



**MASARYKOVA  
UNIVERZITA**



**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

---

# **Neurální mechanismy paměti a metody jejich studia**

Bakalářská práce

**Michaela Mařánová**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D.

Brno 2017

# Bibliografický záznam

**Autor:** Michaela Mařánová  
Přirodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Neurální mechanismy paměti a metody jejich studia

**Studijní program:** Chemie

**Studijní obor:** Chemie se zaměřením na vzdělávání, Biologie se zaměřením na vzdělávání

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D.

**Akademický rok:** 2016/2017

**Počet stran:** 53

**Klíčová slova:** Paměť; Podmiňování; bezobratlí; učení; metody; hmyz; nervová soustava; neurální mechanismy; modely;

# Bibliographic Entry

**Author** Michaela Mařánová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of experimental biology

**Title of Thesis:** Neural mechanisms of memory and methods of investigation

**Degree programme:** Chemistry

**Field of Study:** Chemistry with a View to Education, Biology and with a View to Education

**Supervisor:** Doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D.

**Academic Year:** 2016/2017

**Number of Pages:** 53

**Keywords:** Memory; conditioning; methods; invertebrates; insect; neural system; neural mechanisms; models;

# **Abstrakt**

Cílem této bakalářské práce je zpracovat přehled současných poznatků a metod, které jsou spojené s výzkumem neurálních mechanismů paměti a s podmiňováním u bezobratlých živočichů. Práce představuje komplexní souhrn nejčastěji používaných podmiňovacích metod, běžných modelových organismů používaných k pokusům a popis neurálních mechanismů paměti, ke kterým při podmiňování v nervové soustavě dochází. Práce ukazuje, že poznatky získané při zkoumání bezobratlých modelů přispívají k poznávání cest a mechanismů ukládání informací do paměti, většina z těchto cest ale zatím zůstává nevyjasněná.

První část práce je věnována vzniku paměťové stopy a ukládání informací do nervového systému, další část se pak zabývá jednotlivými mozkovými strukturami, které nalezneme v nervové soustavě bezobratlých. Třetí část popisuje metody, které objasňují pochody v nervové soustavě při podmiňování, závěrečná kapitola obsahuje výběr nejčastěji používaných modelových organismů.

## **Abstract**

The aim of this thesis is to present an overview of the knowledge and methods that are associated with neural mechanisms of memory and conditioning in invertebrate animals. The thesis presents a complex summary of most commonly used conditioning methods, most frequent model organisms used for experiments and description of neural mechanisms of memory necessary for conditioning in the nervous system. The thesis shows that knowledge gained from the research of invertebrate models contributes to the identification of ways and mechanisms of storing information, but most of these paths remain unclear.

The first part of the work is devoted to the creation of a memory trace and the storage of information in the nervous system, the next part deals with the individual brain structures found in the neural system of invertebrates. The third part describes methods investigating the processes in the nervous system during conditioning, the final chapter contains a selection of the most frequently used model organisms.



MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

**Ústav:** Ústav experimentální biologie  
**Studentka:** Michaela Mařánová  
**Program:** Chemie  
**Obor:** Chemie se zaměřením na vzdělávání  
Biologie se zaměřením na vzdělávání

Ředitel Ústavu *experimentální biologie* PíF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

**Název práce:** Neurální mechanismy paměti a metody jejich studia  
**Název práce anglicky:** Neural mechanisms of memory and methods of investigation

### Oficiální zadání:

Na základě studia současné vědecké literatury student zpracuje literární rešerši klasického doporučeného členění z oblasti výzkumu mechanismů paměti. Zaměří se na definici pojmů paměti a shrne základní představy o ukládání informací nervovým systémem. Podstatná část práce bude věnována neurofyziologickým a behaviorálním metodám studia na bezobratlých modelech. Předběžná struktura kapitol bude tato: vznik paměťové stopy, bezobratlí obecně a nejpoužívanější modely ve výzkumu paměti a význam výzkumu, metody výzkumu se zvláštním zaměřením na behaviorální. Student bude konzultovat pravidelně postup práce. Časový plán přípravy: Konec listopadu 2016 - shromažďování a studium literatury, první výpisky a text k přehlednutí. Začátek ledna 2017 - první kapitoly, konec února - dokončování dílčích kapitol, konec března - finalizace.

**Jazyk závěrečné práce:** čeština

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D.

**Datum zadání práce:** 3. 10. 2016

**V Brně dne:** 3. 10. 2016

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Michaela Mařánová  
studentka

doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální  
biologie

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce za ochotu, trpělivost a odborný dohled při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Zbyšku Vodovi za pomoc při tvoření a své babičce Janě Kučerové za pravopisnou kontrolu celé práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 3. května 2017

.....

Jméno Příjmení

# Obsah

Úvod.....	8
Kapitola 1: Neurální procesy učení na molekulární úrovni .....	9
Membránový potenciál .....	9
Děje na synapsích.....	11
Druhy synapsí.....	13
Druhý posel.....	13
Mechanismy procesu učení .....	14
Typy paměti .....	17
Kapitola 2: Nervová soustava a mozek bezobratlých .....	19
Oddíly mozku bezobratlých .....	20
Nejdůležitější neurotransmitery mozku bezobratlých .....	24
Kapitola 3: Metody podmiňování u bezobratlých .....	26
Časové intervaly při podmiňovacích pokusech .....	26
Rozdělení experimentů podle druhu podmiňování .....	31
Rozdělení experimentů podle nepodmíněného stimulu.....	34
Rozdělení experimentů podle podmíněného stimulu.....	35
PER .....	38
SER.....	39
Kapitola 4: Nejpoužívanější modely ve výzkumu paměti .....	39
Nematoda - Hlístice.....	40
Mollusca - měkkýši .....	41
Závěr.....	45
Seznam použité literatury .....	46
Interní zdroje .....	53

# Úvod

Učení je proces poznávání okolního prostředí, který je důležitý pro přizpůsobení se a zvýšení úspěšnosti udržení druhu. Schopnost učení se vyvinula u velké většiny živočichů, protože všichni živočichové včetně člověka čelí základnímu požadavku přizpůsobení. Schopnost poučit se z minulých chyb nebo úspěchů a modifikovat podle nich svoje chování výrazně přispívá k udržení a přežití druhu. Důležité je správné vyhodnocení situace na základě předchozích zkušeností. Tyto zkušenosti slouží například k rozpoznání predátora a včasnému úniku, rozpoznání správné kořisti nebo jiné požitelné potravy a odlišení od potravy nepoživatelné a v mnoha jiných životních situacích.

Paměť je proces, při kterém jsou naučené poznatky zpracovávány a ukládány. Čím složitější má živočich mozek, tím komplexnější informaci si dokáže uložit a využít ji pro sofistikované formy chování.

Pokusy na bezobratlých modelech mají ve výzkumu paměti nezastupitelné místo a jsou výhodné z několika důvodů. Díky malým rozměrům a krátkému generačnímu času je možné hmyz nejen jednoduše chovat, ale i efektivně pozorovat mechanismy paměti, zejména u geneticky modifikovaných linií. Tyto mechanismy jsou pozorovatelné díky celé škále experimentálních přístupů od chování živočicha při pokusech až po studium izolovaných neurálních struktur, které jsou u bezobratlých dobře přístupné.

V posledních letech se výzkum neurálních mechanismů paměti a souvisejících neurodegenerativních poruch, jako je např. Alzheimerova choroba, dostává do popředí vědeckého zájmu. Porozumění principům mechanismů učení u bezobratlých modelů by mohlo vést k lepšímu pochopení těchto pochodů i u vyšších organismů, potažmo u člověka, a případnému vyléčení poruch paměti. Tím výzkum neurálních mechanismů tvoří spojující článek mezi neurobiologií a patologickou psychologií. Poznatky získané zkoumáním paměti jsou využitelné v obou těchto disciplínách.



# Kapitola 1: Neurální procesy učení na molekulární úrovni

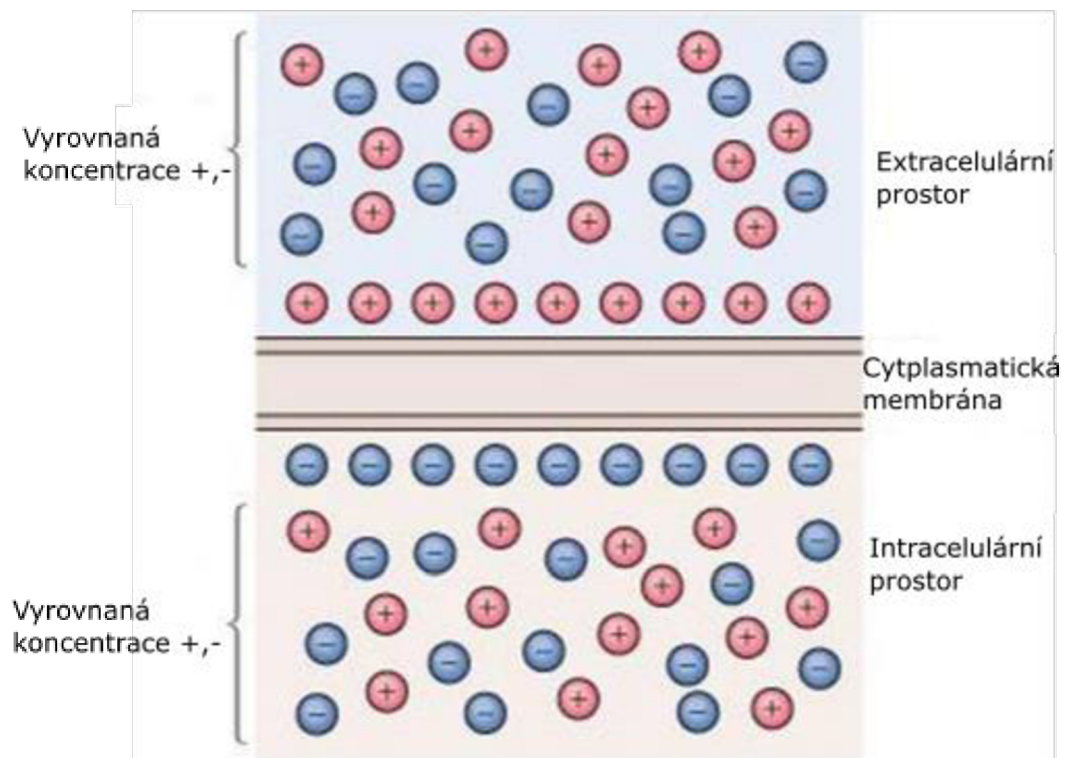
Neurony mají unikátní schopnost modifikovat svoji funkci i strukturu v závislosti na své aktivitě. Při těchto změnách může docházet i k posilování nebo naopak ochabování synaptických spojení, změnám aktivity proteinů i změnám v expresi některých proteinů. Všechny tyto děje ukazují na neurální plasticitu a jsou nezbytné k procesu učení a ukládání informací nervovým systémem.

Nejdůležitějšími základními pojmy v otázce plasticity nervového systému jsou podmíněný a nepodmíněný podnět a podmíněný a nepodmíněný reflex. Nepodmíněný podnět (US) vyvolává u organismu samovolnou reakci – nepodmíněný reflex. Podmíněný podnět (CS) naopak zpočátku žádnou reakci nevyvolává, postupně se však spojuje s reakcí na podnět nepodmíněný. Tím vzniká podmíněný reflex. Podmíněné podněty mohou být různé – nejčastěji se používají čichové, zrakové nebo hmatové. Nepodmíněné podněty mohou být dvojího druhu – apetitivní (pozitivní vjem, například roztok sacharózy) a averzivní (negativní, například elektrický proud). Využívá se obou těchto stimulů, a to proto, že každý z nich používá jiné neurotransmitery a vyvolává tak jiné změny v nervové soustavě (Busto *et al.*, 2010).

## Membránový potenciál

Informace se po neuronu a mezi jednotlivými neurony šíří pomocí elektrických signálů, což umožňuje přenos informace velice rychle i na dlouhé vzdálenosti. Tyto elektrické impulzy jsou tvořeny změnou propustnosti membrány pro určité ionty.

Kolem každé buňky je tenká vrstvička iontů, ve které nejdůležitější úlohu mají kationty sodné a draselné, anionty chloridové a organické. Na vnitřní straně membrány má tato vrstvička záporný náboj, na vnější straně membrány pak kladný. Tento stav se nazývá *klidový potenciál* (Obrázek 1), který je udržován především pomocí specializovaných iontových transportérů zvaných Na/K pumpy. Na vnější straně membrány jsou koncentrovanější sodné kationty a chloridové anionty, na vnitřní straně pak draselné kationty a organické anionty (Kandel, 1991).



**Obrázek 1 – Klidový potenciál**

V těsné blízkosti kolem cytoplasmatické membrány je tenká vrstvička iontů. Ta je na vnitřní straně membrány záporně nabitá, na vnější straně kladně nabitá. Ve větší vzdálenosti od membrány je už koncentrace kationtů i aniontů vyrovnaná (Podle: Kandel, 1991).

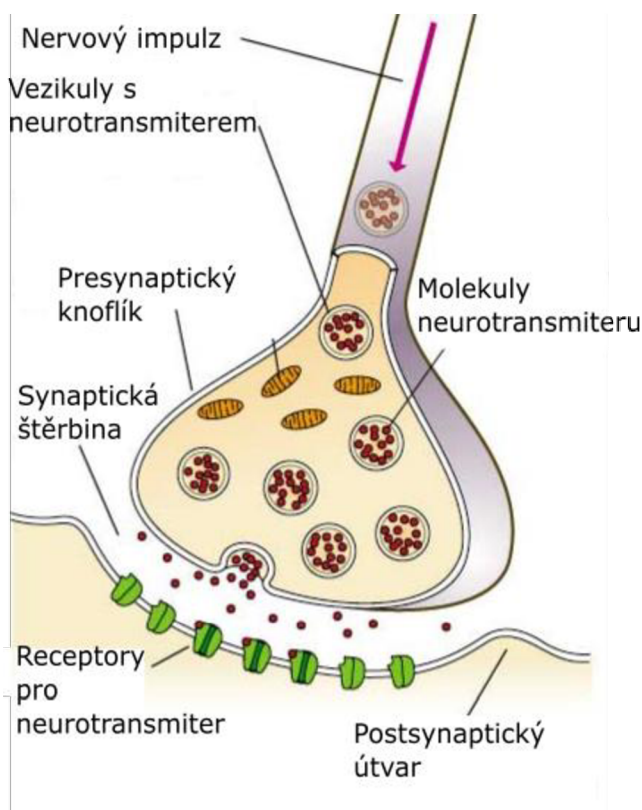
Předávání informace je možné díky tomu, že nervové buňky umí generovat tzv. *akční potenciál*. Ten je spuštěn nadprahovou depolarizací nebo naopak jeho vznik je inhibován hyperpolarizací membrány. Depolarizace znamená, že náboj uvnitř buňky se změní směrem do kladných hodnot, hyperpolarizace naopak, že náboj se změní na více záporný. Depolarizace membrány pak způsobí otevření kanálů pro sodíkové ionty, které začnou vtékat dovnitř do buňky. Tento systém pracuje s kladnou zpětnou vazbou, tudíž čím více sodných iontů vteče do buňky, tím více se depolarizuje membrána a tím více vteče iontů do buňky. Podmínkou vzniku akčního potenciálu je tedy přítomnost napěťově vrátkovaných sodíkových kanálů. Proces depolarizace je ale omezen a po čase ustává, což je způsobeno sodnými kanály, které se samy uzavírají. Navíc se po jistém čase po depolarizaci otvírají kanály pro draselné ionty, které začnou vytékat ven z buňky a obnovovat tak původní náboj na membráně. Tento jev se nazývá repolarizace. Po odeznění impulzu také nastává tzv. refrakterní perioda, což je čas, po který se membrána buňky nemůže polarizovat nezávisle na

velikosti potenciálu. To je způsobeno inaktivovanými kanály pro sodík, které se až po určité době vrátí do aktivního stavu.

Dějů na synapsích se ale neúčastní pouze sodík a draslík, významným iontem je také vápenatý kationt. Čím více iontů se účastní dějů při excitaci, tím více je možností komplexního zpracování informací. Kanály pro vtok vápenatých iontů do buňky jsou napětěově vrátkované, stejně jako kanály pro vstup sodných iontů. To znamená, že se otevírají při změně napětí na membráně. Při klidovém potenciálu je koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky velice malá, změna jeho koncentrace může spouštět další děje v nervové buňce (Kandel, 1991).

## Děje na synapsích

Synaptický přenos je základní forma komunikace mezi neurony. Synapse je místo kontaktu dvou neuronů, střetávají se tak dvě buňky – *presynaptická a postsynaptická*. Mezi těmito dvěma buňkami je prostor nazývaný synaptická štěrbina (Obrázek 2). Existují dva druhy přenosu signálu mezi dvěma neurony, elektricky a chemicky. Oba tyto druhy synapsí mohou způsobit buď excitaci nebo inhibici.

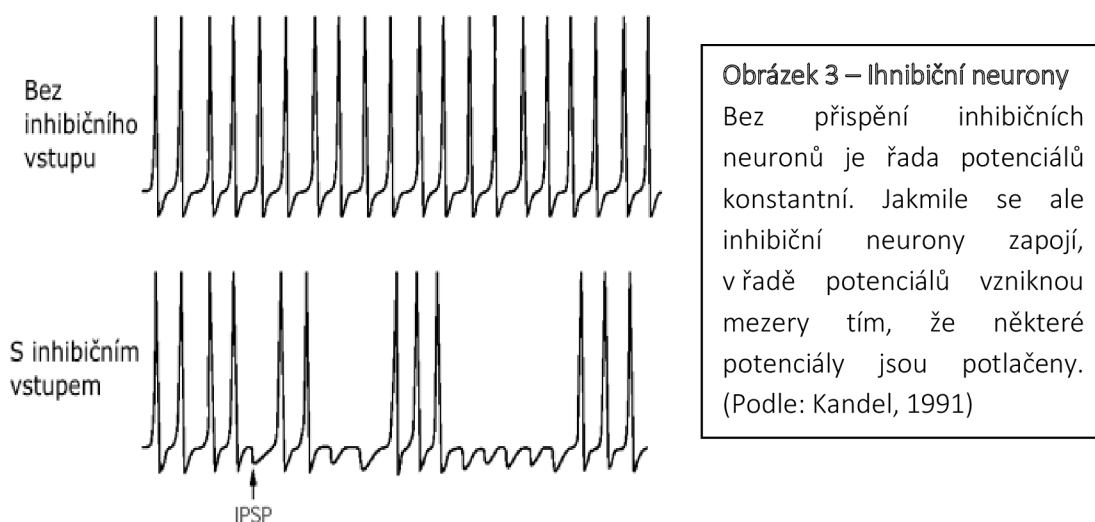


**Obrázek 2 - Synaptický útvar**

Synapse je místo styku dvou buněk, presynaptické a postsynaptické. Presynaptický neuron je zakončen speciálním útvarem zvaným synaptický knoflík, který obsahuje váčky (vezikuly) s neurotransmiterem. Postsynaptický útvar má pak na svém povrchu receptory pro neurotransmiter. Mezi oběma buňkami je prostor nazývaný synaptická štěrbina. Podle: URL 1

Při chemickém přenosu signálu elektrický impulz dojde pouze k synaptické štěrbině, do postsynaptické buňky nedojde. Tento druh synapse funguje tak, že přichází impulz otevře elektricky vrátkované kanály pro vápenaté ionty. Zvyšující se koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  způsobí, že vezikuly s neurotransmiterem (váčky tvořené cytoplasmatickou membránou) spojí svou membránu s membránou buňky a dojde tak k vyliší neurotransmiteru do synaptické štěrbině. Neurotransmitter se na postsynaptické membráně naváže na receptory, čímž způsobí změnu propustnosti membrány pro určité ionty a dojde tak k depolarizaci (excitaci) nebo hyperpolarizaci (inhibici) přijímající strany. Chemický signál je sice pomalejší než elektrický, zato ale má tu schopnost, že umí zesílit signál (pouhé dvě molekuly neurotransmiteru již mohou vyvolat depolarizaci membrány postsynaptické buňky) (Kandel, 1991).

Chemické signály se tedy mohou dělit na dvě skupiny – *excitační a inhibiční*. Primárním excitačním neurotransmiterem je kyselina glutamová, hlavním inhibičním je GABA. Inhibiční neurony sniží pravděpodobnost vzniku akčních potenciálů v postsynaptické buňce tím, že hyperpolarizují membránu, což může způsobit změnu ve schématu excitací (Obrázek 3).

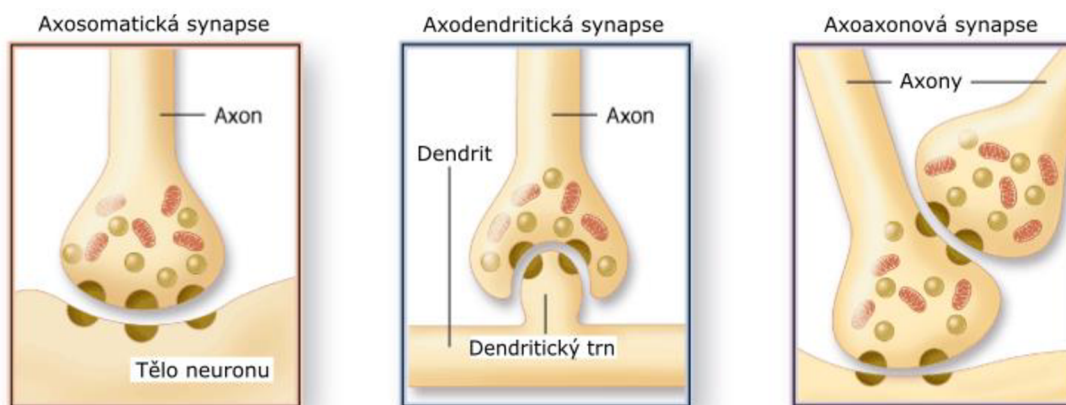


**Obrázek 3 – Inhibiční neurony**  
 Bez přispění inhibičních neuronů je řada potenciálů konstantní. Jakmile se ale inhibiční neurony zapojí, v řadě potenciálů vzniknou mezery tím, že některé potenciály jsou potlačeny. (Podle: Kandel, 1991)

Hyperpolarizace dosáhnou buď otevřením kanálů pro  $\text{Cl}^-$  ionty, které projdou dovnitř, nebo otevřením kanálů pro  $\text{K}^+$  ionty, které vytečou ven z buňky. Akční potenciál přicházející po excitační dráze potom nedosáhne prahu, který by byl pro šíření akčního potenciálu potřeba a signál se tak u této buňky zastaví. Spoluprací nebo naopak kompeticí různých typů synaptických spojení vzniká možnost takřka neomezeného počtu kombinací a zpracování signálu.

## Druhy synapsí

Presynaptická buňka ke komunikaci s ostatními buňkami používá jeden nebo více výběžků zvaných axony. Tyto axony mohou nasedat buď na tělo dalšího neuronu, na dendrit dalšího neuronu nebo i na axon jiného neuronu. Podle toho dělíme synaptická spojení na axosomatická, axodendritická a axoaxonová (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Druhy synaptických spojení

V axosomatické synapsi nasedá presynaptický neuron přímo na tělo postsynaptického, v axodendritickém spojení nasedá axon jednoho neuronu na dendrit druhého neuronu. Třetím případem je pak axoaxonové spojení, kde nasedá axon jednoho neuronu na axon druhého neuronu. (Podle: Mescher, 2013)

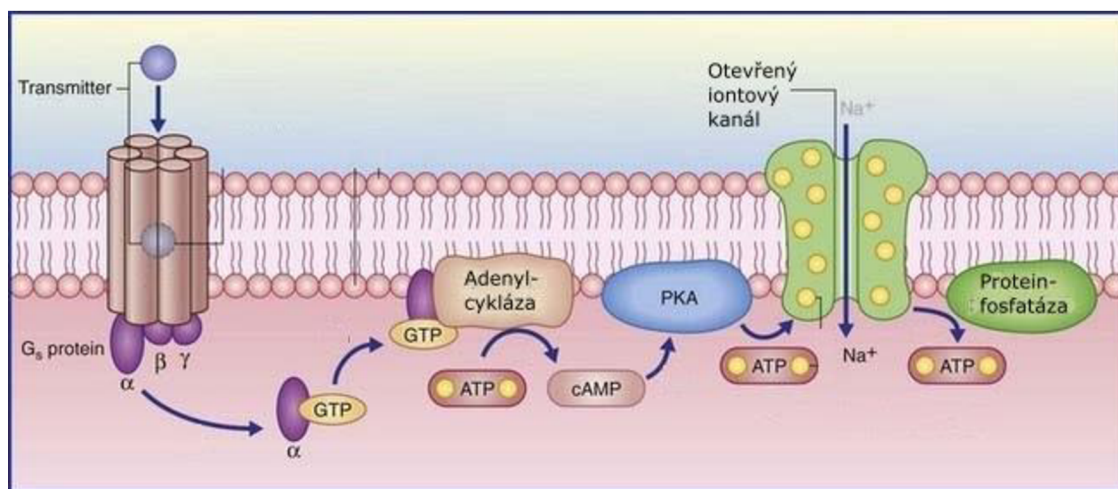
Axoaxonální spojení jsou spojení, kdy jeden axon nasedá na jiný axon v místě jeho synaptického útvaru. Tento typ spojení je častý u inhibičních neuronů, je tak umožněná tzv. presynaptická facilitace, což je děj, který vede k senzibilizaci pomocí systému druhého posla.

## Druhý posel

Receptory pro neurotransmitery mohou být dvou druhů. *Ionotropní receptory* jsou přímo součástí iontových kanálů a po navázání molekuly transmiteru změní svou konformaci. Tím se otevřou a začnou propouštět ionty. Navázání transmiteru na druhý typ receptoru zvaný *metabotropní receptor* také vede ke vtoku iontů do buňky. V tomto případě jsou ale receptor a kanál dvě oddělené struktury, proto se spustí kaskáda reakcí, která pomocí druhého posla putujícího cytoplasmou propojí receptor s kanálem. To pak vede k otevření kanálů.

Navázání transmiteru na metabotropní receptor vede velmi často k aktivaci přenašeče zvaného G protein tím, že vymění již navázanou molekulu GDP (guanosindifosfát) za GTP (guanosintrifosfát), který fosforylací G protein aktivuje. Aktivovaná podjednotka G proteinu pak aktivuje adenylcyklázu, což je enzym přeměňující ATP (adenosintrifosfát) na cAMP (cyklický adenosinmonofosfát – druhý posel). Aktivací cyklázy G protein hydrolyzuje makroergickou vazbu v GTP, čímž ho přemění na GDP + P a odpojí se od cyklázy. Tím zastaví syntézu cAMP, syntéza tohoto druhého posla je tedy regulována vazbou s danou podjednotkou G proteinu. cAMP pak aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA). Ta se pak dále účastní dějů na synapsích, jako například otevření iontových kanálů (Obrázek 5), nebo jiných procesů souvisejících s pamětí (Kandel, 1991).

Jako druhý posel nejčastěji slouží cAMP neboli cyklický adenosinmonofosfát, může se tak chovat ale například i vápenatý iont ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Obrázek 5 – Schéma signální dráhy druhého posla**

Molekula neurotransmiteru se naváže na receptor, tím se spustí kaskáda reakcí zahrnující tzv. G protein, jehož podjednotka aktivuje adenylcyklázu. To je enzym, který přeměňuje ATP na cyklický adenosinmonofosfát, který je tzv. druhým poslem. cAMP pak může fosforylovat proteinkinázu A (PKA) a tím ji aktivovat. PKA umí otevírá iontový kanál a zahájit tak tvorbu akčního potenciálu. Podle: URL 2

## Mechanismy procesu učení

Důležitou schopností neuronů související s učením je tzv. *synaptická plasticita*, což je schopnost neuronu zareagovat na poněkolkáté opakovaný podnět jinak než na

poprvé. Je to jakési upravení činnosti spojení nervových buněk v závislosti na předchozí nervové aktivitě, což je základním mechanismem učení.

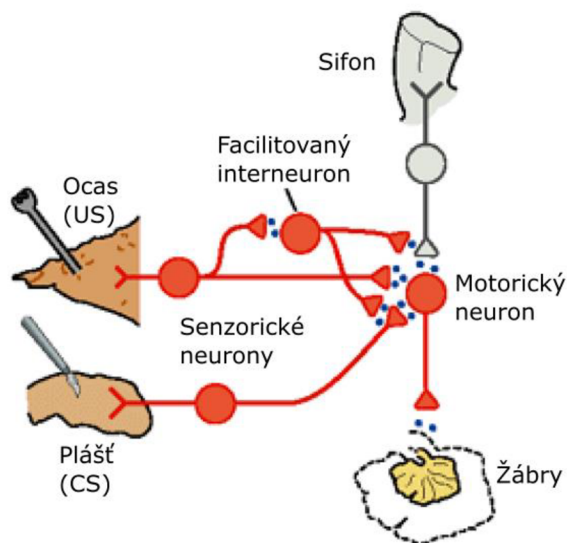
### ***Senzitizace a habituace***

Nejjednoduššími typy učení jsou *habituace* a *senzitizace*, přičemž oba tyto druhy se označují jako neasociativní učení. Habituace je přivykání podnětu a je pro ni charakteristický snížený výdej neurotransmiteru v presynaptické buňce poté, co byl neuron drážděn vícekrát za sebou (Giles and Rankin, 2009). Senzitizace je opakem habituace, tedy posiluje spojení a zvyšuje reakci na určitý podnět (Hawkins, 1984). Oba tyto děje jsou závislé hlavně na interneuronech, což jsou neurony spojující senzorické neurony a motorické neurony.

Působením podnětů se dostanou neurony do stavu zvaného *facilitace*, což je stav zesílení nervové aktivity. Pokud tento stav trvá jen krátkodobě (řádově minuty), v synapsi se uskuteční jen změny v kovalentních vazbách již existujících proteinů. Proteinkináza A totiž fosforyluje proteiny, které jsou odpovědné za zpřístupnění neurotransmiteru a jeho uvolňování. Pokud *facilitace* trvá delší dobu, způsobí to transkripci nových proteinů, které ovlivňují sílu synapse a syntézu neurotransmiteru (Kandel *et al.*, 1991).

### ***Klasické podmiňování***

Při podmiňování jsou přítomny 2 podněty – jeden nepodmíněný, který aktivuje příslušný nepodmíněný reflex, a jeden podmíněný podnět, který na začátku nevyvolává žádnou reakci organismu. Cílem tohoto podmiňování je *spojit podmíněný podnět s nepodmíněným reflexem*. Toto spojení je umožněno např. tím, že k motorickému neuronu jsou připojeny dva senzorické neurony (Obrázek 6), jeden zaznamenává podmíněný podnět (CS), druhý zaznamenává nepodmíněný podnět (US). Tento druhý typ má axon nejen k motorickému neuronu, ale i k axonu neuronu pro CS. Samotný podmíněný podnět na senzorickém neuronu pro CS vyvolá jen podprahový stimul. Pokud ale tento stimul přijde těsně před nepodmíněným podnětem, může tento podprahový stimul pomoci k aktivování synaptického spojení.



Obrázek 6 – Schéma klasického podmiňování

K motorickému neuronu jsou připojeny dva neurony, jeden vede informaci o US (např. elektrickém šoku) z ocasu, druhý vede informaci o CS z pláště. Spojení těchto dvou podnětů je schopné vyvolat nadprahový stimul, každý sám o sobě by vyvolal jen podnět podprahový. (Podle: Kandel, 1991)

Proces na presynaptické buňce je velice podobný senzitivaci. Aktivita neuronů při aplikaci podmíněného stimulu vede ke vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dovnitř senzory neuronu. Vápenaté ionty se navážou na protein calmodulin, spolu se pak navážou na adenylcyklázu, která začne z ATP tvořit cAMP. Adenylcykláza tedy reaguje jak na zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů při podmíněném stimulu, tak na vylití mediátoru (serotoninu) při nepodmíněném stimulu.

Proces na postsynaptické buňce, motorickém neuronu, je ale odlišný. Receptory pro NMDA (N-methyl-D-asparát) jsou v klidu zablokované hořčnatými kationty, ale při správné kombinaci CS a US při klasickém podmiňování je potenciál na postsynaptickém neuronu tak silný, že vyrazí iont blokující kanál. Začne tak vstup vápenatých iontů dovnitř do buňky, který aktivuje *retrográdního posla*, kterým může být například oxid dusnatý (NO) (Menzel and Muller, 1996) nebo oxid uhelnatý (CO) (Abraham, 2008). Tento posel pak působí zpět na presynaptickou buňku a ještě více podporuje vylévání mediátoru. Krátká vysokofrekvenční sada stimulů způsobí zvýšení amplitudy excitačních potenciálů. Tomuto jevu se říká *dlouhodobá potenciace* (LTP – long term potentiation) (Kandel, 1991; Bear and Malenka, 1994).

LTP má dvě fáze – ranou fázi dlouhodobé potenciace neboli early LTP a pozdní fázi potenciace neboli late-LTP. Raná fáze potenciace je vyvolána jednou sadou vysokofrekvenčních stimulů a trvá pouze několik málo hodin a nevyžaduje syntézu nových proteinů. Pokud přijde k neuronu více sad stimulů, vyvolají pozdní fázi LTP, která může trvat i několik dní. Aktivují se transkripční faktory a tím je poté



ovlivněna i exprese genů. Tyto geny kódují některé faktory související s buněčným růstem, a tak i s tvorbou nových aktivních míst. Další faktory jsou spojeny s látkami ovlivňujícími tvorbu nových synapsí. Dlouhodobá inaktivace cest vede ke snížení počtu spojů mezi motorickými neurony a interneurony i ke zmenšení plochy aktivních míst (Kandel, 1991).

Opačným jevem k LTP je takzvaná LTD – long-term depression, dlouhodobá deprese, která se objevuje při sadě nízkofrekvenčních pulzů. LTD jsou také dva druhy – heterosynaptická a homosynaptická deprese. Heterosynaptická deprese probíhá na jiných synapsích, než které jsou aktivní při podmiňování. Pokud na jedné synapsi neuronu dojde k LTP, na ostatních vstupních místech tohoto neuronu to vyvolá LTD – od toho tedy heterosynaptická. Homosynaptická deprese probíhá právě na té synapsi, která je aktivní. (Artola and Singer, 1993; Bear and Malenka, 1994).

Zatímco vysokofrekvenční pulzy způsobí velkou změnu v koncentraci intracelulárního  $Ca^{2+}$  a tím aktivují proteinkinázu, nízkofrekvenční pulzy takové změny koncentrace nedosáhnou, což aktivuje proteinfosfatázu. Tyto dva enzymy mají protichůdnou funkci, proteinkináza aktivuje substrát, zatímco fosfatáza ho inhibuje. Substrátem je v tomto případě synaptický fosfoprotein, který se podílí na synaptické síle (Bear and Malenka, 1994). Existují tedy 2 prahy aktivačního potenciálu, jeden nižší, který aktivuje dlouhodobou depresi, a jeden vyšší, který aktivuje dlouhodobou potenciaci (Artola and Singer, 1993).

## Typy paměti

Všechny výše popsané děje vedou k tomu, že se v centrální nervové soustavě vytvoří paměťová stopa. Ta se může uchovat různě dlouhou dobu – podle toho se dělí paměť na krátkodobou (STM), střednědobou (MTM) a dlouhodobou (LTM). Krátkodobá paměť se utvoří velice rychle, ale vydrží bezobratlým pouze v řádu několika minut, střednědobá paměť může přetrvat až den. Nejdéle pak vydrží dlouhodobá paměť, která např. u včel vydrží až 3 dny, avšak tvoří se nejpomaleji (Monique, 2010). LTM existují dva druhy, které mohou existovat paralelně – tzv. eLTM (early long-term memory), která vydrží 24 – 48 hodin, a ILTM (late long-term memory), která uchová informace po dobu 72 – 96 hodin (Monique, 2010;

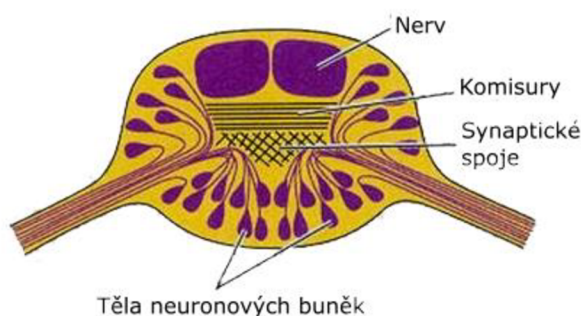
Giurfa and Sandoz, 2012). ILTM se pak vytvoří jen, pokud je interval mezi jednotlivými koly podmiňování více než 10 minut (Giurfa and Sandoz, 2012).

Přenos informace o čichovém podnětu z STM do MTM při jednorázové prezentaci podnětu je zprostředkován pomocí prodloužené doby aktivity cAMP-dependentní proteinkinázy A. Pokud byl podnět prezentován vícekrát (multiple-trial conditioning), vede to k jinému druhu paměti, při kterém je aktivován odlišný enzym  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependentní proteinkináza C (PKC). Prodloužení působení PKC vede k vytvoření dlouhodobě paměti (LTM). Proteinkináza C je aktivována pouze v případě, že předtím došlo k vytvoření STM. Z toho vyplývá, že k vytvoření této paměti dochází až po podmiňování, ovlivnění hladiny PKC v průběhu podmiňování tak neovlivní vytvoření této paměti (Grünbaum and Müller, 1998). Při eLTM dochází pouze k translaci již existující mRNA, tento typ paměti je častěji formován po podmiňování s krátkým intervalem mezi jednotlivými koly podmiňování neboli ITI (cca 1 min). Na rozdíl od ILTM, jejíž formování vyžaduje transkripci a je častěji formována po podmiňování s ITI cca 10 minut (Giurfa and Sandoz, 2012).

## Kapitola 2: Nervová soustava a mozek bezobratlých

Mozek je z hlediska podmiňování zásadní neurální strukturou. Dochází zde ke sběru podnětů ze sensorických receptorů a vyhodnocení situace na základě informací uložených v paměti, což pak vede k určitému chování. Podmiňování ale můžeme pozorovat i na několika málo gangliích, jako například u zeje (Kandel, 1991), což dokazuje, že podmiňování je svázáno s celou nervovou soustavou. Mozek hmyzu můžeme rozdělit na několik částí, podle toho, jakou roli při vyhodnocování podnětu hraje.

Základní stavební jednotkou nervové soustavy je *neuron*. Jednotlivé nervové soustavy ve fylogenezi živočichů se pak liší počtem a specializací neuronů. Postupným splýváním jednotlivých neuronů vznikají nové struktury – *ganglia*, což jsou jednoduchá nervová centra. Jádro ganglia se nazývá neuropile a obsahuje především spoje synapsí. Těla neuronů jsou na periferii ganglia (Obrázek 7). Ganglia se pak mohou dále seskupovat a vytvářet tak ještě složitější struktury procesem *centralizace a cefalizace* a přesouvat tak hlavní nervové centrum směrem k přední části těla. Jako neuropile se někdy označují i větší struktury mozku, které mají homologickou stavbu jako neuropile jednotlivých ganglií. (Kandel *et al.*, 1991).

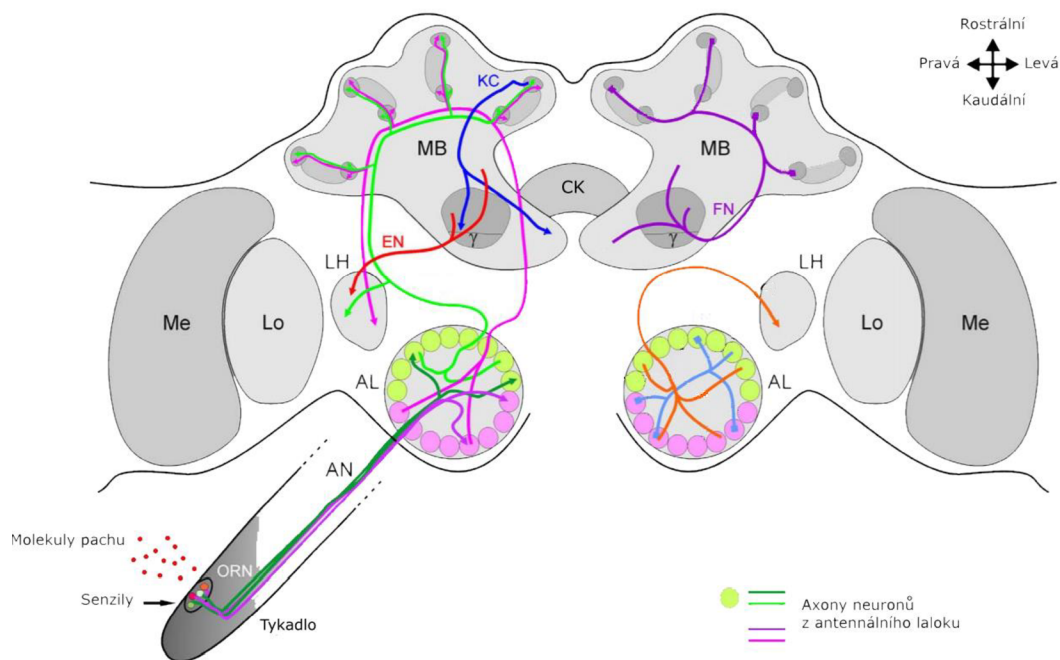


**Obrázek 7 – Stavba ganglia**

Těla neuronových buněk jsou po obvodu neuropile. Jako komisury se označují příčné spoje pruhů v nervové soustavě. Uprostřed se nachází neuropile, mezibuněčná hmota, tvořená synaptickými spoji. (Podle: Hill *et al.*, 2012)

## Oddíly mozku bezobratlých

Z bezobratlých, u kterých je mozek dobře vyvinutý, byly v posledních letech zkoumány hlavně *včela a octomilka*. U nich je struktura mozku dobře patrná i přes jeho malou velikost. Na obrázku je naznačena struktura mozku včely (Obrázek 8). Splynutím třech skupin ganglií vzniká mozek se třemi oddíly – protocerebrem, deutocerebrem a tritocerebrem. Protocerebrum zahrnuje zraková centra a centra pro komplexní chování, deutocerebrum zahrnuje neurony inervující čichový aparát, tritocerebrum inervuje labrum neboli horní pysk hmyzu a zažívací trakt (Ito *et al.*, 2014).



**Obrázek 8 – Schéma mozku včely a dráhy zpracovávající čichové podněty**

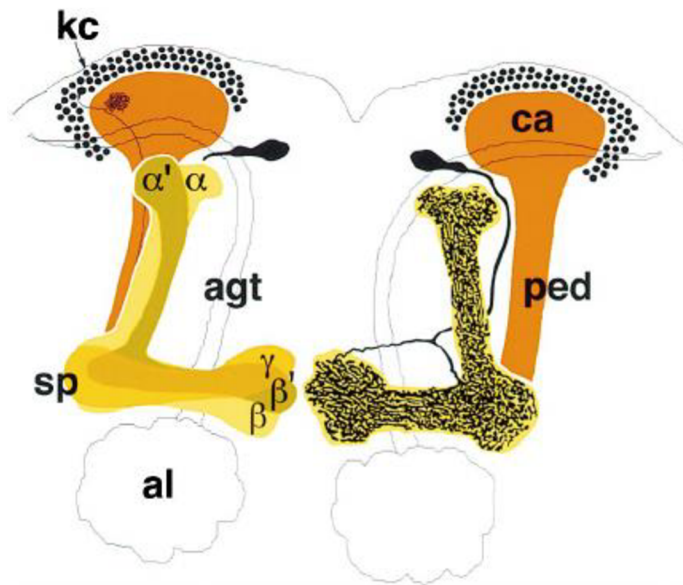
Molekuly pachu zapůsobí na senzily na tykadlech, ty pak vyšlou signál do mozku pomocí čichových receptorových neuronů (ORN), jejichž axony vedou až do antenálních laloků (AL). Růžovou a zelenou barvou jsou naznačeny různé cesty axonů z AL, vzruch pak může pokračovat jednak do houbovitých těles (MB) a poté do laterálního rohu (LH), jednak přímo do LH. Tmavě šedou barvou uprostřed je naznačen centrální komplex (CK). Laterálně jsou šedě vybarveny struktury optických laloků, tmavší je medulla (Me), světlejší barvou pak lobula (Lo). (Podle: Sandoz, 2011).

## ***Antenální laloky***

Prvními většími centry čichu v mozku jsou antenální laloky, které *zpracovávají čichové vjemy* z ORNs (Olfactory receptor neurons). ORNs jsou neurony, které mají těla v tykadlech, do antenálních laloků vedou jen jejich axony. Antenální laloky obsahují struktury zvané *glomeruly*, což jsou globulární útvary, ve kterých se spojují neurony čichových receptorů s projekčními (PN), inhibičními (iLN) a excitačními (eLN) neurony. Všechny čichové neurony (ORN) se stejným druhem receptoru vysílají axony do jednoho glomerulu. Každý z glomerulů je aktivován jen jedním druhem pachu. Glomeruly jsou vzájemně propojené pomocí některého z druhů projekčních neuronů. Glomerulů má každý druh jiný počet, u včel je to 165, u octomilek pouze 43. Čím koncentrovanější je určitý pach, tím více glomerulů zareaguje (Hallem and Carlson, 2004).

## ***Houbová tělesa***

Centrem paměti u hmyzu jsou zejména houbová tělesa, která se dají přirovnat k savčímu hipokampu. Dochází zde k *párování CS a US*. Houbová tělesa se dělí na několik částí, jednou z nich je i kalich (calyx), ve kterém se nacházejí buňky zvané Kenyonovy buňky. Kalich je i vstupním místem informací z nižších částí mozku bezobratlých, dendrity Kenyonových buňek se v kalichu bohatě větví (Wessnitzer and Webb, 2006). Jednotlivé pachy jsou potom kódovány podle toho, jaké Kenyonovy buňky jsou aktivní (Keene and Waddell, 2007). Houbová tělesa obsahují 3 druhy neuronů pojmenovaných podle toho, do jakého laloku houbového tělesa vedou jejich axony –  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , označované jako vertikální laloky, a  $\beta$ ,  $\beta'$ , a  $\gamma$ , označované jako horizontální laloky houbovitých těles. (Waddell *et al.*, 2000; Busto *et al.*, 2010). Tato podrobnější struktura je dobře patrná na schématu (Obrázek 9). Místem výstupu axonů z houbových těles jsou právě tyto laloky. Většina z axonů míří do dalších míst protocerebra.

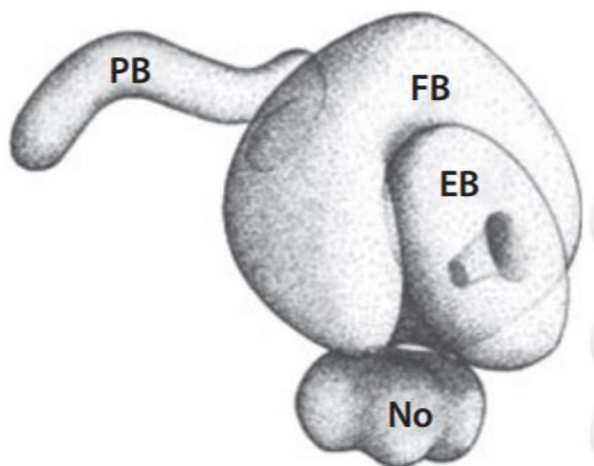


**Obrázek 9 – Struktura a funkce houbových těles u octomilky**

Reakce vyvolaná čichovým podnětem se do kalichu (ca) houbových těles dostává přes antenální laloky (al) pomocí anteno-glomerulárního traktu (agt). Okolo kalichu jsou těla neuronů zvaných Kenyonovy buňky (kc). Jako ped je označený pedunculus neboli stopka, která se dělí na 5 laloků -  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ . Poslední částí je takzvaná ostruha neboli spur (sp). (Podle: Waddell *et al.*, 2000)

### ***Centrální komplex***

Centrální komplex je *střední část* mozku bezobratlých nacházející se mezi oběma hemisférami. Dělí se na 4 hlavní části – protocerebrální most, horní podjednotku (u octomilky nazývaná též fan-shaped body), spodní podjednotku (u octomilky též ellipsoid body) a pár ventrálních nodulů (Obrázek 10). Tato část mozku má na starosti mnoho funkcí, podílí se na tvorbě dlouhodobé čichové paměti. Je také jedním z center vizuální paměti a podílí se i na prostorové orientaci při letu. U octomilek bylo dokonce prokázáno, že ovlivňuje chování při namlouvání (Sakai and Kitamoto, 2006; Pfeiffer and Homberg, 2014). Hlavním vstupním místem centrálního komplexu je protocerebrální most, který je propojen se zrakovými oddíly mozku z obou hemisfér. Hlavním výstupním místem jsou pak noduly, které dostávají informace ze vzestupných neuronů a zároveň i posílají signály do sestupných drah (Wessnitzer and Webb, 2006).



Obrázek 10 – Centrální komplex octomilky, boční pohled

PB – protocerebrální most; FB – fan-shaped body neboli horní podjednotka; EB – ellipsoid body neboli spodní podjednotka; No – nodul. (Podle: Pfeiffer and Homberg, 2014)

### ***Laterální roh***

Dalším oddílem mozku je laterální roh (LH), kde mají zakončení všechny PN inervující jeden čichový glomerulus. Neurony LH ale vysílají axony dál do protocerebra, nejspíše do premotorické oblasti. Tam se napojují na sestupné neurony ovlivňující chování (Yasuyama and Meinertzhagen, 2003). Bližší informace ale nejsou o tomto přepojovacím oddílu mozku známy (Giurfa, 2007; Sandoz, 2011).

### ***Optický lalok***

Optický lalok je část mozku bezobratlých, ve které se *zpracovávají optické vjemy*. Dělí se na tři neuropile – lamina, medulla a lobula (Pfeiffer and Homberg, 2014). Axony 6 druhů sousedících fotoreceptorů citlivých na široké spektrum záření (od UV až po oranžové viditelné světlo) vedou do laminy. Sedmý druh, citlivý na UV záření, a osmý druh fotoreceptoru, citlivý na zelené a modré světlo, vysílají axony skrz laminu až do medully. Medulla je centrem jak barevného vidění, tak i detekce pohybu. Také je spojovacím místem mezi lobulou a dalšími hlubšími centry optického laloku (Morante and Desplan, 2008). Optický lalok obsahuje 4 typy buněk – axony fotoreceptorů, lokální neurony větvcí se v jedné neuropili, interneurony propojující jednotlivé neuropile optického laloku a optické projekční neurony neboli visual projection neurons (VPNs). VPNs propojují optický lalok s centrálním komplexem (Otsuna and Ito, 2006).

## Nejdůležitější neurotransmitery mozku bezobratlých

Jedním z důležitých faktorů při ukládání informace je uvolnění neurotransmiteru na synapsi. *Neurotransmitter* je látka vyplavovaná presynaptickou buňkou a ovlivňující postsynaptickou buňku. Pro správnou reakci a vytvoření paměťové stopy záleží na tom, jaký neurotransmitter se vyplaví. Mezi nejdůležitější patří dopamin, oktopamin, kyselina  $\gamma$ -aminomáselná a acetylcholin.

Dopamin a oktopamin je dvojice neurotransmiterů, která v mozku rozhoduje o tom, zda je nepodmíněný podnět negativní nebo pozitivní, tedy zda půjde o averzivní nebo o apetitivní podmiňování. Oba dva přenašeče jsou přítomny v houbových těleších hmyzího mozku, každý je však dominantní v různých částech těchto těles (Keene and Waddell, 2007). Dopaminergní neurony jsou takové, které exprimují receptor citlivý na dopamin. Tyto neurony přenášejí informace o averzivním nepodmíněném podnětu do neuropilí houbových těles. Těla dopaminergních neuronů jsou u octomilky ve 13 skupinkách po celém mozku. Pokud ovlivníme jejich činnost, ovlivníme tak i formování paměti, například pokud zablokujeme přenos jejich signálu před čichovým podmiňováním, ještě následující hodinu je zamezeno učení (Busto *et al.*, 2010). U octomilek je také možno upravit jejich genetickou výbavu tak, aby měli mutacemi inaktivované dopaminergní neurony. Tito jedinci se pak nejsou schopni učit. DA neurony ale neslouží pouze k averzivnímu podmiňování. Jejich slabší aktivita je potřebná i při tvorbě spojení při apetitivním podmiňování (Busto *et al.*, 2010).

Oktopamin je látka, která u členovců slouží jako neurotransmitter, neurohormon a neuromodulátor. Slouží především pro šíření vzruchu po apetitivním podmiňování, ne však výlučně. Axony oktopaminergních neuronů vedou jak do houbového tělesa, tak do laterálního rohu (Busto *et al.*, 2010). Jedním z neuronů citlivých na oktopamin je i VUM-mx<sub>1</sub>. Tělo tohoto neuronu leží v podjícnovém gangliu, ale jeho axon zasahuje až do kalichu houbových těles. Je to důležitý neuron pro párování CS-US a neuron reaguje na roztok sacharózy (Sandoz, 2011).

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) je primární inhibiční neurotransmitter, který reguluje neurální excitabilitu a specificky tak ovlivňuje učení. Pokud v určitých neuronech (anterior paired lateral neurons – APL, neurony nacházející se v blízkosti



houbových těles) zablokujeme syntézu GABA, zlepší se schopnost učení. GABA totiž reguluje sílu signálu přicházející do houbových těles a aktivita neuronů citlivých na GABA je snižována učením. Tento neurotransmitter obsahují především neurony houbových těles. Dalšími neurony, které obsahují GABA, jsou neurony laterálního rohu a antenálních laloků (Busto et al., 2010).

## **Kapitola 3: Metody podmiňování u bezobratlých**

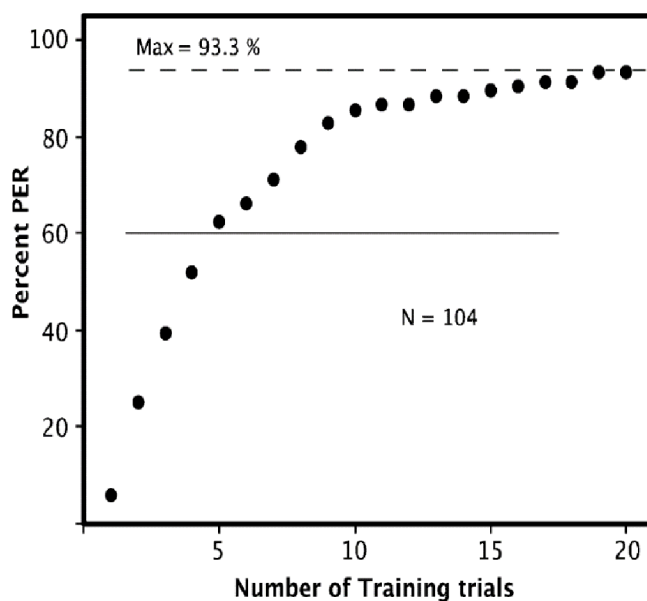
Podmiňování u zvířat všeobecně má dvě základní fáze: učební, tréninkovou fázi a test. Tréninková fáze má v zásadě několik opakování, testovací pak zpravidla probíhá jednou, případně vícekrát, kdy se zkoumá, jak dlouho paměť hmyzu přetrvá.

V organizaci všech behaviorálních testů, pokusy s pamětí nevyjímaje, je důležitá *kontrolní skupina*. Aby se prokázalo, že se organismus naučil určitému spojení mezi CS a US, musí být přítomna i kontrolní skupina, která se neměla čemu naučit, a neměla by reagovat na stimul. Tato kontrolní skupina například nedostává odměnu, popřípadě je odměna posunuta od CS o tolik, že si tyto dva podněty jedinci nespojí. Tato skupina má za cíl vyloučit chybné pozitivní výsledky z důvodu špatně stanovených podmínek. Obecně se při pokusech používá dvou druhů kontrol, pozitivní a negativní kontroly. Negativní kontrola spočívá v tom, že od této skupiny není očekávána žádná změna oproti počátečnímu stavu. Od skupiny pozitivní kontroly je naopak očekávána konkrétní změna nebo chování, které ukazuje na to, jak by měl vypadat výsledek námi zkoumaného jevu (Johnson and Besselsen, 2002).

### **Časové intervaly při podmiňovacích pokusech**

Před začátkem učební fáze se organismy umístí do prostředí, ve kterém bude učení probíhat, aby si na něj zvykly. Jako motivační příprava na apetitivní podmiňování pak působí to, že se organismus nechá hladovět – např. nepodává se mu žádná sacharóza, pouze čistá voda. Tento interval může být různě dlouhý, od 12 do 48 hodin.

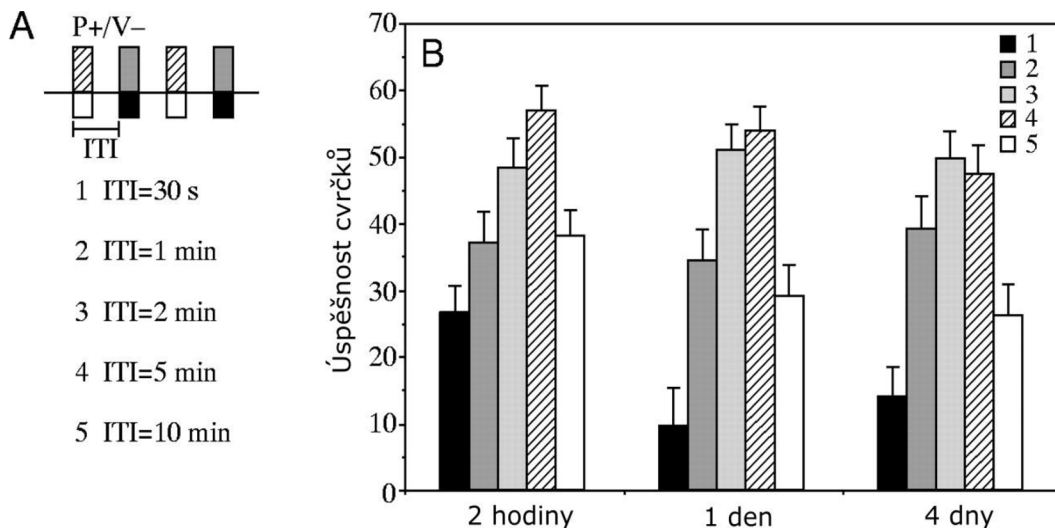
Učební fáze může proběhnout jednou (tzv. *single trial conditioning*) nebo vícekrát (tzv. *multiple trial conditioning*). Čím vícekrát se učební fáze opakuje, tím je větší pravděpodobnost, že si zvíře zapamatuje souvislost mezi nepodmíněným a podmíněným podnětem, (Obrázku 11). Snižuje se také délka zapamatování, například včela totiž při *single trial conditioning* reaguje na CS jen asi 1 - 2 minuty (Giurfa and Sandoz, 2012).



**Obrázek 11 - Úspěšnost čmeláka při učení**

Na tomto grafu je na horizontální ose počet kol učení a na vertikální ose procento čmeláků, u kterých byl pozorován PER. Po sedmi kolech učení už úspěšnost čmeláků takřka nestoupala. (Podle: Riveros and Gronenberg, 2009)

Důležitou roli pak hraje nejen počet opakování, ale i čas mezi jednotlivými opakováními, takzvaný ITI, neboli inter-training interval. Oboje je totiž důležitým faktorem ovlivňujícím to, do jaké paměti se naučené spojení uloží. Pokud trénink u včel proběhne alespoň třikrát s 10 minutami mezi jednotlivými koly (ITI), pak se informace uloží do dlouhodobé paměti a vydrží až 7 dní (Giurfa, 2015). U cvrčků je tento interval kratší, optimální ITI je 2 – 5 minut. Paměť po takovémto učení vydrží až 4 dny (Obrázku 12).

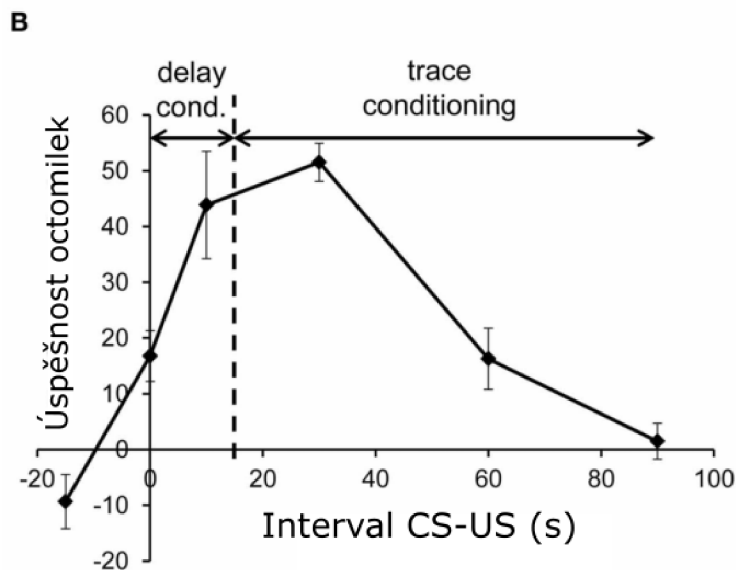
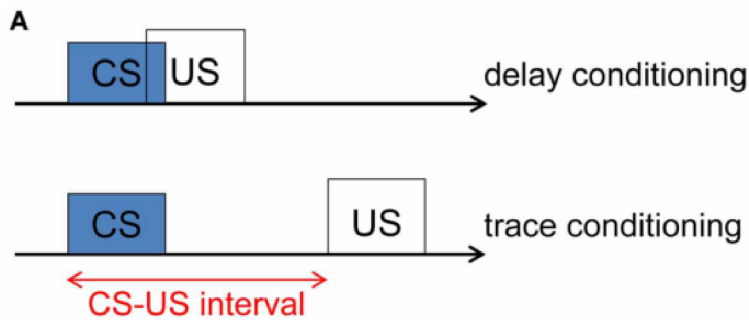


**Obrázek 12 – Závislost délky paměti na ITI u cvrčka**

A: Při pokusu byli cvrčci rozděleni do 5 skupin, každá z nich měla při podmiňování jinak dlouhý ITI. Šrafovane je znázorněn odměňovaný podnět, šedou barvou pak neodměňovaný.

B: Na grafu je znázorněna úspěšnost 5 skupin cvrčků s různými ITI, zkoumala se paměť po různě dlouhé době. Z grafu můžeme vyčíst, že neoptimálnějších výsledků bylo dosaženo při ITI 2 – 5 minut, kdy si cvrčci dokázali spojení zapamatovat až na 4 dny. (Podle: Matsumoto and Mizunami, 2002)

Dalším faktorem je takzvaný ISI neboli inter-stimulus interval, což je čas mezi jednotlivými stimuly. Někteří autoři ISI definují jako čas od konce prvního stimulu do začátku druhého stimulu (Colman, 2008). Jiní autoři uvádějí jako ISI čas od začátku prvního stimulu po začátek druhého stimulu (Dylla *et al.*, 2013), což je podle mého názoru vhodnější, zejména u podmiňování typu delay. Pokud je ISI příliš dlouhý, není podmiňování tak efektivní, jako když je ISI kratší. Například u zeje je nejefektivnější ISI 0,5 sekundy. Pokud byl interval delší než 1 sekunda, k žádnému spojení nedošlo (Rose and Rankin, 2001; Hawkins *et al.*, 1986). U sorganismů s vyvinutější nervovou soustavou tento interval ale může být delší, například u octomilky (Obrázek 13) je nejlepší ISI 30 sekund, přičemž nad ISI 40 sekund už nedojde k párování (Menda *et al.*, 2011).

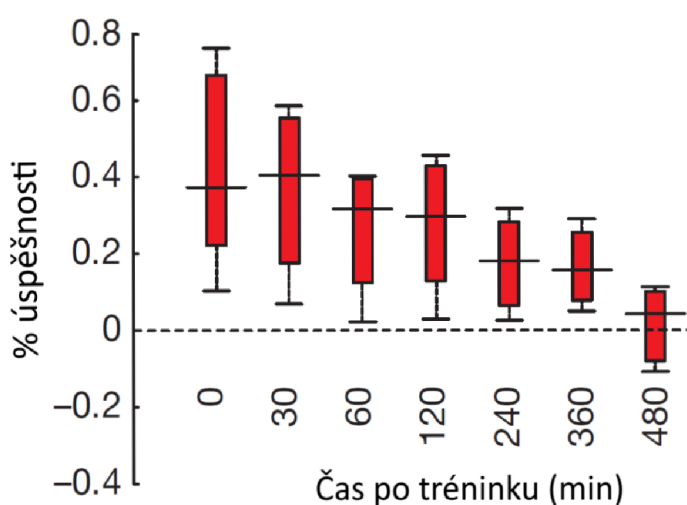


**Obrázek 13 - Závislost intervalu mezi CS a US**

A: Znárodnění intervalu mezi CS a US - pokud US následuje ještě před koncem CS, jedná se o tzv. delay conditioning. Pokud odměna následuje až po prezentaci CS, jedná se o trace conditioning. CS-US interval je pak od začátku prvního stimulu k začátku druhého stimulu.

B: V tomto grafu je na vertikální ose úspěšnost včel a na horizontální ose ISI. Pokud je US prezentován ještě před CS, je jen malá šance, že si podněty včela spojí. Čím víc se ale ISI blíží 30 sekundám, tím více včel si při testu vybralo v T bludišti vůni označující rameno bez trestu. Přerušovanou čarou je znázorněn konec prezentace CS. (Podle: Dylla et al., 2013)

Při testovací fázi se pak na organismus působí *pouze podmíněným podnětem* bez odměny a sleduje se reakce. Pokud bylo učení úspěšné, zvíře ukáže nepodmíněnou reakci, tedy například včela vytáhne sosák, jako kdyby měla následovat odměna sacharózou, vybere si barvu, u které byla přítomna odměna apod. Po několika hodinách se zkoumá tzv. retence, do jaké míry spojení vydrželo v paměti zvířete (Obrázek 14). Na grafu je vidět, že některé octomilky si dokázaly vybavit spojení i 8 hodin po podmiňování. To záleží na tom, zda se spojení dostalo z krátkodobé paměti (STM) do střednědobé paměti (MTM), či až do dlouhodobé paměti (LTM).



**Obrázek 14 – Retence paměti při zrakovém podmiňování octomilky**

Na vertikální ose je úspěšnost učení octomilek a na horizontální ose je čas jednotlivých testů po tréninku v minutách. Je zřejmé, že většina octomilek si spojení dokázala zapamatovat alespoň 2 hodiny po tréninku. Některé octomilky si spojení pamatovaly až 8 hodin po tréninku. (Podle: Ofstad et al., 2011)

Všechny parametry lze ukázat například při pokusu Mota et al. (2011) Při učební fázi je každá barva (CS) včele prezentována šestkrát. Každé učební kolo trvá 60 sekund, mezi jednotlivými koly je 10 minutová pauza (ITI). Barvou je posvíceno na 5 sekund, a pokud je barva trestána, po 3 sekundách přijde elektrický šok, který trvá 2 sekundy. Test probíhal hodinu po posledním kole podmiňování a bylo při něm vždy na 5 sekund posvíceno podmiňovanou barvou, ale bez odměny.

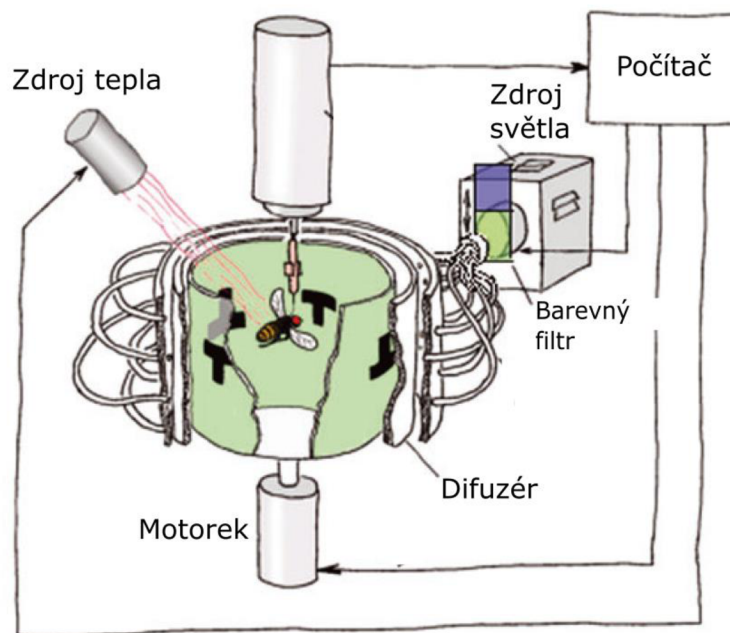
## Rozdělení experimentů podle druhu podmiňování

### *Pavlovovo podmiňování*

Při tomto druhu učení se využívá reakce na nepodmíněný podnět, která se postupně spojuje s jiným podnětem, který dříve nevyvolával žádnou reakci. Nepodmíněným podnětem je ve většině případů potrava, a to nejčastěji 1M roztok sacharózy. Může však být použit i pyl (Grüter *et al.*, 2008). Ten ale obsahuje i jiné cukry, a navíc vydává určité pachy, které mohou metody zkreslovat. Podmíněným podnětem může být pach, zvuk nebo barva. Tento typ podmiňování je dvojího druhu – buď apetitivní nebo averzivní. Při apetitivním druhu se podmíněný podnět páruje se sacharózou, opakem toho je averzivní podmiňování, při kterém se spojuje podnět s trestem, například elektrickým šokem (Schnaitmann *et al.*, 2010), hlasitým zvukem (Menda *et al.*, 2011), slanou vodou (Watanabe *et al.*, 2003), roztokem chininu (Darmaillacq *et al.*, 2004), nebo proudem teplého vzduchu (Giurfa, 2015). Pokud se živočich trestá elektrickým proudem, vždy se volí taková intenzita, aby to živočichovi vadilo, ale nebylo mu ublíženo.

### *Operantní podmiňování*

Operantní podmiňování se liší od klasického tím, že je sledovaný objekt odměňován nebo trestán *za svoje chování*. Například: octomilka je z dorzální strany thoraxu zavěšena doprostřed kruhové arény, na jejíž stěnách jsou nakresleny obrazce. Stěny se pomalu otáčejí. Pokud se octomilka rozhodne letět k obrazci, což je aktivita, která je trestána, pak se na její hrud' spustí proud teplého vzduchu. Tímto se naučí létat směrem k objektům, které nejsou trestány. Podrobný popis aparátu pro experimenty s operantním podmiňováním je vidět na Obrázku 15. Dalším příkladem operantního podmiňování může být například pokus se sépiemi, které se učily vyhýbat se své oblíbené kořisti, protože ta byla následována hořkým roztokem chininu (Darmaillacq *et al.*, 2004).



**Obrázek 15 – Operantní podmiňování u octomilky**

Aparát používaný při operantním podmiňování. Octomilka je uchycena za dorzální stranu thoraxu. Motorek otáčí stěnami arény a zařízení na sledování pohybu octomilky spustí proud teplého vzduchu vždy, když se octomilka vydá trestaným směrem. (Podle: Giurfa, 2015)

### ***Podmiňování druhého řádu (Second-order conditioning)***

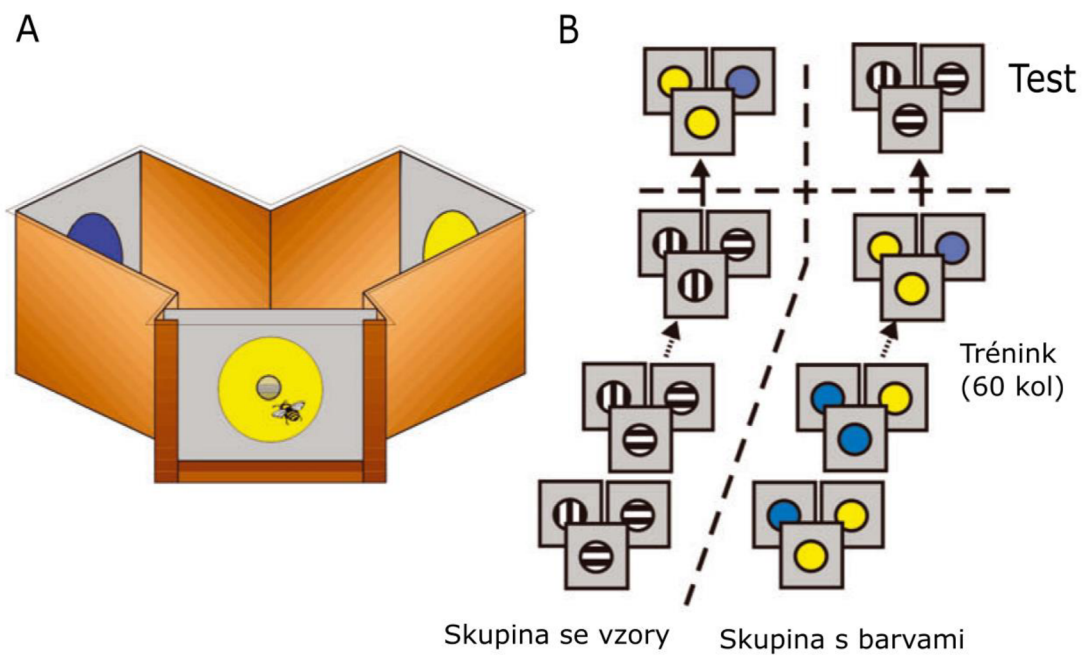
Tento způsob podmiňování spočívá v tom, že si zvíře nejdříve osvojí spojení nepodmíněného (US) a podmíněného podnětu (CS1). Následně je vystaveno spojení mezi jedním známým podnětem (CS1) a jedním novým podnětem (CS2). Tímto spojením se vytvoří nepřímá vazba mezi CS2 a US (Tabone and de Belle, 2011). Podněty mohou být například dva pachy nebo jeden pach a barva.

### ***Zapamatování si shody vzoru a obrazu (Delayed matching-to sample)***

V tomto případě jde o specifický typ podmiňování (Avarguès-Weber *et al.*, 2012), při kterém se včely učí na krátkou dobu (cca 10 s) si zapamatovat vzorek a vybrat ho pak z více možností. Vzorem můžou být jednotlivé barvy nebo i obrazce. Pokud odpoví správně, následuje odměna, pokud špatně, následuje trest, což je v tomto případě roztok chininu. Test pak probíhá v Y bludišti, kde je na začátku bludiště určitý vzor, který je zatím bez odměny. Včela si pak musí vybrat stejný vzor v jednom z ramen bludiště, aby bylo odměněno – oddíl A na Obrázku 16. Aby byl



tento typ učení ještě těžší, včely byly učeny na štítky buď s barvami, nebo se vzory, přičemž při testu byl pak použit druhý typ štítků, jak je vidět na oddíle B Obrázku 16. Další variantou je pak Delayed non-matching - to-sample, při kterém se zvířeti ukáže jeden typ štítků, odměna se však nachází u druhého typu štítků. Další obměnou tohoto podmiňování je takzvané „above/below“, kdy živočich vybírá ze dvou možných uspořádání vzoru, který je buď pod nebo nad prostřední dělicí čarou. Pokud vybere správné uspořádání, následuje odměna, v opačném případě trest.



**Obrázek 16 – Aparát pro podmiňování se zapamatováním si vzoru u včely**

A: Y-bludiště pro uzpůsobené pro zrakové podmiňování u včel. Kolem vchodu je barva, která bude v tomto kole odměňována. Včela si ji musí zapamatovat a poté v bludišti vybrat správné rameno. B: Vzory a barvy použité při tomto druhu podmiňování. Včely trénované na barvy byly pak při testu vystaveny vzorům a opačně. (Podle: Giurfa, 2015)

## ***Reverzní podmiňování***

V tomto konceptu podmiňování se nejprve hmyz naučí klasicky na jeden odměňovaný (CS1+) a jeden neodměňovaný stimul (CS2-). Jakmile se tuto spojitost hmyz naučí, odměňovaný začne být druhý podnět (Hadar and Menzel, 2010). Zkoumá se tím, jestli se zvířata dokáží přizpůsobit novému pravidlu a získat tak odměnu. Tento typ podmiňování úzce souvisí s pojmy jako inhibiční podmiňování a vymizení. Vymizení, anglicky extinkce (anglicky extinction), je proces při učení, kdy si objekt uvědomí, že dříve odměňovaný podnět už není odměňován. Stane se tak po alespoň 10 opakováních, kdy je odměněn nový stimul (Giurfa and Sandoz, 2012). Inhibiční podmiňování, anglicky conditioned inhibition, má několik fází. V první fázi se organismus učí reagovat na CS1 spojený s US. Ve druhé fázi je organismu prezentována směs dvou stimulů, z nichž jeden je mu známý (CS1) a druhý ne (CS2). Tato směs není odměňovaná a nepravidelně se střídá s prezentací CS1+. Organismus si tak spojí, že pokud je přítomný CS2, CS1 není odměňován – CS2 je tedy inhibitor.

## **Rozdělení experimentů podle nepodmíněného stimulu**

Apetitivní i averzivní typ podmiňování lze spojit s jakýmkoliv podmíněným stimulem. Jako příklad uvádím čichové podmiňování.

Trénink u *apetitivního čichového* podmiňování může probíhat tak, že se skupina živočichů umístí do tmavého válce, který je vyložený filtračním papírem. Nejdříve se válec zaplní požadovaným pachem (CS). Na podlahku se umístí papír napuštěný roztokem sacharózy. Následně je komora zaplněná pachem, který není odměňován a filtrační papír se vymění za jiný, napuštěný vodou. Testovací fáze pak probíhá v T bludišti, kde v každém rameni je jeden pach a sleduje se, ke kterému se organismus vydá (Kim *et al.*, 2007).

*Averzivní čichové* podmiňování probíhá u dospělých jedinců octomilky obdobně jako apetitivní podmiňování. Rozdíl je však v tom, že při přítomnosti podmiňovaného pachu je skupina trestaná elektrickým proudem (Kim *et al.*, 2007).

Pokud čichové podmiňování probíhá u larev octomilky (Centre and Sciences, 2009), pak se postupuje tak, že se skupina testovaných larev položí na Petriho misku.

Ta je vyplněná agarem smíchaným se zředěným pachem. Po 30 sekundách vystavení pachu proběhne trest ve formě elektrického šoku. Testovací fáze pak probíhá tak, že se na protilehlé strany Petriho misky umístí dvě menší zóny s pachem. Pozoruje se pak, kolik larev se dostalo do zóny a kolik se zónám vyhýbalo.

## **Rozdělení experimentů podle podmíněného stimulu**

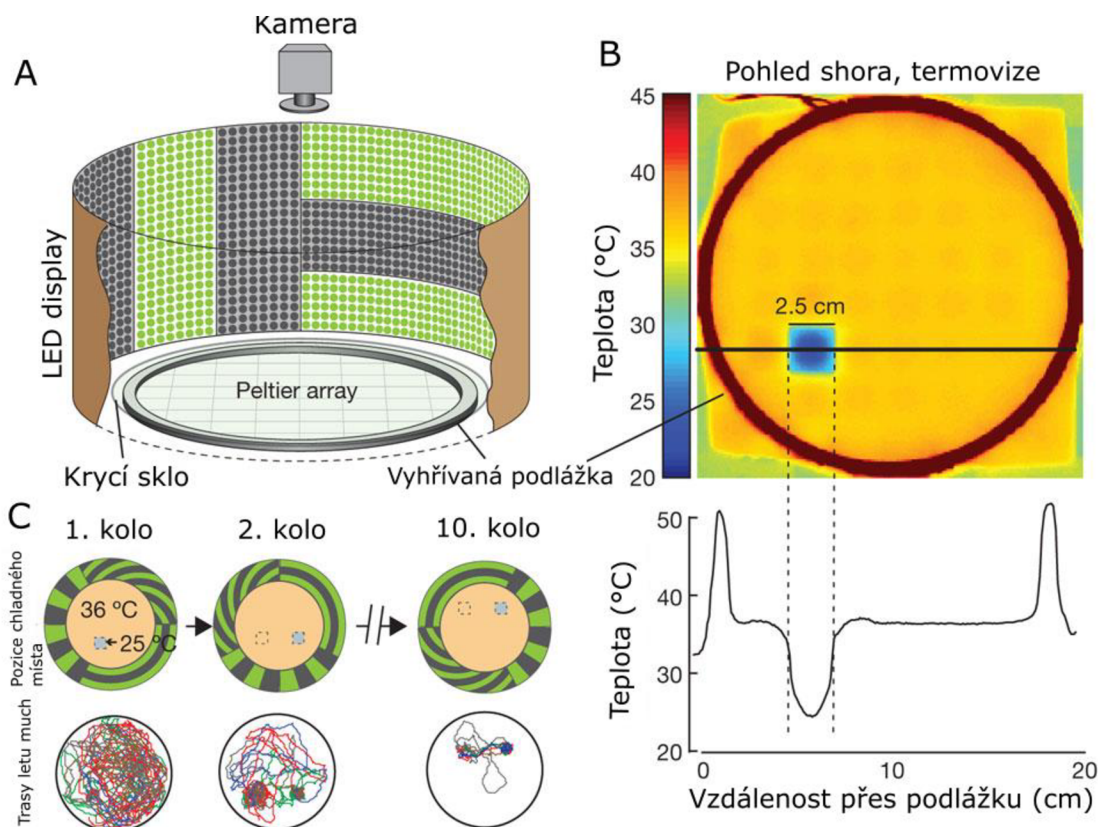
Aby byly při experimentech dosaženy co nejlepší výsledky, je dobré stimul přizpůsobit danému organismu. Někteří živočichové lépe reagují na světlo, jiní na pach. Některé organismy, jako například včely, reagují dobře na více druhů stimulů. Mnoha stimuly se postihne větší oblast mozku, a tedy více neurálních drah, které lze zkoumat.

*Čich* je důležitou součástí života hmyzu, a proto bývá hojně využíván v podmiňovacích pokusech. Pro čichové podmiňování jsou zpravidla použity dva pachy, z nichž jeden je odměňovaný roztokem sacharózy a druhý je buď neodměňovaný, nebo je trestaný slanou vodou. Učební fáze probíhá v kádinkách, kam je například švábům pach a roztok podáván přes injekční stříkačku. Testovací fáze probíhá v plastové komoře, kam jsou umístěny zdroje pachů, šváb si tak vybírá, ke kterému zdroji půjde (Watanabe et al., 2003).

*Zrak* představuje vůbec nejbohatší zdroj pro vnímání okolí, proto se hojně využívá u evolučně pokročilých živočichů. Jednoduchý příklad zrakového podmiňování u včel (Giurfa, 2004) spočívá např. v tom, že včely rozlišují mezi barvou s odměnou a šedým pozadím bez odměny nebo druhou barvou také bez odměny. Učení probíhá v Y bludišti, ve kterém je vždy jen jedna včela. Barvy se po jednom nebo dvou kolech testu vystřídají, aby se předešlo tomu, že si včela zapamatuje směr s odměnou.

Pokusy se zrakovým podmiňováním lze uplatnit i na jiných organismech, než na hmyzu, například na sépii (Purdy *et al.*, 1999). Jako US je použita potrava, jako CS světlo. To svítí vždy po dobu 30 s, po kterých následuje potrava. Kontrolní skupina dostává jídlo až 2 minuty po rozsvícení světla, čímž se zmenšila šance spárování CS a US. Podmiňování probíhá čtyřikrát denně. Trénované sépie pak výrazně častěji vyhledávaly místo se světlem než netréované.

Zvláštním případem pokusů používajících zrak jako podmíněný stimul je pak tak zvaný *Heat box*, ve kterém se testují octomilky (Ofstad *et al.*, 2011). Toto testování v *Heat boxu* má dvě varianty, buďto bez zrakového podnětu nebo se zrakovým podnětem. V prvním případě má tmavá kruhová aréna vytápěnou podlahku a je pomyslně rozdělená na dvě půlky. Pokud octomilka vstoupí na trestanou půlku, podlážka začne topit. Jakmile ale moucha z trestané půlky vystoupí, aréna se vrátí na původní teplotu. Druhá varianta je o něco pokročilejší. Je to kruhová aréna, která má na podlážce vyhřívání a na stěnách LED displej (oddíl A na Obrázku 17). Na něm se promítá pořád stejný obrazec, ale v různých místech na obvodu arény. Podlážka hřeje, což je pro octomilky nepříjemně vysoká teplota, výjimkou je jediné místo, které je chladnější. V průběhu podmiňování se obrazce na displeji i chladné místo otáčejí náhodně buď po směru, nebo proti směru hodinových ručiček, ale vždy tak, aby obrazec označoval pozici chladného ostrůvku, což je vidět na části B Obrázku 17. Octomilka má pak za úkol co nejrychleji nalézt chladné místo podle obrazců na LED displeji. Při testovací fázi se pak na podlážce nenechá chladné místo, ale obraz na displeji se posouvá. Sleduje se, jestli moucha zamíří směrem, kterým je naučená, že leží chladné místo. Tento pokus je možné provádět po skupinách i s jednotlivými mouchami, čímž se ověří, že mouchy nenásledovaly jedna druhou, ale že se opravdu něco naučily (Ofstad *et al.*, 2011).



**Obrázek 17 – Heat box aréna pro zrkové podmiňování u octomilky**

A: Kruhová aréna pro octomilky při zrkovém podmiňování v Heat boxu. Kolem arény je LED display, na kterém se promítají obrázky. Podle nich se může octomilka orientovat a najít tak rychle chladné místo. B: Pohled svrchu na Heat box. Pomocí termovize je dobře patrné jediné chladnější místo na jinak teplé podlážce. C: Na trasách letu octomilek je dobře patrné, že se naučily podle obrázků nacházet studené místo čím dál rychleji. Při prvním kole učební fáze octomilky dlouho náhodně létaly arénou, než našly chladné místo, oproti tomu v 10. kole letěly takřka přímo k němu. (Podle: Ofstad et al., 2011)

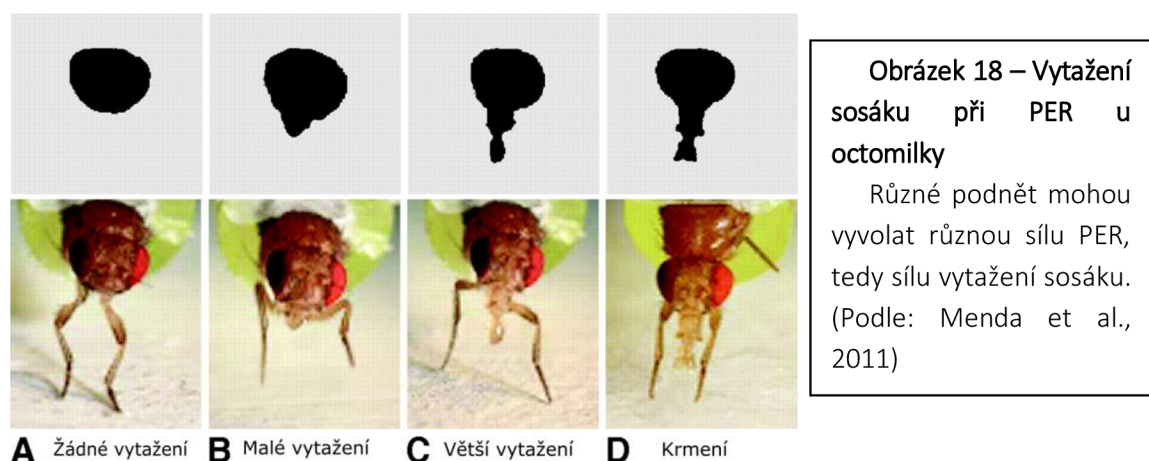
Pro podmiňování je možné využít mechanorecepční neurony. Výhodou je, že se tak mohou učit i organismy, které nemají tolik vyvinutou nervovou soustavu, jako například *Caenorhabditis elegans*, který má pouze 302 neuronů (Ardiel and Rankin, 2010). Zkouší se pak např., jestli po poklepaní na Petriho misku háďátko změní směr pohybu.

Mechanické podráždění je možné využít jako CS i US, jako například u zeje. U něj se sleduje uzavírání dýchacího otvoru. Pokožka kolem dýchacího otvoru se podráždí nylonovou štětkou nebo lehkým elektrickým šokem (CS), jako US je pak použit větší elektrický šok do ocasu (Hawkins *et al.*, 1986).

Další variantou je sledování sosáku při působení zvuku jako podmíněného stimulu (Menda *et al.*, 2011). Octomilky jsou taktéž znehybněny a pohyblivé zůstávají jen přední nohy a sosák, na kterých jsou umístěny receptory pro sacharózu. Při testovací fázi jsou pak octomilky vystaveny pouze zvuku bez přístupu k sacharóze.

## PER

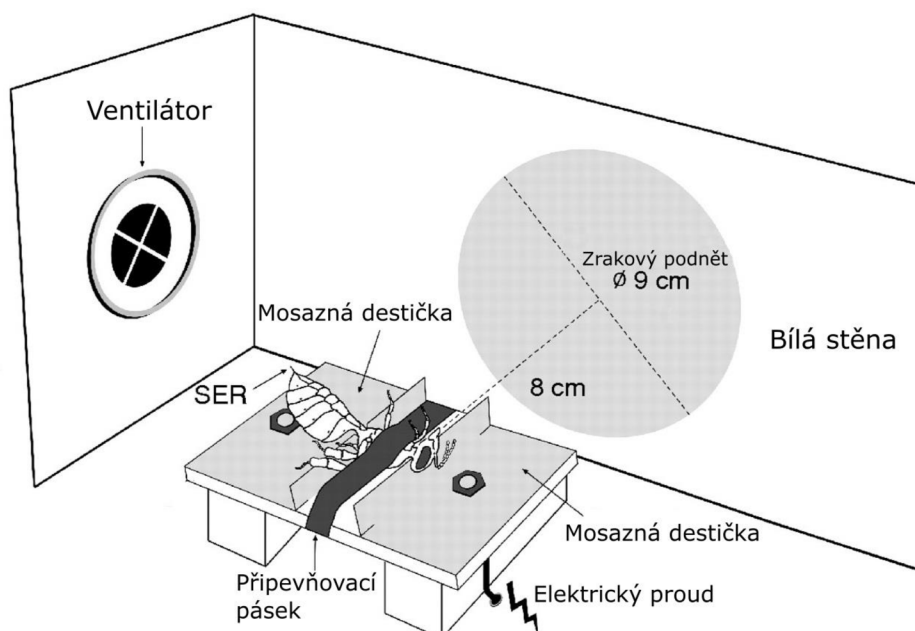
PER (proboscis extension response) je způsob učení hmyzu založený na pozorování *vytažení sosáku*. Lze použít u všech organismů, u kterých se sosák vyvinul. Je to jeden z velmi častých experimentů v současnosti používaných pro výzkum paměti u hmyzu. Princip spočívá v učení se souvislosti mezi pachem (CS+) a odměnou (US), nejčastěji sacharózou. Ta u hmyzu způsobí vytažení sosáku, které je dobře pozorovatelné. Různé intenzity vytažení sosáku jsou popsány na obrázku 18.



Testované organismy, většinou včely nebo octomilky, jsou při tomto pokusu upevněné v malých trubičkách tak, aby se nemohly hýbat a aby hlava byla volná. Při fázi učení se těsně před podáním roztoku sacharózy anebo zároveň s ním zapůsobí na organismus podmíněným podnětem – vyfoukne se přímo na tykadla malé množství pachu (Devaud and Preat, 2006).

## SER

Stejně jako je vysunutí sosáku přirozené při detekci potravy, při podráždění je pro organismy se žihadlem přirozeným obranným mechanismem *vysunutí žihadla*. SER, neboli sting extension response, je tak další možností pro zkoumání učení. U testovaných organismů se sleduje, zda si dokážou spojit určitý podnět s trestem a vytáhnout tak žihadlo jako obranný mechanismus. V tomto případě (Mota *et al.*, 2011) jsou testovaným organismem včely, které se mají naučit spojit si určitou barvu s elektrickým šokem a vysunout tak při ní žihadlo. Aparát pro tento typ podmiňování je popsán na obrázku 19. Včelám je také jako kontrola prezentována druhá barva, která byla bez odměny i trestu. Při testu není přítomen elektrický šok, pouze se sleduje vysunutí žihadla při trestané barvě.



**Obrázek 19 – Aparát na sledování SER u včely**

Včela je upoutána na stolečku ventrální stranou nahoru. Na stěnu této komory je pak promítnuta barva – pokud je trestána, včela dostane elektrický šok. To předpokládá, že jako obranu vysune žihadlo. (Podle: Mota et al., 2011)

## Kapitola 4: Nejpoužívanější modely ve výzkumu paměti

Bezobratlí jsou výborným modelem pro výzkum paměti, protože jejich mozky obsahují jen relativně malý počet neuronů (řádově do milionu). Nabízí se tedy možnost zkoumat paměť na mnoha úrovních vývoje jak fylogenetického, tak ontogenetického. Díky malému počtu neuronů jsme tak schopni sledovat i jednotlivé dráhy a jejich neurální plasticitu dokonce za *in vivo* podmínek. Malý mozek ale neznamená, že nemají žádné složité vzorce chování, naopak. Mezi hmyzem je několik zástupců, kteří tvoří veliké a dobře organizované kolonie, které napovídají, že mezi jedinci musí probíhat určitá komunikace. Nejen že jsou schopni komunikovat pomocí feromonů a používat čichovou paměť, ale také jsou schopni od sebe „opisovat“ určité chování (Putz, 2002). Nesporným kladem je také to, že hmyz se dá lehce pěstovat v laboratoři.

Souhrnné články z posledních let (Menzel, 2012; Menzel and Benjamin, 2013) dobře dokumentují, na jaké druhy se odborníci v rámci této tematiky nejčastěji zaměřují.

### Nematoda - Hlístice

*Caenorhabditis elegans*, háďátka obecné, je průhledný, 1 mm dlouhý, v půdě žijící červ. Je to hermafrodit, takže se může rozmnožovat sám a vytvářet tak genetické klony (Kenyon, 1988). Dobře se na háďátka zkoušejí neasociativní typy učení – habituace nebo spontánní obnovení paměti. I přesto, že má pouhých 302 neuronů, si háďátka umí osvojit určité jednoduché chování. Výhodou je, že jednotlivá synaptická spojení, kterých je pouze 10 000, mohla být díky malému počtu neuronů zmapována elektronovým mikroskopem. Háďátka se využívá také proto, že má jako neurotransmitery dopamin a glutamát, stejně jako savci (Rose and Rankin, 2001; Giles and Rankin, 2009).



## **Mollusca - měkkýši**

### ***Gastropoda***

*Aplysia californica*, zej, lidověji mořský zajíc, je mořský živočich s asi 10 000 velkými neurony. Podobně jako háďátko, se zej hodí spíše pro výzkum neasociativního podmiňování, jako habituace či senzibilizace (Hawkins, 1984). Při nich lze využít obranných reflexů - ustupování, stažení žaber nebo nálevky. Lze jej však použít i při asociativním podmiňování. Nejdůležitějším důvodem, proč se zej používá při experimentech s podmiňováním je, že na jeho neuronech se nacházejí NMDA receptory, což jsou receptory pro glutamát, a lze je najít i u savců (Kandel, 1991).

*Lymnaea stagnalis*, plovatka bahenní, je sladkovodní plž běžně žijící v rybnících. Je schopná se učit asociativně, a to klasicky i operantně, a je schopná si nově naučené chování převést i do dlouhodobé paměti. Plovatka k dýchání využívá jak dýchání pokožkou, tak tzv. vodními plícemi, což je plášťová dutina vyplněná vodou. Je možné jeden z těchto systémů využít k podmiňování, například tím, že se podráždí pneumostom, plovatka ho reflexivně začne zavírat, a tím se aktivuje pokožkové dýchání (Parvez, 2005). Druhou výhodou je, že k ovládní dýchacího aparátu používá plovatka pouze 3 neurony, proto je poměrně snadné tuto cestu sledovat i *in vivo* (Lukowiak, 2003).

### ***Cephalopoda – hlavonožci***

*Octopus vulgaris*, chobotnice obecná, je obvyklým modelem, a to kvůli své inteligenci a pokročilému vývoji. Chobotnice si totiž dokáží stavět úkryty a používat k tomu nástroje a v některých případech dokáží i chodit po dvou končetinách. Chobotnice jsou také pozoruhodné svou schopností měnit barvy pomocí váčků s pigmentem, pomocí nichž se nejen maskují, ale dokáží i komunikovat. Chobotnice jsou také schopné se od sebe navzájem učit (Amodio and Fiorito 2013). Jejich nevýhodou je, že mají velký počet neuronů, jen centrální mozek jich má 50 milionů.

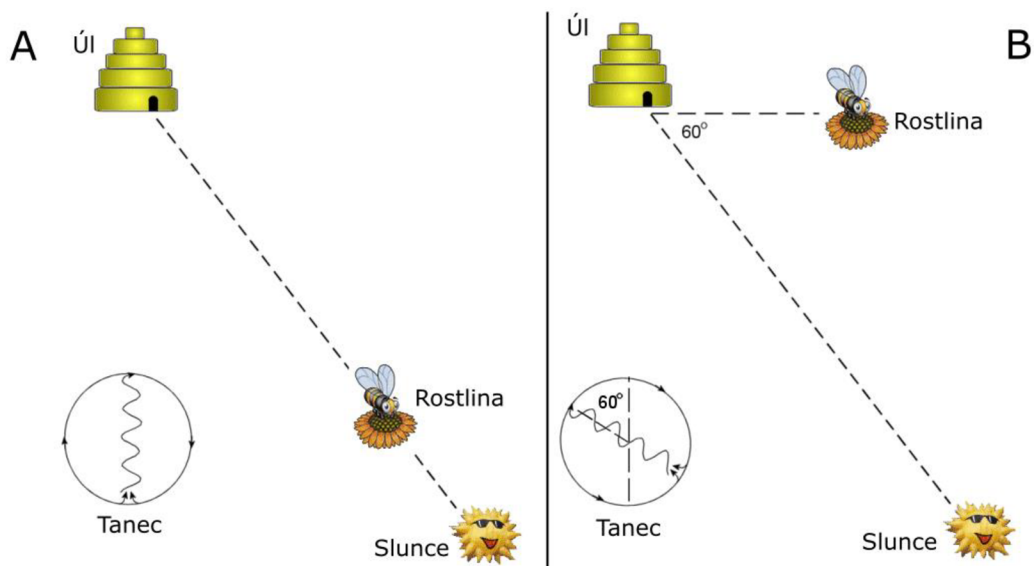
## ***Crustacea – koryši***

*Neohelice granulata*, dříve označovaný jako *Chasmagnathus granulata*, je krab z čeledi Verunidae. Pro pokusy se hodí zejména tím, že používá serotonin, který u něj ovlivňuje různé procesy jako změny barev, metabolismus nebo rozmnožování a funguje tak jako neurotransmitter i neurohormon. Tento krab má i další receptory podobné savčím – například NMDA, které jsou v mnoha částech jeho nervové soustavy (Hepp *et al.*, 2013). Navíc je to velice přizpůsobivý živočich, který dobře snáší i změny podmínek (Inohara *et al.*, 2015).

## ***Hexapoda - Hmyz***

*Drosophila melanogaster*, česky octomilka obecná, je jedním z nejpoužívanějších modelů a zájem o tento model roste. Jejími výhodami je krátký životní cyklus (cca 12 dní) a díky rozvoji genetického inženýrství i velké množství dostupných mutovaných forem. Například mutace *rutabaga* nemá krátkodobou paměť, mutace *radish* střednědobou paměť (Centre and Sciences, 2009).

*Apis mellifera* neboli včela medonosná je spolu s octomilkou nejpoužívanějším modelem při výzkumu paměti a zájem o tento model stále roste. Mají totiž mnoho vlastností, které se pro to výborně hodí – včely mají na poměry hmyzu docela velký mozek (milion neuronů). Také to, že žijí ve společenstvech, napovídá tomu, že musí umět předávat naučené informace dalším jedincům, aby kolonie nezanikla – musí kooperovat. Informace si včely předávají takzvanými „včelími tanci“. Pomocí chůze v kroužcích nebo osmičkách jsou tak schopné vyjádřit, jakým směrem a jak daleko je například dostatek potravy – Obrázek 20. Tuto informaci si druhá včela musí zapamatovat, aby pak vyrazila stejným směrem. Navíc se může spojit s pachem této potravy, který má tančící včela zachycen na těle.



**Obrázek 20 - Obměny včelího tance v závislosti na poloze potravy**

Včelí tance jsou druhem komunikace mezi včelami, které shánějí potravu. Naznačují si tak, jakým směrem a jak daleko letěly při svém průzkumném letu. Orientují se podle polohy slunce – naznačují úhel, který svírá slunce se zdrojem potravy, přičemž vrchol úhlu je východ z úlu. A: Rostlina se nachází přímo směrem ke slunci, pak tedy i taneček směřuje ke slunci. B: Rostlina se nachází v úhlu 60° vzhledem ke slunci, taneček probíhá v úhlu 60° vzhledem ke slunci. Převzato z: URL 3

U včel se také prokázalo, že mají všechny typy paměti – od krátkodobé až po dlouhodobou, navíc se dobře hodí pro všechny typy stimulů – pro čichové podmínování, zrakové, PER i SER (Menzel, 2012). Včely ke komunikaci používají feromony – chemické látky, které pozměňují chovní živočichů a jsou vnímány čichovými receptory. Například celá kolonie je ovládána chemickými signály, které vyprodukuje královna (Sandoz, 2011). Při orientaci a shánění potravy se včely orientují nejen čichem, ale i zrakem. Včelí dělnice před tím, než letí shánět potravu, vykonají pár průzkumných letů. Při těchto až 700 m dlouhých letech včely nesbírají pyl, pouze se rozhlížíjí po okolí a následně se vrací zpět do úlu. To napovídá, že včely by měly mít velice dobrou zrakovou paměť (Capaldi and Dyer, 1999).

*Bombus occidentalis*, čmelák, je příbuzným včely, který se také dobře hodí pro pokusy s pamětí. Čmeláci žijí v menších koloniích, které jsou dobře organizované. Navíc jsou robustnější než včely, takže se lépe hodí pro pokusy v laboratorním prostředí, často se také komerčně chovají a jsou tak zvyklí být uvnitř. Hodí se i pro podmínování s PER, protože také mají sosák. (Riveros and Gronenberg, 2009)

*Grapholita molesta*, obaleč východní, není obvyklým modelem. Protože ale patří do hmyzu s proměnou dokonalou, je u něj výhodné sledovat, zda se paměť zachová od larvy až do dospělce a vydrží tak přes celou proměnu. (Sant'Ana and Gregório, 2016). Při pokusech bylo dokázáno, že larvy samice trénované na pach určité rostliny v dospělosti vyhledávaly tento pach častěji. Dělají to proto, aby samice nakladly vajíčka na stejný druh rostliny, na kterém se sama vylíhla.

*Periplaneta americana*, šváb americký, má sice o něco složitější mozek, než octomilka, což může být nevýhodou. Na druhou stranu si ale dokáže naučené spojení při čichovém podmiňování zapamatovat až na 4 dny (Watanabe *et al.*, 2003). U švábů se využívá aktivity jejich slinných žláz, což je často zkoumaným jevem u obratlovců, v kombinaci s jejich dobrým čichem. Jejich neurony také obsahují stejné neurotransmitery, jako vyšší živočichové (Watanabe and Mizunami, 2007).

*Gryllus bimaculatus*, cvrček dvojskvrnný, se podobně jako šváb dobře hodí pro podmiňování. Má totiž velkou kapacitu paměti, dokáže si zapamatovat i 7 pachů naráz. Umí se učit všemi způsoby – jak vizuálně, tak zvukově i čichově. (Matsumoto and Mizunami, 2006). Čichovou paměť má výborně vyvinutou, protože je to pro něj jedna z nejdůležitějších cest, jak si najít potravu.

## Závěr

Nejvýznamnější osobností vědeckého světa zabývající se tématem učení a podmiňování u bezobratlých v posledních desetiletích je profesor Eric Kandel, který za své zkoumání neurálních mechanismů na zeji rodu *Aplysia* dostal v roce 2000 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Ačkoliv se *Aplysia* v současné době už tolik jako model nepoužívá, svým zkoumáním položil základ pro další autory, jako je M. Giurfa nebo J. Sandoz. Ti se těmito mechanismy zabývají u jiných modelů, jako jsou včely nebo octomilky, které jsou jako modely čím dál více oblíbené.

Z velkého množství metod pro podmiňování je patrné, že podmiňování lze využívat nejen k výzkumu samotné paměti na molekulární úrovni, ale lze ho také využít jako prostředek pro zjišťování smyslových schopností. Lze tím například ověřit, jestli jsou určité organismy vůbec schopny naučit se nějaké spojení, ať už asociativním či neasociativním podmiňováním. Také je možné díky němu například zkoumat, jestli octomilky slyší, a pokud ano, jaké frekvence a intenzity (Menda *et al.*, 2011), nebo jestli včely dokáží rozlišit dva zrakové podněty, které mají stejnou barvu, ale liší se jen achromaticky (Mota *et al.*, 2011).

Paměť a nervové procesy u bezobratlých jsou stále zkoumanou oblastí a zájem o toto téma roste (podle databáze Web of Science), protože se vyskytuje čím dál více nemocí souvisejících s nervovou činností nebo napadajících nervovou soustavu, jako je například Alzheimerova choroba u člověka. Objevy specifických molekul či pochodů by mohly pomoci v tom, jak některým nemocem zabránit nebo jak je léčit.

## Seznam použité literatury

Abraham, W. C. (2008) 'Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity.', *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), p. 387. doi: 10.1038/nrn2356.

Ardiel, E. L. and Rankin, C. H. (2010) 'An elegant mind: learning and memory in *Caenorhabditis elegans*.' , *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(4), pp. 191–201. doi: 10.1101/lm.960510.

Artola, A. and Singer, W. (1993) 'Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation.' , *Trends in neurosciences*, 16(11), pp. 480–7. doi: 10.1016/0166-2236(93)90081-V.

Avarguès-Weber, A., Dyer, A. G., Combe, M. and Giurfa, M. (2012) 'Simultaneous mastering of two abstract concepts by the miniature brain of bees', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), pp. 7481–7486. doi: 10.1073/pnas.1202576109.

Bear, M. F. and Malenka, R. C. (1994) 'Synaptic plasticity: LTP and LTD', *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), pp. 389–399. doi: 10.1016/0959-4388(94)90101-5.

Busto, G., Cervantes-Sandoval, I. and Davis, R. (2010) 'Olfactory learning in *Drosophila*.' , *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(6), pp. 338–346. doi: 10.1152/physiol.00026.2010.

Capaldi, E. A. and Dyer, F. C. (1999) 'The role of orientation flights on homing performance in honeybees.' , *The Journal of Experimental Biology*, 202, pp. 1655–1666.

Centre, N. and Sciences, B. (2009) 'Odour avoidance learning in the larva of *Drosophila melanogaster*' , 34(October), pp. 621–631.

Darmaillacq, A.-S., Dickel, L., Chichery, M.-P., Agin, V. and Chichery, R. (2004) 'Rapid taste aversion learning in adult cuttlefish, *Sepia officinalis*' , *Animal Behaviour*, 68(6), pp. 1291–1298. doi: 10.1016/j.anbehav.2004.01.015.

Devaud, M. C. J. and Preat, M. P. T. (2006) 'Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*' , pp. 1335–1348. doi: 10.1007/s00359-006-

0160-3.

Dylla, K. V., Galili, D. S., Szyszka, P. and Lüdke, A. (2013) 'Trace conditioning in insects-keep the trace!', *Frontiers in Physiology*, 4 AUG(August), pp. 1–12. doi: 10.3389/fphys.2013.00067.

Giles, A. C. and Rankin, C. H. (2009) 'Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*', *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier Inc., 92(2), pp. 139–146. doi: 10.1016/j.nlm.2008.08.004.

Giurfa, M. (2004) 'Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*', *Naturwissenschaften*, 91(5), pp. 228–231. doi: 10.1007/s00114-004-0530-z.

Giurfa, M. (2007) 'Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well', *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193(8), pp. 801–824. doi: 10.1007/s00359-007-0235-9.

Giurfa, M. (2015) 'Learning and cognition in insects', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 6(4), pp. 383–395. doi: 10.1002/wcs.1348.

Giurfa, M. and Sandoz, J.-C. (2012) 'Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees', *Learning & Memory*, 19(2), pp. 54–66. doi: 10.1101/lm.024711.111.

Grünbaum, L. and Müller, U. (1998) 'Induction of a Specific Olfactory Memory Leads to a Long-Lasting Activation of Protein Kinase C in the Antennal Lobe of the Honeybee', *J. Neurosci.*, 18(11), pp. 4384–4392. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/18/11/4384>.

Grüter, C., Arenas, A. and Farina, W. M. (2008) 'Does pollen function as a reward for honeybees in associative learning?', *Insectes Sociaux*, 55(4), pp. 425–427. doi: 10.1007/s00040-008-1022-5.

Hadar, R. and Menzel, R. (2010) 'Memory formation in reversal learning of the honeybee.', *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4(December), p. 186. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00186.

Hallem, E. A. and Carlson, J. R. (2004) 'The odor coding system of *Drosophila*',

*Trends in Genetics*, 20(9), pp. 453–459. doi: 10.1016/j.tig.2004.06.015.

Hawkins, R. D. (1984) ‘A cellular mechanism of classical conditioning in Aplysia.’, *The Journal of experimental biology*, 112, pp. 113–128.

Hawkins, R. D., Carew, T. J. and Kandel, E. R. (1986) ‘Effects of interstimulus interval and contingency on classical conditioning of the Aplysia siphon withdrawal reflex.’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 6(6), pp. 1695–1701.

Heisenberg, M. (1998) ‘What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction.’, *Learning & Memory*, 5(1–2), pp. 1–10. doi: 10.1101/lm.5.1.1.

Hepp, Y., Tano, M. C., Pedreira, M. E. and Freudenthal, R. A. M. (2013) ‘NMDA-like receptors in the nervous system of the crab *Neohelice granulata*: A neuroanatomical description’, *Journal of Comparative Neurology*, 521(10), pp. 2279–2297. doi: 10.1002/cne.23285.

Inohara, E. T. S., Pinto, C. B., Model, J. F. A., Trapp, M., Kucharski, L. C., Da Silva, R. S. M. and Vinagre, A. S. (2015) ‘Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues’, *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*. Elsevier Inc., 185, pp. 80–90. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.03.012.

Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L. L., Rössler, W., Simpson, J. H., Strausfeld, N. J., Strauss, R. and Vosshall, L. B. (2014) ‘A systematic nomenclature for the insect brain’, *Neuron*, 81(4), pp. 755–765. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.017.

Johnson, P. D. and Besselsen, D. G. (2002) ‘Experimental Design : Initial Steps’, *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 43(4), pp. 202–206.

Kandel, E. R. (1991) ‘Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Individuality Short-Term Storage of Implicit Memory for Simple Forms of Learning Results From Changes in the Effectiveness of Synaptic Transmission Habituation Involves an Activity-Dependent Pres’, *Principles of Neural Science*, pp.



1009–1031.

Kandel, E., Schwartz, J. and Jessell, T. (1991) *Principles Of Neural Science*. fourth. McGraw Hill. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

Keene, A. C. and Waddell, S. (2007) ‘Drosophila olfactory memory: single genes to complex neural circuits.’, *Nature reviews. Neuroscience*, 8(5), pp. 341–354. doi: 10.1038/nrn2098.

Kenyon, C. (1988) ‘The nematode *Caenorhabditis elegans*.’, *Science (New York, N.Y.)*, 240(4858), pp. 1448–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3287621>.

Kim, Y. C., Lee, H. G. and Han, K. A. (2007) ‘Classical reward conditioning in *Drosophila melanogaster*’, *Genes, Brain and Behavior*, 6(2), pp. 201–207. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00241.x.

Lukowiak, K. (2003) ‘Associative learning and memory in *Lymnaea stagnalis*: how well do they remember?’, *Journal of Experimental Biology*, 206(13), pp. 2097–2103. doi: 10.1242/jeb.00374.

Matsumoto, Y. and Mizunami, M. (2002) ‘Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*.’, *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 10), pp. 1429–1437.

Matsumoto, Y. and Mizunami, M. (2006) ‘Olfactory memory capacity of the cricket *Gryllus bimaculatus*.’, *Biology letters*, 2(4), pp. 608–610. doi: 10.1098/rsbl.2006.0540.

Menda, G., Bar, H. Y., Arthur, B. J., Rivlin, P. K., Wytenbach, R. a, Strawderman, R. L. and Hoy, R. R. (2011) ‘Classical conditioning through auditory stimuli in *Drosophila*: methods and models.’, *The Journal of experimental biology*, 214, pp. 2864–2870. doi: 10.1242/jeb.055202.

Menzel, R. (2012) ‘The honeybee as a model for understanding the basis of cognition’, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 758–768. doi: 10.1038/nrn3357.

Menzel, R. and Muller, U. (1996) ‘Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates.’, *Annual review of neuroscience*, 19(1), pp. 379–404.

doi: 10.1146/annurev.neuro.19.1.379.

Mescher, A. (2013) *Junquiera's basic histology*. 13th edn. New York, Chicago, London, Lisbon, San Francisco, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Sydney, Toronto, Singapore: McGraw Hill.

Monique, G. (2010) 'State of the Art on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Function in Learning and Memory', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683(June), pp. 75–83. doi: 10.1007/978-1-4419-6445-8.

Morante, J. and Desplan, C. (2008) 'The Color-Vision Circuit in the Medulla of *Drosophila*', *Current Biology*, 18(8), pp. 553–565. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.075.

Mota, T., Roussel, E., Sandoz, J. C. and Giurfa, M. (2011) 'Visual conditioning of the sting extension reflex in harnessed honeybees', *J Exp Biol*, 214(Pt 21), pp. 3577–3587. doi: 10.1242/jeb.062026.

Ofstad, T. A., Zuker, C. S. and Reiser, M. B. (2011) 'Visual place learning in *Drosophila melanogaster*.', *Nature*. Nature Publishing Group, 474(7350), pp. 204–7. doi: 10.1038/nature10131.

Otsuna, H. and Ito, K. (2006) 'Systematic Analysis of the Visual Projection Neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-Specific Pathways', *J Comp Neurol*, 502(2), pp. 275–290. doi: 10.1002/cne.

Parvez, K. (2005) 'Boosting intermediate-term into long-term memory', *Journal of Experimental Biology*, 208(8), pp. 1525–1536. doi: 10.1242/jeb.01545.

Pfeiffer, K. and Homberg, U. (2014) 'Organization and functional roles of the central complex in the insect brain.', *Annual review of entomology*, 59, pp. 165–84. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162031.

Purdy, J. E., Roberts, a C. and Garcia, C. a (1999) 'Sign tracking in cuttlefish (*Sepia officinalis*).', *Journal of comparative psychology*, 113(4), pp. 443–449. doi: 10.1037/0735-7036.113.4.443.

Putz, G. (2002) 'Mutants in Operant Conditioning in the Heat-Box'.

Riveros, A. J. and Gronenberg, W. (2009) 'Olfactory learning and memory in the bumblebee *Bombus occidentalis*', *Naturwissenschaften*, 96(7), pp. 851–856. doi:

10.1007/s00114-009-0532-y.

Rose, J. K. and Rankin, C. H. (no date) 'Caenorhabditis elegans', *Learning & Memory*. doi: 10.1101/lm.37801.so.

Sakai, T. and Kitamoto, T. (2006) 'Differential Roles of Two Major Brain Structures, Mushroom Bodies and Central Complex, for Drosophila Male Courtship Behavior', *Journal of Neurobiology*, 66, pp. 677–686. doi: 10.1002/neu.

Sandoz, J. C. (2011) 'Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees.', *Frontiers in systems neuroscience*, 5(December), p. 98. doi: 10.3389/fnsys.2011.00098.

Sant'Ana, J. and Gregório, P. L. F. (2016) 'Olfactory learning and memory in *Grapholita molesta*', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 160(1), pp. 40–46. doi: 10.1111/eea.12456.

Schnaitmann, C., Vogt, K., Triphan, T. and Tanimoto, H. (2010) 'Appetitive and aversive visual learning in freely moving Drosophila.', *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4(March), p. 10. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00010.

Tabone, C. J. and de Belle, J. S. (2011) 'Second-order conditioning in Drosophila.', *Learning & Memory*, 18(4), pp. 250–253. doi: 10.1101/lm.2035411.

Waddell, S., Armstrong, J. D., Kitamoto, T., Kaiser, K. and Quinn, W. G. (2000) 'The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the Drosophila brain that are critical for memory.', *Cell*, 103(5), pp. 805–13. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00183-5.

Watanabe, H., Kobayashi, Y., Sakura, M. and Matsumoto, Y. (2003) 'Classical Olfactory Conditioning in the Cockroach *Periplaneta americana* Classical Olfactory Conditioning in the Cockroach *Periplaneta americana*', *Zoological science*, 20(12), pp. 1447–1454.

Watanabe, H. and Mizunami, M. (2007) 'Pavlov's Cockroach: Classical Conditioning of Salivation in an Insect', *PLoS ONE*, 2(6). doi: 10.1371/journal.pone.0000529.

Wessnitzer, J. and Webb, B. (2006) 'Multimodal sensory integration in insects — towards insect brain control architectures', 63. doi: 10.1088/1748-3182/1/3/001.

Yasuyama, K. and Meinertzhagen, I. A. N. A. (2003) 'Synaptic Connections of Cholinergic Antennal Lobe Relay Neurons Innervating the Lateral Horn Neuropile in the Brain of *Drosophila melanogaster*', 315(May), pp. 299–315. doi: 10.1002/cne.10867.

Ss

## **Interne rové zdroje**

URL 1: “Synapse”, in Your dictionary. LoveToKnow. Available at: <http://www.yourdictionary.com/synapse> (Accessed: March 29, 20172920172017).

URL 2: in CLINICALGATE. Available at: [http://clinicalgate.com/wp-content/uploads/2015/03/B9780702037382000085\\_f008-004-9780702037382.jpg](http://clinicalgate.com/wp-content/uploads/2015/03/B9780702037382000085_f008-004-9780702037382.jpg) (Accessed: April 05, 20170520172017).

URL 3: “The Honeybee Waggle Dance – Is it a Language?”, in AnimalWise. Available at: <https://animalwise.org/2011/08/25/the-honeybee-waggle-dance-%E2%80%93-is-it-a-language/> (Accessed: March 02, 20170220172017).