



# Experimentální studium učení a paměti

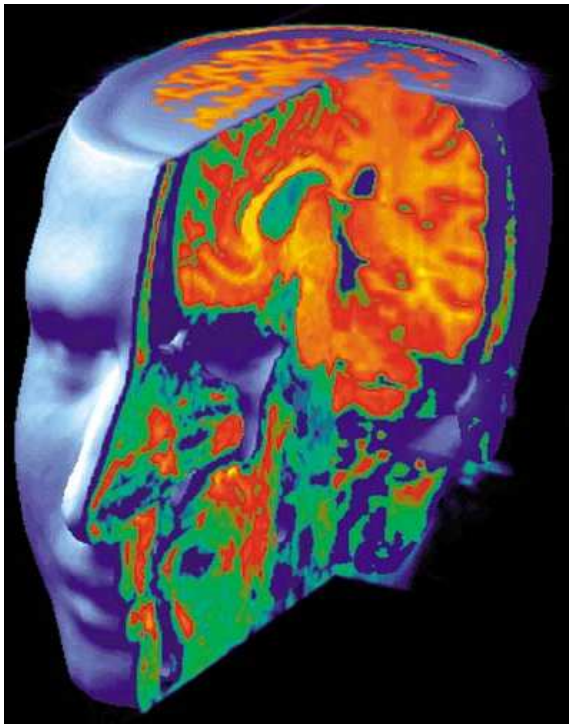
---

Kurz z cyklu Pokroky v Neurovědách  
Aleš Stuchlík & Štěpán Kubík

Učení a paměť – obecné koncepty, dělení paměti, terminologie (A. Stuchlík)  
Prostorová paměť a orientace -experimentální přístupy (A. Stuchlík)  
Novinky z oblasti výzkumu chování (Š. Kubík)

Praktická exkurze do Laboratoře neurofyzologie paměti.

# Učení a paměť – obecné koncepty, mechanismy, terminologie



Existuje řada paměťových systémů (typů paměti) a paměťových procesů (mechanismů tvorby paměti)

Základní molekulární mechanismy změn synaptické plasticity, které jsou podkladem učení a paměti, jsou víceméně univerzální

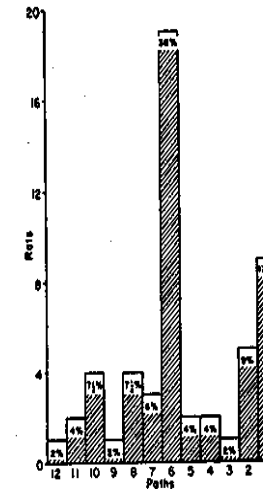
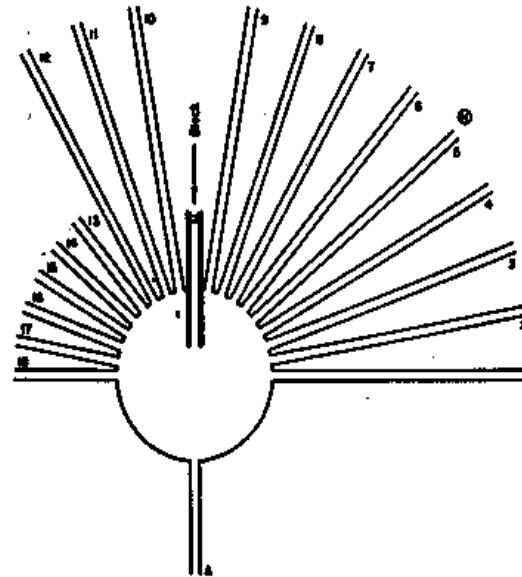
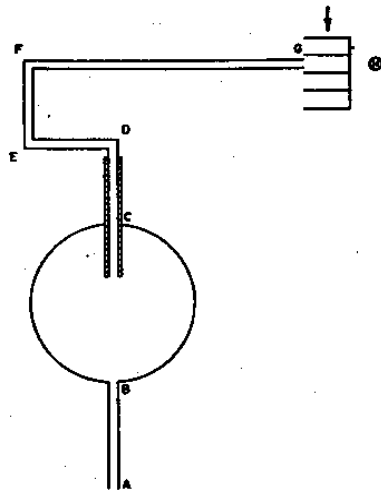


# Historie výzkumu chování

---

- Chování vždy představovalo pro badatele výzvu.
- Na počátku minulého století dominoval **behaviorismus**, který tvrdil, že veškeré (i lidské) chování se dá vysvětlit pomocí SR řetězce – stimulus-response – učení typu „**podnět-odpověď**“
- Edward Thorndike - „law of effect“ – to co je následováno příjemným prožitkem se bude v chování častěji opakovat; to co je následováno trestem, se bude opakovat méně.
- John B. Watson (1878 - 1958) – behaviorismus  
(Stimulus-Response koncept) - „...smysl má pouze studovat odpovědi organismů na fyzikální podněty...“ ..... Veškeré chování lze vysvětlit pomocí řetězců SR – reakcí???
- Burrhus Frederic Skinner (1904 - 1990)
  - Skinnerův box – velký průlom  
(koncept operantní odpovědi) ...ta ve spojení s odměnou je podle Skinnera hlavní složkou řídící chování
- Edward Chace Tolman (1886 - 1959) - metodologický behaviorismus, někdy neobehaviorismus – studium chování je jediná cesta, ale
  - odpověď organismu na stimul může být modifikována zkušeností (koncept Stimulus-Organism-Response)...
  - Tolman byl první, kdo navrhnul koncept kognitivních map

# Edward C. Tolman



- kniha „Purposive Behavior in Animals and Men“ (1932)
- Série článků v Psychological Review
  - The determinants of behavior at a choice point (1938)
  - Cognitive maps in rats and men (1948)
  - Principles of performance (1955)

Latentní učení, důležitost explorační, tvorba kognitivní mapy – ve své době konfrontován se zastáncem S-R teorie Clarkem L. Hullem



# Definice paměti

---

- **Definice paměti**
  - Paměť je schopnost organismů ukládat, uchovávat a vybavovat informace (*existují mnohotné paměťové systémy a typy paměti*).
    - Učení je proces ukládání informací do paměti. (*opět existuje řada typů učení*)
  - Paměť budeme rozebírat jen u živých organismů, konkr. živočichů...*nikoliv počítačová či imunologická paměť*
  
- Z hlediska informačního zpracování lze v zásadě rozlišit 3 fáze paměti
  - **Učení** (*learning, encoding, acquisition*)
    - Získání zpracování a syntéza informace
  - **Uchování** (tvorba trvalého záznamu ukládané informace – engram)
  - **Vybavení** (*retrieval, recall or recollection*) vyvolání uložené informace v a její použití, verbalizace nebo změna chování (u zvířat)



# Učení

---

- Proces, který zahrnuje percepci informací z prostředí a její uložení do paměti.
  - Může zahrnovat rovněž **osvojení určité formy chování**
  - Různé podtypy učení (neasociativní, asociativní, operantní) – *rozebereme později*
  - V zásadě jakýkoliv typ informace vnímaný subjektem může být ukládán do paměti (*různé smyslové modality, čichová, vizuální, akustická paměť...*)
  - Tento proces může rovněž zahrnovat kombinaci informací z více sensorických modalit – smyslů, tzv. multimodální typy paměti typickým příkladem je prostorová paměť ...viz později...
    - Experimentálně lze v úlohách u zvířat kontrolovat typy informace dostupné pro zvíře, např. „vypnutí“ vizuální složky prováděním pokusu ve tmě.



# Uchovávání informací v paměti (*memory storage*)

- Představuje mechanismus, jímž jsou informace v uskladňovány a to v různých typech paměti (*multiple memory systems*)
- Mechanismus uskladnění paměťové stopy souvisí se synaptickou plasticitou v nervové tkáni.
- Paměť nebo vzpomínka nemusí pouze staticky „sedět“ v mozku, ale může být transformována, zobecňována, zeslabována apod (srovnej viz PTSD).
  - Lze sem zahrnout i fenomén konsolidace a rekonolidace...viz později)

## Vybavení informace z paměti

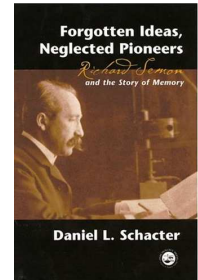
Vybavení (*retrieval, recall*) je znovuoživení paměti, dochází při něm často k nějakému typu chování nebo k jeho změně, nebo jeho změně, to je to, co můžeme měřit u zvířat.

Minimálně u člověka však nemusí být patrná tato změna v chování, lze je zpravidla verbalizovat.

Podnětem k vybavení informace z paměti? Může to být určitý smyslový podnět, kontext ve kterém se subjekt ocitne, motivace (hlad).

Podnět však nemusí být patrný, zvlášť u lidí, spontánní vybavení vzpomínky.

# Paměťová stopa – engram (*memory trace*)



- Termín navržen Richardem Semonem (1921)
  - Semon, R. (1921). *The Mneme*. London: George Allen & Unwin.
    - Semon mj. razil ideu, že psychologické stavy jsou vyvolané činností nervů. Poté, co je engram uložen, může dojít k jeho znovuoživení prezentací podnětů připomínající původní soubor podnětů či kontext.
- Značí vzpomínku, „kousek“ informace v paměti
  - Alt. hypotetické „místo“, kde je uložena konkrétní vzpomínka, nicméně, současné i nedávné nálezy naznačují, že řada typů paměti je v mozku prostorově distribuována (*distributed encoding and storage*), že není lokalizována v jediné konkrétní struktuře.
- U zvířat je často jedinou manifestací existence paměťové stopy změna chování.
- Její podstata coby kousku informace v paměti spočívá ve změně synaptické plasticity mezi neurony
- Synaptická plasticita = specifická změna v účinnosti přenosu informace -> ta vede ke změně signalizace v neuronálních okruzích a následně ke změně chování celého zvířete





# Klasifikace učení a paměti

---

„A now widely held view in neuroscience is that there are multiple ‘types’ of memory and these differ with respect to their psychological characteristics, the anatomical circuits involved and the underlying neural mechanisms of encoding, storage, consolidation and retrieval.“

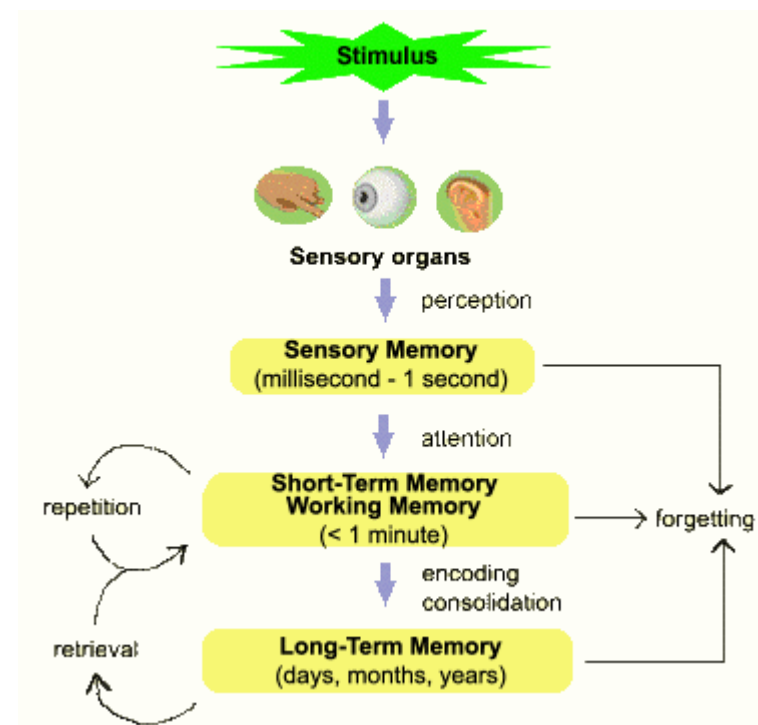
R.G.M. Morris, 2004

Paměť lze dělit podle řady kritérií...

- Podle doby trvání
  - Percepční (senzorická)
  - Krátkodobá (někdy pracovní)
  - Dlouhodobá (referenční)
    - Existují i alternativní dělení - nejasnost ohledně pracovní paměti
- Podle typu informace
  - Deklarativní (explicitní) – lze deklarovat, např. verbálně – sémantická vs. epizodická
  - Nedeklarativní (implicitní) – neasociativní učení, asociativní, priming, motorické dovednosti.

# Dělení paměti podle doby trvání

- Krátkodobá (*short-term memory*) v řádu sekund až minut)
  - Někdo udává i střednědobou (minuty až desítky minut, ale to je otázka)
- Dlouhodobá (*long-term memory*) v řádu hodin, až let, může být i celoživotní)
- Vybrané informace z krátkodobé jsou uloženy do dlouhodobé, záleží na jejich signifikanci (např. emoční)
- Převod vzpomínek do dlouhodobé paměti – **konsolidace** (stopa může být i různě transformována, či generalizována)



# Krátkodobá a pracovní paměť

**Krátkodobé udržení informace** popř. změna chování – to co skutečně lze u zvířete či člověka měřit. Testování u lidí – nejčastěji „*digit span test*“ – magické číslo 7 (+-2)

Pracovní paměť – v podstatě teoretický konstrukt na poli kognitivní psychologie a neurověd.

Exekutivní a pozornostní komponenta krátkodobé paměti, účastníci se dočasné integrace zpracování, dočasného uložení a vybavení informace. Úlohy pracovní paměti (zpravidla u člověka nebo primátů) zahrnují aktivní monitorování a manipulaci s informacemi nebo typy chování. U lidí je nejrozšířenější Baddeleyho model pracovní paměti.

## Centrální exekutivní služka a její podřízené

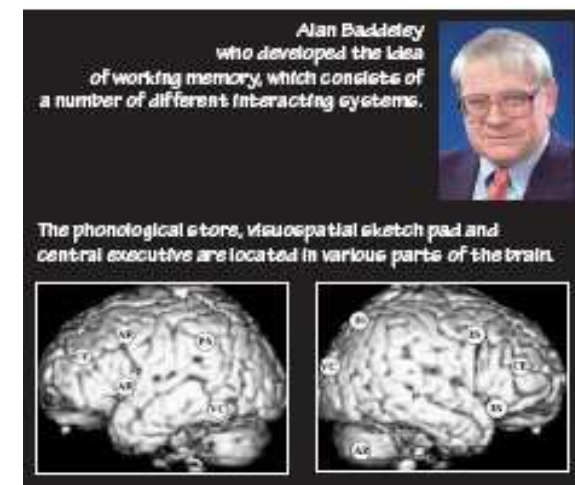
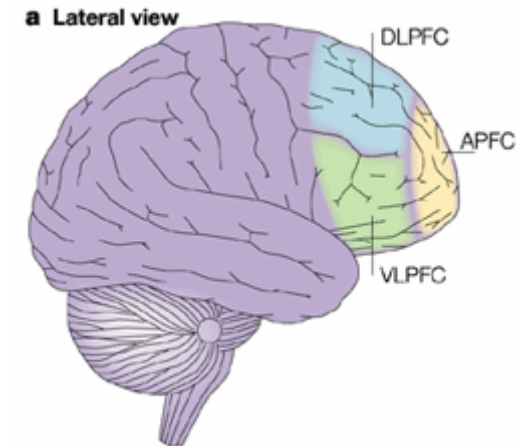
Vizuospaciální náčtník

Fonologická smyčka

Náborová složka (rehearsal component)

Struktury – prefrontální kůra, ale i parietální, hippocampus, thalamus, bazální ganglia. V PFC je možné přímo u zvířat (primátů) měřit neurony, které odpovídají na určité stimuly během řešení úlohy pracovní paměti na monitoru

Léze nebo funkční vyřazení (inaktivace) PFC u zvířat vede k narušení pracovní paměti.





## Krátkodobá paměť u zvířat

---

- Řada definicí a pojetí

Příklad rigorózní definice

*„Representation of a cue over a delay period in which the cue is not present, to make subsequent response.“ (Honig, 1978)*

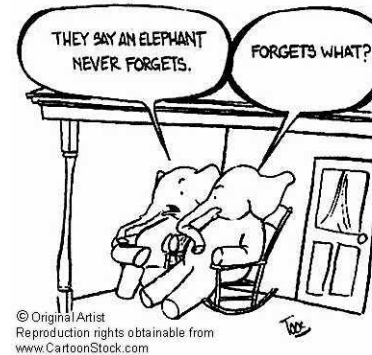
„Běžná“ laboratorní definice:

*„...a short-term memory for an object, stimulus, or location that is used within a testing session, but not typically between sessions.“*

(např. Dudchenko, 2004)

Krátkodobou paměť u zvířat lze testovat řadou úloh, např. spontánní alternací v Y-bludišti nebo v radiálním, popř. Morrisově vodním bludišti.

# Dlouhodobá paměť (*long-term memory; LTM*)



- Trvá od minut po celý život.
  - Ukládá se prostřednictvím změn v synaptické plasticitě, tedy ve změnách účinnosti synaptického přenosu.
  - Výrazná modulační role spánku v konsolidaci paměťových stop, tudíž de facto jeho nezbytnost pro funkci LTM
  - Odbočka – „mnemonists“ – fenomenální dlouhodobá paměť.
    - Solomon Šereševskij – neuropsycholog Alexandr Lurija
      - Kniha „The Mind of a Mnemonist: A Little Book About a Vast Memory“
      - Šereševskij trpěl i synestézií (porucha, kdy dochází k inetrakci mezi smyslovými modalitami, např. když slyšel tón, vybavila se mu i barva...přifazoval lidské charaktery z číslovkám
- Další mnemonisté...

**Table 2.** Examples of AJ's excellent memory for events and dates if within her areas and time period of interest. Answers given below so reader can self-test

*Name the day of the week and the significant event on this date*

August 16, 1977; June 6, 1978; May 25, 1979; November 4, 1979 (book wrong date, AJ correct); May 18, 1980; October 5, 1983; January 17, 1994; December 21, 1988; May 3, 1991; May 4, 2001

*Name the date for the event*

Plane crash in San Diego? Who shot JR episode? Persian Gulf War begins? Rodney King beating? OJ Simpson verdict? Bombing at Atlanta Olympics? Death of Princess Diana? Concorde Crash? Election dates for G.W. Bush and Clinton?

Answers (events) AJ gave to dates:

8/16/77 – Tuesday, Elvis died  
6/6/78 – Proposition 13 passed in CA  
5/25/79 – plane crash, Chicago  
11/4/79 – Iranian invasion of US Embassy  
5/18/80 – Sunday, Mt. St Helens erupted  
10/5/83 – Wednesday, bombing in Beirut, killed 300  
1/17/94 – Monday, Northridge earthquake  
12/21/88 – Lockerby plane crash  
5/3/91 – last episode of Dallas  
5/4/01 – Robert Blake's wife killed

Answers (dates) A.J. gave to events:

San Diego crash – September 25, 1978  
JR – November 21, 1980  
Gulf War – Wednesday, January 16, 1991  
Rodney King beating – March 3, 1991  
OJ Simpson verdict – Tuesday, October 3, 1995  
Atlanta bombing – July 26, 1996  
Princess Diana – August 30 or 31, 1997 (depending on France or US)  
Concorde – July 25, 2000  
Elections date – G.W. Bush – November 7, 2000, Clinton Nov 3, 1992 and November 5, 1996.



# Konsolidace – upevnění paměťové stopy

---

- Konsolidace – upevnění paměťové stopy z krátkodobé do dlouhodobé paměti
- Závislá na přepisu genů a syntéze nových bílkovin > remodelace synapse, zvýšení počtu spojení
- **Konsolidace** - může být definována na různých úrovních
  - Systémová – na úrovni mozkových struktur
    - ...např. *koncept, že engram se fyzicky přesouvá z hipokampu do kortexu...*
  - Buněčná (změny v synaptické plasticitě, měřitelné např. elektrfyziologicky – LTP, LTD)

Zde je zajímavý proces tzv. **rekonsolidace**



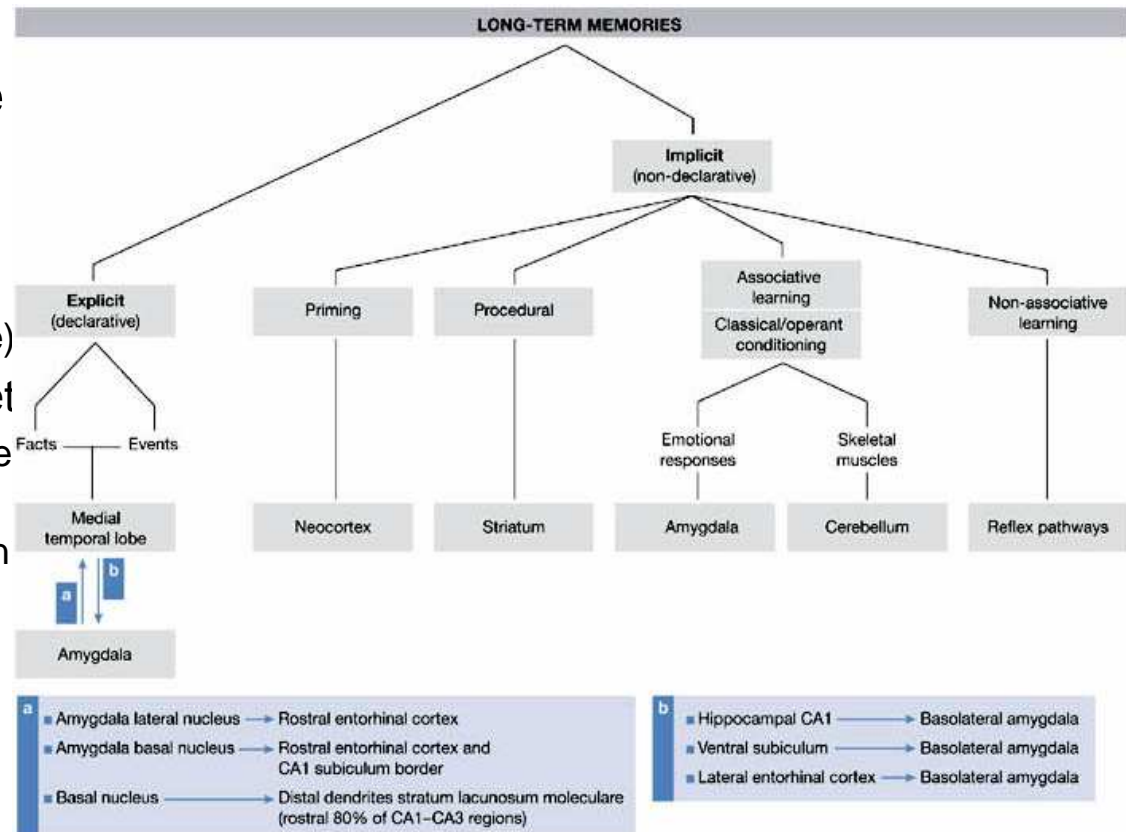
# Rekonsolidace

---

- Předpokládejme, že je již paměťová stopa uložena z krátkodobé paměti do dlouhodobé tedy, konsolidována.
- Pokud dojde k jejímu vybavení (retrieval), může se stopa stát znovu labilní (citlivá např. k inhibici proteosyntézy) a tzv. rekonsoliduje...tzn. znova se ukládá do dlouhodobé paměti.
- Výskyt jen u některých typů paměti
- Paměť může být během vybavení a následné rekonsolidace modifikována.
  - Potenciální vysvětlení abreakce traumatizujících vzpomínek při kognitivně behaviorální terapii, např. u post-traumatické stresové poruchy (PTSD).
  - Beta blokátor propranolol, snížil emoční náboj traumatické vzpomínky, pokud byl podán po jejím vyvolání. – tento náález se vztahuje k roli noradrenergických receptorů v některých oblastech mozku ve strachově zbarvené vzpomínce

# Dělení paměti podle typu informace a jejího zpracování

- týká se spíše dlouhodobé paměti
- Deklarativní – explicitní paměť
  - Sémantická (fakta)
  - Epizodická paměť (co, kdy, kde)
- Nedeklarativní – implicitní paměť
  - Neasociativní učení – habituace senzitivace
  - Asociativní učení – podmiňován klasické operantní
  - Priming
- Další podtypy







# Nedeklarativní, implicitní paměť

---

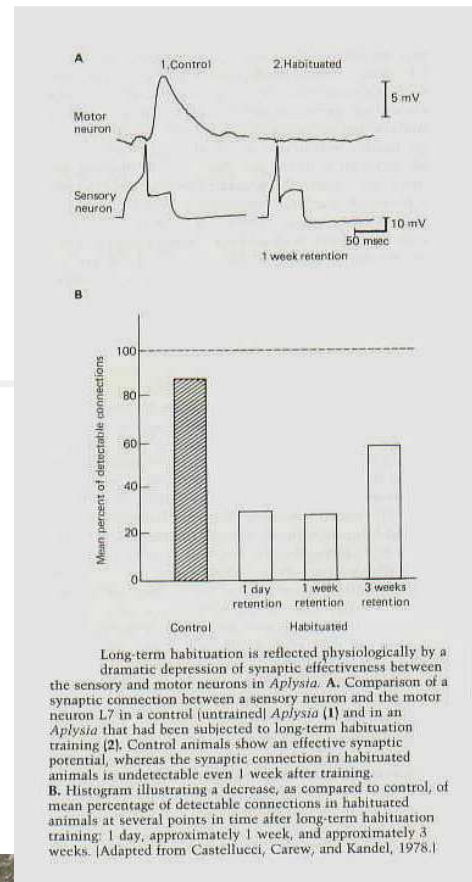
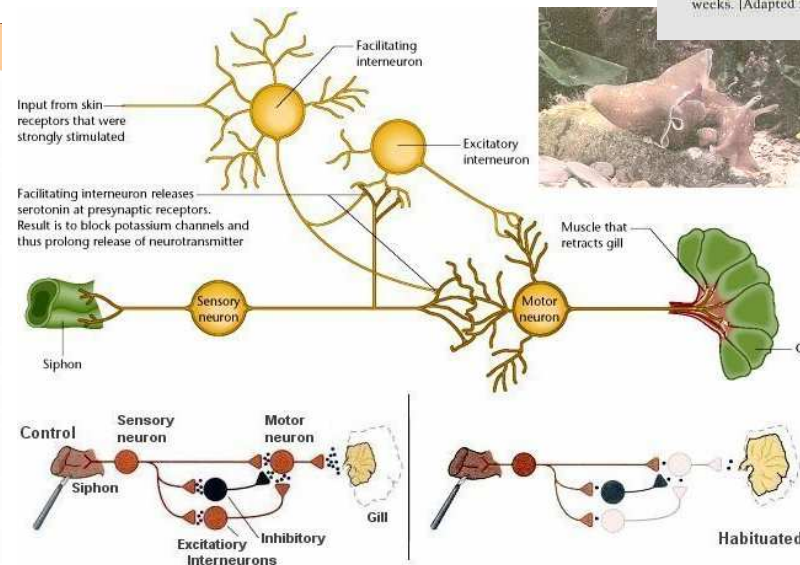
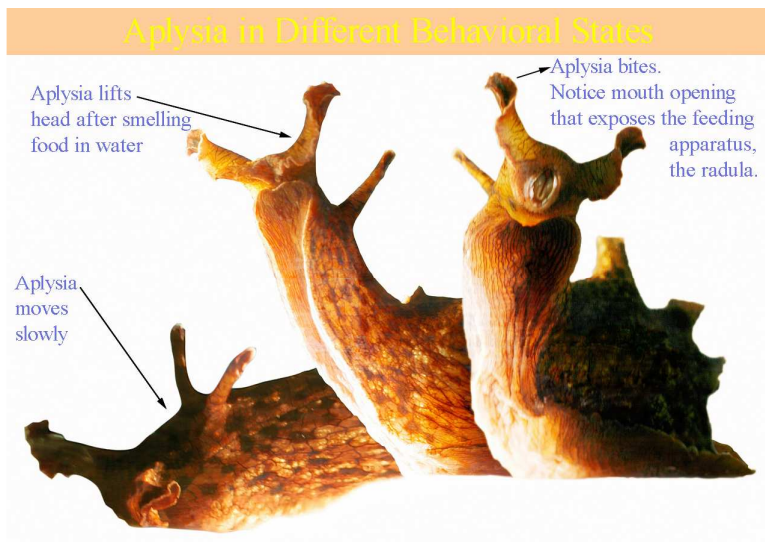
- Reflexy – habituace , nechochází k asociaci podnětů, je přítomen pouze 1 podnět
- Asociativní učení – asociace nepodmíněného podnětu (např. el. ranka nebo potrava s podmíněným podnětem, např. tón či světelný podnět
  - Klasické podmiňování (průkopníkem I.P. Pavlov) – nevyžaduje po zvířeti žádnou volní akci
  - Operantní podmiňování – (Skinner)- zvíře se naučí vykonávat určitou činnost (mačkat páčku) aby dosáhlo odměny nebo se vyhnulo trestu (předvídání důsledků svých akcí)
- Procedurální učení (motor skills) – tréninkem získané dovednosti, které nemusíme vybavovat vědomě (jízda na kole)
  - U zvířat i u člověka jsou především závislé na bazálních gangliích a mozečku

# Neasociativní učení

- Habituační – snížení odpovědi po opakovaném vystavení podráždění
- Senzitizace – zvýšení

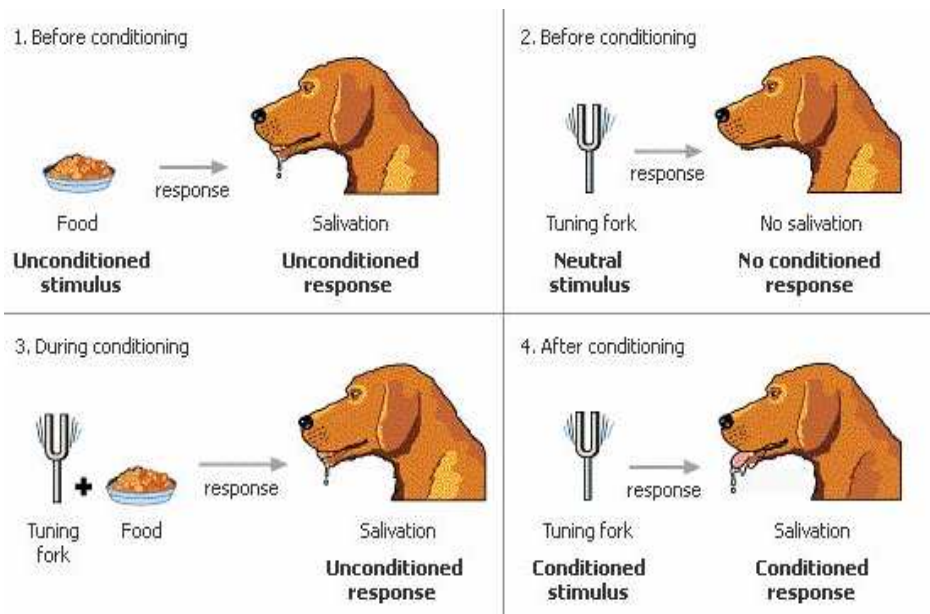
## Studium habituace a senzitivace u Aplysie – zeje mořského

Eric Kandel (Nobelova cena, 2000)

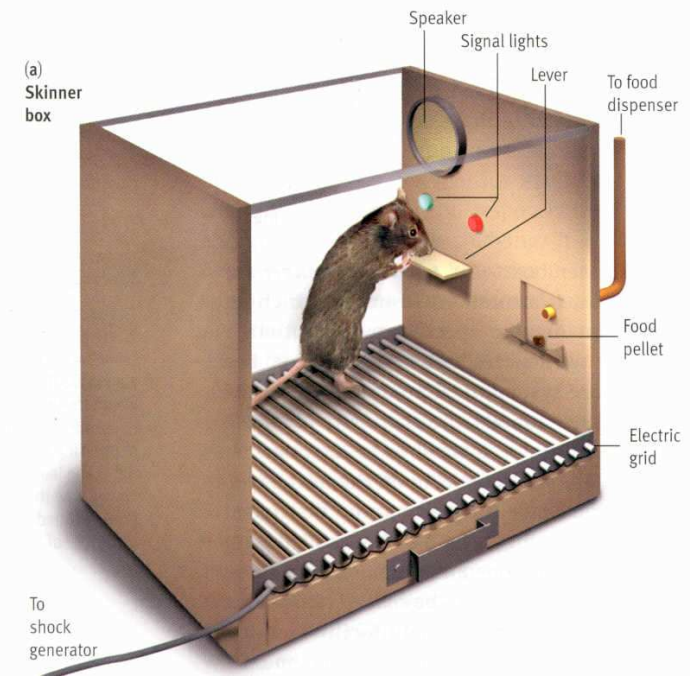


# Asociativní učení

- Dochází k asociaci dvou nebo více podnětů.
  - Podmiňování (klasické a operantní)



Při klasickém podmiňování dochází ke spárování nepodmíněného podnětu s podmíněným, který pak je sám o sobě schopen vyvolat behaviorální odpověď



Zvíře se učí vykonávat nějakou činnost aby dosáhlo odměny nebo se vyhnulo trestu

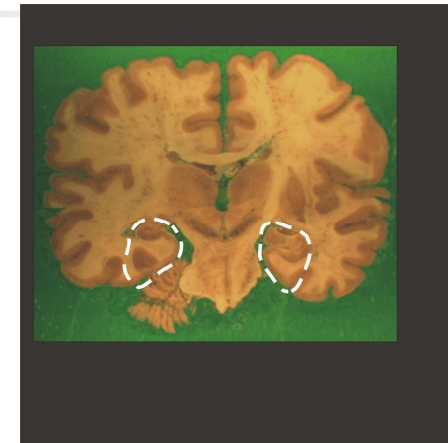
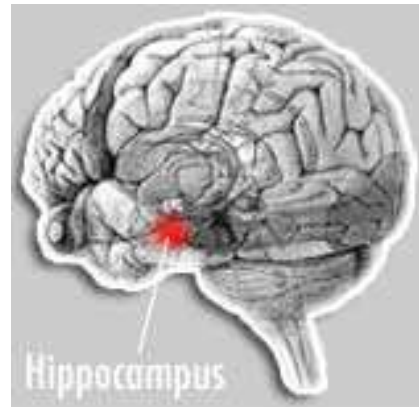
**Apetitivní motivace (odměna)** – vede ke zvýšení četnosti odpovědí

**Averzivní motivace (trest)** – vede ke snížení výskytu odpovědí

Zvíře musí „předvídat“ důsledky svého jednání

# Deklarativní paměť

- Paměť pro fakta a události
- **Sémantická** – vědomé pamatování si faktů nezávisle na místním a časovém kontextu ..... („Hlavním městem Francie je Paříž“)
- **Epizodická** – pamatování si konkrétních událostí v jejich kontextu (u lidí vědomě)..... („V Paříži jsem s přítelem navštívila loni Eiffelovku)
  - Co, kdy, kde?
- „vnitřní cestování v čase“ – autobiografická p.
- knihovna unikátních událostí, single-trial learning (episodic-like)
- obsahuje komponenty co, kde, kdy
- Oba typy se mohou v určitých situacích u lidí překrývat



- Závislá na hipokampální formaci a neokortikálních oblastech.
- Chirurgické odstranění mediálního temporálního (středního spánkového) laloku (např. z terapeutických důvodů při epilepsii) vede k neschopnosti zapamatovat si nová fakta a události, zatímco paměť pro velmi vzdálené vzpomínky zůstane zachována
  - Typický případ pacienta H.M.
    - Miniodbočka – Velmi nedávná práce (2007) ukázala, že pacienti bez hipokampu jsou nejen neschopni si zapamatovat nové věci, ale také poškozena konkrétní imaginace nových situací

# Deklarativní paměť – situace u zvířat

Situace u zvířat:

Deklarativní paměť – někteří autoři považují prostorovou paměť, tedy schopnost zapamatovat si místo v prostoru (s pomocí více sensorických modalit) za specifický typ deklarativní paměti – u zvířat nepřístupná „vědomá“ komponenta

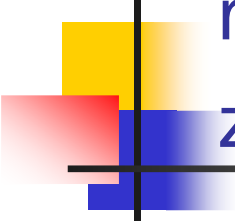
**Sémantická** – problém s analogizací u zvířat

**Epizodická** – opět nemáme vědomou složku, nicméně některá zvířata (*food-storing birds – scrub jays*) jsou schopna pamatovat si, co, kdy, kde.

*Ve výzkumu paměti zvířat obvykle hovoříme o „episodic-like memory“, pokud je přítomná složka časová, prostorová, i věcná*

*Výzkum těchto organismů rovněž ukazuje, že řadu „vyšších nervových funkcí člověka“ lze modelovat na různých zvířecích druzích*





# Koncepce paměti u zvířat jako schopnosti modifikovat své chování na základě zkušenosti

---

- Zvířata vnímají podněty a přiřazují jim biologickou signifikanci, tedy to co je pro ně „užitečné“ (např získání potravy, vyhnutí se predátorovi).
  - We consider learning to be an adaptive change in behavior caused by experience
  - Memory refers to the internal storage and recall of previously learned behaviors. (Forgetting is the loss of storage or recall.)
- Na základě těchto asociací jsou pak např. při příštím setkání se s podnětem modifikovat své chování tak, aby efektivněji využili zdroje.
- Modifikace chování má svůj základ v plastických změnách v činnosti nervových spojení (synaptické plasticitě), které vedou ke změnám signalizace
- Tento pohled je důležitý proto, že současná koncepce paměti pokládá právě synaptickou plasticitu a molekulární změny s ní spojené za hlavní mechanismus uchování informace v mozku, a zároveň kriticky ukazuje důležitost studia chování („jak jinak bychom se dozvěděli, že zvíře se něco učí“?)

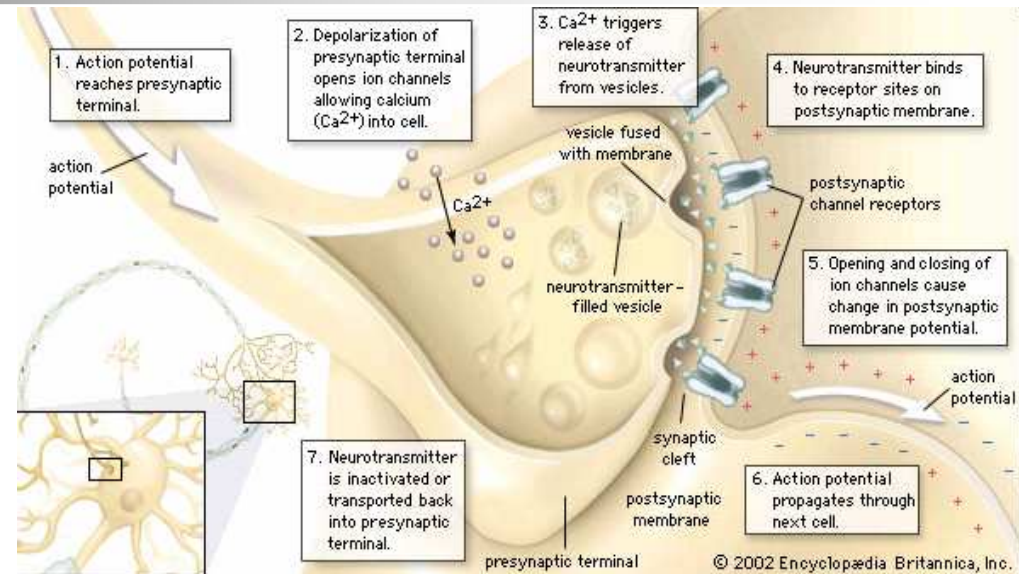
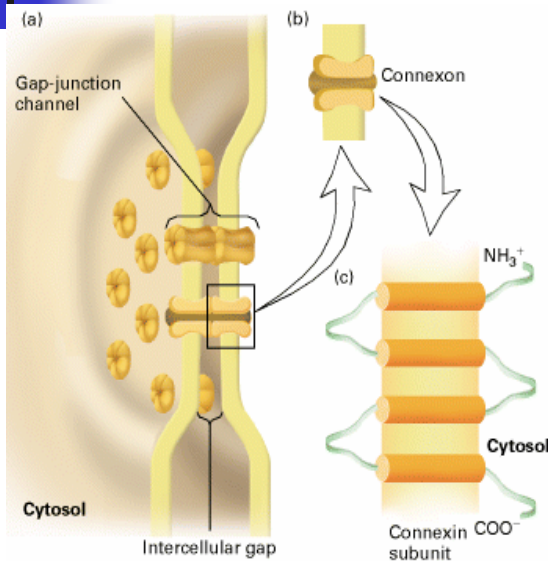
# Mechanismy učení a paměti



Vzhledem k tomu, že změny chování (coby projevy učení) mají svůj původ ve změnách nervové aktivity, nabízí se synaptická plasticita (která také mění zpracování signálu) jako kandidátní mechanismus pro udržení paměťové stopy.

Synapse - chemické, elektrické  
Synaptická plasticita – dobře doložená na chemických synapsích.

# Synaptická plasticita – fyziologie synapsí



Příme nízkoodporové elektrické propojení dvou buněk -z toho vyplývá – absence synaptického zpoždění, typického pro chemickou synapsi.

Méně mechanismsů pro plasticitu.

Avšak existují usměrňující *gap junctions*, pro které je vodivost v jednom směru podstatně vyšší než v druhém

Obecně vzato se jedná o (ne)spojení jedné nervové buňky s jinou, popř. s jinou efektorovou buňkou (svalovou, žláznou)

Lidský mozek obsahuje řádově 10<sup>14</sup> synapsí

Ch.S. Sherrington – autor termínu synapse (řecké „syn“ - spolu a haptin“ – obejmout, stisknout).

Typický neuron tvoří řádově tisíce synapsí.

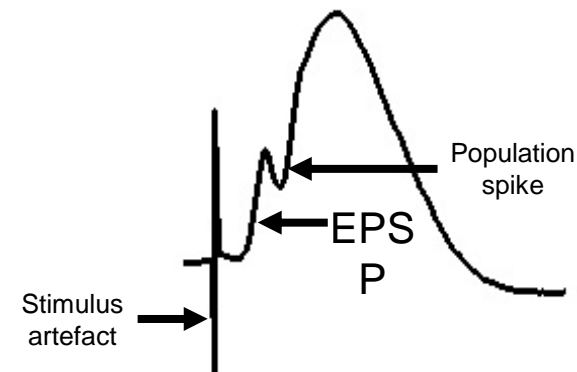
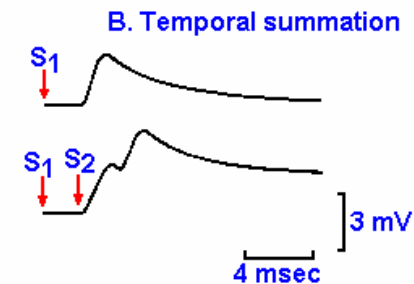
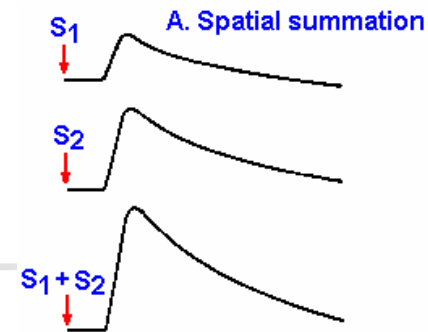
Axodendritické, axo-axonální, axosomatické, atd.

Synaptické zpoždění (cca 1ms) – doba potřebná ke vstupu vápníku do zakončení a k fúzi synaptických vezikul s membránou.



# Synaptická plasticita

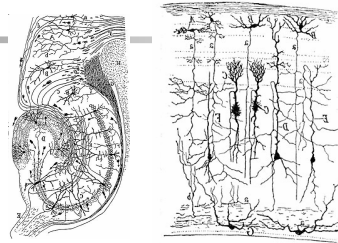
- Je pravděpodobně mechanismem, jímž jsou uchovávány informace v paměti.
- Je patrně podkladem nejen učení a paměti, ale i dlouhodobějších vzorců chování.
- Je přístupná experimentálnímu zkoumání, dá se měřit např. elektrofyziologicky
- Synaptická plasticita je definována jako schopnost synapse změnit svoji synaptickou sílu (*synaptic strength*) v závislosti na vlastní aktivitě.
- Synaptická síla
  - je míra změny postsynaptického potenciálu evokovaného aktivací presynaptického zakončení a následným výlevem neuropřenašeče.
  - *fe facto* účinnost, efektivita synaptického přenosu
  - Změna dráždivosti postsynaptické membrány daná opakovanou aktivací presynaptického a postsynaptického neuronu - (tato definice se blíží pojetí Hebba).



A population field potential ("EPSP") evoked in the dentate gyrus by stimulating the perforant path

# Změnu v účinnosti synaptického přenosu jako základ paměťových stop

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) byl v roce 1894 prvním, kdo navrhl představu, že učení není zprostředkováno přírůstkem počtu neuronů, ale ke změně sil spojení mezi těmito neurony.



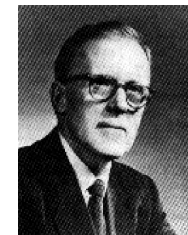
- Tuto myšlenku rozvinul výrazně Donald Hebb (*Hebb, D. O. (1949) The Organization of Behavior, John Wiley & Sons, Inc., N.Y*)
- **Hebbův zákon:** „When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly and persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficacy, as one of the cells firing B, is increased.“

**“Cells that fire together wire together”**

Typy synaptické plasticity: LTP, LTD, ale existují i krátkodobé změny v účinnosti, jako např. synaptická facilitace, augmentace, post-tetanická potenciace (pozorovány i na nervosvalovém spojení) – trvají od desítek až stovek ms do řádu desítek minut, z čeho je za jejich indukci zodpovědné přetrvávající presynaptické zvýšení koncentrace vápníku

Hebbovská synaptická plasticita byla studována především u nižších živočichů, nejvíce asi u Aplysie (E. Kandel)

Velké neuronové definované spojení apod



Donald Hebb

# Příklady mechanismů synaptické plasticity

Mechanismů, které vedou k synaptické plasticitě, je mnoho, např.:

fosforylace receptorů,  
zvýšení intracelulárního  $Ca^{2+}$ ,  
vkládání receptorů do syn. štěrbiny,  
syntéza nových bílkovin,  
zvýšení počtu synaptických knoflíků,  
rašení kolaterálních vláken  
(sprouting)

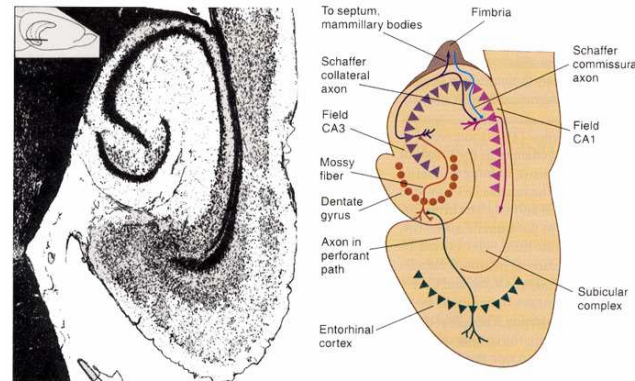
zvýšení výlevu z presynaptické terminály

prostřednictvím retrográdního signálu

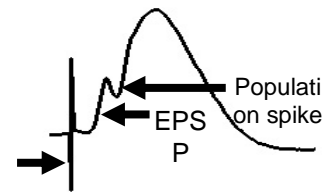
Tyto jevy jsou studovány buď u nižších bezobratlých, nebo pomocí genetických a elektrofyziologických technik, kdy jsou často snímány excitační postsynaptické

EPSP (intra-celulárně, EPSP) větších vláken, popř. pomocí techniky terčíkového zámku

fEPSP (field-EPSP) – extracelulárně, připadá v úvahu u struktur s pravidelným uspořádáním neuronů do vrstev a lamin – viz hipokampus



V hipokampu vzniká populační excitační postsynaptický potenciál v odezvě na dráždění aferentních vláken



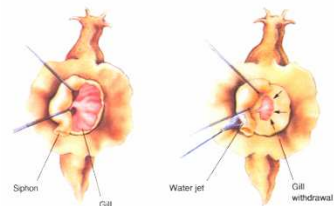
Populační excitační postsynaptický potenciál (fEPSP) v gyrus dentatus drážděním perforující dráhy (svazku přicházejícího z entorhinální kůry)

# Formy synaptické plasticity pozorované u nižších bezobratlých

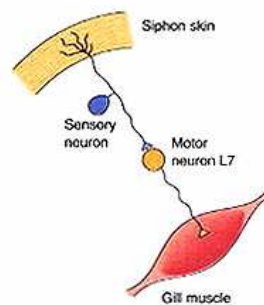
- *Aplysia californica*
- Několik tisíc snadno identifikovatelných, poměrně velkých neuronů.
- Zpravidla se studuje odpověď žaber (gill) na podráždění sifonu (siphon), kterým zvíře nasává a filtruje mořskou vodu

Někdy vědci studují i zatahování sifonu

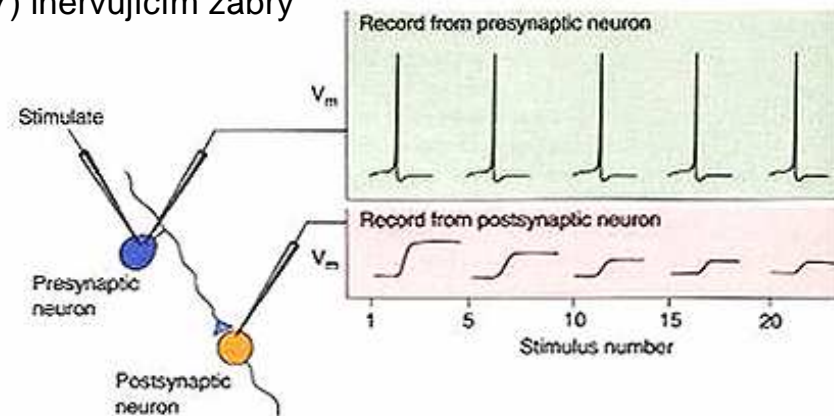
Sifon je inervován senzoryckým neuronem (LE mechanosenzorem), který je synapticky spojen s postsynaptickým motorickým neuronem (L7) inervujícím žábry



The gill-withdrawal reflex in *Aplysia*.



**A simple wiring diagram for the gill-withdrawal reflex.** The sensory neuron which detects stimuli applied to the skin of the siphon synapses directly on the motor neuron that causes the gill to withdraw.



**Habituation at the cellular level.** Repeated electrical stimulation of a sensory neuron leads to a progressively smaller EPSP in the postsynaptic motor neuron.

Při opakovaném dráždění došlo jak ke snížení behaviorálních odpovědí, tak ke snížení amplitudy postsynaptického potenciálu.

# Synaptické změny v důsledku učení u Aplysie

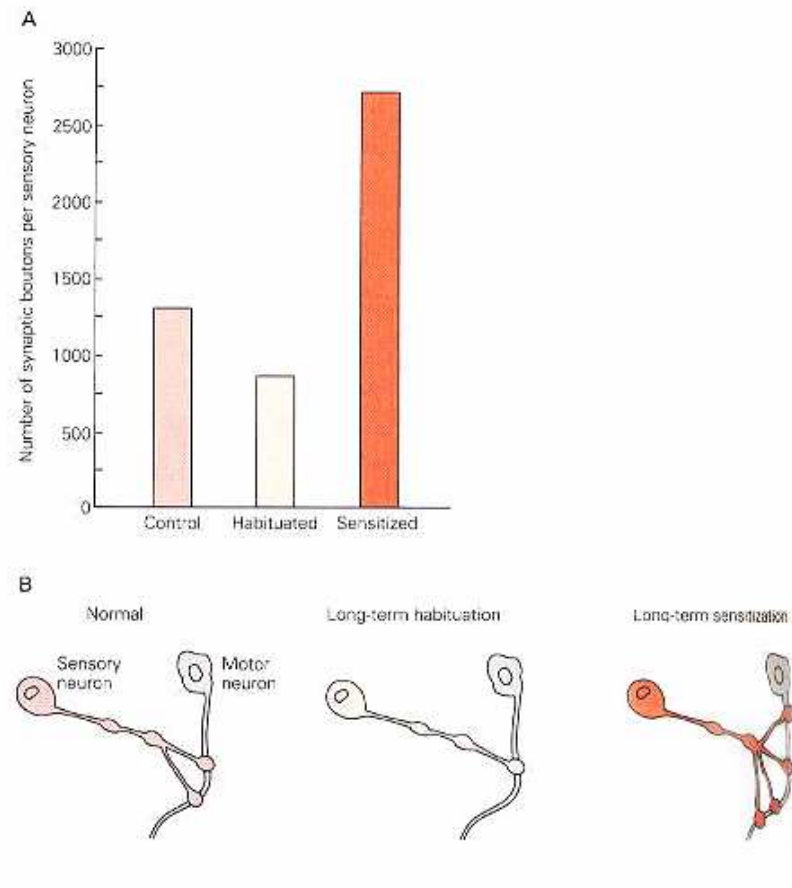
E. Kandel se svým týmem zjistil, že v důsledku dlouhodobé habituace (opakovanou taktilní stimulací) nebo senzitivace (opakovaným šokováním do ocásku), dochází u zeje ke změně **počtu synaptických spojení** – v důsledku toho i ke změně účinnosti synaptického přenosu  
= jeden z příkladů SYNAPTICKÉ PLASTICITY

Avšak zvýšení počtu synapsí je pouze jeden z mechanismů...

Zajímavost: Před časem bylo u Aplysie popsáno také operantní podmiňování (*Hawkins, R.D., Clark, G.A., & Kandel, E.R. (2006). Operant Conditioning of Gill Withdrawal in Aplysia. The Journal of Neuroscience, 26, 2443-2448.*)

Pokud Aplysie povolila žábry po určitou hranici, byla „potrestána“ mírným šokem do ocásku. Zvířata se tedy naučila operantně žábry zatahovat, aby tomuto potrestání vyhnula

Vzhledem k tomu, že neurony inervující struktury, které se tohoto chování účastní, jsou již identifikovány, mohlo by to otevřít cestu ke studiu



## Synaptická plasticita u savců

- **Synaptická plasticita** je pozorovatelná samozřejmě i u vyšších obratlovců, a dlouho se předpokládalo, že by mohla být podkladem uchovávání paměťových stop.
- Dlouhodobá potenciace a dlouhodobá deprese – LTP a LTD – horcí kandidáti na neurální substrát učení a paměti



# Dlouhodobá potenciace (*long-term potentiation*; LTP)



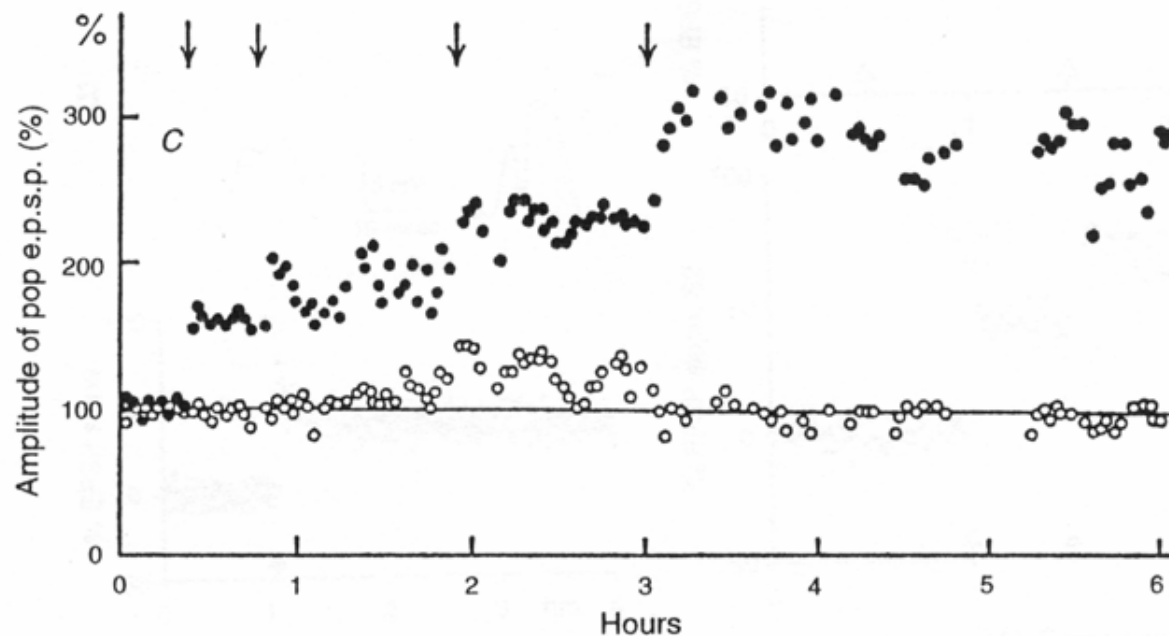
Tim Bliss



Terje Lomo

Dlouhodobé zvýšení synaptických odpovědí post synaptického neuronu (=amplitudy EPSP) po tetanickém dráždění presynaptické terminály. Někdy se vykládá jako zesílení komunikace mezi presynaptickým a postsynaptickým neuronem, na základě aktivace obou těchto neuronů.

LTP popsána poprvé v r. 1973 v hipokampu anestetikovaného králíka – dlouhodobé zvýšení EPSP po tetanickém dráždění



Později popsána i u volně pohyblivých zvířat, včetně potkanů a myší

Obecně se LTP dělí na časnou (E-LTP) a pozdní fázi (L-LTP).

E-LTP nezávisí na proteosyntéze, pozdní vyžaduje tvorbu nových bílkovin.

Lákavé přirovnání

E-LTP ~ krátkodobá paměť

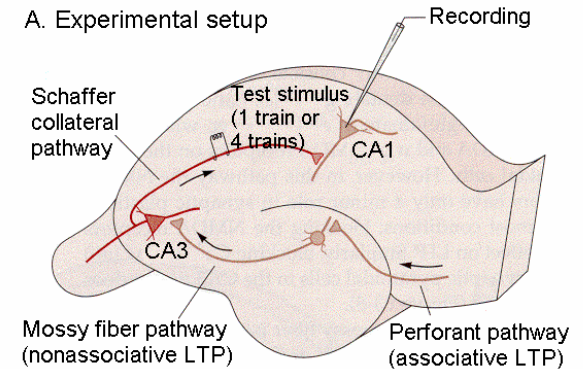
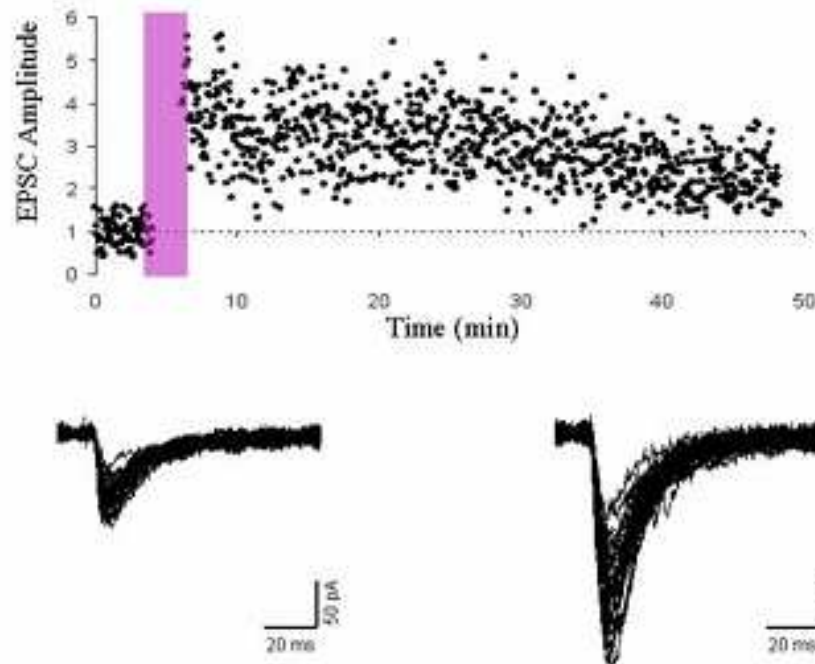
L-LTP ~ dlouhodobá paměť

Není to tak jednoznačné

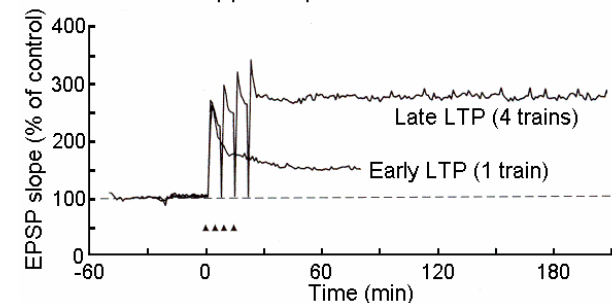
Bliss and Lomo (1973) *J. Physiol.* 232: 331-356  
LTP poprvé popsána v gyrus dentatus králíka

# Dlouhodobá potenciace

*Long Term Potentiation, a mechanisms for memory formation*



B. LTP in the hippocampus CA1 area



- **Časná fáze – nezávislá na proteosyntéze**
  - Induction phase
  - Maintenance phase
- **Pozdní fáze – závisí na syntéze nových bílkovin a remodelaci synapse.**
  - Induction



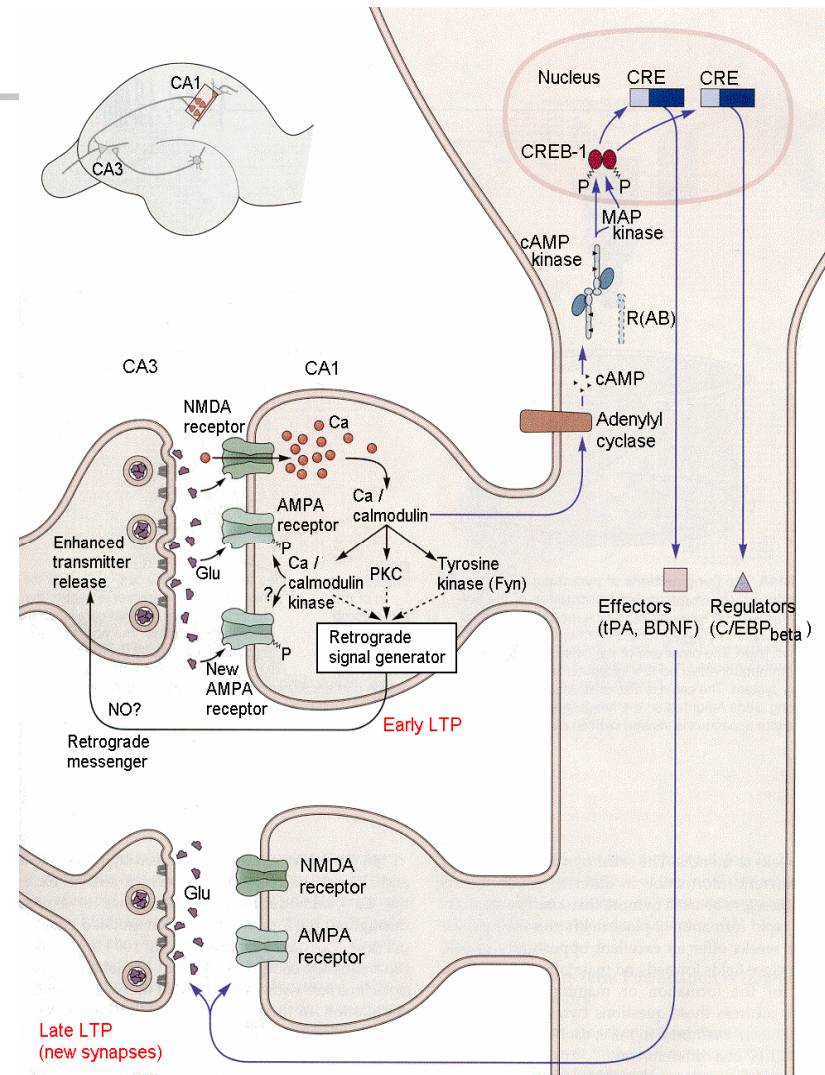
# Mechanismy časně a pozdní fáze LTP

- **Indukce časně fáze** – zvýšená aktivace AMPA receptorů – depolarizace – odblokování NMDA receptorů – vtok  $\text{Ca}^{2+}$  - Ca-calmodulin kináza II – PKC – MAPkináza (MAPK), ale i paralelní aktivace adenylylcyklázy – tvorba cAMP – aktivace PKA

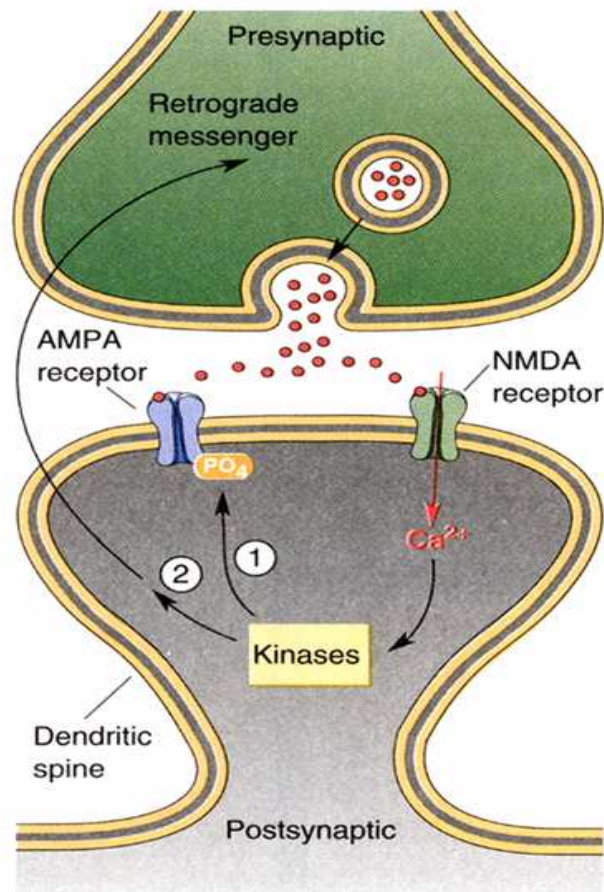
- **Udržování časně** - CMKII a PKC ztrácí závislost na vápníku – perzistentní aktivita > fosforylace AMPA receptorů, inserce AMPA receptorů (**bez proteosyntézy**)

- **Indukce pozdní** – MAPK (ERK) vykazuje prezistentní aktivitu

- **Udržování pozdní** – ERK fosforyluje řady cytosolických a jaderných molekul, které nakonec vedou k syntéze specifických proteinů, které udržují late-LTP, především PKM $\zeta$



## Exprese pozdní LTP – udržovací fáze



Mnoho signálních kaskád (CaMKII, PKC) může konvergovat aktivací *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Ta je patrně spojovacím článkem mezi časnou a pozdní LTP.

ERK fosforyluje řadu proteinů a signálních molekul (jak cytoplazmatických, tak jaderných), včetně transkripčních faktorů.

Klíčovou molekulou pro udržovací fázi pozdní LTP je proteinkináza Mzeta (PKM $\zeta$ )

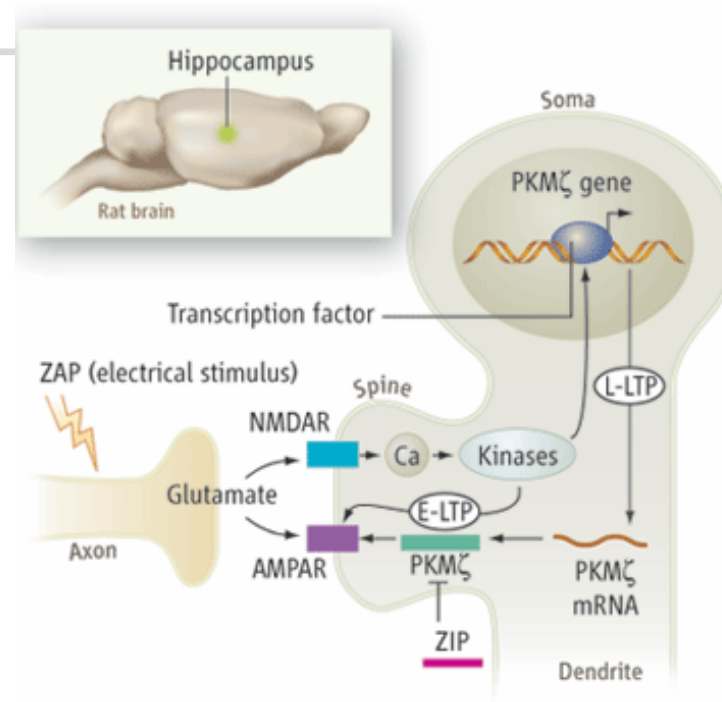
Je to atypická izoforma PKC, která postrádá regulační podjednotku a je trvale aktivní.

Tato molekula je syntetizována a je nezbytnou a dostačující podmínkou pro L-LTP.

Zároveň je tato molekula substrátem

## Udržovací fáze pozdní LTP – *hot spot* současné neurochemie paměti

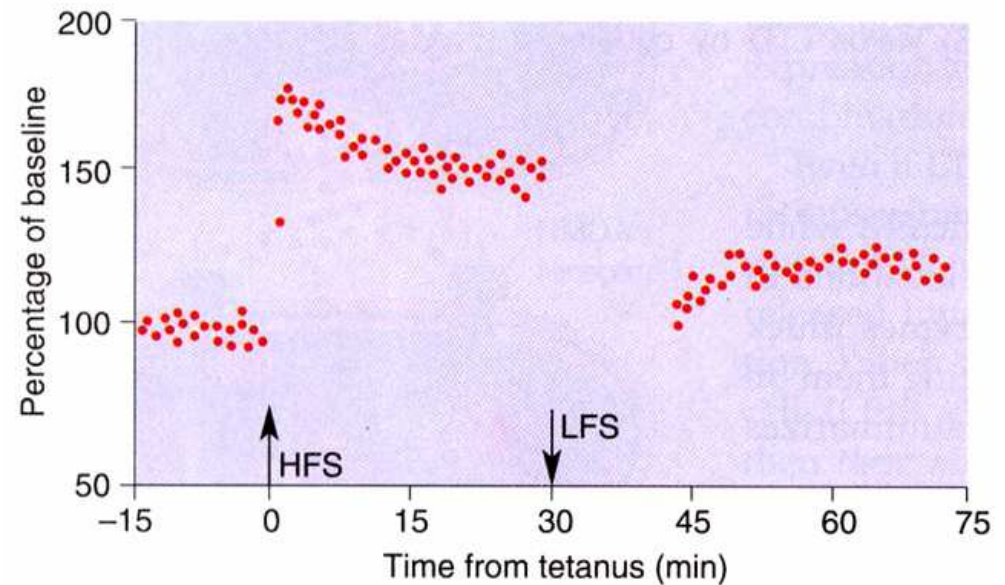
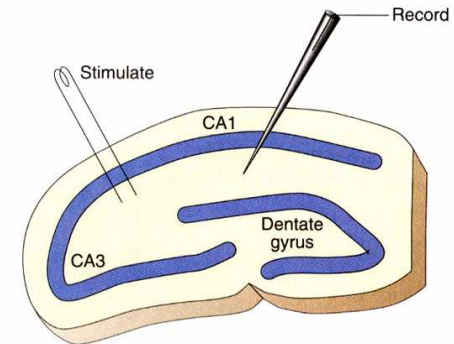
- Během udržovací fáze dochází přes kinázy a transkripční faktory k syntéze PKM $\zeta$  (zeta), což je podtyp PKC, která je po své syntéze konstitutivně aktivní a reguluje *trafficking* a syntézu AMPA receptorů, reorganizaci synaptických proteinů a remodelaci synapse.
- Patrně i jiné kinázy, ale ty nejsou příliš prozkoumány a nedávná studie navíc ukázala, že syntéza PKM $\zeta$  je „nutnou ale dostatečnou“ podmínkou udržení pozdní LTP.
- Z výše uvedeného vyplývá, že v indukci a udržování časné LTP a v indukci pozdní LTP hraje roli mnoho regulačních kináz, ale na PKM $\zeta$  se patrně signál sbíhá



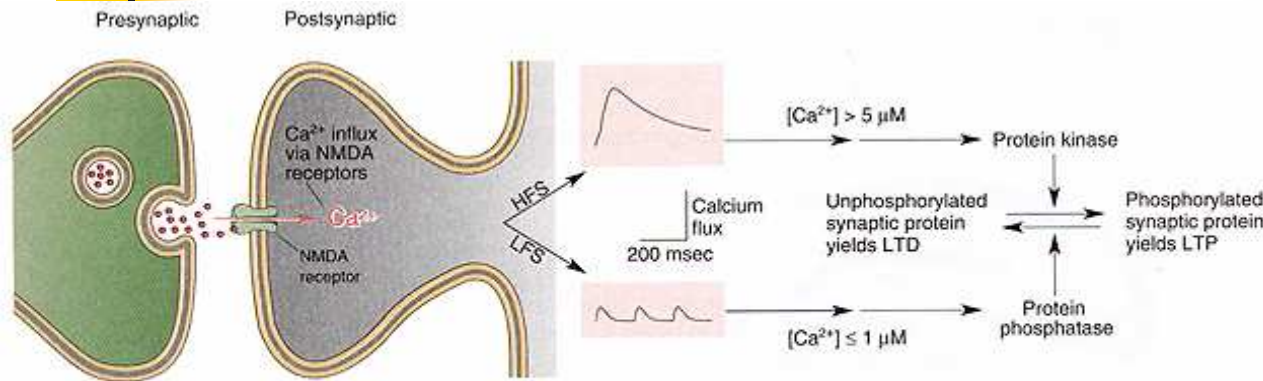
- Nicméně, během pozdní LTP dochází také ke komunikaci s presynaptickým zakončením, neboť bylo prokázáno, že se zvyšuje zásoba synaptických váčků v terminále a dochází k dalším změnám na presynaptických proteinech, měla by tedy existovat retrográdní signalizace (uvažuje se o NO, nebo proteinech extracelulární matrix – viz biologie buňky)

# Dlouhodobá deprese (*long-term depression*) - LTD

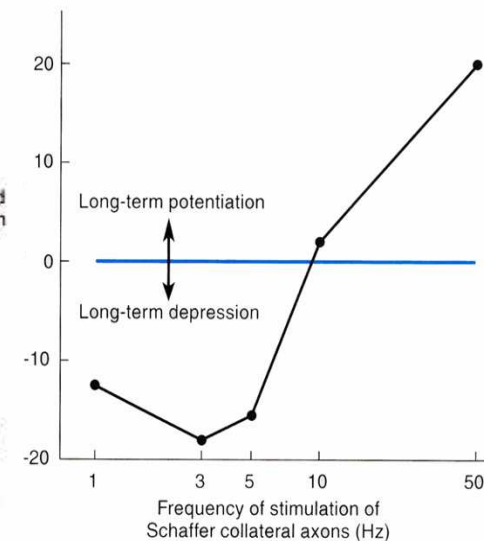
- Opak dlouhodobé potenciace, jde o dlouhodobé snížení účinnosti synaptického přenosu následkem repetitivní stimulace presynaptických vstupů
- Je to vlastně protějšek LTP, z fyziologického hlediska se zdá být intuitivně nezbytný („what goes up, must go down“)
- Vyskytuje se např v hipokampu (nízkofrekvenční stimulace) nebo v Purkyňových buňkách mozečku (silná stimulace)



# Dlouhodobá deprese (*long-term depression*) - LTD



A model for how Ca<sup>2+</sup> can trigger both LTP and LTD in the hippocampus. High-frequency stimulation (HFS) yields LTP by causing a large elevation of [Ca<sup>2+</sup>]. Low-frequency stimulation (LFS) yields LTD by causing a smaller elevation of [Ca<sup>2+</sup>]. (Source: Adapted from Bear and Malenka, 1994, Fig. 1.)



LTD je podmíněna zpravidla aktivací NMDA receptorů (ne vždy), ale o nižší hodnotě, a zvýšením intracelulárního vápníku, avšak na nižší hladinu, než jaká je pozorována u LTP.

Někdy se LTD mohou účastnit také metabotropní glutamátové receptory (mGluR), popř snad i kanabinoidní receptory (také spřažené s G-proteinem)

Indukce LTD zahrnuje aktivaci fosfatáz (defosforylující enzymy), které následně sníží citlivost glutamátových receptorů a tím redukují postsynaptickou odpověď na neuropřenašeč.

Může zahrnovat také internalizaci AMPA receptorů z postsynaptické membrány do intracelulárních kompartmentů.

Na synapsích Schafferových kolaterál (spojení hipokampálních oblastí CA3 a CA1) lze vyvolat LTP i LTD tetanickým drážděním, klíčovým faktorem pro to, který fenomén bude indukován, je frekvence dráždění (viz obrázek).

Nízkofrekvenční stimulace vede ke vzniku LTD.

LTD je odlišná od tzv. synaptické depotenciace, což je de facto návrat LTP na klidovou hladinu. V mozečku se LTD účastní motorického učení.

# Studium vztahu LTP a učení/paměti

Je tedy LTP (popř LTD – méně studovaná) skutečně podkladem učení a paměti?

Zkušenost → Změna synaptické účinnosti (přirozená plasticita) → Paměť

Tetanizace → Změna účinnosti synaptického přenosu (LTP) → Zvýšení evokované odpovědi (EPSP)

**Typy studií zabývajících se vztahem LTP - paměť:**

- **Vliv učení na synaptickou sílu a LTP**
- **Vliv dlouhodobé tetanizace (saturace LTP) na učení**
- **Vliv manipulace (např.blokády) synaptické plasticity na učení paměť**

# Blokáda LTP ovlivňuje učení

The Journal of Neuroscience, September 1989, 9(9): 3040-3057

## Synaptic Plasticity and Learning: Selective Impairment of Learning in Rats and Blockade of Long-Term Potentiation *in vivo* by the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist AP5

R. G. M. Morris

Department of Pharmacology, University of Edinburgh Medical School, Edinburgh EH8 9JZ, Scotland

The Journal of Neuroscience, September 1989, 9(9) 3043

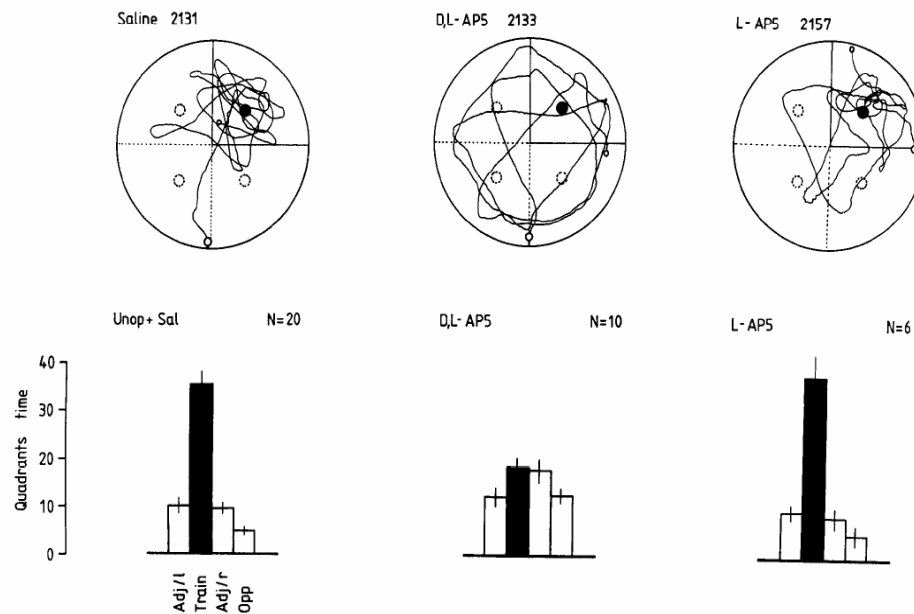


Figure 3. Experiment 1. *Top row*, Swimming path taken during the transfer test of day 9 by the rat closest to the mean in the control (unoperated and saline rats), D,L-AP5, and L-AP5 groups, respectively. Note the absence of spatial bias of the D,L-AP5 rat. *Bottom row*, Group mean times (sec ± 1 SEM) spent in each of the 4 quadrants of the pool, organized with respect to proximity to the training quadrant (NE or SW). Note the substantial spatial bias in the control and L-AP5 groups.

Studie R. Morrise a kolegů ukázala, že po aplikaci antagonisty NMDA receptorů, látky D,L-AP5, došlo jak k zablokování indukce LTP tak nechopnosti učení ve vodním bludišti

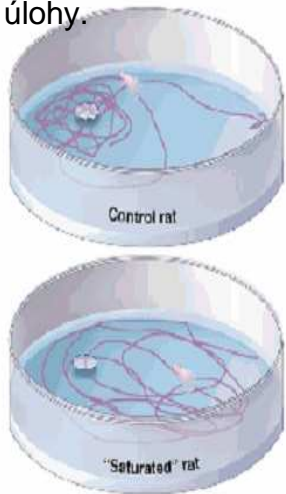
Vidíte, že potkani, jimž byl aplikován D,L-AP5 hledali během *probe trialu* ostrůvek víceméně náhodně, na rozdíl od situace po aplikaci L-AP5 – neaktivní izomer.

Blokáda učení pomocí AP5 však nemusel znamenat kauzální vztah mezi LTP a učením; je možné, že pouze dochází k zablokování nějakých společných mechanismů, popř jinému mechanismu.

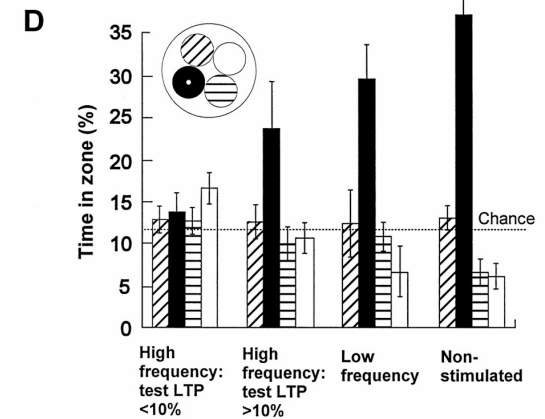
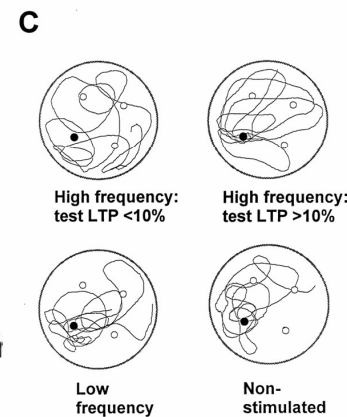
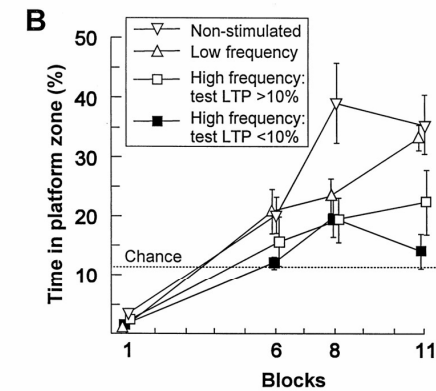
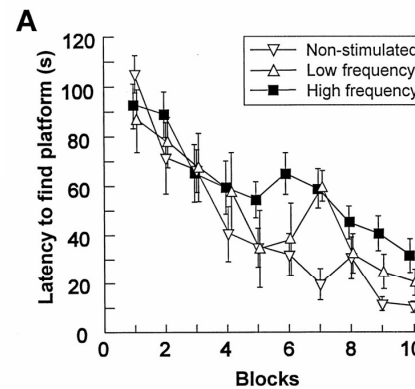
# Saturace LTP poškozuje učení

Původní studie Mosera et al. ukázala, že pokud byli potkani tetanizováni na většině synapsí v hipokampu, tzn. došlo k saturaci LTP, poškodilo to učení a paměť.

To naznačuje vztah mezi LTP a učním. Je tu však velké ALE. Tito potkani nebyli před saturací LTP obeznámeni s pravidly úlohy.



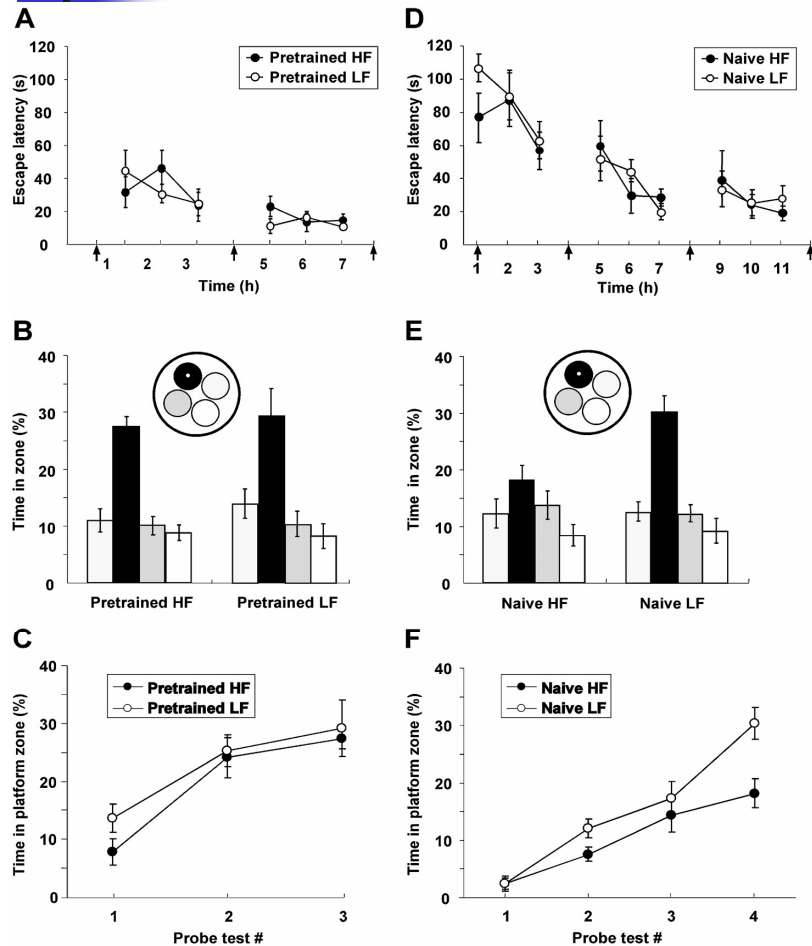
Swim paths of rats in a water maze. Well-trained control rats swim mostly over the region of the pool where the submerged platform (square at left) was located during training. "Saturated" rats, in which LTP in the dentate gyrus is saturated before training, swim randomly, showing no memory of the platform's location. Rats in which the saturation procedure failed behave like control rats.





# Intaktní předtrénování pravidlům úlohy odstraní negativní vliv saturace LTP na učení

The Journal of Neuroscience, 1999, Vol. 19 RC49 1 of 5



## Pretraining Prevents Spatial Learning Impairment after Saturation of Hippocampal Long-Term Potentiation

Mona Kolstø Otnæss, Vegard Heimly Brun, May-Britt Moser, and Edvard I. Moser

Department of Psychology, Norwegian University of Science and Technology, 7491 Trondheim, Norway

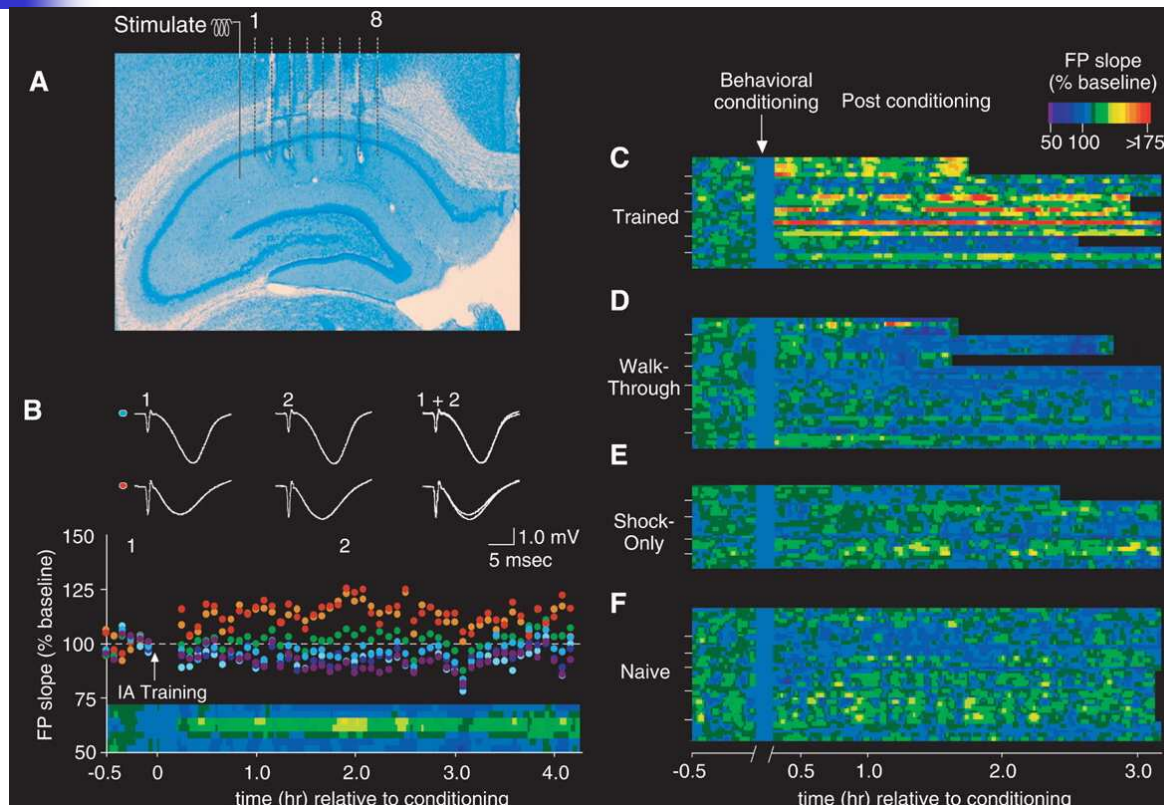
Pokud zvířata podstoupí před saturací LTP tzv. NSP (*non-spatial pretraining*; neprostorové předtrénování), deficit vzniklý saturací LTP vymizí.

Indukce LTP tedy v tomto případě spíše zodpovídá za procedurální aspekt úlohy – to je právě ten, který si zvířata osvojí během NSP

NSP zpravidla realizováno tréninkem potkanů v bazénu bez orientačních bodů (záclona), přičemž poloha ostrůvku se náhodně mění.

Zvířata se tedy naučí pravidla úlohy, tzn. že je třeba hledat ostrůvek, že thigmotaxe nikam nevede, pouze se nenaučí, KDE ostrůvek je.

# Dochází při učení skutečně k indukci LTP?



Whitlock a jeho kolegové trénovali potkany v úloze pasivního vyhýbání (inhibitory avoidance) a zjistili, že u některých synapsí dochází vlivem učení k indukci LTP

U mnoha z měřených neuronů však LTP indukována není.

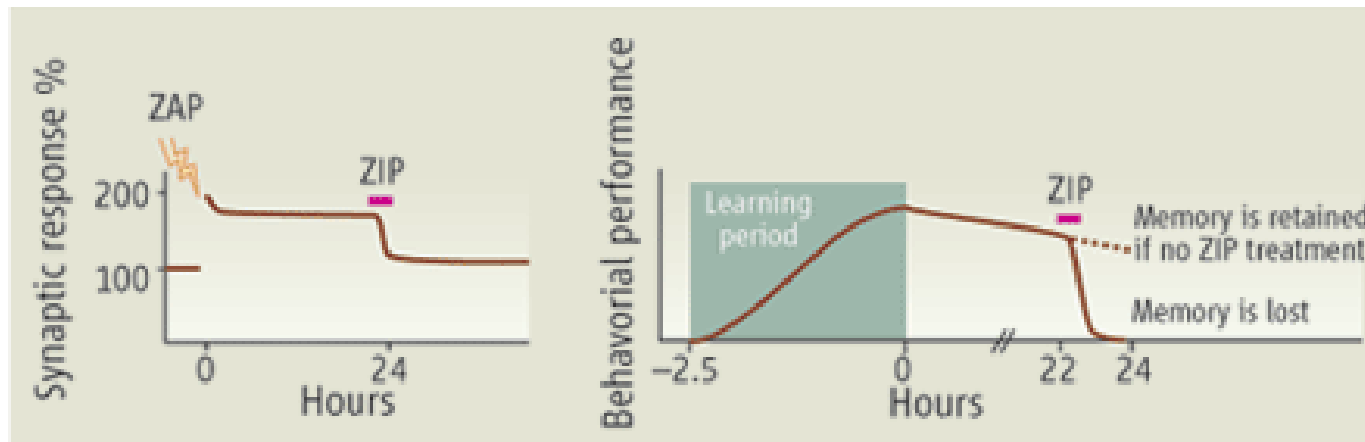
Je to rovněž podpůrným důkazem pro „distributed memory encoding“

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF.

**Learning induces long-term potentiation in the hippocampus.** *Science*. 2006; 313(5790):1093-7

# Lze LTP u učení selektivně farmakologicky zablokovat?

Inhibice PKM $\zeta$  vede k vymizení LTP a k vymazání již ustavené dlouhodobé paměťové stopy



Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 2006;313(5790):1141-4

Specifický blokátor PKM $\zeta$  byl aplikován do hipokampu a zablokoval jak pozdní LTP, tak vybavení naučené informace **avšak neovlivní nové učení, tzn. že PKM  $\zeta$  nehraje patrně roli v indukcí časné LTP**

**Prokázáno bylo, že syntéza PKM $\zeta$  je nezbytnou a dostačující podmínkou pro udržovací fázi pozdní LTP**



## LTP a učení

---

- Je LTP indukována také jinými typy učení než pasivním vyhýbáním?
- Maže inhibice PKM $\zeta$  pomocí peptidu ZIP také jiné druhy paměti než place avoidance, což je kognitivní úloha vysoce závislá na hipokampu?
- Je toto vymazání paměti patrné i v jiných strukturách v mozku než je hipokampus?
  - Některé určitě, např. chuťovou averzi v inzulárním kortexu, viz: Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. *Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. Science*; 317(5840):951-3
  - Velmi nedávno bylo prokázáno, že u řady typů paměti tento mechanismus funguje, konkrétně pro prostorovou, operantní paměť a klasické podmiňování
    - Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JC, Sacktor TC, Fenton AA. *PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. PLoS Biol.* 2008 Dec 23;6(12):2698-706.

**Zdá se že minimálně u některých typů paměti je jejím neurálním mechanismem LTP a další změny synaptické účinnosti.**



# Lateralizace paměťové stopy

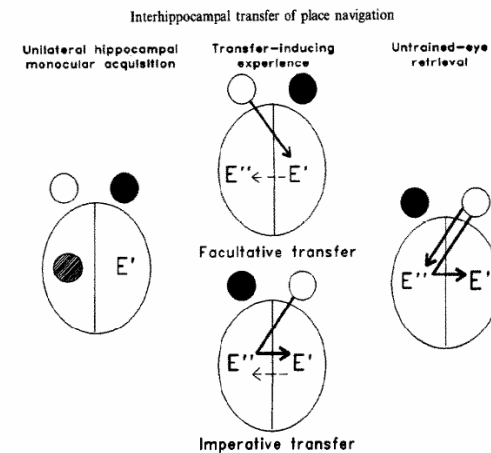
---

- Lateralizace má obecně více významů:
- Může se jednat o rozdíly mezi jednotlivými polovinami jednotlivých bilaterálních mozkových struktur (např. mírně rozdílný objem pravého a levého hipokampu, měřený volumetricky (např. u lidí i u potkanů – zajímavostí je, že albinotičtí potkani Wistar jsou v hipokampu lateralizováni podobně jako člověk, zatímco pigmentovaná zvířata z kmene Long-Evans jsou hipokampálně lateralizována opačně).
- Další význam tohoto pojmu – lateralizace určité funkce (často u lidí) – např. pomocí fMRI bylo zjištěno, že při určitých mentálních úlohách se aktivuje jedna strana mozku více než druhá (PFC, hipokampus) – implikuje, že funkce „sídlí“ ve větší míře v jedné z polovin – lateralita funkce
- V experimentální rovině – např. potkani trénováni naučit se MWM, kterým byl každý den před tréninkem „vypnut“ jeden z hipokampů pomocí TTX (+ zakrytí opačného oka), naučí se také úlohu – říká se, že paměťová stopa byla lateralizována do jednoho hipokampu – tento typ lateralizace je poměrně málo studován – Bureš a Fenton, 90.léta v naší laboratoři
  - Tento typ lateralizace lze snadno detekovat pomocí testu vybavení, kdy „vypneme“ natrénovanou hemisféru a zvířeti pak zbývá k navigaci pouze hemisféra neivní – vybavení bylo skutečně poškozeno

Takto lateralizovaná paměťová stopa může podstupovat nejrůznější modifikace, např. interhemisferální transfer nebo interhemisferální syntézu.

# Interhemisferální transfer paměťové stopy

- Bureš a Fenton ukázali, že kromě lateralizace může u této stopy docházet také ke spontánnímu či nucenému přesunu paměťové stopy z jedné natrénované hemisféry do druhé.
- Spontánní transfer je vyvolán zpravidla krátkou expozicí prostředí s oběma hemisférami intaktními
- Nucený transfer je vyvolán ponecháním obou hemisfér intaktních a odkrytím obou očí



489

Fig. 5. Summary diagram indicating the dynamics of the process of interhemispheric transfer at the level of the hippocampus and visual cortex. A primary engram ( $E'$ ) is formed in the intact hemisphere during unilateral inactivation of the hippocampus and visual cortex. This engram remains lateralized until intact brain experience in the training context (transfer-inducing experience) causes a copy of the primary engram to be created in the naive hemisphere ( $E''$ ). Untrained-eye retrieval with intact brain potentially utilizes both direct read-out of the secondary engram and trans-commissural read-out of the primary trace. Untrained-eye read-out of the secondary engram under blockade of the trained hippocampus and visual

## Interhipokampální syntéza lateralizovaných engramů

Fenton a spol. ukázali, že je možné každou hemisféru natrénovat na 2 orientační body (použili celkem pouze 4 orientační body, ABCD).

Levá AB, pravá CD, posléze testovali úspěšnost s oběma hemisférami intaktními

Výkonnost AB (stejně jako při osvojení) > pouze AC (syntéza – stále vysoko nad hranicí náhody) > AE (s novým, neznámým orientačním bodem; na hranici náhody)

Tento typ experimentů vyžaduje precizní kontrolu orientačních bodů, Fenton a spol tento pokus prováděli v MWM ve tmě, body ABCD byly pouze svítící obrazce.

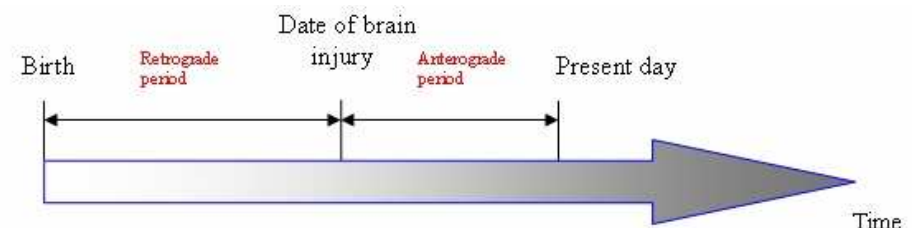
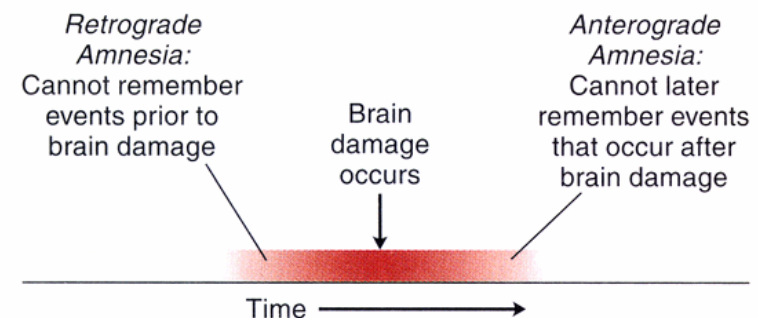
Fenton AA, Arolfo MP, Nerad L, Bures J. Interhippocampal synthesis of lateralized place navigation engrams.

Hippocampus, 1995

# Patofyziologie paměti

- Amnézie, hypermnézie (Solomon Šereševskij- neuropsycholog A. Lurija)
- Amnézie – retrográdní, anterográdní – nemusí být absolutní, mohou být gradované
- Například pacient H.M. (s resekcí MTL včetně hipokampu) trpí anterográdní amnézií a časově gradovanou retrográdní amnézií – nepamatuje si události těsně před operací, ale velmi staré vzpomínky zachovány.

## ► A Schematic Definition of Retrograde Amnesia and Anterograde Amnesia



# Prefrontální kůra (PFC) jako struktura klíčová pro pracovní paměť

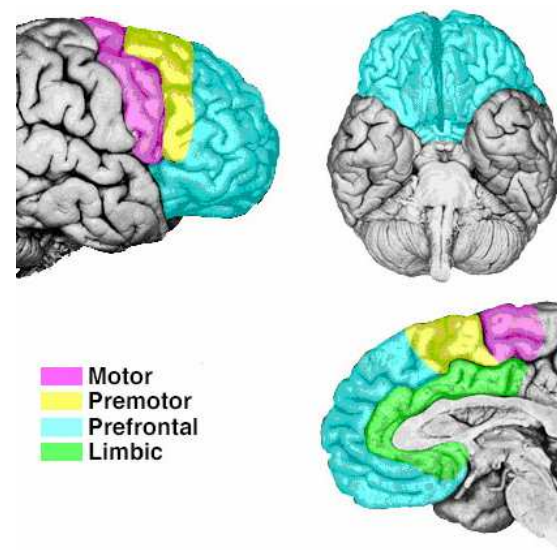
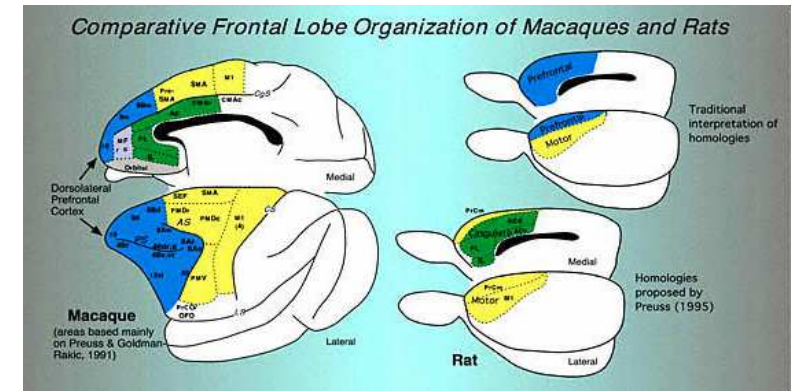
U zvířat vyjma primátů je prefrontální oblast spíše menší a její homologie s PFC u primátů je předmětem debat

Nicméně i laboratorní hlodavci mají krátkodobou paměť a funkční PFC.

Pro fungování pracovní paměti jsou důležité zejména dopaminergní, noradrenergní a glutamatergní dráhy v PFC a její spojení se středním mozkem a ostatními korovými oblastmi

PFC důležitá také pro orientovanou pozornost, flexibilitu, role v sociálním chování, rozhodování, role v chování v závislosti na odměně

Exekutivní funkce (plánování, online kontrola vykonávaných činností apod.) .tyto funkce jsou v jisté míře přítomné i u zvířat





# Léze prefrontální kůry u zvířat a u primátů

## u primátů:

- poškození pracovní paměti (dorzolaterální PFC)
- narušení selektivní pozornosti (mediální PFC)
- deficity v monitorování a plánování behaviorálních akcí
- hyperkineze, poškození některých sensorických vjemů (čich, chuť)
- disinhibice motorických odpovědí (orbitofrontální PFC).
- dochází také k narušení kódování pohybů a snížení vnímání bolesti (přední cingulární kůra)

## u hlodavců (především potkanů)

- deficity ve vizuální pracovní paměti (mPFC)
- formování behaviorální strategie
- spatial reversal learning*
- poškození habituace, pozornosti, hyperaktivita (OFC)
- narušené sociální chování (OFC)
- deficit operantní pracovní paměti, čichová pracovní paměť, a konzumace potravy (OFC)

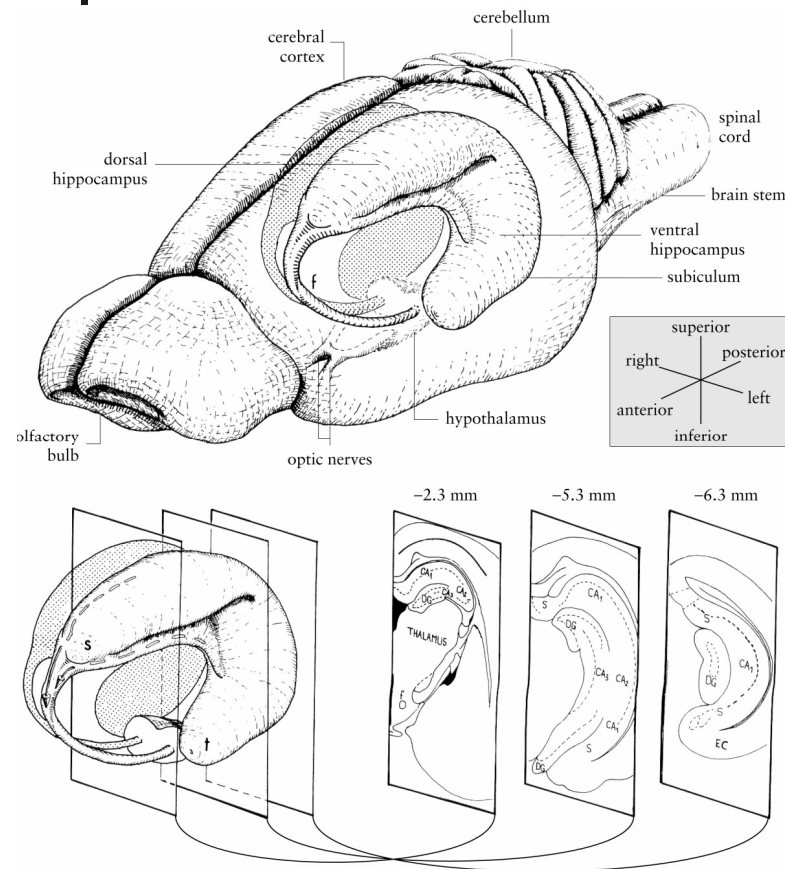


Klasický příklad, pacient Phineas Gage, bilaterální poškození PFC kovovou tyčkou (1948). -dlouhodobá paměť, řeč a motorické funkce zachovány, ale narušení jeho osobnosti – cholerický, netrpělivý, impulzivní, neschopný plánovat

U dalších pacientů s poškozením PFC patrná tendence k chování bez ohledu na dlouhodobé následky, + další změny, deficity pozornosti, pracovní paměti, neschopnost plánování, perseverace ale i koprolalie. Funkce PFC je patrně narušena na úrovni neuropřenaševých systémů i u schizofrenie, bipolární poruchy, ADHD a dalších

# Hipokampus

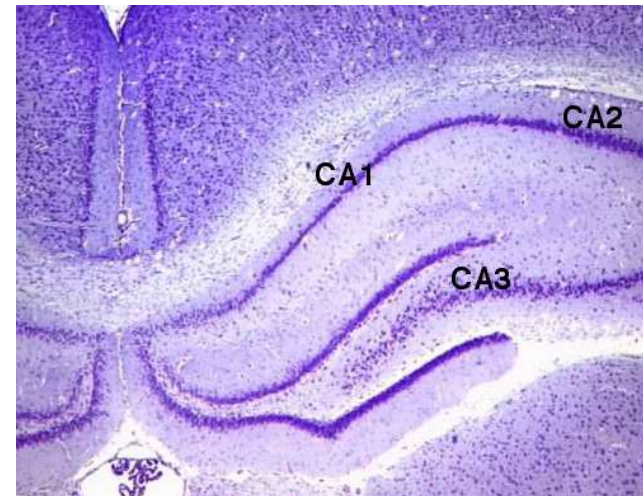
- klíčová struktura pro prostorovou paměť u zvířat a deklarativní paměť u lidí



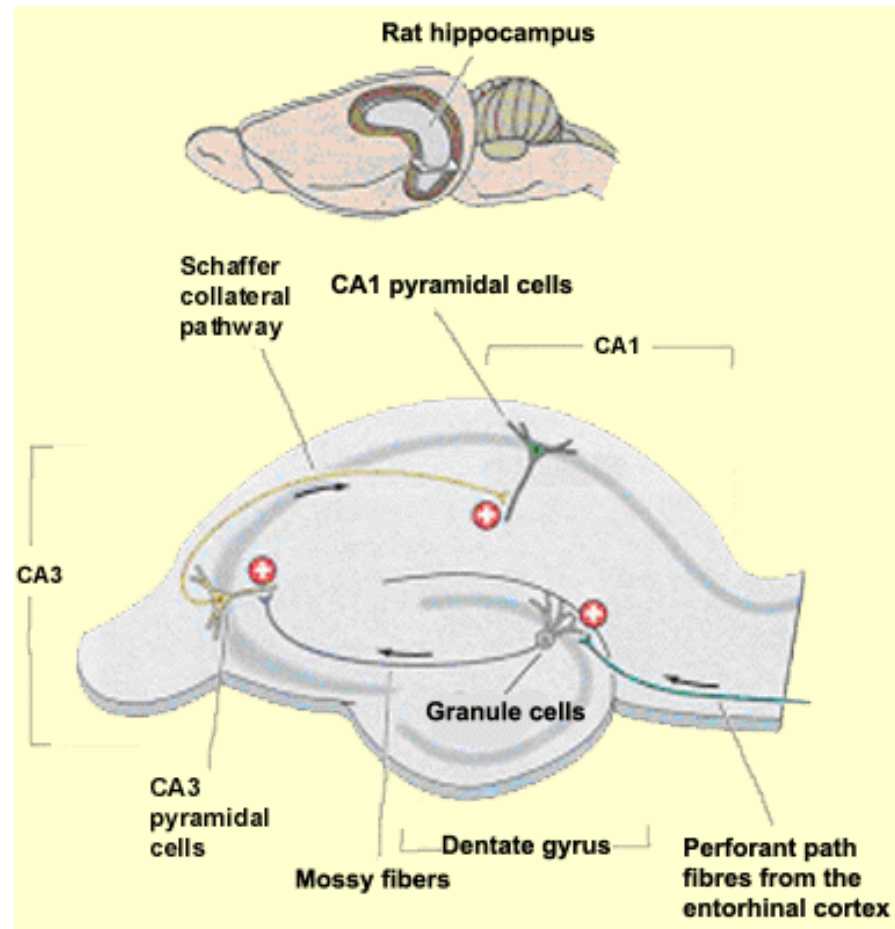
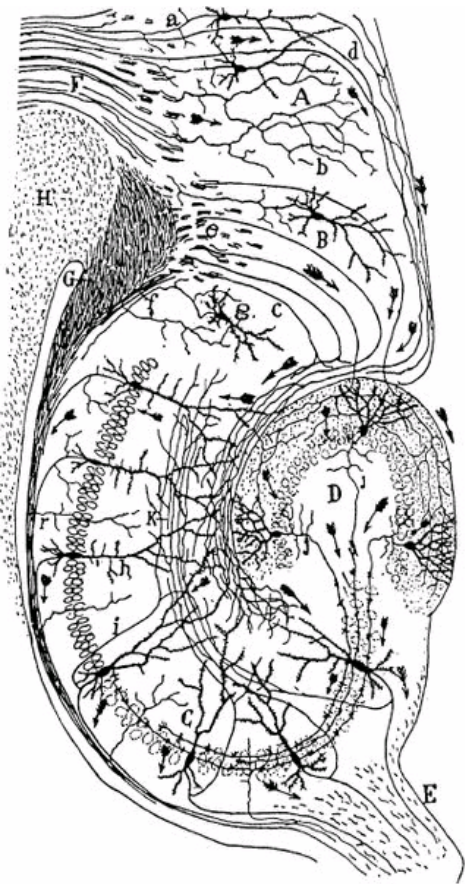
Strukturně jednodušší mozek

Absence rýhování hemisfér koncového mozku,  
Poměrně značnou část potkaního mozku zabírají  
hipokampus a čichové laloky

Hipokampus inervován především z mediálního septa (Ach,  
GABA) a entorhinální kůry (Glu)



# Hipokampus a jeho hlavní nervové dráhy

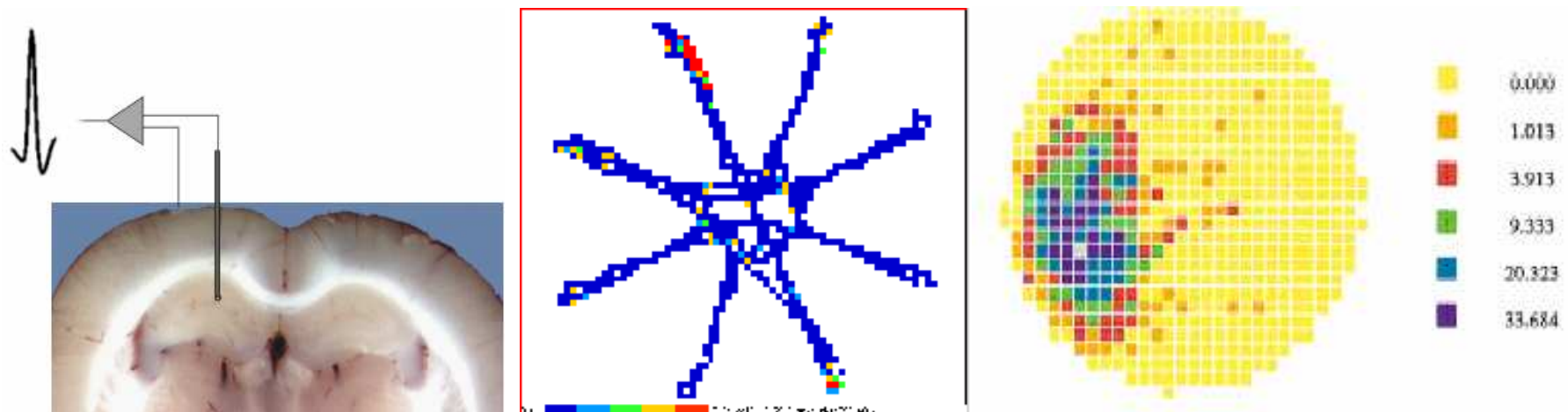
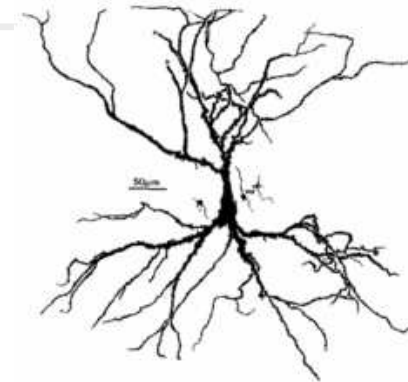


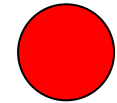
Santiago Ramón y Cajal.  
Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes,  
Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris. 1911.

# Hipokampus a místové neurony

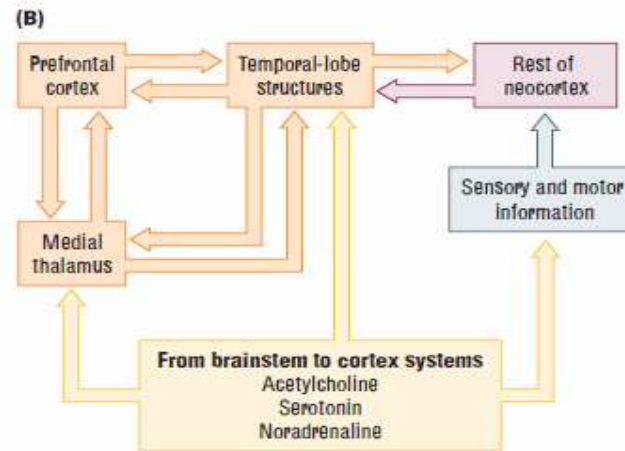
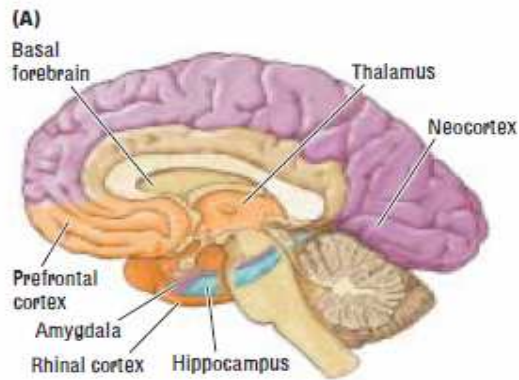
Pyramidové neurony v CA1, CA3 a DG oblastech hipokampu,  
V DG také granulární a košíčkové buňky  
(O'Keefe and Dostrovsky, 1971)

Nahrávají *in vivo* extracelulárně  
vykazují prostorově specifickou aktivitu





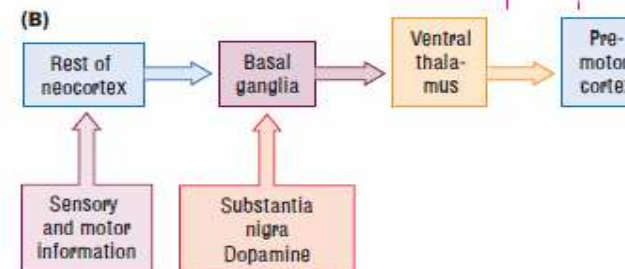
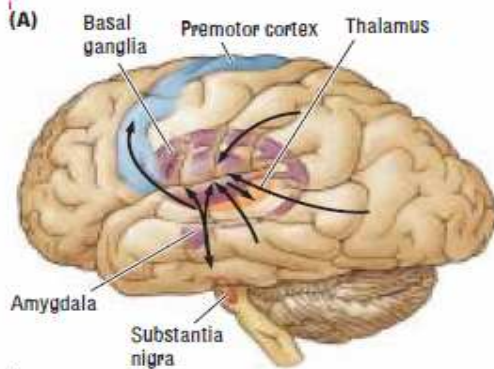
# Deklarativní a nedeklarativní paměť



**Figure 13-14**

### Neural Circuit Proposed for Explicit Memory

(A) General neuroanatomical areas controlling explicit memory. (B) Circuit diagram showing the flow of information, beginning with inputs from the sensory and motor systems, which are not considered part of the memory circuit.



**Figure 13-15**

### Unidirectional Neural Circuit Proposed for Implicit Memory

(A) General anatomical areas controlling implicit memory. (B) Circuit diagram showing the unidirectional flow of information, beginning with inputs from the sensory and motor systems, which are not considered part of the memory circuit.

# Metodické přístupy ke studiu paměti a chování u zvířat



Na učení, paměť a související fenomény je velmi užitečné nahlížet jako na změny chování získané zkušeností.

Učení a paměť lze studovat i v přirozených podmínkách, ale často se využívá experimentálních přístupů, tedy paměťových úloh.

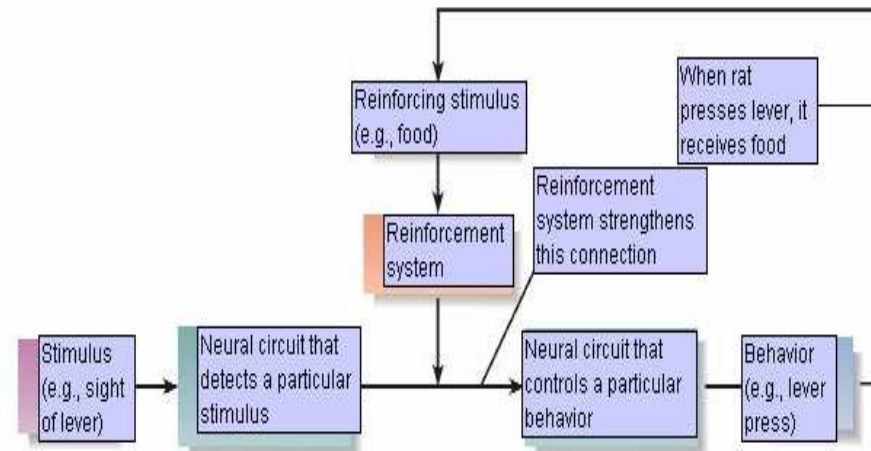
# Učení a paměť (a obecně chování) zvířat

- Řízeno a regulováno řadou mechanismů, z nichž některé jsou vrozené (např. reflexní chování nebo instinkty) a některé získané různými formami učení
- Tyto formy učení zpravidla vyžadují vrozené predispozice k jejich osvojení (angl. *prewiring*, jakýsi substrát pro toto učení)
- Některé získané vzorce chování jsou osvojeny již v rané ontogenezi (např. *imprinting*), jiné mohou být naučeny kdykoliv v průběhu života jedince
  - Příklad: imprinting u husí (zpopularizoval K. Lorenz, ale pozorován již v 19. století amatérským biologem Spaldingem)



# Učení a paměť jako změny chování

- Na systémové úrovni u zvířat jsou to právě změny v jejich chování, které jsou pozorovatelné jako doklad učení a paměti.
- Zvířata jsou schopna změnit svoje chování po opakované expozici podnětu nebo kontextu
- Podkladem těchto změn chování jsou změny funkce nervového systému, a ty zase mají svůj základ ve změnách účinnosti přenosu mezi nervovými buňkami
  - synaptická plasticita jako základ učení a paměti







# Základní okruhy chování studované v laboratorních podmínkách

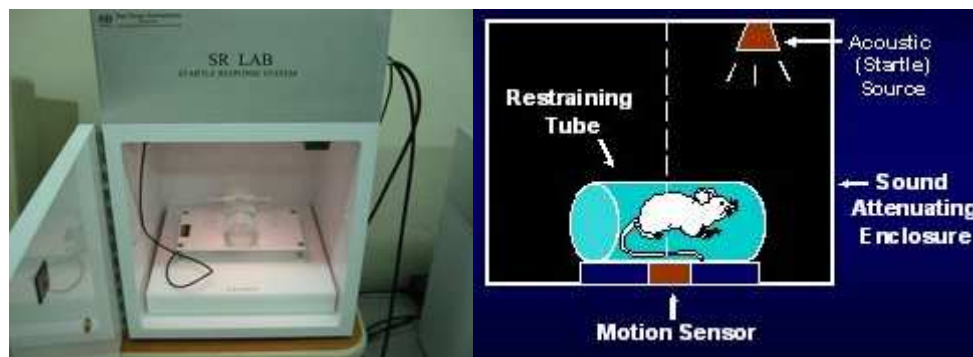
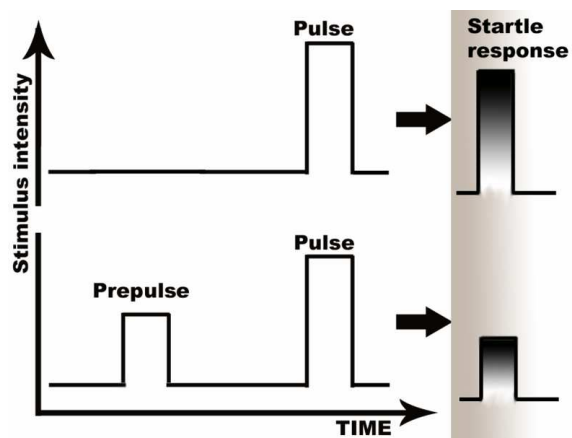
---

- **Senzorimotorické zpracování** (*sensorimotor gating*) – jedná se převážně o reflexy a jejich modifikace
- **Spontánní aktivita**, především lokomoce a explorace
- **Emocionalita**, především anxieta (úzkost)
- **Učení a paměť** – řada podtypů
- Sociální chování a interakce

Všechny tyto přístupy jsou zpravidla kombinovány s operačními, farmakologickými, genetickými, elektrofyziologickými a jinými technikami za účelem testování konkrétní hypotéz, např. týkajících se vztahu chování a jednotkové aktivity neuronů, popř. genetického či neuropřenašedového základu chování.

# Senzorimotorické zpracování – test prepulzní inhibice úlekové reakce

- Testováno především pomocí prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI)
- Je to neurologický fenomén, kde slabší prestimul zeslabuje úlekovou odpověď na následný silný podnět.
- Zpravidla se používá zvukový podnět, ale funguje i s taktilním či světelným
- Vyjadřuje jistou schopnost adaptace na stimul v přítomnosti prestimulu, její deficit dá se interpretovat jako neschopnost filtrovat neinformativní, irrelevantní podněty



Test PPI – znázornění aparatury

Samotná úleková odpověď na stimulus, bez přítomnosti prestimulu je reflexní, vyjadřuje celkovou aktivaci organismu – tato úleková reakce je zvýšena např. u PTSD



# Senzorimotorické zpracování – test prepulzní inhibice úlekové reakce

---

Interval mezi prepulzem a pulzem je 30-480 ms, při delším intervalu nad 500 ms dochází někdy k tzv. prepulzní facilitaci (PPF); zvýšení odpovědi na stimul.... ta patrně odráží zvýšení pozornosti

Jako stimul se často používá krátká salva bílého šumu (white noise)

Inhibice úlekové reakce je dost velká - dosahuje skoro 70 % u zdravých lidí

Existují rozdíly mezi pohlavími muži mají větší PPI, zatímco ženy vyšší PPF.

Díky velmi krátkému intervalu jde patrně o nevědomý fenomén, a objevuje se už při prvním testu, tzn. že zde nehraje roli učení či podmiňování.

Léze či inaktivace některých mozkových struktur narušují PPI.

Aplikace dopaminových a serotoninových 5-HT<sub>2</sub> agonistů, NMDA antagonistů narušuje PPI

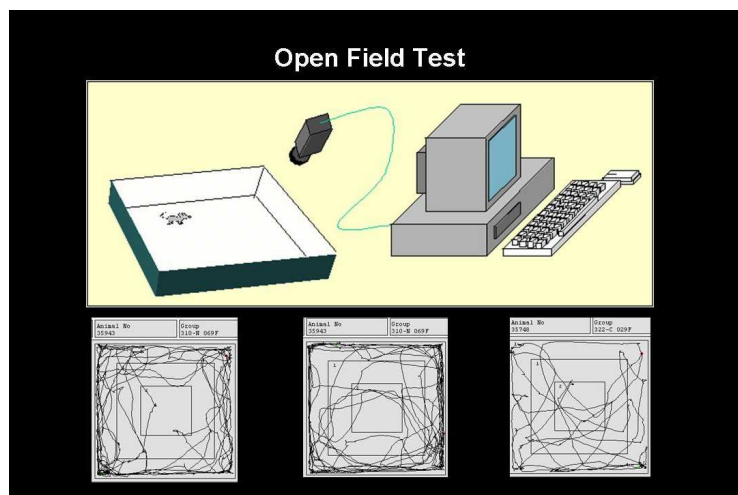
Některé vývojové procedury, jako mateřská deprivace nebo izolovaný chov, vedou také k narušení

Využívána ve studiu animálních modelů schizofrenie

Látky, které obnovují narušenou PPI v animálních modelech, mohou být dále testovány na jejich antipsychotickou účinnost ...*screeningový test*

# Spontánní aktivita zvířat

- Nejčastěji studována v tzv. testu otevřeného pole (angl. *open-field test*)
- Test otevřeného pole je obecně přijímané paradigma pro měření explorační (prozkoumávání), spontánní lokomoce, ale také anxiety u zvířat.
- Zvíře je v tomto testu umístěno do nového prostředí (zpravidla ostře osvětlená čtvercová aréna (1m u potkana), které vyvolá explorační, orientační reakce (čichání, panáčkování apod) a někdy anxiózní chování
- Procedura je velmi jednoduchá, zvíře se umístí do arény, a poté se monitoruje jeho chování, nejčastěji pomocí videokamery napojené na automatizovaný počítačový systém



Horizontální aktivita – lokomoce, thigmotaxe

Vertikální aktivita - panáčkování

Další – čichání, popř i stereotypické chování po aplikaci látek-  
např amfetaminu, *wet dog shakes* – automatismus přítomný u  
animálních modelů epilepsie

Preference stěn (thigmotaxe) a doba po kterou je zvýše  
nehybné – ukazuje úroveň anxiety



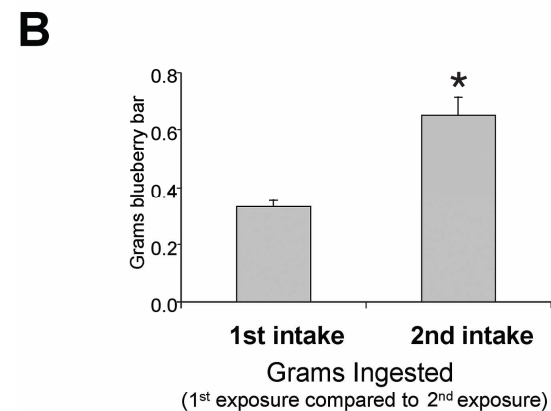
# Test otevřeného pole

---

- Pokud je zvíře umísťováno do otevřeného pole opakovaně, lze testovat *habituaci* na nové prostředí.
- Někdy tento test spojen s úlohou rozpoznávání objektů (*object recognition task* - viz později), objekty jsou pak umístěny v aparatuře.
- Uplatňuje se v něm **konflikt dvou motivací** – strach z nového prostředí a motivace k exploraci, prozkoumání prostředí.
- **Úroveň lokomoční a vertikální aktivity je měřítkem celkové behaviorální aktivity.**
  - Hyperaktivita – často pozorována po aplikaci agonistů dopaminových receptorů – amfetamin, stimulační drogy
  - Hyperlokomoce navozená antagonisty NMDA receptorů (PCP, MK-801) – význam při modelování schizofrenie – považována s jistými omezeními za analogii pozitivních příznaků psychózy – souvisí s nadměrnou funkcí dopaminergního systému v mesolimbickém okruhu
- Stereotypické chování, např. po apomorfinu, či budivých aminech
- Senzitivizace D2 receptorů ontogenetickou chronickou aplikací quinpirolu (D2 agonista) – potkani rituálně explorují některé objekty, rigidně se drží určitých tras – jistá fenomenologická analogie a animální model OCD
- Po aplikaci anxiolytik (BZD) se zvířata méně drží u stěn, snížená úzkost z nového prostředí
- Test otevřeného pole je velmi citlivý na látky snižující aktivitu – např. antagonisté dopaminových a adrenergických receptorů

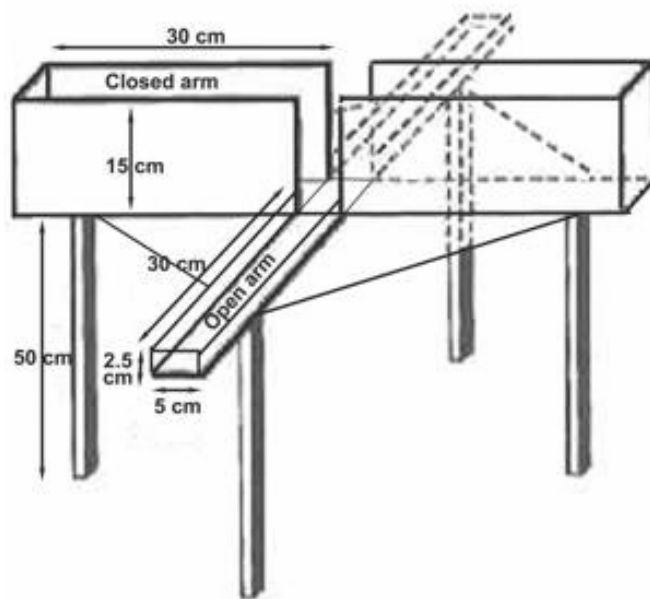
# Testování anxiety a emocionality

- Úzkost (anxieta) je z emocionálních funkcí nejpřístupnější objektivnímu měření
- Někdy se testuje také neofobie, anhedonie (absence přirozené preference pro sladký roztok) – obzvláště u animálních modelů afektivních poruch (např. model deprese indukovaný chronickým mírným stresem)
- Nejpoužívanější metodou pro testování anxiety je kromě testu otevřeného pole především vyvýšené křížové bludiště (*elevated plus maze – EPM*)



Ukázka testu chuťové neofobie

## Vyvýšené křížové bludiště (*elevated plus maze*; EPM)



Počet vstupů do otevřených a uzavřených ramen

Celkový čas strávený v otevřených a uzavřených ramenech – často se vytvářejí indexy

BZD (pozitivní allost.modulátory GABA-A) konzistentně zvyšují dobu strávenou v otevřených ramenech  
Některé jiné léky, používané ke zmírnění úzkosti v klinice (např. SSRI) nevykazují v tomto testu příliš silné výsledky

## Jiné testy na anxietu zvířat

Zero maze – cirkulární bludiště –  
jistá analogie s EPM

Tail suspension test –  
jednoduchý, často užíván u myši  
při sceeningu antidepresiv

Myš je 6 min pověšena za  
ocásek a monitoruje se imobilita  
x snaha o vyproštění –  
antidepresiva snižují imobilitu,  
ale také stimulancia, BZD  
naopak nehybnost zvyšují

Forced swim – využíván rovněž  
při studiu stresu a jeho vlivu na  
paměť a v animálních modelech  
afektivních poruch



Forced swim test







# Učení a paměť

---

Speciální typ chování, vysoká adaptivní hodnota

Zpravidla pozorováno jako změna chování vyvolaná individuální zkušeností subjektu, či opakovanou expozicí určité situaci nebo podnětu (v nejjednodušším případě např. habituace).

Obtíže s vyčerpávající definicí, která by zahrnovala všechny aspekty těchto jevů.

Vybrané úlohy ke studiu učení a paměti:

Fear Conditioning - strachové podmiňování

Active Avoidance – aktivní vyhýbání

Passive Avoidance – pasivní vyhýbání

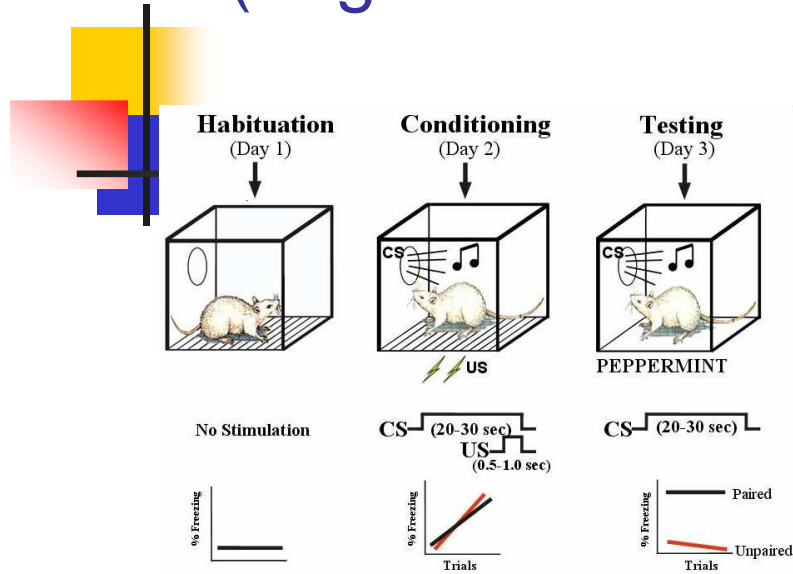
Taste Memory – především podmíněná chuťová averze

Object recognition task

Spontaneous Alternation – spontánní alternace

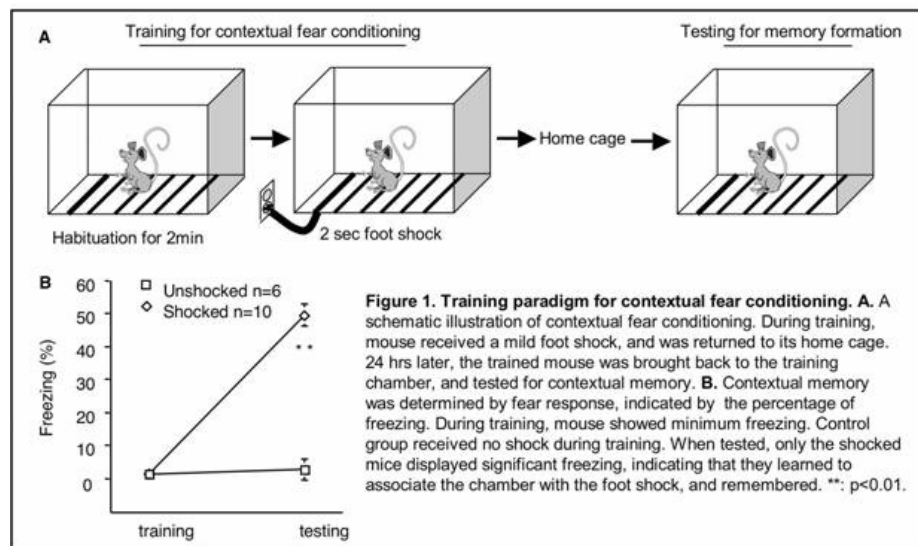
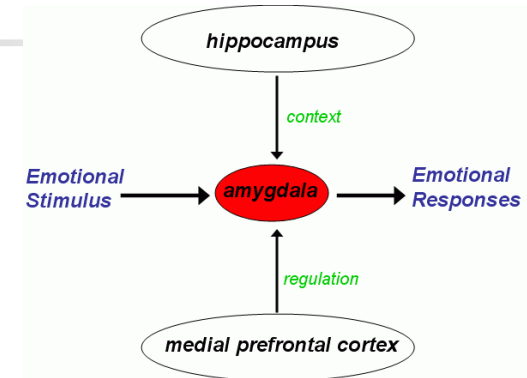
Water and Radial Maze – vodní a radiální bludiště

# Strachové podmiňování (angl. fear conditioning)



Auditory  
fear conditioning –  
pavlovovské

Klíčová role amygdaly



Kontextuální strachové podmiňování

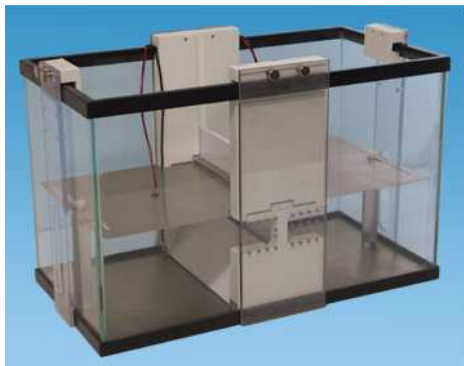
U strachového podmiňování je měřenou veličinou zpravidla doba strachové ataxie – FREEZING

Dnes dostupné tzv. multi-conditioning“ systémy – modulární stavba, přispůsobivost

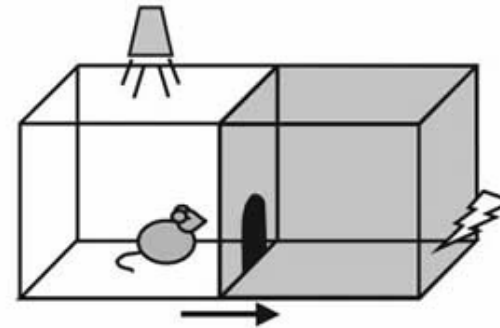
Lze studovat i u lidí, např projekcí obrázků a měřením kožního odporu, či jiných odpovědí VNS

# Aktivní vyhýbání x pasivní vyhýbání

- Aktivní - Subjekt musí aktivně vykonat nějakou činnost, aby se vyhnul trestu
  - One-way active avoidance
  - Two-way shuttle box
- Pasivní (*passive, inhibitory avoidance*) – Subjekt musí potlačit nějakou svoji přirozenou aktivitu nebo tendenci, aby se vyhnul trestu
  - Step-through
  - Step-down

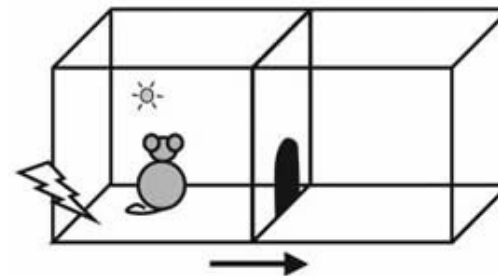


Aktivní vyhýbání ve vodní verzi  
- Určeno pro studium chování akvarijních rybek



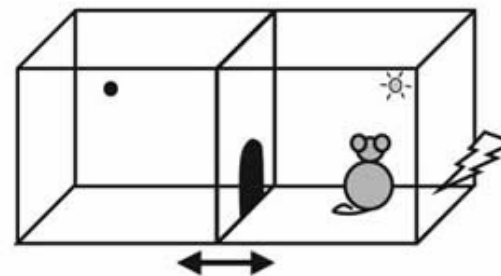
**Passive Avoidance**  
*Exploits a natural tendency of mice to enter dark environments.*

*Unidirectional: mouse goes from light to dark chamber.*



**Active Avoidance**  
*Mouse learns to avoid shock based upon the presentation of a light cue.*

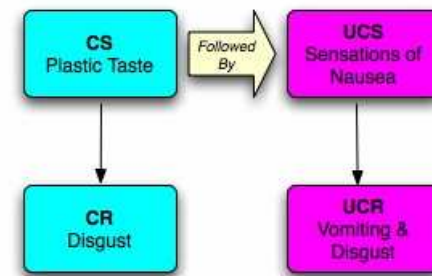
*Unidirectional: mouse is always shocked in the same chamber/location.*



**Shuttle Avoidance**  
*Mouse learns to avoid shock based upon the presentation of a light cue which is dependent upon location of the mouse in the apparatus.*

*Bi-directional: mouse learns to monitor for cues in both chambers that predict shock.*

# Podmíněná chuťová averze



*conditioned taste aversion* (CTA), Garciův efekt, *Sauce-Bearnaise syndrome*

jedná se o formu klasického (pavlovovského) podmiňování, Asociace podmíněného podnětu (určité chuti) s nepodmíněným nevolností), která vede k vyhýbání se této chuti

Tato paměťová stopa může perzistovat po VELMI dlouhou dobu

Evolučně velmi výhodný typ učení, probíhá i v narkóze  
V minulosti podrobně studován v naší laboratoři (Dr. Bureš, Dr. Bielavská)

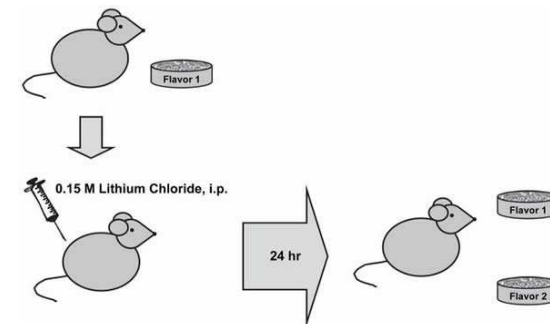
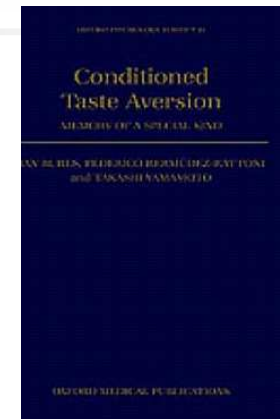
Kriticky závislá na **parabrachiálním jádře** (hlubokém jádru spodního mozku) a **insulárním kortexu** (obsahuje korovou oblast pro zpracování chuťových vjemů), **amygdale**, **supramammilárním jádře**, **nucleus accumbens**

Je rovněž zprostředkována proteinkinázou Mzeta, její blokáda v insulární kůře vede k vymazání této averze

Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta.

Shema R, Sacktor TC, Dudai Y.

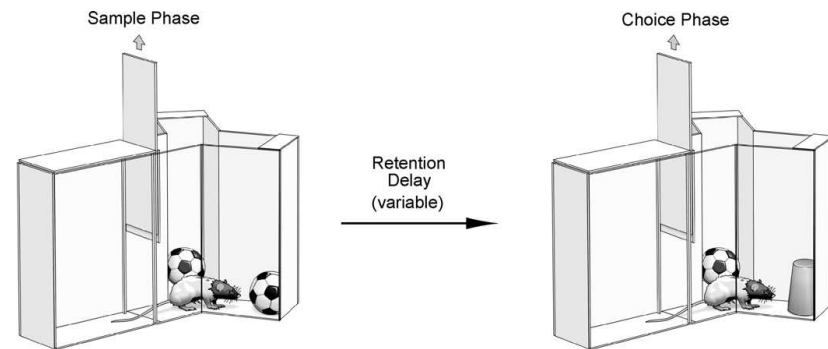
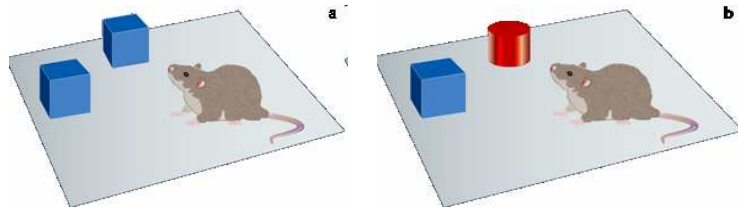
Science. 2007 Aug 17;317(5840):951-3.



Generalizace stimulu – subjekt se vyhýbá i podobným chutím

Objev – 50. léta 20.století – John Garcia – studium vlivu ozáření na chování

# Úloha rozpoznávání objektu (*object recognition task*)



Signifikantní preference pro nový objekt po 4, ale ne 24 hodinách.

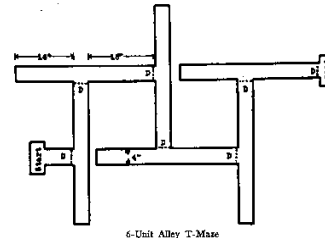
Měřenou veličinou je doba prozkoumávání objektu, doba, kdy je zvíře v kontaktu s tímto objektem

Zvíře objekt očichává, kontaktuje, prozkoumává

Tato úloha je citlivá k vyčerpání (depleci) serotoninu, např. pomocí p-chlorofenylalaninu, jako jedna z mála.

Odbočka – **serotoninová deplece** – buď dietou, nebo chemicky, má jistý vliv na kognitivní funkce u člověka, u zvířat je dopad podstatně menší

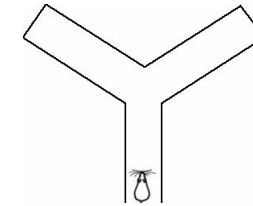
# Prostorové úlohy



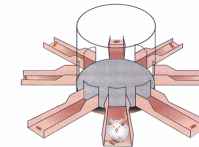
Komplexní bludiště  
Dnes se využívá jen zřídka.

- Prostorová paměť (ve smyslu navigace k cílům, jež nejsou přímo perceptibilní) – speciální druh paměti, ve kterém se subjekt učí určovat a rozeznávat vlastní polohu vzhledem k okolním orientačním bodům (alotetická orientace), popř. vzhledem k vlastnímu pohybu a výchozímu bodu (idiotetická orientace)
- Zpravidla zahrnuje vytvoření kognitivní mapy prostředí
- Někteří badatelé ji považují za zvířecí analogii lidské deklarativní paměti
- Je kriticky závislá na hipokampu, ale v její funkci hraje roli i entorinální kůra (hlavní aferentující struktura), a v některých uspořádáních také prefrontální (PFC) a posteriorní parietální kůra (PPC)

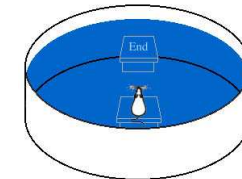
- „Y“, „T“ a křížové bludiště



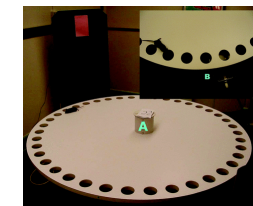
- Radiální bludiště (*radial arm*)



- Morrisovo vodní bludiště



- Barnesové bludiště

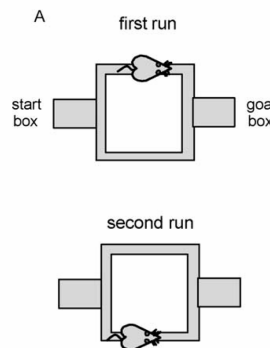
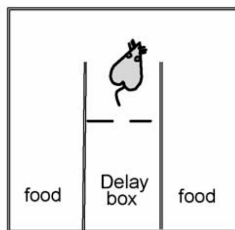
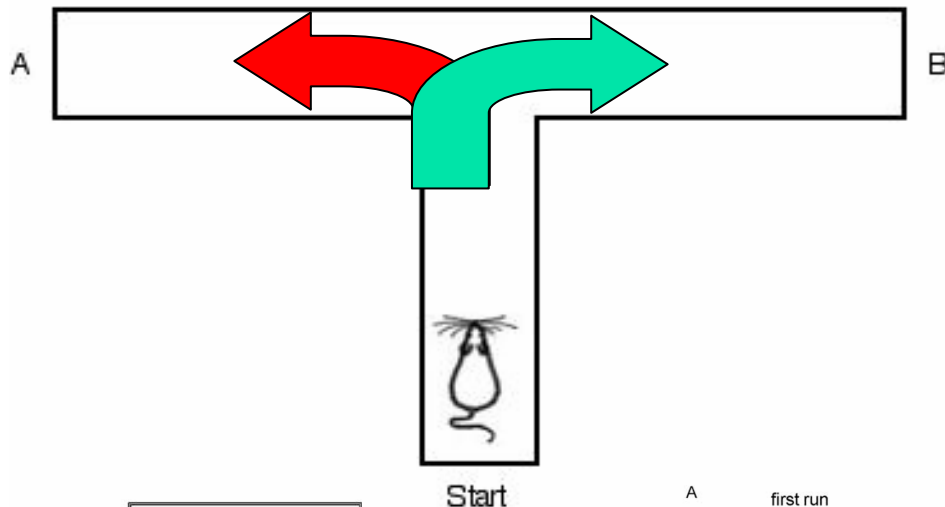


- Úlohy vyhýbání se místu



# Spontánní alternace

**Spontánní alternace**  
(SAB - Spontaneous Alternation Behavior)



Ve většině případů je toto chování vrozené, ale k jeho vyjádření může dojít i v průběhu ontogeneze

Bylo popsáno i u dětí, kdy u 6-měsíčních nebylo již vyjádřeno plně (často se vracely do stejného ramene), zatímco u jednoročních již ano

Snad zvláštní forma exploračního chování, v přírodě zřejmě velmi univerzální (ukázáno u trepky *Paramecium* i lidských spermií v „mikrobludištích“)

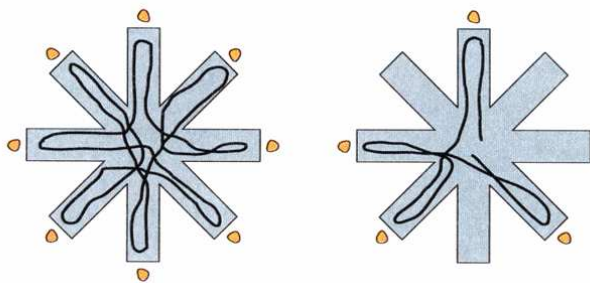
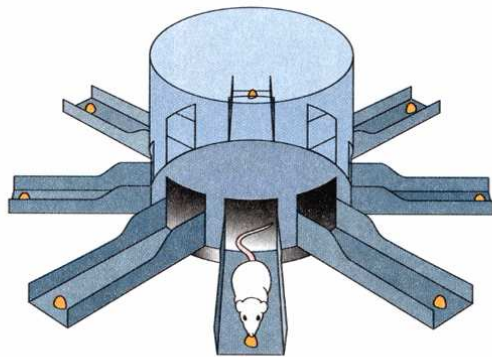
Dosavadní vysvětlení tohoto „jednoduchého jevu“ jsou zatím nedostatečná

Často je používána jako test pracovní paměti (zvíře si musí pamatovat které rameno navštívilo), vyžaduje také pozornost

Citlivá k lézi mPFC, také bazolatelární amygdaly (BLA, intenzivně spojená s PFC), v některých případech může být poškozena i po rozsáhlejších lézích hipokampu

# Radiální bludiště

Úkolem zvířat je navštívit ramena, kde je potrava, a vyhnout se opakování návštěvy v ramenu, kde již bylo, tedy které neobsahuje potravu.



Navrženo Oltonem a Samuelsonem jako test prostorového učení a paměti. Olton, D.S., & Samuelson, R.J. (1976). *Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2, 97-116.

Pokud je zvířatům v ve verzi pro pracovní paměť nabídnuto 8 ramen, z 8 prvních návštěv zpravidla 7 je do ramen ještě nenavštívených, což je vysoko nad náhodnou hranicí...ukazuje to, že hlodavci mají funkční pracovní paměť.

V průběhu let byla použita bludiště obsahující 3-48 ramen. (Cole, M.R., & Chappell-Stephenson. (2003). *Exploring the limits of spatial memory using very large mazes. Learning & Behavior*, 31, 349-368.)

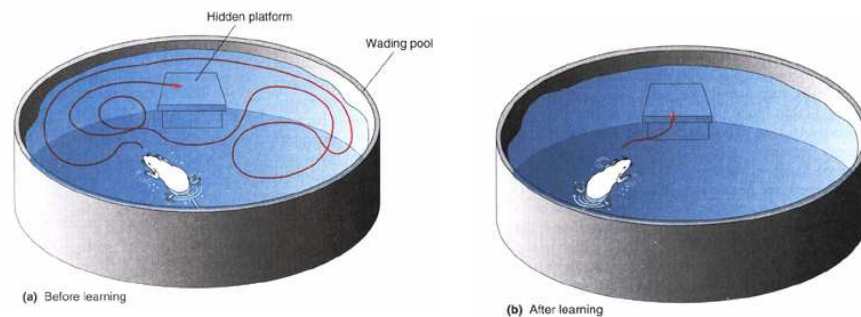
Olton et al. (1977) ukázali, že pokud byl počet ramen 17, výkonnost ve verzi pracovní paměti se snížila jen mírně. Cole a Chappell-Stephenson (2003) doložili, že limit pro úspěšné pamatování se navštívených ramen leží někde mezi 24 a 32 ramen (použili max 48 ramen)

Úloha existuje v modifikaci pro pracovní i referenční paměť

Úloha je závislá na hipokampu – v případě, že poloha ramen je určena jejich prostorovými vztahy k okolním orientačním bodům



# Morrisovo vodní bludiště (*Morris water maze*; MWM)



- Zvíře je vypouštěno z náhodných míst na periferii bazénku, skrytý ostrůvek je zpravidla umístěn ve středu jednoho z kvadrantů, pokud zvíře nedosáhne ostrůvku během 60 sekund, je na něj jemně dovedeno, na ostrůvku se rozhlíží; je na něm ponecháno cca 20 sekund.
- Na počátku zvířata plavou především po okrajích (thigmotaxe) a snaží se vyškrábat na stěnu, posléze opouštějí tuto strategii (zdravá) a hledají ostrůvek v ploše bazénku.

MWM vyvinuto skotským badatelem **Richardem G. Morrisem**, publikováno poprvé v r. 1981, v r. 1984 pak vyšel metodický článek popisující vývoj této techniky

Metoda má řadu výhod, např. **eliminace blízkých (čichových) orientačních bodů**, zvíře se orientuje téměř výhradně podle vzdálených orientačních bodů umístěných v místnosti.

Využívá také toho, že potkan je dobrý plavec, úloha nezpůsobuje distres, ale zvířata jsou motivována ostrůvek najít.

Lze studovat osvojování (učení, acquisition) a také vybavení – *probe trial* – zvíře je na 60 sekund vypuštěno do bazénku bez ostrůvku a sleduje se preference pro místo, kde se dříve platforma nacházela během předchozího tréninku.

Měří se parametry – **latence (s) k nalezení ostrůvku**, **thigmotaxe**, **celková uplavaná dráha před nalezením**, **rychlost plavání** (poskytuje informaci o motorických funkcích), a další.

Zpravidla se využívá také **test hledání viditelného**

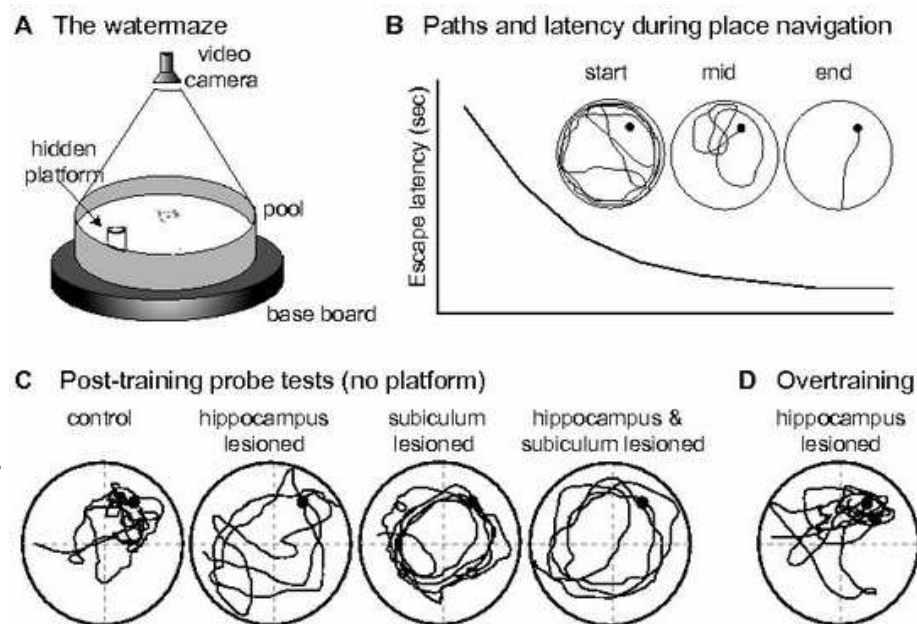
# MWM

Vliv experimentálních manipulací – po lézi hipokampu zvířata zpravidla nejsou schopna řešit MWM, také aplikace některých antagonistů receptorů (např. NMDA, AMPA či cholinergních) může výkon poškodit.

Ale: existuje tzv. **technika předtrénování**, kdy zvíře je naučeno, že se má hledat ostrůvek (procedurální aspekt) – **NSP - nonspatial pretraining** (skrytý ostrůvek náhodně mění polohu a bazén je obklopen neprůhlednou zástěnou) – zvíře se seznámí s tím, jak ostrůvek hledat a že je třeba ho hledat, ale nikoliv s tím, **kde** jej hledat.

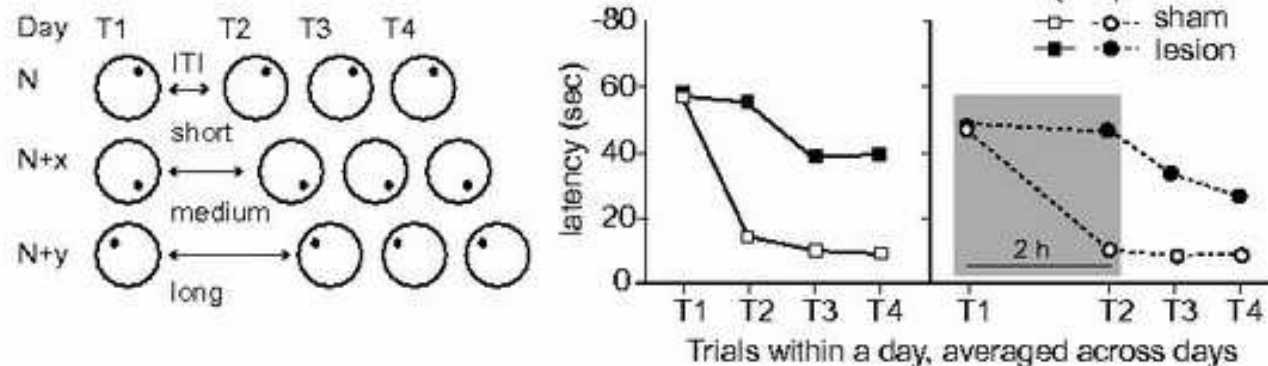
NSP odstraní řadu poškození, např. skopolaminem (antagonista mAChR), či APV (NMDAR antagonist) – z toho lze vyvozovat, že část deficitů způsobených těmito látkami lze připsat na vrub procedurálnímu poškození, nebo také na naučení se „pravidel“ úlohy.

Existuje ve verzi pro dlouhodobou i krátkodobou paměť. Test pracovní paměti (*delayed matching to place-DMTP*) – 4 plavby denně, poloha ostůvku se mezi dny mění – vysoce závislá na hipokampu i po předtrénování.



## Delayed matching-to-place úloha ve vodním bludišti

### A Delayed matching to place (DMP)



4 plavby denně, poloha ostrůvku se každý den mění – při první plavbě zvíře zpravidla najde ostrůvek náhodou nebo je na něj navedeno – klíčovou je druhá plavba (která následuje s různě dlouhým ostupem po první plavbě), kdy se měří čas potřebný k nalezení ostrůvku

*Steele RJ, Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. Hippocampus. 1999;9(2):118-36.*

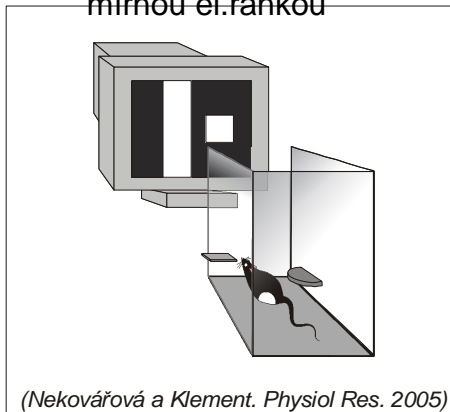
S pomocí této úlohy bylo rovněž zjištěno, že dopaminové D1 receptory kriticky modulují perzistenci paměťové stopy v této variantě vodního bludiště.

# Úlohy navržené v naší laboratoři

## Vyhýbání se pohyblivému objektu



Potkan se během zhruba 15 sezení naučí vyhýbat pohyujícímu se robotu, okolo nějž je definována kruhová oblast o průměru 30cm, jejíž navštívení je potrestáno mírnou el.rankou

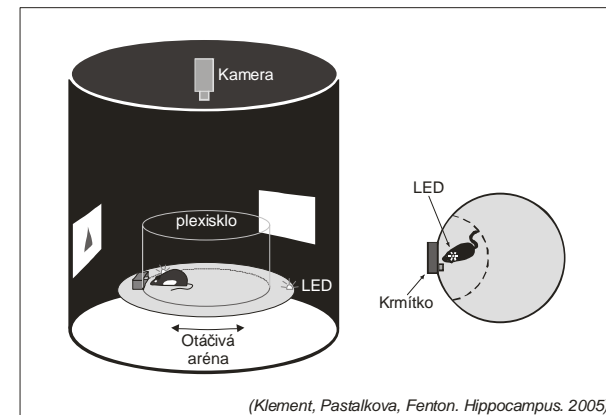


(Nekovářová a Klement. *Physiol Res.* 2005)

## Konfigurace objektů na monitoru

Potkan se učí rozpoznávat konfiguraci objektů na monitoru  
Operantní odpověď na základě prostorového rozpoznání ?  
Configuration (geometry) vs. pattern recognition

## Rozpoznání místa

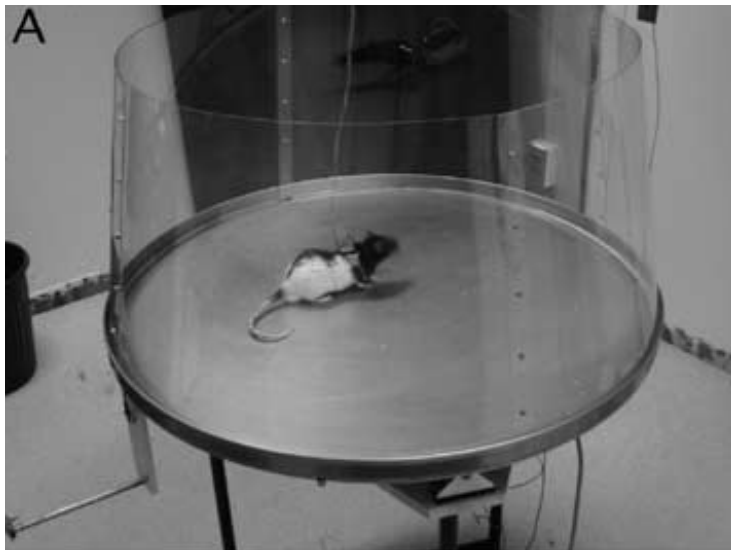


(Klement, Pastalkova, Fenton. *Hippocampus.* 2005)

**Prostorově řízené operantní chování, pouze v určité oblasti prostoru je zmáčknutí „honorováno“ odměnou**

*Klement et al., 2002*

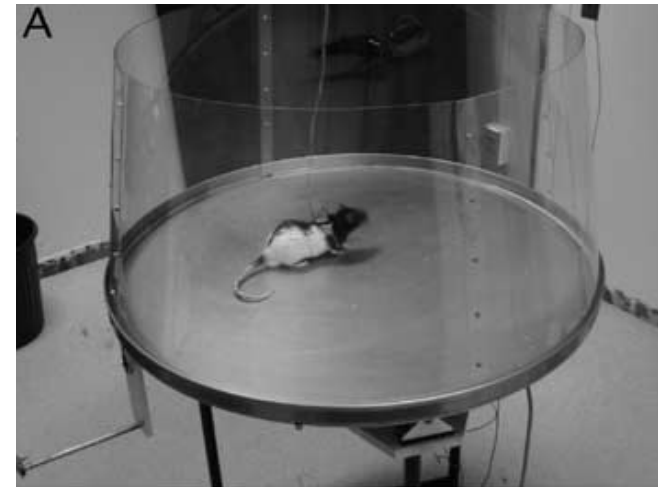
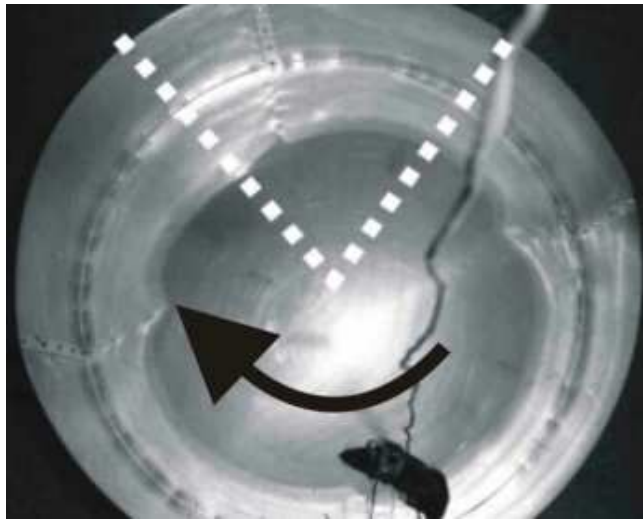
# Úloha vyhýbání se místu (*place avoidance*)



Zvíře se pohybuje po aréně s uniformním povrchem a má za úkol vyhýbat se zakázané oblasti, pokud do ní vstoupí, je potrestáno mírnou elektrickou rankou

Oblast může být definována v souřadnicovém systému místnosti (*room frame*) nebo arény (*arena frame*)

# Aktivní alotetické vyhýbání se místu (*active allothetic place avoidance - AAPA*)



Potkan má za úkol se vyhýbat na rotující aréně stabilnímu sektoru definovanému v souřadnicích místnosti

*Stuchlík et al., 2004*

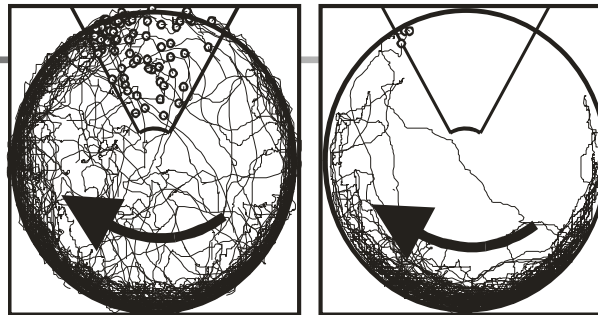
Zvířata musejí **rozlišit mezi orientačními body na aréně a v místnosti a vybrat souřadnicový rámec místnosti jako relevantní** pro navigaci

Kromě alotetické navigace vyžaduje AAPA tzv. „**kognitivní koordinaci**“

*(Wesierska et al., 2005)*

Úloha je **citlivá i k jednostranné inaktivaci hipokampu** (větší nárok na integritu hipokampu)  
*(Cimadevilla et al., 2000)*

# Aktivní alotetické vyhýbání se místu

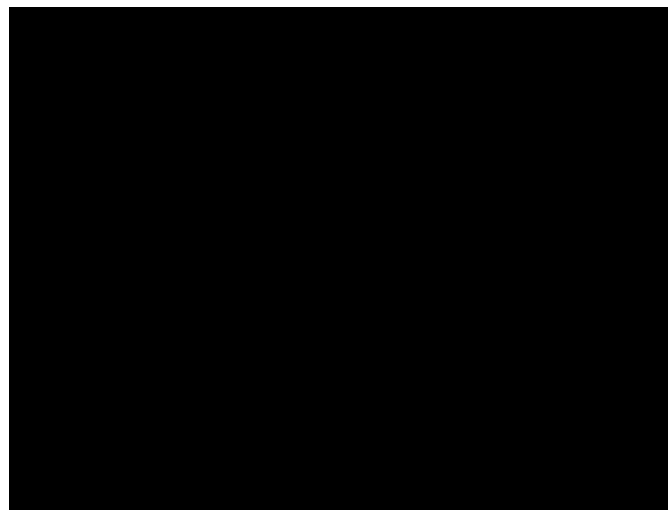


A

B

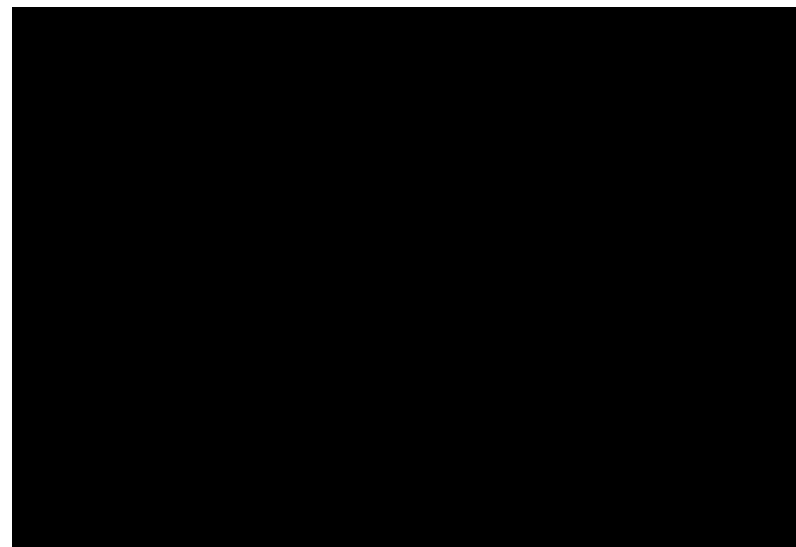
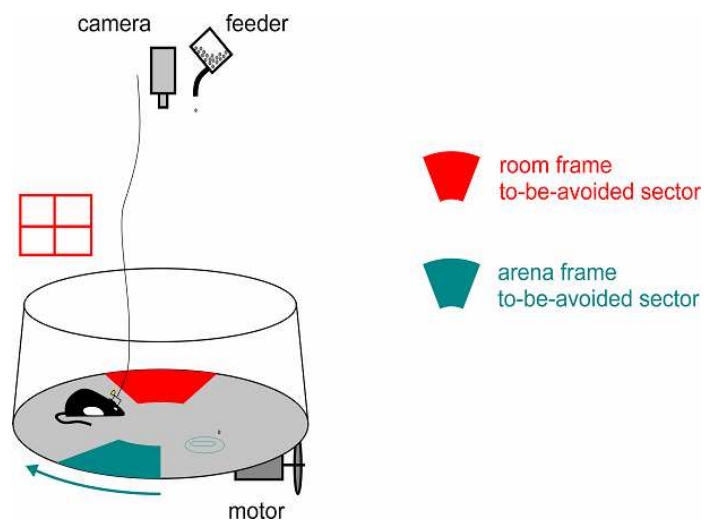
Ukázky trajektorií poškozeného a nepoškozeného potkana

Nalevo – hyperlokomoce + neschopnost řešit úlohu



video laskavě zapůjčeno A.A. Fentonem, SUNY - N.Y.

# Dvojité vyhýbání (double avoidance)



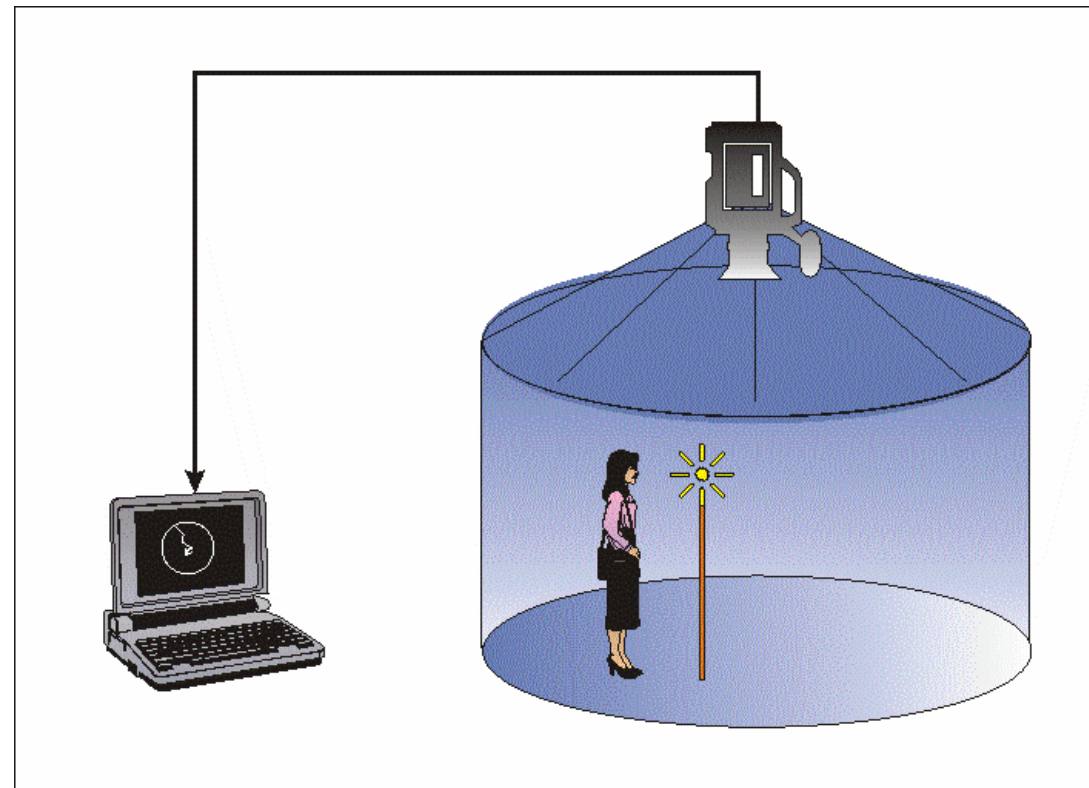
**Potkan je trénován vyhýbat se místu stabilnímu v místnosti a zároveň místu na rotující aréně.**

Klement, 2005

video laskavě zapůjčeno A.A. Fentonem, SUNY - N.Y.



# Blue Velvet Arena



Zařízení pro testování prostorové paměti i lidských subjektů, vyhýbání se místu, dvojité vyhýbání, preference místa, rotující aréna (*kontakt: kamil@biomed.cas.cz*)