muset utéct. V této situaci se zvíře vrátí zpátky co nejkratší cestou díky vytvořenému homing vektoru. Integrace dráhy je těsně spojená s idiotheticou navigací, ale může být použita i informace allotheticá, která napomáhá odstranit systematické kumulativní chyby vzniklé idiotheticou orientací (Stuhlik, 2003). Etienne a kol. ukázali, že křečci používají vnější vizuální orientační značky k obnovení informace o poloze integrátoru (referenčního bodu) své cesty (Etienne et al., 2004).

1.1.2. *Kognitivní mapa*

Kognitivní mapa je mentální reprezentace prostředí, která slouží ke kódování, ukládání a vybavení prostorové informace. Pro vznik kognitivní mapy prostoru je zásadní aktivní zkoumání prostředí, které vede k stanovení důležitých orientačních bodů a k pochopení geometrických vztahů mezi nimi, jako jsou úhly a vzdálenosti (Poucet, 1993). Vytvoření kognitivní mapy je náročný proces, ale po jejím vzniku na dlouhou dobu zůstává zakódována v paměti. Při existenci takové reprezentace prostoru v mozku se jedinec může dostat do žádoucího bodu nejen pomocí jediné dráhy, ale vybrat si z několika dostupných cest, které vedou do cílové oblasti, vymyslet si co nejkratší trajektorii, a navíc použít okliky v případě nějaké zablokované trasy (Redish, 1999).

Koncept kognitivní mapy byl poprvé uveden Edwardem Tolmanem v roce 1948. Americký psycholog studoval chování potkanů v různých bludištích. V jednom z jeho

experimentů byl potkan umístěn do křížového bludiště a musel ho nejdřív prozkoumat. Po tomto počátečním kroku byl potkan lokalizován na jednom z ramen a jídlo bylo rozmístěno v druhém tak, že potkan musel odbočit vpravo na křižovatce, aby se dostal k odměně (výše popsané jídlo). Tomuto jednoduchému úkolu se laboratorní zvíře rychle naučilo. Když byl však potkan vypouštěn z jiného ramene, než během tréninku, místo toho, aby automaticky zahrnout doprava, dokázal určit správnou cestu k potravě (Tolman, 1948). To znamená, že předchází explorace bludiště vedla k vytvoření kognitivní mapy prostředí v mozku potkana, podle které se pak orientoval a plánoval svůj pohyb.

Vzhledem k nedostatku dat podporujících teorii Tolmana, zejména neuronálních mechanismů vysvětlujících princip fungování kognitivních map, jeho koncept nebyl přijat a byl podroben kritice. Později však Tolmanova myšlenka získala neurobiologickou podporu objevením místových buněk O'Keefem a Dostrovskym v roce 1971 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Tyto neurony se nacházejí v hipokampu a mají místně-specifickou aktivitu, tzn., že pálí s vysokou frekvencí, když se subjekt nachází v určité části prostoru nazývané aktivační pole. Na základě těchto výsledků O'Keefe a Nadel v roce 1978 publikovali knihu „*Hipokampus jako kognitivní mapa*“, ve které navrhli hypotézu o hipokampu jako nervovém substrátu kognitivní mapy prostoru a předpokládali, že tato mapa má podobu alocentrického souřadnicového systému, kde jsou zakódovány důležitá místa a objekty a vzájemné vztahy mezi nimi (O'Keefe and Nadel, 1978). Následné objevy mřížkových buněk a buněk směru hlavy upřesnily hypotézu kognitivních map a rozšířily poznatky o navigačním systému mozku. Systém určování polohy v prostoru podporovaný výše popsanými buňkami je často považován za modelový systém pro pochopení toho, jak mozek zpracovává kognitivní informace vyššího řádu (Epstein et al., 2017).

1.2. Hipokampus a jeho úloha v prostorové navigaci

Hipokampus (řec. *hippocampus* – mořský koník) je párový archikortikální orgán lokalizovaný v mediálním temporálním laloku a je součástí koncového mozku lidí a jiných obratlovců. Patří do limbického systému a hraje klíčovou roli při ukládání a konsolidaci epizodické paměti (paměť pro události v jejich prostorovém a časovém kontextu) u lidí (Scoville and Milner, 1957) a prostorové paměti umožňující navigaci u zvířat (Morris et al., 1982).

Termín “hipokampální formace“ zahrnuje hipokampus vlastní, což je Ammonův roh (orig. *cornu Ammonis*), a další s ním související části mozku. Neexistuje však shoda o tom, které oblasti jsou začleněny. Někdy hipokampus zahrnuje vroubkový závit (orig. *gyrus dentatus*) a subikulum (orig. *subiculum*). Některé odkazy přiřazují *gyrus dentatus* a *subiculum* k hipokampální formaci (Martin, 2003) a podle jiných zdrojů sem patří také *presubiculum*, *parasubiculum* a entorhinální kortex (Anderson et al., 2007).

U Alzheimerovy choroby a dalších forem demence je hipokampus jednou z prvních oblastí mozku, která trpí poškozením. Ztráta krátkodobé paměti a dezorientace jsou prvními příznaky. Lidé s rozsáhlým bilaterálním poškozením hipokampu zažívají anterográdní amnézii, tzn., mají potíže s vytvářením a udržením nových vzpomínek (Amaral and Lavenex, 2007).

Vzhledem k tomu, že je z histologického hlediska hipokampus laminární strukturou složenou z několika vrstev různých typů nervových buněk, často se používá jako modelový systém pro výzkumy v neurofyzilogii. Jedna z forem neuroplasticity známá jako dlouhodobá potenciace (orig. *long-term potentiation*) byla poprvé objevena v hipokampu králíka v roce 1966 a v této struktuře byla posléze často studována (Andersen and Lømo, 1966). LTP je jedním z hlavních buněčných mechanismů, který je podstatou učení a paměti.

1.2.1. Anatomie hipokampální formace

1.2.1.1. Ammonův roh

Hipokampus je tvořen převážně pyramidovými buňkami. Jako všechny neurony, tyto buňky mají výběžky dvojího druhů: *aférentní* dendrity a *eferentní* neurity neboli axony. Bazální dendrity pyramidálních buněk směřují k povrchu laterálních komor, zatímco apikální

dendrity se rozprostírají od laterálních komor k DG. Axony pyramidálních buněk převádějí informace přijaté hipokampem do jiných struktur v mozku – tyto eferentní výběžky probíhají od těla pyramidových buněk, procházejí strukturou zvanou *alveus* (tenká vrstva bílé hmoty na komorovém povrchu hipokampu) a pak vstupují do entorhinalního kortexu nebo fornixu (Knowles and Schwartzkroin, 1981). Fornix je svazek drah spojující hipokampální formaci s dalšími strukturami limbického systému a pravý a levý hipokampus navzájem.

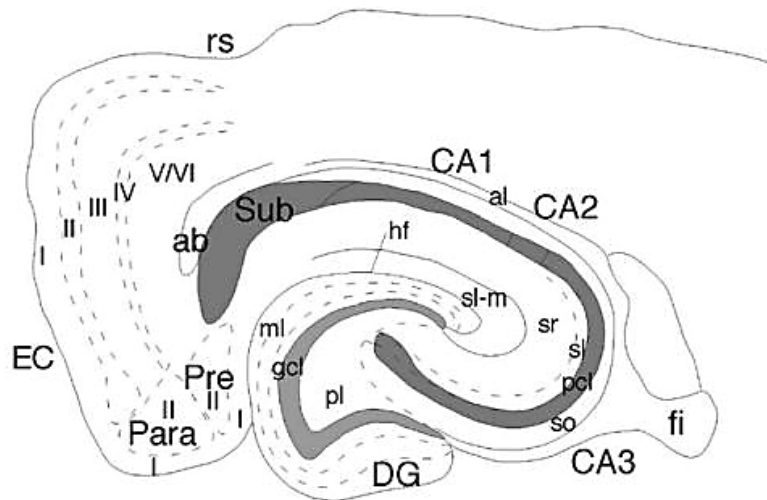
Jak bylo zmíněno výše, hipokampus je laminární strukturou, tzn., že se skládá z několika vrstev (obr. 1). Od komorového povrchu až po DG je hipokampus tvořen těmito vrstvami:

1. *stratum oriens*,
2. *stratum pyramidale*,
3. *stratum radiatum*,
4. *stratum lacunosum-moleculare*.

Stratum oriens obsahuje bazální dendrity pyramidových neuronů a košíkové buňky (angl. *basket cells*), které představují inhibiční interneurony s GABAergní projekcí. Vrstva pyramidálních buněk (orig. *stratum pyramidale*) je tvořena těly pyramidových neuronů, což jsou excitační neurony hipokampu. *Stratum radiatum* obsahuje Schafferovy kolaterály (orig. *Schaffer collaterals*) projikující z CA3 oblasti do CA1. *Stratum lacunosum-moleculare* zahrnuje perforující dráhu, která se skládá z apikálních dendritů pyramidálních buněk a z vláken pocházejících z entorhinalního kortexu. Perforující dráha končí v DG (Anderson et al., 2007).

Hipokampus se dále rozděluje do třech oblastí zvaných pole: CA1, CA2 a CA3 (*Cornu Ammonis* – Ammonův roh). Pole CA1, také známé jako Sommerův sektor, obsahuje malé pyramidální buňky umístěné poblíž subikula. Výstupní cesta s této oblasti vede do V. vrstvy entorhinalního kortexu a také do subikula. CA2 je malá oblast lokalizovaná mezi CA1 a CA3. Dostává signály z II. vrstvy entorhinalní kůry přes perforující dráhu a vyznačuje se velkými pyramidovými neurony bez mechových vláken. Pole CA3 je též tvořeno velkými pyramidovými buňkami, ale na rozdíl od CA1, jsou zde přítomná mechová vlákna (orig. *mossy fibers*, axony granulárních buněk DG projikující do polymorfni vrstvy vroubkového závitů k dendritům pyramidových buněk CA3 hipokampu). Takže díky existenci výše uvedených vláken přijímá CA3 informace z granulárních buněk DG. Také dostává tato oblast signály z

entorhinální kůry přes perforující dráhu. Axony pyramidálních buněk v CA3 se promítají zpět do *hillu* DG, ale většinou do oblastí CA1 a CA2 prostřednictvím Schafferových kolaterál nebo zpětně do CA3 pomocí rekurentního spojení (orig. *recurrent connections*) (Knowles, 1992).



Obr. č. 1. Schematické znázornění hipokampální formace u potkana. Vysvětlivky: ab – angular bundle, sub – subikulum, CA1 – CA1 oblast *cornu Ammonis*, CA2 – CA2 oblast *cornu Ammonis*, CA3 – CA3 oblast *cornu Ammonis*, al – *alveus*, sr – *stratum radiatum* hipokampu, sl – *stratum lacunosum* hipokampu, sl-m – *stratum lacunosum-moleculare* hipokampu, pcl – pyramidová vrstva hipokampu, so – *stratum oriens* hipokampu, fi – fimbria, DG – *gyrus dentatus*, pl – polymorfni vrstva DG, gcl – granulární vrstva DG, ml – molekulární vrstva DG, hf – hipokampální fisura, para – parasubikulum, pre – presubikulum, EC – entorhinální kortex. Převzato z (Andersen et al., 2007).

1.2.1.2. Vroubkový závit

Stejně jako CA pole hipokampu, i *gyrus dentatus* je vícevrstevnou strukturou (obr. 1). Ale na rozdíl od Ammonova rohu, jehož základními buňkami jsou pyramidální neurony, primárními buňkami DG jsou buňky granulární. To jsou velikostně malé neurony umožňující glutamátergní projekce z DG.

Molekulární vrstva se vyznačuje přítomností dendritů granulárních buněk, vláken entorhinálního kortexu a také interneuronů. Hlavní vrstvu tvoří těla granulárních buněk a v poslední polymorfni vrstvě se nacházejí axony granulárních buněk, které se nazývají mechová vlákna a jsou spojeny s pyramidovými buňkami oblasti CA3 hipokampu, a také tzv.

mechové buňky (Amaral et al., 2007). Základní úlohou DG je zprostředkovávání převodu informací mezi entorhinální kůrou a CA3 hipokampu.

1.2.1.3. *Subikulum*

Subikulum leží mezi CA1 oblastí a entorhinální kůrou a představuje tranzitní oblast mezi těmito strukturami. Zde na rozdíl od hipokampu je vrstva pyramidových buněk výrazně silnější. Aferentní dráhy z této oblasti vedou do entorhinální kůry, mammilárních jader, laterálního thalamu, prefrontální kůry, septálního jádra a do *nucleus accumbens* (Burwell and Agster, 2008)

1.2.2. *Funkce hipokampu v prostorové navigaci*

Hipokampus hraje důležitou roli při zpracování informace o prostoru (Liu and Bilkey, 2001). Na to je několik důvodů: zaprvé, mnoho neuronů v hipokampu reaguje jako buňky místa generující akční potenciály, když zvíře prochází vymezenou částí prostředí. Zadruhé, existují četné studie na laboratorních zvířatech, pacientech s poškozením této oblasti a na zdravých dobrovolnících podporující výše popsanou nepostradatelnost hipokampu v prostorové navigaci.

Pacienti trpící amnézií, u kterých je poškozen hipokampus, se nemohou naučit uspořádání objektů v prostoru a u pacientů, kteří se podrobili úplnému odstranění této oblasti, je prostorová navigace vážně narušená (Squire, 1992). Blokování plasticity v hipokampu má za následek problémy s cílenou navigací a zhoršení schopnosti si zapamatovat přesná místa (Hebert and Dash, 2004). Když jsou potkani s ireversibilní lézí dorzálního hipokampu vypouštěni z různých startovních míst Morrisova vodního bludiště, nemohou najít skrytý ostrůvek (cíl) umístěný vždy v konstantní pozici (Morris et al., 1982). Zatímco léze ventrální části nemá žádný vliv na prostorovou paměť, což ukazuje, že existuje funkční diferenciací mezi výše zmíněnými dvěma oblastmi hipokampu (Bannerman et al., 2002). Ptáci uchovávající potravu, tzv. „*food-storing birds*“, se vyznačují zvýšeným objemem hipokampu ve vztahu k velikosti mozku a těla (Clayton, 1998).

Poznatky o úloze lidského hipokampu v prostorové orientaci byly výrazně posíleny vývojem zobrazovacích metod, jako je pozitronová emisní tomografie (PET) a funkční magnetické rezonance (fMRI). Například, když se zdraví dobrovolníci procházeli složitým virtuálními prostředím, Maguire a kol. pozorovali zvýšenou hipokampální aktivaci, což

potvrzuje, že se hipokampus u lidí také podílí na kódování informace o prostoru (Maguire et al., 1996). Také byly prováděny experimenty na londýnských taxikářích, kde se studovala jejich topografická paměť: subjekty si museli vzpomenout na složité cesty Londýnem. Výsledky této studie ukázaly, že je vybavení prostorových vzpomínek těsně spojeno s aktivací pravého hipokampu (Maguire, 1997). Navíc je posteriorní část hipokampu těchto pracovníků větší než u kontrolní skupiny a míra vzrůstu souvisí s délkou taxikářské praxe (Maguire et al., 2000).

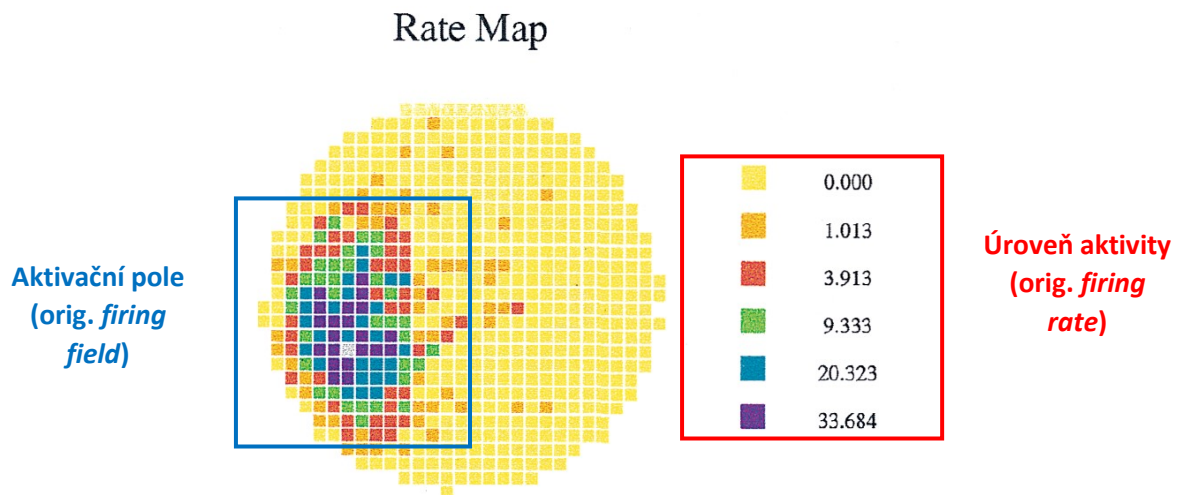
Existují další studie, které popisují odlišnou roli hipokampálních spojení v prostorové paměti. Podle nich se systém entorhinální kůra-CA1 používá k rozpoznávání míst založené na vzpomínkách (Brun et al., 2002), zatímco systém, který se skládá z třisynaptické smyčky (entorhinální kůra – *gyrus dentatus* – CA3 – CA1), je významný pro vybavení prostorové paměti (Goodrich-Hunsaker et al., 2008).

1.3. Neuronální mechanizmy prostorové paměti

1.3.1. Neurony místa

1.3.1.1. Základní informace

Neurony místa (orig. *place cells*) těsně spojené s navigací objevili John O'Keefe a Jonathan Dostrovsky v roce 1971 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Anatomicky *place cells* jsou excitačními pyramidálními neurony umístěnými v CA1 a CA3 subregionech *cornu Ammonis* (O'Keefe, 1979) a nacházejícími se jak v dorzální tak i ve ventrální části hipokampu (Jung et al., 1994). Charakteristickým rysem místových buněk je jejich aktivita vztažena na určité místo v prostoru, tedy fakt, že pálí s vysokou frekvencí, když se subjekt nachází ve vymezené části prostředí nazývané aktivační pole, aktivační místo neboli receptivní pole (orig. *firing/place field*). Mimo toto pole je aktivita skoro nulová (Muller, 1996).



Obr. č. 2. Mapa prostorové aktivity hipokampální místové buňky ve válcovém bludišti. Aktivačním místem (orig. *firing field*) znázorněné *place cell* je oblast vedle zdi arény z levé strany. Napravo je uvedena úroveň aktivity (orig. *firing rate*) tohoto neuronu místa v pixelu určité barvy. Upraveno podle (Muller, 1996).

Na obrázku číslo 2 je znázorněn neuron místa kódující oblast vedle stěny válcové arény. Každý malý čtverec (pixel) představuje 2,5 cm² v tomto bludišti a barva jednotlivého pixelu označuje úroveň aktivity neuronu v této oblasti (orig. *firing rate*). *Firing rate* je celkový počet vygenerovaných akčních potenciálů v pixelu dělený celkovým časem stráveným v tomto pixelu. Vyšší aktivita je kódována tmavšími barvami, zatímco žlutá barva znázorňuje nulovou aktivitu (žádné akční potenciály). Jednotlivé místové neurony jsou aktivní na různých místech a spolu pokrývají povrch prostředí (Wilson and McNaughton, 1993). Aktivita

buněk místa je závislá na vnějších orientačních vizuálních značkách. Při jejich posunu dochází k odpovídající rotaci receptivních polí (Muller and Kubie, 1987). Buňky místa poskytují zvířeti dynamickou, nepřetržitě aktualizovanou reprezentaci alocentrického prostoru a vlastní polohu subjektu v něm.

1.3.1.2. *Stabilita aktivačních míst a přemapování*

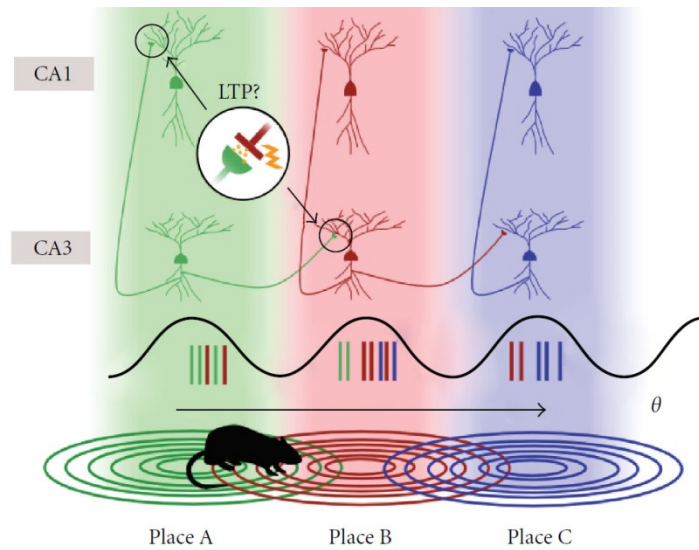
Nahrávání aktivity *place cells* obvykle probíhá nepřetržitě při exploraci nějaké arény potkanem. Téměř vždy aktivační místa jednotlivých neuronů jsou stabilní během sezení, které může činit od několika minut do hodin. Navíc aktivační pole zůstávají ve stejné oblasti i v případě prodlevy mezi sezeními trvajících hodiny, týdny až měsíce (Thompson and Best, 1990). Dlouhodobá stabilita aktivačních polí ukazuje, že vzniklá reprezentace nějakého prostoru je trvalá a nevytváří se *de novo* při opakovaném umístění subjektu do známého prostředí. Předpokládá se, že rozpoznávání stejného prostředí je prováděno samotným hipokampem dostávajícím vysoce zpracované smyslové informace přes entorhinální kortex (Muller, 1996).

V roce 1987 Bob Muller a John Kubie zjistili, že neurony místa mění svou aktivitu při změně experimentálního prostoru (Muller and Kubie, 1987). Tomuto fenoménu se říká "přemapování", což znamená, že při umístění subjektu do nového prostředí místové buňky jsou schopné změnit svá aktivační místa, utlumit svou aktivitu nebo naopak ji navýšit či zahájit v případě, že před tím byly tzv. tiché. Tyto změny se odehrávají v celé populaci *place cells*, takže pro každý nový prostor se tvoří odlišná prostorová mapa. Jednotlivý neuron místa je součástí několika nezávislých reprezentací (Moser et al., 2015). Ale k přemapování může docházet i ve stejném prostředí, například při změně behaviorální úlohy (Markus et al., 1995; Kelemen and Fenton, 2013) nebo změnou motivačního stavu zvířete (Moita et al., 2004).

1.3.1.3. *Théta fázová precese*

Jeden ze zajímavých fenoménů ve studiu aktivity místových neuronů byl popsán v 90. letech dvacátého století, tj. více než 20 let po objevení buněk místa. Tento jev se nazývá théta fázová precese (orig. *phase precession*) a je schematicky znázorněn na obrázku číslo 3. Théta fázová precese je neurofyziologický proces, kdy je generování akčních potenciálů jednotlivými buňkami místa časově vázáno na fázi théta rytmu a závisí na poloze zvířete

vzhledem ke středu aktivačního pole. Předpokládá se, že fázová precese hraje významnou úlohu v neurálním kódování informací (O'Keefe and Recce, 1993).



Obr. č. 3. Théta fázová precese. Aktivita jednotlivé buňky místa je časově vázána na určitý moment théta rytmu (před maximem théta vlny, uprostřed nebo po ní) v závislosti na poloze zvířete vzhledem ke středu aktivačního pole. Receptivní pole různých buněk místa v CA1 a CA3 se mohou více či méně překrývat. To umožňuje tvorbu prostorové paměti pomocí synaptické plasticity. Převzato z (Sadowski et al., 2011).

Během exploračního chování zvířete v hipokampu dochází k aktivaci théta rytmu s frekvencí 6–10 Hz (Winson, 1974). Pokud se zvíře nachází uprostřed aktivačního pole „zelené“ buňky místa, tato buňka se aktivuje, když théta vlna dosahuje svého maxima (obr. 3). Při dalším pohybu se subjekt dostává do místa překrytí receptivních polí „zelené“ a „červené“ buňky. „Zelená buňka“ stále pálí, ale zároveň se stává aktivní i „červená buňka“, a její impulzy se zpožďují vzhledem k maximu théta vlny. V době, kdy se zvíře přesune do středu pole „červené“ buňky, vzniká další vlna théta rytmu. Teď „červená“ buňka generuje akční potenciály uprostřed maxima vlny théta, aktivita „zelené“ buňky předhání tento vrchol a impulzy „modré buňky“ se opoždí za ním. Analogicky, při přiblížení zvířete ke středu aktivačního pole „modré“ buňky, tato buňka začíná pálit, když théta vlna dosahuje svého maxima. „Zelená“ buňka v té době už není aktivní, protože subjekt se nachází za hranicemi jejího aktivačního místa, a impulzy „červené“ buňky předhání maximum vlny théta.

Předpokládá se, že taková časová organizace činnosti buněk místa je nezbytná pro vytvoření (posílení) důležitých spojů mezi buňkami při učení informace o prostoru. Díky

synaptické plasticitě se posilují spoje mezi buňkami v CA1 nebo CA3, které pálí postupně jedna za druhou s krátkým časovým zpožděním. To umožňuje zvířeti zapamatovat si a vzpomenout si posloupnost pohybů v přímém pořadí. Upevnění vazby mezi neuronem, který pálí v čase o něco později, s neuronem pálícím nemnoho dříve, umožňuje zapamatovat si a vzpomenout si posloupnost pohybů v opačném pořadí. Synchronní aktivita místových neuronů v CA3 a CA1, které mají stejná aktivační pole a jsou spojeny Schafferovými kolaterálami, vede k zesílení kontaktu mezi těmito neurony a ke koordinaci jejich aktivity. Takovým způsobem se formují podmínky pro kódování trajektorií pohybu a vytváření prostorové paměti (Skaggs et al., 1996).

Hipokampální místové neurony interagují s buňkami směru hlavy (orig. *head direction cells*), jejichž aktivita působí jako vnitřní kompas, a jsou v kontaktu s mřížkovými buňkami (orig. *grid cells*) nacházejícími se v mediální entorhinální kůře. Spolu výše zmíněné typy neuronů vytvářejí hipokampálně - entorhinální systém umožňující prostorovou reprezentaci (Moser et al., 2008).

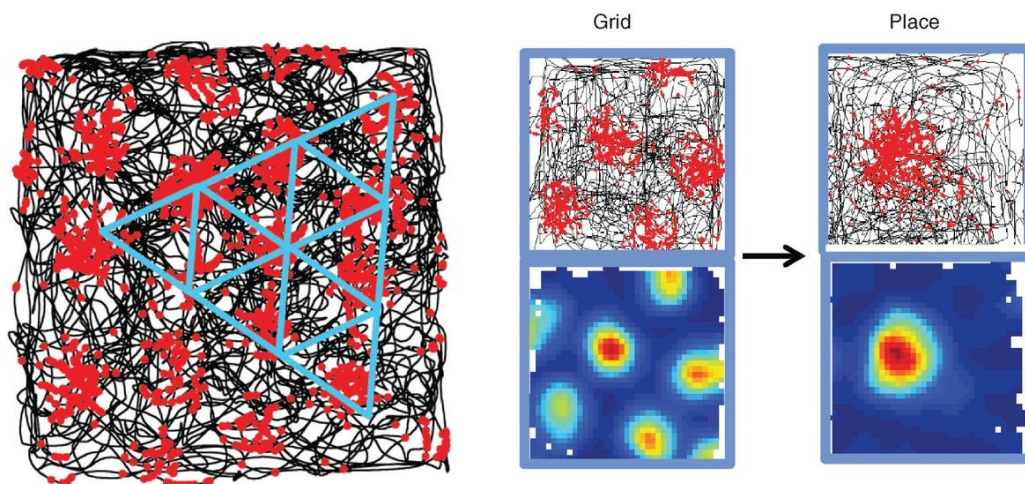
1.3.2. Mřížkové buňky

Mnozí badatelé si již od počátku objevení *place cells* mysleli, že signály místových buněk závisí především na výpočtech v rámci samotného hipokampu. Tento pohled byl zpochybněn pozorováním, že místně specifická aktivita neuronů CA1 přetrvává i po odstranění intrahipokampálních vstupů z DG (McNaughton et al., 1989) a CA3 (Brun et al., 2002). Tyto objevy prokázaly, že se prostorové signály dostávají do CA oblastí hipokampu také pomocí perforující dráhy z entorhinalního kortexu.

Tak v roce 2005 v laboratoři Edvarda a May-Britt Moserových v Norsku byly objeveny mřížkové buňky (orig. *grid cells*) a posléze v roce 2014 výše uvedení vědci spolu s Johnem O'Keefem dostali Nobelovou cenu za fyziologii nebo lékařství za objevy neuronů, které jsou v mozku zodpovědné za určování polohy. *Grid cells* jsou dalším typem neuronů umožňujícím subjektu porozumět jeho pozici v okolním prostoru (obr. 4). Mřížkové buňky na rozdíl od neuronů místa nemají jen jedno aktivační pole (orig. *firing field*), namísto toho pálí, když se volně pohybující zvíře prochází množstvím malých oblastí experimentálního prostoru (Fyhn et al., 2004), a navíc jsou aktivní ve všech testovaných prostředích. Aktivační místa *grid cell* mají přibližně stejnou velikost a dohromady vytvářejí trojúhelníkovou mřížku, která pokrývá

celé prostředí (Hafting et al., 2005). Kolektivní aktivita *grid cells* kóduje měnící se polohu subjektu v prostoru s přesností podobnou místovým buňkám hipokampu (Fyhn et al., 2004). Mřížkové buňky jsou považovány za metrický systém mozku nutný pro prostorovou navigaci.

Mřížkové buňky byly nalezeny ve všech vrstvách mediálního entorhinalního kortexu (MEC), ale buňky v různých vrstvách mají tendenci se lišit ve svých vlastnostech. Vrstva II obsahuje největší hustotu „čistých“ *grid cells* v tom smyslu, že pálí rovnoměrně bez ohledu na směr, ve kterém zvíře prochází přes aktivační pole. Mřížkové buňky z hlubších vrstev III, V a VI jsou promíchány s *conjunctive cells* a buňkami směru hlavy a generují akční potenciály pouze tehdy, když se zvíře pohybuje v konkrétním směru (Sargolini et al., 2006). *Grid cells* II vrstvy MEC vykazují fázovou precisi, tzn., že jejich aktivita je řízena fází théta, jak je tomu u hipokampálních místových buněk (Hafting et al., 2008).

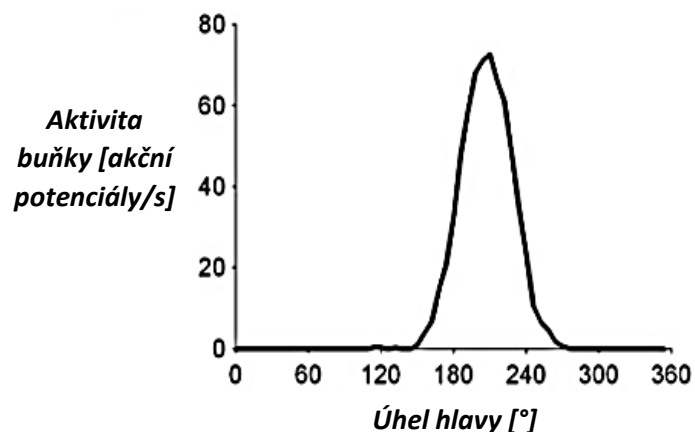


Obr. č. 4. Znárodnění aktivity mřížkové buňky a neuronu místa. (Vlevo) Mřížková buňka z MEC. Černou linkou je vyznačena trajektorie chůze potkana v čtvercové aréně o ploše 1,5 m x 1,5 m, zatímco červené tečky znázorňují místa generování akčních potenciálů *grid cell*. Každá červená tečka odpovídá jednomu akčnímu potenciálu. Modré rovnostranné trojúhelníky ilustrují trojúhelníkovou mřížku vznikající z aktivity *grid cell* a pokrývající celou arénu. (Vpravo) Mřížková buňka a místová buňka. (Nahoře) Trajektorie s lokalizací akčních potenciálů, jako v levé části. (Dole) Mapy prostorové aktivity buněk nahoře, které barevně znázorňují aktivitu neuronů v jednotlivých pixlech (částech) arény. Vysoká aktivita je kódována červenou barvou, nulová – tmavě modrou. Předpokládá se, že mřížkové buňky poskytují prostorovou informaci pro *place cells*. Převzato z (Moser et al., 2015).

Mřížka jednotlivé *grid cell* je charakterizována rozestupy mezi aktivačními poli (vzdáleností mezi nimi), orientací (naklonění vzhledem k vnější referenční ose) a fází (posunutí v směru osy XY vzhledem k vnějšímu referenčnímu bodu). Ačkoli mřížky neuronů ze stejné části MEC mají podobné rozestupy mezi aktivačními poli a shodnou orientaci, jejich fáze není topografická, tzn., že je rozložení *firing fields* lokalizovaných vedle sebe u mřížkových buněk náhodné, stejně jako to u aktivačních polí sousedících buněk místa hipokampu (Moser et al., 2008). Rozestupy mezi aktivačními poli se monotónně zvyšují od buněk umístěných v dorzomediální MEC k neuronům ventrolaterální MEC (Hafting et al., 2005), což odráží nárůst velikosti aktivačních polí *place cells* podél dorsoventrální osy hipokampu (Jung et al., 1994; Maurer et al., 2005). Aktiva *grid cells* zůstává zachována i ve tmě, tzn., že je reprezentace vytvořena jen ze signálů o vlastním pohybu a nezávislá na vnějších orientačních značkách. Mřížkové buňky jsou nepostradatelné pro proces integrace trasy (McNaughton et al., 2006).

1.3.3. Buňky směru hlavy

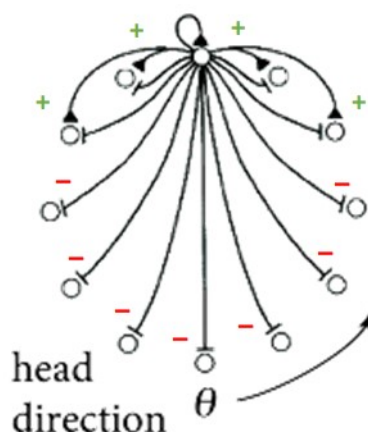
Buňky směru hlavy (orig. *head direction cells*) jsou dalším typem funkčně specializovaných neuronů, které se nacházejí v několika mozkových strukturách spojených s hipokampem. Tyto buňky zvyšují svou aktivitu nad bazální úroveň pouze tehdy, když je hlava zvířete otočena určitým směrem v horizontální rovině (obr. 5). Jejich aktivita je nezávislá na poloze v experimentálním prostoru, na chování, a na poloze trupu subjektu (Raudies et al., 2015). *Head direction cells* byly nalezeny u potkanů (Taube et al., 1990), opic (Robertson et al., 1999), myší (Yoder and Taube, 2009) a činčil (Muir et al., 2009), ale jsou považovány za společné všem savcům, snad všem obratlovcům a možná i některým bezobratlým (Seelig and Jayaraman, 2015). Když se hlava zvířete zdržuje v preferovaném směru (orig. *preferred firing direction*) konkrétní buňky směru hlavy, tento neuron pálí s pravidelnou frekvencí, tzn., že nevykazuje adaptaci. Aktivita se sníží zpět na bazální úroveň, pokud se hlava zvířete otočí pryč od *preferred firing direction*, obvykle asi o 45° od tohoto směru (Taube, 2007). Různé buňky směru hlavy mají různé preferované směry a vztahy mezi preferovanými směry různých buněk jsou zachovány, i když je zvíře přemístěno do jiné místnosti, nebo pokud jsou posunuty orientační body v stejném prostředí.



Obr. č. 5. Zázornění aktivity *head direction cell*. Aktivita buňky směru hlavy zaznamenané z anterodorzálního jádra thalamu ve standardní válcové aréně. Buňka je aktivní, když je hlava potkana otočena o přibližně 200°, a tento směr je *preferred firing direction* pro tento neuron.

Převzato a upraveno podle (Taube, 1998).

Stabilita přednostních směrů jednotlivých *head direction cells* bez ohledu na změny v prostředí vedlo k navržení teoretické představy, že aktivita buněk směru hlavy může být organizována ve formě kruhového atraktoru (orig. *ring attractor*), což je jeden z typů atraktorových sítí (Zhang, 1996), kde interakce mezi neurony způsobují stabilizaci aktivity, takže jeden stav je preferován a jiné jsou potlačeny. V případě *head direction cells* jsou buňky konceptualizovány tak, že tvoří imaginární kruh, přičemž každá buňka excituje buňky kódující vlastní nebo vedlejší směry hlavy a potlačuje buňky kódující jiné směry (obr. 6).



Obr. č. 6. Kruhový atraktorový model buněk směru hlavy. Různé neurony kódující různé směry hlavy jsou vizualizovány jako jednotlivé kroužky a dohromady vytvářejí imaginární

kruh. Zelené plusy znázorňují excitační propojení, zatímco červené minusy – inhibiční.

Převzato a upraveno podle (Zugaro et al., 2003).

Buňky směru hlavy se nacházejí jak v kortikální oblastech, jako jsou *postsubiculum* (Taube et al., 1990) a entorhinální kortex (Giocomo et al., 2014), tak i v subkortikálních regiorech mozku – v thalamu (Taube, 1995; Mizumori and Williams, 1993) a laterálním mamilárním jádře (Stackman and Taube, 1998). Historicky *head direction cells* byly objeveny Jamesem Ranckem v dorzálním presubikulu potkanů v roce 1984 (Taube et al., 1990).

Ačkoliv jsou buňky směru hlavy nezbytnou součástí hipokampálně – entorhinálního systému umožňujícího prostorovou reprezentaci (Moser et al., 2008), tyto neurony nevyžadují přítomnost funkčního hipokampu, aby vykazovaly svou specifickou k určitému směru (Golob and Taube, 1999). Ale jejich aktivita včetně stability *preferred firing directions* je závislá na správném fungování vestibulárního systému (Blair and Sharp, 1996), zejména polokruhovitých kanálků vnitřního ucha signalizujících rotaci hlavy (Yoder and Taube, 2014).

1.4. Spánek

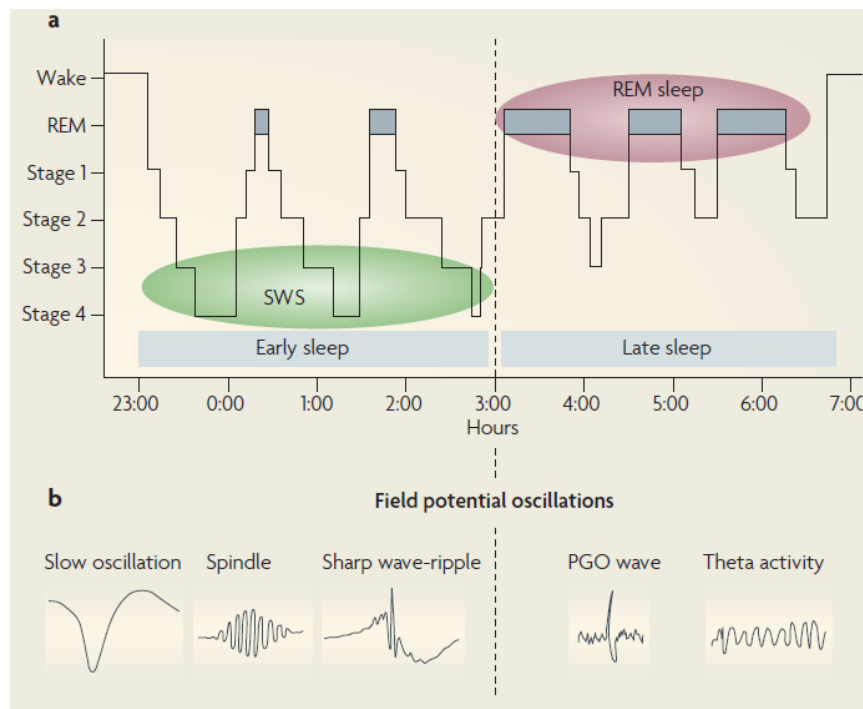
Spánek je přirozeně se opakující útlumově-relaxační fáze organismu charakterizovaná ztrátou vědomí, významně redukovanou citlivostí na signály z okolí, sníženou svalovou aktivitou a inhibicí téměř všech vůlí ovládaných svalů během REM (orig. *rapid eye movement* – rychlé oční pohyby) spánku (Carskadon and Dement, 2005).

Četné studie potvrdily, že spánek přispívá k retenci (uchovávaní) deklarativní paměti a zlepšuje výkon v procedurálních dovednostech (Smith, 2001), přičemž SWS (orig. *slow wave sleep* – spánek pomalých vln) přednostně konsoliduje explicitní paměť, zatímco REM spánek primárně napomáhá zlepšení paměti implicitní (Plihal and Born, 1997). Takže spánek je identifikován jako stav organismu, který kromě jiného optimalizuje konsolidaci nově získaných informací, což odpovídá kvantitativním i kvalitativním změnám paměťových reprezentací. SWS a REM spánek podporují systémovou (předávání informace mezi hipokampem a neokortexem) a synaptickou (lokální synaptické posilování) konsolidaci. Během spánku pomalých vln, pro něž jsou charakteristické pomalé oscilace, spánková vřetenka a ostré vlny, dochází k reaktivaci vzpomínek závislých na hipokampu a k jejich redistribuci do neokortikálních oblastí. Zatímco během REM spánku, kdy můžeme pozorovat théta aktivitu mozku, lokální zvýšení genů primární odpovědi (orig. *immediate early genes*) souvisejících s plasticitou podporuje následnou synaptickou konsolidaci vzpomínek v kortexu (Diekelmann and Born, 2010).

1.4.1. Architektura spánku a elektrofyziologické charakteristiky spánkových fází

Spánek je charakterizován cyklickým střídáním REM (orig. *rapid eye movement* – rychlé oční pohyby) a NREM (orig. *non-REM* – opak REM) spánkových fází, kdy se poslední dělí na čtyři stádia podle hloubky spánku a zahrnuje lehký spánek (fáze 1 a 2) a spánek pomalých vln (SWS, fáze 3 a 4). U lidí je první část noci (orig. *early sleep* – raný spánek) charakterizována výskytem spánku pomalých vln, zatímco během druhé poloviny (orig. *late sleep* – pozdní spánek) převládá REM spánek (obr. 7a). SWS a REM spánek jsou charakterizovány specifickými oscilacemi elektrického pole (orig. *electrical field potential oscillations*). Nejvýraznějšími oscilacemi v průběhu SWS jsou pomalé oscilace (orig. *slow oscillations*), spánková vřetenka (orig. *spindles*) a ostré vlny (orig. *sharp wave-ripples*),

zatímco REM spánek je charakterizován ponto-genikulookcipitálními vlnami (orig. *PGO waves*) a aktivitou théta (obr. 7b).



Obr. č. 7. Architektura spánku. a – hypnogram zobrazující sled jednotlivých fází v průběhu spánku u lidí, b – znázornění specifických oscilací elektrického pole charakterizujících buď spánek pomalých vln anebo REM spánek. Převzato z (Diekelmann and Born, 2010).

Pomalé oscilace pocházejí z neokortexu a jejich frekvence činí přibližně 0,5-4 Hz (Achermann and Borbely, 1997). Tyto vlny synchronizují neuronální aktivitu cyklickým střídáním tzv. „down-stavů“ (neuronální útlum způsobený hyperpolarizací) a „up-stavů“, kdy je aktivita neuronů podobná stavu bdění, což je spojeno s depolarizací (Destexhe et al., 2007).

Aktivita spánkových vřetének představuje pravidelné elektroencefalografické oscilace s frekvencí 10 až 15 Hz, které jsou pozorovány ve fázi 2 lidského spánku, ale jsou přítomny také během SWS. *Spindles* vznikají v thalamu z interakce mezi GABAergními neurony *nucleus reticularis* a glutamatergními talamo-kortikálními projekcemi, které zprostředkovávají jejich synchronizované šíření do kortikálních oblastí (De Gennaro and Ferrara, 2003).

Hipokampální ostré vlny generované v CA3 pocházejí z interakce mezi inhibičními interneurony a pyramidovými buňkami v CA1 oblasti a vykazují vysokofrekvenční oscilace 100 až 300 Hz (Buzsaki, 2006). *Sharp wave-ripples* se vyskytují během SWS a také během

bdělosti. Kromě toho doprovázejí reaktivaci neuronů, které byly aktivní během předcházejícího stavu vigily, a to v době spánku (Wilson and McNaughton, 1994; Peyrache et al., 2009).

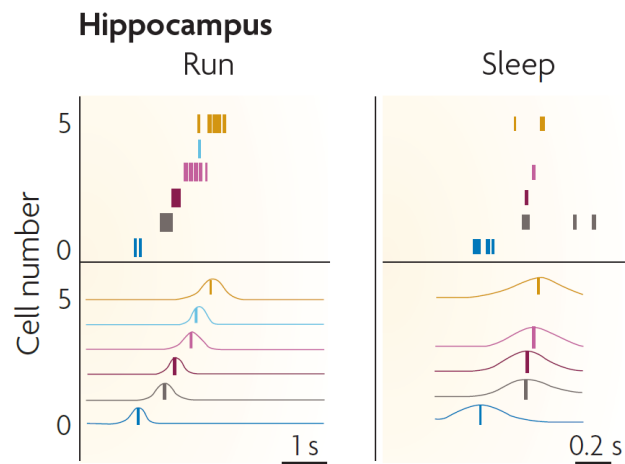
PGO-vlny jsou generovány tzv. salvou synchronizované aktivity (orig. *bursts of synchronized activity*), která se šíří z Varolova mostu mozkového kmene do laterálního genikulárního jádra talamu a zrakové kůry. Vyskytují se během REM spánku u potkanů a koček, ale nejsou spolehlivě identifikovány u lidí. Théta oscilace (4–8 Hz) jsou charakteristickým rysem REM fáze u potkanů a převažují v hipokampu (Buzsaki, 2002). U lidí je aktivita théta méně koherentní (Cantero et al., 2003).

1.4.2. Reaktivace hipokampálních neuronů během spánku

Důležitým průlomem ve výzkumu paměti bylo objevení reaktivace hipokampálních buněk místa, které pálí při exploraci nového prostředí nebo splnění prostých prostorových úkolů, během následujícího spánku (obr. 8). K reaktivaci dochází u *place cells* s překrývajícími se aktivačními místy, tzn., že generují akční potenciály současně při zkoumání nějaké arény. Takové přehrávání neuronální aktivity neboli *replay* se většinou vyskytuje ve SWS a během prvních hodin po učení (Wilson and McNaughton, 1994). Vzácně se také odehrává během REM spánků (Louie and Wilson, 2001). K reaktivaci dochází i při bdělosti, ale na rozdíl od *replay* během spánků pomalých vln, kde neurony místa pálí ve stejném pořadí jako během provedení pokusu, zde sekvence je opačná (Foster and Wilson, 2006). Ve srovnání s aktivitou během kódovací fáze, tzn. při stavu bdělosti, reaktivace během SWS je méně přesná, odehrává se v kratším časovém okně a signál je více znečištěn bazálním šumem (Nádasy et al., 1999).

Jak bylo popsáno výše, hipokampální ostré vlny doprovázejí takové neuronální přehrávání během následujícího spánku (Wilson and McNaughton, 1994; Peyrache et al., 2009) a také přispívají k synaptické potenciaci (King et al., 1999). Selektivní přerušení *sharp wave-ripples* elektrickou stimulací po učení prostorového úkolu u potkanů zabraňuje tvorbě dlouhodobé prostorové paměti (Girardeau et al., 2009). Společně všechny tyto studie naznačují, že hipokampální *replay* během SWS a ostré vlny podporující tento proces mají kauzální roli v konsolidaci paměti během spánku. Navíc existuje důkaz, že reaktivace a redistribuce paměti během spánku pomalých vln jsou řízeny tzv. „hipokampo-neokortikálním

dialogem“. Ten je regulován pomalými oscilacemi a je důležitý pro přenos informace z dočasného uložení hipokampu do dalších oblastí kortexu, kde již informace je uložena dlouhodobě a více ustáleně (De Gennaro and Ferrara, 2003).



Obr. č. 8. Reaktivace hipokampálních *place cells* během SWS. Každý řádek představuje samostatný neuron místa. Při chůzi potkana po kruhové dráze (Run), neurony místa v hipokampu pálí v charakteristickém pořadí. Během následujícího SWS spánku (Sleep) se objevuje reaktivace stejných buněk, navíc v stejném pořadí, jako během provedení pokusu. Převzato z (Diekelmann and Born, 2010).

2. Cíle práce

Je známo, jak se v hipokampu tvoří mapy jednoduchého prostoru, a my chceme zjistit, jak vzniká velká prostorová mapa složitějšího prostředí z jednotlivých jednoduchých map, a proto diplomová práce má 2 základní cíle:

1) Popsat aktivitu hipokampálních neuronů během behaviorální úlohy v radiálním bludišti imitujícím složitý prostor;

2) Srovnat aktivitu hipokampálních neuronů během spánku před plněním behaviorální úlohy v radiálním bludišti imitujícím složitý prostor a po něm.

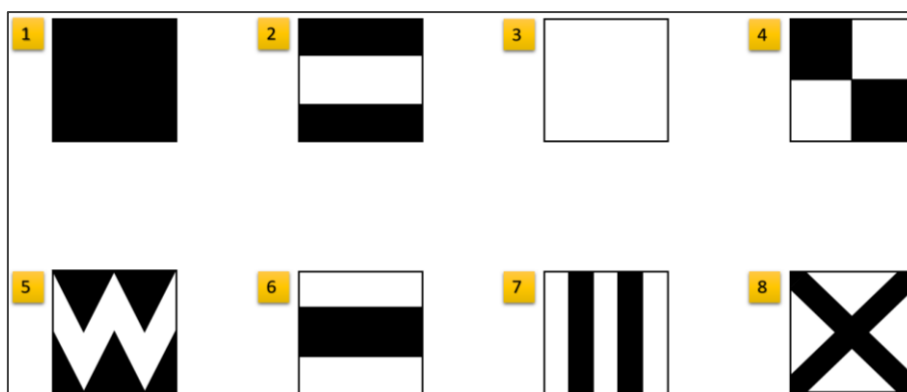
Pro dosažení cílů jsem připravila plán, který se skládal z několika bodů:

1. navrhnout a vyrobit bludiště imitující složitý prostor;
2. naučit se výrobě implantátů obsahujících mikroelektrody;
3. naučit se provedení stereotaktické operace;
4. nahrát aktivitu hipokampálních neuronů během behaviorální úlohy;
5. vyhodnotit nahranou aktivitu hipokampálních neuronů.

3. Metodika

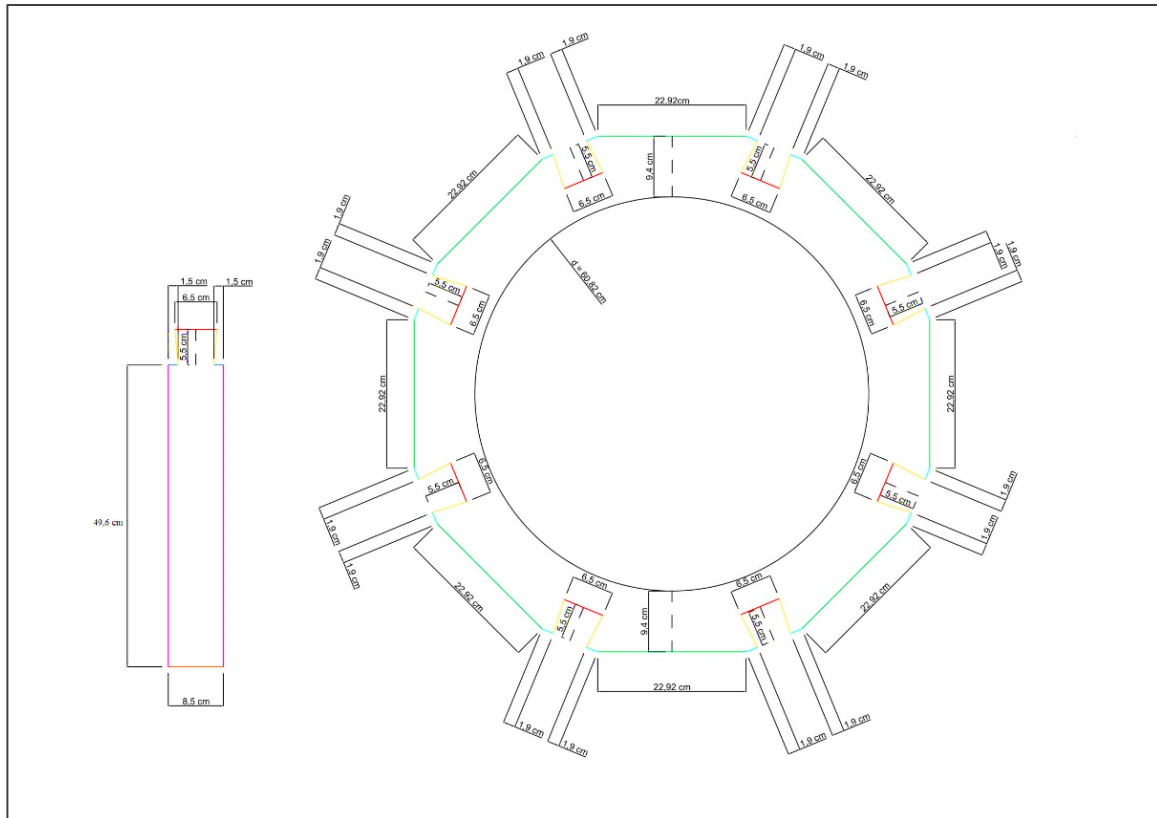
3.1. Aparatura

Na provádění experimentu bylo vyrobeno radiální bludiště imitující složitý prostor, které je sestaveno z centrální platformy, 8 ramen odbočujících z této platformy (obr. 9) a otevírajících se a zavírajících se přepážek, které umožňují nebo naopak neumožňují vstup do určitých ramen. Každé rameno je obklopeno unikátním vzorem proximálních vizuálních značek.



Obr. č. 9. Reprezentace radiálního bludiště imitujícího složitý prostor. (Nahoře) Fotografie vyrobeného bludiště. (Dole) Design každého z osmi ramen.

Bludiště bylo vyrobeno z plexiskla. Průměr centrální arény, kde je umístěn kužel, činí ≈ 61 cm. Délka jednotlivého ramene ≈ 50 cm, šířka = 8,5 cm (obr. 10). Výška bludiště ve všech částech = 40 cm.

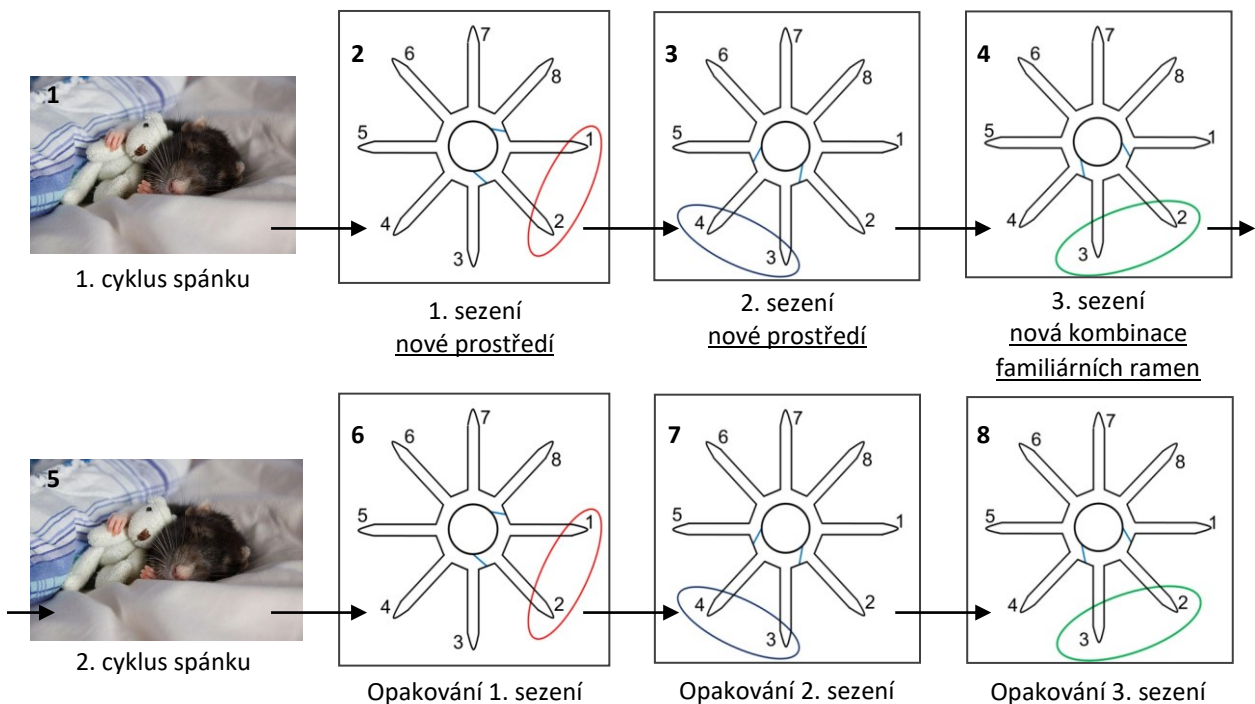


Obr. č. 10. Kótovaný výkres radiálního bludiště. (Vlevo) Výkres jednotlivého ramene. (Vpravo) Výkres centrální platformy.

Experiment se vždy prováděl ve stejné obdélníkové místnosti, kde se uprostřed nacházelo bludiště, na stěně vlevo od vchodu do místnosti byl připojen držák pro kameru a nahrávací systém Axona (Ltd.), na stěně naproti vchodu bylo umyvadlo a malá lampička. Ostatní stěny byly prázdné.

3.2. Experimentální design

Pro dosažení cíle jsme navrhli behaviorální úlohu skládající se z 3 sezení v bludišti, ve kterých potkani postupně zkoumali 4 různá ramena, a 2 cyklů spánku. Schematicky postup experimentu je znázorněn na obr. č. 11. Zprvce byla zvířata umístěna do spánkového koše, kde se sledovala neuronální aktivita v době spánku. Během prvního a druhého sezení v bludišti potkani zvlášť navštívili dva páry sousedících ramen (číslo 1 a 2 v případě prvního sezení, číslo 3 a 4 během druhého). Pro experimentální zvíře každá tato dvojice představovala nové prostředí. Dále během třetího sezení potkani zkoumali ramena číslo 2 a 3, což není novým prostředím pro jedince, ale novou kombinací již známých ramen. Po exploraci bludiště se znovu nahrávala aktivita neuronů během následujícího spánku a pak byl zopakován proces zkoumání výše uvedených ramen ve stejném pořadí. Takže experimentální zvířata byla vystavena výše popsané sekvenci třech sezení dvakrát: před spánkem a po něm. Každé sezení trvalo 15 minut. Aktivita hipokampálních buněk byla zaznamenávána jak při exploraci bludiště, tak i během spánku.



Obr. č. 11. Schéma experimentu. 1 – nahrávání jednotkové aktivity během 1 cyklu spánku, 2 – nahrávání jednotkové aktivity v ramenech číslo 1 a 2 (1 sezení), 3 – nahrávání jednotkové aktivity v ramenech číslo 3 a 4 (2 sezení), 4 – nahrávání jednotkové aktivity v ramenech číslo 2 a 3 (3 sezení), 5 – nahrávání jednotkové aktivity během 2 cyklu spánku, 6 – nahrávání

jednotkové aktivity během opakování 1. sezení, 7 – nahrávání jednotkové aktivity během opakování 2. sezení, 8 – nahrávání jednotkové aktivity během opakování 3. sezení.

3.3. Experimentální zvířata

V experimentu byli použiti potkani kmene *Long Evans* (SPF; Velaz s.r.o., Konárovice, Česká republika) ve věku 3-6 měsíců a o hmotnosti 400 - 650 g v době provedení pokusu. Experimentální zvířata byla držena v průhledných plastových chovných boxech individuálně. V klimatizovaném zvěřinci byla udržována konstantní vlhkost (± 40 %), teplota ($\pm 21^\circ\text{C}$) a pravidelný dvanáctihodinový režim den/noc. Přísun vody a jídla měli *ad libitum*, ale vzhledem k tomu, že potkani byli motivováni pro řešení behaviorálního úkolu apetitivně (odměnou ve formě potravy), k zvětšení účinku odměny 12 hodin před provedením pokusu byli hladoví. Všichni potkani byli experimentálně naivní a testováni pouze jednou.

3.3.1. Manipulace se zvířaty

3.3.1.1. Handling

Před začátkem vlastního pokusu všechna experimentální zvířata byla seznámena s experimentátorem (*handling*), aby si zvykla na fyzickou manipulaci člověkem.

3.3.1.2. Úloha sbírání pelet

Cílem tréninku na sbírání pelet bylo motivování potkanů ke zkoumání radiálního bludiště v následujícím pokusu. Celá tato úloha spočívala v tom, že potkani se pohybovali po lineární trase a dostávali se k tomu místu, kde jim dopadaly pelety s potravou. Úloha sbírání pelet (*orig. pellet retrieval*) je jednou z metod používaných ke studiu místních neuronů a zaručuje pohyb testovaného živočicha po celém prostoru experimentální arény.

3.3.1.3. Habituační spánkový koš

Vzhledem k tomu, že je spánek součástí behaviorální úlohy, před provedením pokusu byli potkani umístěni do spánkového koše na dobu cca 2 hodiny, aby si zvykli na prostředí, kde se následně nahrávala neuronální aktivita během spánku.

3.3.1.4. Stereotaktická operace

Pro uvedení potkanů do celkové anestézie byl použit inhalační roztok anestetika isofluranu (2,5 %). Pak byla zvířata umístěna do stereotaktického rámu (Stoelting) a po zbytek operace udržována v anestezii pomocí masky protékající směsí kyslíku a isofluranu (0,5-3,0%). Po oholení srsti na hlavě holicím strojkem, obnažení a očištění lebky skalpelem bylo vyvrtáno 5 otvorů tak, aby se nepoškodil mozek. Do každého z otvorů byl vložen

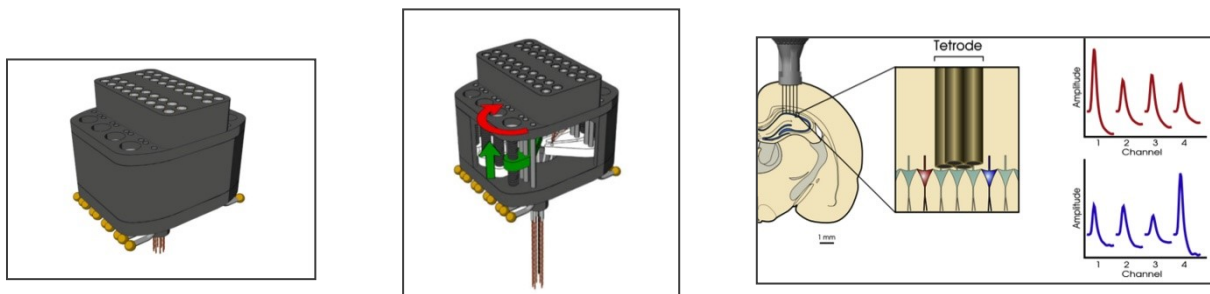
šroubek. Čtyři z nich představovaly zemní elektrody, poslední byl používán jako reference pro nahrávání EEG. Následně byl vyvrtán další velký otvor nad hippokampem (3,8 mm posteriorně, 2,5 mm laterálně od bregmy) pro intrakraniální elektrody, které byly zanořeny 1,5 mm pod úroveň lebky. Implantát s mikroelektrodami byl upevněn k lebce pomocí rychle tuhajícího duracrylu (zubařský cement). Aby se neobjevil zánět, operované místo bylo dezinfikováno a namazáno framykoinem. Po probuzení po skončení operace byl zvířatům podáván loxicom. Každé zvíře dostalo nejméně týden na úplné zotavení.

3.4. Elektrofyziologické nahrávání hipokampálních neuronů a jejich skupin *in vivo*

3.4.1 Výroba implantátů

K nahrávání jednotkové aktivity byly použity mikroelektrody z nikel-chromové slitiny o průměru 25 mikrometrů v tzv. tetrodové konfiguraci. Je to extracelulární elektroda, kde každá z čtyř dohromady smotaných mikroelektrod představuje samostatný záznamový kanál. Vzhledem k tomu, že každý neuron zaujímá jedinečnou polohu v prostoru, jeho akční potenciály jsou „viděny“ odlišně každou mikroelektrodou (obr. 12). Výsledně taková konfigurace umožňuje rozdělit signály vygenerované skupinou nervových buněk a identifikovat jednotlivé neurony (Maren, Quirk, 2004).

Elektrody byly vbudovány do implantátu (VersaDrive, Neuralynx), který zprostředkuje propojení elektrod s konektorem a současně obsahuje mechanismus pro pohyb elektrod ve vertikálním směru (obr. 12). Implantát obsahoval 8 nezávisle pohyblivých tetrad (tj. 32 mikroelektrod). Mikroelektrody po vyrobení implantátu byly zlaceny a jejich impedance se pohybovala mezi 50 až 200 kOhm.



Obr. č. 12. Znázornění implantátu a tetrody. (Vlevo) Implantát obsahující 8 tetrad. (Uprostřed) Mechanismus pro pohyb elektrod ve vertikálním směru. (Vpravo) Tetrodová konfigurace mikroelektrod. Převzato z VersaDrive User Manual.

3.4.2 Nahrávání jednotkové aktivity

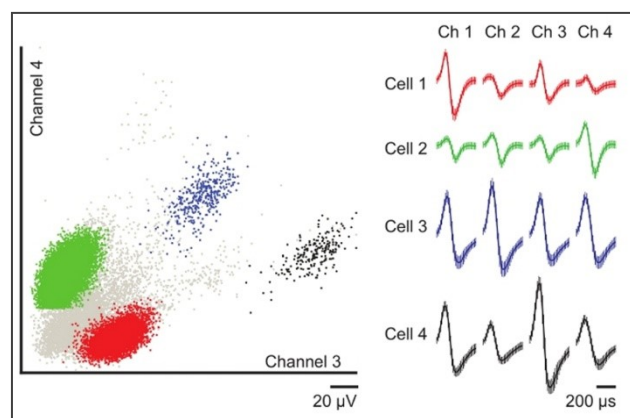
Po zotavení zvíře z operace byly mikroelektrody postupně snižovány do CA1 oblasti hipokampu za průběžného elektrofyziologického monitorování signálu. Jakmile se objevovala charakteristická aktivita akčních potenciálů (orig. *burst firing of hippocampal complex-spike cells*), začínalo se zaznamenávání jednotkové aktivity během behaviorální úlohy. V průběhu nahrávání byl konektor implantovaný k hlavě potkana připojen

k operačním předzesilovačům a kabelem k zesilovačům (Axona Ltd.). Signál pro nahrávání jednotlivých buněk byl filtrován mezi 300-10000 Hz a digitálně uložen při vzorkovací frekvenci 32000 Hz, zatímco signál pro zaznamenávání LFP byl filtrován mezi 0,1-500 Hz a digitálně uložen při vzorkovací frekvenci 2000 Hz. Dioda připevněná na konektoru zaznamenávala trajektorii pohybujícího se potkana za pomoci kamery umístěné nad arénou.

3.5. Analýza dat

3.5.1. Shluková analýza

Záznam aktivity několika nervových buněk byl následně analyzován pomocí shlukové analýzy (angl. *cluster analysis*). Díky této metodě lze podle zvoleného parametru vytvořit graf obsahující aktivitu všech nahraných neuronů, odlišit hodnotný signál od šumu a identifikovat jednotlivé buňky (obr. 13). Vzruchy z jedné buňky mají stejný tvar akčních potenciálů, takže různé neurony tvoří různé klastry akčních potenciálů (Lewicki, 1998). Klastrování se provádělo manuálním způsobem v programu Tint (Axona Ltd.).



Obr. č. 13. Znázornění shlukové analýzy. (Vlevo) Graf jednotlivých akčních potenciálů podle zvoleného parametru a vydělené klastry. (Vpravo) Identifikované neurony. Barva jednotlivé buňky odpovídá barvě klastru. Převzato z (Lu et al., 2018).

3.5.2. Analýza aktivity hipokampálních neuronů během behaviorální úlohy a spánku

V naší laboratoři byly vytvořeny dva programy v Matlabu (MathWorks, Natick, MA, USA) přispívající k vyhodnocení získaných dat. První program vytváří mapy prostorové aktivity hipokampálních buněk podle metody popsanou Mullerem a kol. (Muller et al., 1987), druhý analyzuje neuronální aktivitu během spánku.

4. Výsledky

4.1. Aktivita hipokampálních neuronů při tvorbě prostorové mapy složitějšího prostředí

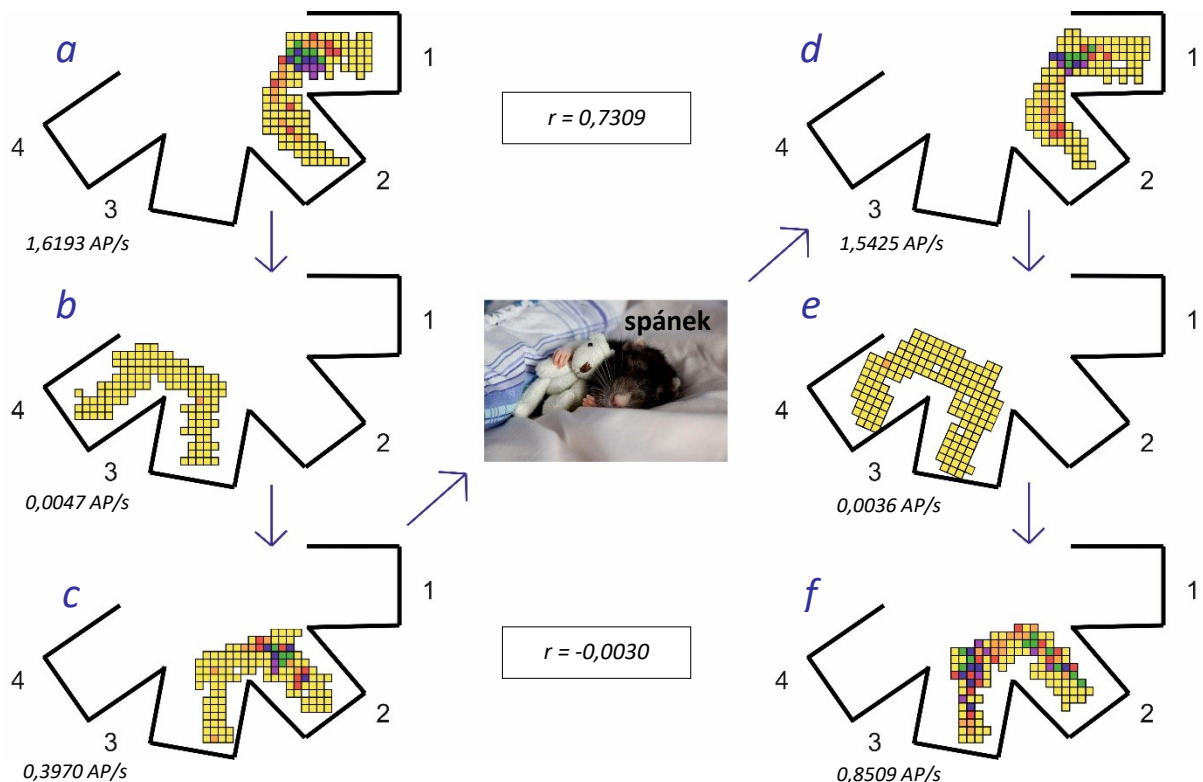
V průběhu našeho experimentu bylo nahráno 5 neuronů z oblasti CA1 hipokampu. Tři z nich byly pyramidální buňky s prostorově organizovanou aktivitou – *place cells* (neuron A, B a C), neuron D neměl prostorově organizovanou aktivitu, neuron E byl aktivní jen v době spánku. Aktivita čtyř buněk během behaviorálního úkolu je zobrazena na obrázcích č. 14, 15, 16 a 17 v podobě map prostorové aktivity (*orig. firing rate map*), Každý malý čtverec (pixel) v těchto mapách představuje malou plochu ramen našeho radiálního bludiště. Barva jednotlivého pixelu označuje úroveň aktivity daného neuronu v této oblasti (*orig. firing rate*), což je celkový počet vygenerovaných akčních potenciálů v pixelu dělený celkovým časem stráveným v něm. Pro každou mapu rostoucí hodnota úrovně aktivity kódována v následujícím pořadí: žlutá, oranžová, červená, zelená, modrá a fialová. Takže nejvyšší aktivita je znázorněna fialovou barvou, zatímco nulová – žlutou (žádné akční potenciály). Černou barvou na obrázcích schematicky znázorněny hranice ramen bludiště, arabské číslice ukazují čísla ramen. Průměrná úroveň aktivity buněk během jednotlivého sezení je uvedena pod každou prostorovou mapou.

4.1.1. Aktivita neuronu A během behaviorální úlohy

V průběhu prvního sezení při zkoumání ramen číslo 1 a 2 neuron A byl aktivní u vstupu do ramene číslo 1 (obr. 14a). Když zvíře vstoupilo do kombinace ramen číslo 3 a 4 v době druhého sezení, tato buňka stala „tichou“, tzn., že nevykazovala žádnou aktivitu a tedy nekódovala žádné místo v tomto prostoru (obr. 14b). Při umístění potkana do nové kombinace již známých ramen číslo 2 a 3, neuron A se znovu aktivoval a generoval akční potenciály na začátku ramene číslo 2 (obr. 14c).

Po následujícím cyklu spánku neuron A byl během prvního sezení stále aktivní na začátku ramene číslo 1 (obr. 14d), jak tomu bylo i před spánkem. Abychom zjistili, nakolik jsou podobné tyto dvě prostorové mapy, spočítali jsme korelační koeficient mezi nimi. Pro výše popsané mapy $r = 0,7309$, což je kladná hodnota blíží se $+1$, a tedy ukazuje, že tyto mapy jsou dost shodné. Neuron A také nezměnil svou aktivitu po následujícím spánku a zůstal tichým v ramenech číslo 3 a 4 (obr. 14e). Kritické změny v aktivitě buňky A byly

pozorovány v době opakování třetího sezení (obr. 14f): aktivační pole tohoto neuronu se rozšířilo, buňka generovala akční potenciály téměř ve všech částech ramen číslo 2 a 3, a průměrná úroveň aktivity se zvýšila dvakrát. Navíc hodnota korelačního koeficientu je záporná a skoro nulová ($r = -0,0030$). To potvrzuje, že prostorové mapy kombinace ramen číslo 2 a 3 před spánkem a po něm nejsou podobné.



Obr. č. 14. Mapy prostorové aktivity neuronu A během behaviorální úlohy. a – aktivační pole se během prvního sezení nachází při vstupu do ramene číslo 1, b – neuron A je během druhého sezení neaktivní, c - aktivační pole se během třetího sezení nachází při vstupu do ramene číslo 2, d - aktivační pole se během prvního sezení po následujícím spánku nachází stejně při vstupu do ramene číslo 1, e - neuron A je během druhého sezení po následujícím spánku zase neaktivní, f - aktivační pole se během třetího sezení po následujícím spánku rozšířilo do celého prostoru ramen číslo 2 a 3.

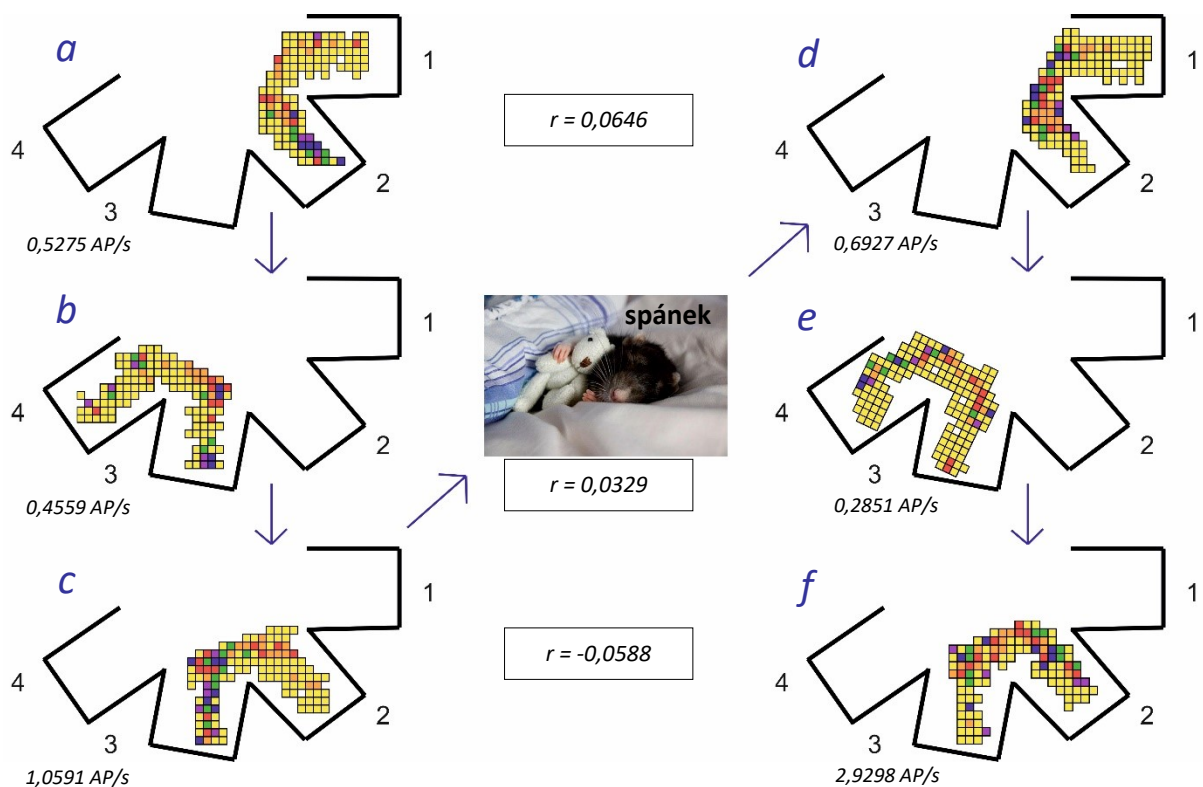
4.1.2. Aktivita neuronu B během behaviorální úlohy

Při zkoumání ramen číslo 1 a 2 během prvního sezení se aktivační místo neuronu B nacházelo na konci ramene A (obr. 15a). Ale po následujícím spánku se aktivační pole

posunulo z původní pozice a tento neuron v té době kódoval přechod mezi rameny (obr. 15d). Korelační koeficient také potvrzuje nízkou shodu výše zmíněných prostorových map ($r = 0,0646$).

V průběhu druhého sezení jak před spánkem, tak i po něm neuron B neměl přesně stanované receptivní pole a byl aktivní v různých částech ramen číslo 3 a 4 (obr. 15b, 15e). Navíc koeficient korelace $r = 0,0329$ ukazuje malou podobnost těchto map.

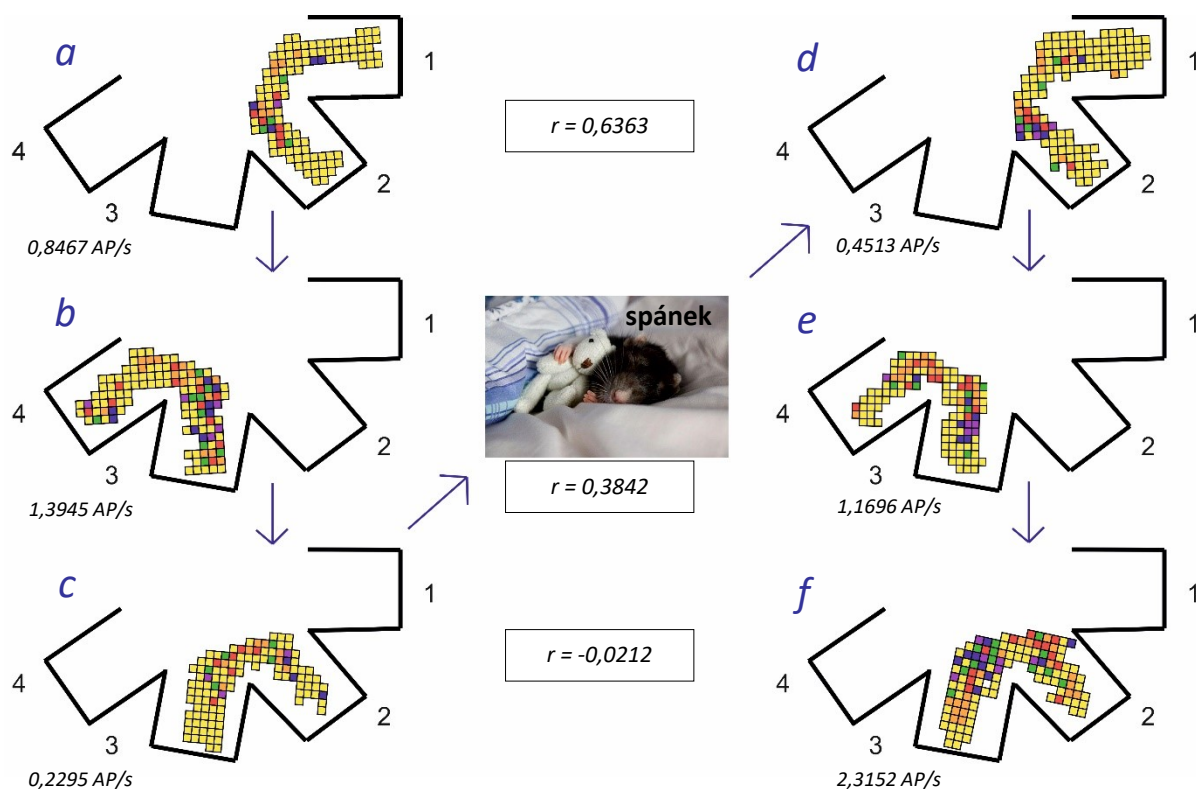
Když potkan vstoupil do nové kombinace známých ramen číslo 2 a 3, aktivita buňky B byla znovu vztažena na určité místo v prostoru – na rameno číslo 3 (obr. 15c). Po následujícím spánku během opakování třetího sezení se aktivační pole zvětšilo a neuron B kódoval téměř celý prostor, ve kterém potkan se pohyboval (obr. 15f). Korelační koeficient $r = -0,0588$ je záporný a skoro nulový, jak tomu bylo i při srovnání dvou prostorových map neuronu A během zkoumání ramen číslo 2 a 3.



Obr. č. 15. Mapy prostorové aktivity neuronu B během behaviorální úlohy. a – aktivační pole se během prvního sezení nachází na konci ramene číslo 2, b – neuron B během druhého sezení nemá přesně určené receptivní pole, c - aktivační pole během třetího sezení zaujímá

prostor ramene číslo 3, d - aktivační pole se během prvního sezení po následujícím spánku nachází v prostoru mezi rameny číslo 2 a 3, e - neuron B během druhého sezení po následujícím spánku zase nemá přesně stanovené receptivní pole, f - aktivační pole se během třetího sezení po následujícím spánku rozšířilo do celého prostoru ramen číslo 2 a 3.

4.1.3. Aktivita neuronu C během behaviorální úlohy



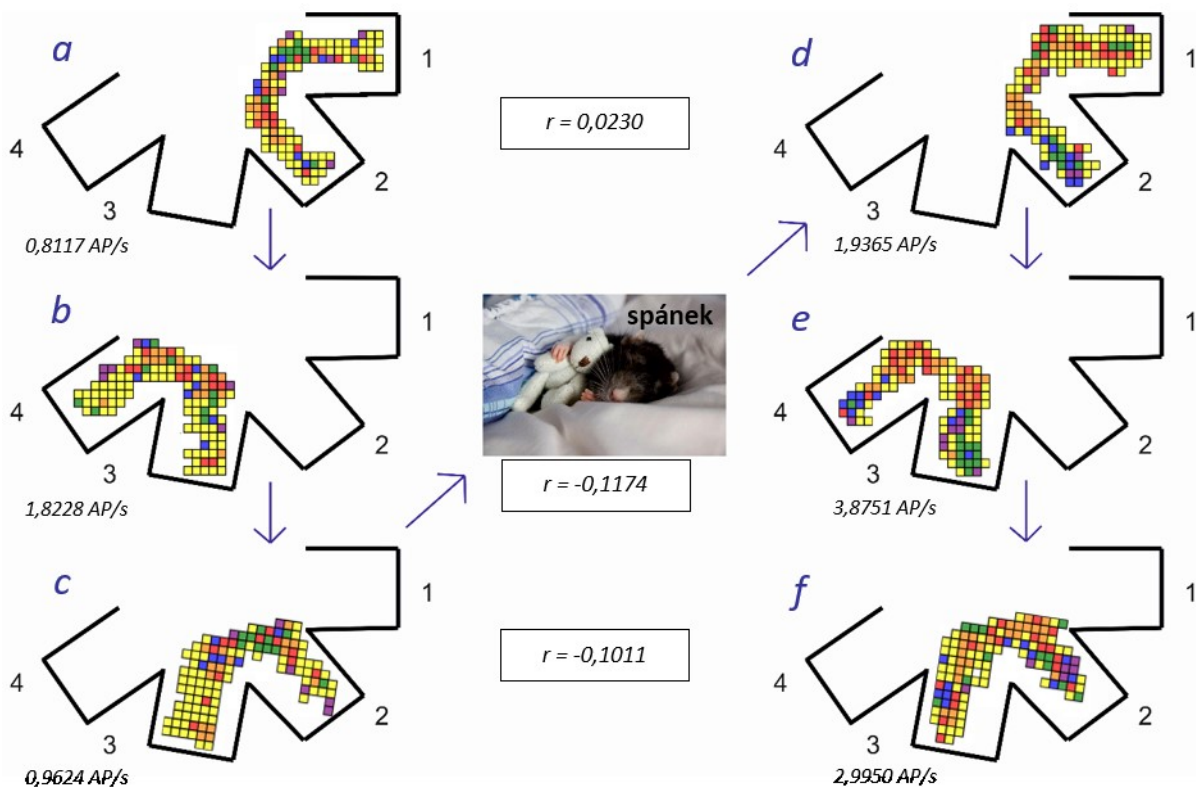
Obr. č. 16. Mapy prostorové aktivity neuronu C během behaviorální úlohy. a – aktivační pole se během prvního sezení nachází na začátku ramene číslo 2, b – aktivační pole se během druhého sezení nachází v prostoru ramene číslo 3, c - aktivační pole během třetího sezení zaujímá prostor mezi rameny číslo 2 a 3, d - aktivační pole se během prvního sezení po následujícím spánku nachází stejně při vstupu do ramene číslo 2, e - aktivační pole se během třetího sezení stejně nachází v prostoru ramene číslo 3, f - aktivační pole se během třetího sezení po následujícím spánku rozšířilo do celého prostoru ramen číslo 2 a 3.

V době prvního sezení při exploraci páru ramen číslo 1 a 2 byl neuron C aktivní u vstupu do ramene číslo 2 (obr. 16a). Když zvíře bylo vystaveno kombinaci ramen číslo 3 a 4 během druhého sezení, neuron C zde kódoval rameno číslo 3 (obr. 16b). Během třetího

sezení stejná buňka generovala akční potenciály, když potkan se nacházel na přechodu mezi rameny číslo 2 a 3 (obr. 15c).

Po následujícím cyklu spánku vidíme, že jak během prvního sezení, tak i během druhého, aktivační místa neuronu C zůstala stejná: na začátku ramene čísla 2 v případě prvního sezení (obr. 16d) a v prostoru ramene číslo 3 v případě druhého (obr. 16e). Koeficient korelace pro první dvojici map (ramena číslo 1 a 2) $r = 0,6363$ se blíží k hodnotě $+1$, což říká o velkou shodnosti těchto prostorových map. Pro druhou dvojici map (ramena číslo 3 a 4) $r = 0,3842$. Ale při opakování třetího sezení po cyklu spánku se aktivita místové buňky C výrazně změnila a aktivační pole se roztáhlo do celého prostoru zkoumaných ramen číslo 2 a 3 (obr. 16f). Koeficient korelace $r = -0,0212$ je záporný a téměř nulový, což potvrzuje nízkou podobnost těchto prostorových map. Výše popsaný fenomén je charakteristickým rysem pro všechny nahrané neurony místa.

4.1.4. Aktivita neuronu D během behaviorální úlohy

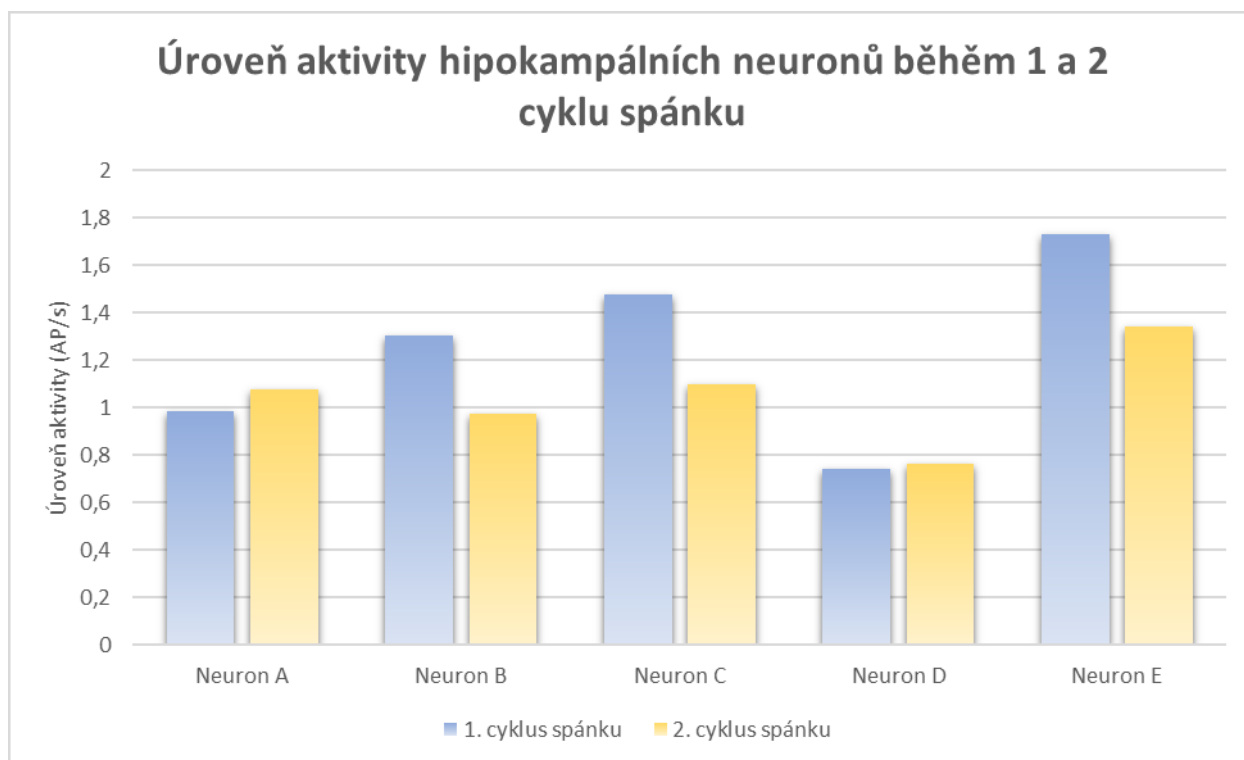


Obr. č. 17. Mapy prostorové aktivity neuronu D během behaviorální úlohy. a-f – aktivita buňky D se rozprostírala na celý prostor jednotlivých kombinací ramen radiálního bludiště.

Nahraná hipokampální buňka D představovala interneuron. Na obrázku číslo 17 můžeme vidět, že aktivita tohoto neuronu není místně specifická: buňka D generovala akční potenciály po celou dobu zkoumání jednotlivých částí bludiště. To platí jak pro první sekvenci třech sezení (obr. 17a, 17b, 17c), tak i pro druhou (obr. 17d, 17e, 17f).

4.1. Aktivita hipokampálních neuronů během spánku

Aktivita všech výše popsaných buněk byla zaznamenávána během dvou cyklů spánku. První cyklus spánku předcházel plnění behaviorálního úkolu, druhý probíhal po exploraci bludiště. Vzhledem k tomu, že doba trvání každé nahrávky činí 1 hodinu a potkani se během této doby občas mohli pohybovat po spánkovém koši, program analyzující spánek dělí záznam na 2 části podle rychlosti pohybu jedince. Pokud se zvíře pohybovalo rychlostí více než 5 cm/s, program přidával této době značku *“fast movement”*. Jestliže hodnota rychlosti byla menší než 2 cm/s, tyto intervaly byly označeny jako *“slow movement”*. Tento krok přispívá k rozdělení jednohodinové nahrávky aktivity jednotlivých buněk do dvou stavů – bdění a vlastního spánku. Analýza aktivity hipokampálních neuronů se prováděla v době *“slow movement”*.



Obr. č. 18. Úroveň aktivity nahraných hipokampálních neuronů během dvou cyklů spánku.

První cyklus spánku předcházel plnění behaviorálního úkolu, druhý probíhal po seznámení jedince s novým prostředím.

Protože 2. cyklus spánku se zaznamenával po třech sezeních behaviorální úlohy, vyvstává otázka, jestli se aktivita stejných buněk během spánku bude lišit před explorací nového prostředí a po jeho prozkoumání. Na obrázku číslo 18 je graf znázorňující srovnání

úrovně aktivity nahraných neuronů v době dvou cyklů spánku. Aktivita neuronu místa A se nepatrně zvýšila po seznámení potkana s bludištěm, zatímco úroveň aktivity neuronů B, C a E se snížila. Úroveň aktivity neuronu D během 1 a 2 cyklu spánku je přibližně stejná. Na základě těchto dat neexistuje žádná tendence ani k růstu úrovně aktivity hipokampálních buněk po exploraci nového prostředí, ani k jejímu snížení. Ale pro získání statisticky významných dat potřebujeme více zaznamenaných hipokampálních neuronů.

5. Diskuze

5.1. „Complex-spike“ buňky a „theta“ buňky

První záznamy hipokampální jednotkové aktivity Jamesem Ranckem a Johnem O'Keefem ukázaly přítomnost dvou základních skupin neuronů v hipokampu, které se liší anatomickými a elektrofyziologickými vlastnostmi (délkou trvání akčního potenciálu, úrovní aktivity, umístěním v hipokampu atd.). James Ranck pojmenoval výše popsané dvě skupiny termíny „complex-spike“ buňky a „theta“ buňky (Ranck, 1973), zatímco John O'Keefe označil první skupinu také jako „place cells“ vzhledem k jejich aktivitě závislé na určitém místě v prostoru (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Aktivita „theta“ neuronů stoupá, když je přítomen théta rytmus v hipokampu, z čehož plyne jejich název (O'Keefe, 2007). Pro „theta“ buňky je charakteristické, že generují akční potenciály ve všech částech zkoumaného prostředí, ale ve svých prostorových mapách mají oblasti s vyšší úrovní aktivity. Každá taková oblast odráží inervaci od jednoho neuronu místa, takže prostorové vlastnosti „theta“ buněk odrážejí konvergenci místních buněk na „theta“ buňky (Kubie et al., 1990).

Anatomicky „complex-spike“ neurony jsou pyramidální buňky hipokampu, zatímco „theta“ představují interneurony. Extracelulární nahrávání ukázaly, že „complex-spike“ neurony se charakterizují salvou akčních potenciálů (orig. *complex-spike burst*), kdy každý následující hrotový potenciál má menší amplitudu a delší trvání, než předcházející. Oproti tomu se akční potenciály „theta“ buněk vyznačují kratším trváním a jejich amplituda je konstantní (O'Keefe, 2007).

Jak již bylo zmíněno v předcházející kapitole, podařilo se nám nahrát jak „complex-spike“ buňky, tak i „theta“ buňky, které se lišily elektrofyziologickými a prostorovými vlastnostmi popsanými výše. Pyramidální buňky (*complex spike cells*) představovaly neurony místa a jejich aktivita se vyznačovala charakteristickou salvou akčních potenciálů. Také prostorové mapy těchto buněk téměř vždy měly přesně určené receptivní pole (obr. 14, 15, 16). Interneurony (*theta cells*) měly stejnou amplitudu akčního potenciálu a jeden z nich (neuron D) generoval akční potenciály po celém prostoru zkoumaného bludiště (obr. 17), což je charakteristické pro tuto skupinu hipokampálních buněk. Neuron E byl aktivní jen v době dvou cyklů spánku.

5.2. Stabilita aktivačních polí a přemapování neuronů místa

Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu, při umístění potkana do nového prostředí místové buňky podléhají přemapování: buď dochází k útlumu jejich aktivity či naopak k jejímu navýšení v případě, že před tím byly inaktivní, anebo se posouvá poloha receptivního pole (Muller and Kubie, 1987). Vzhledem k tomu, že v našem experimentu potkani nebyli seznámeni s radiálním bludištěm imitujícím složitý prostor, každý pár ramen během prvního (ramena číslo 1 a 2) a druhého sezení (ramena číslo 3 a 4) před následujícím spánkem představoval pro ně nové experimentální prostředí. U nahraných pyramidálních neuronů docházelo k přemapování: pozice jejich aktivačních míst se lišila mezi prvními dvěma sezeními, navíc neuron A se během druhého sezení inaktivoval, tzn., že negeneroval žádné akční potenciály.

Po následujícím spánku prostorové mapy prvních dvou kombinací ramen pyramidálních neuronů A a C zůstaly stejné, což potvrzuje stabilitu aktivačních polí ve známém prostředí. Taková dlouhodobá stabilita aktivačních míst ukazuje, že vzniklá reprezentace nějakého prostoru je trvalá a nevytváří se *de novo* při opakovaném umístění subjektu do známého prostředí (Muller, 1996). Výjimku tvořil neuron B, aktivita kterého se změnila ve familiární kombinaci ramen. Existují četné studie ukazující, že k přemapování může docházet i ve známém prostředí. Například při změně behaviorální úlohy (Markus et al., 1995), při umístění averzivního podnětu do aktuálního receptivního pole (Moita et al., 2004), při posouvání ostrůvku ve vodním bludišti (Fyhn et al., 2002) atd. Souhrnně výsledky těchto prací podporují názor, že hipokampální místové buňky kódují nejen geometrii prostředí, ale také motivační a behaviorální kontext s ním spojený (Sharp, 1999). Příčina změny aktivity neuronu B v našem experimentu (obr. 14a, 14d) je možná způsobena tím, že právě během opakování druhého sezení nejvíc pelet s potravou dopadalo na oblast mezi rameny, což vyvolalo posun receptivního pole do této oblasti.

5.3. Vznik prostorové mapy složitějšího prostředí z jednotlivých jednoduchých map

Během třetího sezení potkání nebyli vystaveni novému prostředí, ale nové kombinaci již známých ramen (ramena číslo 2 a 3). Tento krok umožňoval prostudovat integrování dvou jednoduchých původně na sobě nezávislých hipokampálních map v době, když se jedinec teoreticky musel dozvědět o jejich prostorovém vztahu. Předpokládali jsme, že reprezentace tohoto prostoru (ramena číslo 2 a 3) by mohla být vytvářena spojením dvou prostorových map vzniklých během předcházejících dvou sezení (ramena číslo 1 a 2 v době prvního sezení a ramena číslo 3 a 4 v době druhého). Ale získaná data nepotvrdila výše popsanou hypotézu. Prostorové mapy všech nahraných pyramidálních neuronů ukazují, že při první návštěvě nové kombinace familiárních ramen vzniká úplně nová reprezentace tohoto prostředí.

Další zajímavostí je fakt, že tyto prostorové mapy nové kombinace již známých ramen se zase modifikují po druhé návštěvě téhož prostředí. Ten fenomén je charakteristickým rysem pro všechny nahrané pyramidální neurony místa. Zaprvé, po následujícím spánku dochází k rozšíření plochy aktivačních míst, které začínají zaujímat téměř celý prostor zkoumaného prostředí. Zadruhé, při porovnání úrovně aktivity každého pyramidálního neuronu v průběhu první a druhé návštěvy ramen číslo 2 a 3, jsme pozorovali tendenci k zvyšování této hodnoty. A nakonec zatřetí, koeficient korelace je mezi dvěma prostorovými mapami vytvořenými pro pár ramen číslo 2 a 3 (tedy před spánkem a po něm) pro všechny pyramidální neurony záporný a blíží se k hodnotě 0, což říká o jejich minimální shodnosti. Na základě výše popsaných dat předpokládáme, že po druhé návštěvě nové kombinace známých ramen subjekt už si začíná uvědomovat prostorový vztah všech 4 ramen, ale pro vznik stabilní reprezentace komplexního prostředí je potřeba více času, než dva krátce trávající vystavení tomuto prostoru.

Souhrnně naše první výsledky ukazují, že:

- Hipokampální mapy stejného páru ramen představujících nové prostředí pro potkání byly vytvořeny během první návštěvy a zůstaly nezměněny i při druhé návštěvě, tj. nebyly ovlivněny spánkem ($r = 0,58 \pm 0,14$);
- Hipokampální mapy nové kombinace již známých míst nevznikají jako jednoduché spojení dříve vytvořených jednotlivých jednoduchých map;

- Hipokampální mapy nové kombinace známých míst nebyly stabilní: mezi první a druhou návštěvou se zase modifikovaly ($r = -0,03 \pm 0,02$)

Závěr

Díky této diplomové práci jsem se naučila provádět stereotaktické operace, vyrábět implantáty obsahující mikroelektrody, elektrofyziologickému nahrávání jednotkové aktivity hipokampálních neuronů pomocí systému Axona a také vyhodnocení dat v programech Tint a MatLab.

Podařilo se nám získat první výsledky přispívající k vysvětlení vzniku prostorové mapy složitého prostředí. Získaná data naznačují, že reprezentace složitého prostředí není jednoduchou kombinací dříve vytvořených jednotlivých map a také se neformuje zcela *de novo*. Místo toho probíhá postupná modifikace již existujících map, což zabírá více času než krátko trvající vystavení tomuto prostoru.

Výsledky této diplomové práce byly použity pro vytvoření posteru pro konferenci „*The Czech Neuroscience Society*“, která konala od 26. 11. 2019 do 27. 11. 2019. Viz náhled posteru v příloze. Tento poster získal ocenění na *Posterovém dnu Národního ústavu duševního zdraví* 18. 12. 2019.

Literatura

Achermann, P., Borbely, A. (1997) Low-frequency (< 1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram. *Neuroscience*. 81: 213-222.

Amaral, D., Lavenex, P. (2007) Hippocampal neuroanatomy. In: *The hippocampus book*, Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (first ed.), Oxford University Press, New York, pp. 37-114.

Andersen, P., Lømo, T. (1966) Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites. *Experimental Brain Research*. 2: 247-260.

Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (2007) The hippocampal formation. In: *The hippocampus book*, Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (first ed.), Oxford University Press, New York, pp. 3-8.

Bannerman, D., Deacon, R., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., Rawlins, J. (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience*. 116: 884-901.

Blair, H., Sharp, P. (1996) Visual and vestibular influences on head-direction cells in the anterior thalamus of the rat. *Behavioral neuroscience*. 110: 643-660.

Brun, V., Otnaess, M., Molden, S., Steffenach, H., Witter, M., Moser, M., Moser, E. (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science*. 296: 2243-2246.

Burwell, R., Agster, K. (2008) Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. In: *Learning and Memory*, Eichenbaum, H. (ed.), Elsevier, Oxford, pp. 47-66.

Buzsaki, G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*. 33: 325-340.

Buzsaki, G. (2006) *Rhythms of the brain*. Oxford University Press, pp. 344-363.

Cantero, J., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M., Madsen, J., Kocsis, B. (2003) Sleep-dependent θ oscillations in the human hippocampus and neocortex. *Journal of Neuroscience*. 23: 10897-10903.

Carskadon, M., Dement, W. (2005) Normal human sleep: an overview. *Principles and practice of sleep medicine*. 4: 13-23.

Clayton, N. (1998) Memory and the hippocampus in food-storing birds: a comparative approach. *Neuropharmacology*. 37: 441-452.

De Gennaro, L., Ferrara, M. (2003) Sleep spindles: an overview. *Sleep medicine reviews*. 7: 423-440.

Destexhe, A., Hughes, S., Rudolph, M., Crunelli, V. (2007) Are corticothalamic 'up' states fragments of wakefulness? *Trends in neurosciences*. 30: 334-342.

Diekelmann, S., Born, J. (2010) The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*. 11: 114-126.

Epstein, R., Patai, E., Julian, J., Spiers, H. (2017) The cognitive map in humans: spatial navigation and beyond. *Nature neuroscience*. 20: 1504-1513.

Etienne, A., Jeffery, K. (2004) Path integration in mammals. *Hippocampus*. 14: 180-192.

Etienne, A., Maurer, R., Boulens, V., Levy, A., Rowe, T. (2004) Resetting the path integrator: a basic condition for route-based navigation. *Journal of Experimental Biology*. 207: 1491-1508.

Foster, D., Wilson, M. (2006) Reverse replay of behavioral sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*. 440: 680-683.

Fyhn, M., Molden, S., Hollup, S., Moser, M., Moser, E. (2002) Hippocampal neurons responding to first-time dislocation of a target object. *Neuron*. 35: 555-566.

Fyhn, M., Molden, S., Witter, M., Moser, E., Moser, M. (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*. 305: 1258-1264.

Giocomo, L., Stensola, T., Bonnevie, T., Van Cauter, T., Moser, M., Moser, E. (2014) Topography of head direction cells in medial entorhinal cortex. *Current Biology*. 24: 252-262.

Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S., Buzsaki, G., Zugaro, M. (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature neuroscience*. 12: 1222-1223.

Golob, E., Taube, J. (1999) Head direction cells in rats with hippocampal or overlying neocortical lesions: evidence for impaired angular path integration. *Journal of Neuroscience*. 19: 7198-7211.

Goodrich-Hunsaker, N., Hunsaker, M., Kesner, R. (2008) The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behavioral Neuroscience*. 122: 16-26.

Hafting, T., Fyhn, M., Bonnevie, T., Moser, M., Moser, E. (2008) Hippocampus-independent phase precession in entorhinal grid cells. *Nature*. 453: 1248-1253.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M., Moser, E. (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 436: 801-806.

Hebert, A., Dash, P. (2004) Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 79: 143-153.

Jung, M., Wiener, S., & McNaughton, B. (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *Journal of Neuroscience*. 14: 7347-7356.

Kelemen, E., Fenton, A. (2013) Key features of human episodic recollection in the cross-episode retrieval of rat hippocampus representations of space. *PLoS biology*. 11: e1001607.

King, C., Henze, D., Leinekugel, X., Buzsaki, G. (1999) Hebbian modification of a hippocampal population pattern in the rat. *The Journal of Physiology*. 521: 159-167.

Klatzky, R. (1998) Allocentric and Egocentric Spatial Representations: Definitions, Distinctions, and Interconnections. In: *Spatial Cognition. Lecture Notes in Computer Science*, Freksa C., Habel C., Wender K., Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-17.

Knowles, W. (1992) Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 9: 253-263.

Knowles, W., Schwartzkroin, P. (1981) Axonal ramifications of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*. 1: 1236-1241.

Kubie, J., Muller, R., Bostock, E. (1990) Spatial firing properties of hippocampal theta cells. *Journal of Neuroscience*. 10: 1110-1123.

Lewicki, M. (1998) A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Computation in Neural Systems*. 9: 53-78.

Liu, P., Bilkey, D. (2001) The effect of excitotoxic lesions centered on the hippocampus or perirhinal cortex in object recognition and spatial memory tasks. *Behavioral neuroscience*. 115: 94-111.

Louie, K., Wilson, M. (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron*. 29: 145-156.

Lu, L., Popeney, B., Dickman, J., Angelaki, D. (2018) Construction of an improved multi-tetrode hyperdrive for large-scale neural recording in behaving rats. *Journal of Visualized Experiments*. 135: e57388.

Maguire, E. (1997) Hippocampal involvement in human topographical memory: evidence from functional imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 352: 1475-1480.

Maguire, E., Frackowiak, R., Frith, C. (1996) Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 263: 1745-1750.

Maguire, E., Gadian, D., Johnsrude, I., Good, C., Ashburner, J., Frackowiak, R., Frith, C. (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 4398-4403.

Maren, S., Quirk, G. (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5: 844-852.

Markus, E., Qin, Y., Leonard, B., Skaggs, W., McNaughton, B., Barnes, C. (1995) Interactions between location and task affect the spatial and directional firing of hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 15: 7079-7094.

Martin, J. (2003) Lymbic system and cerebral circuits for emotions, learning, and memory. In: *Neuroanatomy: text and atlas*, Martin, J. (third ed.), McGraw-Hill Companies, pp. 382-407.

Maurer, A., VanRhoads, S., Sutherland, G., Lipa, P., McNaughton, B. (2005) Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus*. 15: 841-852.

McNaughton, B., Barnes, C., Meltzer, J., Sutherland, R. (1989) Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Experimental brain research*. 76: 485-496.

McNaughton, B., Battaglia, F., Jensen, O., Moser, E., Moser, M. (2006) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nature Reviews Neuroscience*. 7: 663-678.

Mizumori, S., Williams, J. (1993) Directionally selective mnemonic properties of neurons in the lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats. *Journal of Neuroscience*. 13: 4015-4028.

Moita, M., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J., Blair, H. (2004) Putting fear in its place: remapping of hippocampal place cells during fear conditioning. *Journal of Neuroscience*. 24: 7015-7023.

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

Moser, E., Kropff, E., Moser, M. (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *The Annual Review of Neuroscience*. 31: 69-89.

Moser, M., Rowland, D., Moser, E. (2015) Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7: 1-16.

Muir, G., Brown, J., Carey, J., Hirvonen, T., Della Santina, C., Minor, L., Taube, J. (2009) Disruption of the head direction cell signal after occlusion of the semicircular canals in the freely moving chinchilla. *Journal of Neuroscience*. 29: 14521-14533.

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

Muller, R., Kubie, J. (1987) The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *Journal of Neuroscience*. 7: 1951-1968.

Muller, R., Kubie, J., Ranck, J. (1987) Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *Journal of Neuroscience*. 7: 1935-1950.

Nádasdy, Z., Hirase, H., Czurkó, A., Csicsvari, J., Buzsáki, G. (1999) Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 19: 9497-9507.

O'Keefe, J. (1979) A review of the hippocampal place cells. *Progress in neurobiology*. 13: 419-439.

O'Keefe, J. (2007) Hippocampal neurophysiology in the behaving animal. In: The hippocampus book, Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (first ed.), Oxford University Press, New York, pp. 475-548.

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

O'Keefe, J., Nadel, L. (1978) The hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press, pp. 62-217.

O'Keefe, J., Recce, M. L. (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*. 3: 317-330.

Peyrache, A., Khamassi, M., Benchenane, K., Wiener, S., Battaglia, F. (2009). Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nature neuroscience*. 12: 919-926.

Plihal, W., Born, J. (1997) Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory. *Journal of cognitive neuroscience*. 9: 534-547.

Poucet, B. (1993) Spatial cognitive maps in animals: new hypotheses on their structure and neural mechanisms. *Psychological review*. 100: 163-182.

Ranck, J. (1973) Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats: Part I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Experimental neurology*. 41: 462-531.

Raudies, F., Brandon, M., Chapman, G., Hasselmo, M. (2015) Head direction is coded more strongly than movement direction in a population of entorhinal neurons. *Brain research*. 1621: 355-367.

Redish, A. (1999) Beyond the cognitive map: from place cells to episodic memory. MIT press, London, England, pp. 5-23.

Robertson, R., Rolls, E., Georges-François, P., Panzeri, S. (1999) Head direction cells in the primate pre-subiculum. *Hippocampus*. 9: 206-219.

Sadowski, J. H., Jones, M. W., & Mellor, J. R. (2011) Ripples make waves: binding structured activity and plasticity in hippocampal networks. *Neural plasticity*. 1-11.

Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B., Witter, M., Moser, M., Moser, E. I. (2006) Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*. 312: 758-762.

Scoville, W., Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 20: 11-21.

Seelig, J., Jayaraman, V. (2015) Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration. *Nature*. 521: 186-191.

Sharp, P. (1999) Complimentary roles for hippocampal versus subicular/entorhinal place cells in coding place, context, and events. *Hippocampus*. 9: 432-443.

Skaggs, W., McNaughton, B., Wilson, M., Barnes, C. (1996) Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*. 6: 149-172.

Smith, C. (2001) Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep medicine reviews*. 5: 491-506.

Squire, L. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*. 99: 195-231.

Stackman, R., Taube, J. (1998) Firing properties of rat lateral mammillary single units: head direction, head pitch, and angular head velocity. *Journal of Neuroscience*. 18: 9020-9037.

Stuchlík, A. (2003) Prostor a prostorová orientace. *Československá fyziologie*. 52: 22-33.

Taube, J. (1995) Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats. *Journal of Neuroscience*. 15: 70-86.

Taube, J. (1998) Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Progress in neurobiology*. 55: 225-256.

Taube, J. (2007) The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annual Review of Neuroscience*. 30: 181-207.

Taube, J., Muller, R., Ranck, J. (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *Journal of Neuroscience*. 10: 420-435.

Thompson, L., Best, P. (1990) Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain research*. 509: 299-308.

Tolman, E. (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychological review*. 55: 189-208.

Wesierska, M., Dockery, C., Fenton, A. (2005) Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *Journal of Neuroscience*. 25: 2413-2419.

Whishaw, I., Brooks, B. (1999) Calibrating space: exploration is important for allothetic and idiothetic navigation. *Hippocampus*. 9: 659-667.

Wilson, M., McNaughton, B. (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*. 261: 1055-1058.

Wilson, M., McNaughton, B. (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*. 265: 676-679.

Winson, J. (1974) Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 36: 291-301.


Yoder, R., Taube, J. (2009) Head direction cell activity in mice: robust directional signal depends on intact otolith organs. *Journal of Neuroscience*. 29: 1061-1076.

Yoder, R., Taube, J. (2014) The vestibular contribution to the head direction signal and navigation. *Frontiers in integrative neuroscience*. 8: 1-13.


Zhang, K. (1996) Representation of spatial orientation by the intrinsic dynamics of the head-direction cell ensemble: a theory. *Journal of Neuroscience*. 16: 2112-2126.

Zugaro, M., Arleo, A., Berthoz, A., Wiener, S. (2003) Rapid spatial reorientation and head direction cells. *Journal of Neuroscience*. 23: 3478-3482.

Příloha č. 1. Náhled posteru, ve kterém byly použity některé výsledky této diplomové práce.



Department
of Experimental
Neurobiology




Role of hippocampal neurons in creation of cognitive schemas and higher-order spatial relationships.

Maria Lebedeva^{1,2}, Ewa Szczurowska¹, Eduard Kelemen¹

1) National Institute of Mental Health, Topolová 748, 250 67, Klecany, Czech Republic
2) Department of Physiology, Faculty of Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

INTRODUCTION

Space is a fundamental and omnipresent element of the world, therefore, it is essential and necessary for survival to acknowledge surroundings and remember important places. The key structure involved in the above-mentioned processes is the hippocampus. The hippocampus plays an important role in spatial behavior and it is often regarded as a key structure in formation of cognitive map (internal representation of the environment) in rats because of several reasons: firstly, spatial memory is sensitive to hippocampal damage, and secondly, this brain structure contains a number of nerve cells encoding the space – place cells, which are characterized by location-specific firing.



For better understanding the aim of our study, we created this figure. Let's imagine that you are in Prague for the first time:

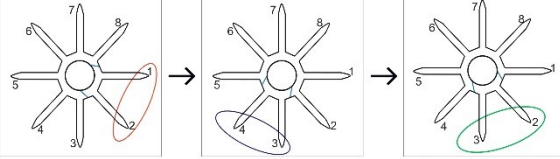

- **MAP 1:** first day you will start your stroll from the IP Pavlova metro station and will walk to the Botanical garden. This action will create a simple spatial map of this route in the hippocampus.
- **MAP 2:** second day you will shop in Palladium and will go to Wenceslas Square. This path again will be encoded in your brain.
- **?**: finally on the third day you will start your walk on Wenceslas Square and suddenly during strolling you will come across IP Pavlova metro station. Of course, at this moment you will realize that these 4 places are next to each other, but you have never explored that way all at once. Which map will arise in the hippocampus?

AIM OF THE STUDY

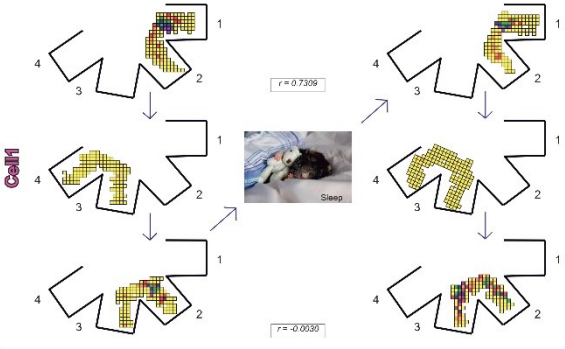
Formation of spatial representations of simple environments has been described in details, in this work we focus on the question of **emergence of a spatial map of a complex environment from individual simple maps.**

METHODS

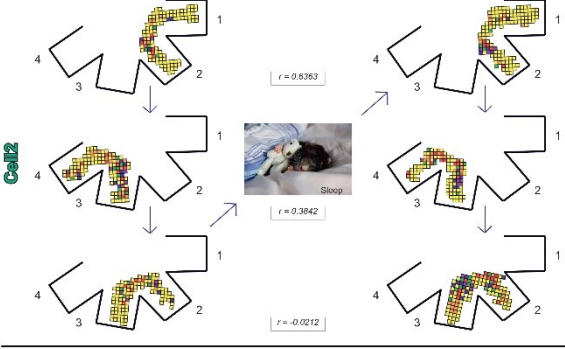
- 1) Stereotaxic surgery**
 - Long-Evans male rats were anesthetized with isoflurane and their heads were fixed in a stereotaxic frame. A microelectrode system was inserted into the hole in the skull overlying the hippocampus (AP = -4 mm, L ± 2.5 mm relative to bregma).
- 2) Single unit recording**
 - For single unit recordings tetrode configuration of microelectrodes is used. It is an extracellular microelectrode that comprises four juxtaposed recording channels, which can be used to disambiguate the signals emitted by individual point sources. Because each neuron occupies a unique position in space, its spikes are 'seen' slightly differently by each microelectrode, providing a unique signature. This technique allows the identification of many more neurons than there are sampling electrodes.
 - 8 tetrodes (i.e. 32 microelectrodes) are located in the implant that mediates the electrode connection with the connector and at the same time includes a mechanism for moving the tetrodes in the vertical direction.
 - After the recovery of animals from the surgery, the tetrodes advanced to the target area with contemporary measuring the electrophysiological responses of single neurons.
 - Single unit recordings were analysed offline using Axona Ltd. TINT sw. Using clustering analysis spikes of single cells were divided into individual neurons according to the selected parameter.
- 3) Behavioral task**
 - A radial-arm maze was used to model a complex environment, where each arm was surrounded by unique pattern of proximal visual landmarks.
 - Long Evans rats were allowed to explore gradually 4 different arms of the maze in a sequence of three sessions:
 - > During the first and second sessions rats separately visited two novel pairs of neighboring arms (arms 1 and 2 in the first session, arms 3 and 4 in the second session).
 - > In the third session rats were exposed to a new combination of already familiar arms (arms 2 and 3)
 - Rats were exposed to this sequence of three sessions twice – before and after sleep.

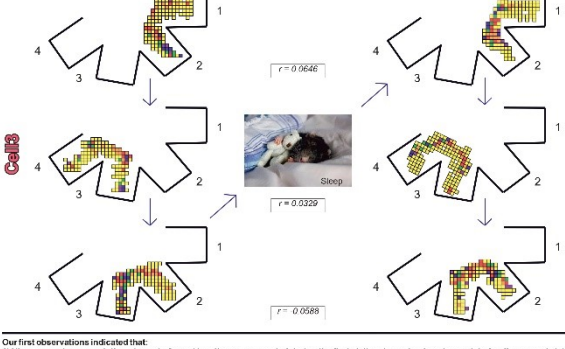
RESULTS




$r = 0.7309$



$r = 0.3963$




$r = 0.3842$



$r = -0.0212$

$r = 0.0646$



$r = 0.0329$

$r = -0.0588$

Our first observations indicated that:

- 1) Hippocampal representations (maps) of novel locations were created during the first visit and remained unchanged during the second visit to the same pair of arms (they were not altered by sleep).
- 2) Hippocampal maps of novel combinations of already known locations did not emerge as simple combinations of previously created individual simple maps.
- 3) Hippocampal maps of novel combinations of known locations were not stable, they changed between the first and second visit.

CONCLUSIONS

Our preliminary data suggest that **representation of a complex environment is neither a simple combination of preexisting individual maps, nor is it created completely de novo.** Instead it involves gradual modification of pre-existing maps that takes more than a single exposure to the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by GACR grant 17 26002Y awarded to E.K., 17 04047S awarded to J.L., and by the project N. Lu1611 with a financial support from the MEYS under the NLU1 program.

