

2

SVĚT OTIŠTĚNÝ
DO PAMĚŤOVÝCH STOP

Aleš Stuchlík

ÚVOD DO UČENÍ A PAMĚTI

Přežití v každodenním světě často vyžaduje, aby jedinec pružně reagoval na změny prostředí, a schopnost jakéhokoliv adaptivního chování předpokládá využití předchozí zkušenosti v neustále se měnícím světě. Často tyto dovednosti zahrnují i oblast sociálních vztahů, a to jak u člověka, tak u zvířat. Učení a paměť patří v neurovědě k nejstudovanějším fenoménům chování. Paměť je disciplínou studovanou také psychiatry, neurology a vědci z řady dalších oborů. Učení a paměť umožňuje srovnávací studie, kdy tytéž procesy lze sledovat často u mnoha živočišných druhů, v mnoha případech včetně člověka. Učení a paměť jsou jedněmi z prvních domén zasažených při neurodegenerativních onemocněních a demencích (jako např. Alzheimerova nemoc), ale i např. u schizofrenie; jejich detailní studium má proto velký význam i pro medicínu.

Učení a paměť jsou všudypřítomné fenomény, avšak i na jejich přesné definici se odborníci často obtížně shodnou. Učení lze chápat jako ukládání informací pro jejich následné použití a paměť jako proces udržování, regulace a opětovného použití těchto informací. Pro vlastní učení či osvojování paměti se často používají anglické výrazy **learning**, **acquisition** a **encoding**. Dnes se badatelé víceméně shodnou na tom, že neexistuje nic jako univerzální paměť; naproti tomu existují mnohočetné paměťové systémy s odlišným umístěním, mechanismy a také projevy. Přesto však alespoň některé typy paměti sdílejí podobné či shodné molekulární mechanismy (viz níže). Nervové buňky jsou v centrální nervové soustavě propojeny specifickými spojeními, synapsími, a právě zesílení a zeslabení přenosu na těchto spojeních (synaptická plasticita) je podkladem učení a paměti. Existuje celá řada citlivých molekul v membráně (receptorů), dále enzymů a také vnitrobuněčných signálních molekul, které se těchto procesů účastní.

Schopnost pamatovat si vzpomínky je klíčová u druhů s vyšší délkou života, neboť se v průběhu svého ontogenetického vývoje setkávají s řadou vstupů a změn. Dále je učení velmi žádoucí, pokud se prostředí, ve kte-

rém jedinec žije, mění. A přiznejme si, že to je velmi častý případ. Učení lze pozorovat od nejjednodušších projevů bezobratlých, a to i přisedlých organismů, až po savce včetně primátů a člověka. Jako příklad jednoduchého učení u přisedlého živočicha lze zmínit např. experiment, při němž se opakovaně dotýkáme nezmarra (*Hydra oligactis*) skleněnou tyčinkou: jeho reflexivní odpovědi slábnou – nezmar se učí, že podnět pravděpodobně ztrácí svoji relevanci či potenciální nebezpečnost. Příkladem komplikovaného učení je např. americká sojka západní, pták ukládající si potravu do skrýš, který je schopen zapamatovat si, jakou potravu si uložil a kdy a kde tak učinil. Tento druh paměti, obsahující komponenty »co, kdy, kde«, poněkud připomíná autobiografické (epizodické; viz níže) vzpomínky u člověka. Učení v průběhu života jedince vyžaduje správné přednastavení nervových buněk, drah a spojů ve vývoji a dozrávání mozku (v angličtině se někdy používá termínu **prewiring**, což by se dalo přeložit poněkud vulgárně jako »správné předdrátování«). K určitým typům učení dochází i ve specifických úsecích života jedince. Pěkným příkladem je **imprinting** neboli vtištění, kdy housata či kachňata jsou schopna věrně následovat jakákoliv pohyblivý objekt, kterému byla vystavena druhý den po narození, a to třeba i autíčko tažené na provázku nebo dokonce i obyčejnou krabici. Tento nesmírně zajímavý etologický fenomén byl pozorován již v 19. století amatérským biologem Spaldingem, a velmi jej později rozpracoval a zpopularizoval proslulý etolog Konrad Lorenz, nositel Nobelovy ceny.

Řada čtenářů jistě ví ještě ze školy, že v rámci jedné nervové buňky se signál přenáší elektricky, avšak s tím rozdílem, že nejde o podélný tok elektronů, tak jako je tomu u elektrického drátu. Elektrický drát je sám vodičem a proud nesou elektrony šířící se podélně drátem rychlostí světla. V případě neuronu dochází k příčnému toku iontů (nikoli elektronů) skrze plazmatickou membránu, buněčný obal neuronu. Tato membrána totiž obsahuje bílkovinné kanálky (označované jako iontové kanály), které propouštějí více či méně různé typy iontů, a to velmi selektivně a propracovaně! Tokem

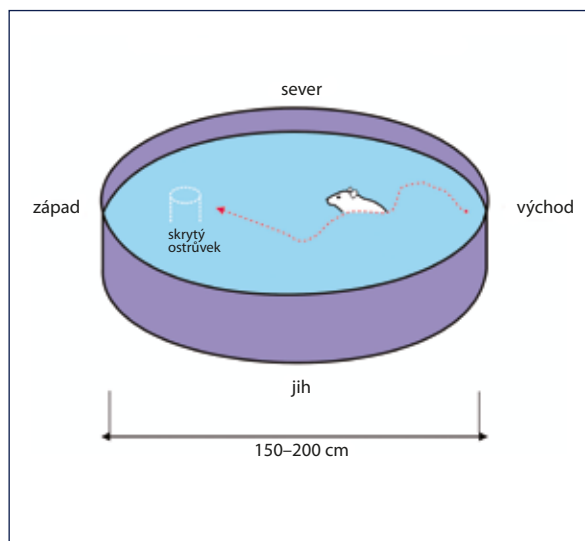
iontů skrze otevřené kanálky dochází ke změně potenciálu (jinými slovy napětí) na této membráně. Změna napětí se šíří do sousedních částí membrány, kde se touto změnou polarity otevírají další iontové kanály řízené napětím a začínají opět procházet ionty.

Tak se vlastně příčně šíří proud po vlákne i v podélném směru, ovšem daleko pomaleji než elektrický proud ve vodiči. Tento samotný elektrický přenos nabízí poměrně málo či žádné mechanismy pro jeho ovlivnění a následnou změnu funkce, např. učení. Lapidárně řečeno, tento tok iontů lze vypnout, např. tetradotoxinem (TTX), jedem z tropických ryb jako např. čtverzubce (mj. vyhledávané japonské lahůdky), avšak je prakticky nemožná nějaká jeho selektivní modulace. Zcela jiné situace nastává tam, kde si dvě buňky signál předávají, protože to se děje chemickou cestou, které se účastní nezměrné množství látek, vlastně celé molekulární kaskády. Zde už se nabízí řada mechanismů např. pro působení léků.

PAMĚŤOVÁ STOPA (ENGRAM)

Paměťovou stopu lze chápat právě jako konkrétní vzpomínku, termín engram je někdy používán ve stejném smyslu, avšak lze jej chápat i jako mechanismus kódování a uskladnění vzpomínky. Alternativně je termín engram někdy chápán jako hypotetické místo, kde je vzpomínka pomocí změny neurochemických procesů uchována. U řady typů paměti však platí, že paměťová stopa není lokalizovaná v jediné struktuře, a už vůbec ne v omezené sadě synaptických spojů. Na toto téma byly v laboratoři Edvarda I. Mosera v Trondheimu, jednoho z nejvýznamnějších badatelů na poli učení a paměti a čerstvého spolunositele Nobelovy ceny, provedeny v devadesátých letech nesmírně zajímavé experimenty. Zvířata byla trénována v prostorově paměťové úloze, kruhovém bazénu (Morrisově vodním bludišti⁽⁶⁾; MWM; obr. 2.1.) hledat skrytý ostrůvek na základě vnějších orientačních značek a jejich mozková struktura zvaná hipokampus⁽¹⁾ (která je pro tuto úlohu zásadní) byla ponechána nedotčená. Následně byla těmto předtrénovaným zvířatům určitá část hipokampu experimentálně narušena a zvířata byla opět testována v úloze vodního bludiště. Výsledek byl ten, že zvířata si předešlou informaci nepamatovala, avšak byla schopna se naučit novou polohu ostrůvku. To ukazuje, že původní engram byl při osvojení distribuován v celém hipokampu a po narušení této distribuované sítě zvířata v bludišti selhávala. Nové učení po poškození hipokampu bylo možné proto, že i část této struktury byla schopna vytvořit funkční síť schopnou kódovat nové vzpomínky.^(2,3,5)

Termín **engram**⁽¹⁰⁾ byl zaveden německým zoologem a evolučním biologem Richardem Wolfgangem Semonem (1859–1918), badatelem, jehož řada myšlenek



Obr. 2.1. Schematické znázornění aparatury Morrisova vodního bludiště⁽⁶⁾. Představuje jej kruhová nádrž naplněná vodou, ve které potkan či myš vypuštěná z náhodného místa na periferii hledá ostrůvek zanořený na daném místě bazénku, který není přímo viditelný. Po několika plavbách potkani najdou ostrůvek v konstantní pozici po několika sekundách plavání na základě kognitivní mapy prostředí. Autorka obrázku Barbara Stuchlíková

upadla v zapomnění či byla překonána, avšak na rozvoj neurobiologie paměti měl veliký vliv. Richard Semon publikoval v roce 1921 knihu nazvanou *The Mneme*, ve které navrhl řadu zásadních myšlenek z behaviorální biologie. Výborný přehled Semonových myšlenek, podává Daniel Schacter ve své knize *Forgotten Ideas, Neglected Pioneers: Richard Semon and the Story of Memory*, vydané v roce 2001. Celkově lze říci, že vzpomínka, paměťová stopa, nebo engram jsou vlastně základním stavebním kamenem učení a paměti.

PAMĚŤOVÉ PROCESY

Se zapomínáním souvisí další paměťový proces, vyhasínání (oborně extinkce). Extinkce není totéž co zapomínání, je vlastně určitým druhem učení, při vystavení určité situaci, kdy se změní kontingence (vlastně důsledky chování). Subjekt se musí naučit, že daný podnět, situace či vzpomínka již není relevantní (vlastně se odnaučí), a zpravidla tomu své chování přizpůsobí. Jak zapomínání, tak extinkce jsou velmi důležité, protože mozek má omezenou kódovací kapacitu a za nepřítomnosti těchto procesů by byla jeho informační kapacita brzo nasycena.

Základních paměťových procesů v mozku živočichů je celá řada. Jak jsme již zmínili, informace se nejprve ukládají či kódují (tj. učení, osvojení). Obecně platí, že informace se nejprve ukládají do senzorické (neboli percepční), pak krátkodobé paměti a poté jsou

procesem upevňování či fixace (paměťové konsolidace) převedeny do dlouhodobé paměti (avšak nikoli všechny). Konsolidace je dalším důležitým paměťovým procesem a ve valné většině, ne-li ve všech případech vyžaduje tvorbu nových bílkovin kódovaných deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a ribonukleovou kyselinou (RNA). Konsolidaci můžeme rozlišit minimálně na dvou základních úrovních, a to buněčné (plastické změny v buňkách a na nervových spojích), a systémové, kdy u některých typů paměti může jejich lokalizace přecházet z jedné struktury do jiné, např. do mozkové kůry.

Dalším důležitým paměťovým procesem je uchování paměťové stopy. Jde o uskladnění paměťové stopy a zde je velice důležité zdůraznit, že nejde o proces neměnný a pevně daný, ale vysoce dynamický. Paměť může být ve fázi uskladnění nejrůznějšími způsoby modifikována, transformována či zobecnována (generalizace). Uskladnění paměti slouží k jejímu dalšímu vybavení, které u zvířat, jež nám nemohou verbálně sdělit své vzpomínky, zpravidla pozorujeme jako změnu chování, resp. schopnost či neschopnost se něčemu naučit nebo si vybavit předem naučenou informaci. Vybavení je vlastně znovuoživení dané paměťové stopy. U člověka je běžné např. slovní vybavení vzpomínek. U zvířat je dnes řada známa řada etologických přístupů ke studiu všech dosud zmíněných paměťových procesů.

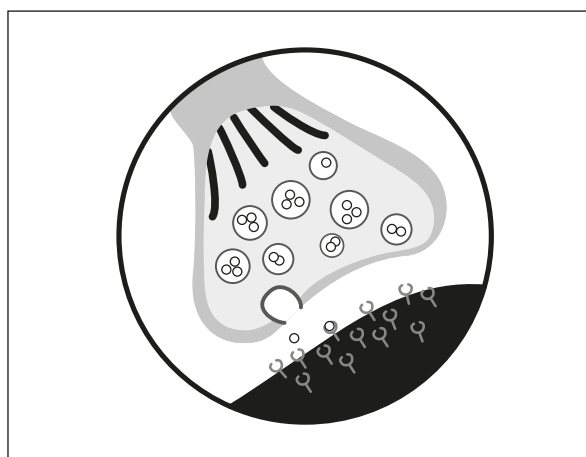
Nesmírně zajímavým paměťovým procesem je jev rekon-solidace. Není jisté, zda k ní dochází u všech typů paměti. Její podstata spočívá v tom, že je-li uskladněná vzpomínka znovu vybavena, stává se opět »labilní« či citlivá (např. k blokadě syntézy bílkovin anisomycinem) a opětovně podstupuje právě zmíněný proces konsolidace.⁽¹⁵⁾ Rekon-solidace vybavených vzpomínek byla objevena poměrně nedávno; jako fenomén v roce 1997 a fakt, že rekon-solidace strachově zabarvených vzpomínek vyžaduje syntézu nových bílkovin, byl popsán až v roce 2000. Zásadní postavou ve studiu rekon-solidace je Karim Nader z McGill University. Klíčové je, že během rekon-solidace např. strachových vzpomínek mohou být tyto vzpomínky modifikovány, ať už psychologicky nebo farmakologicky, což má terapeutické využití. Tento jev je využíván např. při léčbě posttraumatické stresové poruchy (PTSD) – u některých pacientů vystavených silné strachové vzpomínce nebo traumatu se mohou v průběhu času projevit extrémně silné strachové vzpomínky, zvýšená úzkost, tendence k užívání návykových látek, narušené zapojení do společnosti, noční můry a **flashbacky**, tedy jakési záblesky připomínající prožitou traumatickou událost. Vzhledem k tomu, že během opakovaného vybavování se vzpomínka může postupně pozměnit a stát nepřesnou, fenomén rekon-solidace patrně souvisí i s existencí tzv. falešných vzpomínek.

SYNAPSE A SYNAPTICKÁ PLASTICITA

Aby mohl mozek kódovat, uchovávat a vybavovat vzpomínky, musejí být jeho funkční složky vybaveny schopností dynamických, plastických změn. Termín plasticita lze vystopovat až do starověku k hliněným tabulkám, Sokratovi a Platónovi. Obecný termín plasticita je poměrně vágní a nespecifický, ale asi každý si pod ním určitě dokáže představit procesy, při kterých dochází k dynamickým změnám funkce. Časová dynamika je zásadní vlastností plasticity obecně.

Jak jsme zmínili, nervové buňky v mozku neboli neurony si předávají informace pomocí synapsí. Je nesmírně důležité, že i synapse mohou procházet plastickými změnami. Už desítky let se badatelé domnívají, že tato **synaptická plasticita** by mohla být podkladem učení, paměti, ale i dlouhodobějších vzorců chování či patologických stavů (např. chronické neuropatické bolesti, nutkavého užívání drog, posttraumatické stresové poruchy apod.). Nejprve si krátce popíšeme koncept synaptických spojení. Ta lze rozdělit na chemické a elektrické synapse.

Chemické synapse (obr. 2.2.) jsou klasické synapse, spojení mezi neuronem a jinou buňkou, např. nervovou, svalovou či buňkou žláz (glioové buňky je nevytvářejí), kde membrány obou sousedících neuronů, presynaptického a postsynaptického, odděluje tenká mezera, přes kterou volnou difúzí přechází chemická látka, neuropřenašeč (někdy též neurotransmitter; velmi různorodá skupina chemických látek). Tato látka se následně váže na receptory v postsynaptické membráně a vyvo-



Obr. 2.2. Základní zobrazení chemické synapse. Presynaptické zakončení (nahore) obsahuje synaptické váčky naplněné neuropřenašečem. Po příchodu vzruchu na toto zakončení se spustí molekulární kaskáda vedoucí ke splynutí váček s membránou terminály a uvolnění jejich obsahu do synaptické štěrbin. Neuropřenašeč se poté váže na receptory v membráně cílového, tedy postsynaptického neuronu, které vyvolávají odpověď, a předává tak signál dále. <http://clipart-finder.com/clipart/chemical-synapse.html>

lá tak odpověď postsynaptické (cílové buňky). V presynaptickém neuronu je neuropřenašeč syntetizován a v samotném zakončení uložen v synaptických váčcích (angl. vesicles) ohraničených membránou z lipidové dvojvrstvy. Do váčku se neuropřenašeče přenášejí molekulárními pumpami ve stěně váčků, proti elektrochemickému spádu. Jde tedy o aktivní transport. Impulsem pro výlev obsahu synaptického váčku je vstup vápenatých iontů do presynaptického zakončení; tento vstup spouští proteinovou kaskádu zahrnující řadu poměrně nedávno popsaných bílkovin s komplikovanými akronymy (např. SNARE, SNAP). Poté dojde ke splynutí (odborně exocytóze) membrány váčku s plazmatickou membránou zakončení, samotnému výlevu, volné difúzi neuropřenašeče přes synaptickou štěrbinu a aktivaci či inhibici cílové postsynaptické buňky, kde následně dojde k odpovědi. Badatelé Katz a Miledi a současně s nimi badatel Illés a český neurofyziolog prof. František Vyskočil v 70. letech 20. století popsali, že na presynaptické membráně dochází také k nekvantovému výlevu, tedy kontinuálnímu úniku neuropřenašeče ze zakončení skrze speciální kanálky v jeho membráně. Funkční význam tohoto jevu je dnes předmětem mnoha studií. Prof. František Vyskočil je dnes uznávaným odborníkem v oblasti buněčné neurofyziologie a také velmi známým popularizátorem vědy.

Chemická synapse je kromě substrátu plastických změn také dominantním místem, kde lze funkci nervové soustavy ovlivnit např. léky nebo drogami. Zcela zásadním krokem synaptického přenosu je včasné ukončení účinku neuropřenašeče, aby nedocházelo k trvalé aktivaci synapse. Toto ukončení se může dít přímým chemickým rozkladem neuropřenašeče, jako je to např. u acetylcholinu enzymem acetylcholinesterázou na cholin a kyselinu octovou. Ukončení účinku se také může dít vychytáváním do okolních neuronů a gliových buněk, kde jsou dále zpracovávány. Například pro zakončení účinku glutamátu existuje několik typů transportérů excitačních aminokyselin (angl. excitatory amino acid transporters; EAATs) v membránách okolních buněk, které vychytávání (anglický termín reuptake) zajišťují.

Velmi dobře prostudovanou modelovou synapsí je nervosvalové spojení (nervosvalová ploténka;), tedy synapse mezi motorickým neuronem a kosterním svalem, kde jsou u obratlovců přenašeči acetylcholin (ACh) a adenosintrifosfát (ATP). Na nervosvalové ploténce nebyly studovány dlouhodobé synaptické změny, které by mohly vést k tvorbě paměti, ale i zde je možno pozorovat krátkodobější formy plasticity, které jsou přítomné i u synapsí v mozku. I z hlediska farmakologie a toxikologie je nervosvalové spojení nesmírně zajímavou strukturou. Acetylcholin se na něm váže na rychlé, tzv. nikotinové receptory, a tyto receptory, kromě aktivace nikotinem, jsou blokovány tubokurarinem, látkou z kurare, tedy z jedu jihoamerických tropických žab, jímž tamní domorodci napouštěli hroty šípů. Další zajíma-

vou problematikou je otázka inhibitorů právě zmíněné acetylcholinesterázy. Takovými spolehlivými blokátory jsou organofosfáty. Kromě velmi nelidského využití organofosfátů jako nervových jedů využívaných jako chemické zbraně (např. sarin) jsou tyto látky využívány jako insekticidy. Při intoxikaci organofosfáty dojde právě k zablokování AChE a neschopnosti rozkládat acetylcholin. Pokud je takový případ letální, úmrtí nastává kvůli neschopnosti relaxovat bránici (i bránice je kosterní sval a je řízena motoneurony vylučujícími acetylcholin) spojené s následným udušením.

SYNAPTICKÁ PLASTICITA

Koncept plasticity čili schopnosti dynamických změn se v historii poznání vyskytuje už velmi dlouhou dobu, v novověku byla synaptická plasticita poprvé predikována Donaldem Hebbem a Davidem Courtney Marrem již v 50. letech 20. století. Donald Hebb předpovídal, že když jsou presynaptický a postsynaptický neuron opakovaně a **současně** aktivní, nastanou mezi nimi metabolické nebo jiné změny, které usnadní synaptický přenos (volný autorův překlad Hebbova zákona) a dojde tak k posílení spojení mezi oběma neurony.⁽⁴⁾ David Marr byl britský neurobiolog a psycholog a zabýval se především viděním. V roce 1971 navrhnul autoasociativní model archikortikální (hipokampální) reprezentace paměti, kdy aktivované neurony vytvářely vzájemná spojení na základě zvýšení synaptické účinnosti a následně po vytvoření sítě stačila aktivace části buněk k obnovení funkce celé sítě.

Model byl založen na modifikaci synaptických spojení pomocí zkušenosti, umožňoval vybavení paměťové stopy i na základě částečné informace, a stal se východiskem pro mnoho hypotéz o funkci hipokampu, z nichž některé byly potvrzeny. Synaptickou plasticitu lze obecně definovat jako změny synaptické síly, tedy účinnosti synaptického přenosu z neuronu na jiný neuron nebo výše zmíněné další buňky. Mechanismů synaptické plasticity je celá řada. Patří sem např. rašení (angl. sprouting) či úbytek nervových spojů, neurochemické změny na synapsích, které si představíme v následující kapitole, změna množství uvolněného neuropřenašeče. Některé z těchto změn jsou pozorovatelné i u bezobratlých živočichů.

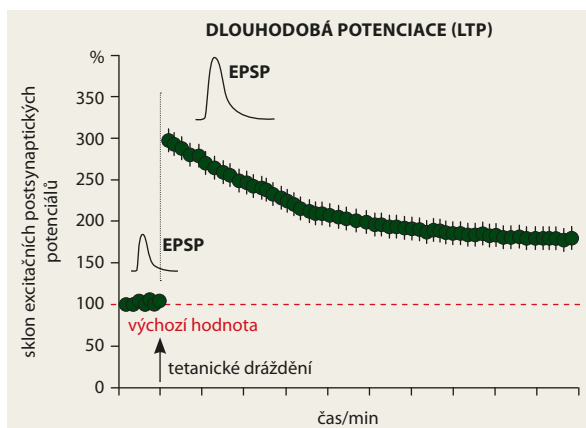
Krátkodobé změny na mnoha typech synapsí včetně nervosvalového spojení zahrnují párovou facilitaci, ke které dochází po aplikaci dvou stimulačních pulsů následujících zlomek sekundy po sobě. Druhá odpověď je pak vyšší než odpověď na první puls. Například na nervosvalovém spojení lze také pozorovat synaptickou augmentaci nebo posttetanickou potenciaci, speciální typy krátkodobé synaptické plasticity po aplikaci vysokofrekvenční stimulace. Za tyto změny je povětšinou zodpovědné hromadění vápníku v buňce.

Vzhledem k tomu že v raných fázích výzkumu byly tyto změny studovány právě na nervosvalovém spojení (nejprve žab, později také hlodavců), na kterém nedochází k učení a paměti, opravdový zájem badatelů zabývajících se pamětí vyvolaly experimenty z laboratoře badatele Andersena z norského Osla.

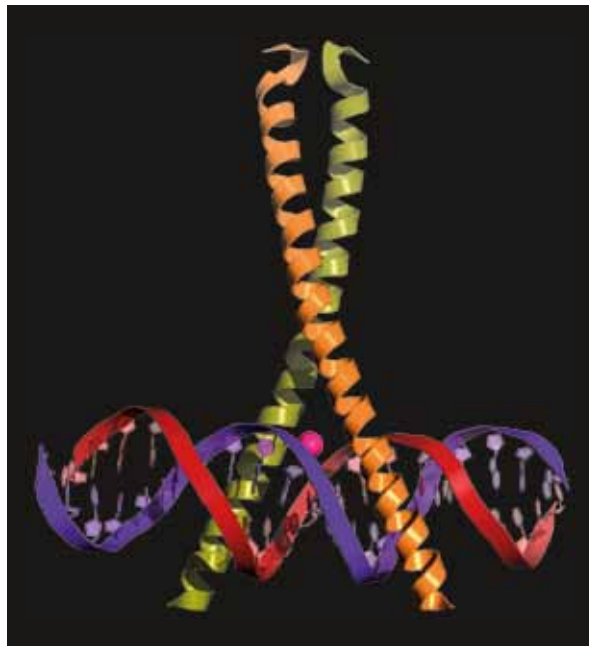
DLOUHODOBÁ POTENCIACE

Badatelé Tim Bliss a Terje Lømo z laboratoře Pera Andersena v norském Oslu popsali v roce 1973 po několika letech studia zjištění, že tetanická (tedy vysokofrekvenční) stimulace perforující dráhy, přivádějící do hipokampu informace z neokortexu, vede ke zvýšení synaptických odpovědí neuronů v gyrus dentatus (jakási vstupní brána do hipokampu) anestezovaného králíka. Tento jev byl nazván dlouhodobá potenciace (angl. long-term potentiation; LTP) – obr. 2.3. Později byl tento fenomén prokázán i u volně pohyblivých králíků, potkanů, myši a dalších druhů. LTP byla později popsána i v jiných oblastech hipokampu a také v řadě dalších struktur včetně povrchové kůry mozku, ale hipokampální LTP stále zůstávala a zůstává v centru pozornosti, patrně především pro jeho významnou roli v učení a paměti. LTP lze rozlišit na časnou a pozdní. Obě fáze ještě obsahují indukční fázi a fázi udržovací. Řada badatelů dnes považuje hipokampální LTP za podklad paměti. LTP lze dnes studovat mnohem detailněji, i za pomoci např. hipokampální řezů, optogenetiky a dalších přístupů.

Složité molekularní kaskáda vede k expresi specifických enzymů, které udržují tuto pozdní fázi LTP, pře-



Obr. 2.3. Znárodnění fenoménu dlouhodobé potenciace. V grafu je na vodorovné ose čas, na svislé ose je vynesena sklon rostoucí fáze synaptických odpovědí. Sklon i velikost excitacích postsynaptických potenciálů (EPSP) se prudce zvýší po tetanickém dráždění této synapse v souvislosti s dlouhodobou potenciací (LTP). Tento fenomén může přetrvávat po dobu hodin až dnů. Autorka obrázku Barbara Stuchlíková



Obr. 2.4. Schematické znázornění trojrozměrné struktury faktoru CREB. <https://en.wikipedia.org/wiki/CREB#/media/File:CREB.png>

devším proteinkinázy MČ (PKMČ). PKMČ je atypickou formou proteinkinázy C, která postrádá regulační podjednotku a vykazuje trvalou aktivitu. Jak si ukážeme v následující kapitole o vztahu učení a paměti k LTP, je to žhavý kandidát na »**memory molecule**«, tedy molekulu klíčovou k uchování paměťové stopy. Zásadním je také zjištění, že na synapsích může docházet i ke změnám výlevu neuropřenašeče z nervového zakončení, a to prostřednictvím retrogradních (neboli zpětných) signálů. V této souvislosti se uvažuje o plyných neuropřenašecích oxidu dusnatém a oxidu uhelnatém, které mají schopnost volně pronikat nervovou tkání na vzdálenost několika milimetrů. Poslední výzkumy také naznačují, že by se retrogradní signalizace mohly účastnit i proteiny extracelulární matrix, tedy bílkoviny obsažené v mezibuněčných prostorech včetně synaptických štěrbin.

Zásadní molekulou účastnící se dlouhodobé potenciace a tvorby dlouhodobé paměťové stopy obecně je bílkovina označovaná jako CREB (zkratka pro anglický termín **cAMP response element-binding protein** (obr. 2.4.). cAMP je zase zkratka označující cyklický adenosinmonofosfát (ten představuje spolu s dalšími molekulami a ionty, jako např. iont Ca^{2+} nebo inositoltrifosfát, důležité vnitrobuněčné posly, které přenášejí v buňce informace). CREB je transkripčním faktorem (tedy proteinem vázajícím se na DNA v jádře neuronu, který může spustit kaskádu přepisu genů a tvorbu nových bílkovin). Souvisí se stabilizací vzpomínek spojených se strachem. Svoji zásadní roli hraje hlavně v hipokampu a amygdale. Pokud je odstraněn gen pro

CREB u modelového organismu zeje mořského (*Aplysia californica*; angl. sea slug), tento mořský měkkýš není schopen uchovávat dlouhodobé paměťové stopy, zatímco krátkodobé ano. Pokud je podobné vyřazení genu pro CREB provedeno u myši, mají zachování krátkodobou paměť, ale vykazují poškozenou dlouhodobou paměť v řadě úloh, především těch, které jsou závislé na hipokampu a amygdale. Tato zásadní role CREB byla prokázána i u modelového živočicha octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*, angl. fruit fly nebo banana fly), což naznačuje, že jeho role v dlouhodobých vzpomínkách je evolučně vysoce konzervována (přítomná i u členovců). Elektrofyziologické studie také prokázaly, že vyřazení této bílkoviny naruší synaptickou plasticitu a zvýšené synaptické odpovědi při LTP se v tomto případě navrátí po cca 90 minutách do bazální koncentrace. Pokud je pomocí virového vektoru (*herpes simplex* s vloženým genem pro CREB) do amygdaly vložena tato bílkovina, obnoví paměť pro vzpomínky na události vyvolávající strach. Všechny tyto poznatky naznačují, že mezi aktivitou proteinu CREB, pamětí a synaptickou plasticitou existuje jednoznačný vztah, ačkoliv (jak tomu ve vědě často bývá) byly publikovány i studie, které ho zpochybňují.

DLOUHODOBÁ DEPRESE

Jakýmsi přirozeným protějškem LTP je dlouhodobá deprese (angl. long-term depression; LTD). LTD představuje vlastně opak LTP, jde o zeslabení synaptické síly a zajímavé je, že je zpravidla také podmíněna aktivací NMDA receptorů a vstupem vápenatých iontů do postsynaptického zakončení, avšak na nižší koncentraci Ca^{2+} . Někdy se vyvolání LTD účastní také metabotropní glutamátové receptory, tedy pomalé receptory citlivé na glutamát, které přímo svojí molekulou nepropouštějí ionty, ale aktivují nepřímou signální kaskádu skrze aktivaci intracelulárních proteinů a kaskádu druhých posílů.

Následně dojde v postsynaptickém neuronu k mírnějšímu zvýšení aktivity vápenatých iontů než u LTP, a dále k indukci fosfatáz, což jsou enzymy, které naopak defosforylují jiné bílkoviny (odštěpují z nich fosfátové zbytky). Defosforylace vede ke snížení citlivosti postsynaptických receptorů na neuropřenašeč a také někdy k navrácení těchto receptorů z plazmatické membrány dovnitř buňky, tedy do cytoplazmy. Velmi pozoruhodný je i fakt, že na synapsích Schafferových kolaterál (spojení hipokampálních oblastí CA3 a CA1) lze vyvolat jak LTP, tak LTD, a oboje tetanickým drážděním; klíčovým faktorem je frekvence elektrických pulsů. Nízkofrekvenční dráždění (např. 3 Hz) vyvolá LTD, zatímco vysokofrekvenční dráždění (např. 50–100 Hz) pak indukuje LTP. LTD v části mozku zvané mozeček (angl. i lat. *cerebellum*) je klíčová pro motorické učení. Dokon-

ce zde neurovědci ukázali klíčovou roli transkripčních faktorů, jako je např. již výše zmíněný CREB. Faktorem zůstává, že ve srovnání s LTP je LTD mnohem méně studována.

DLOUHODOBÁ POTENCIACE A VZTAH K UČENÍ A PAMĚTI

Fakt, že by dlouhodobá potenciace u savců mohla sloužit jako substrát učení a paměti, nebyl dlouho exaktně prokázán, přesto se již ve 20. století objevily pokusy, které se snažily tuto vazbu prokázat. Znamé jsou např. experimenty, kdy badatelé blokovali určité typy receptorů (např. NMDA nebo AMPA podtyp glutamátových receptorů, které jsou nezbytné pro indukci a udržování LTP) a snažili se detekovat simultánní narušení učení a paměti a dlouhodobé potenciace. Výsledky ukázaly, že blokáda NMDA receptorů vede k narušení indukce dlouhodobé potenciace, zatímco blokáda AMPA receptorů pak postihuje již navozenou LTP. Přesto však neprokázali příčinný vztah mezi LTP a pamětí, stále byla »na stole« řada alternativních vysvětlení. Blokáda NMDA receptorů narušovala paměť např. v Morrisově vodním bludišti, avšak pouze pokud potkani nebyli předem obeznámeni s pravidly úlohy. Pakliže podstoupili neprostorové předtrénování (angl. non-spatial pretraining; NSP), narušení učení nebylo pozorováno. NSP je procedura, při níž jsou potkani obeznámeni před experimentálním zásahem pravidlům úlohy, takže jedinou věcí, jež se poté během testu musejí naučit, je umístění přesné polohy skrytého cíle v jejich mapě prostoru. NSP je zpravidla realizován tréninkem potkanů ve vodním bludišti bez orientačních bodů (okolo bazénu je zatažen neprůhledný závěs). Poloha ostrůvku se mezi plavbami náhodně mění, zvířata jsou tedy nucena opustit plavání okolo stěn, na které se snaží marně vyšplhat, a naučí se, že v bazénku ostrůvek je, a že jej potřeba je aktivně hledat, neznají však jeho polohu během budoucího tréninku.

Jiné experimenty, především z laboratoře již zmíněného Edvarda I. Mosera z norského Trondheimu, využily odlišný přístup, a to tetanické (tj. vysokofrekvenční) dráždění valné většiny hipokampálních synapsí a následného tréninku ve vodním bludišti. Výsledky opět ukázaly, že toto nasycení (odborně saturace) LTP vede ke zhoršení učení, avšak pokud byla zvířata opět vystavena před saturací LTP neprostorovému předtrénování, deficit opět vymizel. Zdálo se tedy, že LTP by mohlo mít vztah k osvojení správné strategie a pravidel úlohy.⁽⁶⁻⁸⁾

Nesmírně zajímavá studie byla publikována v roce 2006 v americkém časopise *Science* badatelem Jonathánem Whitlockem a spolupracovníky. Ukázala, že trénování v úloze pasivního vyhýbání vede na některých hipokampálních synapsích k indukci LTP.⁽¹⁴⁾ V této neprostorové úloze mají potkani umístění do boxu sestávajícího ze dvou oddílů, jednoho ostře osvětle-

ného a druhého tmavého, za úkol vyhnout se vstupu do tmavého oddílu (který přirozeně jako noční zvířata preferují), kde byla předtím potrestána mírnou elektrickou rankou. Mají tak vlastně za úkol potlačit svoji přirozenou tendenci na základě předchozí zkušenosti (proto pasivní vyhýbání). Bez zajímavosti také není, že u řady synapsí LTP indukována nebyla, což bychom mohli chápat jako podpůrný důkaz pro již zmíněnou hypotézu distribuce paměťových stop, která poukazuje na zapojení často velmi vzájemně vzdálených mozkových okruhů v určitém typu vzpomínky.

Další, tentokrát už mnohem přesvědčivější důkazy o vztahu LTP a paměti vycházejí z prací Todda Charltona Sacktora, který byl tím badatelem, jenž ukázal, že syntéza PKM ζ je nezbytnou a dostačující podmínkou k udržovací fázi pozdní LTP. Badatelé vyvinuli specifický blokátor PKM ζ , peptid ZIP (angl. zeta-inhibiting peptide) a původem česká výzkumnice Eva Paštáková spolu se spolupracovníky ukázala⁽⁹⁾ (ve stejném čísle časopisu Science, ve kterém vyšla studie o indukcii LTP učněním), že mikroinjekce tohoto peptidu a následná blokáda PKM ζ vymazala prostorovou paměť v úloze aktivního vyhýbání se místu. Zajímavé bylo taky zjištění, že tato blokáda sice vedla k vymazání již existující paměťové stopy, avšak nezabránila novému učení v téže úloze, což naznačuje že PKM ζ nehraje patrně roli v indukcii časné LTP a v novém osvojení úlohy. Nedávné nálezy však ukázaly, že inhibice PKM ζ peptidem ZIP byla schopna zablokovat také rozvoj neuropatické bolesti, inhibice PKM ζ eliminovala paměť pro odměnu spojenou s drogou a tento inhibiční peptid také zmírňoval vyhledávání a konzumaci kokainu. Zdá se tedy, že nejen paměť, ale i některé dlouhodobé stavy, jichž se neuroplastické mechanismy účastní, by mohly být pozitivně ovlivnitelné.

Badatele také zaujala otázka, zda toto vymazání paměťové stopy je patrné i u jiných druhů paměti (vzpomeňte na mnohočetné paměťové systémy). A skutečně tato blokáda pomocí injekce peptidu ZIP do chuťové korové oblasti vymazala i podmíněnou chuťovou averzi, speciální a evolučně velmi výhodný typ učení, kde se subjekt vyhýbá potravě či obecně chuti, jež mu byla předtím spojena s nevolností. V roce 2008 bylo prokázáno, že u řady typů paměti tento mechanismus funguje, konkrétně pro prostorovou paměť, a operantní a klasické podmiňování u laboratorních potkanů.⁽¹¹⁻¹³⁾

Aby situace nebyla tak jednoduchá, zcela nedávno byly ve dvou nezávislých studiích vyvinuty transgenní myši s konstitutivním (tedy provedeným už ve fázi vajíčka) a v dospělosti experimentálně navozeným vyřazením PKM ζ a u těchto zvířat nebylo narušení LTP ani paměti patrné. Naopak, dodatečná aplikace peptidu ZIP vedla k eliminaci LTP, což by naznačovalo, že peptid ZIP může cílit ještě na jiný enzym, který se procesu učení a paměti účastní. Náznačky objasnění tohoto rozporu se objevily s nálezem, že jiná příbuzná atypická forma proteinkinázy C, proteinkináza iota, by mohla

velmi rychle kompenzovat absenci či vyřazení PKM ζ . Zda je tedy PKM ζ jedinou »paměťovou molekulou«, se nezdá pravděpodobné, a je možné že více izoforem proteinkináz může zajišťovat jak retenci paměti, tak LTP, a to především kompenzačními mechanismy, zatímco u intaktních zvířat, tj. bez pokusné manipulace či vyvolání mutace, hraje PKM ζ pravděpodobně opravdu klíčovou roli.

SHRNUTÍ

Poznání kognitivních funkcí zvířat a člověka dosáhlo výrazného pokroku, přesto však stále neznáme přesnou příčinu řady nemocí, z nichž mnohé z nich postihují učení, paměť a kognitivní funkce obecně, např. Alzheimerova nemoc nebo schizofrenie. Velké pokroky v poznání základních mechanismů paměti skýtají naději, že se nám podaří rozklíčovat podstatu kognitivních deficitů a mechanismy jejich vzniku. K tomu je však potřeba společné úsilí vědců ze základního výzkumu, klinických pracovníků a lékařů a v neposlední řadě i odborníků zabývajících se translačním a orientovaným výzkumem a aplikacemi do praxe.

Učení a paměť jsou speciální typy chování, které lze u nonhumánních živočichů velmi snadno testovat pomocí specifických experimentálních zásahů a testování v prostorových úlohách. Zrovna tak je třeba vysoce vyzdvihnout práci terénních badatelů, kteří přímo v přirozeném životním prostředí zvířat získávají cenné poznatky o učení a paměti, chování obecně, používání nástrojů a sociální interakci a komunikaci. Avšak i badatelé pracující s lidskými subjekty disponují slušným repertoárem výzkumných technik, od neuropsychologických vyšetření a testování paměti ve virtuální realitě a v experimentálních bludištích přes neurovizuální techniky až po výjimečné případy, zmíněné u epileptických pacientů s vhojenými diagnostickými elektrodami. Všechny tyto techniky nabízejí slibný potenciál pro získání poznatků o kognitivních funkcích, o mozkové a neuronální organizaci vzhledem k učení a paměti a snad nám v budoucnu pomohou najít i příčiny onemocnění, která jsou doprovázena významnými paměťovými deficity, jako např. schizofrenie nebo Alzheimerova nemoc.

Na závěr bych rád vyzdvihl nutnost vzájemné těsné kooperace výzkumníků z nejrůznějších oblastí, jako jsou neurovědci, výpočetní biologové, psychiatři, psychologové a snad i filozofové. Velkým problémem vzájemných interakcí těchto oborů je určitá diskrepance poznávacích metod, odlišnost »vědeckého jazyka«, rozdílnost teoretických rámců a často i neshoda o základních pojmech. Již nyní však v Čechách (na Západě je to již běžnou praxí) dochází k prvním vlastovkám interakce kliniků a neurovědci. Proto, aby se různé vědní disciplíny dobraly kompaktního poznání učení, paměti,

kognitivních funkcí, nemocí postihujících paměť apod., bude třeba sblížit výzkumný aparát těchto disciplín a zaměřit se na aktuální témata, na kterých budou práce probíhat v synergii a komplementárním přístupu lékařů a badatelů v základním výzkumu. Věda jako taková představuje strukturu v leckterých projevech podobnou církvi; má vlastní metody poznání pravdy, vlastní dogmata a rituály a vlastní výrazový aparát. Aby jí nehrozil úpadek související se sebezahleděností, musí-

me usilovat o »živou«, komunikující a otevřenou vědu. V přiblížení vědy veřejnosti a kooperaci vědních disciplín spatřuji jednu z největších společenských výzev v oblasti vědy v současnosti.

Tato kapitola vznikla za podpory projektu č. LO1611 MŠMT (NUP4NUDZ) v rámci programu NPU I, grantu GA ČR 14-03627S, AZV 15-34524A a projektu ED2.1.00/03.0078.

LITERATURA

1. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31: 571–591.
2. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331–356.
3. Brown TH, et al. Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Ann Rev Neurosci* 1990; 13: 475–511.
4. Hebb D. *The organization of behavior*. New York: John Wiley 1949.
5. Morris RGM. Spatial localization does not require presence of local cues. *Learn Mot* 1981; 260: 239–260.
6. Moser EI, Moser MB. Is learning blocked by saturation of synaptic weights in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23: 661–672.
7. Moser M, Moser EI. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 1998; 18: 7535–7542.
8. Otnæss MK, et al. Pretraining prevents spatial learning impairment after saturation of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 1999; 19: RC49.
9. Pastalkova E, et al. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 2006; 313: 1141–1144.
10. Semon R. *The mneme*. London: Allen and Unwin 1921.
11. Serrano P, et al. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol* 2008; 6: 2698–2706.
12. Shema R, et al. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science* 2011; 331: 1207–1210.
13. Shema R, et al. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 2007; 317: 951–953.
14. Whitlock JR, et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 2006; 313: 1093–1097.
15. Dudai Y. The Restless engram: consolidations never end. *Ann Rev Neurosci* 2012; 35: 227–247.