



**Akademie věd
České republiky**

Příloha B

Teze disertace
k získání vědeckého titulu "doktor věd"
ve skupině věd: **Biologicko-ekologické vědy**

**Dynamická navigace, kognitivní koordinace a behaviorální flexibilita
v animálních modelech neuropsychiatrických poruch**

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru: **Zoologie a fyziologie živočichů**

Jméno uchazeče: **Prof. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD.**

Pracoviště uchazeče: **Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.**

Místo a datum

Obsah

Úvod

Kognitivní funkce živočichů včetně člověka zahrnují komplexní nervové procesy založené na výpočetní kapacitě mozkových sítí, synchronizaci nervové aktivity v mikro- a makro-okruzích, komplexních mechanismech synaptického přenosu a dynamické strukturální a funkční přestavbě mozkových sítí. Tyto vysoce dynamické procesy vedou nakonec k viditelnému výstupu na úrovni chování a speciálně u člověka na úrovni popsatelného prožívání. Současně tyto procesy interagují se vstupy z autonomního nervového systému s cílem udržet tělesnou homeostázi a zajistit organismu přežití v neustále se měnících podmínkách.

V kognitivních procesech zauímají význačné místo dynamická navigace v prostoru (*Morris, 2003*) a procesy kognitivní koordinace a behaviorální flexibility (*Phillips a Silverstein, 2003*). Dynamickou navigaci a orientaci v prostoru můžeme chápat jako systém znalostí a dovedností, který umožňuje živočichům hledat a nacházet konkrétní cíle, v mnoha případech pohyblivé, a optimálně vytyčit trasy v prostředí. Prostorová navigace je typem paměti; starší koncepce řadí tento typ paměti jako model deklarativní paměti, který je patrný i u zvířat, a nové koncepce pak počítají s prostorovou navigací jako s jedním z podtypů deklarativní paměti (*Morris, 2003*). Klíčové je, že dynamická prostorová paměť je kriticky závislá na strukturách středního spánkového laloku, zejména hipokampu a přilehlých oblastí, stejně jako sémantická paměť pro fakta a epizodická paměť pro události (*O'Keefe a Nadel, 1978; Gallistel, 1990*). Dle současných poznatků se zdá, že lidé, ale i subhumánní živočichové disponují systémem pro efektivní orientaci v prostředí, označovaným nejčastěji jako „kognitivní mapa“. Tu lze chápat jako soubor informací o rozložení rysů vnějšího světa, uložený ve výpočetní kapacitě neuronálních sítí, a umožňující nalézt optimální trajektorii mezi libovolnými dvěma body této mapy (*O'Keefe a Nadel, 1978*).

Pokud jde o metodologii, je prostorová paměť u zvířat obecně testována pomocí nejrůznějších typů bludišť. Mezi nejznámější patří např. Morrisovo vodní bludiště (*Morris, 1981;1984*), radiální bludiště (*Olton a Samuelson, 1976*), a bludiště Barnesové (*Barnes et al., 1979*). Dynamická prostorová navigace je pak testovatelná v úlohách, které modelují pohyblivý aspekt prostředí. Tím může být buď pohyblivý cíl, jako je tomu v úloze vyhýbání se nepříteli (*Telensky et al., 2009; 2011*), nebo celé pohybující se prostředí jako je tomu v případě vyhýbání se místu na rotující aréně (*Bures et al., 1997; Fenton et al., 1998, Stuchlik et al., 2001; Stuchlik a Bures, 2002*). Rovněž do této kategorie lze zařadit test rozpoznání pozice stimulů na počítačovém monitoru (*Nekovarova a Klement, 2006*). Tyto

posledně zmíněné úlohy byly vyvinuty v uplynulých letech v naší laboratoři. Zatímco Morrisovo vodní bludiště a Barnesové bludiště testují především přesnou prostorovou reprezentaci, radiální bludiště umožňuje testovat pracovní paměť a prostorové rozhodování. Aktivní vyhýbání se místu pak je zaměřeno na kognitivní koordinaci a ve variantě přeučení na behaviorální flexibilitu. Vyhýbání se nepříteli vyžaduje průběžné zpracování měnící se informace. Rozpoznání pozice objektu na monitoru pak je test determinace pozice objektu v nepřístupném prostoru.

Animální modely neuropsychiatrických onemocnění vycházejí z obecného konceptu modelů ve vědě (např. *Rosenblueth a Wiener, 1945*), a je třeba říci, že to rozhodně nejsou zrcadlové obrazy skutečných onemocnění, ani „zmenšeniny“ těchto nemocí u zvířat. Jedná se spíše o užitečné nástroje pro studium mechanismů, které se mohou uplatňovat i ve vzniku reálných lidských onemocnění. Rovněž jsou vysoce užitečné při hledání a testování nových možností jejich léčby.

Stručné vyjádření základních myšlenek, metod a závěrů disertace

Dynamická navigace

První práce (**Telenský et al., 2009**) ukazuje vývoj úlohy vyhýbání se nepříteli. Tato úloha byla v první fázi vyvinuta pro dva potkany, volně se pohybující na otevřené kruhové aréně. Jeden z potkanů byl definován jako nepřítel (odtud pochází anglický název úlohy *Enemy avoidance task*), kolem nějž byla vymezena zóna o průměru 25 cm a druhý potkan, samotný testovaný, měl za úkol do této zóny nevstupovat. Obě zvířata byla sledována pomocí kamery umístěné na stropě, snímající půdorys celého experimentálního prostoru. Pokud se testovaný potkan přiblížil k nepříteli na vzdálenost menší než 25 cm, počítačový systém mu udělil mírnou elektrickou ranku. V první fázi byla obě zvířata volně pohyblivá a vykazovala pozitivně agonistické chování, často se tedy k sobě přibližovala a měla tendenci se následovat. Proto byl v druhé fázi experimentu pohyb nepřítele omezen tím, že byl vložen do malé klíčky umístěné na arénu. Výkonnost testovaného potkana se tím významně zlepšila. V následné fázi byli oba potkani opět volně pohybliví a testovaný potkan se poté naučil vyhýbat se nepříteli efektivně. Nutnost vřazení periody, kdy měl potkan-nepřítel omezený pohyb, interpretujeme jako fázi, kdy měl testovaný potkan možnost vytvořit asociaci mezi subjektem nepřítele a averzivním stimulem. Tato práce (Telenský et al., 2009) byla opublikována v metodologickém časopise *Journal of Neuroscience Methods* a vytyčila cestu pro další studie zaměřené na vyhýbání se dynamickým objektům.

Další studie (**Telenský et al., 2011**) se také zaměřila na dynamické vyhýbání se pohyblivému objektu a tentokrát jsme využili malého programovatelného robota. Důvodem pro nahrazení nepřítel-potkana nepřitelem-robotem byl jednodušší a více předvídatelný pohyb robotického vozítka po aréně, kdy jsme předpokládali, že osvojování dynamického vyhýbání testovaným potkanem bude rychlejší a celková výkonnost lepší. Tento předpoklad se ukázal jako správný a testovaní potkani si skutečně během několika sezení osvojili efektivní vyhýbání se. V další fázi experimentu jsme provedli bilaterální funkční vyřazení dorsálního hipokampu, archikortikální struktury klíčové pro navigaci ke skrytým cílům (dle Teorie kognitivní mapy; *O'Keefe a Nadel, 1978*). Překvapivé bylo následné zjištění, že tato inaktivace hipokampu narušila vyhýbání se pohyblivému objektu, přestože byl viditelný a virtuálně byla vymezena pouze zakázaná oblast kolem něj. Jako kontrolní experiment jsme provedli paralelní pokus, kdy byl robot stabilní, tzn., že se po aréně nepohyboval. V případě nepohyblivého robota nevedla inaktivace hipokampu k žádnému narušení vyhýbání. V obou experimentech byl v dalším kontrolním sezení následujícím jeden den po mozkové inaktivaci do hipokampu aplikován pouze fyziologický roztok a v obou případech byla výkonnost potkanů na úrovni normálního zdravého výkonu. Tato studie tedy ukázala, že i. selektivní vypnutí hipokampu narušilo vyhýbání pohyblivému se, ale nikoliv stabilnímu viditelnému objektu, a ii. že tato inaktivace nevyvolala žádné trvalé funkční změny a byla plně reverzibilní. Tato práce byla publikována v časopise *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* a představuje významné rozšíření Teorie kognitivní mapy. Tato teorie totiž předpokládá, že zapamatování pozice skrytých míst závisí na funkční integritě hipokampu, zatímco navigace k viditelným cílům (nebo od nich) nikoliv. Práce ukazuje, že i navigace vzhledem k viditelným cílům na hipokampu závisí, a to ve specifickém případě, kdy se tyto objekty pohybují. Práce tím také koroborovala specifickou teorii o tom, že hipokampus funguje jako kontinuální detektor automatického záznamu zažitých zkušeností (ARAE – *automated recording of attended experience*; *Morris a Frey, 1997*).

Následující práce se zaměřila na vývoj a otestování jiné úlohy, která spočívá v rozpoznání pozice objektu promítaného na obrazovce monitoru. Jedná se tak vlastně o jakousi jednoduchou verzi virtuální reality pro laboratorní potkany. Technika využívá počítačového monitoru, na který jsou promítány stimuly v různých pozicích. V boxu umístěném před monitorem se nacházejí páčky s krmítky, které laboratorní potkan může zmáčknout a obdržet jako odměnu potravinovou kuličku. Podstata úlohy spočívá v tom, že jedna pozice stimulu na monitoru je „správná“ a zmáčknutí páčky po jejím promítnutí je honorováno odměnou. Zmáčknutí po promítnutí stimulů v „nesprávné“ pozici odměněno není. Tento

úkol vlastně testuje důležitou schopnost zvířat, totiž rozpoznávat pozice podnětů v prostoru, který není přímo přístupný (tedy na monitoru). To nás vedlo k otestování hypotézy, že na rozpoznání pozice v nepřístupném prostoru se rovněž významně podílí hipokampus. Provedli jsme proto u zvířat, která dobře úlohu zvládala, bilaterální inaktivaci této struktury pomocí muscimolu, agonisty GABA-A receptorů, který ve struktuře natolik posílí synaptickou inhibici, že de facto vypne veškerý neuronální výstup z této struktury. Po tomto funkčním vyřazení dorsálního hipokampu již nebyla preference pro odměňovaný objekt patrná, takže potkani ztratili schopnost rozpoznat polohu stimulu. Tato práce (**Levčík et al., 2013**) byla vydána v časopise *Hippocampus*.

Důležitou úlohou pro studium prostorové navigace, kognitivní koordinace a behaviorální flexibility je výše zmíněná rotující aréna. Jedná se o disk, na kterém je vymezen sektor, jemuž se potkani mají vyhýbat (a po jehož navštívení obdrží mírnou elektrickou ranku v řádu 200-500 uA). Úloha byla vyvinuta na našem pracovišti na konci devadesátých let 20. století v týmu vedeném Dr. Janem Burešem. U této úlohy bylo od té doby sledováno, jakým způsobem závisí na hipokampu a na základě těchto studií byla popsána kognitivní koordinace jako jedna z distinktních hipokampálních funkcí.

V naší studii, otištěné v časopise *Neuroscience Letters* (**Svoboda et al., 2008**), jsme se zabývali otázkou, zdali zadní parietální kůra (angl. *posterior parietal cortex*) se jakožto důležité centrum egocentrické navigace, tedy orientace vzhledem k vlastní poloze těla, také podílí na prostorovém vyhýbání. Specifickou hypotézou bylo to, že permanentní léze zadní parietální kůry ovlivní na rotující aréně navigaci v souřadnicovém systému arény (kladoucím důraz na egocentrickou navigaci), nikoliv ve stabilním souřadnicovém systému místnosti (kladoucím nároky na allocentrickou navigaci závislou na vzdálených orientačních bodech). Překvapivě jsme zjistili, že tomu tak není a že tato léze významně výkonnost neovlivnila. Toto kontinuální vyhýbání patrně klade důraz na on-line zpracování souřadnicových rámců a již zmíněnou kognitivní koordinaci. V následné studii zaměřené na zadní parietální kůru (**Svoboda et al., 2015**), vydané v časopise *Behavioural Brain Research* jsme roli této struktury studovali detailněji, a to pomocí složitějších variant změn souřadnicových rámců určených k navigaci. Specificky bylo studováno přeučení navigace ze souřadnicového systému arény na souřadnicový systém místnosti, ze souřadnicového systému místnosti na rámec arény a také přeučení prostorové pozice v rámci jedné verze. Výsledky ukázaly, že léze zadní parietální kůry narušila přeučení z rámce arény na rámec místnosti a také přeučení pozice v rámci stabilního souřadnicového systému místnosti. To

opět naznačuje, že nervový substrát této úlohy s ohledem na parietální kůru je zcela odlišný od navigace v MWM.

Přehledový článek opublikovaný v časopise *Physiological Research* shrnul a diskutoval vývoj úlohy aktivního vyhýbání se místu a ukázal její možné využití ve studiích prostorové navigace, kognitivní koordinace a behaviorální flexibility (**Stuchlík et al., 2013**). Tento článek představil dosavadní studie z naší laboratoře i laboratoří ve světě, které tuto úlohu využily, a provedl jejich kritické zhodnocení. Shrnutí výsledků ukázalo, že úloha je vhodná zejména ke studiu kognitivní koordinace a jejích mechanismů, dále ke studiu behaviorální farmakologie, ke studiu mozkové lokalizace těchto funkcí a v neposlední řadě pro výzkum kognitivních deficitů v animálních modelech neuropsychiatrických onemocnění.

Další přehledový článek (**Stuchlík et al., 2014**) otištěný ve stejném časopise jako předešlý pak ukázal obecnou důležitost prostorové navigace a jejího studia za využití nejrůznějších behaviorálních úloh pro výzkum právě animálních modelů neuropsychiatrických poruch a také jejich klinickou implikaci ve studiu lidských subjektů. Závěrem této sekce o výzkumu prostorové kognice a jejích mechanismů stojí za zmínku přehledový článek vydaný v renomovaném časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (**Stuchlík, 2014**). Tato hojně citovaná práce diskutuje vztah navigace v dynamických prostředích, synaptické plasticity (zejména dlouhodobé potenciace, angl. long-term potentiation, LTP) a neurogeneze v dospělém mozku. Dlouhodobá potenciace je již dnes téměř jistě prokázaným substrátem učení a paměti (*Pastalkova et al., 2006; Whitlock et al., 2006*) a její detailní molekulární mechanismy jsou intenzivně studovány. Klíčová je v tomto kontextu především role proteinkinázy Mzeta. Tento enzym se dle nejnovějších výzkumů zdá být právě onou „molekulou paměti“ (angl. *memory molecule*). Neurogeneze v dospělém hipokampu byla prokázána teprve v 70. letech 20. století u zvířat (*Altman, 1963; Altman a Das, 1965*) a v roce 1998 definitivně u člověka (*Eriksson et al, 1998*). Její přesná úloha není dodnes přesvědčivě objasněna, ač existuje řada teorií o roli nově vzniklých neuronů právě v učení a paměti. Tento článek vytyčil některé koncepty a predikce, které mohou být v budoucny testovány právě s využitím prostorových úloh a dalších neurofyziologických technik s vzhledem do mozkových funkcí a vysokou rozlišovací schopností.

Animální modely

Animální modely, jak již bylo zmíněno, představují velmi užitečné nástroje pro studium mechanismů nervových funkcí u neuropsychiatrických onemocnění a pro hledání nových

možností léčby s příznivějším poměrem užítku a rizika. Vzhledem k tomu, že prožívání zvířat a jejich možné mentální procesy nejsou přístupné vědeckému zkoumání, badatelé se velmi často uchylují ke studiu chování jako jedné z možných pozorovatelných změn, ze které lze na funkce mozku usuzovat. Jak bylo řečeno výše, vycházejí animální modely a jejich hodnocení z obecného konceptu modelů a jejich validit. Tento koncept rozpracoval pro modelování neurologických a psychiatrických onemocnění badatel Paul Willner (1986). Validita animálních modelů je postavena na třech základních osách: Fenomenologická validita (angl. *face validity*) hodnotí podobnost chování v případě animálního modelu a u reálného onemocnění. Konstrukční validita modelu hodnotí jeho vztah k mechanismům uplatňujícím se při vzniku skutečného onemocnění. A konečně, prediktivní validita je založena na obecné schopnosti modelu generovat poznatky o lidském onemocnění; někdy bývá poněkud zjednodušeně chápána jako citlivost modelu k farmakologickým intervencím používaným v klinice. V následujících odstavcích se zmíníme o narušení kognitivních funkcí u animálních modelů schizofrenie, obsedantně kompulzivní poruchy a Alzheimerovy nemoci a demencí obecně.

Schizofrenie

Tato sekce pojedná o studiích zaměřených na kognitivní deficit u animálního modelu schizofrenii-podobného chování navozeného aplikací látky MK-801, non-kompetitivního antagonisty NMDA podtypu glutamátových receptorů. Aplikace této látky vede v závislosti na dávce k deficitu sociálního chování (nízké dávky; interpretováno jako model negativních příznaků schizofrenie, Rung et al., 2005) přes deficity paměti, a to zejména v oblasti pracovní a prostorové paměti (střední dávky; interpretovány jako model kognitivních deficitů u schizofrenie; **Stuchlik et al., 2004; Stuchlik a Vales, 2005**) až po experimentální psychózu, silnou hyperlokomoci a celkovou desorganizaci chování (**Vales et al., 2006**). V naší laboratoři se zabýváme zejména aplikací středně vysokých dávek (mezi 0,05 – 0,15 mg/kg), které v závislosti na uspořádání experimentu vyvolávají kognitivní deficit a někdy též zvýšenou lokomoční aktivitu.

První studie z roku 2004 opublikovaná v časopise *Neuroscience Letters* (**Stuchlik et al., 2004**) srovnala vliv aplikace psychotomimetika MK-801 na osvojení si úloh Morrisova bludiště a aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně. Výsledky ukázaly, že Morrisovou vodní bludiště bylo v případě počátečního osvojení si úlohy citlivější k této farmakologické manipulaci než rotující aréna. Tato publikace využila dvě dávky MK-801 (0,10 a 0,20 mg/kg) a našla poškození orientace na rotující aréně pod vlivem vyšší dávky a deficit navigace v Morrisově vodním bludišti pod vlivem obou dávek; vyšší dávka vyvolala

dokonce v této úloze závažný deficit, kdy zvířata vůbec nebyla schopna skrytý ostrůvek v bludišti najít.

Další studie otištěná v časopise *Behavioural Brain Research* (**Stuchlik a Vales, 2005**) pak ukázala na zjištění, že behaviorální deficit vyvolaný aplikací MK-801 v úloze aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně je závislý na dávce psychotomimetika a není závislý na předchozím pretréninku zvířat. To znamená, že ani obeznámení s pravidly úlohy nemá na toto narušení kognitivních funkcí žádný vliv.

Další práce (**Vales et al., 2006**) opublikovaná v časopise *Neuroscience Research* se zabývala rozdíly v povaze experimentální psychózy v úlohách Morrisova vodního bludiště a aktivního vyhýbání se místu mezi inbredními kmeny potkanů Long-Evans a Wistar. Tato práce využila tři různé dávky MK-801 a zjistila, že samci potkanů kmene Wistar jsou citlivější k indukci stavu podobného psychóze než potkani Long-Evans. Publikace zároveň jednoznačně ukázala, že pro indukci kognitivního deficitu v animálním modelu schizofrenie je u samců pigmentovaných potkanů kmene Long-Evans optimální dávka mezi 0,10 - 0,20 mg/kg. V souvislosti s výsledky studie zmíněné o odstavec výše lze říci, že pro tento kmen se optimální dávka pohybuje okolo 0,15 mg/kg. U samců albinotických potkanů Wistar optimální dávka pro indukci kognitivních příznaků v tomto animálním modelu činila 0,10 mg/kg.

Další studie zaměřená na model schizofrenie vyvolaný látkou MK-801 se týkala prediktivní validity kognitivního deficitu v tomto animálním modelu (**Bubenikova-Valesova et al., 2008**). Studie využila samců albinotických potkanů Wistar, jimž bylo aplikováno MK-801 v dávce 0,1 mg/kg s cílem vyvolat kognitivní deficit. Potkani byli testováni opět v úloze aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně. Pro testování prediktivní validity byly aplikovány následující farmaka: klasické antipsychotikum haloperidol, atypické antipsychotikum risperidon a také experimentální antagonist 5-HT_{2A/2C} receptorů ritanserin. Výsledky ukázaly, že zatímco haloperidol silně potlačoval lokomoční aktivitu zvířat, risperidon a ritanserin byly schopny zmírnit kognitivní deficit vyvolaný prostřednictvím MK-801. Vzhledem k faktu, že jak risperidon, tak ritanserin působí jako antagonisté 5-HT_{2A/2C} receptorů, výsledky studie lze interpretovat tak, že právě antagonistické působení na tomto podtypu serotoninových receptorů by mohlo hrát významnou úlohu ve zmírnění kognitivních příznaků schizofrenie u lidských pacientů. Tato studie byla opublikována v časopise *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.

Další práce se zabývala dalším studiem možných mechanismů, jež by mohly být užitečné ve zmírnění či zvrácení kognitivního deficitu ve zvířecím modelu psychózy vyvolaném látkou MK-801. Tato práce pro změnu využila samců potkanů kmene Long-Evans a společně s MK-801 bylo aplikováno několik látek ze třídy agonistů metabotropních glutamátových receptorů 2/3 a ze třídy 5. Výsledky této studie, publikované v časopise *European Journal of Pharmacology* (**Vales et al., 2010**), ukázaly, že agonisté metabotropních glutamátových receptorů třídy 5 jsou schopny zmírnit kognitivní deficit vyvolaný pomocí MK-801, zatímco látky třídy 2/3 tento účinek nemají. Tato práce našla poměrně zvučný ohlas v mezinárodní literatuře. Naše výsledky byly jedny z prvních, které naznačili možný léčebný účinek látek působících agonisticky na metabotropní glutamátové receptory třídy 5. Tyto látky se dnes dostávají do popředí zájmu vědeckých odborníků i farmaceutických firem (*Krystal et al., 2010*)

Zásadním problémem u pacientů se schizofrenií je také narušení behaviorální flexibility, což je schopnost přizpůsobit pružně své chování změněným podmínkám v prostředí. Jendou z možností, jak flexibilitu otestovat, je změněná poloha cíle, např. zakázaného sektoru v úloze vyhýbání se místu nebo polohy ostrůvku v Morrisově vodním bludišti. Práce **Lobelové a spol. (2013)** se zabývala prostorovým přeúčením v úlohách aktivního vyhýbání se místu a Morrisova vodního bludiště v animálním modelu kognitivních symptomů schizofrenie a byla koncipována jako dávková studie (angl. *dose-response study*) s využitím řady dávek MK-801. Výsledky ukázaly, že již poměrně nízké dávky (0,08 mg/kg) MK-801 narušily přeúčení v úloze aktivního vyhýbání se místu, o něco vyšší dávky také narušily přeúčení ve vodním bludišti. Tato práce byla přijata do časopisu *Behavioural Brain Research*.

Změny behaviorální flexibility jsme studovali nadále a v roce 2015 jsme opublikovali v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience* práci, která doložila, že poškození flexibility závisí v animálním modelu schizofrenie vyvolaném MK-801 na náročnosti přeúčení. Tato studie využila více forem přeúčení na rotující aréně. V první řadě jsme provedli jednoduchou změnu motorického pravidla, kdy byl pouze změněn směr rotace arény. Ve druhém případě byla převrácena poloha zakázaného sektoru, podobně, jako tomu bylo v předchozí studii. Nejnáročnější formu přeúčení představovalo přeúčení navigace ze souřadnicového rámce arény na souřadnicový systém místnosti a *vice versa*. Toto uspořádání bylo vlastně analogií úlohy zvané set-shifting, kdy mají testovaná zvířata za úkol změnit sadu pravidel používaných při řešení úlohy. Signifikantní poškození vlivem indukce schizofrenii-podobného chování jsme v této studii našli u náročnějších verzí

kognitivní flexibility, avšak nikoliv u pouhé změny motorického pravidla (**Svoboda et al., 2015**).

Zásadní funkcí patřící do kognitivních schopností je pracovní paměť. Jedná se o formu krátkodobé paměti umožňující uchování, manipulaci a monitorování informací nezbytných pro vykonávání určité činnosti. Tato schopnost je u schizofrenie a poruch schizofrenního okruhu narušena velmi výrazně. Spolupracující badatelka z Nenckeho ústavu experimentální biologie v polské Varšavě vyvinula modifikaci úlohy aktivního vyhýbání se místu, nazvanou alternační vyhýbání se místu, která vyžaduje pracovní paměť (*Dockery a Wesierska, 2010*). V této úloze jsme také otestovali potkany v animálním modelu schizofrenie a zjistili jsme, že i v našem modelu dochází k narušení pracovní paměti (**Zemanova et al., 2013**). To významně podporuje jeho fenomenologickou validitu. Tato práce vyšla v impaktovaném časopise *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.

Další otázkou, která vyvstává v souvislosti s kognitivním deficitem v animálním modelu schizofrenie, je schopnost mozku zabraňovat interferenci mezi paměťovými stopami. Tuto schopnost jsme testovali také v animálním modelu vyvolaném MK-801 a to pomocí protokolu behaviorální separace. Ten spočíval ve využití dvou úloh s rozdílnými kognitivními nároky. Aktivní vyhýbání se místu na rotující aréně vyžaduje především kognitivní koordinaci, zatímco úloha skryté platformy v Morrisově vodním bludišti testuje především přesnou prostorovou reprezentaci. Protokol spočíval ve střídání obou úloh v jednodenním časovém intervalu, kontrolní skupiny byly testovány postupně nejprve v jedné a pak v druhé úloze. Rovněž jsme otestovali střídání dvou kontextů, tedy provedení testu na rotující aréně ve dvou různých místnostech, které se opět buď střídaly, nebo byly použity postupně. Výsledky ukázaly, že po aplikaci MK-801 nedošlo k selektivnímu postižení v žádném z alternačních protokolů ve srovnání s protokolem postupným, ukázaly však narušení řešení aktivního vyhýbání se místu pomocí relativně nízké dávky psychotomimetika (0,08 mg/kg). Tato práce vyšla v roce 2016 v časopise *Behavioural Brain Research* (**Vojtechova et al., 2016**).

V souvislosti s narušením řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu po aplikaci psychotomimetika MK-801 jsme si také položili otázku, zdali v tomto animálním modelu je selektivně postižena právě kognitivní koordinace, tedy schopnost koordinovat a synchronizovat zpracování vícečetných proudů informace. Zajímalo nás také, jak se odrazí experimentální psychóza na aktivaci neuronálních reprezentací v odlišných prostředích, jimž budou potkani vystaveni. Tuto otázku jsme se pokusili zodpovědět pomocí aplikace MK-801 a testování v různých variantách úloh vyhýbání se místu na

rotující aréně. Tyto verze buď zahrnovaly konflikt dvou souřadnicových rámců, rámce arény a rámce místnosti (ve variantách vyžadujících kognitivní koordinaci), nebo byl přítomný pouze jeden rámec, popř. oba rámce, které však poskytovaly stejnou informaci. Dále jsme stanovili podobnost neuronálních reprezentací v různých prostředích. Tato neuronální aktivace byla mapována pomocí techniky molekulárního zobrazování exprese časného genu *Arc* (prostřednictvím speciální varianty fluorescenční in situ hybridizace, označované jako *cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization* čili *catFISH*). Výsledky ukázaly, že vyšší dávka MK-801, avšak nikoliv dávka nižší, selektivně postihuje právě varianty vyhýbání se místu, ve kterých je přítomen konflikt souřadnicových rámců. Dále se ukázalo, že vyšší dávka MK-801 zvyšuje podobnost (angl. similarity score) neuronálních reprezentací v oblasti CA1 hipokampu po expozici dvou odlišným prostředím. To poukazuje zjednodušeně řečeno na neschopnost odlišovat relevantní a irelevantní informace v tomto modelu a také, na úrovni neuronálních reprezentací, na změněné kódování různých prostředí, které může být podkladem této neschopnosti. Výsledky představují významnou podporu teorii hypersynchronie u schizofrenie, která navrhuje, že za řadu příznaků tohoto onemocnění může být zodpovědná zvýšená synchronie a patologická koaktivita mezi jednotlivými neuronálními reprezentacemi. Tato práce byla opublikována v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (**Kubik et al., 2014**).

Následující publikace (**Buchtová et al., 2016**) se zabývala do větších detailů právě funkční aktivací neuronálních reprezentací ve vybraných oblastech mozku zobrazenou pomocí techniky molekulárního zobrazování exprese časných genů metodou *catFISH*. Tato práce se zaměřila na oblasti CA3 a CA1 (*Cornu ammonis*) hipokampu a retrosplenální kůru (RSC), která představuje důležité funkční rozhraní mezi hipokampem a dalšími asociačními korovými oblastmi, např. zadní parietální kůrou. Studie využila opět behaviorální expozice potkanů dvěma odlišným prostředím a následně molekulárně genetické určení funkční aktivace, a to jak u kontrolních potkanů, kteří obdrželi injekci fyziologického roztoku, tak u potkanů, jimž bylo injikováno MK-801 v dávce 0,15 mg/kg. Výsledky ukázaly na funkční rozpojení mezi oblastmi CA3 a CA1 a na téměř kompletní ztrátu rozlišení v retrosplenální kůře, kdy v animálním modelu neurony v této oblasti vůbec daná dvě prostředí specificky nekódovaly. Tato práce byla vydána v prestižním oborovém časopise *Hippocampus*.

Animálních modelů schizofrenie je celá řada a kromě výše představeného modelu akutní experimentální psychózy se v naší laboratoři věnujeme také modelům založeným na

neurovývojové manipulaci, které mají vysokou konstrukční validitu vzhledem k předpokládanému neurovývojovému pozadí tohoto závažného onemocnění. Konkrétně jsme se v našich studiích zaměřili na geneticky modifikované potkany s konstitutivním snížením exprese proteinu Nogo-A pomocí techniky knockdown. Tato zvířata byla vyvinuta ve spolupráci se zahraničními pracovišti.

Nogo-A je inhibiční protein, který brzdí růst axonů a jehož exprese způsobuje kolaps růstového kužele axonu. Je jedním z proteinů celé kaskády faktorů potlačujících regeneraci a neuronální růst v dospělém mozku. Jeho funkční vyřazení vede u dospělých jedinců k lepšímu zotavení po poranění nervové tkáně a k obnově funkce. Tento fakt byl prozatím prokázán pouze v animálních modelech. Za zmínku však stojí, že protilátky proti Nogo-A jsou nyní ve fázi klinického testování i u lidských subjektů.

Vyřazení Nogo-A v zárodečných buňkách pomocí techniky knockdown a mRNA interference, a tudíž snížení jeho exprese ve vyvíjejícím se mozku, vede k neurovývojovým abnormalitám, jež mohou v dospělosti vyústit ve fenotyp schizofrenii-podobného chování. Transgenní potkany se sníženou expresí Nogo-A jsme zkoumali s ohledem na jejich fenotyp ve dvou studiích, otištěných v impaktovaných časopisech.

První studie (**Petrasek et al., 2014a**) otištěná v prestižním oborovém časopise *Neurobiology of Learning and Memory* využila dvou behaviorálních testů zaměřených na kognitivní funkce. Jednak protokol *delayed-matching-to-place* v Morrisově vodním bludišti a také protokol nazvaný „segregační baterie“ na rotující aréně. *Delayed-matching-to-place* varianta Morrisova vodního bludiště testuje jednak pracovní paměť a také persistenci paměťové stopy. Provádí se tak, že potkani hledají během čtyř plaveb v jednom dni skrytý ostrůvek, jehož poloha se každý den náhodně změní; mezi plavbami však zůstává stejná. Znamená to, že při první plavbě je vždy ostrůvek v unikátní nové pozici a potkan jej zpravidla během 60-sekundového limitu nenajde, či jej najde náhodou. Klíčovou je druhá plavba, ve které má zvíře za úkol si pamatovat polohu ostrůvku z plavby první, a tato druhá plavba následuje vždy buď po velmi krátkém intervalu po první (např. 30 s, pak jde o test pracovní paměti), nebo s delším odstupem (např. 30 či 90 minut; pak jde o test persistence paměťové stopy). Tato úloha představuje typ učení označovaný jako „učení na jeden pokus“ (angl. one-trial learning) a je vysoce závislá na funkční integritě středního spánkového laloku, zejména hipokampu.

Protokol segregální baterie představuje sérii postupně se ztěžujících variant úlohy vyhýbání se místu, kdy v úvodních verzích není přítomen konflikt rámců, v následujících verzích tento konflikt je, a v závěrečné verzi přibývá ještě nárok na behaviorální flexibilitu

způsobený změnou polohy zakázaného sektoru. Tento protokol jsme vyvinuli na našem pracovišti a představuje integraci jednotlivých variant této úlohy tak, jak byly představeny v publikaci Wesierské a kolegů (2005). Segregační baterie tedy také vyžaduje funkční integritu hipokampu (Wesierska et al., 2005), ale testuje především kognitivní koordinaci a flexibilitu, oproti vodnímu bludišti, které testuje především přesnou prostorovou reprezentaci (viz také Kubík a Fenton, 2005).

Výsledky této studie ukázaly, že potkani se sníženou expresí Nogo-A neměli oproti kontrolám změněné učení v Morrisově vodním bludišti v úloze vyžadující pracovní paměť a udržení paměťové stopy, avšak v segregační baterii na rotující aréně se jejich výkon s postupně se ztěžujícími nároky na segregaci rámců a prostorové přeučení (tedy vlastně kognitivní koordinaci a flexibilitu) progresivně zhoršoval. Největší deficit byl pozorován v závěrečné verzi vyžadující jak kognitivní koordinaci, tak behaviorální flexibilitu. To ukazuje, že genetická modifikace způsobující snížení exprese Nogo-A vede ke zhoršení těchto funkcí (koordinace a flexibility), zatímco pracovní paměť a přesná prostorové reprezentace ovlivněna není.

Následující práce otištěná v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience* využila jednodušší a zkrácenou variantu segregační baterie a navíc také testů anxiety a rovněž studovala změny cirkadiánní aktivity ve spolupráci s Dr. Alenou Sumovou (Petrasek et al., 2014b). Práce potvrdila komplexní kognitivní a behaviorální fenotyp tohoto modelu a ukázala také na paradoxní snížení anxiety u těchto potkanů. Tyto změny v emocionalitě a motivaci byly také potvrzeny našimi zahraničními partnery v nezávislé studii (Enkel et al., 2014). Ačkoliv jsme daleci toho říci, že knockdown Nogo-A vyvolává u potkanů schizofrenii (viz diskuse a popis animálních modelů obecně výše), koncept tohoto potkaního mutantu jako animálního modelu podporuje i skutečnost, že faktor Nogo-A byl v genomových asociačních studiích částečně vázán na schizofrenii, bipolární poruchu a další neuropsychiatrická onemocnění (Novak a Talerico, 2006).

Závěrem bychom rádi představili translační studii, která vznikla ve spolupráci týmu uchazeče ve Fyziologickém ústavu AV ČR a týmu vedeného Dr. Ivetou Fajnerovou z Psychiatrického centra Praha (dnes Národní ústav duševního zdraví, Klecany). Tato práce (Fajnerová et al., 2014), která představovala završení společného projektu Ministerstva zdravotnictví, si dala za cíl převést kognitivní testy představené v odstavcích výše, tedy aktivní vyhýbání se místu a Morrisovo vodní bludiště, do virtuální reality a pomocí těchto virtuálních testů studovat pacienty s první epizodou schizofrenie. Oba testy se podařilo úspěšně implementovat do prostředí virtuální reality. Následně bylo v sadě těchto úloh

otestováno několik desítek pacientů se schizofrenií a kontrolních subjektů. Výsledky této přelomové studie ukázaly jasný deficit v obou zmíněných typech virtuálních úloh. Tato publikace byla otištěna v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience* a již byla několikrát citována. Nálezy obsažené v této studii významným způsobem podporují validitu námi testovaných animálních modelů a rovněž významně podporují translační validitu samotných přístupů k testování kognitivních funkcí, tedy aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně a Morrisova vodního bludiště, pro studium kognitivního deficitu doprovázejícího zmíněné modely, neboť analogický deficit byl pomocí těchto testů, resp. jejich virtuálních verzí, zjištěn i u skutečných pacientů se schizofrenií.

Obsedantně kompulzivní porucha

Obsedantně kompulzivní porucha (angl. *obsessive-compulsive disorder*, OCD) je závažné neuropsychiatrické onemocnění s celoživotní prevalencí 2-3%. Mezi typické příznaky této nemoci patří vtíravé, opakující se, a obtěžující myšlenky (obsese), které způsobují pacientovi distres (Stein, 2002). Dále jsou pro toto onemocnění charakteristické kompulze, tj. ritualizované formy chování, které jsou zpravidla vykonávány s cílem snížit úzkost vyvolanou přítomností obsesí. U některých pacientů se vyskytují pouze obsese či pouze kompulze. Velmi častá je současná přítomnost jiných psychiatrických onemocnění, typické a velmi časté komorbidity OCD představují porucha pozornosti spojená s hyperaktivitou (angl. *attention deficit/hyperactivity disorder*, ADHD) a tiková onemocnění jako např. Touretteův syndrom (mnohočetná tiková porucha) (Stein, 2002). Léčbou první volby v případě OCD jsou selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (angl. *selective serotonin-reuptake inhibitors*) a psychoterapie, zejména kognitivně behaviorální terapie (KBT). U některých pacientů je užíván také klomipramin, tricyklické antidepresivum.

Námi využitý animální model obsedantně kompulzivní poruchy spočíval v sensitizaci dopaminových D2-like receptorů (podtypů D2/D3/D4) pomocí specifického agonisty quinpirolu. Tento model byl vyvinut kanadským badatelem Henry Szechtmanem (Szechtman et al., 1998; 2001) a je založen na opakovaném subkutánním podávání této látky. Potkani vystaveni tomuto působení vykazují v aréně otevřeného pole s vloženými objekty zvláštní formy chování. V prostoru, kde se pohybují, je několik objektů, ke kterým se zvíře vrací mnohem častěji než k jiným. K těmto vybraným objektům se vrací po mnohem kratší době. Mezi jednotlivými návštěvami preferovaných objektů nenavštíví příliš mnoho ostatních. Na preferovaných místech pak provádí určité „rituály“ (např. šplhání na objekt a jeho přeskokování), odlišné od těch, které jsou prováděny na jiných místech arény. Prediktivní validitu tohoto modelu podporuje fakt, že systémová aplikace

tricyklického antidepresiva klomipraminu potlačuje toto ritualizované chování. Tato etologická kritéria byla již validována pomocí studie na lidských pacientech s OCD, a byla shledána jejich platnost i u člověka (*Eilam et al., 2012*).

V našich experimentech jsme se zabývali otázkou, jakým způsobem je u modelu sensitizace dopaminových receptorů quinpirolem postižena schopnost učení, kognitivní koordinace a behaviorální flexibility. Já známo, že u OCD dochází k subtilním, ale přesto významným poruchám kognitivních funkcí, především právě behaviorální flexibility. V úvahy by dokonce padala myšlenka, že narušení behaviorální flexibility by mohlo zodpovídat za stav setrvávání v kompulzích a určitou rigiditu chování, které je u tohoto onemocnění často pozorována.

V našich studiích jsme se u tohoto animálního modelu vyvolaného opakovaným podáváním quinpirolu zaměřili na behaviorální flexibilitu testovanou v úloze aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně. První práce (**Hatalova et al., 2014**) se zaměřila na změny pružnosti chování u zvířat jednak kontrolních a jednak sensitizovaných quinpirolem. U experimentální skupiny jsme ještě zvlášť otestovali jedince pod akutním vlivem látky a bez tohoto vlivu. Výsledky ukázaly, že u sensitizovaných zvířat pod akutním vlivem látky dochází k významnému zhoršení schopnosti přeučení se na novou polohu zakázaného sektoru. Toto zhoršení se projevilo pouze v prvním sezení po změně této polohy, avšak bylo statisticky významné. U sensitizovaných zvířat bez akutního vlivu látky jsme pozorovali subtilnější změnu přeučení, která se projevila jinou časovou dynamikou v jednotlivých fázích po změně polohy sektoru. Tento výsledek jasně dokumentuje alteraci behaviorální flexibility v tomto modelu a publikace byla otištěna v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

Z důvodu otestování prediktivní validity tohoto modelu jsme provedli následující studii. Tato studie, vydaná v časopise *Behavioural Brain Research*, se zaměřila na vliv léčiv používaných u OCD na deficit kognitivní flexibility v tomto modelu. Otestovali jsme tricyklické antidepresivum klomipramin, používaný u některých pacientů, a také risperidon, atypické antipsychotikum používané jako doplňková farmakoterapie u resistantních pacientů společně s antidepresivy. Výsledky této studie ukázaly, že klomipramin podaný společně s quinpirolem způsobuje významný kognitivní deficit, kdy zvířata nebyla schopna se úlohu naučit a jejich špatná výkonnost v osvojení si úlohy ani neumožnila otestovat přeučení. Naopak společná aplikace klomipraminu a risperidonu ukázala, že takto ošetřená zvířata byla schopna se naučit jak úlohu, tak test flexibility, tedy paradigma přeučení (**Hatalova et al., 2016**). Zjištění, že klomipramin způsobuje v tomto animálním

modelu výrazný kognitivní deficit, významným způsobem mění náš pohled na zmírnění kompulzivní kontroly pomocí klomipraminu v testu otevřeného pole s vloženými objekty (Szechtman et al., 2001), protože tento nálezn je díky našemu zjištění možno interpretovat také jako prostou neschopnost si konfiguraci objektů pamatovat a efektivně se mezi nimi orientovat než jako samotné zmírnění ritualizované kontroly. To poněkud oslabuje prediktivní validitu tohoto modelu. Naopak pozitivní účinek současné aplikace klomipraminu a risperidonu na deficit přeučení v tomto modelu prediktivní validitu podporuje, protože právě aplikace antipsychotik a antidepresiv je často u OCD úspěšně využívána.

Závěrem stojí za připomenutí přehledový článek (Stuchlík et al., 2016), vydaný v časopise *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, který přehledně shrnuje současné poznatky o quinpirolovém modelu OCD. Tato práce diskutuje neurobiologické změny u OCD a v animálním modelu. Jinými slovy, článek diskutuje vztah mezi neurobiologií OCD a změnami v mozku, nalezenými v modelu, a také kriticky hodnotí validity tohoto modelu a vytyčuje další směry výzkumu. Z diskuse těchto poznatků vyplývá, že model OCD založený na sensitizaci quinpirolem má velmi solidní fenomenologickou validitu, dobrou konstrukční validitu, ale nálezy a experimenty testující validitu prediktivní poskytnuly výsledky spíše rozporuplné. Tato práce byla opublikována ve spolupráci badatelů z Fyziologického ústavu AV ČR a Národního ústavu duševního zdraví.

Alzheimerova nemoc a demence

Další neuropsychiatrickou poruchou, kterou se intenzivně zabýváme, je Alzheimerova nemoc (angl. *Alzheimer's disease*; AD). Alzheimerova nemoc je neurodegenerativní onemocnění, klinicky se projevující jako demence s postižením několika základních domén: poznávacích funkcí, schopnosti vykonávat běžné aktivity denního života a chování, spánku a také emotivity. Mezi významné neurobiologické změny doprovázející Alzheimerovu nemoc patří přítomnost specifických nálezů, detekovaných zpravidla post mortem v mozku zesnulých pacientů. Jedná se o intracelulární senilní plaky (angl. *senile plaques*), tvořené polymerním amyloidem-beta a extracelulární neurofibrilární klubíčka (angl. *neurofibrillary tangles*), tvořená bílkovinou *tau*. Ohledně původu a časového průběhu se u AD rozlišují dva základní podtypy: familiální forma (forma s časným začátkem) způsobená genetickými predispozicemi a forma sporadická, typicky se objevující po 65. roce věku, jejíž příčina je nejasná. Alzheimerova nemoc je nevléčitelná, stávající formy terapie pouze mírně zpomalují její progresi a působí na některé symptomy. Mezi používaná léčiva patří především inhibitory acetylcholinesterázy (např. donepezil). U

mírnějších forem se používá také nízkoafinitní non-kompetitivní antagonist NMDA receptorů memantin. V současné době je v klinických testech řada nových přípravků, včetně protilátek.

Animální modely AD jsou založeny opět na hledání přístupů a nástrojů sloužících především k objasnění mechanismů patogeneze této choroby, která je neznámá. Existuje velké množství transgenních myší (a dnes už také potkanů, ač v menší míře), které mají v genomu zaneseny některé ze zmíněných patologických bílkovin či jiné mutace. Dále se využívá aplikace farmak, např. cholinergních antagonistů, amyloidu, apod.

V naší laboratoři se zaměřujeme především na behaviorální a kognitivní deficity v těchto animálních modelech. Studovali jsme především rychlý screeningový animální model kognitivního deficitu podobného demenci vyvolaný skopolaminem, dále farmakologický model sporadické formy AD (Samaritan™), založený na intracerebroventrikulární aplikaci amyloidu-beta a pro-oxidativních substancí, a v poslední době také McGill transgenní kmen potkanů (McGill-R-Thy1-APP).

První studie (**Vales a Stuchlik, 2005**) studovala screeningový model demence založený na systémové aplikaci skopolaminu, antagonisty muskarinového podtypu acetylcholinových receptorů. Studie využila dvou dávek skopolaminu (1 a 2 mg/kg). Tato práce ukázala, že aplikace tohoto farmaka vyvolává v úloze aktivního vyhýbání se místa na rotující aréně behaviorální deficit, u kterého je patrná mírná hyperlokomoce a neschopnost vyhýbat se zakázané oblasti. Pozoruhodné bylo, že tato neschopnost se učit nebyla odstraněna ani předtrénováním v úloze bez vlivu látek. Specificky, potkani byli nejprve naučeni během čtyř dvacetiminutových denních sezení se oblasti vyhýbat a pátý den byl proveden test vybavení pod vlivem látky. Obě dávky se v tomto testu negativně projevily. Následujících pět sezení proběhlo v odlišném prostředí, na podobné aréně, avšak umístěné v jiné místnosti. Zde se na chování nepříznivě projevil pouze účinek vyšší dávky skopolaminu. Tato práce byla vydána v časopise *Behavioural Brain Research*.

Další studie se zaměřila, podobně jako v animálním modelu schizofrenie, na srovnání dvou outbredních kmenů laboratorních potkanů, kmenů Long-Evans a Wistar z chovů Fyziologického ústavu, na citlivost ke skopolaminu ve dvou kognitivních úlohách, tedy aktivním vyhýbání se místu a Morrisově vodním bludišti (**Entlerova et al., 2013**). Práce otestovala potkany v obou úlohách, a to jak zvířata kontrolní, která dostala injekci fyziologického roztoku, a experimentální zvířata, která dostala injekci skopolaminu. Práce odhalila statisticky významně zvýšenou citlivost potkanů kmene Wistar v úloze aktivního vyhýbání se místu. Zajímavým bylo zjištění, že ve verzi Morrisova vodního bludiště

zaměřené na dlouhodobou paměť mezi jednotlivými kmeny nebyl pozorován žádný rozdíl v citlivosti na farmakum, zdá se tedy, že tento mezikmenový rozdíl je závislý na typu použité úlohy. Tato práce byla opublikována v časopise *Physiology & Behavior*. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že kmen Wistar je citlivější k aplikaci muskarinového antagonisty skopolaminu na rotující aréně.

Klíčovou otázkou ve studiu kognitivních deficitů v animálních modelech demencí je také translační validita behaviorálních testů, využitých ke studiu těchto funkcí. Následující studie (**Laczó et al., 2016**), přijatá v časopise *Psychopharmacology*, otestovala tuto validitu u úlohy hledání skrytého cíle, a to pomocí aplikace skopolaminu a donepezilu, využívaného v léčbě AD, a to jak potkanům kmene Wistar, tak zdravým lidským dobrovolníkům. U lidských dobrovolníků byl využit randomizovaný design s opakovaným testováním a tento design byl také upraven v Morrisově vodním bludišti do verze pro potkany, která zohledňovala rozdíly v učení mezi potkany a lidmi a také zrychlenou farmakokinetiku skopolaminu a donepezilu u potkanů. Výsledky této práce ukázaly, že v obou případech, tedy jak u potkanů, tak u lidí, skopolamin zhoršuje navigaci ke skrytému cíli ve zvoleném testu, a že donepezil jsem schopen tento deficit odstranit. Studie posloužila tedy jako proof-of-concept zmíněného behaviorálního přístupu za pomoci testu skrytého cíle a ukázala, že tento test prováděný s pomocí Morrisova vodního bludiště pro potkany a reálného bludiště pro lidské subjekty může být užitečným a spolehlivým nástrojem pro zjišťování účinku prokognitivních látek na prostorovou navigaci. Tento přístup může pomoci omezit nekonsistentní výsledky mezi preklinickými a klinickými fázemi vývoje nových léčebných přístupů pro AD a demence obecně a naznačuje, že tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnými funkcemi, které stávající úlohy testují.

V naší práci jsme se rovněž věnovali animálnímu modelu sporadické formy AD, založenému na aplikaci amyloidu-beta-42 a prooxidativních substancí konkrétně L-buthionin-(S,R)-sulfoximinu a heptahydrátu síranu železnatého, do mozkových komor potkana. Kontrolní skupině bylo aplikováno pouze inaktivní rozpouštědlo bez farmak. Tento model (*Lecanu et al., 2006*) byl patentován firmou Taconic™ jako model Samaritan™ a naše zvířata byla připravena právě touto společností. My jsme potkany otestovali v kognitivních úlohách a spolupracovnice z Psychiatrického centra Praha (dnes Národní ústav duševního zdraví, Klecany), provedly biochemickou analýzu mozkové tkáně odebrané post mortem, zaměřenou na glutamatergní a cholinergní systém. Na rotující aréně byl využit protokol vyžadující jak kognitivní koordinaci, tak kognitivní flexibilitu (osvojení a přeučení se poloze zakázaného sektoru. Ve vodním bludišti jsme využili verzi

pro dlouhodobou paměť a po ní byl zařazen testovací pokus (angl. *probe trial*), při kterém byl ostrůvek z bazénku vyjmut, a byla měřena preference pro cílové místo. Na rotující aréně jsme pozorovali deficit především v počátečním osvojovacím učení, rozdíl mezi skupinami v přeuení vyžadujícím flexibilitu nebyl statisticky významný. V Morrisově vodním bludišti jsme pozorovali také významné zhoršení experimentální skupiny oproti skupině kontrolní, které se projevilo také při testovací plavbě. V kontrolní verzi vodního bludiště s viditelným ostrůvkem nedosáhl deficit statistické významnosti. Biochemické nálezy zahrnovaly signifikantní změny v hladinách NR2A podjednotky NMDA receptoru a také v aktivitě CHT1 acetylcholinového transportéru, které korespondovaly se změnami nalezenými u pacientů v raných stádiích Alzheimerovy nemoci (Slotkin et al., 1990). Tyto výsledky tedy významně posílily fenomenologickou a konstrukční validitu tohoto modelu a pomohly jej definovat jako spolehlivý animální model sporadické formy Alzheimerovy nemoci. Práce byla vydána ve *Frontiers in Aging Neuroscience* (Petrasek et al., 2016).

V naší práci jsme se rovněž zaměřili transgenní model Alzheimerovy nemoci, McGill transgenní potkany (viz výše). U tohoto kmene jsme pomocí variant úlohy aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně popsali velmi selektivní deficit kognitivní koordinace a behaviorální flexibility. V Morrisově vodním bludišti jsme pozorovali selektivní deficit persistence paměťové stopy. Transgenní potkani vykazovali rovněž oproti kontrolám změny v emocionalitě. Tyto výsledky jsou nyní zpracovávány a připravovány pro publikování (Petrasek et al., v přípravě).

Stručné vyjádření základních metod

Zvířata a operace

Ve studiích byli použiti dospělí laboratorní potkani (převážně samci) kmenů Long-Evans, Wistar, Sprague-Dawley a transgenní potkani s konstitutivním snížením exprese proteinu Nogo-A, vyvinutí na pozadí kmene Sprague-Dawley. Dále jsme použili transgenní McGill potkany jako model Alzheimerovy nemoci. Potkani (200-500g) byli ustájeni v klimatizovaném příručním zvěřinci s konstantní teplotou, vzdušenou vlhkostí a pravidelným rytmem světla tma (12hoh/12hod). Přístup k pitné vodě byl vždy *ad libitum*, přístup k potravě byl také volný, anebo, v experimentech zahrnujících potravní odměny, byl snížen tak, aby zvířata dosáhla 85-90% své původní hmotnosti. Potkanům, kteří byli testováni v úloze aktivního vyhýbání se místu či vyhýbání se robotovi, byla implantována do podkoží jehla, jejíž konec byl odlomen a zatočen do malé smyčky, která bránila

vyklouznutí a poskytovala upevnění pro malý aligátorový klip, který přiváděl mírné elektrické ranky (0,2-0,6 mA) přes uzemněnou podlahu arény.

Potkani, u nichž byl studován neurobiologický substrát paměťové stupy, prodělali implantace vodících kanyl do hipokampu. Zvířata byla uvedena do celkové anestézie a upevněna do stereotaxického přístroje. Po incizi a očištění lebky byly zubařskou vrtačkou vyvrtány otvory nad hipokampem o průměru 1 mm, skrze které byla implantována tato vodící kanyla do hipokampu dle stereotaxického atlasu (*Paxinos a Watson, 2005*), která byla následně zafixována dentální akrylátem a kotvícími šroubky v čelní kosti fixována k lebce. Následovala perioda zotavení trvající nejméně jeden týden s pečlivou denní kontrolou stavu zvířat a monitorováním jejich zdravotního stavu. Na rány byla jemně aplikována antiseptika a do pitné vody byla přidávána analgetika. V případě, že byla prováděna permanentní léze zadní parietální kůry (Svoboda et al., 2008; 2015), byla zvířata po celkové anestézii opět umístěna do stereotaxického aparátu a po očištění lebky a otevření trepanačních otvorů nad touto korovou oblastí byla jemným hrotem mikropájkou provedena termokoagulační léze. Tato procedura byla etablována v řadě laboratoří a je publikována v odborné literatuře (*Save a Poucet, 2009*).

Chemikálie a farmaka

Ve studiích bylo použito psychotomimetikum MK-801 (*dizocilpine maleate*; SigmaAldrich, ČR) tato látka bylo rozpouštěna ve fyziologickém roztoku v adekvátních koncentracích a injikována intraperitoneálně v dávkách popsanych v jednotlivých studiích, a to 30 min před behaviorálním testováním. Dále byl využit quinpirol (*quinpirole hydrochloride*; Tocris, USA), agonista dopaminových D2-like receptorů, a to v dávce 0,5 mg/kg. Tato látka byla rozpuštěna také ve fyziologickém roztoku a injikována subkutánně 30 min před započítím behaviorálního testování. Posledním využitým farmakem byl skopolamin (*scopolamine hydrobromide*, SigmaAldrich, ČR). Tato látka byla potkanům aplikována v dávkách 0,8 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg, opět 30 minut před behaviorálním testováním. V modelu Samaritan, který zahrnoval chronickou intracerebroventrikulární aplikaci amyloidu-beta a pro-oxidativních substancí, jsme využili zvířata již připravená firmou Taconic a tudíž přípravu modelu v tomto krátkém přehledu metodiky neuvádíme. K intracerebroventrikulárním infúzím do hipokampu byly použity blokátor napěťové závislých sodíkových kanálů tetrodotoxin a muscimol.

Behaviorální procedury

Aktivní vyhýbání se místu na rotující aréně

Rotující aréna byla vynalezena na našem pracovišti na samém konci 20. století (*Bures et al., 1997; Fenton et al., 1998; Stuchlík et al., 2001*). Aparatura pro vyhýbání se místu sestává z kruhovitěho kovového disku, který se může otáčet libovolnou rychlostí až do 2 otáček/min a který je ohraničen průhlednou stěnou z Plexiskla. Aréna je vyvýšena 1 m nad povrchem experimentální místnosti, ve které se nachází řada orientačních bodů. Na aréně je sledovacím systémem vymezen přímo neoznačený (tedy „neviditelný“) sektor, jehož navštívení je potrestáno mírnou elektrickou rankou. Potkan má mezi předními končetinami („na ramenou“) umístěn latexový postrojek, který nese infračervenou LED diodu a drátek zapojený do subkutánní jehly (viz kapitola výše), skrze nějž jsou udílány mírné elektrické ranky o konstantním proudu regulovatelném v rozmezí 0,2 -0,6 mA. Elektrický proud pak prochází na uzemněnou podlahku, a protože největší napěťový spád je na zrohovatělých končetinách v kontaktu s uzemněnou podlahkou, percepce elektrické ranky je právě nejvýraznější patrně v oblasti končetin. Infračervená kamera je umístěna na stropě místnosti a snímá jednak infračervenou LED diodu na zvířeti, tak LED diodu na periférii arény, které se otáčí společně s ní. Tím umožňuje získat, zobrazit a uložit trajektorii potkana jednak v reálném souřadnicovém systému místnosti, tak zároveň ve „virtuálním“ obrazu arény, tato trajektorie by se dala připodobnit k obrazu hypotetické kamery, která by se otáčela společně s arénou. Přesná intenzita elektrických ranek je pro každé zvíře nastavena individuálně tak, aby vyvolal rychlou únikovou reakci po vstupu do sektoru. Potkani jsou ve vyhýbání se místu trénováni zpravidla v denních sezeních (tedy jedno sezení denně) trvajících obvykle 20 min a prováděných v intervalu 24 hod.

Morrisovo vodní bludiště

Morrisovo vodní bludiště (*Morris 1981; 1984, Stuchlík et al., 2007*) představuje kruhový bazének o průměru 180 cm, natřený šedou akrylátovou barvou, umístěný opět v místnosti plné různorodých orientačních bodů (zaslepená okna, dveře, police, plakáty na stěnách). Bazén je naplněn vodou bíle zakalenou netoxickou barvou. V bazénku je umístěn průhledný ostrůvek, který je zanořený 1 cm pod hladinou. Potkan je při každé plavbě jemně umístěn do vody u stěny bazénku čelem k ní. Pokud do 30 či 120 sekund ostrůvek nenajde, je k němu po uplynutí této doby naveden. Nad bludištěm je opět umístěna kamera, která snímá trajektorii potkana a digitalizuje ji pro následné uložení do počítače. Úloha existuje v několika základních modifikacích:

Ve verzi pro dlouhodobou paměť je ostrůvek umístěn každý den na stejném místě a potkan absolvuje čtyři, popř. osm plaveb z náhodných míst na jeho okraji, zpravidla po dobu čtyř nebo pěti dnů. Tato úloha testuje postupné (inkrementální) učení a dlouhodobou paměť.

Ve verzi *delayed-matching-to-place*, ve které je testována pracovní paměť a persistence paměťové stopy, je ostrůvek každý den v nové unikátní pozici a proto je při první plavbě najde pouze náhodou či jej během vymezeného časového intervalu nenajde a je k němu naveden. Klíčová je pak latence k nalezení ostrůvku ve druhé plavbě. Ta následuje buď po velmi krátké době (např. 15 s, pak jde o test pracovní paměti) nebo po době delší, např. 90 min; pak jde o test persistence paměťové stopy. Další dvě plavby, tedy třetí a čtvrtá, slouží v tom uspořádání pouze pro fixaci strategie hledat v rámci dne ostrůvek v stejném místě.

Dalším speciálním protokolem pro testování v MWM je tzv. *probe trial* (dalo by se přeložit jako testovací či slepá plavba; český ekvivalent doposud v literatuře neexistuje). V této úloze je ostrůvek z vody vyjmut, potkan se vypustí, a v jeho trajektorii se sleduje preference pro cílový kvadrant bazénku, popř. i přímo pro místo, kde se ostrůvek předtím během předchozího tréninku nalézal. Statisticky se pak pracovává většinou procento celkového času strávené v daném kvadrantu, popř. počet proplutí místem, na které byl ostrůvek. *Probe trial* je citlivým měřítkem retence paměťové stopy.

Další a kontrolní procedurou v MWM je potom test viditelné platformy. Ten slouží k tomu, aby bylo možno vyloučit motivační, senzomotorické, či jiné defekty vyvolané danou experimentální manipulací. Tato varianta se provádí tak, že je ostrůvek vynořen zhruba 1 cm nad hladinu a zpravidla i nějak viditelně označen, např. pruhovaným prstencem nebo balónkem zavěšeným nad ním. Díky tomu je možno, pokud např. nalezneme deficit ve verzi pro dlouhodobou paměť po inaktivaci mozkové struktury, zopakovat test i s viditelnou platformou a v tomto testu by pak výkonnost měla být zachována; jediné tak se jedná o „čistě kognitivní“ deficit.

V této disertaci byly ještě okrajově použity další kognitivní úlohy a testy na anxieta zvířat, pro zachování koherence tohoto textu najde čtenář jejich přehled v konkrétních originálních studiích, jež jsou součástí tohoto textu.

Molekulární zobrazování exprese časných genů pomocí techniky *catFISH*.

Po posledním testovacím sezení byli potkani po anestézii v parách isofluranu a jejich mozky byly zpracovány metodou *catFISH* pro značení časného genu *Arc*. Rychle byly

vyňaty mozky, bleskově zmrazeny a uloženy v mraznici při -80°C . Mozky byly poté nakrájeny na kryostatu Leica CM1850 na řezy tenké 20 μm . Poté byly umístěny na sklíčka Superfrost (Fisher, Czech Republic). Tkáň byla zpracována na sklíčkách pro fluorescenční *in situ* hybridizaci s *antisense* probami pro časný gen *Arc* označenými fluoresceinem, detekovaným protilátkou proti fluoresceinu, konjugovanou s křenovou peroxidázou (Jackson Labs, USA), a vizualizovány pomocí tyramidového amplifikačního kitu (Perkin-Elmer, USA). Obrázky s desetinásobně zvětšenými oblastmi zájmu (CA1, CA3, RSC) byly snímány na fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 a analyzovány pomocí speciálního makra v programu ImageJ (NIH, USA). Kontrolní vizualizace genů *Homer1a* or *zif268* byla prováděna podle publikovaných protokolů (např. *Salvat et al., 2011; Kubik et al., 2011*).

Statistická analýza

Behaviorální a neurofyziologické výsledky byly hodnoceny Studentovým t-testem pro jeden či dva výběry, jedno- či více-faktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) s opakovanými měřeními, pokud to bylo třeba, a s následným Tukeyho či Newman-Keulsovým *post hoc* testem. Při přítomnosti mnohočetných porovnávání byla provedena Bonferroniho korekce. Data byla před hodnocením testována na normalitu distribuce Kolmogorovovým-Smirnovovým testem a také na shody rozptylu. Při výrazných odchylkách od normálního rozložení byla data korektně transformována (*log*, *ln*). Data v grafech zpravidla znázorňují průměry a střední chyby průměru (S.E.M.), v případech nenormálních rozložení někdy i mediánem a konfidenčními intervaly. Počet subjektů ve skupinách vycházel obecně s hodnocení síly testů a zpravidla se pohyboval mezi 8-14 subjekty. Za statisticky významné byly považovány výsledky testů na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$.

Stručné vyjádření závěrů disertace

Předložená práce ukazuje některé nově vyvinuté behaviorální a kognitivní testy určené pro studium prostorové navigace v dynamickém prostředí, kognitivní koordinace a behaviorální flexibility. Práce rovněž představuje větev výzkumu zabývající se nervovým mechanismem těchto funkcí, zaměřenou na hipokampus a vybrané korové oblasti mozku. V oblasti výzkumu zaměřené na kognitivní a další deficity u neuropsychiatrických onemocnění jsme se pak snažili představit narušení těchto funkcí a jejich různých aspektů v případě schizofrenie, obsedantně kompulzivní poruchy a Alzheimerovy nemoci a modelů demencí obecně. V této rovině byly využity zejména animální modely těchto onemocnění, ale byly přestaveny také některé translační studie s využitím lidských subjektů. Právě

v translační validaci našich tesů, přenositelnosti výsledků na klinické soubory, a využití inovativních metod, jako např. optogenetiky, *in vivo* zobrazování, molekulárního značení časných genů a molekulárně-biologických a elektrofyziologických metodik obecně spatřujeme naše perspektivy pro budoucí výzkum. Vzhledem k tomu, že kognitivní deficity doprovázejí řadu neuropsychiatrických onemocnění a že neznáme jejich pravou příčinu, ani je nedokážeme odpovídajícím způsobem léčit, klademe si za cíl pomocí biomedicínského základního a orientovaného výzkumu tyto mezery v našich znalostech zaplnit a v konečném důsledku tak pomoci samotným pacientům.

Summary of the thesis - Resumé tézí

Navigating in highly dynamic world is an important cognitive domain. Such ability probably consists of multiple processes efficiently encoded by animal brain. These processes comprise of recognition of position of objects, cognitive coordination, behavioral flexibility, representation of dynamic objects, continuous updating of moving features, and others. This thesis is focused on the navigation in dynamic environments, cognitive coordination and behavioral flexibility in healthy and disordered brain.

The first part of the thesis discusses the development of several novel behavioral tasks aimed at spatial cognition in the dynamic world, such as the Enemy avoidance task and recognition of objects' positions in an inaccessible space (a computer monitor). It also summarizes studies focused on the neural substrate of these dynamic navigation, cognitive coordination and behavioral flexibility, specifically the involvement of the hippocampus and posterior parietal cortex. We have discovered a specific role of the hippocampus in continuous updating of moving world experiences and navigation to/from visible goals and in recognition of positions of objects located in an inaccessible space. We have also studied the role of the posterior parietal cortex on the navigation and flexibility in the active and passive place avoidance tasks on a rotating arena, and found subtle, yet significant impairments in various forms of flexibility and set-shifting. Moreover, we present a few review papers focused on the usability of our cognitive tasks in studying brain disorders and a review paper focused on the relation of dynamic memory, synaptic plasticity (mainly the long-term potentiation) and adult neurogenesis.

The second part of the thesis shows the results obtained with cognitive and neurophysiological studies in animal models of psychosis and schizophrenia, specifically the experimental psychosis induced by MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA

receptors, and a model of Nogo-A knockdown transgenic rats displaying neurodevelopmental abnormalities resembling schizophrenia-like behaviors. In MK-801-treated rats, significant disruptions of place navigation, cognitive coordination, spatial working memory, spatial reference memory, and behavioral flexibility (reversal learning and set-shifting) were observed. We also described deficits in neural signal processing detected by molecular imaging of immediate-early genes as markers of preceding neuronal activity, specifically in the hippocampus and retrosplenial cortex. In Nogo-A knockdown transgenic model of developmental abnormalities, we elucidated deficits in cognitive coordination and behavioral flexibility on the rotating arena, but no impairment in the spatial working memory and memory trace persistence in the delayed-matching-to-place version of the Morris water maze. Additionally, subtle but significant alterations in circadian timing and anxiety were revealed. Finally, a paper involving clinical research on the patients with schizophrenia tested with virtual version of our tasks has been published.

The third part of the thesis deals with the studies of cognitive coordination and behavioral flexibility in an animal model of obsessive-compulsive disorder induced by behavioral sensitization of rats to quinpirole, an agonist of the D2-like dopamine receptors. Beside marked hyperlocomotion, specific deficits in behavioral flexibility in active place avoidance task were observed. Response of this model to the treatment with a tricyclic antidepressant clomipramine and atypical antipsychotic risperidone was also assessed. Result showed that clomipramine severely disrupts learning in this animal model, which has implications for predictive validity of it. However, addition of risperidone rescued learning, confirming its beneficial effects in obsessive-compulsive disorder. The final part of the thesis shows results from animal models of Alzheimer's disease and cognitive decline in dementia, mainly the cognitive studies with scopolamine, pharmacological model of sporadic form of Alzheimer's disease (SamaritanTM) and McGill transgenic model of AD.

In summary, this thesis shows a long-term interest of the applicant in the cognitive deficits associated with animal models of neuropsychiatric disorders and their mechanisms. It is a coherent set of impacted papers in renowned journals. Additionally an e-book has been published by Frontiers Media, edited by the applicant, which directly focused on the cognitive deficits in brain disorders in both rodents and humans.

Seznam vlastních vědeckých prací, které jsou podkladem disertace (řazene tématicky)

Dynamická navigace

Telensky P, Svoboda J, Pastalkova E, Blahna K, Bures J, Stuchlik A. Enemy avoidance task: a novel behavioral paradigm for assessing spatial avoidance of a moving subject. *J Neurosci Methods*. 2009; **180**: 29-33.

Telensky P, Svoboda J, Blahna K, Bureš J, Kubik S, Stuchlik A. Functional inactivation of the rat hippocampus disrupts avoidance of a moving object. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; **108(13)**: 5414-5418.

Levcik D, Nekovarova T, Stuchlik A, Klement D. Rats use hippocampus to recognize positions of objects located in an inaccessible space. *Hippocampus*. 2013; **23(2)**: 153-161.

Svoboda J, Telensky P, Blahna K, Zach P, Bures J, Stuchlik A. Lesion of posterior parietal cortex in rats does not disrupt place avoidance based on either distal or proximal orienting cues. *Neurosci Lett*. 2008; **445(1)**: 73-77.

Svoboda J, Telensky P, Blahna K, Vodicka M, Stuchlik A. The role of rat posterior parietal cortex in coordinating spatial representations during place avoidance in dissociated reference frames on a continuously rotating arena (Carousel). *Behav Brain Res*. 2015; **292**: 1-9.

Stuchlík A, Petrásek T, Prokopová I, Holubová K, Hatalová H, Valeš K, Kubík S, Dockery C, Wesierska M. Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory. *Physiol Res*. 2013; **62(1)**: S1-S19.

Stuchlik A, Kubik S, Vlcek K, Vales K. Spatial navigation: implications for animal models, drug development and human studies. *Physiol Res*. 2014; **63(1)**: S237-S249.

Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci*. 2014; **8**: 106.

Schizofrenie

Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci Lett*. 2004; **366(2)**: 162-166.

Stuchlík A, Vales K. Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. *Behav Brain Res*. 2005; **159(1)**: 163-171.

Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci Res*. 2006; **55(4)**: 383-388.

Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; **105(3)**: 1061-1066.

Vales K, Svoboda J, Benkovicova K, Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A. The difference in effect of mGlu2/3 and mGlu5 receptor agonists on cognitive impairment induced by MK-801. *Eur J Pharmacol*. 2010; **639(1-3)**: 91-98.

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

Zemanova A, Stankova A, Lobelova V, Svoboda J, Vales K, Vlcek K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. Visuospatial working memory is impaired in an animal model of schizophrenia induced by acute MK-801: an effect of pretraining. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; **106**: 117-123.

Vojtechova I, Petrasek T, Hatalova H, Pistikova A, Vales K, Stuchlik A. Dizocilpine (MK-801) impairs learning in the active place avoidance task but has no effect on the performance during task/context alternation. *Behav Brain Res*. 2016; **305**: 247-257.

Svoboda J, Stankova A, Entlerova M, Stuchlik A. Acute administration of MK-801 in an animal model of psychosis in rats interferes with cognitively demanding forms of behavioral flexibility on a rotating arena. *Front Behav Neurosci*. 2015; **9**: 75.

Kubík S, Buchtová H, Valeš K, Stuchlík A. MK-801 Impairs Cognitive Coordination on a Rotating Arena (Carousel) and Contextual Specificity of Hippocampal Immediate-Early Gene Expression in a Rat Model of Psychosis. *Front Behav Neurosci*. 2014; **8**: 75.

Buchtová H, Fajnerová I, Stuchlík A, Kubík Š. Acute systemic MK-801 induced functional uncoupling between hippocampal areas CA3 and CA1 with distant effect in the retrosplenial cortex. *Hippocampus*. 2016.

Petrasek T, Prokopova I, Bahník S, Schonig K, Berger S, Vales K, Tews B, Schwab ME, Bartsch D, Stuchlik A. Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem*. 2014; **107**: 42-49.

Petrasek T, Prokopova I, Sladek M, Weissova K, Vojtechova I, Bahník S, Zemanova A, Schönig K, Berger S, Tews B, Bartsch D, Schwab ME, Sumova A, Stuchlik A. Nogo-A-deficient Transgenic Rats Show Deficits in Higher Cognitive Functions, Decreased Anxiety, and Altered Circadian Activity Patterns. *Front Behav Neurosci*. 2014; **8**: 90.

Fajnerová I, Rodriguez M, Levčík D, Konrádová L, Mikoláš P, Brom C, Stuchlík A, Vlček K, Horáček J. A virtual reality task based on animal research - spatial learning and memory in patients after the first episode of schizophrenia. *Front Behav Neurosci*. 2014; **8**: 157.

Obsedantně-kompulzivní porucha

Hatalova H, Radostova D, Pistikova A, Vales K, Stuchlik A. Spatial reversal learning in chronically sensitized rats and in undrugged sensitized rats with dopamine d2-like receptor agonist quinpirole. *Front Behav Neurosci*. 2014; **8**: 122.

Hatalova H, Radostova D, Pistikova A, Vales K, Stuchlik A. Detrimental effect of clomipramine on hippocampus-dependent learning in an animal model of obsessive-compulsive disorder induced by sensitization with d2/d3 agonist quinpirole. *Behav Brain Res*. 2016; **317**: 210-217.

Stuchlik A, Radostová D, Hatalova H, Vales K, Nekovarova T, Koprivova J, Svoboda J, Horacek J. Validity of Quinpirole Sensitization Rat Model of OCD: Linking Evidence from Animal and Clinical Studies. *Front Behav Neurosci*. 2016; **10**: 209.

Alzheimerova nemoc a demence

Vales K, Stuchlik A. Central muscarinic blockade interferes with retrieval and reacquisition of active allothetic place avoidance despite spatial pretraining. *Behav Brain Res*. 2005; **161(2)**: 238-244.

Entlerova M, Lobellova V, Hatalova H, Zemanova A, Vales K, Stuchlik A. Comparison of Long-Evans and Wistar rats in sensitivity to central cholinergic blockade with scopolamine in two spatial tasks: an active place avoidance and the Morris water maze. *Physiol Behav*. 2013; **120**: 11-18.

Laczó J, Markova H, Lobellova V. et al. Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Psychopharmacology*. 2016.

Petrasek T, Skurlova M, Maleninska K, Vojtechova I, Kristofikova Z, Matuskova H, Sirova J, Vales K, Ripova D, Stuchlik A. A Rat Model of Alzheimer's Disease Based on Abeta42 and Pro-oxidative Substances Exhibits Cognitive Deficit and Alterations in Glutamatergic and Cholinergic Neurotransmitter Systems. *Front Aging Neurosci*. 2016; **8**: 83.

Seznam použité literatury (řazeno abecedně)

Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*. 1963; **145**: 573-591.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965; **124**: 319-335.

Bannerman DM, Bus T, Taylor A, Sanderson DJ, Schwarz I, Jensen V, Hvalby Ø, Rawlins JN, Seeburg PH, Sprengel R: Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nat Neurosci*. 2012; **15**:1153-1159.

Bannerman DM, Rawlins JN, Good MA. The drugs don't work-or do they? Pharmacological and transgenic studies of the contribution of NMDA and GluR-A-containing AMPA receptors to hippocampal-dependent memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; **188(4)**: 552-566.

Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979; **93(1)**: 74-104.

Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; **94**: 343-350.

Dockery CA, Liebetanz D, Birbaumer N, Malinowska M, Wesierska MJ. Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; **96**: 452-460.

Dockery CA, Wesierska MJ. A spatial paradigm, the allothetic place avoidance alternation task, for testing visuospatial working memory and skill learning in rats. *J Neurosci Methods*. 2010; **191**: 215-221.

- Eilam D, Golani I. The ontogeny of exploratory behavior in the house rat (*Rattus rattus*): the mobility gradient. *Dev Psychobiol.* 1988; **21(7)**: 679-710.
- Eilam D, Golani I. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behav Brain Res.* 1989; **34(3)**: 199-211.
- Eilam D, Zor R, Fineberg N, Hermesh H. Animal behavior as a conceptual framework for the study of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Brain Res.* 2012; **231(2)**: 289-296.
- Einat H, Szechtman H. Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alternation task in rats sensitized to the dopamine agonist quinpirole. *Physiol Behav.* 1995; **57**: 55-59.
- Enkel T, Berger SM, Schönig K, Tews B, Bartsch D. Reduced expression of nogo-a leads to motivational deficits in rats. *Front Behav Neurosci.* 2014; **8**: 10.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; **4(11)**: 1313-1317.
- Fenton AA, Wesierska M, Kaminsky Y, Bures J. Both here and there: simultaneous expression of autonomous spatial memories in rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; **95**: 11493-11498.
- Hort J, Laczó J, Vyhnalek M, Bojar M, Bures J, Vlcek K. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; **104**: 4042-4047.
- Krystal JH, Mathew SJ, D'Souza DC, Garakani A, Gunduz-Bruce H, Charney DS. Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. *CNS Drugs.* 2010; **24(8)**: 669-693.
- Kubík S, Fenton AA. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *J Neurosci.* 2005; **25**: 9205-9212.
- Laczó J, Andel R, Vlcek K, Matoska V, Vyhnalek M, Tolar M, Bojar M, Hort J. Spatial navigation and ApoE in amnesic mild cognitive impairment. *Neurodegenerative Disorders.* 2011; **8**: 169-177.
- Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos V. Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology.* 2006; **76(1)**: 19-33.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984; **11(1)**: 47-60.
- Morris R. Neurobiology of learning and memory. In: DW Pfaff (Ed.) 2013; *Neuroscience in the 21st century*.
- Morris RG, Frey U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans Royal Soc Lond B Biol Sci.* 1997; **352(1360)**: 1489-1503.
- Morris RGM. Spatial localization does not require presence of local cues. *Learn Mot.* 1981; **260**: 239-260.
- Nekovarova T, Klement D. Rat's operant behavior can be controlled by the configuration of objects in an animated scene displayed on a computer screen. *Physiol Res.* 2006; **55(1)**: 105-113.
- Novak G, Tallerico T. Nogo A, B and C expression in schizophrenia, depression and bipolar frontal cortex, and correlation of Nogo expression with CAA/TATC polymorphism in 3'-UTR. *Brain Res.* 2006; **1120(1)**: 161-171.
- O'Keefe J, Nadel L. *Hippocampus as a cognitive map*. London, 1978; Clarendon Press.

- Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J of Exp Psychology: Animal Behavior Processes*. 1976; **2**: 97-116,
- 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)**: 1141-1144.
- Phillips WA, Silverstein SM. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behav Brain Sci*. 2003; **26(1)**: 65-82.
- Rosenblueth A, Wiener N. The role of models in science. *Philosophy of Science*. 1945; **12(4)**: 316-321.
- Rung JP, Carlsson A, Rydén Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; **29(5)**: 827-832.
- Slotkin TA, Seidler FJ, Crain BJ, Bell JM, Bissette G, Nemeroff CB. Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87(7)**: 2452-2455.
- Stuchlik A, Fenton AA, Bures J. Substratal idiothetic navigation of rats is impaired by removal or devaluation of extramaze and intramaze cues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**: 3537-3542.
- Stuchlik A, Bures J. Relative contribution of allothetic and idiothetic navigation to place avoidance on stable and rotating arenas in darkness. *Behav Brain Res*. 2002; **128**: 179-188.
- Szechtman H, Eckert MJ, Tse WS, Boersma JT, Bonura CA, McClelland JZ. Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): form and control. *Bmc Neuroscience*. 2001; **2**: 4.
- Szechtman H, Sulis W, Eilam D. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Neurosci*. 1998; **112**: 1475-1485.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci*. 2005; **25(9)**: 2413-2419.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006; **313(5790)**: 1093-1097.
- Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 1986; **10**: 677-690.