

**Edyta Balcerek**

**Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy:  
znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek  
wizualnych w procesach nawigacyjnych**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Pamięci Przestrzennej  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:  
Dr hab. Rafał Czajkowski, prof. Instytutu Nenckiego

Warszawa, 2024

*Dziękuję*

*Dr hab. Rafałowi Czajkowskiemu, prof. Instytutu Nenckiego  
za nieocenione wsparcie, nieustanną otwartość na dialog, za zaufanie, ogromny optymizm oraz  
autentyczną wiarę w ludzi, za możliwość pracy w tak sprzyjających i przyjemnych warunkach.*

*Uli Włodkowskiej,*

*za zrozumienie, za pełne empatii, przyjacielskie, inspirujące oraz naukowe wsparcie na każdym etapie  
pracy doktorskiej.*

*Monice Falińskiej,*

*za nieocenioną, bezinteresowną gotowość do pomocy i przyjacielską relację.*

*Koleżankom i Kolegom z Pracowni Pamięci Przestrzennej,*

*za przyjazną atmosferę pracy, wspólnie spędzone chwile i wymianę myśli zarówno naukowych jak  
i przyjacielskich.*

*Borysowi,*

*za niekończące się wsparcie, cierpliwość, zrozumienie, pogodę ducha i czułą opiekę nad dziećmi  
podczas realizacji pracy doktorskiej.*

*Badania opisane w pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki wsparciu finansowemu z Narodowego  
Centrum Nauki SONATA BIS 4 2014/14/E/NZ4/00172*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

# Spis treści

1	Streszczenie .....	6
2	Abstract .....	7
3	Wykaz skrótów .....	8
4	Wstęp.....	12
4.1	<i>Nawigacja w przestrzeni .....</i>	<i>12</i>
4.2	<i>Neuronalna reprezentacja mapy przestrzennej .....</i>	<i>15</i>
4.3	<i>Komórki miejsca .....</i>	<i>16</i>
4.4	<i>Komórki siatki.....</i>	<i>19</i>
4.5	<i>Komórki kierunku głowy.....</i>	<i>20</i>
4.6	<i>Komórki granicy .....</i>	<i>21</i>
4.7	<i>Komórki prędkości i komórki czasu .....</i>	<i>22</i>
4.8	<i>Umiejscowienie RSC w obwodzie pamięci przestrzennej.....</i>	<i>24</i>
4.9	<i>Zaangażowanie RSC w proces nawigacji.....</i>	<i>27</i>
4.10	<i>Funkcjonalne subpopulacje komórek RSC .....</i>	<i>30</i>
4.11	<i>c-Fos jako marker pobudzenia neuronalnego .....</i>	<i>32</i>
4.12	<i>Mapowanie c-Fos w RSC .....</i>	<i>37</i>
4.13	<i>Podstawy zastosowanego systemu behawioralnego (labirynt T) .....</i>	<i>40</i>
5	Cele pracy.....	43
6	Materiały i metody .....	44
6.1	<i>Zwierzęcy model badawczy i warunki hodowli.....</i>	<i>44</i>
6.2	<i>Wektory wirusowe (Chemogenetyczny system modulacji aktywności neuronalnej oparty na receptorach DREADD).....</i>	<i>45</i>
6.3	<i>Operacje stereotaktyczne.....</i>	<i>46</i>
6.4	<i>Eutanazja na skutek skrwawienia przez perfuzję przezsercową .....</i>	<i>48</i>
6.5	<i>Doświadczenia laboratoryjne.....</i>	<i>50</i>
6.5.1	<i>Przygotowanie skrawków mózgu.....</i>	<i>50</i>
6.5.2	<i>Znakowanie białka c-Fos z użyciem 3’3- diaminobenzydyny (DAB) (immunohistochemia).....</i>	<i>50</i>

6.6	<i>Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych</i> .....	53
6.6.1	Obrazowanie białka c-Fos w neuronach .....	53
6.6.2	Analiza występowania białka c-Fos w neuronach .....	53
6.7	<i>Analiza statystyczna</i> .....	55
6.8	<i>Układ doświadczalny</i> .....	55
6.8.1	Automatyzacja systemu do realizacji zadania behawioralnego .....	55
6.8.2	Automatyczny dispenser nagrody .....	61
6.9	<i>Metody behawioralne</i> .....	62
6.9.1	Habitucja do zadania behawioralnego .....	62
6.9.2	Habitucja do wzmocnienia apetytywnego .....	63
6.9.3	Protokół eksperymentalny. Trening kontekstowy (eksperyment 1) .....	64
6.9.4	Trening Alternacyjny .....	66
6.9.5	Trening Złożony .....	67
6.9.6	Test (trening kontekstowy) .....	69
6.9.7	Indukcja ekspresji c-fos .....	70
6.9.8	Protokół eksperymentalny. Trening w oparciu o zróżnicowane bodźce wzrokowe (eksperyment 2 i eksperyment 3) .....	70
6.9.9	Test (trening oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe, eksperyment 2) .....	73
6.9.10	Test (trening oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe, eksperyment 3) .....	73
7	<b>Wyniki</b> .....	76
7.1	<i>Opracowanie i wykonanie automatycznego systemu do badania pamięci przestrzennej myszy</i> .....	76
7.2	<i>Analiza wpływu różnych strategii treningu na proces nawigacji opartej o bodźce wizualne</i> .....	78
7.3	<i>Zaangażowanie RSC oraz HPC w proces nawigacji opartej o wskazówki wizualne przy zastosowaniu różnych strategii uczenia się myszy</i> .....	83
7.4	<i>Stworzenie paradygmatu behawioralnego uzależniającego nawigację zwierząt od prezentowanych bodźców wzrokowych</i> .....	92
7.5	<i>Analiza wykorzystania zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji w labiryncie</i> .....	96
7.6	<i>Analiza wpływu inaktywacji kory retrosplenialnej na nawigację opartą o zestaw znanych wskazówek przestrzennych bądź o wybiórczą dostępność jednego typu wskazówki</i> .....	101
8	<b>Dyskusja</b> .....	106
9	<b>Podsumowanie i wnioski</b> .....	123
10	<b>Bibliografia</b> .....	125

11	Spis opublikowanych prac naukowych .....	151
12	Suplement.....	152
12.1	<i>Skrypty użyte do analizy komórek c-Fos pozytywnych: .....</i>	<i>152</i>

# 1 Streszczenie

Neuronalne interakcje między korą retrosplenia (RSC), a hipokampem (HPC) odgrywają kluczową rolę w integracji bodźców zewnętrznych i wewnętrznych, tworząc funkcjonalną podstawę zdolności nawigacyjnych organizmu. W ramach niniejszej pracy opracowano innowacyjny model behawioralny do badania pamięci przestrzennej u myszy, skoncentrowany na integracji wskazówek wizualnych oraz roli strategii treningowych w procesach nawigacyjnych. Automatyzacja systemu eksperymentalnego umożliwiła istotne zwiększenie liczebności badanych zwierząt, wyeliminowanie czynnika ludzkiego oraz zapewniła wysoką powtarzalność i stabilność warunków badawczych.

Wykazano wpływ różnych strategii treningowych na proces nawigacji, ujawniając zdolność myszy do tworzenia asocjacji między wskazówkami wizualnymi, a wyborem kierunku. Mechanizmy te mogą być realizowane zarówno poprzez wzmacnianie naturalnej tendencji do alternacji, jak i poprzez zastosowanie treningu wymagającego zaprzeczenia tej zasady i wzmożonej koncentracji zwierząt. Analizy molekularne poziomu białka c-Fos wykazały zróżnicowane zaangażowanie RSC i HPC w procesach nawigacyjnych. Ujawniono funkcjonalne różnice w aktywności wzdłuż osi przednio-tylnej RSC, a podwyższoną aktywność HPC zaobserwowano u zwierząt eksponowanych na schematy treningowe charakteryzujące się wysoką dynamiką zmian.

Analiza wpływu zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji potwierdziła zdolność myszy do podejmowania skutecznych decyzji zarówno w oparciu o pełny zestaw wskazówek, jak i w warunkach ograniczonej dostępności pojedynczego typu bodźca. Wyróżniający się na tle globalnego kontekstu, indywidualny punkt odniesienia wywiera dominujący wpływ na proces nawigacyjny. W warunkach wybiórczej dostępności wskazówki indywidualnej odnotowano istotnie wyższą aktywność rRSA. Pomimo wykazanych różnic w aktywności molekularnej, czasowa inaktywacja kory retrosplenia nie wpłynęła istotnie na procesy nawigacji opartej na wskazówkach przestrzennych.

Przeprowadzone badania dostarczają nie tylko istotnych informacji na temat mechanizmów pamięci przestrzennej, lecz także opisują opracowanie nowego narzędzia badawczego, które może znaleźć zastosowanie w analizach zaburzeń pamięci i procesów decyzyjnych związanych z nawigacją.

## 2 Abstract

The neuronal interaction between the retrosplenial cortex (RSC) and the hippocampus (HPC) plays a crucial role in the integration of external and internal stimuli, forming the functional basis of an organism's navigational abilities.

This study presents a novel behavioral model for studying spatial memory in mice, focusing on the integration of visual cues and the role of training strategies in navigation processes. The automation of the experimental system significantly increased the number of analyzed animals, eliminated human bias and ensured high reproducibility and stability of experimental conditions.

Exposing mice on different training strategies reveal the ability of mice to form associations between visual cues and directional choices. This effect could be achieved using two different training protocols: prolonged alternation training, or a flexible protocol with unpredictable turn succession. Based on the c-Fos mapping I also provide evidence of opposing levels of engagement of HPC and RSC after training of mice in these two different regimens. Functional differences in activity were observed along the anterior-posterior axis of the RSC, with increased HPC activity noted in animals exposed to flexible training regimes.

The assessment of the availability of differentiated visual cues confirmed that mice are capable of making effective navigational decisions based on both, a full set of cues and under conditions of limited availability of a single cue type. An individual reference point exerted a dominant influence on the navigation process. It was manifested in higher navigational performance.

Under selective availability of the individual cue, significantly increased activity was observed in the rRSA. Inactivation of the retrosplenial cortex did not significantly affect navigation processes based on spatial cues.

The conducted research not only provides valuable insights into the mechanisms of spatial memory but also introduces a novel research tool that can be applied in studies of memory impairments and decision-making processes in navigation.

### 3 Wykaz skrótów

- 3'UTR** (ang. *3' untranslated region*) - rejon 3' mRNA niepodlegający translacji
- 3D** (ang. *three-dimensional*) - trójwymiarowy
- AAV** (ang. *Adeno-associated viruses*) - wirusy związane z Adenowirusami
- AM** (ang. *anteromedial nucleus of the thalamus*) - przednio-przyśrodkowe jądro wzgórza
- ANOVA** (ang. *analysis of variance*) - analiza wariancji
- AP** (ang. *anterior-posterior*) - przednio-tylny
- AP-1** (ang. *activator protein 1*) - czynnik transkrypcyjny AP-1
- ATN** (ang. *anterior thalamic nuclei*) - przednie jądra wzgórza
- ATN** (ang. *anterior thalamic nuclei*) - przednio-grzbietowe jądra wzgórza
- AV** (ang. *anteroventral thalamus*) - przednio-brzuszy obszar wzgórza
- BC** (ang. *border cells*) - komórki granicy
- c-Fos** – białko c-Fos
- c-fos** - gen kodujący białko c-Fos
- c-Jun** - białko c-Jun
- C-TAD** (ang. *C-terminal c-Fos transactivation domain*) - C-terminalna, transaktywacyjna domena białka c-Fos
- C57BL6/cmdb** - nazwa szczepu myszy użytych w doświadczeniach
- CA1** (łac. *Cornu Ammonis field 1*) - pole CA1 hipokampa
- CA3** (łac. *Cornu Ammonis field 3*) - pole CA3 hipokampa
- CaMKII** (ang. *calcium and calmodulin-dependent kinase II*) - kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny typu drugiego
- cAMP** (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozymonofosforan
- CArGbox** - sekwencja regulatorowa na promotorze c-fos
- CNO** (ang. *clozapine-N-oxide*) - N-tlenek klozapiny
- CRE** (ang. *cAMP response element*) - sekwencja regulatorowa na promotorze c-fos
- CREB** (ang. *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein 1*) - czynnik transkrypcyjny CREB
- cRSA** (ang. *caudal agranular retrosplenial cortex*) - tylna część kory retrosplenialnej agranularnej
- cRSC** (ang. *caudal RSC*) - tylna część kory retrosplenialnej

**cRSG** (ang. *caudal granular retrosplenial cortex*) - tylna część kory retrosplenialnej granularnej

**Ctx** (ang. *context*) - kontekstowa wskazówka wizualna

**DAB** (ang. *3,3-diaminobenzidine*) - 3,3- diaminobenzzydina

**dCA1** (łac. *dorsal Cornu Ammonis field 1*) - grzbietowa część pola CA1 hipokampa

**dCA3** (ang. *dorsal Cornu Ammonis field 3*) - grzbietowa część pola CA3 hipokampa

**dDG** (ang. *dorsal dentate gyrus*) - grzbietowa część zakrętu zębatego

**DG** (ang. *dentate gyrus*) - zakręt zębaty

**dHPC** (ang. *dorsal HPC*) - grzbietowa część hipokampa

**dMEC** (ang. *dorsocaudal medial entorhinal cortex*) - tylnogrzbietowa część przyśrodkowej kory śródwęchowej

**DREADDs** (ang. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) - zaprojektowane receptory wybiórczo aktywowane przez zaprojektowane związki

**dSub** (ang. *dorsal subiculum*) - grzbietowa część podpory

**DTN** (ang. *dorsal tegmental nucleus*) - jądro grzbietowe nakrywki

**EBC** (ang. *egocentric boundary cells*) - komórki granicy

**EC** (ang. *entorhinal cortex*) - kora śródwęchowa

**Ets** - sekwencja regulatorowa na promotorze c-fos

**FBJ** (ang. *Finkel-Biskis-Jinkis murine osteogenic sarcoma virus*) - onkogenna linia komórek wirusowych, odpowiedzialnych za indukcję nowotworu mięsaka kości

**FosB** - białko FosB

**Fra-1** (ang. *Fos related antigen*) - białko Fra-1

**Fra-2** (ang. *Fos related antigen*) - białko Fra-2

**GC** (ang. *grid cells*) - komórki siatki

**GIMP** (ang. *GNU Image Manipulation Program*) - program do graficznej modyfikacji

**HD** (ang. *head-direction cells*) - komórki kierunku głowy

**hM3Dq** (ang. *modified human M3 muscarinic type 3 (hM3) receptor*) - ludzki, sprzężony z białkiem Gq DREADD, oparty o receptor muskarynowy typu trzeciego

**hM4Di** (ang. *modified form of the human M4 muscarinic type 4 (hM4) receptor*) - ludzki, sprzężony z białkiem Gi DREADD, oparty o receptor muskarynowy typu czwartego

**HPC** (ang. *hippocampus*) - hipokamp

**IEGs** (ang. *immediate early genes*) - geny wczesnej odpowiedzi

**JU60** - ligant, agonista receptorów DREADDs

**JunB** - białko JunB

**JunD** - białko JunD

**L** (ang. *landmark*) - indywidualna wskazówka wizualna

**LD** (ang. *laterodorsal thalamic nuclei*) - jądra boczno-grzbietowe wzgórza

**LDN** (ang. *lateral dorsal nucleus of the thalamus*) - grzbietowo-boczne jądro wzgórza

**LEC** (ang. *lateral entorhinal cortex*) - boczna kora śródwęchowa

**LED** (ang. *light emitting diode*) - dioda elektroluminescencyjna

**LMN** (ang. *lateral mammillary nuclei*) - jądro boczne ciała suteczkowego

**LTD** (ang. *long-term depression*) - długotrwałe osłabienie (synaptyczne)

**LTP** (ang. *long-term potentiation*) - długotrwałe wzmocnienie (synaptyczne)

**LTN** (ang. *lateral thalamic nuclei*) - boczne jądra wzgórza

**MAPK** (ang. *mitogen-activated protein kinases*) - kaskada kinaz aktywowanych mitogenami  
kinaza białkowa A,

**MB** (ang. *mammillary bodies*) - ciała suteczkowe

**MEC** (ang. *medial entorhinal cortex*) - przyśrodkowa kora śródwęchowa

**MiR-7b** - cząsteczka mikroRNA 7b

**MMP-9** (ang. *matrix metalloproteinase 9*) - metaloproteinaza 9 macierzy zewnątrzkomórkowej

**mRNA** (ang. *messenger RNA*) - informacyjny, matrycowy RNA, matrycowy rodzaj kwasu rybonukleinowego (RNA)

**MTT** (ang. *mammillothalamic tract*) - droga suteczkowo-wzgórzowa

**NGS** (ang. *normal goat serum*) - kozia surowica

**NLPZ** - Niesteroidowe leki przeciwzapalne

**NMDA** (ang. *N-methyl-d-aspartic acid* or *N-methyl-d-aspartate*) - kwas N-metylo-D-asparaginowy

**NRe** (ang. *nucleus reuniens of thalamus*) - jądro łączące wzgórza

**PaS** (ang. *parasubiculum*) - przypodpora

**PBS** (ang. *phosphate buffered saline*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami

**PBS-T** (ang. *phosphate buffered saline TritonX-100*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami z dodatkiem Triton-X

**PC** (ang. *place cells*) - komórki miejsca

**PCC** (ang. *posterior cingulate cortex*) - tylna kora zakrętu obręczy

**PF** (ang. *place fields*) - pola miejsca

**PFA** (ang. *Paraformaldehyde*) - paraformaldehyd

**PKA** (ang. *protein kinase A*) - kinaza białkowa A,

**PKC** (ang. *protein kinase C*) - kinaza białkowa C,

**PoS** (ang. *postubicum=dorsal presubiculum*) - grzbietowej części kompleksu podpory

**PPC** (ang. *posterior parietal cortex*) - tylna kora ciemieniowa

**PrS** (ang. *presubiculum*) - przedpodpora

**PVC** (ang. *polyvinyl chloride*) - polichlorek winylu

**RNA** (ang. *ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

**rRSA** (ang. *rostral agranular retrosplenial cortex*) - przednia część kory retrosplenialnej agranularnej

**rRSC** (ang. *rostral RSC*) - przednia część kory retrosplenialnej

**rRSG** (ang. *rostral granular retrosplenial cortex*) - przednia część kory retrosplenialnej granularnej

**RSA** (ang. *agranular retrosplenial cortex*) - kora retrosplenialna część agranularna

**RSC** (ang. *retrosplenial cortex*) - kora retrosplenialna

**RSG** (ang. *granular retrosplenial cortex*) - kora retrosplenialna, część granularna

**SC** (ang. *speed cells*) - komórki prędkości

**SEM** (ang. *standard error of the mean*) - standardowy błąd średniej

**shRNA** (ang. *small hairpin RNA*) - krótkie cząsteczki RNA o drugorzędowej strukturze

**SIE** (ang. *sis-inducible Enhancer*) - sekwencja regulatorowa na promotorze c-fos spinki do włosów

**SRE** (ang. *serum response element*) - sekwencja regulatorowa na promotorze c-fos

**SRF** (ang. *serum response factor*) - czynnik transkrypcyjny SRF

**Sub** (ang. *subiculum*) - obszar podpory

**SuB** (ang. *subiculum*) - podpora

**TBS** (ang. *tris buffered saline*) - sól fizjologiczna buforowana Trisem

**TC** (ang. *time cells*) - komórki czasu

**TIMP-1** (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) - tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1

**v-fos** - protoonkogen v-fos

**ZFP36** (ang. *zinc-finger protein 36*)- białko ZFP36

## 4 Wstęp

### 4.1 Nawigacja w przestrzeni

Nawigacja rozumiana jako zdolność do planowania i przemieszczania się po ukierunkowanej na cel drodze, stanowi jeden z fundamentalnych aspektów życia większości zwierząt. Jest to złożony proces, wykorzystujący jednocześnie wskazówki znajdujące się w przestrzeni jak i wewnętrzne sygnały pochodzące z osobistego doświadczenia lokomocji. Niezależnie od czynnika motywującego, poruszanie się w przestrzeni, w której zachodzi gros zjawisk biologicznych, wydaje się być głównym czynnikiem zapewniającym przetrwanie u wielu gatunków. Relacje przestrzenne stanowią środowisko dla większości zachowań adaptacyjnych, a także kontekst towarzyszący kodowanym wspomnieniom epizodycznym. Nawigacja jest więc ściśle zależna od mechanizmów pamięci przestrzennej, określanej jako zdolności do rozpoznawania i zapamiętywania parametrów otoczenia oraz późniejszego wykorzystania zgromadzonej informacji.

Szacowanie własnej pozycji poprzez ciągle aktualizowanie reprezentacji kierunku i odległości podczas oddalania się od punktu początkowego, to proces znany jako integracja ścieżki (ang. *path integration*) (Etienne i Jeffery, 2004). Ustalenie swojego położenia w przestrzeni, wybór strategii eksploracyjnej i optymalnej strategii nawigacji do celu, a także umiejętność identyfikacji uprzednio odwiedzanych miejsc, to mechanizmy warunkowane przez współpracę różnych obszarów mózgu. Struktury formacji hipokampa odgrywają kluczową rolę w przetwarzaniu informacji z otoczenia w celu tworzenia, aktualizacji i utrzymywania pamięci przestrzennej. Wiedza na temat zdolności do oszacowania drogi bez zaangażowania wskazówek zewnętrznych (*path integration*) nie została dotychczas jednoznacznie potwierdzona, jako zależna od hipokampa (ang. *hippocampus*, HPC) (Alyan i McNaughton, 1999). Dowiedziono natomiast, że w celu aktualizacji pozycji i kierunku podczas przemieszczania się, integracja ścieżki wykorzystuje wskazówki idiotetyczne, takie jak informacje przedsionkowe, sygnały proprioceptywne i informacje pochodzące od zmysłów (Julian i in., 2018). Poznanie procesów determinujących funkcjonalność obwodów neuronalnych odpowiedzialnych za powstawanie, utrzymywanie i przywoływanie pamięci przestrzennej stanowi jeden z najintensywniej badanych obszarów współczesnej neurobiologii.

Obecny stan wiedzy wskazuje na to, że zdolność do nawigacji w przestrzeni jest zależna od połączenia procesu integracji ścieżki z podjętymi strategiami uczenia się i wskazówkami wizualnymi płynącymi ze środowiska (McNaughton i in., 1996). Znaczenie ma także sposób postrzegania otoczenia. Nawigacja oparta na neuronalnej reprezentacji punktów orientacyjnych i ich wzajemnej relacji, wykorzystuje percepcję allocentryczną układu obiektów w przestrzeni. Bazuje na informacjach pochodzących od zmysłów i stanowi globalny obraz otaczającego środowiska, niezależnego od własnej pozycji (Klatzky, 1998). Percepcja egocentryczna polega na określeniu lokalizacji i orientacji w przestrzeni w odniesieniu do własnego organizmu. Kodowanie egocentryczne wykorzystuje zarówno bodźce sensoryczne jak i sygnały motoryczne w celu stworzenia układu odniesienia środowiska zewnętrznego, zależnego od własnego postrzegania. Obrazowo rzecz ujmując, dla danego obiektu konstruowany jest wektor prowadzący od części ciała (głowy, ciała, oczu) podmiotu do przedmiotu (Byrne i in., 2007). Obecnie dominuje teoria, że egocentryczne reprezentacje głównych obszarów kory sensorycznej zostają przekształcone w allocentryczną reprezentację w hipokampie, a następnie ulegają ponownej transformacji na egocentryczną reprezentację motoryczną, aby ostatecznie wywołać aktywność behawioralną (Byrne i in., 2007).

Zwierzęta wykazują zachowania adaptujące się do zmiennych okoliczności. Możemy dostosować sposób reakcji, wykorzystując działania, które sprawdziły się w przeszłości, ale także opierając się na doświadczeniach, które są tylko częściowo powiązane. Mamy również możliwość, aby przewidywać i wyobrażać sobie konsekwencje całkowicie nowych wyborów. Na podstawie przeżyć z przeszłości jesteśmy w stanie abstrahować zdobytą wiedzę i uogólniać ją na nowe sytuacje. Tak złożone procesy poznawcze zostały wyartykułowane już na początku XX wieku przez Edwarda Tolmana, który zauważył elastyczność w dostosowywaniu zachowań szczurów w złożonych labiryntach. Badacz zakwestionował ówczesne behawiorystyczne podejście, które opierało się wyłącznie na warunkowaniu (uczeniu się przez prosty mechanizm bodziec-reakcja), sugerując bardziej złożony proces uczenia, z wytworzeniem wewnętrznych, mentalnych reprezentacji otaczającego środowiska. Zauważył, że zwierzęta zapamiętywały przestrzenne szczegóły labiryntu podczas swobodnej eksploracji, a następnie wykorzystywały zdobyte informacje w celu osiągnięcia nagrody. Wraz z postępem treningu szczury popełniały coraz mniej błędów (wejść do odgradzonych miejsc labiryntu), umiały zastosować optymalną drogę podczas wzmocnienia apetytywnego, a także skrócić czas podejmowanych decyzji (Tolman, 1948; Tolman i Honzik, 1930). Zgromadzone obserwacje zainspirowały Tolmana do zaproponowania terminu „mapy poznawczej” czyli

rodzaju tymczasowej mapy środowiska, która przechowuje informacje na temat tras, ścieżek oraz wzajemnych relacji obiektów w otoczeniu. Mapa poznawcza powstaje w mózgu, w toku uczenia się zadania behawioralnego i ostatecznie determinuje jakie reakcje, jeśli w ogóle, zwierzę ostatecznie wyzwoli (Tolman, 1948). W swoich badaniach bazował m.in. na wstępnych, opublikowanych w późniejszym czasie doświadczeniach Lippitt R. i współpracownicy (obecnie klasycznym eksperymencie z zakresu psychologii motywacji), którzy badali wpływ wzmocnienia apetytywnego na przebieg procesu uczenia się zadania przestrzennego, w zależności od stopnia motywacji szczurów. Używano labiryntu Y (labirynt z kątem rozwartym między ramieniem podstawy, a ramionami bocznymi), gdzie szczur musi każdorazowo podjąć decyzję wyboru ramienia bocznego. Jako motywacyjno-nagradzający bodziec zastosowano pierwotnie jedynie subtelną gratyfikację w postaci powrotu do komfortowej klatki bytowej, gdzie zwierzęta mogły wznowić bezpieczne relacje społeczne ze współlokatorem. Na końcu każdego z ramion bocznych znajdowała się skrzynka z jedzeniem (lewe ramię) bądź wodą (prawe ramię). Mimo, że początkowo zwierzętom nie wprowadzono restrykcji pokarmowej ani ograniczenia wody, to podejmowały aktywność nawigacyjną, co okazało się być wystarczające do wykreowania mapy poznawczej lokalizacji źródła pokarmu i wody. W teście szczury podzielono bowiem na dwie grupy i zastosowano odpowiednio deprivację jedzenia bądź wody. Okazało się, że zwierzęta nabyły i przechowują informację o umiejscowieniu pożądanego celu. Szczury z restrykcją pokarmową wykazały preferencję wyboru lewego ramienia, a spragniona grupa szczurów statystycznie częściej szła w prawą stronę (Spence i in., 1950). Zwierzęta stworzyły mapę poznawczą lokalizacji i zawartości skrzynek, mimo że podczas swobodnej eksploracji nie wykazywały ku temu skłonności. Tolman udowodnił w swoich eksperymentach, że szczury zamiast zapamiętywać konkretne sekwencje skrętów, tworzą przestrzenną reprezentację labiryntu, która umożliwia im skuteczne odnalezienie drogi do celu. Co więcej, w przypadku zmiany znanej trasy, na przykład poprzez zablokowanie przejścia, zwierzęta były w stanie zidentyfikować alternatywne ścieżki prowadzące do celu, co potwierdza zdolność do adaptacji na podstawie przestrzennego obrazu środowiska. Tolman i współpracownicy pokazali, że w labiryncie składającym się z okrągłej areny i osiemnastu zlokalizowanych wokół korytarzy (przypominając kształtem słońce z promieniami, labirynt nazwany został przez badaczy ang. *sun-burst*), szczury zamiast zapamiętywać konkretną sekwencję ruchów (np. ile razy trzeba skręcić w lewo lub prawo), miały w głowie „mentalny obraz” labiryntu i wiedziały, gdzie znajduje się pokarm. Początkowo zwierzęta trenowane były w uproszczonym schemacie, gdzie od areny odchodził

tylko jeden korytarz prowadzący do wzmocnienia apetytywnego (pokarmu). Następnie po zablokowaniu znanego szczyrom korytarza wprowadzono wiele nowych ścieżek, przy czym tylko jedna, najbliższa przestrzennie, prowadziła do miejsca, w którym wcześniej znajdowało się wzmocnienie apetytywne. Okazało się, że szczury wykazują w wyborze preferencję do najbardziej bezpośredniej trasy prowadzącej do lokalizacji pokarmu, czyli posiadają informację na temat przestrzennej orientacji lokalizacji punktu docelowego (Tolman i in., 1946).

Umiejętność odnalezienia drogi do celu zależy od neuronalnych algorytmów, które integrują informacje niezbędne do wywołania konkretnej aktywności nawigacyjnej, adekwatnej do aktualnego kontekstu przestrzennego. Sprecyzowanie mechanizmów odpowiedzialnych za pobudzenie specyficznych mikroobwodów neuronalnych odpowiedzialnych za pamięć przestrzenną stanowi jeden z głównych celów badawczych obecnej neurobiologii. Badania Tolmana miały fundamentalny wpływ na rozwój wiedzy o pamięci przestrzennej, a jego teoretyczna koncepcja została potwierdzona przez kolejnych badaczy.

## **4.2 Neuronalna reprezentacja mapy przestrzennej**

Pionierskie odkrycie związku przyśrodkowych płatów skroniowych z pamięcią zostało opublikowane w 1957 roku. Było ono wynikiem badań klinicznych nad cierpiącym od 10 roku życia na epilepsję pacjentem Henrym Molaison (pacjent H.M.). Przeprowadzono wówczas nowatorską operację obustronnej lobektomii przyśrodkowo-skroniowej, w ramach której usunięto znaczną część hipokampa pacjenta. W ciągu pooperacyjnego życia pacjent H.M. był badany przez około 100 badaczy i cytowany w prawie 12 000 artykułów. Jego sława nie była jednak własnym wyborem, wynikała z wyniszczającej choroby, na którą cierpiał oraz częściowo udanego leczenia chirurgicznego. Okazało się bowiem, że lobektomia przyczyniła się do zahamowania ognisk epileptycznych, ale jako skutek uboczny pacjent H.M. utracił zdolność do prawidłowego nawigowania i orientowania się w przestrzeni z towarzyszącym brakiem możliwości tworzenia nowych wspomnień epizodycznych (Scoville i Milner, 1957; Watts, 2009). Był to początek skupienia uwagi naukowców wokół struktury hipokampa i serii eksperymentów nad pamięcią zwierząt. Dopiero jednak po 20 latach potwierdzono rolę formacji hipokampa w pamięci przestrzennej (O'Keefe, 1976). Historycznym przełomem otwierającym drogę do zrozumienia głównych mechanizmów przetwarzania informacji przestrzennej były wyniki badań elektrofizjologicznych O'Keefe i Nadela wskazujące na

zaangażowanie hipokampa w komórkową reprezentację lokalnego środowiska (R. G. Morris i in., 1982; O'Keefe i in., 1978). Zgodnie z tą teorią to HPC jest centralnym miejscem przechowywania pełnego neuronalnego odzwierciedlenia przestrzeni, mapy kognitywnej (ang. *cognitive map*). Mapa ta umożliwia organizmowi elastyczną nawigację w środowisku, odnalezienie miejsc docelowych na podstawie relacji przestrzennych obiektów, a nie tylko bazując na uczeniu asocjacyjnym (np. zapamiętanych sekwencji skrętów) bodźców i reakcji. Zwierzę wykorzystując mapę kognitywną może wyznaczyć alternatywne trasy lub odnaleźć nowy, bardziej efektywny sposób dotarcia do celu, nawet jeśli kontekst środowiska zostanie częściowo zmieniony (R. G. Morris i in., 1982; O'Keefe i in., 1978).

Odkrycie w mózgu fizjologicznych koordynatów odzwierciedlających mapę przestrzenną środowiska (*cognitive map*) umożliwiło poznanie podstawowych mechanizmów determinujących powstawanie pamięci przestrzennej. W wykształcenie mentalnej mapy otoczenia zaangażowanych jest szereg subpopulacji neuronalnych o wyspecjalizowanych funkcjach, tworzących hipokampalno-korowe połączenia.

### 4.3 Komórki miejsca

Rejestrowanie potencjałów czynnościowych pojedynczych komórek piramidowych, głównie z obszarów CA1 i CA3 (łac. *Cornu Ammonis*, CA) grzbietowej części hipokampa, u swobodnie poruszających się szczurów wykazało, że ich aktywność jest silnie zlokalizowana w przestrzeni. Hipokampalne neurony, aktywujące się gdy zwierzę znajduje się w określonym miejscu w środowisku nazwano komórkami miejsca (ang. *place cells*, PC) (O'Keefe, 1976; O'Keefe i Dostrovsky, 1971). Gdy szczur opuści konkretną lokalizację, specyficzna komórka miejsca powraca do stanu spoczynku. Obszary, na których każda z sąsiadujących komórek wykazuje maksymalną aktywność, określane są jako pola miejsca (ang. *place fields*, PF). Po powrocie do znanego środowiska specyficzna mu mapa pól miejsca zostaje odtworzona. Charakterystyczne wzorce wyładowań PF stanowią neurofizjologiczne podstawy mapy poznawczej, w której znajduje się dany osobnik, tworząc mentalną reprezentację konkretnego otoczenia (Bures i in., 1997).

Jedną z kluczowych cech komórek miejsca jest zdolność do remapowania w nowym środowisku, co przejawia się całkowitą przestrzenną rearanżacją potencjałów czynnościowych tworzących pola miejsca. Proces ten odnosi się do formowania odrębnych reprezentacji kontekstów przestrzennych w populacji PC w odpowiedzi na adaptację informacji docierającej

do hipokampa (Colgin i in., 2008). Remapowanie może zostać osiągnięte poprzez fizyczną zmianę lokalizacji (transfer do innego miejsca), bądź przez gwałtowną zmianę wskazówek zewnętrznych (Jezek i in., 2011). Specyficzne dla danej lokalizacji komórki miejsca wymagają zbieżności bodźców allocentrycznych i egocentrycznych. Wypadkowa wpływu informacji generowanej przez własny ruch i informacji pochodzącej ze wskazówek zewnętrznych powoduje obniżenie bądź całkowity zanik aktywności, albo zmianę miejsca wyładowania PC (Bures i in., 1997). Rejestrowanie neuronów w polach CA1 i CA3 podczas nawigacji szczurów, wykazało dwa odrębne mechanizmy kodowania pamięci przestrzennej. Remapowanie częstotliwości (ang. *rate remapping*) oznaczające znaczne zmiany częstotliwości wyładowań komórek miejsca przy zachowaniu ich lokalizacji przestrzennej, pozwala na odróżnianie wariantów tego samego środowiska. Miało miejsce, gdy szczur znajdował się w tej samej lokalizacji przy zmianie koloru lub kształtu ścian labiryntu. Globalne remapowanie (ang. *global remapping*) charakteryzuje natomiast zarówno zmiana częstotliwości wyładowań, jak i powstanie całkowicie nowego wzoru lokalizacji PC, umożliwiając tworzenie niezależnych reprezentacji odrębnych środowisk i rozróżnianie podobnych doświadczeń występujących w odmiennych kontekstach przestrzennych. Wystąpiło na przykład wtedy, gdy zachowano identyczny wygląd ścian labiryntu, ale jego lokalizacja została dynamicznie zmieniona (J. K. Leutgeb i in., 2005). W sytuacji stopniowego, subtelnego przekształcania znanego szczurowi, kwadratowego środowiska w okrągłe, pozostawiając pewne, stałe wskazówki, hipokampalna populacja PC została utrzymana. Sugeruje to, że komórki miejsca są zdolne do implementacji zmian plastycznych, włączając niespójne informacje do powstałej reprezentacji (S. Leutgeb i in., 2005). Zdolność komórek hipokampa do neuroplastyczności w odpowiedzi na zmiany w środowisku jest kluczowa dla adaptacji i aktualizacji reprezentacji otoczenia, co jest niezbędnym aspektem w procesie nawigacji, rozróżniania znanych i nowych wskazówek przestrzennych (Nakazawa i in., 2004). Dziś wiemy, że hipokampalna plastyczność synaptyczna oraz plastyczność funkcjonalna zależą od receptorów NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate*) i stanowią mechanizmy leżące u podstaw procesów uczenia się (Lüscher i Malenka, 2012; Nakazawa i in., 2004).

Zanim informacja przestrzenna dotrze do komórek miejsca w polu CA1 hipokampa, przepływa przez dwie inne podjednostki HPC (również bogate w populacje PC): zakręt zębąty (ang. *dentate gyrus*, DG) i pole CA3. W każdej z nich sygnał poddany jest pewnej obróbce. Sygnał z przyśrodkowej kory śródwęchowej (ang. *medial entorhinal cortex*, MEC) od komórek prędkości, siatki, kierunku i granicy (opisanych poniżej) trafia do zakrętu zębatego, gdzie

zachodzi proces neurogenezy - to właśnie tutaj generowane są komórki miejsca i ich integracja do obwodu. W DG zachodzi także zjawisko separacji podobnych, ale jednak różniących się doświadczeń. Poszczególne ślady pamięci ulegają ortogonalizacji i możliwe jest tworzenie ich odrębnych reprezentacji w pamięci. Zakręt zębaty przekazuje następnie informację do pola CA3, gdzie komórki komunikując się za pomocą wzajemnych połączeń pobudzających umożliwiają propagację częściowego pobudzenia płynącego z DG (tylko niektórych neuronów) i przez to aktywację pełnej reprezentacji neuronów w polu CA3. Rozpoznanie niekompletnego bodźca i uzupełnianie wzorców (zjawisko *pattern completion*) umożliwia przywoływanie pełnych wspomnień na podstawie tylko częściowych informacji (Frankland i in., 2013; J. K. Leutgeb i in., 2007; Yassa i Stark, 2011). Tak przetworzona informacja trafia dopiero do pola CA1 HPC. Pokazano jednak, że przestrzenna aktywacja neuronów CA1 utrzymywała się mimo dezaktywacji połączeń z polem CA3 i zakrętem zębatym (Brun i in., 2002; McNaughton i in., 1989). Bezpośrednie projekcje z MEC wysyłają bowiem odrębny sygnał przestrzenny do CA1, gdzie dopiero dochodzi do zestawienia i porównania otrzymanych informacji i w konsekwencji wygenerowania odpowiedzi behawioralnej.

Komórki miejsca są częścią systemu złożonego ze współistniejących sieci neuronalnych, pomiędzy którymi dochodzi do precyzyjnej wymiany informacji. Każda z sieci wnosi odrębne dane służące do poprawy dokładności wyznaczonej lokalizacji i udoskonalenia pamięci przestrzennej (Moser i in., 2008a). Komórki znajdujące się w hipokampie wykazują także aktywność w odpowiedzi na sytuacje pozbawione aspektu przestrzennego, sugerując że mapa mentalna może kodować również informacje kontekstu i doświadczenia zasocjowanego z danym miejscem w przestrzeni (Wood i in., 1999). Wykazano, że mapa komórek miejsca ulega remapowaniu również po zastosowaniu wzmocnienia awersyjnego (warunkowania strachem), mimo że środowisko pozostaje niezmienione (Moita i in., 2004). Wzór aktywności neuronalnej tworzony przez komórki miejsca podczas przemieszczania się szczura w zadaniu behawioralnym ulega reaktywacji podczas snu, zapewniając wzmocnienie i konsolidację powstałego śladu pamięciowego. Proces ten jest silnie specyficzny, komórki pozbawione nakładających się przestrzennie aktywności w zadaniu behawioralnym nie wykazywały jej także podczas snu (Wilson i McNaughton, 1994).

## 4.4 Komórki siatki

Współtworzenie procesu remapowania wymaga zaangażowania struktur innych niż HPC, z różnym stopniem niezależności. Komórki miejsca otrzymują informację między innymi od komórek siatki (ang. *grid cells*, GC), zlokalizowanych w korze śródwęchowej (ang. *entorhinal cortex*, EC). EC wchodzi w skład formacji hipokampa i zajmuje kluczową pozycję w integracji pomiędzy hipokampem, a strukturami korowymi. Odpowiada za gromadzenie, wstępne procesowanie oraz przekazywanie wizualno-przestrzennych informacji płynących z innych struktur do hipokampa (Burwell, 2000; Eichenbaum i Lipton, 2008). Jest źródłem głównej projekcji do HPC, tzw. drogi przeszywającej (ang. *perforant pathway*). Hafting i współpracownicy udowodnili, że dane na temat pozycji, dystansu i kierunku poruszania się osobnika są integrowane w tylnogrzebietowej części przyśrodkowej kory śródwęchowej (ang. *dorsocaudal medial entorhinal cortex*, dMEC) (Hafting i in., 2005). Nadzwyczajność komórek siatki przejawia się w niezwyklej regularności wyładowań, układających się w heksagonalny wzór siatki. Każda GC wykazuje aktywność, gdy szczur przechodzi przez wierzchołki równobocznych trójkątów, które pokrywają całą przestrzeń środowiska, ostatecznie przyjmując kształt sześciokątnej siatki (Buzsáki, 2005). Umożliwia to wektorowe oszacowanie relacji i odległości między różnymi lokalizacjami przestrzennymi (Bush i in., 2015). Równomierne rozmieszczenie pól aktywności GC zapewnia uniwersalny kod przestrzenny, determinowany głównie szybkością ruchu osobnika (sygnał wewnętrzny), jedynie stabilizowany przez wskazówki zewnętrzne. Rozmiar, kształt, a nawet dostępność wskazówek wizualnych nie miały wpływu na silnie zakonserwowane, unikatowe ułożenie komórek siatki (Moser i in., 2008a). Ich wzór zachowuje stabilność nie tylko w ramach jednej przestrzeni, ale wydaje się mieć zastosowanie w równym stopniu do odmiennych środowisk, odzwierciedlając jednorodność przestrzeni, pomimo różnic w szczegółach kontekstowych (Kropff, Yang, i in., 2015). Aktywujące się w sąsiedztwie GC zachowują niezmienną orientację i wzajemne odstępy w ramach tej samej populacji, ale ich fazy (dokładna lokalizacja wierzchołków siatki, czyli miejsc o szczytowym pobudzeniu) mogą się różnić, dzięki czemu każda z komórek zapewnia unikalne, przestrzenne kodowanie (Fyhn i in., 2004). Odległości między węzłami siatki rosną jednak wzdłuż osi grzbietowo-brzuszej umożliwiając skalowanie w zależności od wielkości przetwarzanego środowiska (Brun i in., 2008). Przyśrodkowa kora śródwęchowa wykazuje heterogeniczność populacji GC w zależności od głębokości rejestracji. U szczura występują 4 niezależne moduły, charakteryzujące się odmiennym rozmiarem siatki

(odległością i wielkością pól), zwiększającym się o stały współczynnik wraz z głębokością warstwy (Stensola i in., 2012). Poszczególne moduły mogą wykazywać różną orientację i częstotliwość modulacji fal, a mimo wszystko ich wzajemna interferencja skutkuje koordynacją i powstaniem spójnej mapy przestrzennej (Hafting i in., 2005). Regularna struktura stworzonego pola siatki (nakładanie się wzorów siatki o odmiennym orientacji) i niezależność aktywności komórek od środowiska powoduje wygaszanie jednych obszarów i wzmocnienie innych, ostatecznie dając specyficzny, nieregularny obraz pól miejsca (Rowland i Moser, 2014). GC stanowią więc ciągłą, uniwersalną przestrzenną metrykę dla powstającej w HPC reprezentacji otoczenia (Sargolini i in., 2006). Gdy szczur przebywa w dwóch odrębnych środowiskach, pola komórek siatki pochodzące z poszczególnych modułów przesuwają się i rotują względem siebie. Funkcjonalnie autonomiczne moduły uzupełniają się na wzór zamka szyfrowego, tworząc ostatecznie obszerne źródło kombinacji, umożliwiające powstawanie unikalnych wzorów dla każdego środowiska, przyczyniając się jednocześnie do hipokampalnego remapowania (Rowland i Moser, 2014). W korze śródwęczowej zidentyfikowano jeszcze dwa inne typy neuronów zaangażowanych w kodowanie przestrzeni, komórki kierunku głowy (ang. *head-direction cells*, HD) i komórki granicy (ang. *border cells*, BC).

#### **4.5 Komórki kierunku głowy**

Komórki kierunku głowy (HD) wykazują selektywną aktywność wyładowań, gdy głowa zwierzęcia skierowana jest w określonym, preferowanym kierunku. Niezależnie od jego pozycji i bieżącego zachowania (Zugaro i in., 2003). Wzorzec aktywności HD jest stabilny w różnych środowiskach (Lozano i in., 2017), a informacje dostarczane przez HD prawdopodobnie determinują właściwości komórek siatki (Burgess i in., 2007; McNaughton i in., 2006). Działają na wzór biologicznego kompasu, reagując na specyficzny kierunek, niezależnie od pola magnetycznego ziemi, inicjowany względem pozycji początkowej (integracja ścieżki) i jedynie modulowany wskazówkami wizualnymi pochodzącymi z otoczenia (odniesienie) (Sharp i in., 2001; Taube i in., 1990).

Generowanie sygnału HD zależne jest od wewnętrznej informacji płynącej z układu przedsionkowego. Czasowa dezaktywacja układu przedsionkowego wygaszała kierunkowe wyładowania HD, jak również aktywność komórek miejsca (Stackman i in., 2002; Stackman i Taube, 1997). Kierunek aktualizowany jest także wraz z poruszaniem się zwierzęcia, czerpiąc

informację z motorycznych, eferentnych transmisji sygnału, informacji wzrokowej i prioprioreceptywnej (Lozano i in., 2017) oraz percepcji zapachów (Goodridge i in., 1998). Modelowanie aktywności mikroobwodów neuronalnych sugeruje, że komórki kierunku głowy komunikują się za pomocą wzajemnej sieci połączeń pobudzających i hamujących. Komórki wrażliwe na ten sam kierunek mają zbliżoną sieć połączeń, ulegając aktywności w tym samym czasie (Sharp i in., 2001). HD zostały udokumentowane w szeroko rozprzestrzenionym, ale aktywnie komunikującym się zespole struktur. Sygnał kierunku głowy ma swój początek w jądrze grzbietowym nakrywki (ang. *dorsal tegmental nucleus*, DTN), wysyłając dwukierunkowe projekcje do jąder bocznych ciała suteczkowatego (ang. *lateral mammillary nuclei*, LMN), następnie za pośrednictwem przednio-grzbietowych jąder wzgórza (ang. *anterodorsal thalamus*, ATN) przekazywany jest do wielu obszarów mózgu (Stackman i Taube, 1997; Taube, 2007), począwszy od części formacji hipokampa, grzbietowej części kompleksu podpory (ang. *postubicum=dorsal presubiculum*, PoS) (Taube i in., 1990). Komórki kierunku głowy udokumentowano m.in. także w korze retrosplenialnej (ang. *retrosplenial cortex*, RSC) (granularnej i dysgranularnej) (Chen i in., 1994; Cho i Sharp, 2001), korze śródwęchowej (Sargolini i in., 2006, 2006), grzbietowo-bocznym jądrze wzgórza (ang. *lateral dorsal nucleus of the thalamus*, LDN) (S. J. Mizumori i Williams, 1993) i grzbietowej części prążkowiec (ang. *dorsal striatum*) (S. J. Y. Mizumori i in., 2000). Informacja płynąca z PoS wydaje się być kluczowa do postrzegania informacji wizualnej jako wskazówki przestrzennej (Yoder i in., 2011). Komórki kierunku głowy zarówno PoS jak i RSC wykazują natychmiastową reakcję nawet na subtelne, wizualne zmiany płynące ze środowiska (komórki kierunku głowy kory retrosplenialnej wyprzedzały czasowo aktywność komórek pochodzących z PoS). Wyjątkowa czułość HD tych regionów może być spowodowana informacją dostarczaną bezpośrednio z kory wzrokowej bądź szybkim przepływem danych między strukturami (Lozano i in., 2017).

#### **4.6 Komórki granicy**

Zarejestrowane w laboratorium Moserów, komórki granicy (BC) reagują na zbliżanie się do fizycznej granicy dzielącej środowisko bądź wystającego elementu, niezależnie od ich długości i ciągłości z innymi granicami. Wysokość, barwa, faktura i zapach napotkanej bariery również nie wpływają na profil wyładowań komórek granicy (Lever i in., 2009). Specyficzna aktywność determinowana jest informacją o poruszaniu się osobnika i reprezentacją położenia

granicy względem jednostki (*path integration*), przy jednoczesnej aktualizacji z obrazem odbieranym przez siatkówkę (Raudies i Hasselmo, 2012). BC stanowią niespełna 10% lokalnej populacji komórek, ale znajdują się we wszystkich warstwach MEC (Solstad i in., 2008), w hipokampie, w podporze (ang. *subiculum*, SuB) (Lever i in., 2009), jak również w czołowej części wzgórza, w jądrze łączącym (ang. *nucleus reuniens of thalamus*, NRe) oraz przednio-przyśrodkowym (ang. *anteromedial nucleus of the thalamus*, AM) (Jankowski i in., 2015). Dzięki ich szerokiej dostępności w obwodzie, informacja o przeszkodach i granicach może być łatwo osiągalna dla pozostałych regionów biorących udział w planowaniu ścieżki nawigacji. W odróżnieniu od komórek miejsca, siatki i kierunku głowy, komórki granicy zachowują niezmienną aktywność w różnych pomieszczeniach (Grieves i Jeffery, 2017). Rejestrowano je nawet gdy szczur nawigował w ciemności (Lever i in., 2009). Komórki granicy ściśle współpracują z komórkami miejsca w hipokampie, nadając rekonstrukcji środowiska skończony wymiar – granicę (Hartley i in., 2000).

#### **4.7 Komórki prędkości i komórki czasu**

W przyśrodkowej korze śródwęchowej poza komórkami GC, HD i BC obecna jest także lokalnie występująca subpopulacja neuronów, które reagują proporcjonalnie do prędkości poruszania się zwierzęcia. Komórki prędkości (ang. *speed cells*, SC) wykazują liniową, dodatnią korelację częstotliwości wyładowań z prędkością ruchu, niezależnie od kontekstu i kierunku. Odgrywają kluczową rolę w determinowaniu synchronizacji komórek siatki (a przez to też komórek miejsca) z aktywnym położeniem zwierzęcia (Kropff, Carmichael, i in., 2015). Obserwacje częstotliwości wyładowań i przebiegu impulsów sugerują, że główne subpopulacje komórek MEC stanowią HD, GC i BC, podczas gdy SC prawdopodobnie są połączeniem powyższych komórek oraz puli interneuronów (Rowland i in., 2016). Komórki te pobierają informacje z proprioceptorów, dlatego też stają się niezależne od czynników wizualnych, dzięki czemu możliwa jest percepcja prędkości w ciemności (Kropff, Carmichael, i in., 2015). Uniwersalność kodu prędkości w różnych środowiskach stanowi wraz z pozostałymi komórkami przestrzennymi stabilne źródło danych wejściowych dla wzoru wyładowań komórek siatki, co ostatecznie modeluje komórki miejsca w hipokampie. HD, BC, GC i SC wysyłają swoje aksony do hipokampa. To właśnie ich wypadkowa aktywność generuje specyficzność pól miejsca i podstawę systemu lokalizacji przestrzennej. Mapa kognitywna, powstając dzięki informacjom płynącym z poszczególnych subpopulacji komórek

przestrzennych, może być elastycznym modelem mentalnym, który umożliwia organizowanie i przetrzymywanie informacji o umiejscowieniu w środowisku, w celu wyznaczenia odpowiedniej drogi do celu. Specyficzne cechy poszczególnych komórek determinowane są we wczesnym okresie rozwoju, jeszcze zanim zwierzę zacznie eksplorować środowisko. U szczurów każda klasa komórek podąża własną trajektorią rozwojową, przy czym komórki kierunku głowy pojawiają się jeszcze przed otwarciem oczu (Bjerknes i in., 2015), zaraz po nich komórki granicy (Solstad i in., 2008), a później komórki prędkości i siatki (Wills i in., 2010). To oznacza, że w momencie opuszczania gniazda po raz pierwszy w życiu szczury są uprzednio wyposażone w komórkowy repertuar umożliwiający nawigację (Bjerknes i in., 2015; Langston i in., 2010).

Niektóre komórki siatki i komórki miejsca odpowiadają także selektywnie jako komórki czasu (ang. *time cells*, TC). Komórki te aktywują się w specyficznych odstępach czasu, w trakcie wykonywania zadania, pomagając w odtwarzaniu kolejności zdarzeń (Alexander, Robinson, i in., 2020). TC i PC to prawdopodobnie ta sama populacja komórek. Zarówno u swobodnie poruszających się szczurów, jak i w przypadku zastosowania bieżni, komórki czasu ulegały aktywacji wyłącznie, gdy zwierzę znajdowało się w konkretnym miejscu (Eichenbaum, 2014). Reprezentacja upływu czasu nie jest zależna od wydarzeń zewnętrznych, określonych zachowań lub wymiarów przestrzennych doświadczenia. TC pomagają w tworzeniu mentalnej osi sekwencji przeżyć w czasie i są szczególnie ważne dla pamięci epizodycznej, która obejmuje zarówno aspekty przestrzenne, jak i chronologiczne wydarzeń (Eichenbaum, 2014). Komórki odpowiedzialne za kodowanie informacji związanych z upływem czasu udokumentowano w regionach CA1 (Mau i in., 2018) i CA3 hipokampa (Salz i in., 2016) oraz w korze śródwęchowej (Kraus i in., 2015; Tsao i in., 2018). Podobny, okresowy rozkład aktywności neuronalnej zaobserwowano także w korze retrosplinalnej (Alexander i Nitz, 2017) i tylnej korze ciemieniowej (ang. *posterior parietal cortex*, PPC) (Runyan i in., 2017).

Pamięć epizodyczna definiowana jest jako pamięć wydarzeń, które miały miejsce w konkretnym miejscu i czasie. Umożliwia świadome przypominanie sobie doświadczeń, które miały miejsce w przeszłości (Tulving, 1993). Pamięć epizodyczna obejmuje koncepcję mentalnej podróży w czasie i przywoływania wspomnień (rekonstrukcji) w sposób chronologiczny. Zatem komórki czasu są kluczowe dla funkcjonowania pamięci epizodycznej, szczególnie dla zdolności do przypominania sobie nie tylko gdzie coś się wydarzyło, lecz także kiedy (Alexander, Robinson, i in., 2020). Nawigacja i przechowywanie pamięci są obsługiwane

przez wiele funkcjonalnie odrębnych populacji neuronalnych, które dodatkowo tworzą zespoły komórkowe (ang. *neuronal ensembles*) reprezentujące wspomnienia wywołane przestrzennym i asocjacyjnym uczeniem (Cai i in., 2016). Pomimo spektakularnego postępu badań wiele mechanizmów pamięci przestrzennej nadal pozostaje niewyjaśnionych. Wraz z postępem technologicznym, bazując na fundamencie zgromadzonej dotychczas wiedzy badacze zauważają kolejne właściwości badanych subpopulacji neuronów tworzących system pamięci przestrzennej. Na przykład dowiedziono, że PC w hipokampie otrzymują projekcje także z bocznej kory śródwęczowej (ang. *lateral entorhinal cortex*, LEC), gdzie zidentyfikowano komórki reagujące na obecność konkretnych obiektów w polu percepcyjnym (Deshmukh i Knierim, 2011; Tsao i in., 2013). Coraz więcej uwagi naukowców gromadzi się również wokół wciąż mało poznanej roli interneuronów w pamięci przestrzennej. Poza wspomnianym powyżej przypuszczeniem, że to właśnie interneurony współtworzą populację komórek prędkości w MEC, dostarczając sygnał potrzebny do aktualizacji podczas ruchu, wykazano, że hipokampalne interneurony posiadają specyficzność przestrzenną i ich aktywność może być źródłem przestrzennej informacji, porównywalnym z komórkami miejsca (Grieves i Jeffery, 2017).

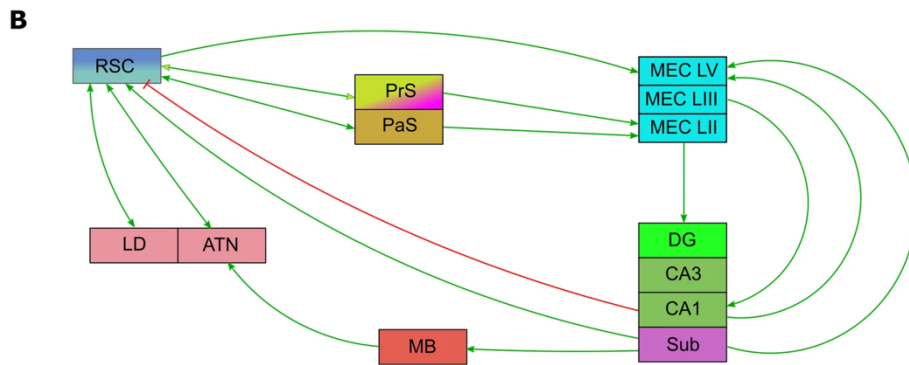
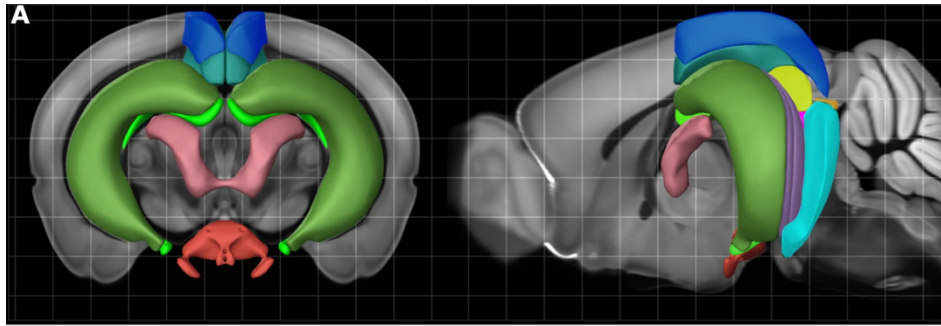
#### **4.8 Umiejscowienie RSC w obwodzie pamięci przestrzennej**

Zdolność do tworzenia, odzyskiwania i aktualizowania wspomnień autobiograficznych jest jedną z najbardziej fascynujących cech ludzkiego zachowania. Pamięć przestrzenna jako umiejętność zapamiętywania układu środowiska zewnętrznego, poruszania się w jego granicach i przywoływania informacji o wzajemnym położeniu obiektów, jest ściśle związana z domeną pamięci autobiograficznej. Stanowi fundament naszego systemu poznawczego i adaptacyjnego zachowania, daje możliwość orientacji w środowisku, planowania tras i przemieszczania się do celu. Integralność formacji hipokampa jest konieczna do stworzenia mapy poznawczej umożliwiającej elastyczną, przestrzenną nawigację w środowisku (Xavier i Costa, 2009). Niezbędna jest także interakcja skoncentrowanego wokół HPC obwodu ze strukturami korowymi. Jednym z najszerzej badanych regionów jest kora retrosplenialna, obszar w przyśrodkowej części płata ciemieniowego, intensywnie komunikujący się z formacją hipokampa. Brodman opisał RSC jako dwa oddzielne obszary 29 (granularny) (ang. *granular retrosplenial cortex*, RSG) i 30 (agranularny) (ang. *agranular retrosplenial cortex*, RSA), które

u ludzi tworzą kompleks z obszarami 23 i 31 tylnej kory zakrętu obręczy (ang. *posterior cingulate cortex*, PCC).

Badania dystrybucji projekcji korowych, początkowo z transportowanymi anterogradnie (tzn. od ciała komórki do zakończeń aksonalnych), znakowanymi radioaktywnie aminokwasami, a później z różnorodnymi, podlegającymi transportowi wstecznemu (ang. *retrograde transport*, tzn. z zakończeń aksonu do ciała komórki) znacznikami, wykazały że RSC tworzy gęstą sieć połączeń z kluczowymi obszarami mózgu tworzącymi system pamięci przestrzennej (Rycina 1). Jest kluczowym węzłem w sieci neuronalnej odpowiedzialnej za pamięć przestrzenną, łączy m. in. hipokamp, korę śródwęchową i jądra wzgórza, umożliwiając płynną integrację i przetwarzanie informacji nawigacyjnych. Jednym z pierwotnych, przełomowych odkryć było udokumentowanie dwukierunkowych, ipsilateralnych (przebiegających w ramach tej samej półkuli mózgu) połączeń z kompleksem obszaru podpory (ang. *subiculum*, Sub) (Sorensen, 1980; Swanson i Cowan, 1977). Granularna kora retrosplenia otrzymuje bezpośredni sygnał z grzbietowej części formacji hipokampa, z pola CA1 oraz z położonego tuż obok Sub (Aggleton i in., 2012; Haugland i in., 2019; Opalka i Wang, 2020), zarówno glutaminergiczny (Yamawaki, Corcoran, i in., 2019), jak i GABAergiczny (Miyashita i Rockland, 2007; Yamawaki, Li, i in., 2019). Wykazano, że bezpośrednie włókna eferentne z grzbietowej części podpory (ang. *dorsal subiculum*, dSub) dają obfite zakończenia w warstwach II i III RSG, a jedynie pojedyncze projekcje kontaktują się z agranularną częścią kory retrosplenia (RSA) (Aggleton i in., 2021), co zostało potwierdzone również funkcjonalnie (Yamawaki, Corcoran, i in., 2019). Strategiczne umiejscowienie RSC, pomiędzy strukturami sensorycznymi mózgu, a odpowiedzialnym za pamięć, kompleksem formacji hipokampa sprawia, że RSC stanowi ważne centrum integracji i przekazywania sygnałów. Do agranularnej części kory retrosplenia dochodzą sygnały sensoryczne, bezpośrednio z obszarów 17 i 18 kory wzrokowej (van Groen i Wyss, 1992) oraz z okolic okołowęchowych (ang. *perirhinal cortex*) (Kobayashi i Amaral, 2003). Przepływ informacji przez korę retrosplenia następuje zarówno na drodze aferentnej jak i eferentnej sugerując, że RSC nie tylko przekazuje informacje sensoryczne do HPC, ale również może stanowić kluczowe miejsce odbioru parametrów przestrzennych. Neurony przyśrodkowej kory śródwęchowej otrzymują projekcje z obszaru retrosplenia. RSC wysyła aksony dokładnie do tego miejsca kory śródwęchowej (warstwa V i VI), do którego dostarczana jest także zwrotna informacja z HPC, co sugeruje obecność dwóch równoległych obwodów neuronalnych, mogących wzajemnie wpływać na swoją aktywność (Balcerek i in., 2021;

Burwell i Amaral, 1998; Czajkowski i in., 2013). Ponadto wydaje się, że HPC może wywoływać także bezpośrednie, supresyjne działanie na aktywność RSC. Opisano bowiem połączenia hamujące z obszarów CA1 i Sub hipokampa do RSC (Miyashita i Rockland, 2007). Ewidentne dwukierunkowe połączenia z przednim (ang. *anterior thalamic nuclei*, ATN) i bocznym (ang. *lateral thalamic nuclei*, LTN) jądrem wzgórza zostały zidentyfikowane na podstawie badań cytoarchitektury neuronów (Clark i Harvey, 2016; Robertson i Kaitz, 1981) oraz przeprowadzonych inaktywacji struktury (Clark i in., 2010). Specyficzne znakowanie RSC, podlegające transportowi wstecznemu wykazało, że RSG i RSA tworzą niezależne połączenia z przednio-brzusznym obszarem wzgórza (ang. *anteroventral thalamus*, AV) (Lomi i in., 2021). Ponadto RSC wysyła projekcje do przyśrodkowego regionu jąder suteczkowatych (ang. *mammillary nuclei*) (Shibata, 1989) oraz komunikuje się dwukierunkowo z korą przedczołową (ang. *prefrontal cortex*) (Kobayashi i Amaral, 2003; R. Morris i in., 1999) i korą ruchową (ang. *motor cortex*) (Yamawaki i in., 2016).



### Rycina 1. Pozycja kory retrosplenia w obwodzie pamięci przestrzennej.

**A.** Uproszczony schemat względnej lokalizacji struktur anatomicznych mózgu gryzoni z zachowaniem kolorystyki adekwatnej do części B.

**B.** Schematyczny diagram przedstawiający sieć połączeń najważniejszych struktur zaangażowanych w obwód pamięci przestrzennej.

RSC (ang. *retrosplenial cortex*), DG (ang. *dentate gyrus*), CA1, CA3 (ang. *hippocampal corni ammoni subdivisions*), Sub (ang. *subiculum*), PrS (ang. *presubiculum*; *postsubiculum* zostało przedstawione jako grzbietowa część *presubiculum*), PaS (ang. *parasubiculum*), MEC (ang. *medial entorhinal cortex*), ATN (ang. *anterior thalamic nuclei*), LD (ang. *laterodorsal thalamic nuclei*), MB (ang. *mammillary bodies*). Na podstawie publikacji własnej (Balcerek i in., 2021).

## 4.9 Zaangażowanie RSC w proces nawigacji

Kora retrosplenia u gryzoni stanowi jeden z najbardziej rozległych obszarów korowych. Ludzki mózg charakteryzuje się natomiast wyraźnie mniejszą względną powierzchnią RSC. Pomimo rozbieżności w rozmiarze, rola RSC u człowieka jest ściśle związana procesami poznawczymi, a nieprawidłowości w tym regionie są jednym z prekursorów choroby Alzheimera (Buckner i in., 2005; Vann i Albasser, 2009). Obszar 29 uznawany jest głównie za miejsce odbioru informacji przestrzennej i kontekstualnej (zarówno wskazówki wizualne jak i niewizualne np. sygnały interoceptywne pochodzące z przeszłych

i obecnych bodźców płynących z otoczenia). Funkcją obszaru 30 jest interakcja z bieżącym sygnałem wizualnym (Aggleton i in., 2021). Kora retrosplenia jest miejscem dialogu informacji przestrzennych pochodzących z różnych perspektyw np. egocentrycznej i allocentrycznej, dostarcza wskazówek dotyczących punktów orientacyjnych i kierunku przemieszczania się. Nawigacja w przestrzeni wymaga podejmowania decyzji, a więc nieustannej elastyczności, aby móc dostosować swoje działania w odpowiedzi na bodźce sensoryczne, a jednocześnie konfrontować je z przechowywaną, nabytą w poprzednich doświadczeniach informacją. Kira S. i współpracownicy scharakteryzowali RSC jako strukturę niezbędną do poprawnej nawigacji w wirtualnym labiryncie T, gdzie zmiany kierunku przemieszczania się, uzależnione są od dostępności wskazówek wzrokowych (Kira i in., 2023). Umiejętność poruszania się w znanym środowisku umożliwia realizowanie podstawowych aspektów poznawczych zachowań zwierząt, w tym żerowania, gniazdowania czy ucieczki przed drapieżnikiem. W znanych środowiskach zwierzęta często stosują strategię podążania trasą, na podstawie rozpoznawania wyuczonych, globalnych kontekstów bądź specyficznych, charakterystycznych punktów orientacyjnych, wykorzystując je do działań motorycznych (Balcerek i in., 2021). Podróżując między dwoma znanymi miejscami (np. domem i pracą), możemy rozpoznawać znane sceny wizualne (np. określone skrzyżowania) i zastosować je do kierowania naszą trajektorią. Chociaż ta zdolność wydaje się na pozór prosta, wymaga konkretnej neuronalnej integracji różnorodnych wskazówek sensorycznych i ich asocjacji w celu podjęcia odpowiednich działań motorycznych. Prawdopodobnie to właśnie kora retrosplenia odpowiedzialna jest za powiązanie danych dotyczących planowania ruchu z lokalizacją przestrzenną, co umożliwia aktualizację map kognitywnych, a przez to efektywne poruszanie się i orientowanie w przestrzeni. W literaturze scharakteryzowano także anatomiczny gradient w aktywności RSC, zależny od przetwarzanych bodźców. Populacja neuronów tylnej kory retrosplenia odpowiedzialna jest za kodowanie kontekstu środowiska i sygnałów wpływających na decyzję nawigacyjną myszy, podczas gdy planowanie i egzekwowanie funkcji motorycznych kodowane jest w całym zakresie RSC (Franco i Goard, 2021). Taka organizacja funkcjonalna jest zgodna z komunikacją anatomiczną od kory wzrokowej do tylnej części RSC oraz projekcjami przedniej RSC do pola ruchowego. Kora retrosplenia pełniąc rolę interfejsu pomiędzy odtwarzaniem pamięci przestrzennej, a procesami wzrokowo-przestrzennymi została opisana także u ludzi (Gainotti i in., 1998). Badania z wykorzystaniem funkcjonalnego obrazowania aktywności mózgu człowieka pokazały, że RSC ulega pobudzeniu podczas nawigacji w wirtualnym środowisku. Co więcej

samo mentalne wyobrażenie przemieszczania się jest wystarczające do aktywacji RSC (Epstein, 2008; Ino i in., 2002; Sherrill i in., 2013). Kluczowym komponentem nawigacji jest zdolność do użycia charakterystycznych wskazówek w celu oszacowania aktualnej lokalizacji i orientacji w danym środowisku. Zaangażowanie RSC w odtwarzanie pamięci przestrzennej potwierdzone zostało m.in. przez Epstein i współpracowników, którzy za pomocą funkcjonalnego rezonansu magnetycznego pokazali silną aktywność w obszarze retrosplenialnym, kiedy uczestnicy badania mieli za zadanie wskazać lokalizację przedstawionych zdjęć (mentalny kontakt przestrzenny). Odpowiedź na lokalizację była silniejsza niż aktywność związana z oceną ich orientacji lub określeniem znajomości zaprezentowanych przedmiotów (pozbawionych kontekstu środowiska). Co więcej zaangażowanie RSC było wyższe podczas ekspozycji na znane środowiska w porównaniu z obcymi, nierozpoznawalnymi przestrzeniami (Epstein i in., 2007). Badanie doświadczonych londyńskich taksówkarzy, przeprowadzone w wirtualnym środowisku ujawniło aktywację całego obszaru kory retrosplenialnej zarówno podczas planowania drogi jak i spontanicznych decyzji o zmianie trasy podczas nawigacji (Spiers i Maguire, 2006).

Najbardziej gruntowne dowody na funkcjonalne zaangażowanie RSC w pamięć przestrzenną pochodzą z przypadków lezji i uszkodzeń. Te wykazane u ludzi powodują deficyty osobistych wspomnień autobiograficznych przy jednoczesnym zachowaniu nienaruszonych funkcji intelektualnych (Valenstein i in., 1987), topograficzną i nawigacyjną dezorientację w znanych środowiskach (Maguire, 2001) oraz upośledzenie pamięci (Maeshima i in., 2001; Svoboda i in., 2006) i orientacji przestrzennej z towarzyszącą trudnością w określeniu wzajemnej relacji położenia między dwoma miejscami znanego środowiska (Takahashi i in., 1997). Uderzającą cechą deficytu nawigacyjnego jest niezdolność do korzystania z punktów orientacyjnych podczas wyznaczania drogi do celu (Maguire, 2001). Selektywne anatomicznie lezje w modelach zwierzęcych zapoczątkowały nowy rozdział w badaniach nad pamięcią przestrzenną ujawniając obligatoryjność hipokampa dla prawidłowej nawigacji (R. G. Morris i in., 1982). Gros behawioralnych doświadczeń opiera się na wykorzystaniu testu basenu morrisa (ang. *morris water maze*), zależnego od wskazówek allotetycznych. Okazało się, że poza koniecznością zachowania funkcji HPC, inaktywacja EC również upośledza naukę odnajdywania platformy w basenie morrisa (Nagahara i in., 1995), co dało podstawę teorii o roli EC w przekazywaniu sygnałów sensorycznych do HPC. Z drugiej strony pojawiły się przeciwstawne doniesienia o braku wpływu inaktywacji EC na zdolność rozwiązywania zadań przestrzennych (Galani i in., 1998). Zaczęto więc szukać innego,

dodatkowego źródła informacji sensorycznej, które trafia do głównego obwodu pamięciowego. Skierowano wówczas uwagę właśnie na RSC, jako struktury posiadającej solidne połączenia z EC, wzgórzem, a nawet samym HPC. Szczególnie, że inaktywacja HPC przekładała się na obniżenie aktywności neuronalnej RSC (Albasser i in., 2007; Kubik i in., 2012).

Liczne eksperymenty wykazały, że inaktywacja RSC u gryzoni i naczelnych skutkowałą zaburzeniem nawigacji przestrzennej (Czajkowski i in., 2014; Sato i in., 2006; Vann i in., 2003; Vann i Aggleton, 2002; Wesierska i in., 2009; Wishaw i in., 2001), problemami z przywoływaniem i konsolidacją śladów pamięciowych o obiektach (de Landeta i in., 2020), bądź deficytami w zdolności uczenia się przy jednoczesnych zmianach bodźców sensorycznych (takich jak zamiana światła na ciemność lub wskazówek lokalnych na odległe) (Cooper i Mizumori, 1999; Pothuizen i in., 2008; Vann i Aggleton, 2004). Wbrew temu trendowi pojawiły się także doniesienia o braku konsekwencji nawigacyjnych, mimo uszkodzenia RSC (Aggleton i in., 1995; Warburton i in., 1998). Dodatkowo niektóre obszary kory retrosplenialnej wydawały się być bardziej zaangażowane w przetwarzanie przestrzenne niż pozostałe. W badaniach przeprowadzonych przez Knierima i współpracowników, wyróżniono region 29b jako obligatoryjny dla poprawnej nawigacji przestrzennej (Knierim i in., 1995). Obszar 29b otrzymuje bezpośrednie połączenie z kory wzrokowej (region 18b), co może determinować zależną od szlaku wzrokowego funkcję RSC w wykorzystywaniu punktów orientacyjnych do nawigacji (Fischer i in., 2020; Yoder i in., 2011). Przedstawiono zróżnicowane odpowiedzi populacji komórek znajdujących się w RSC, związane z cechami przestrzennymi otoczenia, orientacją ciała, charakterystycznymi punktami środowiska czy mającymi znaczenie wydarzeniami (Alexander i Nitz, 2017; Cho i Sharp, 2001; D. M. Smith i in., 2018; Vedder i in., 2017). Nie ma zatem wątpliwości co do zaangażowania RSC w system pamięci przestrzennej, niemniej sprecyzowanie mechanizmów odpowiedzialnych za tę funkcję nadal pozostaje w kwestii domniemań.

#### **4.10 Funkcjonalne subpopulacje komórek RSC**

Rozróżnianie znanych i nowych miejsc, obiektów i osób jest fundamentalnym aspektem życia codziennego (de Landeta i in., 2020). Położenie, odległość i kierunek w otoczeniu są reprezentowane w mózgu odpowiednio przez komórki miejsca, komórki siatki i komórki kierunku głowy. Badania elektrofizjologii neuronów kory retrosplenialnej zidentyfikowały populację HD odpowiedzialnych za kodowanie lokalizacji przestrzennej (Chen i in., 1994; Cho

i Sharp, 2001), a dwufotonowe obrazowanie potwierdziło, że aktywność neuronów RSC jest silnie zależna od punktów orientacyjnych w środowisku eksplorowanym przez zwierzę. Ta reprezentacja punktów odniesienia jest z kolei wynikiem lokalnej integracji informacji wzrokowej i ruchowej w przestrzeni (Fischer i in., 2020), a siła zależności oparta jest na stabilności percepcji konkretnych wskazówek (Knierim i in., 1995). Zgodnie z tą możliwością doniesiono, że niektóre neurony odpowiedzialne za kierunek głowy w korze retrosplenialnej mogą zmieniać preferowany tor aktywności zgodnie z konfiguracją charakterystycznych punktów (Jacob i in., 2017). Neuronalne odwzorowanie punktów orientacyjnych może być również odzwierciedleniem reprezentacji ważnych wydarzeń, takich jak wzmocnienie apetytywne (wystąpienie nagrody) (Miller i in., 2019). Co więcej reakcje na bodźce wizualne w RSC mogą pozostać stabilne w czasie liczącym w tygodniach, wskazując na to, że RSC posiada neuronalne podłoże do długoterminowego mapowania sygnałów wzrokowych (Powell i in., 2020).

Zdolność do integracji nowych informacji wizualnych z już przetworzonym sygnałem sensorycznym umożliwia korze retrosplenialnej wspieranie adaptacji i przełączania strategii podczas nawigacji oraz nieustanną aktualizację pamięci przestrzennej, z uwzględnieniem zmieniających się okoliczności otoczenia (Stacho i Manahan-Vaughan, 2022). Sygnał kierowania głowy w konkretne położenie kodowany jest bilateralnie w RSC, będąc potencjalnie zależnym od interpretacji egocentrycznej (Dutriaux i in., 2023). Prawdopodobne jest także kodowanie egocentrycznego postrzegania przez neurony RSC i następującej później transformacji współrzędnych egocentrycznych na allocentryczne (Alexander i in., 2023). Biorąc dodatkowo pod uwagę silne połączenia z MEC zasadna wydaje się być spekulacja, że komórki HD kory retrosplenialnej mogą wpływać na orientację GC w MEC (Moser i in., 2008b; Stacho i Manahan-Vaughan, 2022). Ponadto wykazano, że populacja neuronów, zlokalizowana głównie w powierzchniowych warstwach RSC, wykazuje aktywność przypominającą sekwencje komórek miejsca (Alexander i Nitz, 2017; Mao i in., 2017). Z uwagi na to, że wyładowania komórek RSC są wynikiem integracji wizualnych wskazówek kontekstowych z aktywnością ruchową, to jednoczesne przetwarzanie sygnałów proprioceptywnych (pamięć idiotetyczna, pochodząca z informacji z wnętrza ciała) i informacji o kierunku głowy, sugeruje adaptację mechanizmu integracji ścieżki (Mao i in., 2020). Teorię, że RSC jest strukturą kluczową dla nawigacji i pamięci przestrzennej wspiera zatem odkrycie obecności różnorodnych klas neuronów charakterystycznych dla przetwarzania otoczenia, takich jak wspomniane komórki kierunku głowy i komórki miejsca, ale także

komórki granicy (ang. *egocentric boundary cells*, EBC) i inne subpopulacje współodpowiedzialne za kodowanie kontekstów i przestrzeni. Egocentryczny sygnał lokalizacji, kodowany wektorowo przez EBC ulega aktywacji, gdy zwierzę znajduje się w określonej odległości i orientacji względem granic otoczenia. Sygnał EBC jest stabilny i niezależny od własnego ruchu oraz zmian środowiska (kontekstu), o ile granica jest niezmienna. W przeciwieństwie do BC znajdujących się w MEC, EBC kory retrospleniałnej mają kilka pól aktywacji, podczas gdy komórki MEC wykazują specyficzność do jednej ściany (Alexander, Carstensen, i in., 2020).

Podsumowując neurony w RSC reprezentują i integrują różnorodne cechy zarówno zewnętrzne jak i wewnętrzne (kierunek, orientację, sygnały proprioceptywne, wzmocnienia apetytywne i awersyjne, przebyte trajektorie, lokalizację, ale także istotne cechy środowiska, np. wskazówki, ściany, granice), które w zestawieniu wspierają procesy nawigacji i pamięci przestrzennej (Corcoran i in., 2018; Stacho i Manahan-Vaughan, 2022). Pomimo tak wielu obszarów zaangażowania kory retrospleniałnej i wysokiej klarowności poszczególnych, zbadanych aspektów, ostateczna funkcja RSC nadal nie została sprecyzowana i stanowi cel wielu badań doświadczalnych współczesnej neurobiologii. Ponadto przytoczone na początku powiązanie zmian w RSC z wczesnymi fazami demencji i pogorszenia funkcji poznawczych (Ash i in., 2016) determinują potrzebę zrozumienia funkcjonalności tej struktury również z klinicznego punktu widzenia.

#### **4.11 c-Fos jako marker pobudzenia neuronalnego**

Neuroplastyczność jest mechanizmem stojącym u podstaw procesu uczenia się. Plastyczność komórek jest ściśle powiązana z plastycznością synaptyczną, czyli długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (LTP) i długotrwałym osłabieniem synaptycznym (LTD), które umożliwiają trwałe zmiany w obwodach neuronalnych.

Modulacja siły połączeń synaptycznych wpływa na późniejszą zdolność do odtwarzania (przypominania) lub modyfikowania zakodowanych informacji. Jedną z pierwszych zmian na poziomie molekularnym, która zachodzi podczas plastyczności synaptycznej jest aktywacja tzw. genów wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*, IEGs) (Jaworski i in., 2018; Kaczmarek i Nikołajew, 1990). Do tej grupy, liczącej kilkadziesiąt innych sekwencji, należy gen c-fos, kodujący czynnik transkrypcyjny c-Fos (ang. *cellular-Fos*). c-fos to komórkowy odpowiednik protoonkogenu v-fos, odpowiedzialnego za indukcję nowotworu kości, mięsaka

kości FBJ (ang. *Finkel-Biskis-Jinkis murine osteogenic sarcoma virus*) (Curran i Franza, 1988). c-Fos wraz z białkami Fra-1 (ang. *Fos related antigen*), Fra-2, FosB i jego wariantem splicingowym, delta FosB należy do rodziny białek FOS. Jest to białko jądrowe, w swojej strukturze przestrzennej posiada domenę suwaka leucynowego (Pfam bZIP\_1), dzięki czemu może tworzyć heterodimery z białkami z rodziny Jun (c-Jun, JunB, JunD) (Bahrami i Drabløs, 2016). Po translacji c-Fos transportowany jest z cytoplazmy z powrotem do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do inicjacji procesu dimeryzacji. Kompleksy c-Fos z Jun funkcjonują razem jako czynnik transkrypcyjny AP-1 (aktywator białkowy, ang. *activator protein 1*) (O'Donnell i in., 2012). Powstały dimer zdolny jest do wiązania się z promotorami lub sekwencjami wzmacniającymi (ang. *enhancers*) genów docelowych i w dalszej konsekwencji do indukowania ekspresji kodowanych przez nie białek (Morgan i Curran, 1991). Ekspresja IEG nie wymaga syntezy nowych czynników transkrypcyjnych - inicjują ją białka obecne w komórce, stąd przy odpowiednim pobudzeniu c-fos może być szybko indukowany w komórkach (Lau i Nathans, 1987). Transkrypt pojawia się już kilka minut po stymulacji (Herdegen i Leah, 1998), przy czym maksimum ekspresji występuje 30-60 minut po ekspozycji na bodziec, powrót do stanu wyjściowego zachodzi w czasie 60-90 minut od stymulacji (O'Donnell i in., 2012), a w czasie ok. 6 godzin spada poniżej wykrywalnego poziomu (Kaczmarek, 2002; Nikolaev i in., 1991). W warunkach braku stymulacji, natywny poziom fosa pozostaje bardzo niski. Stabilność konstruktów mRNA c-fos musi więc być względnie niska, aby komórka mogła usunąć pozostałe, niepoddane dalszej molekularnej obróbce, łańcuchy mRNA. Degradacja łańcuchów mRNA zachodzi m.in. za pośrednictwem białka wiążącego RNA, ZFP36 (ang. *zinc-finger protein 36*, posiadającego domenę palca cynkowego) (Amit i in., 2007). Do degradacji mRNA c-fos może też dojść za pomocą wiązania niskocząsteczkowych, niekodujących, regulatorowych cząsteczek mikroRNA. MiR-7b wiążąc się do konserwatywnej sekwencji w obrębie 3'UTR mRNA c-fos prowadzi do represji translacji bądź degradacji matrycowego RNA (Vesely i in., 2009). Znanych jest także szereg innych mechanizmów obróbki potranskrypcyjnej, przyczyniających się do degradacji mRNA c-fos. Dodanie sekwencji ARE (domena 75 pz, bogata w nukleotydy adeninę i uracyl) do końca 3'UTR sekwencji mRNA, również przyczynia się do niestabilności mRNA (Jing i in., 2005). W obrębie regionu kodującego transkryptu c-fos znajduje się sekwencja mCRD (87pz), która może oddziaływać z grupą kilku białek, tworzących rodzaj białkowego mostu, prowadzącego bezpośrednio do sekwencji PoliA i rozpadu mRNA (Grosset i in., 2000). Białko c-Fos osiąga natomiast szczytowy poziom około 90–120 minut po stymulacji, po czym zaczyna spadać

i powraca do wartości wyjściowych w przeciągu około 2-3 godzin (Amit i in., 2007; Barros i in., 2015; Chaudhuri i in., 2000; Sakurai, 2024). Degradacja białka c-Fos następuje głównie poprzez mechanizmy proteasomalne, które przy wykorzystaniu ubikwitynacji usuwają nadmiar białka, aby przygotować neurony na kolejne potencjalne epizody aktywacji (Stancovski i in., 1995).

Odkrycie roli c-Fos jako markera aktywności neuronów miało fundamentalne znaczenie dla współczesnej neurobiologii, umożliwiając lokalizowanie pojedynczych komórek, aktywnie zaangażowanych w określone zachowanie zwierząt. c-Fos odgrywa kluczową rolę w podstawowych procesach komórkowych, w tym w proliferacji, różnicowaniu i przeżyciu, transformacji czy śmierci komórkowej (Bahrami i Drabløs, 2016). Właściwości c-Fos modulujące komórką są związane z transaktywacyjną domeną, zlokalizowaną na C-końcu łańcucha polipeptydowego. C-terminalną, transaktywacyjną domenę C-TAD zawierają białka FosB i c-Fos (z rodziny białek FOS), dlatego kompleksy AP-1 zawierające c-Fos albo FosB [c-fos/Jun i FosB/Jun] charakteryzują się najwyższą zdolnością wiązania DNA docelowego genu. Kompleksy AP-1 wykazują powinowactwo do swoistej sekwencji konsensusowej, nazywaną miejscem wiązania AP-1 lub TRE w wielu promotorach genów i enhancerach (Cruz-Mendoza i in., 2022; Wisdon i Verma, 1993). Poznanie budowy promotora c-fos ujawniło szeroki zakres różnorodnych czynników, które mogą determinować jego indukcję (Kovács, 2008). Obszar regulatorowy promotora genu c-fos zawiera kilka elementów (ang. *cis-acting elements*), są to specyficzne sekwencje DNA, miejsca wiązania konkretnych cząsteczek (ang. *trans-acting*), które to wpływają na ekspresję genu c-fos. Najbliżej kasety TATA, czyli najbliżej miejsca inicjacji transkrypcji znajduje się sekwencja CRE (ang. *cAMP response element*), następnie miejsce wiązania kompleksu AP-1 oraz domeny SRE (ang. *Serum Response Element*, na którą składa się sekwencja Ets i umieszczona tuż obok kaseta CARGbox) i SIE (ang. *sis-inducible Enhancer*) (Dalhäuser i in., 2022; Kovács, 1998). Każda z wymienionych sekwencji regulatorowych odpowiada za wiązanie konkretnych czynników transkrypcyjnych, wpływających na ekspresję c-fos. Przy czym znane są 2 kluczowe czynniki transkrypcyjne, które są niezbędne do aktywacji promotora genu c-fos: CREB (ang. *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein 1*) oraz czynnik odpowiedzi surowicy, SRF (ang. *serum response factor*) (Dalhäuser i in., 2022). Aktywacja przez cząsteczki oddziałujące na domeny regulatorowe promotora c-fos, odbywa się za pośrednictwem współzależnych, wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, takich jak: kaskada kinaz aktywowanych mitogenami, MAPK (ang. *mitogen-activated protein*

*kinases*), kinaza białkowa A, PKA (ang. *protein kinase A*), kinaza białkowa C, PKC (ang. *protein kinase C*) oraz kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny typu drugiego, CaMKII (ang. *calcium and calmodulin-dependent kinase II*) (Chung, 2015). Zgodnie z powyższym ekspresja genu *c-fos* może być indukowana za pośrednictwem różnych ścieżek sygnałowych, które to inicjowane są przez wtórne, wewnątrzkomórkowe przekaźniki sygnału, takie jak cAMP (cykliczny adenozynomonofosforan) czy  $Ca^{2+}$ . Do wzrostu cAMP/ $Ca^{2+}$  dochodzi po stymulacji szerokim zakresem różnorodnych sygnałów zewnętrznych, takich jak czynniki wzrostu, peptydy (np. Neurokinina B), cytokiny, hormony, ligandy dla receptorów związanych z białkiem G czy inne cząsteczki sygnałowe (Glidewell-Kenney i in., 2014; Greenberg i in., 1985; Thiel i Rössler, 2011). *c-Fos* pośredniczy zatem w transdukcji sygnałów zewnątrzkomórkowych na zmiany w ekspresji genów, na które oddziałuje. Umożliwia konwersję krótkotrwałych bodźców zewnętrznych na długotrwałe zmiany neuronalne (Marx, 1987; Yang i in., 1990). Kompleks AP-1 reguluje wiele procesów biologicznych, w tym przyczynia się do zwiększenia liczby i siły połączeń synaptycznych (Sanyal i in., 2002). Indukcja białka *c-Fos* oraz rola jaką spełnia w kompleksie AP-1 towarzyszy więc warunkom długotrwałej plastyczności neuronalnej, obejmującej procesy uczenia się i zapamiętywania (Kaczmarek, 1993). Wykazano, że do akumulacji mRNA *c-fos*, w rejonie hipokampa mózgu szczura, dochodzi po uprzedniej iniekcji glutaminianu w tej okolicy (Kaczmarek i in., 1988), a zastosowanie antagonisty receptora NMDA spowodowało jednoczesny spadek poziomu *c-Fos* z towarzyszącym upośledzeniem reakcji na kontekstualne warunkowanie strachem (Savonenko i in., 2003). Wyciszenie ekspresji *c-fos* w korze słuchowej myszy, przez zastosowanie krótkich fragmentów shRNA o drugorzędowej strukturze spinki do włosów (ang. *short hairpin RNA*), doprowadziło do upośledzenia nauki rozpoznawania dźwięków, a zmierzone parametry elektrofizjologiczne świadczyły o zaburzeniach plastyczności neuronów pozbawionych *c-Fos*. Jednocześnie badane zwierzęta nie miały problemu z uczeniem się czynności niepowiązanych z bodźcami słuchowymi, takimi jak unikanie miejsca (de Hoz i in., 2018). Poziom mRNA *c-fos* znacząco wzrasta podczas testów behawioralnych, w których zwierzęta uczą się nowych reakcji (*acquisition*), jest unekcjonalnie powiązany z czynnikiem behawioralnym zapewniającym aspekt nowości. Największe zmiany poziomu *c-Fos* zaobserwowano podczas pierwszych sesji procedur treningowych, co wskazuje na jego rolę w odpowiedzi adaptacyjnej neuronów (Kaczmarek i Nikolajew, 1990). Aby poziom białka *c-Fos* stanowił odzwierciedlenie długotrwałych procedur behawioralnych, niezbędny jest aspekt zapewniający zróżnicowanie sesji treningowych, np. wprowadzenie

nowości czy zmienność bodźców (Bertaina-Anglade i in., 2000; Grimm i Tischmeyer, 1997; Nikolaev i in., 1992). Poza uczeniem się nowych zadań, reekspozycja na środowisko treningowe po pewnym czasie (nawet 30 dni) również indukuje syntezę białka c-Fos (Frankland i in., 2004). Reaktywacja śladu pamięciowego zwiększa jego podatność na modyfikacje w procesie rekonsolidacji, czyniąc go wrażliwym na zakłócenia “świeżą” informacją. Ponowna stabilizacja wzmocnionego śladu pamięci wymaga syntezy białek zaangażowanych w pobudzenie tych konkretnych populacji komórek (Lee, 2008). Pokazano, że białko c-Fos pojawia się w komórkach nerwowych tylko wtedy, gdy dany neuron jest stymulowany w warunkach czyniących go podatnym na plastyczność synaptyczną (Kaczmarek, 2002), a jego poziom wzrasta w neuronach odpowiedzialnych za powstawanie tzw. *engramów* (śladów pamięciowych) (Gore i in., 2015; Tonegawa i in., 2015). c-Fos jako komponent kompleksu AP-1 promuje genetyczną regulację, prowadzącą do strukturalnych i funkcjonalnych zmian neuronów, poprzez powstawanie nowych połączeń między neuronami, wzmocnienie synaptyczne i zmiany morfologiczne - kształtu kolców dendrytycznych. To wszystko reguluje proces plastyczności neuronalnej i reorganizację połączeń, które stanowią podstawę procesów uczenia się i zapamiętywania (Jaworski i in., 2018). AP-1 reguluje bowiem ekspresję genów kodujących zewnątrzkomórkową proteinazę macierzową MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*) oraz jej inhibitora TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), które odgrywają kluczową rolę w modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej, a przez to umożliwiają kontrolę siły połączeń synaptycznych (Kuzniewska i in., 2013).

c-Fos stanowi bardzo przydatne narzędzie do określenia aktywności neuronalnej. Można go stosunkowo łatwo wykryć przy użyciu swoistych przeciwciał. Jest wyraźnie indukowany zarówno wzmocnieniem awersyjnym jak i apetytywnym i obszernym spektrum szkodliwych i nieszkodliwych bodźców. Może więc być używany do analizy różnorodnych odpowiedzi behawioralnych. Stan wyjściowy białka pozostaje na niskim poziomie, a jego komórkowa lokalizacja pozwala na detekcję pojedynczych neuronów. Wykorzystanie opisanych wcześniej, specyficznych cech c-Fos w połączeniu z metodami inżynierii genetycznej i nowatorskimi technikami obrazowania (celowane nośniki wirusowe, systemy rekombinacji i detekcji w czasie rzeczywistym, system obrazowania dwufotonowego i obrazowania za pomocą miniskopów) zapewnia szerokie spektrum zastosowań do niezwykle precyzyjnej diagnostyki. Istnieją jednak pewne ograniczenia w stosowaniu c-Fos do mapowania aktywności neuronalnej. W związku ze skłonnością do indukcji po kontakcie z nowo napotkanymi, świeżymi bodźcami pojawia się potrzeba zapewnienia wyjątkowo stałych warunków podczas

przeprowadzania eksperymentów behawioralnych. Szczególnie ważne stają się aspekty dobrej aklimatyzacji zwierząt, habituacji do eksperymentatora, pomieszczenia, zapachów, oświetlenia, tak aby zredukować niespecyficzne bodźce do minimum, kładąc nacisk na zagwarantowanie niezmiennych warunków tła doświadczalnego. c-Fos jest bardzo ważnym wskaźnikiem komórkowego stanu pobudzenia, ale nie można pominąć aspektu, że jego niski poziom nie stanowi wiarygodnego potwierdzenia braku aktywności komórki (Cruz i in., 2015; Peter i in., 2013). Komórki nerwowe mogą być równocześnie zaangażowane w wiele mikroobwodów otrzymując zarówno pobudzające jak i inhibujące sygnały. W fizjologicznie zahamowanych neuronach c-Fos także nie będzie ulegał aktywacji.

#### 4.12 Mapowanie c-Fos w RSC

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, wraz z odkryciem kluczowych procesów systemu pamięci przestrzennej doszło do znacznego rozwoju zakresu i technik eksperymentów behawioralnych. Biorąc pod uwagę nieco peryferyjne położenie RSC w obwodzie nawigacyjnym (Rycina 1), początkowe badania mapowania c-Fos i paradygmaty behawioralne dotyczące tego regionu były często częścią szerszego obrazu anatomicznego. Jedną z pierwszych publikacji pokazała wyższy poziom c-Fos w RSC zwierząt poruszających się w bardziej zaawansowanym labiryncie (ośmioramiennym labiryncie promienistym, ang. *eight-arm radial maze*), w stosunku do nawigacji zwierząt w uproszczonym, jednoramiennym środowisku. Jednocześnie zmiana miejsca, przy zachowaniu paradygmatu nawigacyjnego szczurów, nie znalazła odzwierciedlenia we wzmożonej ekspresji c-fos (Vann i in., 2000). Wysłunięto wnioski, że zaangażowanie RSC może polegać zatem na aktualizacji położenia zwierzęcia w stosunku do środowiska i monitorowaniu przebytej trajektorii, w odpowiedzi na przyswojenie nowych bodźców przestrzennych. Niemniej jednak kolejne analizy zarówno tych samych jak i innych badaczy wykazały, że w odpowiedzi na zmianę miejsca (nowy pokój), podczas aktywnej eksploracji przestrzeni, doszło do znacznego obniżenia poziomu białka c-Fos w RSC, ale tylko w przypadku wyciszenia projekcji płynących z przedniego wzgórza (ATN). Zdecydowana większość neuronów z obniżonym poziomem c-Fos zlokalizowana była w powierzchniowych warstwach RSG (Jenkins i in., 2002), a efekt wykazał chroniczny charakter (Jenkins i in., 2004). Podobne wyniki obniżenia poziomu Fos w komórkach RSC osiągnięto w przypadku wyciszenia innych składowych systemu przestrzennego, w tym HPC (Albasser i in., 2007) czy drogi suteczkowo-wzgórzowej (ang. *mammillothalamic tract*, MTT)

(Vann i Albasser, 2009). Pojawiły się też kontrargumentujące doniesienia, pokazujące odpowiedź neuronów RSC na zmiany zachodzące w środowisku (kształtu, wielkości, rotacji czy koloru otoczenia, zmiana kontekstu bądź pojawienie się obiektu (Carstensen i in., 2021; Franco i Goard, 2021; Miller i in., 2021). Znakując komórki c-Fos-pozytywne ujawniono także rozbieżność zaangażowania nawigacyjnego poszczególnych części anatomicznych RSC. Neurony RSG wykazywały zwiększone pobudzenie podczas treningu zwierząt w promienistym labiryncie, niezależnie od obecności źródła światła. Neurony RSA przejawiały natomiast podwyższony poziom c-Fos tylko w warunkach dostępności bodźców wzrokowych (Pothuizen i in., 2009). Znajduje to uzasadnienie w opisanym powyżej anatomicznym sieci połączeń pomiędzy RSG i formacją hipokampa (CA1, Sub) oraz sygnałami wzrokowymi dochodzącymi do części agranularnej. Co istotne, RSC jest jedną z dwóch struktur (drugą jest PoS), która otrzymuje bezpośrednie projekcje zarówno z kory wzrokowej jak i ATN (Sit i Goard, 2023). Użycie innych testów nawigacyjnych również skutkowało aktywacją RSC podczas przemieszczania się do celu.

W przypadku treningu szczurów w basenie morrisa wykazano wzrost komórek c-Fos-pozytywnych w RSC w kolejnych dniach nauki (Fernández i Morris, 2018) bądź powtarzający się wzór odpowiedzi neuronalnej (Czajkowski i in., 2014), wskazując na zaangażowanie w proces konsolidacji pamięci. Zaobserwowano, że kora retrosplenia jest aktywowana podczas przetwarzania i asocjacji sygnałów kontekstowych, czego najbardziej reprezentatywnym przykładem w ówczesnych zasobach testów behawioralnych, było kontekstualne warunkowanie strachem. Paradygmat wymaga powiązania różnych sygnałów sensorycznych, a następnie aktualizacji asocjacji stworzonego kontekstu o bodziec awersyjny. Do wzrostu c-Fos w RSC dochodzi zarówno podczas tworzenia asocjacji jak i ich przywoływania z pamięci (Beck i Fibiger, 1995; Bucci i Robinson, 2014). Wiadomo także, że jest to proces zależny od receptorów NMDA (Baumgärtel i in., 2018), co sugeruje, że mechanizmy plastyczności synaptycznej regionu RSC odpowiadają za procesy asocjacyjne. O tym, że reprezentacja przestrzenna RSC oddziałuje z uczeniem asocjacyjnym świadczą także badania Trask i współpracowników, którzy wykazali, że aktywność całego obszaru retrosplenia jest niezbędna podczas procesu integracji bodźców, a selektywna inhibicja tylnej RSC upośledzała powstawanie i przywoływanie pamięci o kontekście przestrzennym (Trask i Helmstetter, 2022). Na podstawie tego zaczęto poszukiwać roli retrosplenia neuronów w przetwarzaniu wskazówek sensorycznych, w związku z podejmowaniem decyzji o wyborze drogi do celu.

Konsolidacja pamięci (proces stabilizacji śladu pamięciowego w strukturach korowych) zachodzi stopniowo wraz z upływem czasu (Wiltgen i in., 2004). Świeżo nabyte informacje sukcesywnie przekształcają się z początkowo niestabilnego stanu w trwałe, ugruntowane ślady pamięciowe (Dudai, 2004). Hipokamp jest kluczowy dla tworzenia nowych wspomnień deklaracyjnych (Eichenbaum, 2000). Jednak jego decydująca rola w procesie konsolidacji jest ograniczona czasowo. Z szerokiej gamy bodźców docierających do organizmu, wyselekcjonowane, istotne z punktu widzenia rozpoznawania kontekstu, tworzą ślad pamięciowy. Zaangażowanie RSC wyrażone w podwyższonym poziomie białka c-Fos wykazano zarówno w trakcie powstawania jak i przywoływania pamięci dotyczącej poruszania się w pięcioramiennym labiryncie (Maviel i in., 2004). Podczas aktualizacji śladu pamięciowego, dochodzi do inkorporacji nowego sygnału do już istniejącego, neuronalnego schematu. Dodana informacja zostaje szybko nadpisana i już w ciągu 48 godzin staje się niezależna od hipokampa (Tse i in., 2007). Dokładna dynamika i regulacja tego procesu nie są jeszcze poznane. Wiadomo natomiast, że aktualizacja istniejącego śladu pamięciowego angażuje zarówno HPC, jak struktury korowe, w tym RSC. Podczas gdy proces tworzenia kompletnej nowej reprezentacji lokalizacji (przy wykorzystaniu testu asocjacji obiektów i ich lokalizacji, ang. *paired-associates task*) powoduje podwyższony poziom IEG jedynie w polu CA1 HPC (Tse i in., 2011). Zastosowanie dwufotonowego obrazowania mikroskopowego *in vivo*, przy jednoczesnym wykorzystaniu transgenicznej linii myszy, które ekspresują białko zielonej fluorescencji zależne od promotora c-fos (*cFos-shGfp*) (Reijmers i in., 2007) wykazała, że uczeniu przestrzennemu towarzyszy pojawienie się specyficznego, kontekstowego engramu pamięci w RSC. Potwierdza to hipotezę, że kora retrosplenialna bierze udział zarówno w tworzeniu jak i odzyskiwaniu długotrwałej pamięci przestrzennej (Milczarek i in., 2018; Milczarek i Vann, 2020). Co więcej dzięki technice obrazowania dwufotonowego i możliwości sukcesywnego obrazowania c-Fos pozytywnych neuronów w RSC pokazano stabilizację specyficznego dla zasocjowanego kontekstu wzoru aktywacji komórek wraz z postępem nauki nawigacji, potwierdzając utrzymanie zaangażowanego engramu nawet po 3 tygodniach.

Neuronalna reprezentacja kontekstu oparta jest o jednoczesne postrzeganie różnorodnych bodźców tak, aby wykształcić możliwie najlepszy sposób rozpoznawania danego miejsca w przestrzeni, niezawodny nawet gdy zasocjowane bodźce ulegną częściowej modyfikacji. Wydaje się, że zaangażowanie RSC jest kluczowe dla stworzenia odpowiedniej ramy porównawczej, łączącej w sobie wypadkową bodźców allocentrycznych i egocentrycznych. Wymaga to właściwego rozpoznania i segregacji informacji pochodzących

z różnych źródeł. W warunkach konfliktu bodźców będących odniesieniem zaangażowanie RSC jest niezbędne (Wesierska i in., 2009).

Powyższe oraz liczne inne eksperymenty dotyczące roli RSC w nawigacji ujawniły złożony i wielowymiarowy obraz funkcji tej struktury. W większości przypadków wnioski z elektrofizjologicznych i neuroanatomicznych badań pozostają spójne. Mapowanie poziomu białka c-Fos w RSC pokazuje, że jego obecność jest ściśle związana z aktywnością neuronów zaangażowanych w zadania nawigacyjne i orientację w środowisku. Wyróżniono istotność kory retrosplenialnej we współtworzeniu sieci odpowiedzialnej za pamięć przestrzenną, eksponując znaczenie badania struktur obwodu nawigacyjnego jako spójnego, zintegrowanego systemu. Aby móc poznać procesy stojące u podstaw specjalizacji systemu nawigacji i zagłębić mechanizmy zaangażowania kory retrosplenialnej, niezbędny jest elastyczny paradygmat behawioralny, zapewniający możliwość wprowadzania modyfikacji na różnych poziomach badania, a dodatkowy brak konieczności zmiany aparatury, aranżacji pomieszczenia na nowo i dostosowywania wyposażenia jest wysoce pożądanym. W celu szczegółowego poznania neuronalnych determinantów zależności nawigacji od wskazówek zewnętrznych, paradygmat behawioralny powinien umożliwić nawigację bez ingerencji człowieka, w oparciu o bodźce wzrokowe, pozwalając na wprowadzanie zmian wskazówek oraz płynne decydowanie o ich dostępności oraz pokazywać klarowność podjętych przez zwierzę decyzji wyboru ścieżki nawigacji.

#### **4.13 Podstawy zastosowanego systemu behawioralnego (labirynt T)**

Pierwszy labirynt w kształcie litery T zaprojektowany został na początku 1910 roku przez Roberta Yerkesa (1876–1956) na Uniwersytecie Harvarda, do badań bezkręgowców, w szczególności procesów uczenia się dżdżownic (Yerkes, 1912). Klasyczny labirynt T składa się z podstawy (długi korytarz) i dwóch ramion bocznych na kształt litery T, zapewniając bezpośrednią ekspozycję zwierzęcia na dychotomiczny wybór skrętu. Zadanie opiera się na założeniu, że zwierzęta wyewoluowały optymalną strategię eksploracji swojego otoczenia i zdobywania pożywienia przy minimalnym wysiłku (Wenk, 1998). Dodatkowo wyróżnia go możliwość wykorzystania naturalnej tendencji gryzoni do alternacji podczas realizacji zadania nawigacyjnego (d’Isa i in., 2021). Po umieszczeniu w labiryncie T, szczury lub myszy wykazują silną tendencję do naprzemiennego wyboru ramion w kolejnych próbach. Zjawisko naturalnej skłonności do alternacji po raz pierwszy zostało opisane w badaniu Edwarda

Tolmana z 1920 roku (Tolman, 1925). Tolman zauważył, że szczury kierują swoją eksplorację w labiryncie T do ramienia przeciwnego do odwiedzanego przy poprzednim wyborze, mimo zachowania niezmiennych cech środowiska. Wrodzoną tendencję do alternacji wielokrotnie potwierdziłam podczas własnych, wieloletnich badań zarówno na szczurach jak i na myszach. Popierają ją także współczesne badania z wykorzystaniem wirtualnej przestrzeni (Pinto i in., 2018).

Aby z powodzeniem dokonać naprzemiennych wyborów w próbach, zwierzę musi pamiętać, które ramię zostało odwiedzone poprzednio. Czyni to labirynt T optymalnym narzędziem do oceny roboczej pamięci przestrzennej, rozumianej jako zdolność poznawczą, która przechowuje informację i pozwala na jej manipulację, aby kierować podejmowaniem decyzji i odpowiedzią behawioralną (zachowaniem) (Nestler i in., 2015). Standardowy protokół nawigacji w labiryncie T może dodatkowo obejmować nagradzanie alternacji (Dudchenko, 2001), bądź bodziec awersyjny w przypadku niepoprawnego wyboru (Okada i in., 2017). Wzmocnienia mają na celu ugruntowanie naprzemiennej nawigacji, a wprowadzenie dodatkowych bodźców sensorycznych pozwoliło na zastosowanie labiryntu T do badania rozpoznawania nawigacyjnych punktów odniesienia.

Pomimo znacznego postępu w badaniach nad rolą poszczególnych obszarów mózgu i ich wzajemnych relacji w funkcjonowaniu pamięci przestrzennej, gros badań koncentrowało się na strategiach nawigacyjnych, uzależnionych od mapy poznawczej lokalnego środowiska (Burgess i in., 2001; O'Keefe i Dostrovsky, 1971). W znanym otoczeniu zwierzęta często stosują jednak schemat podążania trasą, rozpoznając konteksty i wskazówki środowiskowe, co determinuje ich działania motoryczne (Franco i Goard, 2021). Strategia asocjacyjna, poruszania się w odniesieniu do określonych wskazówek przestrzennych, nie stanowi jednak odrębnego systemu, a jest ściśle zintegrowana z indeksem mapy poznawczej, nabytej przez aktywność eksploracyjną. Dzięki temu, możliwa jest nawigacja do celu z różnych miejsc początkowych, a także podjęcie nowej ścieżki, gdy dotychczasowa trasa jest niedostępna (Xavier i Costa, 2009). Reprezentacja oparta na mapie i oparta na integracji ścieżki zawsze działają razem, ale dostępność zewnętrznych punktów orientacyjnych może decydować o tym, czy dominują strategie allocentryczne, czy egocentryczne. Środowiska bogate we wskazówki zewnętrzne mogą być często aktualizowane przez zmiany zależności bodźców sensorycznych, w przeciwieństwie do przestrzeni ubogich w punkty odniesienia, wówczas integracja ścieżki staje się nadrzędnym mechanizmem osiągnięcia lokalizacji celu (Buzsáki i Moser, 2013).

Podjęcie decyzji o kierunku przemieszczania się w oparciu o rozproszone i niejednoznaczne wskazówki sensoryczne jest zadaniem, z którym zwierzęta muszą mierzyć się w naturalnym środowisku. Wybór rozwiązań zachodzi zatem często w połączeniu z innymi złożonymi zachowaniami i może być dynamicznym procesem. Rozwiązywanie zadań przestrzennych jest niewątpliwie złożonym procesem, którego poznanie wymaga posiadania odpowiednich narzędzi w postaci testów behawioralnych. W literaturze zwraca się uwagę na prawdopodobne, jednoczesne współistnienie wielu strategii poruszania się do celu, w zależności od bogactwa sensorycznego otoczenia. Brakuje jednak adekwatnego testu, badającego decyzje nawigacyjne zwierząt w oparciu o dostępne wskazówki wizualne, uwzględniającego środowisko bogate w dynamiczne zmiany. Taki test powinien wymagać efektywnej aktualizacji planu motorycznego, jednocześnie umożliwiając swobodny ruch, zgodny z naturalną prędkością poruszania się myszy.

## 5 Cele pracy

Nawigacja w przestrzeni stanowi złożony, wieloczynnikowy proces. Postuluje się, że efektywność ukierunkowanego poruszania się w środowisku opiera się na ciągłym monitorowaniu i aktualizowaniu pozycji względem punktu początkowego, w odniesieniu do wskazówek wizualnych pochodzących z otoczenia. Odnalezienie drogi do celu wymaga precyzyjnej aktywności specyficznych populacji neuronalnych, integrujących potrzebne informacje, a przez to umożliwiającą inicjowanie i kontrolowanie aktywności nawigacyjnej, zgodnej z bieżącym kontekstem przestrzennym. Stworzenie warunków umożliwiających badanie naturalnych strategii nawigacyjnych zwierząt, w oparciu o dostępne wskazówki środowiskowe stanowi zatem kluczowy krok na drodze do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie, przechowywanie i odtwarzanie pamięci przestrzennej. Wiadomo, że kora retrosplenialna jest zaangażowana w przetwarzanie wizualnej informacji o zewnętrznym środowisku, lokomocję, orientację głowy i pozycję zwierzęcia, ale jej dokładna rola w funkcjonowaniu pamięci przestrzennej pozostaje wciąż niedostatecznie poznana.

Głównym celem niniejszej pracy było opracowanie behawioralnego modelu umożliwiającego badanie pamięci przestrzennej myszy w kontekście zależności nawigacji od prezentowanych wskazówek przestrzennych. W ramach realizacji nadrzędnego celu przyjęto następujące cele szczegółowe:

- zaprojektowanie, zoptymalizowanie i wdrożenie zautomatyzowanego systemu do badania pamięci przestrzennej u myszy
- analiza wpływu różnych strategii treningu na proces nawigacji opartej o bodźce wizualne
- zbadanie zaangażowania kory retrosplenialnej oraz hipokampa, wyrażone poziomem białka c-Fos, w proces nawigacji opartej o wskazówki wizualne przy zastosowaniu różnych strategii uczenia się myszy
- stworzenie paradygmatu behawioralnego uzależniającego nawigację zwierząt od złożonych bodźców wizualnych
- analiza wpływu wykorzystania zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji w labiryncie (z uwzględnieniem zaangażowania kory retrosplenialnej i hipokampa)
- analiza wpływu inaktywacji kory retrosplenialnej na nawigację opartą o zestaw znanych wskazówek przestrzennych bądź o wybiórczą dostępność jednego typu wskazówki

## 6 Materiały i metody

### 6.1 Zwierzęcy model badawczy i warunki hodowli

Wszelkie procedury doświadczalne wykonane były zgodnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi:

- Dyrektywa 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych
- Ustawa z 15 stycznia 2015 o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 26 lutego 2015 poz. 266)
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia (2016) w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek, oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku

oraz za zgodą i Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr zgód: LKE 119/2016, LKE 932/2019).

Zawarte w niniejszej pracy doświadczenia przeprowadzono na samcach myszy szczepu C57BL6/cmdb w wieku ok. 12 tygodni (eksperyment 1) oraz 8-10 tygodni (eksperyment 2 i 3). Zwierzęta zakupiono w Centrum Medycyny Doświadczalnej (CMD) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku lub w Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Zastosowano powyższy model doświadczalny ze względu na szereg korzyści, które znacząco zwiększają potencjał eksperymentalny. Mysi model cechuje stosunkowo niski koszt, możliwość ekstrapolacji danych, dzięki wysokiej homologii genomów myszy i człowieka (90%) oraz szeroka dostępność stale powiększającego się arsenału narzędzi do rejestrowania i manipulowania obwodami neuronalnymi z dużą specyficzną czasoprzestrzenną. Dodatkowo krótki cykl życiowy i mnogość potomstwa determinuje pożądaną dostępność zwierząt. Myszy utrzymywane były w wentylowanych pomieszczeniach hodowlanych, z 12-godzinnym cyklem dobowym (12 godz. fazy jasnej / 12 godz. fazy ciemnej), stałą temperaturą (20-24°C) i optymalną wilgotnością powietrza (50-60%). Początkowo zwierzęta przetrzymywane były w grupach do pięciu osobników, a kilka dni przed rozpoczęciem procedury habituacyjnej, rozdzielane do pojedynczych, indywidualnie wentylowanych klatek, o podwyższonym standardzie mikrobiologicznym (klatka IVC), z dostępem do pożywienia i wody *ad libitum*.

W trakcie trwania procedury habituacji do eksperymentatora (szósty dzień), tuż przed rozpoczęciem habituacji do pomieszczenia eksperymentalnego i labiryntu, myszy były przenoszone do strefy bytowania zwierząt w docelowym kompleksie pomieszczeń doświadczalnych, pozostając pojedynczo, w standardowych (choć większych niż zalecane) klatkach do końca procedury eksperymentalnej. Klatki umożliwiały wzajemny kontakt wzrokowy i zapachowy zwierząt. W momencie przeniesienia myszy do pomieszczenia eksperymentalnego odwrócono także cykl dobowy zwierząt, z zachowaniem proporcji fazy jasnej do fazy ciemnej (ciemna faza rozpoczynała się o godzinie 7 rano) oraz wprowadzono minimalne ograniczenia żywieniowe. Stosowano 3,5g standardowej paszy hodowlanej dziennie/ mysz w celu subtelnego wzmocnienia motywacji do nagrody pokarmowej. Średnia dzienna masa ciała była monitorowana dla każdego osobnika i nigdy nie spadła poniżej 90% wartości początkowej. Myszy ważono codziennie po zakończeniu procedury treningu. Zwierzęta utrzymywane były w warunkach maksymalnego wzbogacenia środowiska (kołki osikowe, materiał gniazdowy (włosy drzewne), domki, bawełniane wałeczki, rolki papierowe). Zapewniono codzienną kontrolę warunków środowiskowych, dobrostanu i stanu zdrowia zwierząt oraz dołożono wszelkich starań, aby zredukować liczbę zwierząt użytych w doświadczeniach i wykluczyć ich cierpienie.

## **6.2 Wektory wirusowe (Chemogenetyczny system modulacji aktywności neuronalnej oparty na receptorach DREADD)**

Aby określić, czy kora retrosplenia tworzy indeksy pamięci umożliwiające skuteczną nawigację oraz czy odpowiada za przetwarzanie preferencyjnych wskazówek przestrzennych (kontekstowej bądź indywidualnej) konieczna jest jej przejściowa, odwracalna inaktywacja podczas wykonywania wyuczonego wcześniej zadania przestrzennego. Jest to możliwe za pomocą technik chemogenetycznych. W celu selektywnego wyciszenia aktywności kory retrosplenia wykorzystano system DREADDs (ang. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*). Jednymi z najpopularniejszych DREADDs są syntetyczne warianty muskarynowych receptorów acetylocholinowych sprzężonych z Gi (np. zmutowane receptory muskarynowe 4; hM4Di, które pozwalają na zmniejszenie aktywności neuronalnej) lub Gq (np. zmutowane receptory muskarynowe 3; hM3Dq, umożliwiające stymulację aktywności neuronalnej) (K. S. Smith i in., 2016). Dzięki tej metodzie aktywność docelowych neuronów może być pobudzana bądź hamowana poprzez ogólnoustrojowe podanie

egzogennych substancji chemicznych (efektora chemogenetycznego). W przeciwnym wypadku indukowana obecność receptorów hM3Dq i hM4D (DREADDs) w błonach neuronalnych pozostaje fizjologicznie neutralna, nie wpływając na endogenne procesy komórkowe ani na funkcjonowanie neuronów w warunkach bazowych. Ze względu na potencjalne skutki uboczne spowodowane wstecznym metabolizmem CNO do klozapiny, jako agonistę podawano bezpieczną substancję JU60 (HB626), o wysokim powinowactwie i potencjale pobudzenia receptorów DREADDs (Bonaventura i in., 2019). W eksperymencie 3 jako nośniki informacji genetycznej zastosowano wektory wirusowe związane z adenowirusami (ang. *adeno-associated virus*, *AAV*). Zastosowano następujące konstrukty:

pAAV-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry (nr kat. 50475, Addgen); miano wyjściowe  $\geq 7 \times 10^{12}$  vg/ml  
pAAV-hSyn-mCherry (nr kat. 114472, Addgen); miano wyjściowe  $\geq 7 \times 10^{12}$  vg/ml

Miano wirusa użyte do iniekcji dobrano doświadczalnie, za pomocą pilotażowych iniekcji domózgowych. Przyjęto miano  $3,5 \times 10^{12}$  vg/ml.

W przypadku użytych konstruktów jako gen promotorowy, kontrolujący ekspresję transgenu, użyto specyficznego dla neuronów, ludzkiego genu synapsyny typu pierwszego (hSyn1).

Powinowactwo wektorów AAV do poszczególnych typów komórek jest ściśle zależne od serotypu, który z kolei jest determinowany przez specyficzne modyfikacje białek kapsydu AAV. Te modyfikacje wpływają na zdolność wektorów do wiązania się z receptorami na powierzchni określonych komórek. W celu zapewnienia jednakowej skuteczności transdukcji w niniejszej pracy, dla obu użytych konstruktów AAV zastosowano serotyp 5.

### 6.3 Operacje stereotaktyczne

Przed rozpoczęciem procedur chirurgicznych wszystkie narzędzia były sterylizowane. Myszy przenoszono do przedsiionka sali chirurgicznej w klatkach bytowych (minimalizacja stresu) i umieszczano w przygotowanym, wentylowanym regale. Pozwoliło to zmniejszyć czas pomiędzy opuszczeniem bezpiecznej strefy klatki, a ekspozycją na komorę wzięwną. Po zakończeniu procedur operacyjnych zwierzęta trafiały do przygotowanych uprzednio, czystych klatek. W celu wprowadzenia zmian genetycznych i zastosowania chemogenetycznego systemu wyciszenia struktury, myszy poddano operacjom stereotaktycznym iniekcji wektorów

wirusowych AAV do kory retrosplenialnej. Zwierzę w stan głębokiej narkozy wprowadzano poprzez zastosowanie wziewnego anestetyku, izofluranu (Vetflurane 1000 mg/g, indukcja - 5%, podtrzymanie - 2% w tlenie). Następnie zapewniając ciągłą ekspozycję na anestetyk (nozdrza myszy umieszczone w dyfuzorze ramy stereotaktycznej) podano podskórnym leki: opioidowy lek przeciwbólowy Butomidol (Butorfanol 10 mg/ml, dawka 3.3 mg/kg masy ciała), przeciwbólowy lek z grupy NLPZ Loxicom (Meloksykam 5 mg/ml, dawka 5 mg/kg m.c.) oraz przeciwzapalny Tolfedine (4% kwas tolfenamowy 40 mg/ml, dawka 4 mg/kg m.c.). Jako antybiotyk zastosowano Baytril (enrofloksacyna 2,5%, dawka 2,5 mg/kg m.c.). Iniekcje wymienionych substancji wykonano minimum 30 minut przed nacięciem skóry. Podczas trwania operacji temperatura myszy była monitorowana i utrzymywana na stałym poziomie przy pomocy koca termicznego. Skórę na głowie ogołono. Aby zapobiec wysuszeniu rogówki, na czas operacji oczy zwierząt pokrywano nawilżającym preparatem ochronnym (Lubrithal). Po upewnieniu się, że czucie głębokie zostało zniesione (brak reakcji czucia bólu podczas ucisku paliczków i ogona) i potwierdzeniu braku odruchu rogówkowego, mysz była umieszczana w aparacie stereotaktycznym poprzez włożenie do zewnętrznego otworu kanału słuchowego kołków (ang. *ear bars*) unieruchamiających czaszkę. Skórę głowy dezynfekowano naprzemiennie jodyną i alkoholem (70% alkohol etylowy, nr kat. 470198, Sigma-Aldrich). Miejsce cięcia znieczulano lidokainą (Lignocainum 20 mg/g, Jelfal) w formie żelu. W celu odsłonięcia powierzchni czaszki wykonywano skalpelem nacięcie o długości około 1 cm, a powierzchnię kości dokładnie oczyszczano. Umożliwiło to znalezienie punktu bregma i identyfikację miejsc iniekcji. Koordynaty wyznaczono na podstawie atlasu mózgu myszy (Paxinos i Franklin, 2019). Wyznaczone koordynaty dla kory retrosplenialnej:

- - 1,5 w płaszczyźnie przód/tył (A/P), - 0,350 w płaszczyźnie lewo/prawo (P/L), -0,4 w płaszczyźnie brzusznej/grzbietowej (D/V)
- 1,5 (A/P), 0,350 (P/L), -0,4 (D/V)
- -2,54 (A/P), -0,400 (P/L), -0,5 (D/V)
- 2,54 (A/P), 0,400 (P/L), -0,5 (D/V)

Przy czym lokalizację w płaszczyźnie brzusno-grzbietowej liczono od powierzchni mózgu. Po ustaleniu miejsc tożsamyh z przyjętymi koordynatami, za pomocą wiertła dentystycznego wywiercano w czaszce cztery otwory o średnicy ok 1,2 mm, pozwalające na wprowadzenie w odpowiednie miejsca igły strzykawki Nanofil. Liczba miejsc iniekcji wynika z rozmiaru i kształtu kory retrosplenialnej. W strzykawce Nanofil znajdowała się odpowiednia zawiesina

nośników wirusowych zawierających gen kodujący receptor hamujący hM4Di (grupa eksperymentalna i grupa kontrolna) lub białko fluorescencyjne mCherry (grupa kontrolna sham). Gdy igła (35G, średnica 135µm, nr kat. NF35BV-2, WPI) znalazła się we właściwym położeniu, pozostała nieruchoma przez 5 minut w celu umożliwienia tkankom wokół niej na powrót do pierwotnej pozycji. Następnie za pomocą pompy infuzyjnej podawano zawiesinę odpowiedniego wirusa w wodnym roztworze chlorku sodu (NaCl, o stężeniu 0,9%). Podawano objętość 0,4 µl, z szybkością 75 nl/min. Po zakończeniu pracy pompy igła pozostawała w danym położeniu przez kolejne 5 minut w celu umożliwienia dyfuzji wstrzykniętym nośnikom wirusowym. Następnie bardzo delikatnie igłę usuwano z mózgu. Czynność powtarzano dla każdego miejsca iniekcji. Następnie skórę zabezpieczano szwem chirurgicznym, nicią wchłaniającą rozmiar 4-0 (nr kat. SR2674, Atramat). Brzegi rany zabezpieczano wodnym roztworem fioleto genjany. Mysz otrzymywała również podskórny zastrzyk z wodnego roztworu chlorku sodu (NaCl, 1 ml, 0,9%), ogrzanej do temperatury 36°C w celu nawodnienia. Do momentu wybudzenia, zwierzę pozostawało pod stałą kontrolą, w dogrzewanej klatce. Antybiotyk (enrofloksacyna) podawano przez kolejne 5 dni po zabiegu, lek przeciwbólowy (meloksykam) minimum przez 48-72 godzin po zabiegu. Oba preparaty podawano podskórnie. Procedury doświadczalne rozpoczynano po minimum dwóch tygodniach od czasu przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych.

#### **6.4 Eutanazja na skutek skrwawienia przez perfuzję przezsercową**

W celu przygotowania i pobrania tkanki do późniejszego wykonania analiz histologicznych *ex vivo*, przeprowadzano perfuzję przezsercową. Jest to metoda utrwalająca tkankę, która polega na wymianie płynów ustrojowych organizmu na roztwór 4% paraformaldehydu (PFA, nr kat. 158127, Sigma- Aldrich). 90 minut po rozpoczęciu testu w labiryncie T zwierzęta wprowadzano w stan sedatywno-nasenny poprzez podanie wziewne mieszaniny 5% Izofluranu (Vetflurane 1000 mg/g) i tlenu, a następnie dootrzewnową iniekcję (igłą 30G 0,3x13mm) mieszaniny ketaminy z medetomidyną. Stan głębokiej narkozy osiągnano przez dootrzewnowe podanie (igłą 30G 0,3x13mm) Morbitalu (150 mg/kg). Po upewnieniu się, że zwierzę znajduje się w stanie głębokiego uśpienia: brak reakcji czucia bólu (ucisk ogona) i odruchów bezwarunkowych (zanik odruchu rogówkowego) oraz ustaniu oddechu przystępowano do dalszej procedury. Nacinano powłoki brzuszne i otwierano klatkę piersiową w celu uwidocznienia serca. Do lewej komory serca wprowadzano igłę podłączoną do systemu

przewodów napędzanych pompą perystaltyczną. Przecinając prawy przedsionek serca uruchamiano jednocześnie system tłoczący. Przecięcie prawego przedsionka ma na celu przerwanie ciągłości naczyń krwionośnych i upust krwi z organizmu. Przez igłę podawano zbuforowany roztwór PBS (50 ml/ 3 min, 4°C, nr kat. 18912, Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem heparyny (5 000 jednostek/ml, Polfa Warszawa S.A.) wypłukując tym samym płyny ustrojowe. Następnie stosowano roztwór paraformaldehydu (4%, 150 ml/ 6 min, 4°C, PFA, nr kat. 441244, Sigma-Aldrich) w PBS (pH 7,5). Po osiągnięciu pożądanego efektu utrwalenia i zakończeniu perfuzji, nieżywe zwierzę poddawano dekapitacji, a mózg izolowano z czaszki. Uzyskaną tkankę przetrzymywano w roztworze 4% paraformaldehydu przez 24 godziny (4°C), po czym zastępowano go 30% roztworem sacharozy (nr kat. S7903, Sigma-Aldrich) w PBS, z dodatkiem azydku sodu (0,001%, nr kat. SIAL71290, Sigma-Aldrich), pozostawiając na minimum 3 dni w 4°C w celu przesylenia tkanki i uzyskania efektu krioprotekcji. Tak przygotowaną tkankę przechowywano do dalszych analiz.

Środek	Sposób podania	Dawka
Ketamina (100 mg/ml)	dootrzewnowo	75 mg/kg
Cepetor (Medetomidyna (1mg/ml))	dootrzewnowo	0,5-1 mg/kg
Morbital (Pentobarbital sodowy (133,3 mg/ml) + Pentobarbital (26,7 mg/ml))	dootrzewnowo	150 mg/kg (1 ml/kg)

**Tabela 1.** Dawki i droga podania użytych podczas zabiegów chirurgicznych substancji leczniczych. Przedstawiono dawkę wymagającą dostosowania do wagi (masy ciała) każdego osobnika indywidualnie.

## **6.5 Doświadczenia laboratoryjne**

### **6.5.1 Przygotowanie skrawków mózgu**

W celu przygotowania skrawków do analizy histologicznej mózg krojono przy zastosowaniu półautomatycznego kriostatu żyłkowego (CM1950, Leica Biosystems). Aby osiągnąć maksymalną precyzję cięcia w płaszczyźnie czołowej stosowano matrycę odniesienia dla krojenia dorosłego mózgu myszy (Mouse Brain Slicer Matrix BSMAS005-1). Dzięki temu zachowano odpowiednią płaszczyznę koronalną (prostopadłą do długiej osi mózgu) oraz anatomiczne kształty podczas wymaganego odcięcia tylnej części mózdzku w celu przyklejenia tkanki do talerza stabilizacyjnego kriostatu. Przygotowany mózg umieszczano na talerzu stabilizacyjnym, zalewano minimalną, ale wystarczającą do zabezpieczenia tkanki, warstwą medium (Tissue Freezing Medium, nr kat. 14020108926, Leica Biosystems) i pozostawiano na stacji Peltiera kriostatu (10 min) w celu zamrożenia tkanki. Po tym czasie talerz wraz z preparatem mocowano do ruchomej głowicy kriostatu i pozostawiano na ok. 15 minut. Tkankę krojono w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , na skrawki grubości  $40\ \mu\text{m}$  w płaszczyźnie czołowej. Z każdego preparatu starano się zabezpieczyć jak najwięcej materiału, który wykorzystano zarówno na potrzeby niniejszej pracy jak i wielu innych analiz. Skrawki selekcjonowano zgodnie z atlasem referencyjnym (Paxinos i Franklin, 2019). Na potrzeby niniejszej pracy wykorzystano te zawierające obszary kory retrosplenialnej i hipokampa. Skrawki przenoszono na płytki 24-dołkowe, zanurzano w roztworze krioprotekcyjnym zawierającym glikol etylenowy (30%, nr kat. 114466303, Chempur), glicerynę bezwodną (30%, nr kat. 114433204, Chempur) oraz bufor (10%) (składający się z  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (33,65 g/ 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nr kat S3139, Sigma-Aldrich) i  $\text{NaOH}$  (7,7 g/ 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nr kat. 221465, Sigma-Aldrich) w wodzie i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.5.2 Znakowanie białka c-Fos z użyciem 3'3'- diaminobenzydyny (DAB) (immunohistochemia)**

W celu detekcji białka c-Fos przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne. Do wykonania barwień wybierano skrawki zawierające grzbietową część hipokampa

(ang. *dorsal HPC*, dHPC), przednią część kory retrosplenialnej (ang. *rostral RSC*, rRSC) oraz tylną część kory retrosplenialnej (ang. *caudal RSC*, cRSC). Skrawki zidentyfikowano na podstawie mysiego, referencyjnego atlasu mózgu (Paxinos i Franklin, 2019) i wybrano takie, które znajdowały się w przedziale koordynatów w osi przednio-tylnej (ang. *anterior-posterior*, AP) odpowiednio pomiędzy -1.46 mm do -1,70 mm od punktu bregmy dla rRSC (rRSA i rRSG) i dHPC (dCA1, dCA3, dDG) oraz od -2,80 mm do -2.92 mm od punktu bregmy dla cRSC (cRSA i cRSG). Starano się zabezpieczyć jak najwięcej skrawków, będących marginesem osi AP docelowych koordynatów: -1.50 mm oraz -2.90 mm.

Procedura barwienia składała się z następujących etapów:

1. Płukanie skrawków mózgu 3x 10 min w roztworze 0,1 M PBS (nr kat. 18912, Thermo Fisher Scientific). Bujanie szalek na kołysce laboratoryjnej, 40 rpm.
2. W celu wyeliminowania wiązań krzyżowych pomiędzy aldehydami obecnymi w tkance i stosowanym w następnych krokach przeciwciałem (redukcja grup aldehydowych w tkance, a tym samym zminimalizowanie barwienia tła) inkubacja przez 15 minut w 1% roztworze borowodoru sodu, NaBH<sub>4</sub> (nr kat. 452882, Sigma-Aldrich) w PBS (2 rpm).
3. Wypłukiwanie roztworu NaBH<sub>4</sub> / PBS, poprzez płukania w PBS kolejno 1 × 10 min i 3 × 5 min (30 rpm).
4. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy poprzez inkubację skrawków w 3% roztworze nadtlenu wodoru (nr kat. 216763, Sigma-Aldrich) i 70% metanolu (nr kat. BA1990110, POCH) w wodzie destylowanej przez 10 minut (10 rpm).
5. Płukanie w PBS, 4 x 5 min (30 rpm).
6. Redukcja niespecyficznego wiązania przeciwciała pierwszorzędowego poprzez inkubację skrawków w buforze blokującym: 0,3% PBST (0,3% Triton X100 (nr kat. SLCL31403, Sigma-Aldrich) w PBS), z dodatkiem 5% koziej surowicy (ang. *normal goat serum*, NGS, nr kat. ZG0728, Vector Laboratories) przez 4 godziny (10 rpm).
7. Wiązanie przeciwciała pierwszorzędowego poprzez inkubację w buforze 0,3% PBST, 5% NGS z dodatkiem króliczego poliklonalnego przeciwciała I-rzędowego, rozpoznającego antygeny białka c-Fos (nr kat. 226 008, Synaptic Systems), w rozcieńczeniu 1:1000 (48 godzin, w 4 °C, 10 rpm).
8. Przerwanie procesu wiązania I-rzędowego przeciwciała przez inkubację w roztworze 0,3% PBST / 5% NGS (5 minut, 30 rpm).

9. Trzykrotne płukanie skrawków w roztworze 0,3% PBST / 2% NGS (10 minut, 30 rpm).
10. Wiązanie przeciwciała drugorzędowego poprzez inkubację w roztworze 0,3% PBST, 2% NGS z dodatkiem biotynylowanego, II-rzędowego, koziego, przeciwciała, skierowanego przeciwko antygenom króliczym, w rozcieńczeniu 1:200 (nr kat. PK-6101, Vector Laboratories) przez 75 minut (10 rpm).
11. Wypłukiwanie roztworu przeciwciała drugorzędowego, poprzez zastosowanie roztworu 0,3% PBST (5 x 5 minut, 20 rpm).
12. Inkubacja z enzymatycznym systemem ABC (kompleks avidyna-biotynylowana peroksydaza chrzanowa), przygotowanym według zaleceń producenta (Vectastain Elite ABC Kit, nr kat. PK-6101, Vector Laboratories), w roztworze 0,3% PBST przez 60 minut (2 rpm).
13. Płukanie skrawków w roztworze 0,3% PBST, 4 x 5 minut (15 rpm).
14. Wizualizacja reakcji przez potraktowanie skrawków roztworem 3'-diaminobenzylidyny wzmocnionym solą niklu (DAB, nr kat. SK-4100, Vector Laboratories). Czas inkubacji ustalany był indywidualnie (możliwie zbliżony dla całej kohorty porównywanych później skrawków), w zależności od szybkości wysycania się tkanki intensywnym kolorem.
15. Zatrzymanie reakcji przez natychmiastowe dodanie buforu TBS (nr kat. 94158, Sigma-Aldrich), a następnie kilkukrotne płukanie w roztworze PBS 4 x 5 minut (15 rpm).
16. Nakładanie skrawków na szkiełka podstawowe (SuperFrost Plus, nr kat. 631-0848, Thermo Scientific) i pozostawianie na noc do wyschnięcia.
17. Odwadnianie preparatów poprzez zanurzanie szkiełek w gradiencie rosnącego stężenia etanolu w wodzie (50%, 75%, 95%, 100%). Następnie stopniowe odtłuszczenie w ksylenie, przy zastosowaniu mieszaniny ksylen (nr kat. 115208603, Chempur): etanol (nr kat. 459844, Sigma-Aldrich) (50%), po czym 100% roztworu ksyleny. Każdy etap odwadniania i odtłuszczenia trwał 2 minuty.
18. Zatopienie skrawków w bezwodnym roztworze Entellanu (nr kat. 107960, Sigma-Aldrich) i przykrycie szkiełkiem nakrywkowym (Menzel Glaser, nr kat. B-1220, Thermo Scientific). Preparaty po barwieniu DAB przechowywano w temperaturze pokojowej.

Wszystkie płukania i inkubacje, poza inkubacją z I-rzędowym przeciwciałem miały miejsce w temperaturze pokojowej.

## 6.6 Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych

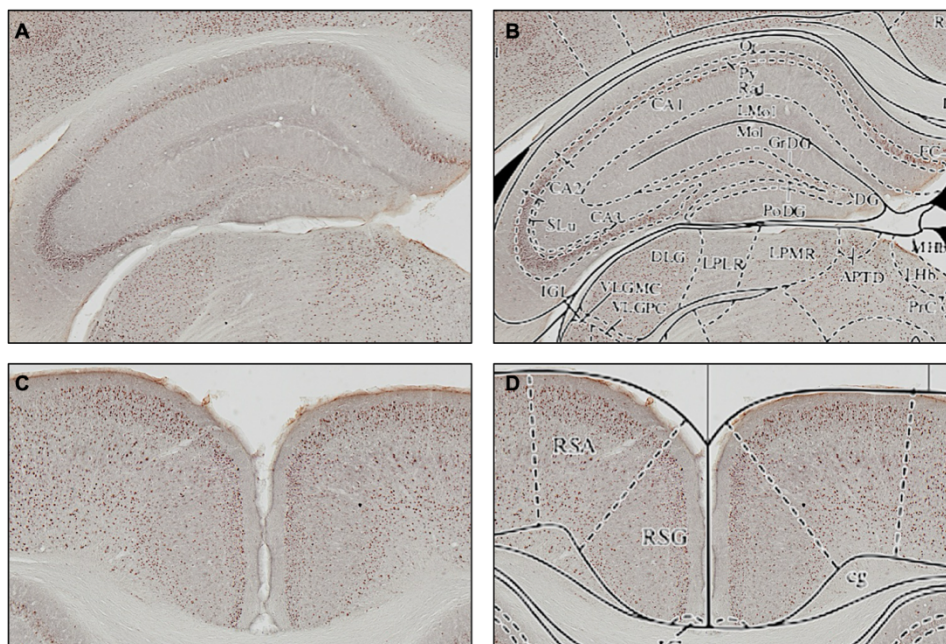
### 6.6.1 Obrazowanie białka c-Fos w neuronach

Obrazy tkanek poddanych barwieniom immunohistochemicznym zostały zarejestrowane przy użyciu mikroskopu Olympus VS110. Wykonano wysokiej rozdzielczości cyfrowe skany całych preparatów, co pozwoliło na analizę próbek zarówno w widoku standardowym, jak i w dużych powiększeniach. Poglądowy skan całego preparatu wykonywano za pomocą obiektywu PLAN APO N 2x/ 0.08 DRY, a szczegółowe obrazowanie poszczególnych skrawków za pomocą obiektywu PLAN SAPO 10x/ 0.40 DRY. Uzyskano pliki w formacie .vsi (ang. *Virtual Slide Image*), używanym do przechowywania wysokiej jakości obrazów całych preparatów mikroskopowych, umożliwiając ich analizę przy różnych powiększeniach. Analizę zdjęć przeprowadzono w trybie offline, korzystając z pakietu do przetwarzania obrazów Fiji ImageJ (wersja 2.14.0/1.55f) oraz oprogramowania do obróbki graficznej GIMP (GNU Image Manipulation Program, wersja 2.10.34).

### 6.6.2 Analiza występowania białka c-Fos w neuronach

Aby uzyskać najlepszą precyzję w wyborze obszaru zainteresowania, tj. w wyznaczeniu granic struktur, których nie widać gołym okiem badacza, wykonano schematyczne szablony granic struktur mózgowych. W tym celu, za pomocą programu do obróbki graficznej GIMP zmodyfikowano każdy z czołowych przekrojów mózgu obecnych w atlasie referencyjnym (Paxinos i Franklin, 2019), który uwzględnia analizowany fragment mózgu (Rycina 2). Tak przygotowane ramy granic struktur nakładano na cyfrowe przekroje wybarwionych preparatów w celu precyzyjnego wyodrębnienia obszarów zainteresowania - dla każdego mózgu wyodrębniono 7 obszarów, zgodnie z nałożonym przeźroczem granic międzystrukturalnych: rRSA, cRSA, rRSG, cRSG (wyśrodkowanych wokół współrzędnej AP -1.50 mm), dCA1, dCA3, dDG (wyśrodkowanych wokół współrzędnej AP -2.90 mm). Analiza obecności białka c-Fos w uzyskanych strukturach została przeprowadzona przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji ImageJ. Do wykrycia lokalizacji komórek c-Fos pozytywnych wykorzystano dwa półautomatyczne skrypty, powstałe na potrzeby badań naszej pracowni (które zamieszczono

w podsekcji 12.1 rozdziału Suplement). Wynik analizy obrazów przedstawiono jako gęstość immunododatnich pod względem antygeny białka c-Fos jąder komórkowych (liczba komórek c-Fos+ / mm<sup>2</sup> badanego obszaru). Próg detekcji został zdefiniowany indywidualnie dla każdego obszaru zainteresowania i utrzymany na tym samym poziomie wśród wszystkich preparatów pochodzących od porównywanych myszy. Podczas analizy preparaty zostały zaślepione (pod względem warunków eksperymentalnych) w celu wyeliminowania wpływu badacza na otrzymany wynik.



**Rycina 2. Przykład wyodrębniania obszarów zainteresowania, A-B.** Cyfrowy obraz czołowego przekroju mózgu zawierający HPC (A) oraz nałożone referencyjne ramy granic struktur (B) służące do selekcji substrukturalnej. **C-D.** Czołowy przekrój mózgu przedstawiający odpowiednio RSC (C) oraz RSC z referencją granic (D).

## 6.7 Analiza statystyczna

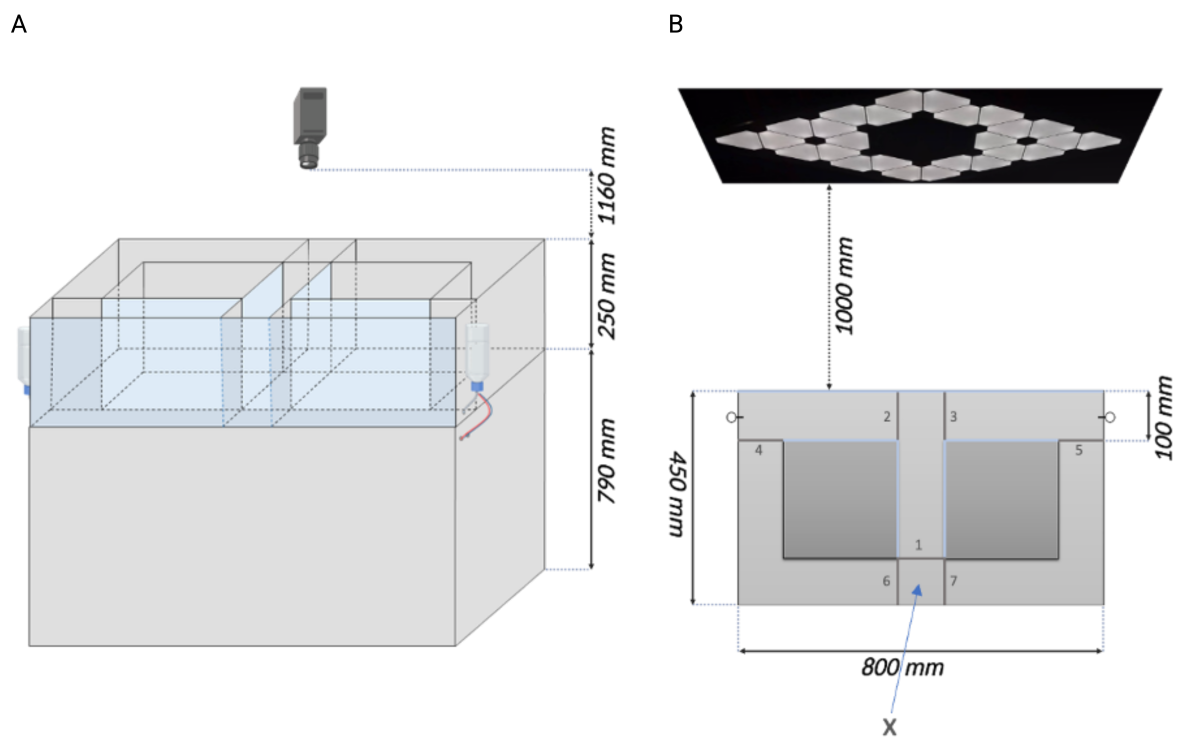
Zbiory danych zostały zagregowane w arkuszu kalkulacyjnym Excel (Microsoft Office 2013, USA) i w dalszej kolejności przeanalizowane w programie Prism v7.01 (GraphPad Software). Różnice pomiędzy badanymi grupami uznawano za istotne statystycznie dla  $p < 0,05$ . Wielkości grup doświadczalnych podane są w części Wyniki. Aby porównać postępy w nauce pomiędzy grupami eksperymentalnymi, zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA, z testem post-hoc Tukey'a dla poszczególnych punktów czasowych bądź z testem Fishera LSD dla porównań wyników testów. Znamienność statystyczną pomiędzy grupami eksperymentalnymi, dla ostatecznego testu behawioralnego, przedstawionego na wykresie jako procent poprawnych wyborów, sprawdzana była testem t-studenta. Do porównania gęstości komórek c-Fos pozytywnych między obszarami zastosowano wielokrotny test t Holma-Sidaka w celu kontroli błędu typu I (fałszywego odrzucenia hipotezy zerowej). Aby porównać średnie poprawności wyborów myszy między wieloma grupami w eksperymencie z inaktywacją kory retrosplenialnej, po wykonaniu dwuczynnikowej analizy ANOVA, zastosowano test wielokrotnych porównań Bonferroniego. Wyniki z eksperymentów zostały przedstawione na rycinach jako średnie dla danych wariantów doświadczalnych, wraz wartościami zmiennych dla indywidualnych zwierząt oraz odchyleniami w postaci SD (odchylenie standardowe).

## 6.8 Układ doświadczalny

### 6.8.1 Automatyzacja systemu do realizacji zadania behawioralnego

W celu uzyskania stabilności i powtarzalności eksperymentalnej, przy jednoczesnym wyeliminowaniu czynnika ludzkiego i stresu zwierząt uczących się nawigacji oraz dla zapewnienia możliwości późniejszego zastosowania najnowszych technik obrazowania *in vivo*, zaprojektowano zautomatyzowaną wersję aparatu behawioralnego. Bazując na poprzednich doświadczeniach z wykorzystaniem konwencjonalnego labiryntu T, zbudowano i zoptymalizowano w pełni automatyczny system do badania pamięci przestrzennej zależnej od wskazówek wizualnych. Przeznaczony jest do analizy pamięci przestrzennej zwierząt, zależnej

od hipokampa oraz struktur korowych, takich jak kora retrosplenialna czy kora śródwęchowa, z zachowaniem możliwości adaptacji do realizacji innych celów badawczych. Aparat ma kształt litery T, z dodatkowymi korytarzami zapewniającymi kontrolowany powrót myszy do punktu wyjściowego. Schemat labiryntu pokazano na rycinie 3. Projekt składa się z uniesionej na wysokość 790 mm części behawioralnej (miejsce treningu myszy) oraz umieszczonej poniżej strefy zawierającej mechanizmy wykonawcze (siłowniki oraz wiązki przewodów elektrycznych i pneumatycznych), determinujące ruch drzwi.



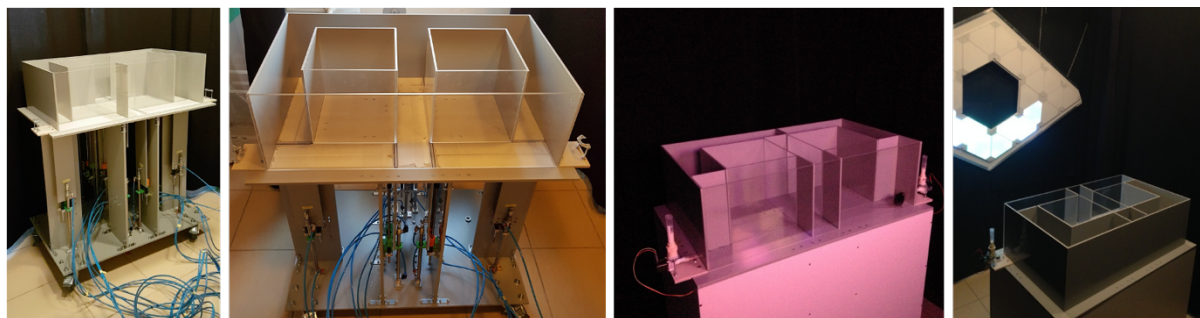
**Rycina 3. Schemat automatycznego labiryntu T, A-B.** Widok od przodu uwzględniający umieszczoną centralnie nad aparatem kamerę, transparentne ściany (jasnoniebieska barwa) oraz lokalizację dyspenserów nagrody (A). Widok z góry, w relacji do umieszczonych w odległości 1000 mm ledowych paneli (z wyświetlonym kontekstem neutralnym). Przedstawiono lokalizację 7 automatycznie sterowanych drzwiczek (1-7) oraz punktu startu (x). Transparentne ściany zaznaczono kolorem niebieskim. Lokalizację dyspenserów nagrody pokazano symbolicznie (kółka) (B).

Zewnętrzne wymiary ścian aparatu to 45 cm x 80 cm x 25 cm (długość, szerokość, wysokość). Aby umożliwić badanemu osobnikowi ekspozycję na kontekst przestrzenny już w momencie otwarcia drzwiczek (1, Rycina 3B), w punkcie startowym (x), a tym samym zapewnić maksymalny czas dostępności wskazówki przestrzennej wszystkie przednie ściany wykonane zostały z polimetakrylanu metylu. Jest to przezroczyste tworzywo sztuczne, o wysokiej wytrzymałości, lekkości i optymalnej twardości, przez co jest odporne na uszkodzenia mechaniczne. Pozostałe ściany oraz drzwiczki wykonano z twardego polichlorku winylu (PCV) i zachowano nieprzejryste w celu uzyskania maksymalnego skupienia uwagi zwierzęcia na kontekście przestrzennym oraz zapewnienia stałego otoczenia, bez względu na pomieszczenie eksperymentalne. Dodatkowo obszar aparatury ogrodzono czarną kurtyną. Długość centralnego korytarza (ang. *stem*) wynosi 25 cm, a długość każdego z ramion wyboru wyboru wynosi 35 cm. Stałą szerokość (10 cm) zachowano dla wszystkich odcinków labiryntu. Zainstalowano siedem automatycznie sterowanych drzwi, aby umożliwić ciągły ruch zwierząt i wyegzekwować pożądaną kierunek skrętu w razie potrzeby. Przegrody chowają się w dół, osiągając równy poziom z podłogą w celu zapewnienia swobodnego przejścia myszy. Ruch drzwiczek napędzany jest systemem pneumatycznym, do którego zastosowano opisane poniżej komponenty.

Źródło sprężonego powietrza stanowi bezolejowy kompresor tłokowy (nr kat. PT50D, Pneumat). Aby ograniczyć stresujące bodźce dla zwierząt eksperymentalnych, biorąc pod uwagę emitowany przez kompresor poziom hałasu (54 dB(A)), umieszczono go z dala od pokoju doświadczalnego (dwie kondygnacje wyżej). Zamontowano system poliuretanowych węży pneumatycznych w celu doprowadzenia powietrza do pomieszczenia eksperymentalnego (o średnicy zewnętrznej 6 mm i wewnętrznej 4 mm, nr kat. 259.16B, Pneumat). Pierwszy element układu pneumatycznego pokoju doświadczalnego stanowi półautomatyczny filtr-reduktor ciśnieniowy (nr kat. FMFR 12, Pneumat) z wbudowanym manometrem. Jest to urządzenie łączące funkcję filtra (o dokładności 5  $\mu$ m) i regulatora ciśnienia- usuwa zanieczyszczenia i jednocześnie utrzymuje ustawione ciśnienie. Dodatkowa możliwość spustu kondensatu zapobiega dostaniu się wilgoci oraz pozwala na konserwację całego obwodu. Przefiltrowane powietrze trafia zbiorczo do 7 sterowanych elektromagnetycznie sprężyną elektrozaworów pneumatycznych rozdzielających powietrze (nr kat. 5213C EE, Pneumat). Elektrozwoy cechuje centralnie zamknięta pozycja środkowa i precyzyjne sterowanie przepływem powietrza, a co za tym idzie wysoka dokładność kontrolowania ruchu siłowników. Elektrozawory połączono szeregowo za pośrednictwem płyty modułowej (00.057.2, Pneumat).

Na każdy trzpień elektrozaworów zastosowano kompatybilną cewkę (nr kat. MS 01200, Pneumat), wzbudzającą pole magnetyczne, a tym samym aktywującą elektrozawór. Indukowanie cewki zakodowane jest i sterowane systemem arduino (Arduino Uno R4 WiFi - ABX00087). W celu dodatkowej redukcji hałasu powstającego podczas uwalniania sprężonego powietrza z elektrozaworów zastosowano odpowiednie tłumiki (nr kat. 7000 1/8, Pneumat). Wnętrze tłumiącego stożka wypełnia stop brązu, a dodatkowa, mosiężna obudowa zapewnia skuteczną absorpcję dźwięku. Aby umożliwić kolejny stopień regulacji przepływu powietrza generowanego przez elektrozawór, wprowadzono do układu (pomiędzy elektrozaworem a siłownikiem) specyficzne zawory dławiająco-zwrotne (nr kat. 187.018-6, Pneumat). Zawory wyposażone są w ręczną regulację przepływu, co w konsekwencji umożliwiło precyzyjne dostosowanie prędkości pracy siłownika, a tym samym zapewnienie optymalnej dla zwierząt szybkości otwierania i zamykania drzewiczek. Zarówno doprowadzenie sprężonego powietrza do elektrozaworów jak i wyprowadzenie do efektorów układu (siłowników) osiągnięto za pośrednictwem poliuretanowych przewodów (259.16B, Pneumat, Rycina 4). Przewody połączono bezpośrednio z zaworami dławiająco-zwrotnymi elektrozaworów i płytą modułową oraz siłownikami za pomocą mosiężnych, niklowanych złączek wtykowych grodziskowych kątowych (nr kat. 125.014-6, Pneumat), bądź wtykowych kątowych (nr kat. 125.005-6, Pneumat). Sprężone powietrze trafia w ten sposób do siedmiu umieszczonych pod każdymi drzewczkami siłowników pneumatycznych (nr kat. DNM012.0250, Pneumat), o jednostronnym tłoczysku i dodatkowej mechanicznej amortyzacji. Siłowniki przytwierdzono do drzewiczek, a następnie do stałej konstrukcji aparatu za pomocą zaprojektowanych na własne potrzeby i wydrukowanych na drukarce 3D elementów mocujących. Do podłoża przytwierdzono za pomocą dopasowanego, gwintowanego kołnierza mocującego. Aby osiągnąć stabilną pracę drzewiczek i wyeliminować drgania podczas ruchu zastosowano dodatkowe dwie prowadnice o przekroju koła. Utrzymanie płynności ruchu wzdłuż prowadnic osiągnięto dzięki użyciu liniowych łożysk polimerowych, do których zaprojektowano i wydrukowano w technologii 3D odpowiednie obudowy, pełniące jednocześnie rolę elementów mocujących drzewiczek. Jako mechaniczną amortyzację na krańcach prowadnic, aby uniemożliwić fizyczny kontakt łożyska ze stałym rusztowaniem aparatury (eliminacja dźwięku stukania) zastosowano zbrojony, elastyczny wąż gumowy o odpowiedniej średnicy. Zoptymalizowanie prędkości poruszania się drzewiczek miało zatem miejsce kilkietapowo (reduktor kompresora, filtro-reduktor, zawór dławiająco zwrotny, amortyzacja siłowników). Zgodnie z powyższym opisem dołożono wszelkich starań,

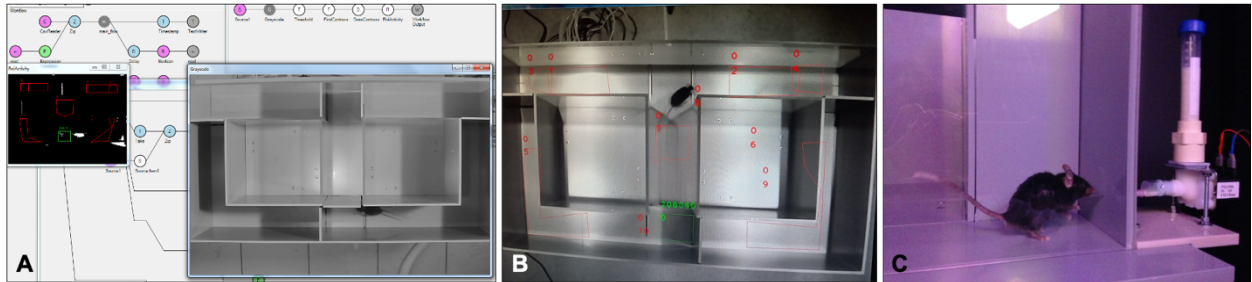
aby zapewnić odpowiedni ruch drzwiczek, aby wysuwające się przeszkody nie stanowiły bodźca awersyjnego, a badane myszy komfortowo poruszały się podczas nawigacji, co osiągnięto z sukcesem. Średnia prędkość ruchu drzwiczek wynosiła 162 mm/ s. System przetestowano również z butlą gazową w zastępstwie sprężarki, uzyskując pozytywny efekt.



**Rycina 4.** Fotografie ilustrujące fragmenty procesu budowy automatycznego labiryntu T oraz jego ostateczny wygląd w trakcie użytkowania.

Warunkowanie ruchu drzwiczek zaprogramowane zostało w środowisku Bonsai (ang. *Bonsai, visual reactive programming*), opierającym się na obrazach video w czasie rzeczywistym i wykorzystującym graficzny język programowania. Skorzystano z procedury zaprogramowanej i zoptymalizowanej przez mgr. Urszulę Włodkowską z Pracowni Pamięci Przestrzennej. Środowisko Bonsai pozwala na automatyczne sterowanie ruchem drzwiczek w zależności od wykrycia obecności myszy w zdefiniowanych uprzednio sektorach. Wszystkie nagrania trajektorii myszy zachowane są w pamięci komputera, co pozwala na późniejszą dodatkową analizę. Wybór skrętu myszy (lewo, prawo) z każdego okrążenia podczas nawigacji jest również automatycznie zapisywany i zachowywany w pamięci. Kamera (ELP 1080P OV2710) umieszczona jest centralnie nad aparatem. Zastosowano kamerę z technologią podczerwieni (IR), aby umożliwić śledzenie ruchu myszy (ang. *mouse tracking*) w czasie rzeczywistym, w warunkach słabego oświetlenia bądź całkowitej ciemności. Ruch drzwiczek determinowany jest wykryciem obecności myszy w precyzyjnie zdefiniowanej sekcji labiryntu, uwzględniając odpowiednie opóźnienie i płynną pracę systemu, umożliwiającą swobodę

nawigacji myszy (Rycina 5). Oprogramowanie umożliwia precyzyjną regulację czasu oraz rodzaju wyświetlania kontekstu, z możliwością dynamicznego dostosowania parametrów w zależności od innych zmiennych eksperymentalnych, np. od otwarcia konkretnych drzwiczek czy detekcji myszy w konkretnym sektorze.



**Rycina 5.** Fotografie ilustrujące przykładowy obraz detekcji myszy (A) zapisu treningu nawigacyjnego myszy w czasie rzeczywistym (B) oraz zaprojektowany dyspenser nagrody (C).

Wizualne konteksty przestrzenne wprowadzono za pomocą systemu paneli LED (Nanoleaf Triangle Panels, Nanoleaf Smarter by Design) o kształcie równobocznych trójkątów (długość boku: 23 cm) i możliwości wyświetlania ponad 16 milionów kolorów z regulacją jasności. Panele połączono w przestrzenny moduł i umieszczono w odległości 100 cm od przedniej ściany labiryntu. Skonfigurowano dwa odrębne konteksty wizualne (Rycina 6B), zróżnicowane pod względem koloru i ułożenia przestrzennego, zdefiniowane odpowiednio dla skrętu w lewą i prawą stronę.

W eksperymencie 2 i 3 zastosowano zmodyfikowany paradygmat behawioralny, wprowadzając dodatkową, odrębną wskazówkę przestrzenną (ang. *landmark*), będącą charakterystycznym, wyróżniającym się punktem odniesienia na tle wyżej opisanego kontekstu. Tak jak w przypadku bodźca kontekstowego, zdefiniowano dwie wskazówki indywidualne, dla przeciwnych skrętów myszy (lewo, prawo). Użyto w tym celu kombinacji żarówki LED, emitującej niebieskie światło (skręt w prawo) oraz umieszczonej na obwodzie taśmy LED, emitującej światło czerwone (skręt w lewo) (Rycina 8B). Indywidualne wskazówki umieszczono w pozycji centralnej, w odległości 30 cm od przedniej ściany

labiryntu. Przez cały czas trwania treningu obecności nagrody danym ramieniu labiryntu przypisana jest jednoznacznie para wskazówek, po jednej z obu typów (kontekst + landmark).

### 6.8.2 Automatyczny dispenser nagrody

Jako wzmocnienie apetytywne zastosowano 50% roztwór słodkiego, skondensowanego mleka (SM Gostyń) w wodzie. Nagrodę umieszczono na końcu każdego z ramion wyboru (Rycina 3). Aby umożliwić automatyzację podania nagrody zaprojektowano, zbudowano i zoptymalizowano dispenser roztworu mleka. W tym celu wykorzystano elektromagnetyczny zawór (nr kat. MOD-09448, OEM), umożliwiający sterowanie przepływem cieczy za pomocą systemu Arduino, zintegrowanego z oprogramowaniem całego paradygmatu behawioralnego w środowisku Bonsai. Zawór jest zamknięty w pozycji spoczynkowej, a otwarcie następuje po uzyskaniu elektrycznego sygnału z Arduino, uwarunkowanego pojawieniem się myszy w zdefiniowanym w środowisku Bonsai sektorze nagrody. Czas i opóźnienie otwarcia zaworu zoptymalizowano doświadczalnie, tak aby każdorazowo wypływała kropla objętości 10  $\mu$ l. Przetestowano, że masa przyjętej objętości mleka zapewnia stabilne utrzymanie się kropli na końcówce podajnika. Na króciec zaworu nałożono uszczelkę wykonaną z polichlorku winylu (PVC) (wydzielony kawałek przewodu do substancji spożywczych), na co zamontowano przedni odcinek strzykawki (zachowując stożkowe przyłącze typu Luer i kilka cm długości cylindra). Tak przygotowana konstrukcja pozwoliła na zamontowanie igły (18G) ze zeszlifowaną uprzednio końcówką (na kształt obłego talerzyka), na której z łatwością eksponowano wydzieloną kroplę roztworu mleka. Na gwint zaworu zamontowano natomiast uszczelnioną tuleję redukcyjną (PVC) wraz z wklejoną cylindryczną częścią próbówki laboratoryjnej (15ml), która stanowiła wyposażony w miarkę zbiornik roztworu mleka (Rycina 5C).

## 6.9 Metody behawioralne

### 6.9.1 Habitucja do zadania behawioralnego

Habitucja zwierząt do eksperymentatora oraz do warunków doświadczalnych zajmowała minimum 14 dni i miała miejsce przed każdą procedurą eksperymentalną wykonaną w automatycznym labiryncie. Na przestrzeni wieloletnich badań z wykorzystaniem gryzoni, zarówno przy użyciu klasycznego labiryntu T jak i opisanej wyżej nowatorskiej wersji, zauważono, że odpowiednia habitucja jest niezwykle istotna w prowadzeniu tego typu doświadczeń. Dlatego też protokół stopniowego osvajania zwierząt jest rozbudowany, ale prowadzi do sytuacji, w której myszy chętnie wchodzi na pojawiającą się w klatce dłoń eksperymentatora, zapewnia komfort zwierząt w czasie trwania eksperymentu oraz pozwala na zredukowanie niepotrzebnego stresu. Eliminacja zmiennych wynikających z lęku przyczynia się także do optymalizacji czasu trwania nawigacji zwierząt oraz zwiększonej powtarzalności wyników. Zauważono, że dobrze oswojone myszy wykazują większą skłonność do eksploracji środowiska i naturalnego zachowania.

Procedurę habitucji do eksperymentatora rozpoczynano jeszcze w pokoju hodowlanym przez 10 minut dziennie dla każdego osobnika. Pierwszego dnia badacz wkładał jedynie dłonie do klatki, aby zwierzęta mogły oswoić się z ich obecnością i nowym zapachem. w ciągu następnych dwóch dni myszy przyzwyczajają się do delikatnego dotyku eksperymentatora. Przez kolejne trzy dni zwierzęta są delikatnie podnoszone, w sposób odzwierciedlający późniejsze postępowanie w labiryncie T i przebywają na rękach badacza przez 10 minut. Eksperymentator na czas całego doświadczenia (kontakt z zwierzętami) zobowiązuje się wyeliminować z użycia zapachowe środki chemiczne, kosmetyki i perfumy. Szóstego dnia, w odstępie kilku godzin po habitucji do eksperymentatora następuje przeniesienie myszy do strefy bytowania w kompleksie pomieszczeń eksperymentalnych. Dochodzi wówczas do odwrócenia cyklu dobowego zwierząt, w związku z tym przez kolejne dwa dni zapewnia się maksymalny spokój i brak ingerencji człowieka.

Następnie w dniach 9 i 10 rozpoczyna się procedura habitucji do wzmocnienia apetytywnego (opisana poniżej), a po upływie kilku godzin każde zwierzę spędza 4 minuty na rękach eksperymentatora. Kolejno myszy przyzwyczajane są do środowiska labiryntu, gdzie nieznane bodźce wprowadzane są stopniowo. W ciągu dwóch dni każda mysz ma możliwość

swobodnej eksploracji labiryntu przez 4 minuty. W tej fazie ruch drzwiczek jest wyłączony (przegrody są opuszczone), a konfiguracja ledowych paneli wyświetla kontekst neutralny (Rycina 6B) będący jednocześnie jedynym źródłem światła. Przy każdym zbliżeniu się do podajnika zwierzę automatycznie otrzymuje nagrodę w postaci kropelki mleka (10  $\mu$ l). W celu habituacji myszy do obecności i ruchu drzwiczek, w dniach 13 i 14, podczas 4 minutowej eksploracji labiryntu uruchomione są niektóre drzwi (1, 2, 3, 6, 7 - Rycina 3B). Ponadto nagroda wydawana jest tylko raz na wejście do określonego ramienia, aby rozpocząć przyzwyczajanie myszy do ukierunkowanego ruchu. W trakcie ostatnich 8 dni sesji habituacyjnych myszy doświadczają zatem pełnej ekspozycji na warunki panujące w ostatecznym protokole eksperymentalnym (poza docelowymi wskazówkami przestrzennymi), w tym odpowiednie zmiany światła, emitowane dźwięki, wzmocnienie apetytywne, warunki pomieszczenia eksperymentalnego i przyzwyczajanie się do aparatu.

W przypadku eksperymentu 3, po osiągnięciu przez zwierzęta odpowiedniego poziomu habituacji do eksperymentatora (tj. samodzielnego wchodzenia na rękę eksperymentatora), myszy przyzwyczajano do procedury iniekcji dootrzewnowych. Rzeczywiste iniekcje wykonywano wyłącznie w dniach testowych. Proces przyzwyczajania obejmował codzienne chwytanie myszy w sposób umożliwiający wykonanie zastrzyku oraz przykładanie strzykawki bez igły do powłok brzusznych. Procedura ta miała na celu minimalizację stresu związanego z rzeczywistymi iniekcjami i zapewnienie większego komfortu zwierzętom podczas testów.

## **6.9.2 Habituacja do wzmocnienia apetytywnego**

Aby całkowicie wyeliminować potencjalny stres związany z nieznaną nagrodą wzmocnienia apetytywnego i zapobiec negatywnym skojarzeniom z nagrodą, myszy były eksponowane na mleko w domowej klatce (zapewnienie komfortowych warunków), przez cztery minuty dziennie, w ciągu czterech następujących po sobie dni (9-12). Przez przygotowany uprzednio w klatkach otwór (o średnicy 1,5 mm) wprowadzono końcówkę igły dyspensera mleka (dokładnie tej, która pojawi się później podczas treningu w aparacie). Za każdym razem, gdy mysz zbliży się do podajnika, otrzymuje kroplę (10  $\mu$ l) nagrody. Kiedy wszystkie zwierzęta rozwiną stabilną preferencję nagrody (określoną wyraźną chęcią spożycia mleka niezwłocznie po włożeniu podajnika do klatki) procedura może zostać zakończona.

Kilka godzin po ekspozycji na wzmocnienie apetytywne myszy kontynuowały habituację do badacza (9-10 dzień) bądź zautomatyzowanego labiryntu T (11-12 dzień).

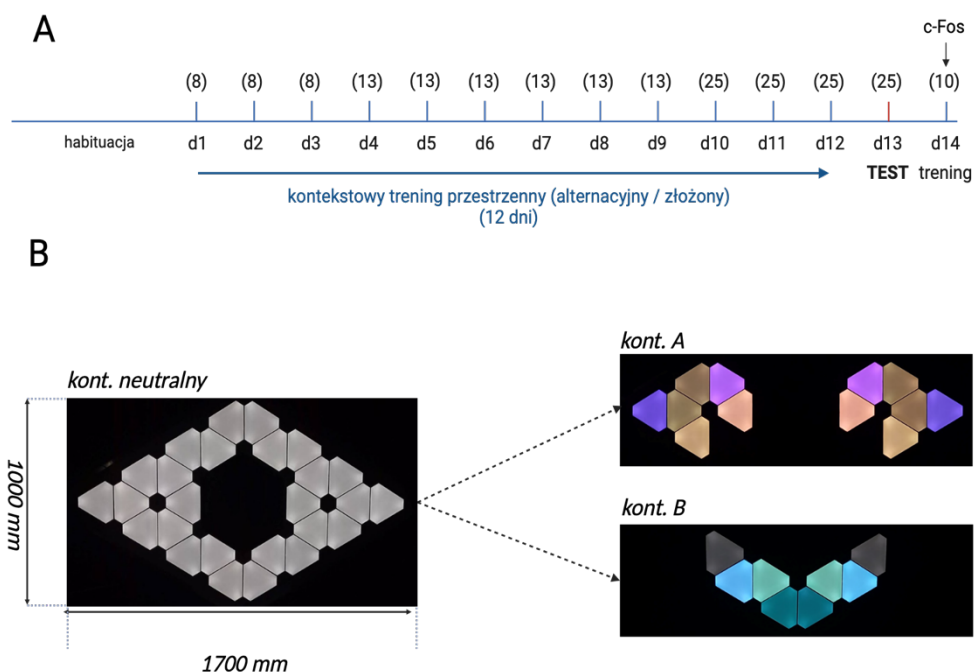
### 6.9.3 Protokół eksperymentalny. Trening kontekstowy (eksperyment 1)

Wszystkie procedury eksperymentalne przeprowadzano w aktywnej fazie cyklu dobowego zwierząt (w fazie ciemnej). W przypadku każdego z opisanych w niniejszej pracy treningów, fizyczny kontakt eksperymentatora z badanym osobnikiem ogranicza się do niezbędnego minimum: włożenia myszy do labiryntu i bezpiecznego przełożenia do klatki bytowej po zakończeniu treningu. Podczas tych czynności system wyświetla na ledowych panelach znany myszom kontekst neutralny. Odpowiednio zhabituowane myszy rozpoczynają 12 dni treningu nawigacyjnego (Rycina 6A). Ogólna koncepcja behawioralna opiera się na dwóch, płynnie następujących po sobie fazach przejścia myszy przez labirynt. W momencie rozpoczęcia treningu drzwiczki 1, 2 lub 3 (w zależności od prezentowanej wskazówki), 4, 5, 6 i 7 są uniesione, a badana mysz wkładana jest do sekcji startu (oznaczonej "x" na rycinie 3B). Aktywacja treningu przez badacza jest jednoznaczna z wyświetleniem kontekstu zdefiniowanego dla określonego skrętu, otwarciem pierwszych drzwiczek (1) i udostępnieniem przejścia do centralnego korytarza. Dzięki temu mysz już w momencie opuszczenia przegrody (1), może dostrzec wizualną wskazówkę. Trening rozpoczyna się od fazy wymuszonej, w której po przejściu centralnego korytarza, zwierzę ma dostęp tylko do jednego z ramion (2 lub 3 - przeciwne jest zamknięte), adekwatnego do wyświetlanego kontekstu. Po odebraniu nagrody, mysz wraca do punktu startu korytarzem łączącym ramię labiryntu z jego podstawą. System wyznacza jednokierunkowy tor ruchu, uniemożliwiając cofanie się myszy do poprzednich stref, poprzez zamykanie odpowiednich drzwiczek w momencie detekcji myszy w kolejnym sektorze (gdy mysz całą długością ogona przekroczy linię drzwi na odległość minimum 2 cm). Gdy zwierzę powróci do punktu startowego (x), rozpoczyna się druga część sesji – faza wyboru. W tym etapie oba ramiona (2 i 3) są otwarte, co pozwala myszy na samodzielny wybór kierunku skrętu. Nagroda jest dostępna wyłącznie w ramieniu zgodnym z aktualnie wyświetlanym kontekstem wizualnym.

W zależności od rodzaju treningu (złożony lub alternacyjny), na panelach prezentowana jest odpowiednia sekwencja wskazówek wizualnych. Aby wystąpiła asocjacja kontekstu z wyborem kierunku, a tym samym nawigacja oparta o wskazówki przestrzenne, poprawne decyzje są każdorazowo wzmacniane nagrodą (kropla mleka), zarówno w fazie wymuszonej

jak i w fazie wyboru. W przypadku błędnej decyzji (gdy nastąpi detekcja myszy w sektorze niezgodnym z wyświetlaną wskazówką przestrzenną) wzmocnienie apetytywne się nie pojawi. Mimo nieprawidłowego skrętu i braku nagrody, mysz kontynuuje nawigację i za pośrednictwem korytarza łączącego wybrane ramię z podstawą wraca do punktu startowego (x). System automatycznie rozpoczyna wówczas fazę wymuszoną kolejnej sesji.

Dzięki temu, że fazy wymuszoną i wyboru występują po sobie naprzemiennie, to w założeniu po każdej błędnej (i poprawnej również) decyzji następuje poprawna, osiągnięta faza wymuszoną, jednocześnie eksponując zwierzę na regułę treningu. Zwierzęta odbywają stopniowo rosnącą liczbę sesji (ruch wymuszony + ruch wyboru) wraz z upływem kolejnych dni treningu. Nawigację rozpoczęto od 8 sesji dziennie, a docelowy poziom 25 sesji osiągnięto w 10 dniu i taką ilość realizowano już do końca procedury. Dwie grupy zwierząt (Alternacja i Złożona) odbyły treningi według dwóch odmiennych schematów nawigacyjnych. Wynik poprawności podejmowanych przez myszy decyzji na przestrzeni kolejnych dni doświadczenia przedstawiono w postaci krzywej uczenia się, która obrazuje uśredniony wynik decyzji (fazy wyboru) wszystkich osobników w grupie, w danym dniu.



**Rycina 6. Oś czasu ilustrująca paradygmat behawioralny treningu kontekstowego (A).** Po procedurze habituacji obie grupy zwierząt (Alternacja i Złożona) przeszły 12 dni treningu przestrzennego, opartego o prezentowane wskazówki kontekstowe. W nawiasach podano wzrastającą liczbę decyzji dotyczących wyboru kierunku nawigacji w poszczególnych dniach treningu (liczba sesji: faza wymuszona + faza wyboru). **Realistyczna reprezentacja zastosowanych wskazówek wizualnych w treningu kontekstowym (zarówno dla treningu alternacyjnego, jak i złożonego) (B).** Kontekst neutralny- stosowany przy każdej interakcji badanego osobnika z aparaturą, która odbywała się poza właściwymi sesjami nawigacyjnymi (po lewej). Ledowe panele skonfigurowano dodatkowo w dwóch wariantach (po prawej): schemat oświetlenia przyporządkowany do skrętu w lewo (kont. A) oraz konfiguracja świetlna przypisana do skrętu w prawo (kont. B).

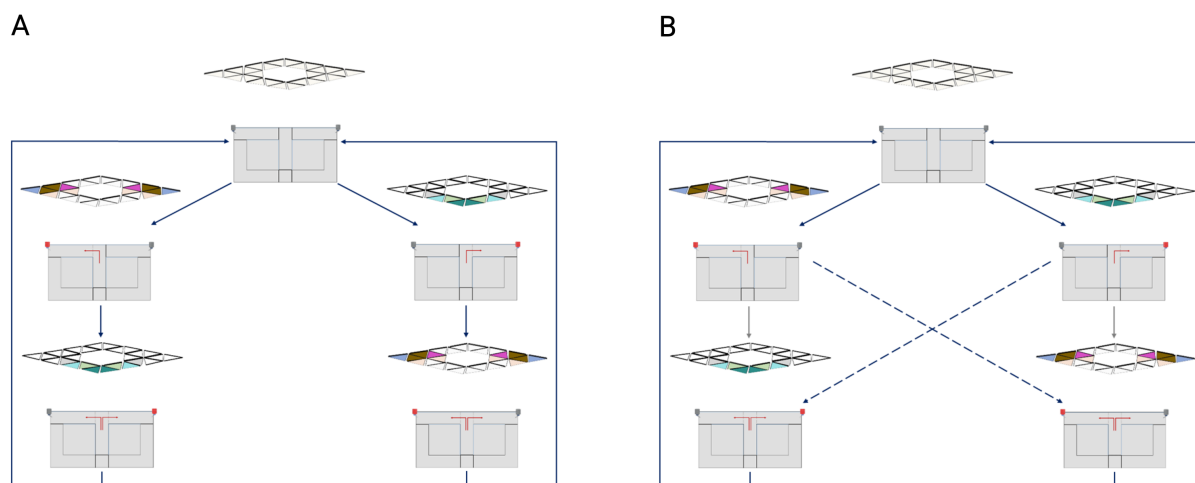
#### 6.9.4 Trening Alternacyjny

W obu fazach (wymuszonej i wyboru) przed labiryntem prezentowane są wizualne konteksty, zdefiniowane odpowiednio dla oczekiwanego skrętu w lewą (kontekst A) lub w prawą stronę (kontekst B). Trening alternacyjny oparty jest o naprzemienne wyświetlanie wskazówek wizualnych. Ta strategia wykorzystuje naturalną tendencję gryzoni do alternacji i podejmowania rotacyjnych wyborów, wzmacniając ją w miarę postępu treningu. Po obecności myszy w danym ramieniu, wyznaczonym fazą wymuszoną (jedyne możliwe skręty), w następującej po niej fazie wyboru system wyświetla odmienny kontekst, przypisany do



a nauka obowiązujących reguł stanowi wyzwanie o stosunkowo wysokim poziomie trudności. Tak jak w treningu alternacyjnym, niezwłocznie po każdej fazie wymuszonej następuje faza wyboru, ale w połowie przypadków zachowany jest identyczny kontekst w obrębie całej sesji (faza wymuszona + faza wyboru). Wówczas oczekiwana nawigacja myszy powinna skutkować ponownym wyborem tego samego ramienia. Zastosowanie schematu złożonego treningu pozwala badaczowi na sukcesywną ocenę zależności podejmowanych wyborów nawigacyjnych zwierząt od wyświetlanych wskazówek przestrzennych.

Dodatkowo w przypadku obu badanych schematów treningu (alternacyjny i złożony) płynność następujących po sobie sesji, osiągnięta dzięki automatyzacji systemu, ekspozuje zwierzęta na ponowne przejście tym samym ramieniem pomiędzy niektórymi sesjami (np. P/L L/P- skręt w lewo fazy wymuszonej następuje po wizycie lewego ramienia w fazie wyboru poprzedzającej sesji). Takie podejście pozwala na styczność obu badanych grup ze zmienną ponownego zastosowania tej samej drogi. W rezultacie całkowita ilość ekspozycji na powtórne wejście do tego samego ramienia z rzędu jest jednakowa pomiędzy badanymi grupami (schematami treningu).



**Rycina 7. Schemat przedstawiający przebieg dwóch strategii uczenia się w ramach treningu kontekstowego.** Wybór oczekiwanego ramienia (zgodnego z przypisanym kontekstem) został oznaczony czerwonym podajnikiem dostarczającym wzmocnienie apetytywne. Kontekst neutralny prezentowany jest wyłącznie przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu procedury nawigacji zwierząt. Schemat ilustrujący naprzemienne prezentowanie wskazówek wzrokowych podczas treningu alternacyjnego. Po każdej fazie wymuszonej następuje faza wyboru, w której zwierzęta są eksponowane na odmienny kontekst wizualny (A).

Schemat obrazujący pseudolosowe prezentowanie bodźców wzrokowych podczas treningu złożonego. W wybranych sesjach system wyświetla ten sam kontekst wzrokowy zarówno w fazie wymuszonej, jak i w fazie wyboru (B).

### 6.9.6 Test (trening kontekstowy)

W 13 dniu procedury doświadczalnej wykonano jednakowy test dla obu badanych grup (niezależnie od rodzaju przebytego treningu). Test obejmował 25 sesji, tożsamy ze schematem treningu złożonego. Jediną różnicą było wzmocnienie nagrodą każdego wyboru myszy, bez względu na to czy decyzja była zgodna z wyświetlaną wskazówką wizualną. Celem testu jest ocena rzeczywistego wykorzystywania wskazówek wizualnych do wyboru kierunku nawigacji w labiryncie. Wynik testu dla każdej grupy przedstawiono jako procent decyzji o przejściu przez ramię zgodne z wyświetlanym kontekstem wizualnym, w stosunku do wszystkich wyborów (procent poprawnych decyzji).

### **6.9.7 Indukcja ekspresji c-fos**

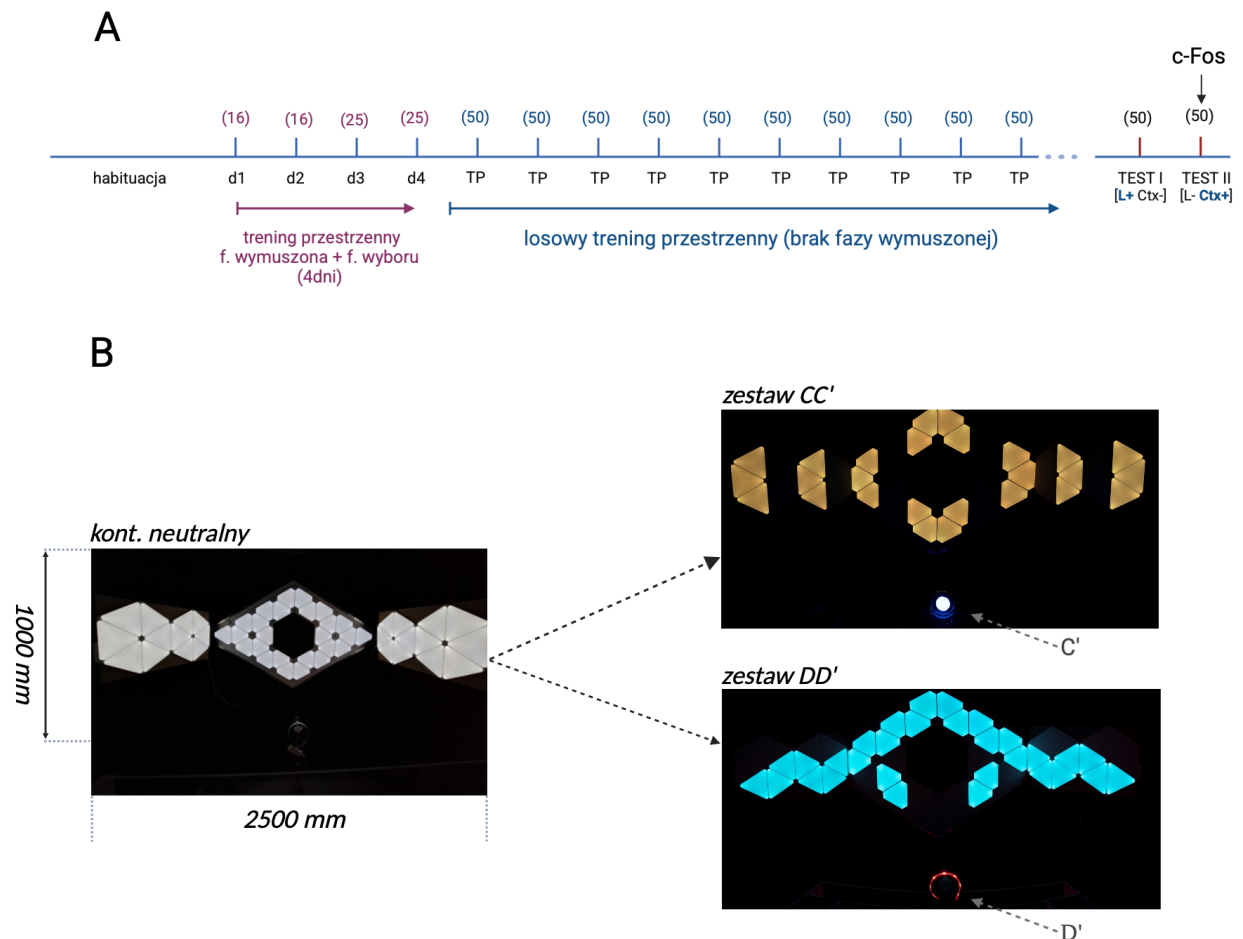
W celu indukcji ekspresji genu c-fos i możliwości detekcji jego białka, każde zwierzę, po 24 godzinach od przeprowadzenia testu, poddano 10 sesjom nawigacji w labiryncie (obejmującym 20 następujących po sobie przejść wymuszonych i wyboru), zgodnie ze schematem treningu złożonego (Rycina 7B). Po upływie 90 minut od rozpoczęcia zadania każde zwierzę wprowadzono w stan sedatywno-nasenny i postępowano według procedury eutanazji przez perfuzję przezsercową.

### **6.9.8 Protokół eksperymentalny. Trening w oparciu o zróżnicowane bodźce wzrokowe (eksperyment 2 i eksperyment 3)**

Wszystkie czynności związane z habituacją zwierząt oraz umieszczaniem w automatycznym aparacie są tożsame z eksperymentem pierwszym. Ogólna koncepcja treningu nawigacyjnego, opartego o udostępniane wskazówki przestrzenne również została zachowana. W celu stworzenia paradygmatu pozwalającego na późniejsze badanie potencjalnego przetwarzania zróżnicowanych typów wskazówek za pomocą odmiennych mechanizmów neuronalnych, wprowadzono dodatkowe, wyróżniające się na tle kontekstu, odrębne punkty odniesienia (Rycina 8B). Tak jak w przypadku kontekstów zdefiniowano odpowiednie wskazówki indywidualne dla skrętu w lewą (C') i prawą stronę (D'). Co więcej, aby podkreślić jeszcze bardziej ogólny charakter bodźców kontekstowych, rozszerzono je o kolejne panele, aby wskazówka obejmowała częściowo również boczne sekcje labiryntu, tworząc bardziej przestrzenny, globalny kontekst. Przez cały okres trwania treningu zwierzętom wyświetlane są zatem dwa zestawy wskazówek wizualnych: złożony, rozbudowany wzór wyświetlany za pomocą paneli i jednorodny, wyraźnie odgraniczający się na tle kontekstu punkt orientacyjny (Rycina 8B).

W celu wytworzenia asocjacji zestawu wskazówek wizualnych z wyborem kierunku, poprawne decyzje były każdorazowo wzmacniane nagrodą (kropla mleka). Dodatkowo, aby ułatwić kojarzenie bodźców wizualnych z wyborem drogi w labiryncie, przez pierwsze 4 dni myszy przechodzą trening według koncepcji następujących po sobie faz wymuszonej i wyboru, które dzięki automatyzacji nadają nawigacji zwierząt ciągły charakter. W ciągu pierwszych 2 dni trening obejmował po 16 sesji (faza wymuszona + faza wyboru), a w dniu 3

i 4 myszy miały ekspozycję na 25 sesji (50 przejść). Po tym czasie wyeliminowano fazę wymuszoną obligując zwierzęta do wyboru kierunku skrętu podczas każdego przejścia. W związku z powyższym od 5 dnia treningu, aż do końca procedury doświadczalnej każda mysz podejmowała 50 decyzji wyboru ramienia. Zestawy wskazówek zaprogramowane były w sposób pseudolosowy na każdy dzień procedury doświadczalnej, przy czym ekspozycja na wskazówki dla skrętu w lewo i w prawo była równa każdego dnia treningu. Dzięki zastosowaniu procedury nieuwzględniającej naprzemienności skrętów, badacz zyskuje możliwość bieżącej oceny, czy prezentowane wskazówki odgrywają kluczową rolę w podejmowaniu decyzji dotyczących wyboru kierunku. Tak jak w eksperymencie pierwszym po wykonaniu ustalonej liczby prób ruch drzwiczek ustaje (w pozycji zamkniętej), wskazówki wizualne znikają i załączone zostaje przytłumione neutralne oświetlenie. Badacz delikatnie wyjmuje zwierzę z labiryntu i umieszcza je w klatce bytowej. Procedurę treningu prowadzono do momentu uzyskania określonej skuteczności nawigacji, z wykorzystaniem wskazówek przestrzennych, ale nie dłużej niż 3 tygodnie dla danej myszy. Jako kryterium przyjęto uzyskanie przez 3 kolejne dni wyniku minimum 75 % prawidłowych wyborów (zgodnych ze wskazówkami). Wynik poprawności podejmowanych przez myszy decyzji na przestrzeni kolejnych dni treningu przedstawiono w postaci krzywej uczenia się, która obrazuje uśredniony wynik decyzji wszystkich osobników w grupie, w danym dniu. W powyższym paradygmacie badacz ma możliwość bieżącej oceny rzeczywistego wykorzystywania wskazówek wizualnych do wyboru kierunku nawigacji. Nie mniej jednak nie można stwierdzić, czy rodzaj wskazówki przestrzennej ma preferencyjne znaczenie. W tym celu przeprowadzono dwa dni testu dla każdej myszy.



**Rycina 8. Oś czasu ilustrująca paradygmat behawioralny oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe (A).** W nawiasach podano liczbę decyzji dotyczących wyboru kierunku nawigacji w poszczególnych dniach treningu. Po czterech dniach nawigacji przestrzennej w konfiguracji następujących po sobie sesji (faza wymuszona i faza wyboru) fazę wymuszoną wyeliminowano. Od dnia 5 myszy trenowały z losowo wyświetlanymi zestawami wskazówek wizualnych, podejmując decyzję o wyborze ramienia podczas każdego przejścia przez labirynt. Zwierzęta trenowano do kryterium uzyskania minimum 75% poprawności wyborów przez 3 następujące po sobie dni. Kolejno przeprowadzono testy (A).

**Realistyczna reprezentacja zastosowanych zestawów wskazówek w treningu opartym o różnorodne bodźce wzrokowe (B).** Kontekst neutralny był stosowany przy każdej interakcji badanego osobnika z aparaturą, która odbywała się poza właściwymi sesjami nawigacyjnymi (po lewej). Rozbudowany układ paneli LED skonfigurowano dodatkowo w dwóch wariantach (po prawej): schemat oświetlenia przyporządkowany do skrętu w lewo obejmował zestaw wskazówki kontekstowej, C oraz indywidualnej, C' (zestaw CC') oraz konfiguracja świetlna globalnego kontekstu, D i odrębnego punktu odniesienia, D' przypisana do skrętu w prawo (zestaw DD').

### **6.9.9 Test (trening oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe, eksperyment 2)**

Zgodnie z przyjętym kryterium skutecznej nawigacji czas trwania treningu różnił się pomiędzy niektórymi osobnikami. Procedurę testową rozpoczęto po trzech kolejnych dniach nawigacji zgodnej z wyświetlanymi wskazówkami. Schemat testu odzwierciedlał przebieg treningu i polegał na ciągłej nawigacji, obejmującej 50 przejść przez aparat, z czego każde wymagało dokonania wyboru jednego z dwóch przeciwległych ramion labiryntu. Podobnie wzmocnienie apetytywne było przyznawane równomiernie po obu stronach. Test trwał dwa dni, w każdym dostępny był tylko jeden rodzaj wskazówek przestrzennych (kontekstowe lub indywidualne). Umożliwiło to zbadanie zależności między poziomem złożoności wskazówki, a zdolnością myszy do skutecznej nawigacji na jej podstawie. Myszy zostały losowo przypisane do dwóch grup. Grupę pierwszą charakteryzuje dostępność wskazówki kontekstowej (Ctx), a następnie indywidualnej (L) odpowiednio pierwszego i drugiego dnia testu. W drugiej grupie kolejność testów została odwrócona. Dzięki temu wyeliminowano potencjalny wpływ kolejności ekspozycji na pojedynczy typ prezentowanej wskazówki na jej percepcję. Wyniki testu dla każdej grupy, przedstawiono jako procent decyzji zgodnych z aktualnie dostępną wskazówką wizualną, w stosunku do wszystkich podjętych wyborów (procent poprawnych decyzji). Po upływie 90 minut od rozpoczęcia testu II, każde zwierzę wprowadzono w stan sedatywno-nasenny i postępowano według procedury eutanazji przez perfuzję przezsercową.

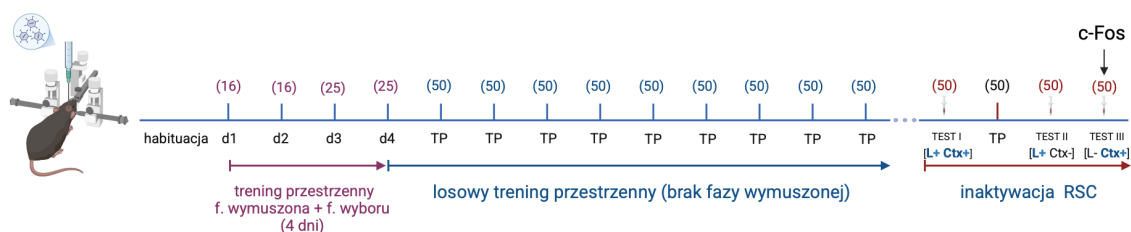
### **6.9.10 Test (trening oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe, eksperyment 3)**

Koncepcja procedury testowej w eksperymencie z inaktywacją kory retrosplenialnej była analogiczna do opisanej w podsekcji 6.9.8 rozdziału Materiały i metody. W celu umożliwienia precyzyjnej analizy wpływu inaktywacji tej struktury na proces nawigacji zależnej zarówno od zestawu znanych wskazówek, jak i od wybiórczej dostępności jednego typu wskazówki, wprowadzono dwa dodatkowe dni w procedurze testowej. Fazę testów rozpoczęto zgodnie z przyjętym kryterium sukcesu nawigacyjnego, po trzech kolejnych dniach, w których zwierzęta osiągnęły co najmniej 75% poprawnych wyborów nawigacyjnych dziennie, zgodnych z prezentowanymi wskazówkami. Schemat testu odzwierciedlał przebieg treningu, zakładając ciągłą nawigację, obejmującą 50 przejść przez aparat, z czego każde wymagało

dokonania wyboru jednego z dwóch przeciwległych ramion labiryntu. System wzmocnienia apetytywnego był utrzymany w sposób równomierny dla obu ramion, co zapewniało stabilność warunków eksperymentalnych. Test obejmował trzy dni, z różną dostępnością wskazówek (Rycina 9):

- Test I: Dostępność pełnego zestawu wskazówek (zarówno kontekstowych, jak i indywidualnych).
- Dzień treningu przestrzennego (pomiędzy testem I, a II i III).
- Test II: Dostępność wyłącznie wskazówek kontekstowych (Ctx)
- Test III: Dostępność wyłącznie wskazówek indywidualnych (L).

Myszy z grupy badanej i grupy kontrolnej zostały losowo dodatkowo podzielone na dwie podgrupy. W pierwszej podgrupie w teście II udostępniono wskazówkę kontekstową (Ctx), a w teście III wskazówkę indywidualną (L). W drugiej podgrupie zastosowano odwrotną kolejność testów. Taki układ eksperymentalny umożliwił eliminację potencjalnego wpływu kolejności ekspozycji na percepcję poszczególnych typów wskazówek, zapewniając większą wiarygodność wyników. W każdym z powyższych dni testu (I, II i III), na 30 minut przed rozpoczęciem procedury nawigacyjnej, podawano dootrzewnowo agonistę receptorów DREADDs, JU60 [0,5mg/ kg m.c.] w celu wywołania selektywnej inaktywacji kory retrosplenia, bądź 0,9% roztwór NaCl do objętości dostosowanej do dawki JU60 (dla myszy z grupy kontrolnej). Procedura ta pozwalała na ocenę wpływu czasowej inaktywacji tej struktury na zdolność myszy do nawigacji w różnych warunkach dostępności wskazówek przestrzennych. Dodatkowo, pomiędzy testem I a testami II i III, wprowadzono dodatkowy dzień treningu, przeprowadzony bez inaktywacji kory retrosplenia (Rycina 9). Dzień ten miał na celu kontrolę potencjalnego wpływu samej procedury eksperymentalnej (iniekcji oraz inaktywacji struktury), na nabyte podczas treningu zdolności sensomotoryczne myszy. Taka strategia pozwoliła wykluczyć zakłócający wpływ procedur związanych z inaktywacją na zdolność zwierząt do skutecznej nawigacji. Wyniki testu dla każdej grupy, przedstawiono jako procent decyzji zgodnych z aktualnie dostępną wskazówką wizualną, w stosunku do wszystkich podjętych wyborów (procent poprawnych decyzji). Po upływie 90 minut od rozpoczęcia testu III, każde zwierzę wprowadzono w stan sedatywno-nasenny i postępowano według procedury eutanazji przez perfuzję przezsercową.



**Rycina 9. Oś czasu ilustrująca paradygmat behawioralny oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe z inaktywacją kory retrosplenialnej.** W nawiasach podano liczbę decyzji dotyczących wyboru kierunku nawigacji w poszczególnych dniach treningu. Po czterech dniach nawigacji przestrzennej w konfiguracji następujących po sobie sesji (faza wymuszona i faza wyboru) fazę wymuszoną wyeliminowano. Od dnia 5 myszy trenowały z losowo wyświetlanymi zestawami wskazówek wizualnych, podejmując decyzję o wyborze ramienia podczas każdego przejścia przez labirynt. Zwierzęta trenowano do kryterium uzyskania minimum 75% poprawności wyborów przez 3 następujące po sobie dni. Kolejno przeprowadzono trzy dni testów z inaktywacją.

## 7 Wyniki

### 7.1 Opracowanie i wykonanie automatycznego systemu do badania pamięci przestrzennej myszy

W oparciu o wieloletnie doświadczenia z wykorzystaniem konwencjonalnego labiryntu T w badaniach zależności nawigacji gryzoni (myszy i szczurów) od wskazówek wizualnych, podjęto działania mające na celu zaprojektowanie i skonstruowanie systemu, który umożliwiłby pełną automatyzację realizacji paradygmatu behawioralnego. Potrzeba wdrożenia nowatorskiego rozwiązania wynikała z nadmiernego zaangażowania czasowego zarówno eksperymentatora, jak i badanych zwierząt, co znacząco ograniczało możliwość zwiększenia liczebności grup eksperymentalnych. Zauważono także problem nadmiernej ingerencji człowieka, utrudniającej badanie mechanizmów nawigacyjnych zwierząt, odzwierciedlających ich naturalne zachowania.

Dla przykładu, aby przeprowadzić pojedynczy dzień treningu przestrzennego, składający się z 25 sesji (zgodnie z opisem w Rozdziale 6.9.3) niezbędna była aż stukrotna ingerencja ze strony eksperymentatora dla każdej myszy. Po każdorazowym przejściu przez labirynt zwierzę musiało być wyjęte przez badacza (na czas zmiany przegród oraz wyświetlanej wskazówki), a następnie ponownie umieszczane w punkcie startowym labiryntu. Zaimplementowanie opisanego w niniejszej pracy systemu automatyzacji pozwoliło znacząco zredukować tę ingerencję. W obecnym rozwiązaniu badacz kontaktuje się ze zwierzęciem jedynie dwukrotnie w trakcie całej procedury: przed rozpoczęciem treningu, umieszczając mysz w labiryncie oraz po zakończeniu, aby przenieść ją do klatki hodowlanej. Przedstawiona potrzeba redukcji czasu i ograniczenia kontaktu fizycznego stanowiła podstawę przemawiającą za realizacją celu automatyzacji systemu behawioralnego. Wdrożenie tego rozwiązania przyniosło liczne korzyści, spośród których najistotniejszą było znaczące zwiększenie liczebności grup eksperymentalnych. Konwencjonalny labirynt umożliwiał jednoczesny trening maksymalnie 8 osobników dziennie, podczas, gdy automatyzacja pozwoliła na przeprowadzenie treningu w grupie liczącej nawet 30 myszy każdego dnia (eksperyment 3), co oznacza niemal czterokrotny wzrost liczby testowanych zwierząt.

Realizacja systemu automatyzacji wymagała przetestowania różnych prototypowych rozwiązań. Pierwotne koncepcje obejmowały zastosowanie silników krokowych, kół zębatych i pasów napędowych. Przykład jednego z takich prototypów przedstawiono na rycinie 10A. Nie uzyskano wówczas satysfakcjonujących efektów pod względem płynności ruchu oraz ograniczonej emisji dźwięków. Te niedoskonałości mogły potencjalnie wywoływać reakcje stresowe u myszy, dlatego zdecydowano się na wdrożenie alternatywnego rozwiązania. Ostateczny sukces osiągnięto poprzez zastosowanie pneumatycznego obiegu powietrza w celu inicjacji ruchu drzwiczek oraz wybór właściwych komponentów układu. Opis automatyzacji systemu zawarto w Rozdziale 6.8.1. Odpowiedni dobór materiału drzwiczek pozwolił na uzyskanie ich optymalnej masy, co w połączeniu z precyzyjnym zsynchronizowaniem elementów układu pneumatycznego, takich jak reduktor kompresora, dodatkowy filtr-reduktor, zawór dławiąco zwrotny oraz amortyzacja siłowników, umożliwiło osiągnięcie satysfakcjonujących parametrów ruchu drzwiczek, charakteryzujących się odpowiednią prędkością (średnia prędkość ruchu drzwiczek 162 mm/ s), płynnością i cichą pracą. Dzięki kilkietapowej redukcji przepływu powietrza, myszy nie wykazują reakcji lękowych w związku z poruszającymi się drzwicami, a jednocześnie zachowano funkcjonalność w postaci wytyczania jednokierunkowych ścieżek w labiryncie.

Ważnym założeniem projektowym było dostosowanie aparatury do potencjalnej integracji z nowoczesnymi technologiami badawczymi w przyszłości. Stąd zaprojektowano wsuw drzwiczek do podłogi labiryntu, aby nie stwarzać ewentualnych przeszkód w zastosowaniu dodatkowego okablowania lub urządzeń takich jak miniskopy, wielokanałowe elektrody czy inne metody funkcjonalnego obrazowania mózgu. Dzięki temu system zachowuje wysoką elastyczność i umożliwia przyszłe rozszerzenia badawcze. Dobór odpowiednich wskazówek wizualnych został również przeprowadzony w oparciu o eksperymentalne testy. Sprawdzone różne typy bodźców, wyświetlanych początkowo za pomocą projektora multimedialnego na ścianie, przed labiryntem, a także na ścianie i suficie. Przetestowano zarówno uproszczone obrazy o wysokim kontraście i różnej wielkości, jak i bardziej złożone przedstawiające perspektywę (Rycina 10B). Pomimo, że poprzednie wskazówki okazały się być wystarczające do rozróżniania przez gryzonie, to emisja ciepła z długotrwałe włączonego projektora wprowadzała dodatkową zmienną do eksperymentu, a w konsekwencji załączający się wbudowany wentylator powodował hałas. Zastosowany układ ledowych paneli (oraz indywidualnych ledowych punktów odniesienia w przypadku

eksperymentów 2 i 3) (Rycina 6B oraz Rycina 8B) pozwolił wyeliminować te ograniczenia, spełniając jednocześnie wszystkie wymagane kryteria techniczne i funkcjonalne.



**Rycina 10.** Fotografie ilustrujące przykład testowanego, prototypowego rozwiązania z zastosowaniem silnika krokowego, koła i pasów zębatych (A). Przykłady testowanych wskazówek przestrzennych przy zastosowaniu konwencjonalnego labiryntu (B).

## 7.2 Analiza wpływu różnych strategii treningu na proces nawigacji opartej o bodźce wizualne

W celu sprawdzenia, czy różnica w schemacie uczenia się ma wpływ na proces nawigacji opartej o prezentowane wizualne wskazówki, zwierzęta poddano treningowi zgodnie z dwoma różnymi schematami: alternacyjnym i złożonym. Zbudowany, automatyczny system umożliwił przeprowadzenie procedur treningowych oraz testowych (Rycina 6A), umożliwiających ocenę myszy pod kątem postrzegania i wykorzystywania prezentowanych kontekstów do nawigacji w labiryncie.

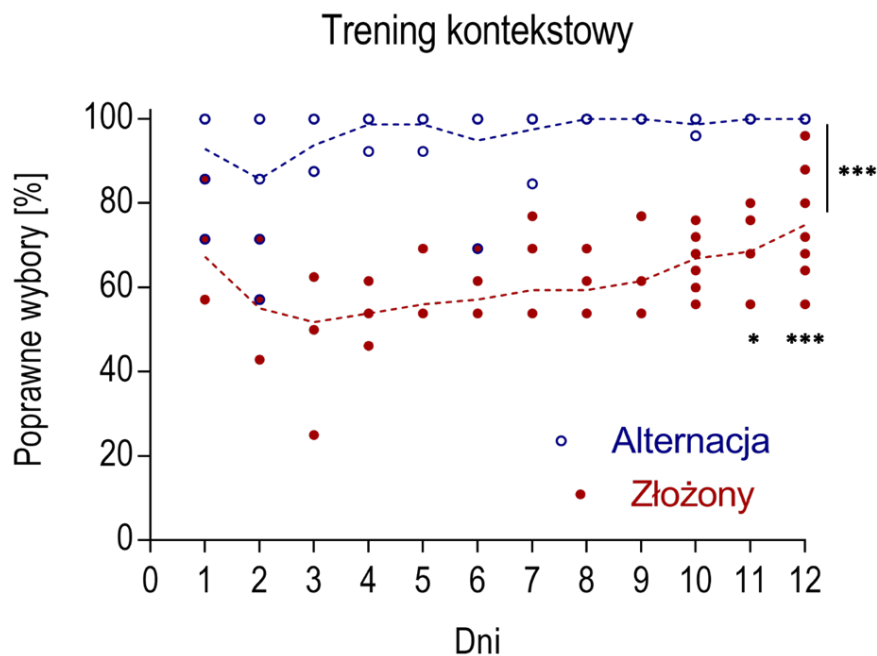
Zanim przystąpiono do przeprowadzania testów behawioralnych, myszy poddano habituacji do zadania behawioralnego oraz do wzmocnienia apetytywnego, według procedur opisanych w rozdziale Materiały i metody- podsekcja 6.9.1 oraz podsekcja 6.9.2. Każda sesja treningu składała się z dwóch faz (wymuszonej i wyboru). Zarówno po zakończeniu każdej fazy jak i sesji niezwłocznie zaczynała się kolejna, tak aby procedura nawigacji była nieprzerwana, a jedynie dostosowana do prędkości poruszania się myszy. System odpowiadał za detekcję nawigującego osobnika w poszczególnych kompartmentach labiryntu i poprzez zamykanie drzwiczek w bezpiecznej odległości od myszy wyznaczał jednokierunkowy ruch w labiryncie (normalizacja przebytej drogi pomiędzy badanymi osobnikami). Oba ramiona były wzmocniane apetytywnie jednakową ilość razy, przy czym mleko dostępne było tylko w ramieniu zgodnym z wyświetlanym kontekstem wizualnym. Szczegóły paradygmatu behawioralnego opisano w rozdziale Materiały i metody – podsekcja 6.9.3.

Dwie grupy zwierząt: Alternacja ( $n = 6$ ) i Złożona ( $n = 7$ ) trenowano w dwóch różnych schematach nawigacyjnych. Dokładny opis procedur treningowych opisano w rozdziale Materiały i metody- podsekcja 6.9.4 i podsekcja 6.9.5. Trening grupy alternacyjnej charakteryzował się silnym, sukcesywnym utrwalaniem naturalnego wzorca naprzemiennych wyborów. Po każdej fazie wymuszonej natychmiast zachodziła faza wyboru, z wyświetleniem zmienionego kontekstu wizualnego. Prawidłowa reakcja dla zwierzęcia polegała na wyborze ramienia przeciwnego do odwiedzonego w poprzedniej fazie (Rycina 7A). Zgodnie z oczekiwaniami, myszy z grupy alternacyjnej opanowały zadanie maksymalnie w ciągu 3 dni i utrzymywały asymptotyczny poziom poprawności wyborów przez resztę treningu (poprawność wyborów w ostatniej sesji treningowej: 100%).

Trening złożony wymagał elastycznej odpowiedzi na bodźce wizualne. W połowie prób schematyczna, naprzemienna sekwencja została zastąpiona sesjami zmodyfikowanymi, w których system wyświetlał identyczny kontekst w obu fazach (wymuszonej i wyboru). Prawidłową reakcją było wówczas wybranie tego samego ramienia, które zwierzę odwiedziło w poprzedniej fazie (Rycina 7B). Złożony schemat uczenia się nie tylko był pozbawiony przewidywalnych, naprzemiennych wyborów, ale dodatkowo wymagał od zwierząt działania przeciwnego do naturalnej tendencji alternacyjnej i podejmowania wyborów jednakowych kierunków kilka razy z rzędu.

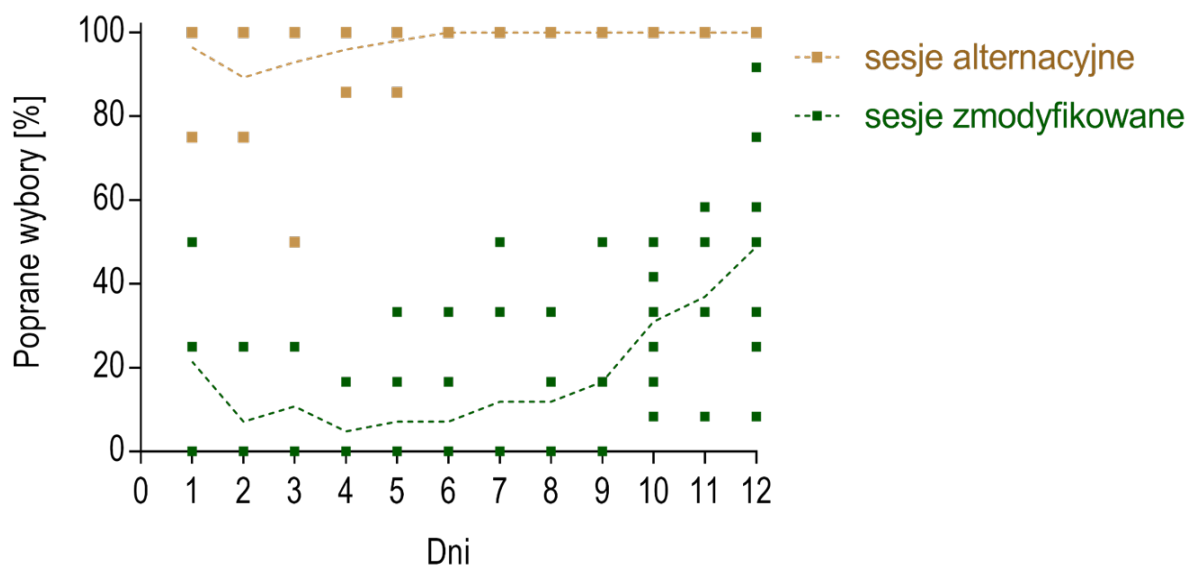
Myszy z grupy złożonej początkowo osiągały wyniki na poziomie losowym. Wyraźny brak spójności pomiędzy preferencją naprzemiennych wyborów, a brakiem wzmocnienia apetytywnego doprowadził do początkowego spadku wydajności, osiągając minimum

w trzeciej dobie treningu (średnia dokładność: 51,8%, odchylenie standardowe: 12,37, Rycina 11). Jednak podczas kolejnych dni nauki (4-12) poprawność wyborów grupy złożonej stopniowo wzrastała, a pod koniec procedury treningowej niektóre osobniki zbliżyły się do poziomu osiągnięć grupy alternacyjnej (średnia poprawność wyborów w ostatniej sesji treningowej: 74,9%, odchylenie standardowe: 12,95, Rycina 11). Zgodnie z przewidywaniami, trening o złożonym charakterze cechował się wysokim poziomem skomplikowania. Procedura częściowo wzmacniała wrodzoną tendencję do eksplorowania nowych (różnych od poprzednio odwiedzanych) ramion, a jednocześnie połowa sesji treningu stanowiła odstępstwo i zaprzeczenie konwencjonalnego schematu. Sesje wymagające powtórzenia tego samego ramienia w ramach treningu złożonego były znacznie trudniejsze do opanowania w porównaniu z nawigacją naprzemienną. Rycina 12 przedstawia różnice w przebiegu krzywych uczenia się badanej grupy złożonej, w zależności od rodzaju sesji (alternacyjne i zmodyfikowane). Pomimo złożoności i wyzwań procedury treningowej niektóre osobniki osiągały ostateczny sukces nawigacji zgodnej z prezentowanymi kontekstami. Analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów w układzie dwuczynnikowym (grupa: Alternacja, Złożona  $\times$  czas: dni 1–12) wykazała istotne efekty dla grupy:  $F(1,11) = 1,499$ ,  $P < 0,0001$ , czasu:  $F(11,121) = 3,839$ ,  $P < 0,0001$  oraz interakcji:  $F(11,121) = 1,878$ ,  $P = 0,0486$ . Test wielokrotnych porównań post hoc Tukeya dla grupy złożonej wykazał istotny wpływ treningu w 11 dniu ( $P = 0,023$ , 95% CI =  $-32,36$ – $-1,213$ ) oraz 12. dniu ( $P = 0,0002$ , 95% CI =  $-38,64$ – $-7,499$ ). Wyniki zobrazowano na rycinie 11.



**Rycina 11.** Wykres przedstawiający krzywe uczenia się zwierząt nawigacji opartej o prezentowane wskazówki, w ramach dwóch odrębnych schematów treningowych (alternacja i złożony). Punkty danych przedstawiają poprawność wyborów, procent decyzji nagradzanych (zgodnych z wyświetlanym kontekstem), dla poszczególnych zwierząt w ramach kolejnych dni treningów. Istotne efekty oznaczono: (\*\*\*) efekt treningu,  $F(1,11) = 1,499$ ,  $P < 0,0001$ , dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z powtarzanymi pomiarami (RM) z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych; dzień treningowy dla grupy złożonej: (\*) dzień 11 ( $P = 0,023$ ), (\*\*\*) dzień 12 ( $P = 0,0002$ ).

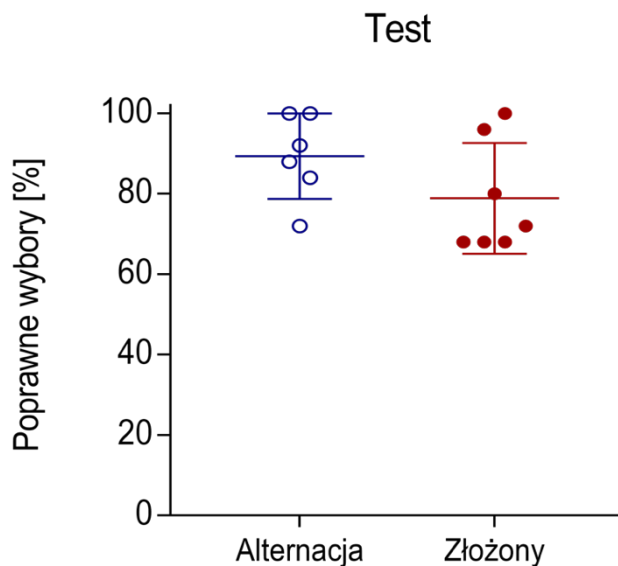
Co interesujące, pomimo faktu zaburzania reguły alternacyjnej, poprzez sesje wymagające powtarzania tego samego wyboru (sesje zmodyfikowane), to analizując wyłącznie sesje alternacyjne treningu złożonego (Rycina 12, sesje alternacyjne) można zauważyć istotne podobieństwo przebiegu krzywej poprawnych wyborów do wyników grupy alternacyjnej (Rycina 11, trening alternacyjny). Powyższa obserwacja stanowi potwierdzenie silnej, wrodzonej tendencji myszy do podejmowania naprzemiennych wyborów, która została zachowana pomimo znacznego zakłócenia schematu. Apetytywne wzmocnienie naprzemiennych wyborów zaledwie w połowie sesji (przy jednoczesnym wprowadzeniu powtórzeń wskazówki w drugiej połowie), okazało się być wystarczające, aby schemat alternacyjny mógł być stosowany z podobnym zaangażowaniem jak w grupie z nagradzaniem każdego, naprzemiennego wyboru.



**Rycina 12.** Wykres przedstawiający przebieg krzywych uczenia się myszy z grupy złożonej, w zależności od rodzaju sesji (alternacyjne i zmodyfikowane). Punkty danych pokazują procent nagrodzonych decyzji (zgodnych z wyświetlanym kontekstem) dla poszczególnych zwierząt w trakcie kolejnych dni treningu złożonego.

W miarę postępu treningu złożonego, analiza poprawności wyborów w sesjach wymagających powtórnego wejścia do tego samego ramienia umożliwiła eksperymentatorowi bieżącą ocenę postępu w procesie tworzenia asocjacji z prezentowanymi wskazówkami. W przypadku drugiej badanej grupy, zgodność wyświetlanych wskazówek z silną tendencją alternacyjną nie umożliwiła poznania faktycznej motywacji wyborów zwierząt. W związku z tym, po zakończeniu treningu, w dniu 13 przeprowadzono test. Obie badane grupy przetestowano pod względem zdolności rozwiązywania zadania według schematu złożonego, w którym 50% sesji wymagało ponownego wejścia do uprzednio odwiedzanego ramienia. W trakcie testu w celu poznania niezaburzonej motywacji zwierząt w podejmowaniu decyzji oraz uniknięcia modyfikacji i wygaszania nabytej dotychczas pamięci, w fazach wyboru nagradzane były oba ramiona, niezależnie od zgodności decyzji z prezentowanym kontekstem. Adekwatnie z oczekiwaniami grupa Złożona osiągnęła wyniki podobne do tych z ostatniego dnia treningu (średnia dokładność: 78,8%, odch. stand. = 13,8; Rycina 13).

W przypadku grupy alternacyjnej, pomimo każdorazowego wzmacniania naturalnej tendencji naprzemiennych wyborów podczas treningu, wykazano równie wysoki poziom poprawności wyborów w teście (średnia dokładność: 89,3%, odch. stand. = 10,6; Rycina 13). Znikoma różnica pomiędzy badanymi grupami nie wykazała istotności statystycznej w dwustronnym teście t-Studenta dla prób niezależnych ( $t = 1,511$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,159$ ).



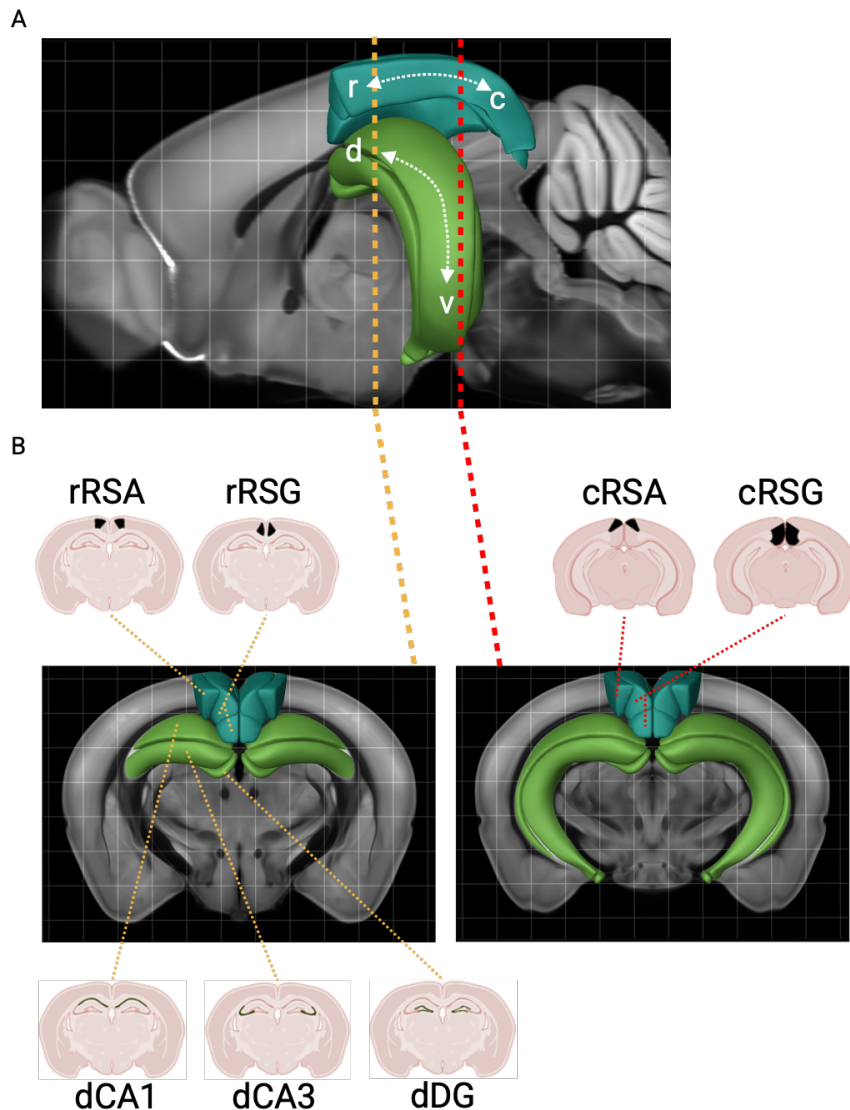
**Rycina 13.** Wykres przedstawiający wyniki testu dla dwóch badanych grup (Alternacja i Złożona). Punkty danych przedstawiają procent decyzji myszy o wyborze kierunku skrętu, zgodnych z wyświetlanym kontekstem. Analiza statystyczna: dwustronny test t-Studenta dla grup niezależnych, ( $t = 1,511$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,159$ ).

### **7.3 Zaangażowanie RSC oraz HPC w proces nawigacji opartej o wskazówki wizualne przy zastosowaniu różnych strategii uczenia się myszy**

Wyniki przeprowadzonego testu pokazują, że zarówno myszy trenowane zgodnie ze schematem alternacyjnym, jak i te z grupy złożonej wykazały wysoki poziom zdolności do asocjacji prezentowanych kontekstów wizualnych z wyborem kierunku skrętu. Oba rodzaje

treningu okazały się być wystarczająco efektywne. Z perspektywy behawioralnej różnice w schematach treningowych nie miały istotnego wpływu na zdolność wykorzystania wskazówek wizualnych do prawidłowej nawigacji.

W związku z powyższym, zbadano następnie czy różne schematy uczenia się wskazówek przestrzennych mogą znaleźć odzwierciedlenie w zróżnicowanym zaangażowaniu struktur istotnych dla pamięci przestrzennej. W celu indukcji ekspresji c-fos w obszarach mózgu zaangażowanych w procesy uczenia przestrzennego, po upływie 24 godzin od zakończenia procedury testowej przeprowadzono dodatkowy trening dla obu badanych grup. Trening obejmował 10 sesji, składających się z fazy wymuszonej oraz fazy wyboru według schematu złożonego. 90 minut od rozpoczęcia zadania behawioralnego myszy poddawano procedurze perfuzji, izolowano mózgi oraz za pomocą kriostatu cięto na skrawki. W celu detekcji białka c-Fos przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko białku c-Fos. Analiza została ukierunkowana na grzbietową część hipokampa, dHPC (dCA1, dCA3, dDG), przednią część kory retrosplenialnej, rRSC (rRSA i rRSG) oraz tylną część kory retrosplenialnej, cRSC (cRSA i cRSG) (Rycina 14). Powyższe rejony wyselekcjonowano opierając się na danych literaturowych, sugerujących na ich zaangażowanie w przetwarzanie pamięci przestrzennej. Szczegóły anatomicznej identyfikacji skrawków mózgu opisano w rozdziale Materiały i metody - podsekcja 6.5.1. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano jądrową lokalizację białka c-Fos (Rycina 2A, C).

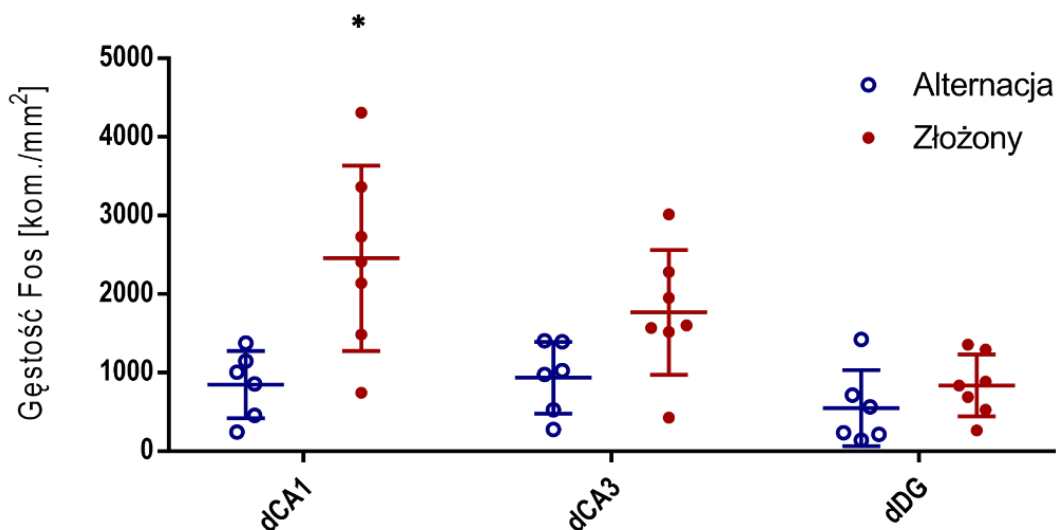


**Rycina 14.** Wizualizacja lokalizacji przekrojów przedstawiających płaszczyzny koronalne każdego z analizowanych obszarów zainteresowania. Na podstawie publikacji własnej (Balcerek i in., 2021).

**(A)** Widok boczny. Hipokamp i korę retrosplenialną oznaczono kolorami, a lokalizacja badanych przekrojów w osi przednio-tylnej została wskazana przerywanymi liniami. Za pomocą strzałek wskazano przebieg osi przednio-tylnej (ang. *rostral-caudal*, r-c) oraz osi grzbietowo-brzusznej (ang. *dorsal-ventral*, d-v) w mózgu.

**(B)** Lokalizacja obszarów zainteresowania (ROI) używanych do analizy gęstości komórek dodatnich pod względem białka c-Fos na przekrojach koronalnych. Badane obszary zainteresowania: rRSA (ang. *rostral agranular retrosplenial cortex*) - przednia część kory retrosplenialnej agranularnej, rRSG (ang. *rostral granular retrosplenial cortex*) - przednia część kory retrosplenialnej granularnej, cRSA (ang. *caudal agranular retrosplenial cortex*) - tylna część kory retrosplenialnej agranularnej, cRSG (ang. *caudal granular retrosplenial cortex*) - tylna część kory retrosplenialnej granularnej, dCA1 (ang. *dorsal CA1 field*) - grzbietowa część pola CA1 hipokampa, dCA3 (ang. *dorsal CA3 field*) - grzbietowa część pola CA3 hipokampa, dDG (ang. *dorsal dentate gyrus*) - grzbietowa część zakrętu zębatego.

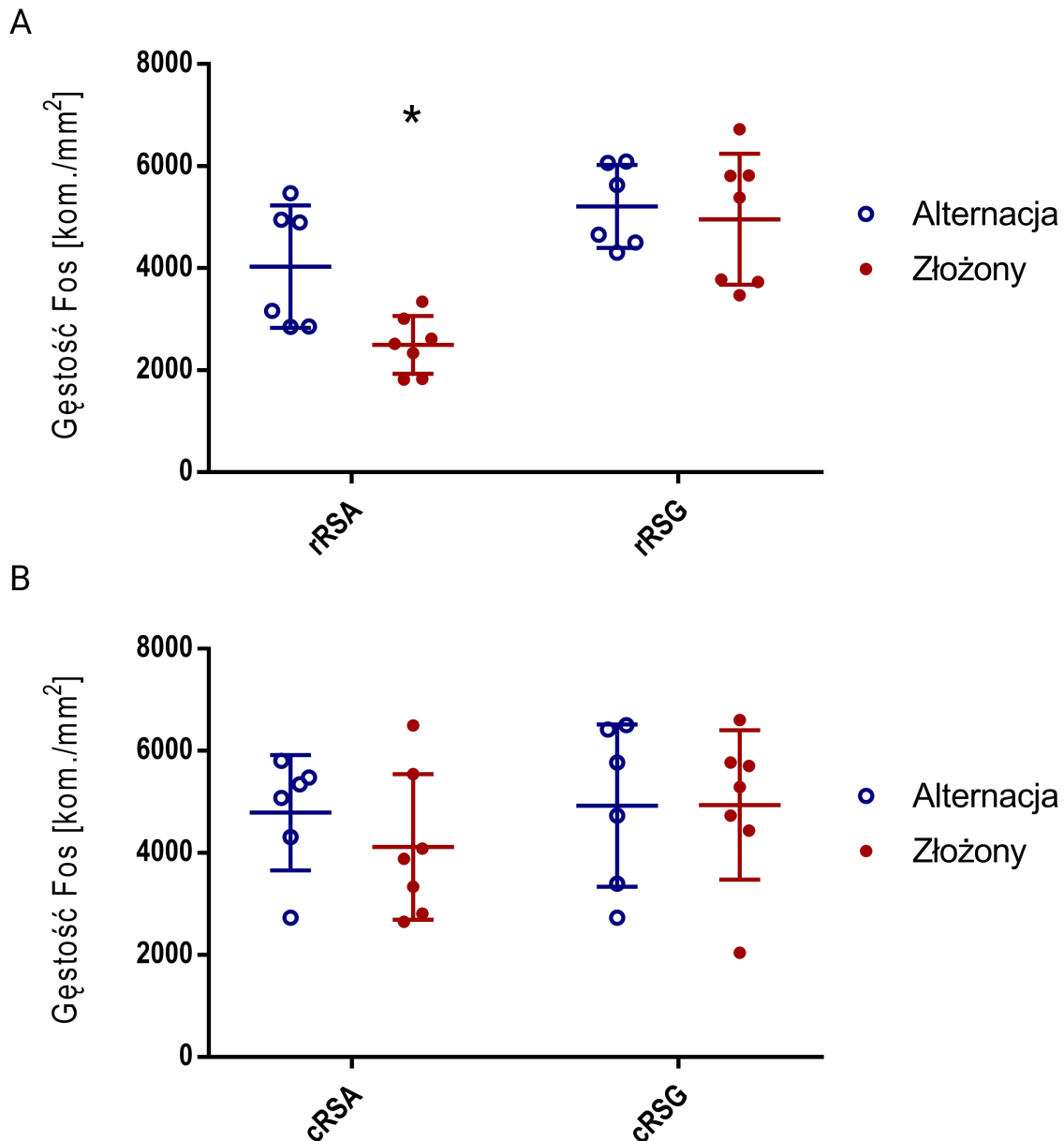
Porównano poziomy białka c-Fos między myszami trenowanymi według dwóch różnych protokołów eksperymentalnych (alternacja i złożony), które ostatecznie testowano w jednakowych warunkach, osiągając zbliżone wyniki poprawności nawigacji. Analiza wykazała istotne różnice w aktywności grzbietowej części hipokampa. U myszy trenowanych w protokole ze zmodyfikowanymi sesjami, które wymagały powtórnego wyboru tego samego ramienia (Rycina 7B), zaobserwowano znacznie wyższą aktywność w polu CA1 hipokampa. Gęstość immunododatnich pod względem antygenu białka c-Fos jąder komórkowych w polu CA1 grupy złożonej była istotnie wyższa (2456 komórek/mm<sup>2</sup>, odch. stand. = 1178), w porównaniu z grupą alternacyjną (848 komórek/mm<sup>2</sup>, odch. stand. = 428, skorygowane  $P = 0,027$ , test wielokrotny Holma-Sidaka, Rycina 15). Podobny trend zaobserwowano w polu CA3, gdzie gęstość c-Fos była wyższa w grupie zmodyfikowanej (1765 komórek/mm<sup>2</sup>, odch. stand. = 794), w porównaniu z grupą alternacyjną (934,7 komórek/mm<sup>2</sup>, odch. stand. = 457). Jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej po uwzględnieniu korekcji wielokrotnej (skorygowane  $P = 0,088$ , test wielokrotny Holma-Sidaka). W zakręcie zębatym, subregionie formacji hipokampalnej, charakteryzującym się zazwyczaj niskim poziomem białka c-Fos, nie zaobserwowano istotnych różnic w aktywności między badanymi grupami. Gęstość jąder immunoreaktywnych względem białka c-Fos wynosiła 549 komórek/mm<sup>2</sup> (odch. stand. = 484) w grupie alternacyjnej oraz 836 komórek/mm<sup>2</sup> (odch. stand. = 392) w grupie złożonej (skorygowane  $P = 0,262$ , test wielokrotny Holma-Sidaka) (Rycina 15).



**Rycina 15.** Wykres przedstawia porównanie średniej gęstości komórek immunoreaktywnych pod względem białka c-Fos w analizowanych subregionach grzbietowej części hipokampa, pomiędzy badanymi grupami eksperymentalnymi (Alternacja i Złożona). Gęstość przedstawiono jako liczba komórek c-Fos+/mm<sup>2</sup> badanego obszaru. Poszczególne punkty danych przedstawiają gęstość komórek pozytywnych pod względem antygenu białka c-Fos dla indywidualnych zwierząt. Analiza ujawniła istotnie statystycznie wyższy poziom gęstości komórek pozytywnych pod względem c-Fos u myszy trenowanych według protokołu złożonego ( $P = 0,027$ ) względem grupy Alternacja w grzbietowej części pola CA1. Do analizy zastosowano wielokrotny test t Holma-Sidaka. Podobny trend zaobserwowano dla obszaru CA3, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ( $P = 0,088$ ).

Analogiczną analizę przeprowadzono dla kory retrosplenialnej, uwzględniając dwie płaszczyzny koronalne: rRSC (przednią) i cRSC (tylną), jak opisano w rozdziale Materiały i metody - podsekcja 6.5.1. Zgodnie z danymi literaturowymi, w RSC występują funkcjonalne różnice wzdłuż osi strzałkowej, dlatego w analizie wyodrębniono także część granularną i agranularną. Otrzymane wyniki wykazały niemal jednolicie wysoką aktywację białka c-Fos we wszystkich badanych podregionach RSC (rRSA, rRSG, cRSA, cRSG), w grupie myszy z naprzemiennym schematem nawigacji (Rycina 16). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic wzdłuż osi przednio-tylnej (rRSA: 4031 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1200; rRSG: 5209 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 814; cRSA: 4789 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1129; cRSG: 4925 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1590), co potwierdzono za pomocą wielokrotnego testu t Holma-Sidaka. U myszy z grupy złożonej odnotowano natomiast istotnie obniżoną, względem grupy

alternacyjnej, gęstość immunododatnich pod względem antygenu białka c-Fos jąder komórkowych w przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej (rRSA; 2494 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 567, P = 0,023, test wielokrotnych porównań Holma-Sidaka). Natomiast aktywność przedniej części kory retrosplenialnej granularnej oraz tylnej kory retrosplenialnej, wyrażona poziomem białka c-Fos, była porównywalna z poziomem uzyskanym w grupie alternacyjnej (rRSG: 4958 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1284; cRSA: 4114 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1426; cRSG: 4938 komórek/mm<sup>2</sup>, s.d. = 1464; Rycina 16).



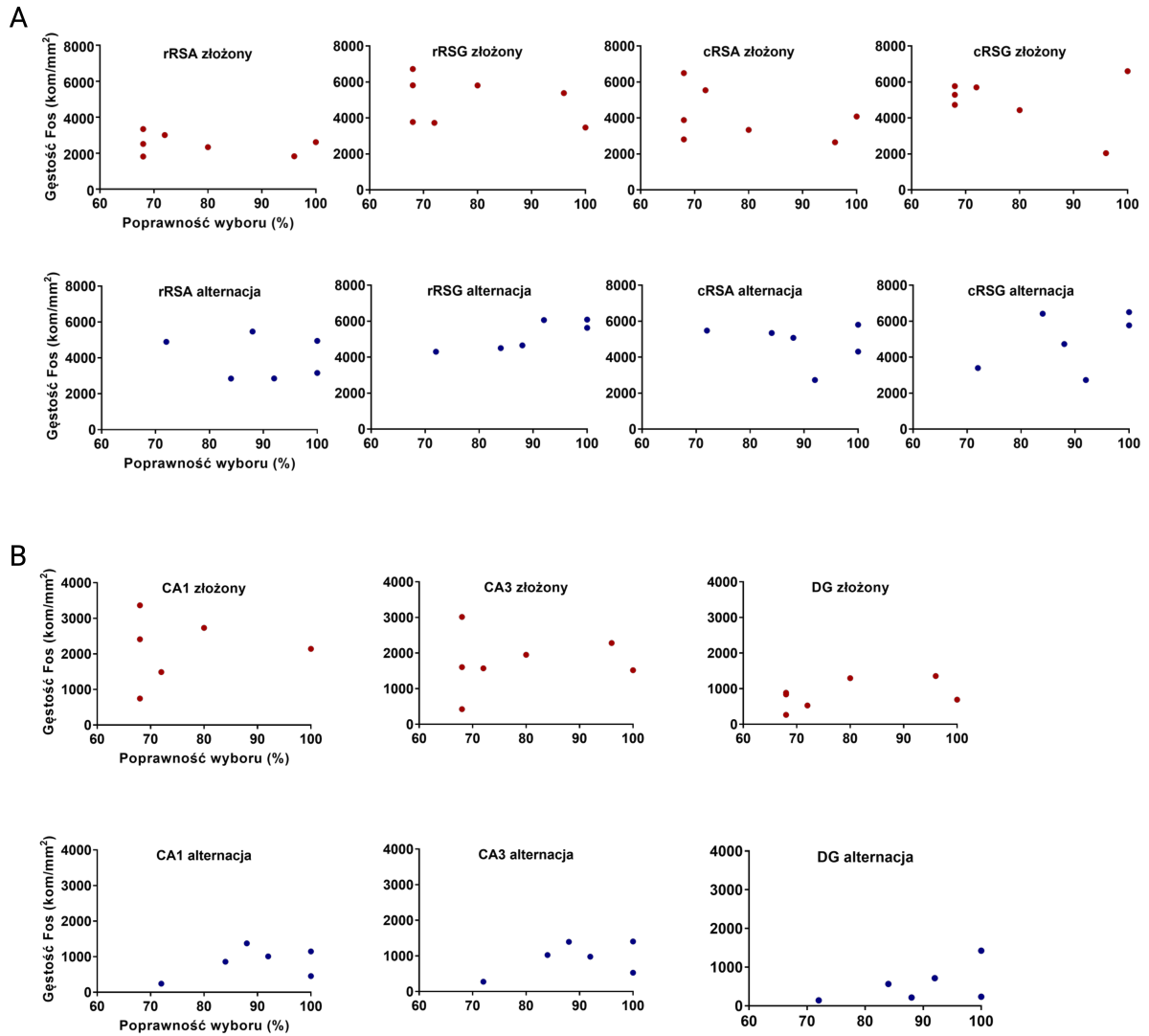
**Rycina 16.** Analiza średniej gęstości komórek immunoreaktywnych pod względem białka c-Fos w poszczególnych subrejonach kory retrosplenialnej dla dwóch badanych grup (Alternacja i Złożona). Gęstość przedstawiono jako liczba komórek c-Fos+ / mm<sup>2</sup> badanego obszaru. Poszczególne punkty danych przedstawiają gęstość komórek pozytywnych pod względem antygenu białka c-Fos dla indywidualnych zwierząt.

**(A)** Wpływ rodzaju przebytego treningu (alternacja, złożony) na poziom białka c-Fos w przedniej części kory retrosplenialnej (agranularnej, rRSA i granularnej, rRSG).

**(B)** Wpływ rodzaju przebytego treningu (alternacja, złożony) na poziom białka c-Fos w tylnej części kory retrosplenialnej (agranularnej, cRSA i granularnej, cRSG). Analiza ujawniła istotne statystycznie obniżenie poziomu białka c-Fos u myszy trenowanych według protokołu złożonego w przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej, rRSA ( $P = 0,023$ ), względem grupy Alternacja. Do analizy zastosowano wielokrotny test t Holma-Sidaka. Nie zaobserwowano istotnych różnic w rejonach tylnej kory retrosplenialnej.

Powyższa analiza ujawniła, że rodzaj zastosowanego schematu nabywania asocjacji pomiędzy wskazówką, a kierunkiem skrętu wpływa na zróżnicowanie aktywności, na poziomie molekularnym. Kluczowymi regionami wykazującymi istotną statystycznie różnicę w gęstości c-Fos-pozytywnych komórek okazały się grzbietowa część pola CA1 hipokampa oraz przednia część agranularnej kory retrosplenialnej. Uzyskane wyniki wskazują także na obecność gradientu aktywacji wzdłuż przednio-tylnej osi agranularnej kory retrosplenialnej, w zależności od rodzaju treningu przebytego przez myszy.

Dodatkowo w celu oceny, czy zaobserwowane reakcje behawioralne poszczególnych osobników są funkcjonalnie powiązane z aktywnością badanych struktur mózgowych (mierzoną poziomem białka c-Fos), zweryfikowano korelację między wynikami behawioralnymi, a poziomem białka c-Fos, we wszystkich analizowanych regionach mózgu (Rycina 17). Zdolność poszczególnych myszy do uczenia się przestrzennego, określana jako stopień opanowania zadania (wyrażony procentem poprawnych wyborów kierunku nawigacji zgodnych z prezentowanymi wskazówkami wizualnymi podczas testu), nie wykazywała istotnej korelacji z poziomem gęstości komórek dodatnich pod względem antygenu białka c-Fos u osobników z grupy Złożonej. Natomiast w grupie alternacyjnej opanowanie zadania podczas testu było silnie skorelowane z poziomem białka c-Fos w przedniej części granularnej kory retrosplenialnej, rRSG (korelacja Spearmana,  $r = 0,899$ ,  $p = 0,028$ ; Rycina 17A).

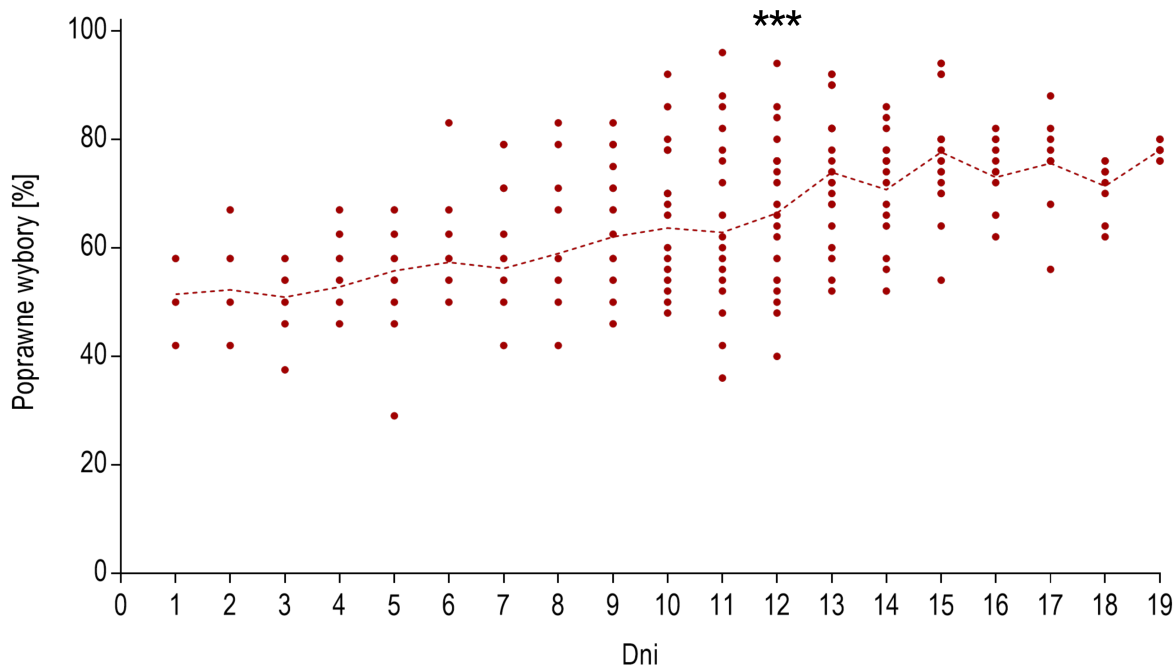


**Rycina 17.** Rycina przedstawia analizę korelacji pomiędzy poprawnością nawigacyjnych wyborów w teście (wyrażoną w procentach) i gęstością komórek immunododatnich pod względem obecności białka c-Fos w analizowanych korowych (**A**) i hipokampalnych (**B**) regionach mózgu. Poszczególne punkty danych określają wartości dotyczące indywidualnych osobników z danej grupy badanej (na niebiesko zaznaczono myszy z grupy alternacyjnej, a na czerwono myszy z grupy złożonej). Zależności analizowano z użyciem testu istotności korelacji rang Spearmana. Istotną korelację wykazano dla przedniej części granularnej kory retrosplenialnej (rRSG) myszy, które trenowały według protokołu alternacyjnego ( $r = 0,899$ , istotność statystyczna korelacji  $p = 0,028$ ).

## **7.4 Stworzenie paradygmatu behawioralnego uzależniającego nawigację zwierząt od prezentowanych bodźców wzrokowych**

W ramach eksperymentu 1, za pomocą treningu kontekstowego wykazano, że prezentowane globalne wskazówki zostały właściwie dobrane, co pozwoliło myszom na ich percepcję oraz utworzenie funkcjonalnego skojarzenia między wskazówką, a wyborem kierunku skrętu, niezależnie od siły wspierania tendencji alternacyjnej podczas nawigacji. Następnie podjęto próbę modyfikacji zadania behawioralnego w celu rozszerzenia możliwości analizy zależności procesu nawigacji od postrzeganych bodźców. Zmiana ta miała na celu dostosowanie paradygmatu do odpowiednich manipulacji eksperymentalnych, umożliwiających szczegółowe badanie mechanizmów neuronalnych leżących u podstaw pamięci przestrzennej. Kluczowym aspektem było opracowanie protokołu treningowego, który umożliwiał sukcesywne przyswajanie różnorodnych bodźców wizualnych, w celu uzyskania pełnej zależności nawigacji każdego badanego zwierzęcia od przestrzennych wskazówek kontekstowych (Rycina 8). Różnorodność bodźców wizualnych osiągnięto przez wprowadzenie dodatkowych, wyróżniające się na tle kontekstu, odrębnych punktów odniesienia, co opisano w rozdziale Materiały i metody- podsekcja 6.9.8.

Dzięki temu, że schemat protokołu umożliwiał systematyczną ocenę uzależnienia decyzji o wyborze ramienia od prezentowanych wskazówek, możliwe było dostosowanie długości treningu do indywidualnych potrzeb badanych osobników, co w konsekwencji umożliwiło osiągnięcie pożądanej asocjacji. Jako kryterium zastosowano uzyskanie minimum 75% średniej poprawności wyborów w ciągu 3 następujących po sobie dni. Stosując trening oparty o zróżnicowane bodźce wzrokowe przetestowano grupę 24 myszy, z czego dwie wykluczono w czasie trwania treningu z przyczyn niezależnych od eksperymentatora ( $n = 22$ ). Maksymalny czas trwania treningu wynosił 19 dni (dla 9 osobników), a najkrótszy czas osiągnięcia kryterium wynosił 13 dni (dla 5 osobników). Na rycinie 18 przedstawiono krzywą uczenia się zwierząt w zależności od czasu trwania treningu. Analiza przeprowadzona testem ANOVA w układzie dwuczynnikowym z powtarzаныmi pomiarami, wykazała statystycznie istotne efekty dla 12 dnia treningu. Stanowiąc go punktem istotnego wzrostu liczby poprawnych decyzji w populacji badanych zwierząt.

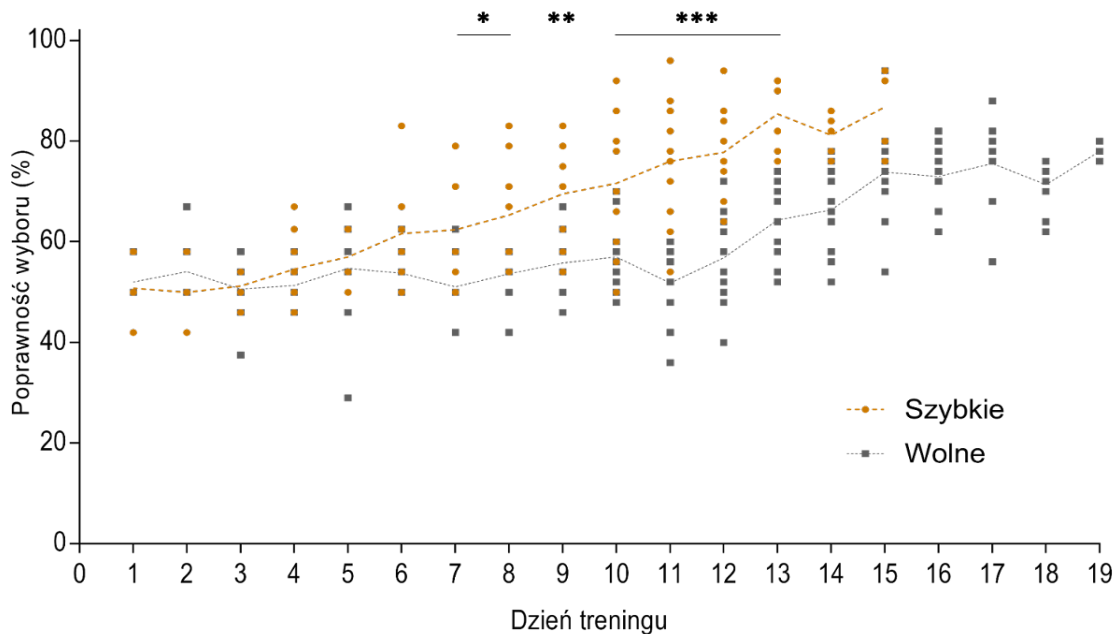


**Rycina 18.** Wykres ilustrujący krzywą uczenia się zwierząt nawigacji opartej o prezentowane zestawy wskazówek przestrzennych. Poszczególne punkty danych reprezentują procent poprawnych wyborów (zgodnych z bodźcami wizualnymi), dla poszczególnych zwierząt w ramach kolejnych dni treningu. Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z powtarzaniem pomiarów wykazała silny efekt dla 12 dnia treningu, wskazując na jego przełomowy charakter w procesie uczenia się badanej populacji myszy  $F(12, 240) = 22,95$ . Istotność na poziomie  $***P < 0,0001$  wskazuje na to, że zmiany poprawności dokonywanych wyborów pomiędzy kolejnymi dniami treningu są statystycznie znaczące.

Biorąc pod uwagę profil uzyskanej krzywej uczenia się (Rycina 18), zaobserwowano, że wyniki poprawności podejmowanych decyzji w kolejnych dniach treningu odbiegają od charakterystyki typowej dla rozkładu Gaussa, wykazując cechy zbliżone do rozkładu wielomodalnego. Taki rozkład sugeruje obecność zróżnicowanych podgrup wśród badanych zwierząt, różniących się dynamiką uczenia się. W związku z tym, jak również na podstawie obserwacji indywidualnego przebiegu procesu treningu u poszczególnych osobników, przeprowadzono szczegółową analizę dynamiki procesu uczenia się w celu identyfikacji potencjalnych wzorców lub różnic w skuteczności nawigacji opartej na wskazówkach przestrzennych. Analiza rozkładu dynamiki procesu uczenia się zwierząt do osiągnięcia kryterium (definiowanego jako zależność wyboru kierunku nawigacji od prezentowanego zestawu wskazówek) pozwoliła na wyodrębnienie dwóch naturalnych modeli uczenia

się zwierząt: szybkiego i wolnego. Przeprowadzono podział bimodalny, dzieląc próbę na dwie grupy odpowiadające dwóm dominującym wartościom. W analizie uwzględniono dane z dni treningowych 1–13, w których dostępna była pełna badana grupa zwierząt. Po zakończeniu tego okresu część osobników osiągnęła kryterium pożądanego efektu nawigacyjnego, co skutkowało ich przejściem do kolejnej fazy eksperymentu – testów oceniających zdolność do wykorzystania wskazówek przestrzennych w procesie nawigacji.

W ciągu pierwszych czterech dni treningu myszy z obu grup wykazywały zbliżone średnie wartości poprawności wyborów nawigacyjnych (Rycina 19). Od 5 dnia treningu można zauważyć subtelne wyodrębnienie dwóch modeli uczenia się zwierząt. Począwszy od siódmego dnia treningu, aż do końca trwania procedury, analiza poprawności wyborów wykazała statystycznie istotne różnice między grupami. Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami wskazała na niemal równoliczny podział badanych zwierząt na dwie grupy, różniące się dynamiką uczenia się. Zwierzęta, które osiągnęły co najmniej 75% poprawnych wyborów przez trzy kolejne dni w krótszym czasie, charakteryzowały się jednocześnie wyższym odsetkiem poprawnych reakcji nawigacyjnych i zostały sklasyfikowane jako „szybkie”. Natomiast zwierzęta wykazujące wolniejszą dynamikę uczenia się określono jako „wolne”. Cechowało je bardziej jednostajne tempo oraz dłuższy czas potrzebny do spełnienia kryterium asocjacyjnego. Krzywa uczenia się tej grupy charakteryzowała się mniejszym nachyleniem i większą długością. Spośród 22 badanych zwierząt dziesięć wykazało szybki model uczenia się, a dwanaście należało do grupy „wolne”. Analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów w układzie dwuczynnikowym (grupa: szybkie, wolne × czas: dni 1–13) wykazała istotne efekty dla: grupy:  $F(1, 20) = 39,38$ ,  $P < 0,0001$ ; czasu:  $F(12, 240) = 22,95$ ,  $P < 0,0001$ ; interakcji  $F(12, 240) = 9,438$ ,  $P < 0,000$ ; i dopasowania  $F(20, 240) = 3,505$ ,  $P < 0,0001$ . Przeprowadzona analiza *post hoc* (test wielokrotny Holma-Sidaka) ujawniła istotne różnice w poprawności wyborów między modelami dla następujących dni treningu: dzień 7 ( $P = 0,0073^*$ , 95% CI = 1,895\_20,82), dzień 8 ( $P = 0,005^*$ , 95% CI = 2,17\_21,1), dzień 9 ( $P = 0,0004^{**}$ , 95% CI = 4,245\_23,17), dzień 10 ( $P = 0,0001^{***}$ , 95% CI = 5,137\_24,06), dzień 11 ( $P = < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 14,7\_33,63), dzień 12 ( $P = < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 11,5\_30,43) oraz dzień 13 ( $P = < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 11,6\_30,53). Wyniki te zostały zilustrowane na rycinie 19, przedstawiając różnice w krzywych uczenia się między wyróżnionymi grupami.



**Rycina 19.** Wykres przedstawiający krzywe uczenia się nawigacji opartej o prezentowane zestawy wskazówek, dla dwóch wyróżnionych modeli dynamiki uczenia się zwierząt: „szybkiego” (n = 10) oraz „wolnego” (n = 12). Oś Y przedstawia średni procent poprawnych wyborów nawigacyjnych (zgodnych z zestawem wskazówek), natomiast oś X reprezentuje kolejne dni treningu (od dnia 1 do dnia 13). Linie przerywane wskazują średnie wartości poprawności wyborów dla każdej z grup, a punkty danych przedstawiają poprawność wyborów poszczególnych badanych osobników. Od 7 dnia treningu widoczne są statystycznie istotne różnice między grupami, co zostało potwierdzone dwuczynnikową analizą wariancji (ANOVA) oraz analizą post hoc (Holma-Sidak). Zwierzęta z grupy "szybkiej" wykazują gwałtowny wzrost poprawności podejmowanych decyzji, osiągając poziom co najmniej 75% trafnych wyborów w krótszym czasie, w przeciwieństwie do grupy "wolnej", charakteryzującej się bardziej równomiernym tempem uczenia się i wydłużonym okresem treningowym. Punkty oznaczające istotne różnice między grupami zaznaczono gwiazdkami (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

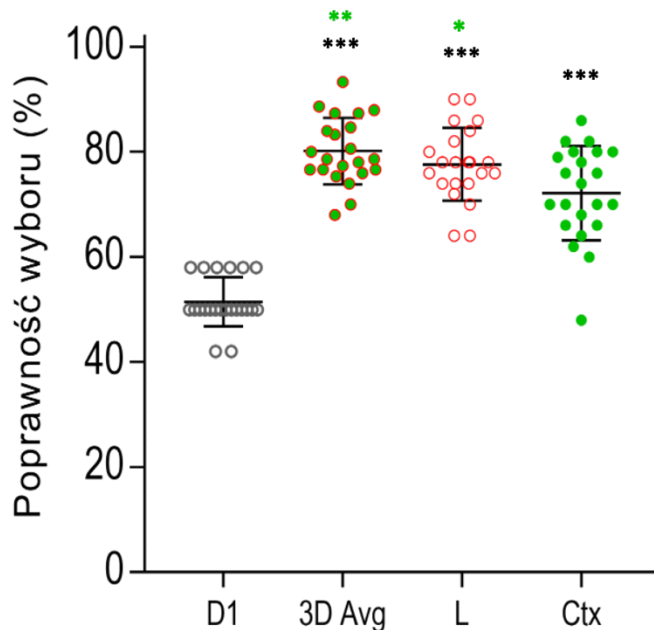
## 7.5 Analiza wykorzystania zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji w labiryncie

Następnie w celu oceny zdolności myszy do rozróżniania poszczególnych wskazówek – kontekstowej (Ctx) oraz indywidualnej (L) – pomimo utrwalonych skojarzeń sensomotorycznych z dotychczas prezentowanym zestawem obu wskazówek jednocześnie, a także w celu ustalenia czy któraś z nich wywiera dominujący wpływ na proces nawigacji, przeprowadzono dedykowany test (Rycina 8A). Procedurę testową rozpoczęto po osiągnięciu przez myszy wyznaczonego kryterium skutecznej nawigacji, zgodnej z wyświetlanymi wskazówkami. Test obejmował dwa kolejne dni, w każdym dostępny był wyłącznie jeden rodzaj wskazówek przestrzennych (kontekstowe lub indywidualne). Taki schemat umożliwił zbadanie zależności między poziomem złożoności wskazówki, a zdolnością myszy do skutecznej nawigacji opartej na jej interpretacji. Szczegóły procedury testowej zostały opisane w rozdziale Materiały i metody, w podsekcji 6.9.9.

W celu wyeliminowania wpływu kolejności ekspozycji na pojedynczy typ prezentowanej wskazówki myszy zostały losowo podzielone na dwie grupy. W pierwszej grupie w pierwszym dniu testu prezentowano wskazówkę kontekstową (Ctx), a w drugim indywidualną (L). W drugiej grupie kolejność dostępności wskazówek została odwrócona. Wyniki testu dla każdej grupy przedstawiono na rycinie 20, jako procent decyzji zgodnych z aktualnie dostępną wskazówką wizualną, w stosunku do wszystkich podjętych wyborów (procent poprawnych decyzji). W celu oceny efektywności przeprowadzonego treningu na proces uczenia się myszy, dokonano porównania średniego odsetka poprawnych wyborów osiągniętych przez zwierzęta w początkowym stadium procedury, gdy skojarzenia sensomotoryczne nie zostały jeszcze wykształcone (dzień pierwszy, D1, Rycina 20), z wynikami osiągniętymi na końcowym etapie nawigacji opartej na zasocjowanych zestawach bodźców wzrokowych (jako średnia 3 ostatnich dni poprawności podejmowanych decyzji, na minimalnym poziomie 75% w każdym dniu, Ctx+L). Statystycznie istotna różnica (efekt D1 vs Ctx+L:  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = -32,5\_-24,89), uzyskana w powyższej analizie potwierdza skuteczność zastosowanego schematu treningowego, wskazując na jego odpowiednie zaprojektowanie i zdolność do efektywnego wspierania procesu uczenia się. Analizę danych przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem czynników dostępności wskazówek oraz indywidualnych różnic między osobnikami. Aby zidentyfikować różnice między zdefiniowanymi warunkami, przeprowadzono test najmniej istotnej różnicy

(LSD) Fishera bez korekcji wielokrotności. Zdolność myszy do postrzegania każdej ze wskazówek w sposób indywidualny udowodniono za pomocą sukcesu wykonania zadania nawigacyjnego w teście z dostępnością pojedynczych wskazówek. Szczególnie silne różnice zaobserwowano pomiędzy ilością poprawnych wyborów kierunku nawigacji w pierwszym dniu treningu, a dostępnością wyłącznie wskazówki kontekstowej w teście (efekt D1 vs Ctx:  $P < 0,0001$ , 95% CI = -24,51\_-16,86) oraz wyłącznie wskazówki indywidualnej w teście (efekt D1 vs L:  $P < 0,0001$ , 95% CI = -29,45\_-22,91). Analiza ujawniła dominujący wpływ wskazówki indywidualnej, co przejawiało się nieco wyższym odsetkiem poprawnych wyborów, gdy myszy opierały się wyłącznie na tym rodzaju wskazówki, w porównaniu do sytuacji, w której wykorzystywały jedynie kontekst. Zaobserwowany efekt uzyskał istotność statystyczną po uwzględnieniu testu najmniej istotnej różnicy (LSD) Fishera (L vs Ctx:  $P = 0,0177^*$ , 95% CI = 1,054\_9,946). W związku z tym, uzasadniona jest interpretacja, że oba typy wskazówek – indywidualna i kontekstowa – są postrzegane przez myszy jako wystarczające do efektywnego wykorzystania do poprawnej nawigacji, przy czym wskazówka kontekstowa odgrywa mniej istotną rolę w procesie decyzyjnym.

Uzyskane wyniki wskazują, że myszy są zdolne do pełnego uzależnienia podejmowanych decyzji nawigacyjnych od wskazówek przestrzennych prezentowanych podczas treningu. Pomimo każdorazowej ekspozycji na zestawy wskazówek zdefiniowane dla określonych kierunków skrętu, test wykazał, że myszy potrafią funkcjonalnie rozróżniać i postrzegać każdy typ wskazówki osobno. Porównanie odsetka poprawnych decyzji, w warunkach wybiórczej dostępności danego typu wskazówki, ze średnim odsetkiem poprawnych decyzji odnotowanym podczas ostatnich trzech dni treningu (w których myszy osiągnęły kryterium asocjacji zestawu wskazówek), wskazuje na istotnie statystycznie niższy odsetek poprawnych reakcji nawigacyjnych w przypadku dostępności wyłącznie wskazówki kontekstowej (efekt Ctx+L vs Ctx:  $P = 0,0015$ , 95% CI = 3,43\_12,6) oraz brak znaczącego wpływu dostępności jedynie wskazówki indywidualnej (efekt Ctx+L vs L:  $P = 0,1024$  (ns), 95% CI = -0,5471\_5,577). Wyniki sugerują, że zarówno pełny zestaw wskazówek, jak i każdy z ich typów wybiórczo (kontekstowe oraz indywidualne), są wystarczające do efektywnego wykorzystania do nawigacji, osiągnięcia kryterium asocjacji, przy czym percepcja wyłącznie wskazówki kontekstowej skutkuje nieznacznym obniżeniem odsetku poprawnych decyzji wyboru kierunku, przy zachowaniu istotności statystycznej sukcesu nawigacyjnego.



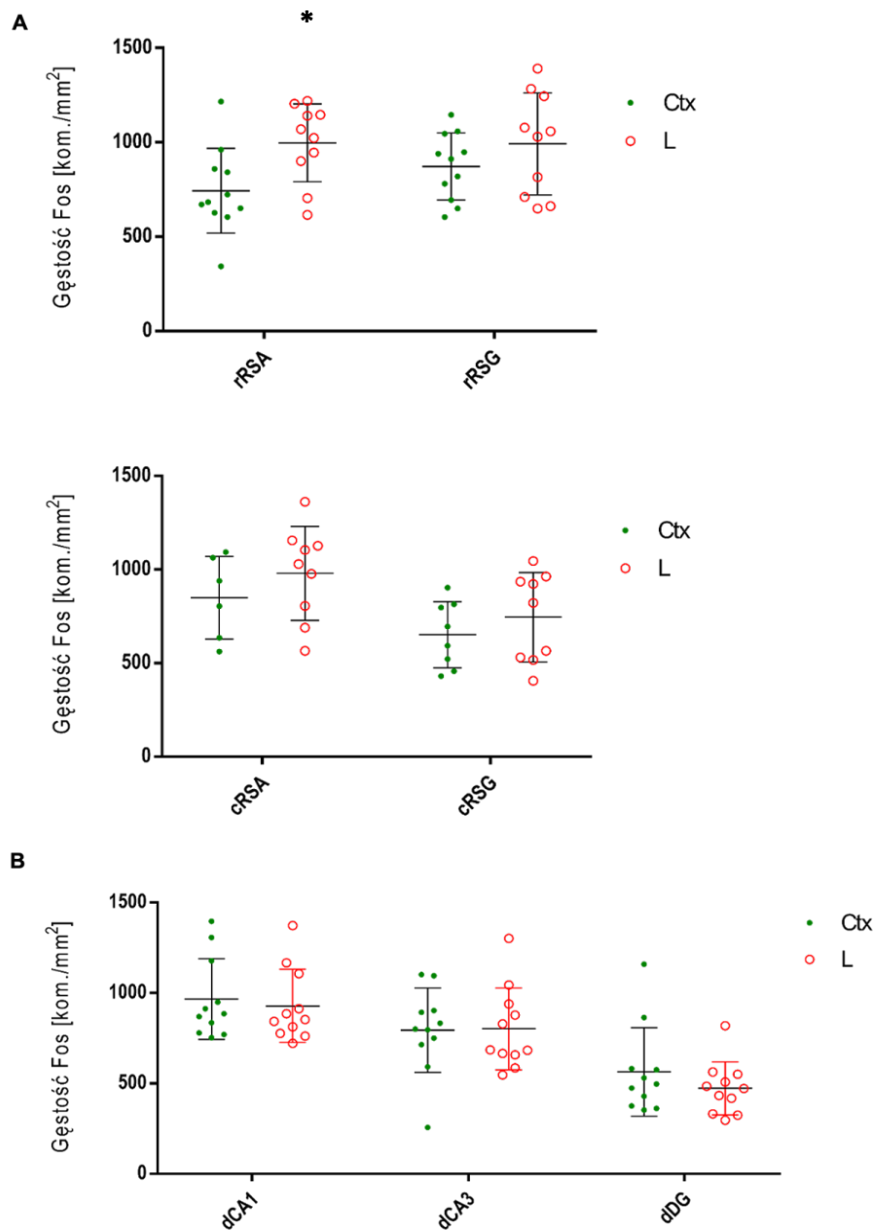
**Rycina 20.** Wykres przedstawiający wyniki dwóch dni testu z wybiórczą dostępnością jednego typu wskazówki: indywidualnej (L) bądź kontekstowej (Ctx). Punkty danych przedstawiają procent decyzji myszy zgodnych z dostępnymi wskazówkami. W celu szczegółowej analizy postrzegania konkretnego typu wskazówki dane porównano również z wyjściowym poziomem poprawności nawigacyjnej zwierząt (D1) oraz momentem osiągnięcia pełnej zależności podejmowanych wyborów od prezentowanego zestawu wskazówek (Ctx+L) - średnia z ostatnich 3 dni treningu. Punkty danych przedstawiają procent decyzji myszy zgodnych z wyświetlanym kontekstem. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z testem (LSD) Fishera. Punkty oznaczające istotne różnice między grupami oznaczono gwiazdkami (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ ).

Następnie w celu oceny zaangażowania poszczególnych regionów zainteresowania podczas percepcji określonego typu wskazówki przestrzennej – kontekstowej (Ctx) lub indywidualnej (L) – porównano poziomy białka c-Fos w odpowiednich obszarach mózgu. Analiza została przeprowadzona na grupach myszy, które w drugim dniu testu nawigowały w oparciu o dostępność wyłącznie wskazówki kontekstowej lub indywidualnej. Takie podejście umożliwiło ocenę aktywności neuronalnej związanej z przetwarzaniem specyficznych typów wskazówek przestrzennych. W analizie uwzględniono grzbietową część hipokampa (dCA1, dCA3 i dDG) oraz dwie płaszczyzny kory retrosplenialnej: przednią i tylną

(rRSC i cRSC) z podziałem na część granularną i agranularną, jak opisano w rozdziale Materiały i metody - podsekcja 6.5.1.

Do analizy danych wykorzystano test t Studenta dla dwóch niezależnych próbek, co pozwoliło na porównanie średnich gęstości komórek c-Fos pozytywnych pomiędzy dwiema grupami. Wyniki zostały dostosowane za pomocą korekcji wielokrotnych porównań przy użyciu wielokrotnego testu t Holma-Sidaka. Analiza wykazała istotne różnice w aktywności przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej podczas wybiórczej dostępności poszczególnych typów wskazówek (Rycina 21A). Gęstość immunododatnich pod względem antygeny białka c-Fos jąder komórkowych w rRSA była istotnie statystycznie wyższa u myszy nawigujących na podstawie wskazówki indywidualnej (L) w stosunku do grupy myszy używających wskazówki kontekstowej (Ctx) (Ctx: 743,5 komórek/mm<sup>2</sup>, L: 996,5 komórek/mm<sup>2</sup>, SE = 94,46, skorygowane P = 0,029, test wielokrotny Holma-Sidaka). Podobny trend zaobserwowano w przypadku przedniej granularnej części kory retrosplenialnej, gdzie gęstość c-Fos była wyższa w grupie podejmującej decyzje na podstawie indywidualnego punktu odniesienia (L: 992,1 komórek/mm<sup>2</sup>), w porównaniu z nawigacją na podstawie globalnych wskazówek kontekstowych (Ctx: 872,3 komórek/mm<sup>2</sup>), jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej po uwzględnieniu korekcji wielokrotnej (skorygowane P = 0,24, test wielokrotny Holma-Sidaka). W obszarach tylnej kory retrosplenialnej cRSA i cRSG również nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomach gęstości komórek c-Fos pozytywnych pomiędzy grupami (P > 0,05). Analiza wykazała natomiast istotną różnicę w obrębie granularnej kory retrosplenialnej wzdłuż osi przednio-tylnej, w grupie myszy, która podejmowała decyzje dotyczące kierunku skrętu w labiryncie T na podstawie wskazówki kontekstowej. W tym przypadku średnia gęstość komórek c-Fos pozytywnych wynosiła 872,3 komórek/mm<sup>2</sup> w rostralnej części granularnej kory retrosplenialnej (rRSG) oraz 651,4 komórek/mm<sup>2</sup> w kaudalnej części granularnej kory retrosplenialnej (cRSG), z SE = 82,48 i skorygowanym P = 0,031. Wyniki te wskazują na zróżnicowaną aktywację neuronalną wzdłuż osi przednio-tylnej w obrębie granularnej kory retrosplenialnej w warunkach percepcji wskazówki kontekstowej.

W przypadku analizy grzbietowej części hipokampa nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami z dostępnością tylko jednego typu wskazówki: dCA1 (Ctx: 967,4 komórek/mm<sup>2</sup>, L: 928,6 komórek/mm<sup>2</sup>, SE = 90,89, skorygowane P > 0,05), dCA3 (Ctx: 794,2 komórek/mm<sup>2</sup>, L: 801,8 komórek/mm<sup>2</sup>, SE = 98,14, skorygowane P > 0,05), dDG (Ctx: 563,8 komórek/mm<sup>2</sup>, L: 472,8 komórek/mm<sup>2</sup>, SE = 85,89, skorygowane P > 0,05, Rycina 21B).



**Rycina 21.** Analiza gęstości komórek immunoreaktywnych pod względem białka c-Fos dla dwóch badanych grup myszy, nawigujących na podstawie selektywnej dostępności jednego typu wskazówki przestrzennej (kontekstowej, Ctx lub indywidualnej, L), w poszczególnych rejonach zainteresowania (na podstawie danych z testu II).

**(A)** Wpływ rodzaju przebytego testu (kontekst, landmark) na poziom białka c-Fos w badanych subrejonach kory retrosplenialnej (rRSA, rRSG, cRSA, cRSG).

**(B)** Wpływ rodzaju przebytego testu (kontekst, landmark) na poziom białka c-Fos w poszczególnych subrejonach grzbietowej części hipokampa (dCA1, dCA3, dDG).

Gęstość przedstawiono jako liczba komórek c-Fos+/mm<sup>2</sup> badanego obszaru. Analiza ujawniła istotne statystycznie obniżenie poziomu białka c-Fos u myszy testowanych w obecności wyłącznie wskazówki kontekstowej, w przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej, rRSA ( $P = 0,029$ ), względem grupy z dostępną wskazówką indywidualną. Do analizy zastosowano wielokrotny test t Holma-Sidaka. Nie zaobserwowano istotnych różnic w rejonach tylnej kory retrosplenialnej ani rejonach grzbietowej części hipokampa.

## **7.6 Analiza wpływu inaktywacji kory retrosplenialnej na nawigację opartą o zestaw znanych wskazówek przestrzennych bądź o wybiórczą dostępność jednego typu wskazówki.**

Zaprezentowane w poprzednich rozdziałach analizy potwierdziły zdolność myszy do skutecznej nawigacji w labiryncie T, zarówno w warunkach prezentacji pełnego zestawu wskazówek, jak i przy ograniczonej dostępności pojedynczego typu wskazówki (kontekstowej lub indywidualnej). Aby dokładnie zbadać rolę kory retrosplenialnej w procesach nawigacji opartych na znanych bodźcach wzrokowych, zastosowano jej czasową inaktywację w poszczególnych dniach testowych. Taka procedura miała umożliwić ocenę wpływu dezaktywacji tej struktury na zdolność zwierząt do podejmowania decyzji nawigacyjnych w oparciu o wcześniej wyuczone wskazówki wizualne. W celu wyciszenia aktywności kory retrosplenialnej wykorzystano chemogenetyczny system modulacji aktywności neuronalnej (DREADDs), zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale Materiały i metody - podsekcja 6.2.

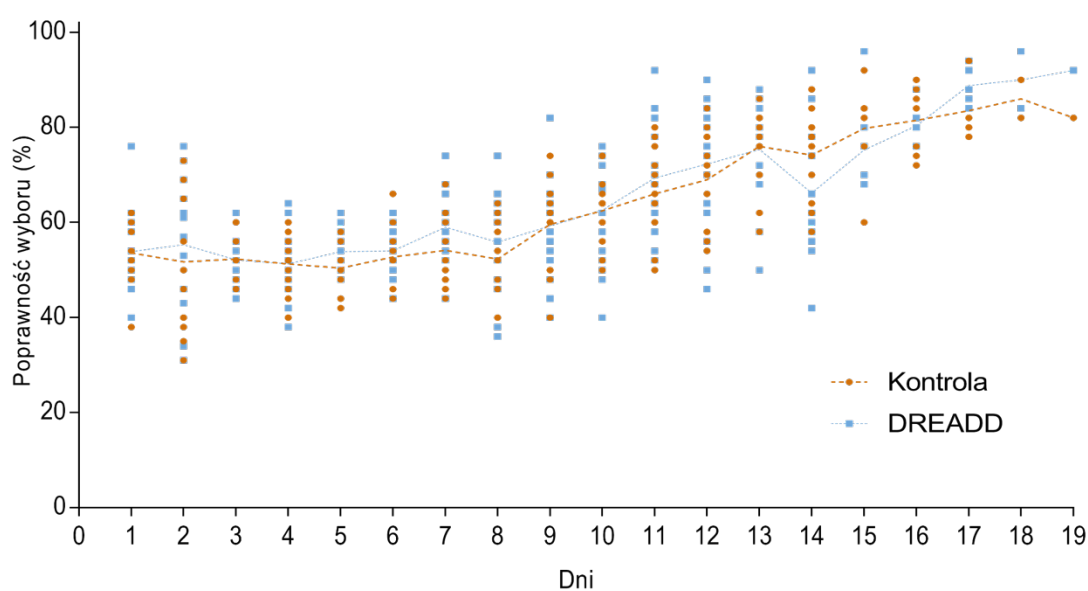
Jako schemat nauki skojarzenia bodźców wzrokowych z wyborem kierunku skrętu zastosowano procedurę treningową opartą na zróżnicowanych bodźcach wzrokowych, zgodnie z opisem zawartym w rozdziale Materiały i metody, podsekcja 6.9.8. Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystano grupę 30 zwierząt ( $n = 30$ ), które zostały przydzielone odpowiednio do:

- grupy eksperymentalnej (DREADD),  $n = 16$  (hM4D(Gi) + JU60)
- grupy kontrolnej 1,  $n = 6$  (hM4D(Gi) + NaCl)
- grupy kontrolnej 2,  $n = 8$  (mcherry + JU60)

Grupa eksperymentalna charakteryzowała się obecnością receptora hM4D(Gi) w korze retrosplenialnej oraz iniekcją jego agonisty (JU60) w trakcie procedury treningowej. Grupy kontrolne cechowała obecność receptora hM4D(Gi), bądź białka czerwonej fluorescencji, mcherry w RSC i iniekcja odpowiednio wodnego roztworu chlorku sodu (NaCl, o stężeniu 0,9%), bądź liganda JU60. W celu kontroli potencjalnych efektów związanych z manipulacją farmakologiczną, wywołaną ogólnoustrojowym podaniem agonisty oraz wprowadzeniem receptora DREADDowego do RSC, zastosowano dwie, powyższe grupy kontrolne (1 i 2). Zwierzęta z grup kontrolnych 1 i 2 traktowano jednak jako jednolitą grupą kontrolną na

potrzeby całego przebiegu eksperymentu (poza charakterystyką iniekcji) oraz przeprowadzonych analiz.

Wyniki poprawności decyzji nawigacyjnych (zgodnych z prezentowanymi wskazówkami), podejmowanych przez myszy w trakcie kolejnych dni treningu, a tym samym dynamika procesu uczenia się myszy, zostały przedstawione w formie krzywej uczenia się (Rycina 22). Krzywa ta ilustruje średnią wartość poprawnych wyborów dla wszystkich osobników w danej grupie zwierząt, a punkty danych przedstawiają poprawność wyborów poszczególnych zwierząt w ramach kolejnych dni treningów. Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów (grupa: DREADD, kontrola  $\times$  czas: dni 1–12) nie wykazała istotnych statystycznie różnic w przebiegu treningu pomiędzy badanymi grupami, co stanowiło oczekiwany rezultat. Zbliżona dynamika uczenia się badanych grup zwierząt jest również zgodna z przebiegiem treningu opisanego w eksperymencie 2 (Rycina 18). Spójne powtarzanie się wyników podkreśla wiarygodność opracowanego paradygmatu behawioralnego oraz jego stabilność w różnych warunkach eksperymentalnych.

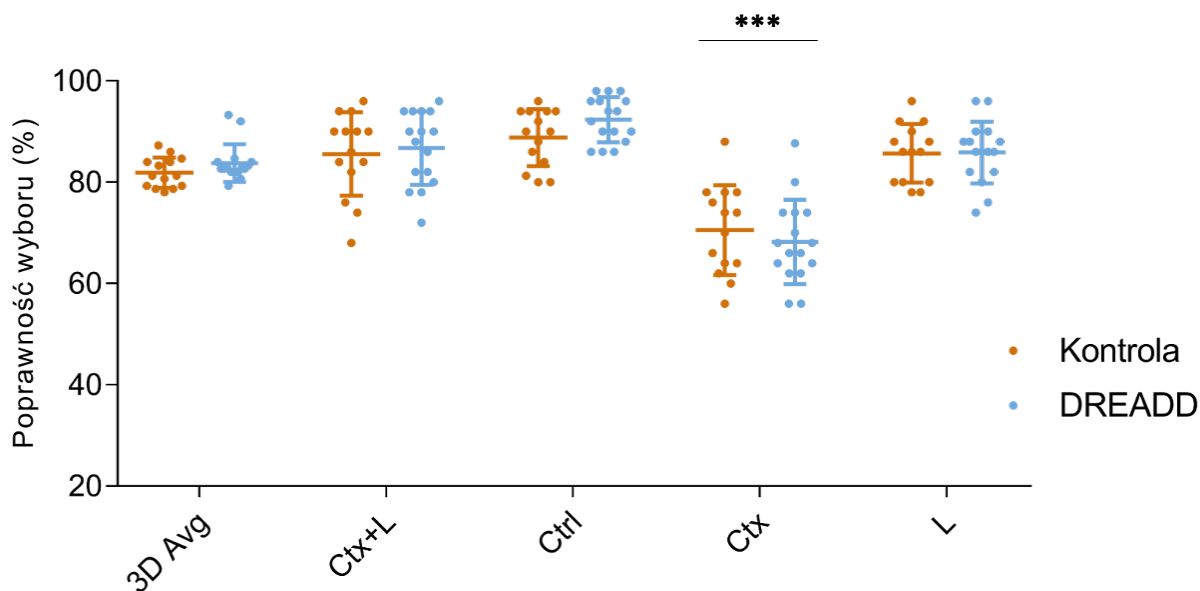


**Rycina 22.** Wykres przedstawiający krzywe uczenia się nawigacji opartej o prezentowane zestawy wskazówek, dla badanych grup zwierząt (DREADD i Kontrola). Poszczególne punkty danych reprezentują procent poprawnych wyborów (zgodnych z bodźcami wizualnymi), dla poszczególnych zwierząt w ramach kolejnych dni treningu, a linie przerywane przedstawiają uśredniony odsetek poprawnych wyborów dla każdej z badanych grup. Analizę danych przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), która nie wykazała istotnych różnic w przebiegu treningu pomiędzy badanymi grupami.

Procedurę testową rozpoczęto po osiągnięciu przez myszy kryterium skutecznej nawigacji, definiowanego jako średnią co najmniej 75% poprawnych wyborów przez trzy kolejne dni treningu. Test obejmował trzy dni z różną dostępnością wskazówek przestrzennych: pełny zestaw wskazówek w teście I, wskazówki kontekstowe w teście II oraz wskazówki indywidualne w teście III (Rycina 9). Adekwatnie do eksperymentu 2, myszy z każdej grupy (DREADD i Kontrola) zostały losowo przydzielone do dwóch podgrup. W pierwszej podgrupie podczas testu II prezentowano wskazówkę kontekstową (Ctx), a w teście III wskazówkę indywidualną (L). W drugiej podgrupie kolejność testów została odwrócona. Taki schemat eksperymentalny pozwolił na wyeliminowanie potencjalnych efektów wynikających z kolejności ekspozycji na dany typ wskazówki, co zwiększyło wiarygodność oraz obiektywność uzyskanych wyników. W celu wykluczenia potencjalnego zakłócającego wpływu inaktywacji kory retrosplenialnej na percepcję wskazówek wzrokowych w dniu następującym po jej czasowym wyłączeniu, pomiędzy testem I, a testami II i III wprowadzono dodatkowy dzień treningu, realizowany bez zastosowania inaktywacji kory retrosplenialnej. Taki zabieg umożliwił ocenę wpływu procedury inaktywacji na procesy percepcyjne i decyzyjne zwierząt w kontrolowanych warunkach treningowych. 30 minut przed rozpoczęciem procedury nawigacyjnej w każdym dniu testu (I, II i III), podawano dootrzewnowo agonistę receptorów DREADDs, JU60 [dawka: 0,5mg/ kg m.c.] w celu wywołania selektywnej inaktywacji kory retrosplenialnej, bądź iniekcję roztworu soli fizjologicznej (NaCl, 0,9%), w dostosowanej do dawki JU60 objętości. Szczegółowy opis procedury testowej znajduje się w rozdziale Materiały i metody, w podsekcji 6.9.10.

Wyniki testu dla każdej grupy (DREADD i Kontrolnej), przedstawiono na rycinie 23, jako procent decyzji zgodnych z aktualnie dostępnymi wskazówkami wizualnymi, w stosunku do wszystkich podjętych wyborów. Adekwatnie do opisanej procedury testu, na wykresie pokazano również średni odsetek poprawności wyborów nawigacyjnych, z ostatnich 3 dni treningu (kiedy zwierzęta wykształciły asocjację zestawów bodźców wzrokowych z kierunkiem, 3DAvg) oraz uśrednioną wartość poprawnych wyborów w dniu treningu przestrzennego, przeprowadzonego pomiędzy testem I, a testami II i III (Ctrl). Punkty danych przedstawiają procent decyzji myszy zgodnych z dostępnymi wskazówkami. Analizę danych przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), która wykazała brak istotnych różnic w poprawności podejmowanych decyzji pomiędzy badanymi grupami (DREADD i Kontrolną,  $F(1, 28) = 0,4895$ ,  $P = 0,4899$ ). Brak wpływu inaktywacji kory retrosplenialnej odnotowano zarówno w teście I - z dostępnością zestawu wskazówek

wizualnych (Ctx+L), jak również w testach II i III - z dostępnością wybiórczych typów wskazówek (Ctx bądź L). Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupą DREADD, a kontrolą w całej procedurze testowej, co sugeruje, że inaktywacja kory retrosplenialnej nie wpływała znacząco na percepcję wskazówek przestrzennych w globalnym ujęciu. Przeprowadzona analiza post hoc z zastosowaniem testu porównań wielokrotnych Bonferroniego znacząco potwierdziła dane uzyskane w eksperymencie 2. Wyniki wskazują na to, że myszy nawigują zależnie od prezentowanych wskazówek wizualnych. Pełny zestaw wskazówek (Ctx+L) przynosił najlepsze wyniki nawigacyjne, test I. Wybiórcza obecność wskazówki kontekstowej wpływa na istotnie niższy odsetek poprawnych wyborów nawigacyjnych zarówno w porównaniu z obecnością wyłącznie wskazówki indywidualnej (Ctx vs L:  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = -21,67\_ -8,619 (Kontrola),  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = -23,75\_ -11,54 (DREADD)), jak również z obecnością obu typów wskazówek (Ctx+L vs Ctx:  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 8,476\_ 21,52 (Kontrola),  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 12,42\_ 24,62 (DREADD)). Procent decyzji myszy zgodnych z prezentowaną wyłącznie wskazówką kontekstową był również istotnie statystycznie niższy w porównaniu z wynikami pojedynczego dnia treningu (Ctrl), przeprowadzonego między testem I, a testami II i III (Ctrl vs Ctx:  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 11,71\_ 24,76 (Kontrola),  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 18,04\_ 30,25 (DREADD)) oraz w porównaniu do średniego odsetka poprawności wyborów nawigacyjnych, z ostatnich 3 dni treningu (3D Avg vs. Ctx  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 4,807\_ 17,85 (Kontrola),  $P < 0,0001^{***}$ , 95% CI = 9,458\_ 21,66 (DREADD)). W każdym z powyższych przykładów nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą eksperymentalną, a grupą kontrolną, co wskazuje na rzeczywisty brak efektu inaktywacji RSC.



**Rycina 23.** Efekt inaktywacji kory retrosplenialnej na poprawność wyborów w zadaniu nawigacyjnym z obecnością znanego zestawu wskazówek (Ctx+L) oraz z wybiórczą dostępnością jednego typu wskazówki: kontekstowej (Ctx) bądź indywidualnej (L). DREADD: myszy z ekspresją receptora DREADD i traktowane agonistą JU60. Kontrola: myszy bez ekspresji DREADD lub bez iniekcji JU60 (grupa łączona). Punkty danych przedstawiają procent decyzji myszy zgodnych z dostępnymi wskazówkami. 3DAvg: średnia z ostatnich 3 dni treningu. Ctrl: średnia wartość poprawnych wyborów w dniu pojedynczego treningu przestrzennego pomiędzy testem I, a testami II i III. Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Bonferroniego. Znaczniki istotności statystycznej  $***P < 0,0001$  na wykresie wskazują poziom istotności porównań. Wybiórcza dostępność wskazówki kontekstowej wykazała istotność statystyczną z każdym porównywalnym wariantem poprawności wyborów.

Powyższa analiza stanowi gruntowne potwierdzenie stabilności opracowanego paradygmatu behawioralnego i wykazuje zgodność z wynikami uzyskanymi w eksperymencie 2. Podobnie jak w tamtym przypadku, wyłączna dostępność wskazówki kontekstowej skutkowała istotnym statystycznie obniżeniem poprawności wyborów nawigacyjnych u myszy. Wyniki te dodatkowo podkreślają znaczenie integracji różnych typów wskazówek w procesach nawigacji przestrzennej, a z perspektywy niniejszej pracy wskazują na drugorzędne znaczenie wskazówki kontekstowej w procesie asocjacji zestawu wskazówek podczas treningu.

## 8 Dyskusja

Pamięć umożliwia przechowywanie i wykorzystywanie doświadczeń z przeszłości i teraźniejszości do podejmowania odpowiednich decyzji. Jest kluczowa dla przetrwania i adaptacji zwierząt w dynamicznie zmieniającym się środowisku. Pozwala na lokalizację źródła pokarmu i schronienia, unikanie miejsc związanych z niebezpieczeństwem, efektywne przemieszczanie się w środowisku, odnajdywanie drogi powrotnej czy znalezienie alternatywnej trasy. Uczenie się i pamięć są niezwykle fascynującymi procesami umysłowymi, odnoszą się do jednej z fundamentalnych cech ludzkiego istnienia: zdolności do wykorzystywania nowych doświadczeń i kształtowania na ich podstawie procesów poznawczych, umożliwiając rozwój intelektualny i adaptację do dynamicznie zmieniającego się otoczenia. Luis Bunuel w swojej biograficznej książce "Ostatnie tchnienie" napisał: "Życie bez pamięci nie byłoby życiem.. nasza pamięć jest naszą spójnią, naszym rozumem, naszym działaniem, naszym uczuciem. Bez niej jesteśmy niczym...". Pomimo, że powyższy cytat pochodzi z literatury faktu - biografii, to zarówno ludzkie, życiowe doświadczenie jak i dane empiryczne zawarte w literaturze naukowej dotyczącej pamięci potwierdzają jego trafność i zasadność. W codziennym życiu pamięć odgrywa kluczową rolę, towarzysząc nam na każdym etapie i w każdej sferze funkcjonowania, będąc fundamentem naszej tożsamości i zdolności do rozumienia świata. Dzięki niej nadajemy sens własnemu istnieniu, identyfikujemy i interpretujemy emocje, a także budujemy relacje z otoczeniem. Pamięć pozwala nam łączyć doświadczenia przeszłości z teraźniejszością, tworząc spójny obraz rzeczywistości i umożliwiając refleksję nad sobą oraz swoim miejscem w świecie. Popularne obecnie techniki poprawy zapamiętywania i odtwarzania wspomnień bazują na interakcjach między uczeniem się i przypominaniem informacji, na docieraniu do stworzonej wcześniej reprezentacji - do obrazu, który powstał w danej sytuacji. Aby go wywołać z pamięci potrzebujemy odpowiednich wskazówek. Na przykład zapamiętanie nazwy ulicy, na której zlokalizowany jest Szpital św. Zofii w Warszawie jest możliwe, ale zdolność odtworzenia tej informacji po długim czasie będzie osobniczo zróżnicowana i zależna od wielu czynników. Wzbogacenie zapamiętywanej informacji wskazówką o tym, że jest to szpital, w którym miały miejsce moje własne narodziny nadaje jej pewien wzmacniający kontekst. Efektywność naszej pamięci uwarunkowana jest więc między innymi wskazówkami o odpowiedniej jakości i dostępności, które umożliwiają skuteczne wydobycie informacji z jej zasobów. Podobnie jest w przypadku

pamięci przestrzennej, stanowiącej podstawę precyzyjnej nawigacji w środowisku. Mimo oczywistego znaczenia dostępności wskazówek wizualnych we wspieraniu pamięci przestrzennej ułatwiających orientację i dokonanie wyboru kierunku ruchu w środowisku, badanie uczenia się przestrzennego gryzoni, opierającego się wyłącznie na informacjach allotetycznych, okazało się dużym wyzwaniem technicznym. Stopniowe przyswajanie bodźców sensorycznych odgrywa kluczową rolę w procesie podejmowania decyzji percepcyjnych, jednak mechanizmy neuronalne, leżące u podstaw tego zjawiska pozostają słabo poznane (Chun i Jiang, 1998; Gonzalez i in., 2019). Z uwagi na szeroką dostępność zaawansowanych narzędzi genetycznych i technologii obrazowania komórek nerwowych myszy, gatunek ten stanowi dominujący model badawczy. Obecne zasoby testów behawioralnych nie zapewniają jednak perspektywy stworzenia kompleksowych, dynamicznych zmian w środowisku, z jednoczesnym zachowaniem rzeczywistych, naturalnych funkcji motorycznych zwierząt oraz możliwości oceny planowania i bezpośredniego wyboru kierunku nawigacji zwierząt (Bird i Burgess, 2009).

Podstawowym założeniem niniejszej rozprawy było opracowanie behawioralnego modelu umożliwiającego badanie pamięci przestrzennej myszy w kontekście zależności nawigacji od prezentowanych wskazówek przestrzennych. Przedstawiłam zoptymalizowany i wdrożony do doświadczalnego zastosowania, innowacyjny aparat behawioralny, spełniający powyższe kryteria (Rycina 3). Podkreślam znaczenie traktowania wspomnień nie jako statycznych bytów (pomimo wytworzonych asocjacji), ale jako stale zmieniających się sieci neuronalnych, które reaktywują się i ewoluują wraz ze zdobywaniem doświadczenia. Opisany automatyczny system przetestowałam pod względem zdolności myszy do podejmowania decyzji o wyborze kierunku nawigacji, wyłącznie na podstawie prezentowanych wskazówek przestrzennych. Pomimo, że założenia konwencjonalnego labiryntu T opisano uprzednio w wielu eksperymentach (Dudchenko, 2001; Gerlai, 2001; Lalonde, 2002; Nelson i in., 2015; Sharma i in., 2010; Vann i in., 2009), to używano go jedynie w układzie wspierania tendencji naprzemiennych wyborów. Pokazałam, że realizacja takiej koncepcji jest także możliwa w proponowanym przez nas automatycznym systemie. Przetestowałam ją w niniejszej pracy w ramach paradygmatu treningu alternacyjnego, w zadaniu zależnym od kontekstów (Rycina 7A). Wraz z rozwojem nowoczesnych technologii testy prowadzone w labiryncie T zostały także zaadoptowane do środowiska wirtualnej rzeczywistości (Franco i Goard, 2021; Kira i in., 2023; Koay i in., 2022). Takie zastosowanie pozbawione jest natomiast bodźców somatosensorycznych, proprioceptywnych i przedsionkowych, które występują podczas fizjologicznych funkcji

motorycznych w trakcie naturalnej nawigacji. Z perspektywy holistycznego podejścia do aktywności biologicznej, postrzeganej jako wynik interakcji różnorodnych, wzajemnie oddziałujących sieci neuronalnych, dochodzi do eliminacji wpływu potencjalnie istotnego czynnika, który odgrywa ważną rolę w naturalnym środowisku. W rezultacie układ doświadczalny oddala się od koncepcji zapewnienia warunków możliwie, maksymalnie zbliżonych do naturalnych, co skutkuje ograniczeniem ekstrapolacji wyników doświadczenia.

Przedstawione przeze mnie rozwiązanie nie tylko zachowuje naturalne funkcje motoryczne podczas nawigacji, nieobarczonej ingerencją człowieka, ale także pozbawione jest dyskomfortu i stresu związanego z unieruchomieniem zwierzęcia. Nie będzie nadużyciem, jeśli określe przedstawiony paradygmat jako zadanie nawigacyjno-asocjacyjne, konkretnego kontekstu środowiskowego z działaniem motorycznym. Ponieważ mózg stanowi wysoce nieliniowy system, mogący angażować odmienne mechanizmy w różnych kontekstach, wprowadzenie dynamiki zmian odniesienia może stanowić ważny element zrozumienia kodów neuronalnych. Zaprojektowanie i optymalizacja nowego systemu do badania pamięci przestrzennej u myszy stanowiła jeden z kluczowych celów szczegółowych, choć techniczny aspekt jego realizacji może sprawiać wrażenie mniej istotnego. W rzeczywistości jednak zbudowanie labiryntu wraz z zewnętrznym środowiskiem miało fundamentalne znaczenie dla realizacji kolejnych założeń badawczych, stanowiąc podstawę powodzenia całego projektu. Umożliwiło przeprowadzenie wiarygodnych i powtarzalnych eksperymentów, mających na celu poznanie mechanizmów neuronalnych leżących u podstaw pamięci przestrzennej. Pozwoliło na redukcję czasu trwania treningów (co przejawia się w możliwości testowania znacznie liczniejszych grup zwierząt), wyeliminowanie wpływu dotyku eksperymentatora i ograniczenie potencjalnego stresu zwierząt. Powyższe rezultaty przyczyniły się do osiągnięcia wysokiej stabilności i powtarzalności eksperymentalnej. W niniejszej pracy świadczy o tym analogia wyników behawioralnych przy zastosowaniu tej samej procedury treningowej pomiędzy eksperymentami 2 i 3. W obu doświadczeniach osiągnięto pełną zależność nawigacji zwierząt od prezentowanych wskazówek przestrzennych (Rycina 18 i 22). W obu eksperymentach maksymalny czas treningu niezbędny do wykształcenia asocjacji wskazówek przestrzennych z podejmowanymi decyzjami nawigacyjnymi wynosił 19 dni. Minimalny czas treningu, potrzebny myszom do osiągnięcia kryterium poprawnej nawigacji w przypadku obu eksperymentów był również bardzo zbliżony, wynosił 13 dni, z wyjątkiem jednej myszy uczestniczącej w eksperymencie 3, która nauczyła się już po 11 dniach treningu. Aby zapewnić możliwie zbliżone do naturalnych warunki nawigacji, prędkość

przemieszczania się zwierząt oraz czas przeznaczony na daną sesję treningową są regulowane ich fizjologiczną funkcją motoryczną. System aktywuje się wyłącznie po wykryciu obecności myszy w konkretnym sektorze, przy czym moment detekcji uzależniony jest od indywidualnego tempa poruszania się zwierzęcia. W celu zapewnienia możliwie najbardziej naturalnych warunków doświadczalnych, czas trwania procedury treningowej (mierzony w dniach) również dostosowano do fizjologicznych funkcji poznawczych badanych osobników. Dzięki temu, że zaprojektowany schemat protokołu treningowego umożliwiał sukcesywną ocenę stopnia uzależnienia decyzji o wyborze ramienia labiryntu od prezentowanych wskazówek, pozwoliło to na elastyczne dostosowanie długości treningu do indywidualnych potrzeb zwierząt. W eksperymentach 2 i 3 przyjęto jako kryterium sukcesu asocjacji wskazówek przestrzennych z decyzjami nawigacyjnymi zdobycie co najmniej 75% średniej poprawności wyborów w trzech kolejnych dniach. Dopiero po osiągnięciu ustalonego poziomu poprawności nawigacji myszy były kwalifikowane do kolejnej, testowej fazy procedury eksperymentalnej.

Kolejnym niezwykle istotnym, wyróżniającym aspektem proponowanego paradygmatu jest brak zależności decyzji nawigacyjnych myszy od pamięci roboczej (ang. *working memory*). Z powodzeniem wykazałam, że myszy mogą stopniowo asymilować znaczenie wskazówek przestrzennych, a w konsekwencji całkowicie uzależnić od nich swoje wybory (Rycina 13, 20 i 23). Tworzenie asocjacji pomiędzy prezentowaną wskazówką i skutecznym wyborem podczas nawigacji miało miejsce zarówno przy zastosowaniu odmiennych strategii uczenia się podczas treningu (eksperyment 1), jak i przy dostępności różnorodnych bodźców przestrzennych (eksperyment 2 i 3). Dzięki wprowadzeniu automatyzacji systemu, która umożliwiła płynną nawigację myszy z naturalną prędkością, oraz optymalizacji prezentowanych wskazówek przestrzennych, osiągnięto pełną zależność nawigacji od bodźców wzrokowych. Tym samym badany osobnik nie musiał polegać na pamięci roboczej, ponieważ decyzje nawigacyjne były niezależne od konieczności zapamiętywania wcześniej odwiedzanych ramion labiryntu. Wyniki uzyskane w eksperymencie wykorzystującym dwa różne schematy treningowe (eksperyment 1) wykazały zdolność do tworzenia funkcjonalnych asocjacji (Rycina 13), pomimo ciągłego wzmocnienia naturalnych mechanizmów alternacyjnych (stosowania reguły). Badanie to potwierdziło możliwość rozdzielenia procesów pamięci przestrzennej od mechanizmów związanych z uczeniem się reguły oraz od zależności od pamięci roboczej, zarówno w trakcie uczenia się, jak i podczas końcowej fazy testowej.

Istotnym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych badań jest pokazanie zdolności myszy do wykorzystywania różnych strategii uczenia się nawigacji, co umożliwia im ostatecznie osiągnięcie porównywalnego poziomu asocjacji wskazówek przestrzennych oraz efektywne ich zastosowanie w procesie podejmowania decyzji wyboru kierunku drogi. Decydowanie o kierunku ruchu na podstawie różnorodnych, rozproszonych bodźców sensorycznych stanowi codzienne wyzwanie życia w naturalnym środowisku zwierząt. Proces ten, często powiązany z innymi złożonymi zachowaniami, charakteryzuje się dynamiką i wymaga ciągłej adaptacji. W proponowanym przeze mnie treningu przestrzennym mysz podejmuje próbę odnalezienia źródła bodźca apetytywnego w zmiennym środowisku, które wymaga nieustannej aktualizacji planu motorycznego. Zaprojektowany system stwarza warunki sprzyjające percepcyjnemu podejmowaniu decyzji, w połączeniu z ciągłą nawigacją, naśladując naturalne wzorce zachowań gryzoni. Zaimplementowana dynamika zmian bodźców odniesienia wymaga elastyczności decyzji nawigacyjnych, pomimo ustalonych skojarzeń sensomotorycznych - myszy wybierają tę samą czynność behawioralną w odpowiedzi na daną wskazówkę, bądź zestaw wskazówek przestrzennych. Ale użycie zmiennej kolejności losowo generowanych bodźców wzrokowych, a w konsekwencji nieprzewidywalnych lokalizacji wzmocnienia apetytywnego, wymaga rezygnacji z reguł wynikających z naturalnej tendencji do alternacji oraz uniezależnienia procesu nawigacji od pamięci roboczej. Ze względu na złożoność mózgu oraz równoczesną aktywację różnych obwodów neuronalnych w celu wygenerowania odpowiedzi behawioralnej, możliwe jest wykorzystanie odmiennych mechanizmów w zależności od kontekstu otoczenia. Wprowadzenie dynamicznych zmian punktu odniesienia może zatem stanowić kluczowy element w zrozumieniu neuronalnych procesów determinujących pamięć przestrzenną. Pomimo skomplikowania i złożoności w treningu behawioralnym, uważam, że jest to pożądana cecha. Naturalne zachowanie rzadko występuje w izolowanych modułach, a zamiast tego jest dynamiczne i wielowymiarowe (Carandini i Churchland, 2013). Analiza procesów w bardziej złożonych kontekstach wydaje się być niezbędna do pogłębiania wiedzy na temat czynników determinujących funkcjonowanie pamięci przestrzennej. Zaimplementowany przeze mnie system, oprócz zapewnienia dynamiki zmieniających się wskazówek w ramach przedstawionego paradygmatu, dodatkowo umożliwia elastyczne dostosowanie wskazówek do zróżnicowanych wymagań eksperymentalnych, co znacząco zwiększa jego uniwersalność i zastosowanie w badaniach behawioralnych.

## **Zaangażowanie RSC oraz HPC w proces nawigacji opartej o wskazówki wizualne przy zastosowaniu różnych strategii uczenia się myszy**

Wyniki testu eksperymentu 1 ujawniły istnienie dwóch populacji zwierząt, o różnych schematach uczenia się, które osiągnęły jednakowy poziom funkcjonalnego wykorzystywania nabytych asocjacji wskazówek wizualnych w podejmowaniu prawidłowych decyzji nawigacyjnych (Rycina 13). Dzięki temu możliwe było zbadanie, czy odmienne schematy uczenia się wskazówek przestrzennych znajdują odzwierciedlenie w zróżnicowanym zaangażowaniu struktur kluczowych dla pamięci przestrzennej. Analiza została ukierunkowana na grzbietową część hipokampa oraz przednią i tylną część RSC. W literaturze istnieją liczne przesłanki wskazujące na rolę tych obszarów w procesach związanych z przetwarzaniem pamięci przestrzennej (Milczarek i Vann, 2020; Nelson i in., 2015; Pothuizen i in., 2004; Wesierska i in., 2009). Pokazano także, że neurony RSC kodują informację o wizualnej wskazówce, sygnalizującej lokalizację nagrody podczas procesu uczenia się w konwencjonalnym labiryncie T. Dodatkowo, neurony RSC wykazywały zróżnicowane wzorce wyładowań wzdłuż trajektorii prowadzących do wzmocnienia apetytywnego, znajdującego się w lewym i prawym ramieniu labiryntu T (Vedder i in., 2017). Opisano także, że na decyzje nawigacyjne myszy wpływa funkcjonalny gradient aktywności, zależny od wskazówek przestrzennych (Franco i Goard, 2021), dlatego zdecydowano się na analizę dwóch miejsc w osi przednio tylnej tej struktury. RSC wydaje się być również ważnym celem konsolidacji pamięci zależnej od hipokampa (Katche i in., 2013), zwłaszcza pamięci kontekstowej (Czajkowski i in., 2014). Badanie różnic wynikających z zastosowania dwóch odmiennych schematów uczenia się podczas treningu pozwoliło na porównanie między grupami bez potrzeby wprowadzania dodatkowej grupy kontrolnej. Pomimo uzyskania jednakowych reakcji behawioralnych w teście przez obie badane grupy, analiza molekularna ujawniła wzmożone zaangażowanie dCA1 w przypadku schematu złożonego (Rycina 15), mierzone gęstością jąder komórkowych pozytywnych dla antygenu białka c-Fos, powszechnie stosowanego jako wskaźnik aktywacji neuronów, co opisano szczegółowo w podrozdziale 4.11. Myszy poddane złożonej procedurze treningowej wraz z jej rozpoczęciem eksponowane były na elastyczną strategię i dynamikę zmian podczas treningu. Podobną tendencję większego pobudzenia neuronów zaobserwowaliśmy również w przypadku dCA3 i dDG, choć efekt nie uzyskał istotności statystycznej. Być może potrzeba dynamicznych zmian percepcyjnych, determinowanych losową sekwencją prezentowanych wskazówek jest powodem zwiększonego

zaangażowania formacji hipokampa. Potencjalnym mechanizmem molekularnym może być zależny od aktywacji receptorów NMDA proces plastyczności synaptycznej, co pokazano w przypadku dCA1 i DG (Bannerman i in., 2012, 2014). W związku z tym, że uwaga myszy z grupy złożonej wymagała nasilonej koncentracji w celu adaptacji do dynamiki zmian prezentowanych wskazówek oraz podejmowania decyzji nawigacyjnych przeciwnych do wrodzonych alternacyjnych reguł, mogło to stanowić przyczynę uruchomienia mechanizmów plastyczności związanej z uczeniem się, a w konsekwencji przejawiać się aktywacją hipokampa. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę odmiennosć schematów uczenia się, należy zauważyć, że myszy doświadczały zróżnicowanej ekspozycji na wzmocnienie apetytywne pomiędzy grupami w trakcie treningu. Różnice te mogły również przyczynić się do zaobserwowanych odmiennosć w aktywności analizowanych struktur mózgu.

Zwiększonemu, hipokampalnemu pobudzeniu towarzyszył obniżony poziom aktywacji przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej w tej samej grupie badawczej. Ten wynik jest zgodny z proponowanym mechanizmem negatywnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy HPC i RSC. Opisano bowiem bezpośrednie supresyjne działanie CA1 i Sub na aktywnosć RSC (Miyashita i Rockland, 2007). Zgodnie z literaturą (Yamawaki, Corcoran, i in., 2019; Yamawaki, Li, i in., 2019), hamujące projekcje, wysyłane z HPC mają zakończenie w granularnej części RSC, a w opisanym przypadku obniżenie aktywności dotyczy części agranularnej RSC. Efekt ten może wynikać z dobrze opisanego interakcji pomiędzy subpopulacjami (granularną i agranularną) RSC (Aggleton i in., 2021). Ponadto otrzymana analiza potwierdziła opisane wyżej zróżnicowanie zaangażowania RSA wzdłuż osi przednio-tylnej, dla myszy trenowanych według schematu złożonego (Rycina 16).

### **Uzależnienie nawigacji przestrzennej myszy od prezentowanych wskazówek wizualnych**

Wzbogacanie śladu pamięciowego poprzez dodawanie nowych szczegółów, które rozszerzają i uzupełniają pierwotną informację, stanowi kluczowy mechanizm jego utrwalania. W celu zbadania możliwości powiązania pamięci przestrzennej z różnorodnymi wskazówkami, prowadzącymi do identyfikacji tej samej informacji opracowano paradygmat behawioralny oparty na zróżnicowanych bodźcach wzrokowych (Rycina 8B). Paradygmat ten został skutecznie zoptymalizowany, co umożliwiło uzależnienie podejmowanych przez myszy decyzji nawigacyjnych, od prezentowanych, złożonych bodźców wizualnych (wskazówki kontekstowej, Ctx i indywidualnej, L). Dzięki temu możliwe było zbadanie wpływu

dostępności zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji. Uzyskane wyniki wykazały, że myszy są zdolne do podejmowania skutecznych decyzji wyboru kierunku zarówno w oparciu o pełny zestaw wskazówek (Ctx + L), jak i w warunkach ograniczonej dostępności pojedynczego typu wskazówki (Ctx lub L). Ten wynik pokrywa się z danymi uzyskanymi w badaniach z udziałem ludzi, gdzie pokazano, że zarówno lokalne, jak i globalne punkty orientacyjne odgrywają istotną rolę w nawigacji w wirtualnym środowisku. Badani stosują różnorodne strategie nawigacyjne – niektórzy preferują wskazówki lokalne, inni globalne, a wielu integruje obie kategorie wskazówek do podjęcia prawidłowych decyzji nawigacyjnych (Steck i Mallot, 2000). Na podstawie eksperymentów 2 i 3 niniejszej pracy stwierdzono także, że wskazówka indywidualna, wyróżniająca się na tle globalnego kontekstu, wywiera dominujący wpływ na proces nawigacyjny. W rzeczywistym świecie obiekty niemal zawsze występują w towarzystwie innych elementów składowych otoczenia, stanowiąc mozaikę cech, przedstawianych obserwatorowi w formie bogatych, globalnych kontekstów. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za priorytetyzowanie aspektów złożonej sceny, które mają istotne znaczenie behawioralne wydaje się być niezbędne w celu zbadania procesów odpowiedzialnych za postrzeganie wskazówek potrzebnych do nawigacji. Dlatego zoptymalizowanie paradygmatu, umożliwiającego badanie neuronalnych podstaw przetwarzania złożonych obrazów wizualnych, przy jednoczesnym zachowaniu pełnej percepcji poszczególnych komponentów obrazu środowiska, które zostało szczegółowo opisane w niniejszej pracy, stanowi solidną podstawę do dalszych badań w tym obszarze. W warunkach wybiórczej dostępności wskazówki indywidualnej odnotowano istotnie wyższą aktywność rRSA, mierzoną gęstością jąder komórkowych pozytywnych dla antygeny białka c-Fos. Ekspresja IEG jest niezbędna do zajścia procesów plastyczności synaptycznej, tym samym tworzenia pamięci (Fleischmann i in., 2003; Jones i in., 2001). Możliwe zatem, że region agranularnej kory retrosplenialnej jest zaangażowany w priorytetyzację i przetwarzanie informacji o indywidualnych, wyróżniających się na tle kontekstu punktach odniesienia. Idąc w tym kierunku rozumowania można przypuszczać, że kora retrosplenialna jest zdolna do utworzenia równoległego, niezależnego od hipokampa śladu pamięciowego, którego podstawę stanowi bezpośrednio połączenie z kory wzrokowej z regionem RSA. Mechanizm ten może być wspierany przez informacje dotyczące obranego kierunku głowy, pochodzące ze wzgórza (Taube, 1995), w tym sygnały przedsionkowe dostarczane przez ATN oraz dodatkowe, wstępnie przetworzone informacje percepcji wizualnej przekazywane przez jądra boczno-grzbietowe wzgórza, LD. Reprezentacja w RSC miałaby bardziej schematyczny

charakter, oparty na odrębnych wizualnych punktach orientacyjnych, z których każdy byłby kodowany indywidualnie, zamiast tworzyć jeden spójny, panoramiczny obraz całego kontekstu. Taka reprezentacja obejmowałaby również zestaw relacji przestrzennych między poszczególnymi punktami orientacyjnymi, jednak bez konieczności odzwierciedlenia całościowego wrażenia kontekstowego. Hipotezę tę szczegółowo przedstawiłam w pracy pt. *Retrosplenial cortex in spatial memory: focus on immediate early genes mapping* (Balcerek i in., 2021).

Funkcjonalny udział RSC w asocjacyjnym przetwarzaniu złożonych reprezentacji wizualno-przestrzennych i jednoczesnym tworzeniu pozahipokampalnego engramu, wyrażonego mapowaniem IEG, został już opisany w literaturze (Baumgärtel i in., 2018; de Landeta i in., 2020; Katche i Medina, 2017; Maviel i in., 2004). Badania te podkreślają zarówno podobieństwa, jak i różnice w mechanizmach plastyczności pomiędzy HPC, a RSC jednocześnie dostarczając dowodów na ich funkcjonalne dysocjacje. Zgodnie z opisem zawartym w rozdziale Wstęp, podsekcji 4.5, literatura wskazuje na to, że sygnał komórek kierunku głowy jest zależny m. in. od punktów orientacyjnych środowiska. Knierim i współpracownicy pokazali, że siła tej zależności jest determinowana stabilnością percepcji punktów odniesienia, rozumianą jako zdolność do ich rozpoznawania (Knierim i in., 1995). Badacze opisali HD pochodzące ze wzgórza, możliwe jednak, że komórki kierunku głowy w RSC pełnią podobną funkcję. Badania przeprowadzone z udziałem ludzi jednoznacznie potwierdzają zaangażowanie kory retrosplenialnej w przetwarzanie najbardziej stabilnych wizualno-przestrzennych punktów odniesienia w środowisku, szczególnie w grupach charakteryzujących się sukcesem nawigacyjnym (Auger i in., 2017). Komórki kierunku głowy w RSC wykazują natychmiastową reakcję na zmiany zachodzące w znanym otoczeniu (Lozano i in., 2017), co może wynikać z bezpośrednich połączeń z korą wzrokową oraz kluczową siecią neuronalną, obejmującą pozostałe struktury zawierające komórki HD (Sugar i in., 2011).

W literaturze wykazano także kluczowe zaangażowanie RSC w mechanizmy pamięci rozpoznawczej (ang. recognition memory), będącej częścią pamięci epizodycznej, która determinowana jest na podstawie trzech komponentów: „co”, „gdzie” i „kiedy”. Ich wzajemna integracja tworzy unikalne wspomnienie. Pokazano, że przednia część kory retrosplenialnej jest niezbędna zarówno do tworzenia, jak i przywoływania komponentów „co” i „gdzie” (de Landeta i in., 2020). Powyższa funkcja RSC znajduje wsparcie w jej silnych połączeniach neuronalnych ze szlakiem wzrokowym, co umożliwia wykorzystanie punktów orientacyjnych podczas nawigacji. Mechanizm ten może stanowić podstawę generowania pamięci

rozpoznawczej, pozwalającej na rozróżnianie pomiędzy znanymi, a nowymi miejscami i obiektami. Otrzymana w niniejszej pracy statystycznie istotnie wyższa gęstość jąder komórkowych immunododatnich pod względem antygeny białka c-Fos w przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej, zaobserwowana w odpowiedzi na wyłączną dostępność wskazówki indywidualnej jako podstawy do podejmowania decyzji nawigacyjnych, jest zgodny z wynikami opublikowanymi przez Jacob i współpracowników. Autorzy wykazali aktywność neuronów HD agranularnej części kory retrosplenialnej będącą reakcją na lokalne wskazówki wizualne. Badacze pokazali także, że część populacji komórek kierunku głowy w RSA pośredniczy w interakcji między lokalnymi punktami wizualnymi, a globalną orientacją kierunku, wykazując charakterystyczny, selektywny wyłącznie do regionu RSA, unikalny, dwukierunkowy model aktywacji neuronalnej HD (Jacob i in., 2017).

### **Różnice w pobudzeniu RSA i HPC w zależności od skomplikowania paradygmatu treningowego**

W niniejszej pracy odwrotny efekt mapowania białka c-Fos uzyskano w przedniej części RSA w przypadku testu grupy złożonej eksperymentu badającego odmienne strategie nabywania asocjacji wskazówek z kierunkiem nawigacji (eksperyment 1) oraz w przypadku dostępności wyłącznie wskazówki kontekstowej w teście, po treningu opartym o zróżnicowane bodźce wzrokowe (eksperyment 2). Wskazówki wizualne zastosowane w obu eksperymentach charakteryzują się zbliżonymi właściwościami oraz porównywalną dynamiką zmian. W obu przypadkach wyróżniał je kontekstowy, globalny charakter, a treningi wymagały wysokiej potrzeby skupienia uwagi przestrzennej, wynikającej z nieprzewidywalności i losowej sekwencji wyświetlanych wskazówek, a także konieczności podejmowania działań wbrew naturalnej tendencji do alternacji. Termin wzrokowej uwagi przestrzennej odnosi się do procesu poznawczego umożliwiającego selekcję oraz reakcję na istotne bodźce wizualne w otoczeniu (Furtak i in., 2020; Lockhofen i Mulert, 2021; Speed i Haider, 2021) W opisanych warunkach eksperymentalnych przednia część agranularnej kory retrosplenialnej wykazała obniżoną aktywność, ocenianą na podstawie gęstości c-Fos pozytywnych komórek, w stosunku do grupy trenowanej w schemacie alternacyjnym (w ramach eksperymentu 1, Rycina 16) oraz w stosunku do grupy zwierząt podejmującej decyzje nawigacyjne w oparciu o wyróżniającą się wskazówkę indywidualną (eksperyment 2, Rycina 21A). Możliwe, że w sytuacji wymagającej wzmożonej koncentracji, wynikającej z nieprzewidywalności prezentowanych wskazówek

to HPC pełni kluczową rolę. Wyniki uzyskane w eksperymencie 1 pokazują, że dwie, odmienne strategie uczenia się asocjacji wskazówek przestrzennych z wyborem kierunku skrętu, ostatecznie prowadzą do porównywalnego sukcesu nawigacyjnego w teście. Wówczas to właśnie u myszy trenowanych w protokole ze zmodyfikowanymi sesjami, które wymagały skupienia i uważności na losowo generowane wskazówki od początku trwania treningu (Rycina 7B) zaobserwowano znacznie wyższą aktywność (za pomocą mapowania c-Fos) w grzbietowej części pola CA1 hipokampa (Rycina 15), w porównaniu z myszami trenowanymi według schematycznego, zgodnego z naturalną tendencją do alternacji, protokołu. W tym regionie hipokampa rejestruje się największą liczbę komórek piramidowych o potencjałach czynnościowych silnie zlokalizowanych w przestrzeni, znanych jako komórki miejsca. Dodatkowo, z dCA1 wysyłane są hamujące projekcje do granularnej części kory retrosplenialnej (Miyashita i Rockland, 2007), co podkreśla złożoność wzajemnych funkcjonalnych interakcji między HPC, a RSC. Biorąc pod uwagę, że zastosowany paradygmat behawioralny wymaga od myszy zintensyfikowanej uwagi przestrzennej (grupa złożona, eksperyment 1), podwyższony poziom białka c-Fos w obszarze dCA1 może wpływać na skuteczność w działaniach nawigacyjnych. Jednocześnie w eksperymencie badającym zróżnicowane bodźce wzrokowe (eksperyment 2, Rycina 21B) nie wykazano różnic poziomu gęstości komórek c-Fos pozytywnych w dCA1 pomiędzy badanymi grupami nawigującymi w oparciu o dostępność poszczególnych typów wskazówek (Ctx lub L). W analizowanym przypadku zastosowany paradygmat behawioralny nie różnił się pod względem wymagań dotyczących koncentracji między porównywanymi grupami, zarówno w fazie treningowej, jak i w teście. W obu grupach zachowano wysoki poziom losowości oraz nieprzewidywalności sekwencji wskazówek. Podwyższone poziomy c-Fos w dCA1, u myszy w warunkach losowości wskazówek w eksperymentach 1 (grupa złożona) i 2 (Ctx lub L) wykazują jednak znaczne zróżnicowanie (Rycina 15 i Rycina 21B). Taka zmienność może wynikać z przynależności badanych grup do różnych kohort w ramach przeprowadzanych barwień immunohistochemicznych. Detekcja c-Fos pozytywnych komórek odbywała się w różnych punktach czasowych, co mogło wpłynąć na uzyskane wyniki. Drugim potencjalnym czynnikiem może być niekonwencjonalna charakterystyka treningu złożonego. Znacząca przewaga gęstości komórek immunododatnich pod względem antygenu białka c-Fos w grupie złożonej eksperymentu badającego wpływ strategii uczenia się na skuteczność nawigacji (eksperyment 1), w porównaniu z wynikami eksperymentu 2 (szczególnie grupy eksponowanej na wybiórczą dostępność kontekstu, charakteryzującej się zbliżoną, globalną formą

wyświetlanych wskazówek), może być podyktowana złożonością i wysokim poziomem trudności paradygmatu behawioralnego zastosowanego podczas treningu. Kluczowy wydaje się fakt, że połowa sekwencji w treningu złożonym nadal wspierała mocno ugruntowaną przez naturę tendencję do alternacji następujących po sobie wyborów, dając namiastkę schematycznego postępowania. Rycina 12 pokazuje poprawność wyborów zgodnych z wyświetlanym kontekstem dla myszy grupy złożonej, uwzględniając podział na sesje alternacyjne i zmodyfikowane. Procent poprawności wyborów nawigacyjnych myszy wyłącznie w sesjach złożonych jest niższy w każdym dniu treningu, uwidaczniając wysoki stopień skomplikowania procedury. Poziom trudności został znacząco zwiększony zatem poprzez narzucenie przełamania częściowo utrwalanego schematu. Tego rodzaju zadanie stanowiło wyjątkowo złożoną próbę, wymagającą od myszy maksymalnej uwagi wzrokowej, co może tłumaczyć wysoki poziom aktywności, obserwowany w grzbietowej części pola CA1 hipokampa. W przypadku eksperymentu 2 dynamika zmian była mniej intensywna, sekwencje wyświetlane były w pełni losowo, ale wykazując bardziej spójny i jednostajny charakter, równomierny dla grupy L i Ctx, co znajduje odzwierciedlenie w porównywalnych poziomach białka c-Fos w badanym obszarze CA1. Jediną zmienną był rodzaj dostępnej wskazówki. Wysoki poziom trudności treningu złożonego łatwo zauważyć na wykresie przedstawiającym krzywe uczenia się zwierząt strategii alternacyjnej i złożonej (Rycina 11). W trakcie kolejnych dni treningu poprawność wyborów w grupie złożonej pozostaje konsekwentnie niższa, w porównaniu do skuteczności nawigacji w grupie alternacyjnej.

Prawdopodobnie każdy zastanawiał się chociaż raz w życiu dlaczego niektóre rzeczy łatwo zapamiętać, a inne są frustrująco zapominane. To pytanie nie jest tylko kwestią przypadkowej introspekcji, ale celem badań kognitywnych neurobiologów od dziesięcioleci. Wiadomo, że sposób, w jaki kierujemy naszą uwagę silnie determinuje to, co kodujemy w pamięci, a rozproszenie uwagi podczas uczenia się skutkuje upośledzeniem zależnych od hipokampa form pamięci (Aly i Turk-Browne, 2017; Chun i Turk-Browne, 2007; Yonelinas, 2002). Dokładna rola, jaką HPC pełni w percepcji jest nadal przedmiotem dyskusji. Prawdopodobnie hipokamp odgrywa kluczową rolę w tworzeniu i wykorzystywaniu asocjacji o złożonym charakterze, które integrują aspekty jakościowe, niezbędne w procesie zapamiętywania. Dzięki temu przyczynia się do zwiększenia efektywności w wykonywaniu różnorodnych zadań percepcyjnych. Jednocześnie jego inaktywacja nie wpływa na zdolność rozwiązywania zadań opartych na zbyt prostych skojarzeniach, co sugeruje, że te mniej złożone procesy mogą być realizowane przez inne struktury mózgu (Yonelinas, 2013).

## Nawigacja w oparciu o zróżnicowanie wizualne wskazówek, aspekt inaktywacji kory retrospleniałnej

Pomimo dynamicznego rozwoju narzędzi badawczych oraz rosnącego zainteresowania naukowców rolą kory retrospleniałnej w procesach związanych z pamięcią przestrzenną i nawigacją, nasza wiedza nadal jest ograniczona, a precyzyjny wkład RSC w uczenie się przestrzenne pozostaje słabo zdefiniowany. Przedstawione w niniejszej pracy zadanie behawioralne pozwala na badanie nawigacji zależnej od zróżnicowanych wskazówek wizualnych, przy jednoczesnym zachowaniu pełnej funkcji motorycznej zwierząt (brak zakłóceń potencjalnego wpływu informacji sensorycznej). W związku z powyższym podjęłam próbę zbadania wpływu inaktywacji kory retrospleniałnej podczas nawigacji opartej o zróżnicowane bodźce wzrokowe. Pomimo otrzymanych w eksperymentach 1 i 2 różnic w pobudzeniu neuronów kory retrospleniałnej w trakcie testu pamięci przestrzennej (mierzonych poziomem gęstości komórek pozytywnych pod względem detekcji białka c-Fos), czasowa inaktywacja RSC nie wpłynęła na proces nawigacji opartej na znanych myszom wskazówkach przestrzennych. Nie uzyskano istotnych różnic w odsetku decyzji podejmowanych zgodnie z wyświetlanymi wskazówkami wizualnymi po ogólnoustrojowym podaniu liganda aktywującego, wprowadzony uprzednio do RSC, receptor hM4Di (zmniejszający aktywność neuronalną). Brak wpływu inaktywacji zanotowano zarówno dla nawigacji opartej o zestaw zróżnicowanych, znanych wskazówek wizualnych, jak i wybiórczej dostępności poszczególnych ich typów. Powyższe wyniki wskazują na to, że proces podejmowania decyzji o wyborze kierunku skrętu na podstawie znanych wskazówek wizualnych, zastosowanych w eksperymencie 3, jest zależny od struktur odmiennych niż RSC. Możliwe, że kora retrospleniałna nie jest zaangażowana w osiągnięcie sukcesu nawigacyjnego myszy, opartego o prezentowane bodźce wzrokowe. Powyższa interpretacja musi jednak zostać potwierdzona analizą poprawności działania zastosowanego systemu chemogenetycznej inaktywacji, która zostanie wykonana w najbliższym czasie. Przeprowadzimy detekcję kolokalizacji komórek immunoreaktywnych pod względem antygenu białka c-Fos (świadczącego o pobudzeniu neuronalnym) z białkiem fluorescencyjnym, wskazującym na obecność egzogenego receptora DREADD. Przy założeniu odpowiedniego działania wygaszania aktywności neuronalnej oczekujemy istotnie obniżonego poziomu gęstości komórek wykazujących kolokalizację receptora hM4Di i białka c-Fos w odniesieniu do całkowitej liczby komórek transdukowanych wirusem DREADD w RSC grupy badanej

w stosunku do RSC grupy kontrolnej. Efekt inaktywacji struktury mózgowej za pomocą systemu DREADD jest zależny od odsetka populacji komórek, które zostały skutecznie wyciszone, co przekłada się na zakres obszaru funkcjonalnego wyłączenia w badanej strukturze. Sprawdzenie rozległości wyciszenia regionu RSC wydaje się być niezbędne dla potwierdzenia braku zaangażowania RSC w proces nawigacji myszy w teście eksperymentu 3.

Równocześnie brak behawioralnego efektu inaktywacji kory retrosplenialnej może być związany z potencjalnie wysokim stopniem kompensacji w sieci neuronalnej odpowiedzialnej za proces nawigacji. Jest to szczególnie prawdopodobne, biorąc pod uwagę dobrze udokumentowane wzajemne jej połączenia z HPC, korą wzrokową, PoS, wzgórzem czy zaangażowanym w podejmowanie decyzji ukierunkowanych na cel, prążkowiem (Mitchell i in., 2018; Monko i Heilbronner, 2021). W celu zidentyfikowania potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych zabezpieczono skrawki mózgów testowanych myszy, pochodzące z wybranych struktur zaangażowanych w pamięć przestrzenną. Planowana jest analiza porównawcza między grupami pod kątem gęstości komórek immunoreaktywnych względem antygeny białka c-Fos w hipokampie (w pierwszej kolejności). Wyższy poziom pobudliwości neuronalnej w HPC grupy badanej w porównaniu z grupą kontrolną mógłby sugerować zaangażowanie mechanizmów kompensacyjnych.

Dotychczasowe badania inaktywacji RSC wykazują brak spójności w raportowanych konsekwencjach. Udokumentowano, że uszkodzenia kory retrosplenialnej (RSC) mogą prowadzić do szerokiego spektrum rozbieżnych efektów – począwszy od upośledzenia zdolności wykonywania zadań przestrzennych, przez bardziej subtelne zaburzenia orientacji przestrzennej (Baird i in., 2004; Cain i in., 2006; Pothuizen i in., 2008, 2010; Vann i Aggleton, 2004), po brak widocznych deficytów w zadaniach wymagających prostszych strategii nawigacyjnych (Aggleton i in., 1995; Neave i in., 1994; Warburton i in., 1998; Zheng i in., 2003).

Pomimo rozbieżności w efektach jakie przynosi wyciszenie kory retrosplenialnej Maguire E. pokazała, że w każdym przypadku uszkodzonego funkcjonowania RSC u ludzi, pacjenci byli w stanie rozpoznać punkty orientacyjne w znanym środowisku i zachować poczucie jego znajomości, a mimo wszystko ich topograficzna orientacja była silnie zaburzona. Żaden z pacjentów nie potrafił odnaleźć potrzebnej drogi do celu ani nauczyć się nowych tras (Maguire, 2001). Niektóre badania sugerują, że RSC odgrywa kluczową rolę w przekształcaniu informacji sensorycznych w reprezentacje przestrzenne (Miller i in., 2014), zwłaszcza wizualnych (Powell i in., 2020). Wykazano także, że inaktywacja kory retrosplenialnej

powoduje upośledzenie orientacji przestrzennej, która opierała się na dystalnych wskazówkach wzrokowych (Hindley i in., 2014; Vann i Aggleton, 2005). RSC odgrywa kluczową rolę w elastycznym wykorzystywaniu informacji allocentrycznych (Pothuizen i in., 2010; Vann i Aggleton, 2002) szczególnie w sytuacjach, gdy dochodzi do konfliktu informacji pochodzącej z wnętrza ciała (idiotetycznej) z informacją allocentryczną (stanowiącą obraz otaczającego środowiska, niezależnego od własnej pozycji) (Pothuizen i in., 2008). Ponadto RSC jest istotna dla procesu integracji ścieżki, który pozwala na śledzenie przebytej trasy i sprecyzowanie własnej lokalizacji w środowisku (Cooper i in., 2001). RSC wydaje się zatem stanowić centralny element mechanizmów wspierających orientację przestrzenną i efektywną nawigację, zwłaszcza ze względu na obecność w tym regionie komórek kierunku (Chen i in., 1994; Cho i Sharp, 2001). Powyższe właściwości przyczyniają się do istotnej roli kory retrosplenialnej w integracji sygnałów generowanych własnym ruchem, z trwałymi, odległymi wskazówkami odniesienia. Dzięki temu możliwe jest przekształcenie egocentrycznych punktów widzenia w allocentryczny układ odniesienia (Knight i Hayman, 2014).

Pomimo wykazanych silnych połączeń z obwodami sieci neuronalnych, zarówno korowych, jak i podkorowych zaangażowanych w różnorodne zadania poznawcze, to dokładna funkcja RSC nadal pozostaje w kwestii badań. Możliwe także, że kora retrosplenialna pełni bardziej zaawansowaną i integracyjną funkcję, niż się obecnie uważa. Pothuizen H. i współpracownicy pokazali, że bilateralna inaktywacja RSC szczurów nie upośledziła alternacyjnej nawigacji w konwencjonalnym labiryncie T. Dopiero zastosowanie modyfikacji poprzez wprowadzenie kolejnego labiryntu i uzależnienie kierunku ruchu od punktów odniesienia w otoczeniu, doprowadziło do ujawnienia deficytów nawigacyjnych spowodowanych inaktywacją RSC (Pothuizen i in., 2008). Efekty wyciszenia kory retrosplenialnej wydają się być uzależnione od stopnia, w jakim realizacja zadania opiera się na przestrzennych punktach orientacyjnych bądź od potrzeby przełączania się między różnymi strategiami przestrzennymi lub perspektywami punktów widzenia. Jest to zgodne z proponowaną w literaturze hipotezą o tym, że kluczowym aspektem funkcjonowania RSC jest integracja postrzeganego kontekstu, aktualizacja reprezentacji o nowe bodźce i informacje, a więc pełnienie funkcji repozytorium uzyskanych percepcyjnie wskazówek i ich wzajemnych interakcji (Mitchell i in., 2018).

Mnogość połączeń z innymi strukturami mózgu, a w konsekwencji otrzymywanie przez RSC szerokiej gamy informacji przestrzennej (Mitchell i in., 2018) może przyczyniać się do komplikacji w jednoznacznym określeniu roli tej struktury. Jak opisano w poprzednich

rozdziałach, jedną z krytycznych kwestii dotyczących badania roli kory retrosplenialnej w obwodzie pamięci przestrzennej jest jej ścisły, funkcjonalny związek z formacją hipokampa i samym hipokampem. Sprecyzowanie zakresu stopnia odrębnego zaangażowania RSC i HPC w mechanizmy pamięci przestrzennej stanowi centralne wyzwanie badawcze. Czynniki wpływające na kierunek przepływu informacji i wzajemne oddziaływanie między uczeniem się, konsolidacją i aktualizacją pamięci w RSC i HPC pozostają słabo poznane (Miller i in., 2014). Aby umożliwić sformułowanie bardziej szczegółowego wyjaśnienia, przyszłe badania powinny uwzględniać równoczesne monitorowanie procesów przetwarzania w obu regionach. Wydaje się, że w większości przypadków opisanych dotychczas w literaturze hipokampalny tryb nawigacji jest wystarczająco efektywny, aby wspierać realizację zadań przestrzennych, a ustalenie paradygmatów behawioralnych w modelach zwierzęcych, które umożliwiłyby naprzemienne zaangażowanie hipokampa i kory retrosplenialnej, okazało się wyzwaniem.

W literaturze znaczną uwagę poświęca się zrozumieniu roli, jaką pełni dany obszar mózgu w kontekście specyficznego rodzaju uczenia się. Pełna interpretacja zakresu plastyczności leżącej u podstaw zjawisk determinujących pamięć przestrzenną jest jednak znacznie bardziej złożona. Wymaga nie tylko analizy mechanizmów neuronalnych odpowiedzialnych za behawioralne przejawianie się wyuczonej informacji, lecz także uwzględnienia interakcji systemów motywacyjnych, wpływu wcześniejszych wspomnień na proces uczenia się oraz, co szczególnie istotne, określenia współdziałania z innymi strukturami mózgu, tworzącymi sieć neuronalną, zaangażowaną w dany proces. Skomplikowanie i dynamiczny charakter zmian zachodzących w mózgu sprawiają, że pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za określone efekty behawioralne pozostaje niemal poza naszym jednostkowym zasięgiem. Możemy jednak stopniowo odkrywać podstawowe mechanizmy, które z czasem pozwolą na stworzenie bardziej kompleksowego obrazu i zrozumienie danego zjawiska biologicznego. Dlatego konieczne są dalsze badania wykorzystujące zaawansowane techniki, takie jak optogenetyka, obrazowanie funkcjonalne i metody śledzenia aktywności neuronalnej w czasie rzeczywistym. Szczególnie istotne wydaje się badanie dynamiki interakcji między RSC, a innymi strukturami w trakcie wykonywania zadań przestrzennych oraz analiza specyficznych wzorców aktywności neuronalnej na różnych etapach pamięci (nabywanie, konsolidacja, odtwarzanie).

Zastosowany nowatorski protokół behawioralny pozwala na całkowite uzależnienie podejmowanych przez zwierzęta decyzji nawigacyjnych od zmieniających się bodźców wzrokowych. Pokazuję, że silna, wrodzona tendencja alternacji może zostać zastąpiona

wyuczoną elastycznością. Dowiodłam również, że różne strategie nawigacyjne mogą prowadzić do uzyskania jednakowej skuteczności przemieszczania się do celu. Mimo podobnej zdolności do rozwiązania testu nawigacyjnego, historia rodzaju treningu i sposobu nabywania pamięci przestrzennej przejawia się w różnicach zaangażowania dwóch głównych struktur obwodu pamięciowego: hipokampa i kory retrosplenialnej. Dzięki zaprojektowaniu i implementacji automatycznego aparatu mogłam pokazać, że możliwe jest oddzielenie pamięci przestrzennej od uczenia się reguł i bazowania na pamięci roboczej, zarówno podczas fazy uczenia się jak i ostatecznego testu. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania dostarczają istotnych informacji na temat mechanizmów pamięci przestrzennej, a opracowany model behawioralny stanowi nowe narzędzie badawcze, które może znaleźć zastosowanie w analizach zaburzeń pamięci i procesów decyzyjnych w nawigacji. Pełni również rolę solidnej podstawy, która w połączeniu z technikami obrazowania w warunkach *in vivo* (podczas nawigacji) może przyczynić się do zrozumienia kolejnych biologicznych faktów, stojących u podstaw mechanizmów pamięci przestrzennej.

## 9 Podsumowanie i wnioski

W niniejszej rozprawie opracowano innowacyjny, zautomatyzowany system badawczy, umożliwiający wszechstronną analizę pamięci przestrzennej u myszy. System ten uwzględnia zastosowanie odmiennych schematów uczenia się oraz zróżnicowanych wskazówek przestrzennych, co pozwala na szczegółowe badanie mechanizmów poznawczo-przestrzennych w kontrolowanych warunkach eksperymentalnych.

- Stworzono zoptymalizowany paradygmat behawioralny, z zastosowaniem zaprojektowanego automatycznego systemu, co przyczyniło się do standaryzacji warunków eksperymentalnych.
- Powstawanie asocjacji pomiędzy prezentowaną wskazówką i skutecznym wyborem kierunku trasy podczas nawigacji, może być osiągnięte za pomocą różnych strategii uczenia się myszy. Zarówno wspieranie naturalnej tendencji do alternacji, jak i trening wymagający zaprzeczenia tej reguły okazały się efektywne. Świadczy to o zdolności myszy do elastycznego dostosowywania swoich strategii uczenia się oraz do modyfikacji zachowań nawigacyjnych w odpowiedzi na wymagania eksperymentalne, co dodatkowo podkreśla dynamiczny charakter procesów związanych z powstawaniem pamięci.
- Analiza poziomu gęstości białka c-Fos ujawniła przeciwstawne zaangażowanie struktur dCA1 oraz rRSA w procesie nawigacji u myszy, które przyswajały wskazówki przestrzenne w oparciu o dwa odmiennie schematy treningowe. Wspiera to hipotezę istnienia równoległych obwodów kierujących nawigacją przestrzenną, jednego opartego na dobrze opisanej reprezentacji hipokampa i drugiego, zależnego od RSC.
- Wykazano, że mechanizm leżący u podstaw asocjacji wyborów nawigacyjnych z dostępnym zestawem wskazówek charakteryzuje się wysokim stopniem elastyczności, pozwalając zarówno na percepcję przestrzennych wskazówek jako prezentowanej całości, jednocześnie umożliwiając selektywne postrzeganie oraz przetwarzanie poszczególnych komponentów wizualnego obrazu.

- Wykazano, że myszy są zdolne do podejmowania skutecznych decyzji nawigacyjnych zarówno w oparciu o pełny zestaw znanych wskazówek, jak i w warunkach ograniczonej dostępności pojedynczego rodzaju wskazówki. Jednocześnie stwierdzono, że wskazówka indywidualna, wyróżniająca się na tle globalnego kontekstu, wywiera dominujący wpływ na proces nawigacji. W sytuacji wybiórczej dostępności wskazówki indywidualnej zanotowano istotnie wyższą aktywność rRSA, mierzoną poziomem gęstości komórek immunoreaktywnych pod względem antygenu białka c-Fos.
- Nie zaobserwowano wpływu czasowej inaktywacji kory retrosplenialnej na proces nawigacji opartej na wskazówkach przestrzennych.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie dowodzą, że integracja wizualnych wskazówek przestrzennych ma fundamentalne znaczenie w procesach decyzyjnych związanych z nawigacją. Stworzenie modelu behawioralnego, umożliwiającego pełne uzależnienie decyzji nawigacyjnych myszy od prezentowanych wskazówek, otwiera nowe perspektywy badawcze w zakresie zaburzeń pamięci przestrzennej i nawigacji. Opracowany model stanowi innowacyjne narzędzie, które może zostać wykorzystane do pogłębionych badań funkcjonowania pamięci przestrzennej oraz zrozumienia mechanizmów neurobiologicznych, leżących u podstaw zachowań przestrzennych.

## 10 Bibliografia

1. Aggleton, J. P., Neave, N., Nagle, S., i Sahgal, A. (1995). A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: Evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. *Journal of Neuroscience*, 15(11), 7270–7281. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07270.1995>
2. Aggleton, J. P., Wright, N. F., Vann, S. D., i Saunders, R. C. (2012). Medial temporal lobe projections to the retrosplenial cortex of the macaque monkey. *Hippocampus*, 22(9), 1883–1900. <https://doi.org/10.1002/hipo.22024>
3. Aggleton, J. P., Yanakieva, S., Sengpiel, F., i Nelson, A. J. (2021). The separate and combined properties of the granular (area 29) and dysgranular (area 30) retrosplenial cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 185, 107516. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107516>
4. Albasser, M. M., Poirier, G. L., Warburton, E. C., i Aggleton, J. P. (2007). Hippocampal lesions halve immediate-early gene protein counts in retrosplenial cortex: Distal dysfunctions in a spatial memory system. *The European Journal of Neuroscience*, 26(5), 1254–1266. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05753.x>
5. Alexander, A. S., Carstensen, L. C., Hinman, J. R., Raudies, F., Chapman, G. W., i Hasselmo, M. E. (2020). Egocentric boundary vector tuning of the retrosplenial cortex. *Science Advances*, 6(8), eaaz2322. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2322>
6. Alexander, A. S., i Nitz, D. A. (2017). Spatially Periodic Activation Patterns of Retrosplenial Cortex Encode Route Sub-spaces and Distance Traveled. *Current Biology*, 27(11), 1551-1560.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.036>
7. Alexander, A. S., Robinson, J. C., Dannenberg, H., Kinsky, N. R., Levy, S. J., Mau, W., Chapman, G. W., Sullivan, D. W., i Hasselmo, M. E. (2020). Neurophysiological coding of space and time in the hippocampus, entorhinal cortex, and retrosplenial cortex. *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 2398212820972871. <https://doi.org/10.1177/2398212820972871>
8. Alexander, A. S., Robinson, J. C., Stern, C. E., i Hasselmo, M. E. (2023). Gated transformations from egocentric to allocentric reference frames involving retrosplenial cortex, entorhinal cortex, and hippocampus. *Hippocampus*, 33(5), 465–487. <https://doi.org/10.1002/hipo.23513>
9. Aly, M., i Turk-Browne, N. B. (2017). How Hippocampal Memory Shapes, and Is Shaped by, Attention. W D. E. Hannula i M. C. Duff (Red.), *The Hippocampus from*

*Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition* (s. 369–403). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-50406-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50406-3_12)

10. Alyan, S., i McNaughton, B. L. (1999). Hippocampectomized rats are capable of homing by path integration. *Behavioral Neuroscience*, *113*(1), 19–31.  
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.1.19>
11. Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Vaisman, N., Segal, E., Rechavi, G., Alon, U., Mills, G. B., Domany, E., i Yarden, Y. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature Genetics*, *39*(4), 503–512.  
<https://doi.org/10.1038/ng1987>
12. Ash, J. A., Lu, H., Taxier, L. R., Long, J. M., Yang, Y., Stein, E. A., i Rapp, P. R. (2016). Functional connectivity with the retrosplenial cortex predicts cognitive aging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(43), 12286–12291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525309113>
13. Auger, S. D., Zeidman, P., i Maguire, E. A. (2017). Efficacy of navigation may be influenced by retrosplenial cortex-mediated learning of landmark stability. W *Neuropsychologia* (T. 104, s. 102–112).  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2017.08.012>
14. Bahrami, S., i Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological Regulation*, *62*, 37–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001>
15. Baird, A. L., Putter, J. E., Muir, J. L., i Aggleton, J. P. (2004). On the transience of egocentric working memory: Evidence from testing the contribution of limbic brain regions. *Behav Neurosci*, *118*(4), 785–797.
16. Balcerek, E., Włodkowska, U., i Czajkowski, R. (2021). Retrosplenial cortex in spatial memory: Focus on immediate early genes mapping. *Molecular Brain*, *14*(1), 172.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-021-00880-w>
17. Bannerman, D. M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D. J., Schwarz, I., Jensen, V., Hvalby, Ø., Rawlins, J. N. P., Seeburg, P. H., i Sprengel, R. (2012). Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nature Neuroscience*, *15*(8), 1153–1159. <https://doi.org/10.1038/nn.3166>
18. Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., i Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(3), 181–192.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3677>

19. Barros, V. N., Mundim, M., Galindo, L. T., Bittencourt, S., Porcionatto, M., i Mello, L. E. (2015). The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00072>
20. Baumgärtel, K., Green, A., Hornberger, D., Lapira, J., Rex, C., Wheeler, D. G., i Peters, M. (2018). PDE4D regulates Spine Plasticity and Memory in the Retrosplenial Cortex. *Scientific Reports*, 8(1), 3895. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22193-0>
21. Beck, C. H., i Fibiger, H. C. (1995). Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: With and without diazepam pretreatment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 2), 709–720. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00709.1995>
22. Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., i Destrade, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *The European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3803–3812. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00258.x>
23. Bird, C. M., i Burgess, N. (2009). Spatial Memory: Assessment in Animals. W L. R. Squire (Red.), *Encyclopedia of Neuroscience* (s. 187–194). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00288-6>
24. Bjerknes, T. L., Langston, R. F., Kruge, I. U., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2015). Coherence among head direction cells before eye opening in rat pups. *Current Biology: CB*, 25(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.009>
25. Bonaventura, J., Eldridge, M. A. G., Hu, F., Gomez, J. L., Sanchez-Soto, M., Abramyan, A. M., Lam, S., Boehm, M. A., Ruiz, C., Farrell, M. R., Moreno, A., Galal Faress, I. M., Andersen, N., Lin, J. Y., Moaddel, R., Morris, P. J., Shi, L., Sibley, D. R., Mahler, S. V., ... Michaelides, M. (2019). High-potency ligands for DREADD imaging and activation in rodents and monkeys. *Nature Communications*, 10(1), 4627. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12236-z>
26. Brun, V. H., Otnæss, M. K., Molden, S., Steffenach, H.-A., Witter, M. P., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2002). Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry. *Science*, 296(5576), 2243–2246. <https://doi.org/10.1126/science.1071089>
27. Brun, V. H., Solstad, T., Kjelstrup, K. B., Fyhn, M., Witter, M. P., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2008). Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex. *Hippocampus*, 18(12), 1200–1212. <https://doi.org/10.1002/hipo.20504>

28. Bucci, D. J., i Robinson, S. (2014). Toward a conceptualization of retrohippocampal contributions to learning and memory. W *Neurobiology of Learning and Memory* (T. 116, s. 197–207). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.007>
29. Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Shannon, B. J., LaRossa, G., Sachs, R., Fotenos, A. F., Sheline, Y. I., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Morris, J. C., i Mintun, M. A. (2005). Molecular, Structural, and Functional Characterization of Alzheimer’s Disease: Evidence for a Relationship between Default Activity, Amyloid, and Memory. *The Journal of Neuroscience*, 25(34), 7709–7717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2177-05.2005>
30. Bures, J., Fenton, A. A., Kaminsky, Y., i Zinyuk, L. (1997). Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 343–350. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.343>
31. Burgess, N., Barry, C., i O’Keefe, J. (2007). An oscillatory interference model of grid cell firing. *Hippocampus*, 17(9), 801–812. <https://doi.org/10.1002/hipo.20327>
32. Burgess, N., Becker, S., King, J. A., i O’Keefe, J. (2001). Memory for events and their spatial context: Models and experiments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1413), 1493–1503. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0948>
33. Burwell, R. D. (2000). The parahippocampal region: Corticocortical connectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 25–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06717.x>
34. Burwell, R. D., i Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. W *Journal of comparative neurology* (T. 398, Numer 2, s. 179–205).
35. Bush, D., Barry, C., Manson, D., i Burgess, N. (2015). Using Grid Cells for Navigation. *Neuron*, 87(3), 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.006>
36. Buzsáki, G. (2005). Neuroscience: Neurons and navigation. *Nature*, 436(7052), 781–782. <https://doi.org/10.1038/436781a>
37. Buzsáki, G., i Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
38. Byrne, P., Becker, S., i Burgess, N. (2007). Remembering the past and imagining the future: A neural model of spatial memory and imagery. *Psychological Review*, 114(2), 340–375. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.114.2.340>

39. Cai, D. J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., Flores, S. E., Kim, I., Sano, Y., Zhou, M., Baumgaertel, K., Lavi, A., Kamata, M., Tuszyński, M., Mayford, M., ... Silva, A. J. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, *534*(7605), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature17955>
40. Cain, D. P., Humpartzoomian, R., i Boon, F. (2006). Retrosplenial cortex lesions impair water maze strategies learning or spatial place learning depending on prior experience of the rat. *Behavioural Brain Research*, *170*(2), 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.003>
41. Carandini, M., i Churchland, A. K. (2013). Probing perceptual decisions in rodents. *Nature Neuroscience*, *16*(7), 824–831. <https://doi.org/10.1038/nn.3410>
42. Carstensen, L. C., Alexander, A. S., Chapman, G. W., Lee, A. J., i Hasselmo, M. E. (2021). Neural responses in retrosplenial cortex associated with environmental alterations. *iScience*, *24*(11), 103377. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103377>
43. Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., i Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *60*(3), Article 3. <https://doi.org/10.55782/ane-2000-1359>
44. Chen, L. L., Lin, L. H., Green, E. J., Barnes, C. A., i McNaughton, B. L. (1994). Head-direction cells in the rat posterior cortex. I. Anatomical distribution and behavioral modulation. *Experimental Brain Research*, *101*(1), 8–23. <https://doi.org/10.1007/BF00243212>
45. Cho, J., i Sharp, P. E. (2001). Head direction, place, and movement correlates for cells in the rat retrosplenial cortex. *Behavioral Neuroscience*, *115*(1), 3–25. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.1.3>
46. Chun, M. M., i Jiang, Y. (1998). Contextual Cueing: Implicit Learning and Memory of Visual Context Guides Spatial Attention. *Cognitive Psychology*, *36*(1), 28–71. <https://doi.org/10.1006/cogp.1998.0681>
47. Chun, M. M., i Turk-Browne, N. B. (2007). Interactions between attention and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *17*(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.03.005>
48. Chung, L. (2015). A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. *Development i Reproduction*, *19*(2), 61–67. <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.2.061>
49. Clark, B. J., Bassett, J. P., Wang, S. S., i Taube, J. S. (2010). Impaired head direction cell representation in the anterodorsal thalamus after lesions of the retrosplenial

cortex. W *Journal of Neuroscience* (T. 30, Numer 15, s. 5289–5302).  
<https://doi.org/30/15/5289> [pii] 10.1523/JNEUROSCI.3380-09.2010

50. Clark, B. J., i Harvey, R. E. (2016). Do the anterior and lateral thalamic nuclei make distinct contributions to spatial representation and memory? *Neurobiology of Learning and Memory*, 133, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.002>
51. Colgin, L. L., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2008). Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 469–477.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.008>
52. Cooper, B. G., Manka, T. F., i Mizumori, S. J. (2001). Finding your way in the dark: The retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. *Behav Neurosci*, 115(5), 1012–1028.
53. Cooper, B. G., i Mizumori, S. J. (1999). Retrosplenial cortex inactivation selectively impairs navigation in darkness. *Neuroreport*, 10(3), 625–630.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199902250-00033>
54. Corcoran, K. A., Yamawaki, N., Leaderbrand, K., i Radulovic, J. (2018). Role of retrosplenial cortex in processing stress-related context memories. *Behavioral Neuroscience*, 132(5), 388–395. <https://doi.org/10.1037/bne0000223>
55. Cruz, F. C., Rubio, F. J., i Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain research*, 1628(0 0), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.005>
56. Cruz-Mendoza, F., Jauregui-Huerta, F., Aguilar-Delgadillo, A., García-Estrada, J., i Luquin, S. (2022). Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sciences*, 12(6), 687. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060687>
57. Curran, T., i Franza, B. R. (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell*, 55(3), 395–397. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90024-4)
58. Czajkowski, R., Jayaprakash, B., Wiltgen, B., Rogerson, T., Guzman-Karlsson, M. C., Barth, A. L., Trachtenberg, J. T., i Silva, A. J. (2014). Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8661–8666.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313222111>
59. Czajkowski, R., Sugar, J., Zhang, S. J., Couey, J. J., Ye, J., i Witter, M. P. (2013). Superficially projecting principal neurons in layer V of medial entorhinal cortex in the rat receive excitatory retrosplenial input. W *J Neurosci* (T. 33, Numer 40, s. 15779–15792). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2646-13.2013>

60. d’Isa, R., Comi, G., i Leocani, L. (2021). Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Scientific Reports*, *11*(1), 21177. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00402-7>
61. Dalhäuser, A. K., Rössler, O. G., i Thiel, G. (2022). Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases. *Gene*, *821*, 146284. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146284>
62. de Hoz, L., Gieriej, D., Lioudyno, V., Jaworski, J., Blazejczyk, M., Cruces-Solís, H., Beroun, A., Lebitko, T., Nikolaev, T., Knapka, E., Nelken, I., i Kaczmarek, L. (2018). Blocking c-Fos Expression Reveals the Role of Auditory Cortex Plasticity in Sound Frequency Discrimination Learning. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *28*(5), 1645–1655. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx060>
63. de Landeta, A. B., Pereyra, M., Medina, J. H., i Kathe, C. (2020). Anterior retrosplenial cortex is required for long-term object recognition memory. *Scientific Reports*, *10*(1), 4002. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60937-z>
64. Deshmukh, S. S., i Knierim, J. J. (2011). Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 69. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00069>
65. Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(Volume 55, 2004), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
66. Dudchenko, P. A. (2001). How do animals actually solve the T maze? *Behavioral Neuroscience*, *115*(4), 850–860.
67. Dutriaux, L., Xu, Y., Sartorato, N., Lhuillier, S., i Bottini, R. (2023). *Disentangling reference frames in the neural compass* (s. 2023.05.21.541641). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.05.21.541641>
68. Eichenbaum, H. (2000). A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1038/35036213>
69. Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: A new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(11), 732–744. <https://doi.org/10.1038/nrn3827>
70. Eichenbaum, H., i Lipton, P. A. (2008). Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: Role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus*, *18*(12), 1314–1324. <https://doi.org/10.1002/hipo.20500>

71. Epstein, R. A. (2008). Parahippocampal and retrosplenial contributions to human spatial navigation. W *Trends in cognitive sciences* (T. 12, Numer 10, s. 388–396). [https://doi.org/S1364-6613\(08\)00199-X](https://doi.org/S1364-6613(08)00199-X) [pii] 10.1016/j.tics.2008.07.004 [doi]
72. Epstein, R. A., Parker, W. E., i Feiler, A. M. (2007). Where am I now? Distinct roles for parahippocampal and retrosplenial cortices in place recognition. *J Neurosci*, 27(23), 6141–6149.
73. Etienne, A. S., i Jeffery, K. J. (2004). Path integration in mammals. *Hippocampus*, 14(2), 180–192. <https://doi.org/10.1002/hipo.10173>
74. Fernández, G., i Morris, R. G. M. (2018). Memory, Novelty and Prior Knowledge. *Trends in Neurosciences*, 41(10), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.08.006>
75. Fischer, L. F., Mojica Soto-Albors, R., Buck, F., i Harnett, M. T. (2020). Representation of visual landmarks in retrosplenial cortex. *eLife*, 9, e51458. <https://doi.org/10.7554/eLife.51458>
76. Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F., i Gass, P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(27), 9116–9122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09116.2003>
77. Franco, L. M., i Goard, M. J. (2021). A distributed circuit for associating environmental context with motor choice in retrosplenial cortex. *Science Advances*, 7(35), eabf9815. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf9815>
78. Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., i Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304(5672), 881–883.
79. Frankland, P. W., Köhler, S., i Josselyn, S. A. (2013). Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends in Neurosciences*, 36(9), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.002>
80. Furtak, M., Doradzińska, Ł., Ptashynska, A., Mudrik, L., Nowicka, A., i Bola, M. (2020). Automatic Attention Capture by Threatening, But Not by Semantically Incongruent Natural Scene Images. *Cerebral Cortex*, 30(7), 4158–4168. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa040>
81. Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2004). Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, 305(5688), 1258–1264. <https://doi.org/10.1126/science.1099901>

82. Gainotti, G., Almonti, S., Di Betta, A. M., i Silveri, M. C. (1998). Retrograde amnesia in a patient with retrosplenial tumour. *Neurocase*, 4(6), 519–526. <https://doi.org/10.1080/13554799808410644>
83. Galani, R., Weiss, I., Cassel, J. C., i Kelche, C. (1998). Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behavioural Brain Research*, 96(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00197-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00197-6)
84. Gerlai, R. (2001). Behavioral tests of hippocampal function: Simple paradigms complex problems. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00296-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00296-0)
85. Glidewell-Kenney, C. A., Trang, C., Shao, P. P., Gutierrez-Reed, N., Uzo-Okereke, A. M., Coss, D., i Mellon, P. L. (2014). Neurokinin B induces c-fos transcription via protein kinase C and activation of serum response factor and Elk-1 in immortalized GnRH neurons. *Endocrinology*, 155(10), 3909–3919. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1263>
86. Gonzalez, W. G., Zhang, H., Harutyunyan, A., i Lois, C. (2019). Persistence of neuronal representations through time and damage in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6455), 821–825. <https://doi.org/10.1126/science.aav9199>
87. Goodridge, J. P., Dudchenko, P. A., Worboys, K. A., Golob, E. J., i Taube, J. S. (1998). Cue control and head direction cells. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 749–761. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.112.4.749>
88. Gore, F., Schwartz, E. C., Brangers, B. C., Aladi, S., Stujenske, J. M., Likhtik, E., Russo, M. J., Gordon, J. A., Salzman, C. D., i Axel, R. (2015). Neural Representations of Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. *Cell*, 162(1), 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.027>
89. Greenberg, M. E., Greene, L. A., i Ziff, E. B. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 260(26), 14101–14110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38689-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38689-1)
90. Grieves, R. M., i Jeffery, K. J. (2017). The representation of space in the brain. *Behavioural Processes*, 135, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.12.012>
91. Grimm, R., i Tischmeyer, W. (1997). Complex patterns of immediate early gene induction in rat brain following brightness discrimination training and pseudotraining. *Behavioural Brain Research*, 84(1–2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)83330-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)83330-x)

92. Grosset, C., Chen, C. Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., i Shyu, A. B. (2000). A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: Interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell*, *103*(1), 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00102-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00102-1)
93. Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, *436*(7052), 801–806. <https://doi.org/10.1038/nature03721>
94. Hartley, T., Burgess, N., Lever, C., Cacucci, F., i O’Keefe, J. (2000). Modeling place fields in terms of the cortical inputs to the hippocampus. *Hippocampus*, *10*(4), 369–379. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<369::AID-HIPO3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<369::AID-HIPO3>3.0.CO;2-0)
95. Haugland, K. G., Sugar, J., i Witter, M. P. (2019). Development and topographical organization of projections from the hippocampus and parahippocampus to the retrosplenial cortex. *The European Journal of Neuroscience*, *50*(1), 1799–1819. <https://doi.org/10.1111/ejn.14395>
96. Herdegen, T., i Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *28*(3), 370–490. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00018-6)
97. Hindley, E. L., Nelson, A. J. D., Aggleton, J. P., i Vann, S. D. (2014). The rat retrosplenial cortex is required when visual cues are used flexibly to determine location. *Behavioural Brain Research*, *263*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.028>
98. Ino, T., Inoue, Y., Kage, M., Hirose, S., Kimura, T., i Fukuyama, H. (2002). Mental navigation in humans is processed in the anterior bank of the parieto-occipital sulcus. *Neuroscience Letters*, *322*(3), 182–186. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00019-8)
99. Jacob, P.-Y., Casali, G., Spiesser, L., Page, H., Overington, D., i Jeffery, K. (2017). An independent, landmark-dominated head-direction signal in dysgranular retrosplenial cortex. *Nature Neuroscience*, *20*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nn.4465>
100. Jankowski, M. M., Passecker, J., Islam, M. N., Vann, S., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P., i O’Mara, S. M. (2015). Evidence for spatially-responsive neurons in the rostral thalamus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*, 256. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00256>
101. Jaworski, J., Kalita, K., i Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: The aftermath of Kaczmarek’s theory. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *78*(4), Article 4. <https://doi.org/10.21307/ane-2018-027>

102. Jenkins, T. A., Dias, R., Amin, E., Brown, M. W., i Aggleton, J. P. (2002). Fos imaging reveals that lesions of the anterior thalamic nuclei produce widespread limbic hypoactivity in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 5230–5238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-05230.2002>
103. Jenkins, T. A., Vann, S. D., Amin, E., i Aggleton, J. P. (2004). Anterior thalamic lesions stop immediate early gene activation in selective laminae of the retrosplenial cortex: Evidence of covert pathology in rats? *The European Journal of Neuroscience*, 19(12), 3291–3304. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03421.x>
104. Jezek, K., Henriksen, E. J., Treves, A., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2011). Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature*, 478(7368), 246–249. <https://doi.org/10.1038/nature10439>
105. Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.-C., Gram, H., i Han, J. (2005). Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability. *Cell*, 120(5), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.038>
106. Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V. P., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., i Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience*, 4(3), 289–296. <https://doi.org/10.1038/85138>
107. Julian, J. B., Keinath, A. T., Marchette, S. A., i Epstein, R. A. (2018). The Neurocognitive Basis of Spatial Reorientation. *Current Biology*, 28(17), R1059–R1073. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.057>
108. Kaczmarek, L. (1993). Glutamate receptor-driven gene expression in learning. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 53(1), 187–196.
109. Kaczmarek, L. (2002). Chapter VIII c-Fos in learning: Beyond the mapping of neuronal activity. W *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (T. 19, s. 189–215). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-8196\(02\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8196(02)80019-7)
110. Kaczmarek, L., i Nikołajew, E. (1990). C-fos protooncogene expression and neuronal plasticity. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 50(4–5), 173–179.
111. Kaczmarek, L., Siedlecki, J. A., i Danysz, W. (1988). Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Brain Research*, 427(2), 183–186. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(88\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0169-328x(88)90064-2)
112. Katche, C., Dorman, G., Gonzalez, C., Kramar, C. P., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Cammarota, M., i Medina, J. H. (2013). On the role of retrosplenial cortex in long-

- lasting memory storage. *Hippocampus*, 23(4), 295–302.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.22092>
113. Katche, C., i Medina, J. H. (2017). Requirement of an Early Activation of BDNF/c-Fos Cascade in the Retrosplenial Cortex for the Persistence of a Long-Lasting Aversive Memory. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 27(2), 1060–1067.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhv284>
  114. Kira, S., Safaai, H., Morcos, A. S., Panzeri, S., i Harvey, C. D. (2023). A distributed and efficient population code of mixed selectivity neurons for flexible navigation decisions. *Nature Communications*, 14(1), 2121. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37804-2>
  115. Klatzky, R. L. (1998). Allocentric and Egocentric Spatial Representations: Definitions, Distinctions, and Interconnections. W C. Freksa, C. Habel, i K. F. Wender (Red.), *Spatial Cognition: An Interdisciplinary Approach to Representing and Processing Spatial Knowledge* (s. 1–17). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-69342-4\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-69342-4_1)
  116. Knierim, J. J., Kudrimoti, H. S., i McNaughton, B. L. (1995). Place cells, head direction cells, and the learning of landmark stability. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 1), 1648–1659.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01648.1995>
  117. Knight, R., i Hayman, R. (2014). Allocentric directional processing in the rodent and human retrosplenial cortex. W *Front Hum Neurosci* (T. 8, s. 135).  
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00135>
  118. Koay, S. A., Charles, A. S., Thiberge, S. Y., Brody, C. D., i Tank, D. W. (2022). Sequential and efficient neural-population coding of complex task information. *Neuron*, 110(2), 328-349.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.020>
  119. Kobayashi, Y., i Amaral, D. G. (2003). Macaque monkey retrosplenial cortex: II. Cortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 466(1), 48–79.  
<https://doi.org/10.1002/cne.10883>
  120. Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–297.  
[https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(98)00023-0)
  121. Kovács, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
  122. Kraus, B. J., Brandon, M. P., Robinson, R. J., Connerney, M. A., Hasselmo, M. E., i Eichenbaum, H. (2015). During Running in Place, Grid Cells Integrate Elapsed Time

- and Distance Run. *Neuron*, 88(3), 578–589.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.031>
123. Kropff, E., Carmichael, J. E., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature*, 523(7561), 419–424.  
<https://doi.org/10.1038/nature14622>
124. Kropff, E., Yang, S. M., i Schinder, A. F. (2015). Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 21–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.002>
125. Kubik, S., Miyashita, T., Kubik-Zahorodna, A., i Guzowski, J. F. (2012). Loss of activity-dependent *Arc* gene expression in the retrosplenial cortex after hippocampal inactivation: Interaction in a higher-order memory circuit. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.10.004>
126. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., i Kalita, K. (2013). Brain-derived neurotrophic factor induces matrix metalloproteinase 9 expression in neurons via the serum response factor/c-Fos pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2149–2162. <https://doi.org/10.1128/MCB.00008-13>
127. Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1), 91–104.  
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00041-0)
128. Langston, R. F., Ainge, J. A., Couey, J. J., Canto, C. B., Bjerknes, T. L., Witter, M. P., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2010). Development of the Spatial Representation System in the Rat. *Science*, 328(5985), 1576–1580.  
<https://doi.org/10.1126/science.1188210>
129. Lau, L. F., i Nathans, D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), 1182–1186.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1182>
130. Lee, J. L. C. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1264–1266.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2205>
131. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
132. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Treves, A., Meyer, R., Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2005). Progressive transformation of hippocampal

- neuronal representations in „morphed” environments. *Neuron*, 48(2), 345–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.007>
133. Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Barnes, C. A., Moser, E. I., McNaughton, B. L., i Moser, M.-B. (2005). Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), 619–623.  
<https://doi.org/10.1126/science.1114037>
134. Lever, C., Burton, S., Jeevjee, A., O’Keefe, J., i Burgess, N. (2009). Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *W J Neurosci* (T. 29, Numer 31, s. 9771–9777). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1319-09.2009>
135. Lockhofen, D. E. L., i Mulert, C. (2021). Neurochemistry of Visual Attention. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.643597>
136. Lomi, E., Mathiasen, M. L., Cheng, H. Y., Zhang, N., Aggleton, J. P., Mitchell, A. S., i Jeffery, K. J. (2021). Evidence for two distinct thalamocortical circuits in retrosplenial cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 185, 107525.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107525>
137. Lozano, Y. R., Page, H., Jacob, P.-Y., Lomi, E., Street, J., i Jeffery, K. (2017). Retrosplenial and postsubicular head direction cells compared during visual landmark discrimination. *Brain and Neuroscience Advances*, 1, 2398212817721859.  
<https://doi.org/10.1177/2398212817721859>
138. Lüscher, C., i Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
139. Maeshima, S., Ozaki, F., Masuo, O., Yamaga, H., Okita, R., i Moriwaki, H. (2001). Memory impairment and spatial disorientation following a left retrosplenial lesion. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 8(5), 450–451. <https://doi.org/10.1054/jocn.2000.0801>
140. Maguire, E. (2001). The retrosplenial contribution to human navigation: A review of lesion and neuroimaging findings. *Scandinavian Journal of Psychology*, 42(3), 225–238. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00233>
141. Mao, D., Kandler, S., McNaughton, B. L., i Bonin, V. (2017). Sparse orthogonal population representation of spatial context in the retrosplenial cortex. *Nature Communications*, 8(1). Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00180-9>
142. Mao, D., Molina, L. A., Bonin, V., i McNaughton, B. L. (2020). Vision and Locomotion Combine to Drive Path Integration Sequences in Mouse Retrosplenial Cortex. *Current Biology: CB*, 30(9), 1680-1688.e4.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.070>

143. Marx, J. L. (1987). The fos Gene as „Master Switch”. *Science*, 237(4817), 854–856. <https://doi.org/10.1126/science.3039659>
144. Mau, W., Sullivan, D. W., Kinsky, N. R., Hasselmo, M. E., Howard, M. W., i Eichenbaum, H. (2018). The Same Hippocampal CA1 Population Simultaneously Codes Temporal Information over Multiple Timescales. *Current Biology*, 28(10), 1499-1508.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.051>
145. Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., i Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, 305(5680), 96–99.
146. McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Gerrard, J. L., Gothard, K., Jung, M. W., Knierim, J. J., Kudrimoti, H., Qin, Y., Skaggs, W. E., Suster, M., i Weaver, K. L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: The hippocampus as a path integration system. *The Journal of Experimental Biology*, 199(Pt 1), 173–185. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.1.173>
147. McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., i Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Experimental Brain Research*, 76(3), 485–496. <https://doi.org/10.1007/BF00248904>
148. McNaughton, B. L., Battaglia, F. P., Jensen, O., Moser, E. I., i Moser, M.-B. (2006). Path integration and the neural basis of the „cognitive map”. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 663–678. <https://doi.org/10.1038/nrn1932>
149. Milczarek, M. M., i Vann, S. D. (2020). The retrosplenial cortex and long-term spatial memory: From the cell to the network. *W Curr Opin Behav Sci* (T. 32, s. 50–56). <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2020.01.014>
150. Milczarek, M. M., Vann, S. D., i Sengpiel, F. (2018). Spatial Memory Engram in the Mouse Retrosplenial Cortex. *Current Biology: CB*, 28(12), 1975-1980.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.002>
151. Miller, A. M. P., Mau, W., i Smith, D. M. (2019). Retrosplenial Cortical Representations of Space and Future Goal Locations Develop with Learning. *Current Biology: CB*, 29(12), Article 12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.034>
152. Miller, A. M. P., Serrichio, A. C., i Smith, D. M. (2021). Dual-Factor Representation of the Environmental Context in the Retrosplenial Cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 31(5), 2720–2728. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa386>
153. Miller, A. M. P., Vedder, L. C., Law, L. M., i Smith, D. M. (2014). Cues, context, and long-term memory: The role of the retrosplenial cortex in spatial cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 586. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00586>

154. Mitchell, A. S., Czajkowski, R., Zhang, N., Jeffery, K., i Nelson, A. J. D. (2018). Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 2398212818757098. <https://doi.org/10.1177/2398212818757098>
155. Miyashita, T., i Rockland, K. S. (2007). GABAergic projections from the hippocampus to the retrosplenial cortex in the rat. *Eur J Neurosci*, 26(5), 1193–1204.
156. Mizumori, S. J., i Williams, J. D. (1993). Directionally selective mnemonic properties of neurons in the lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(9), 4015–4028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-04015.1993>
157. Mizumori, S. J. Y., Ragozzino, K. E., i Cooper, B. G. (2000). Location and head direction representation in the dorsal striatum of rats. *Psychobiology*, 28(4), 441–462. <https://doi.org/10.3758/BF03332003>
158. Moita, M. A. P., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J. E., i Blair, H. T. (2004). Putting Fear in Its Place: Remapping of Hippocampal Place Cells during Fear Conditioning. *Journal of Neuroscience*, 24(31), 7015–7023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-03.2004>
159. Monko, M. E., i Heilbronner, S. R. (2021). Retrosplenial Cortical Connectivity with Frontal Basal Ganglia Networks. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 33(6), 1096–1105. [https://doi.org/10.1162/jocn\\_a\\_01699](https://doi.org/10.1162/jocn_a_01699)
160. Morgan, J. I., i Curran, T. (1991). Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14(Volume 14, 1991), 421–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>
161. Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., i O’Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683.
162. Morris, R., Petrides, M., i Pandya, D. N. (1999). Architecture and connections of retrosplenial area 30 in the rhesus monkey (macaca mulatta). *European Journal of Neuroscience*, 11(7), 2506–2518. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00672.x>
163. Moser, E. I., Kropff, E., i Moser, M.-B. (2008a). Place cells, grid cells, and the brain’s spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 69–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
164. Moser, E. I., Kropff, E., i Moser, M.-B. (2008b). Place Cells, Grid Cells, and the Brain’s Spatial Representation System. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 69–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>

165. Nagahara, A. H., Otto, T., i Gallagher, M. (1995). Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 109(1), 3–9. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.109.1.3>
166. Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A., i Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 361–372. <https://doi.org/10.1038/nrn1385>
167. Neave, N., Lloyd, S., Sahgal, A., i Aggleton, J. P. (1994). Lack of effect of lesions in the anterior cingulate cortex and retrosplenial cortex on certain tests of spatial memory in the rat. *Behavioural Brain Research*, 65(1), 89–101. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90077-9)
168. Nelson, A. J. D., Powell, A. L., Holmes, J. D., Vann, S. D., i Aggleton, J. P. (2015). What does spatial alternation tell us about retrosplenial cortex function? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 126. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00126>
169. Nestler, E. J., Hyman, S. E., Holtzman, D. M., i Malenka, R. C. (2015). Higher Cognitive Function and Behavioral Control. W *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (3. wyd.). McGraw-Hill Education. [neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1105916482](http://neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1105916482)
170. Nikolaev, E., Tischmeyer, W., Krug, M., Matthies, H., i Kaczmarek, L. (1991). C-fos protooncogene expression in rat hippocampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path. *Brain Research*, 560(1–2), 346–349. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91257-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91257-2)
171. Nikolaev, E., Werka, T., i Kaczmarek, L. (1992). C-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of two-way active avoidance reaction. *Behavioural Brain Research*, 48(1), 91–94. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80143-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80143-3)
172. O'Donnell, A., Odrowaz, Z., i Sharrocks, A. D. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: What do and don't we know? *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 58–66. <https://doi.org/10.1042/BST20110636>
173. Okada, S., Igata, H., Sasaki, T., i Ikegaya, Y. (2017). Spatial Representation of Hippocampal Place Cells in a T-Maze with an Aversive Stimulation. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00101>
174. O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51(1), 78–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
175. O'Keefe, J., i Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)

176. O'Keefe, J., Nadel, L., i Nadel, R. P. of P. L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press.
177. Opalka, A. N., i Wang, D. V. (2020). Hippocampal efferents to retrosplenial cortex and lateral septum are required for memory acquisition. *Learning i Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 27(8), Article 8. <https://doi.org/10.1101/lm.051797.120>
178. Paxinos, G., i Franklin, K. B. J. (2019). *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Fifth edition). Academic Press, an imprint of Elsevier.
179. Peter, M., Bathellier, B., Fontinha, B., Pliota, P., Haubensak, W., i Rumpel, S. (2013). Transgenic Mouse Models Enabling Photolabeling of Individual Neurons In Vivo. *PLoS ONE*, 8(4), e62132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062132>
180. Pinto, L., Koay, S. A., Engelhard, B., Yoon, A. M., Deverett, B., Thiberge, S. Y., Witten, I. B., Tank, D. W., i Brody, C. D. (2018). An Accumulation-of-Evidence Task Using Visual Pulses for Mice Navigating in Virtual Reality. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 36. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00036>
181. Pothuizen, H. H. J., Aggleton, J. P., i Vann, S. D. (2008). Do rats with retrosplenial cortex lesions lack direction? *W European Journal of Neuroscience* (T. 28, Numer 12, s. 2486–2498). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06550.x>
182. Pothuizen, H. H. J., Davies, M., Aggleton, J. P., i Vann, S. D. (2010). Effects of selective granular retrosplenial cortex lesions on spatial working memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.001>
183. Pothuizen, H. H. J., Davies, M., Albasser, M. M., Aggleton, J. P., i Vann, S. D. (2009). Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: Evidence from immediate-early gene imaging in rats. *European Journal of Neuroscience*, 30(5), 877–888. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06881.x>
184. Pothuizen, H. H. J., Zhang, W.-N., Jongen-Rêlo, A. L., Feldon, J., i Yee, B. K. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: A within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *The European Journal of Neuroscience*, 19(3), 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2004.03170.x>
185. Powell, A., Connelly, W. M., Vasalaukaite, A., Nelson, A. J. D., Vann, S. D., Aggleton, J. P., Sengpiel, F., i Ranson, A. (2020). Stable Encoding of Visual Cues in the Mouse Retrosplenial Cortex. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 30(8), 4424–4437. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa030>

186. Reijmers, L. G., Perkins, B. L., Matsuo, N., i Mayford, M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5842), 1230–1233. <https://doi.org/10.1126/science.1143839>
187. Robertson, R. T., i Kaitz, S. S. (1981). Thalamic connections with limbic cortex. I. Thalamocortical projections. W *Journal of comparative neurology* (T. 195, Numer 3, s. 501–525).
188. Rowland, D. C., i Moser, M.-B. (2014). From cortical modules to memories. *Current Opinion in Neurobiology*, 24(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.012>
189. Rowland, D. C., Roudi, Y., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2016). Ten Years of Grid Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 39(Volume 39, 2016), 19–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-013824>
190. Runyan, C. A., Piasini, E., Panzeri, S., i Harvey, C. D. (2017). Distinct timescales of population coding across cortex. *Nature*, 548(7665), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature23020>
191. Sakurai, K. (2024). Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain. *Journal of Biochemistry*, 175(4), 377–381. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad110>
192. Salz, D. M., Tiganj, Z., Khasnabish, S., Kohley, A., Sheehan, D., Howard, M. W., i Eichenbaum, H. (2016). Time Cells in Hippocampal Area CA3. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7476–7484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0087-16.2016>
193. Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoeffler, C. A., i Ramaswami, M. (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature*, 416(6883), 870–874. <https://doi.org/10.1038/416870a>
194. Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B. L., Witter, M. P., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2006). Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5774), 758–762. <https://doi.org/10.1126/science.1125572>
195. Sato, N., Sakata, H., Tanaka, Y. L., i Taira, M. (2006). Navigation-associated medial parietal neurons in monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 17001–17006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604277103>
196. Savonenko, A., Werka, T., Nikolaev, E., Zieliński, K., i Kaczmarek, L. (2003). Complex effects of NMDA receptor antagonist APV in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learning i Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(4), 293–303. <https://doi.org/10.1101/lm.58803>

197. Scoville, W. B., i Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
198. Sharma, S., Rakoczy, S., i Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87(17–18), 521–536. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.004>
199. Sharp, P. E., Blair, H. T., i Cho, J. (2001). The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal. *Trends in Neurosciences*, 24(5), 289–294. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01797-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01797-5)
200. Sherrill, K. R., Erdem, U. M., Ross, R. S., Brown, T. I., Hasselmo, M. E., i Stern, C. E. (2013). Hippocampus and retrosplenial cortex combine path integration signals for successful navigation. *W J Neurosci* (T. 33, Numer 49, s. 19304–19313). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1825-13.2013>
201. Shibata, H. (1989). Descending projections to the mammillary nuclei in the rat, as studied by retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 285(4), 436–452.
202. Sit, K. K., i Goard, M. J. (2023). Coregistration of heading to visual cues in retrosplenial cortex. *Nature Communications*, 14(1), 1992. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37704-5>
203. Smith, D. M., Miller, A. M. P., i Vedder, L. C. (2018). The retrosplenial cortical role in encoding behaviorally significant cues. *Behavioral Neuroscience*, 132(5), 356–365. <https://doi.org/10.1037/bne0000257>
204. Smith, K. S., Bucci, D. J., Luikart, B. W., i Mahler, S. V. (2016). DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behavioral Neuroscience*, 130(2), 137–155. <https://doi.org/10.1037/bne0000135>
205. Solstad, T., Boccara, C. N., Kropff, E., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1865–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1166466>
206. Sorensen, K. E. (1980). Ipsilateral projection from the subiculum to the retrosplenial cortex in the guinea pig. *W Journal of comparative neurology* (T. 193, Numer 4, s. 893–911).
207. Speed, A., i Haider, B. (2021). Probing mechanisms of visual spatial attention in mice. *Trends in neurosciences*, 44(10), 822–836. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.07.009>
208. Spence, K. W., Bergmann, G., i Lippitt, R. (1950). A study of simple learning under irrelevant motivational-reward conditions. *Journal of Experimental Psychology*, 40(5), 539–551. <https://doi.org/10.1037/h0060543>

209. Spiers, H. J., i Maguire, E. A. (2006). Thoughts, behaviour, and brain dynamics during navigation in the real world. *Neuroimage*, 31(4), 1826–1840.
210. Stacho, M., i Manahan-Vaughan, D. (2022). Mechanistic flexibility of the retrosplenial cortex enables its contribution to spatial cognition. *Trends in Neurosciences*, 45(4), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.01.007>
211. Stackman, R. W., Clark, A. S., i Taube, J. S. (2002). Hippocampal Spatial Representations Require Vestibular Input. *Hippocampus*, 12(3), 291–303. <https://doi.org/10.1002/hipo.1112>
212. Stackman, R. W., i Taube, J. S. (1997). Firing properties of head direction cells in the rat anterior thalamic nucleus: Dependence on vestibular input. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(11), 4349–4358. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-04349.1997>
213. Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A. L., i Ciechanover, A. (1995). Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: Identification and characterization of the conjugating enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 7106–7116. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.12.7106>
214. Steck, S. D., i Mallot, H. A. (2000). The Role of Global and Local Landmarks in Virtual Environment Navigation. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 9(1), 69–83. <https://doi.org/10.1162/105474600566628>
215. Stensola, H., Stensola, T., Solstad, T., Frøland, K., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2012). The entorhinal grid map is discretized. *Nature*, 492(7427), 72–78. <https://doi.org/10.1038/nature11649>
216. Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N., i Cappaert, N. (2011). The Retrosplenial Cortex: Intrinsic Connectivity and Connections with the (Para)Hippocampal Region in the Rat. An Interactive Connectome. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fninf.2011.00007>
217. Svoboda, E., McKinnon, M. C., i Levine, B. (2006). The functional neuroanatomy of autobiographical memory: A meta-analysis. *Neuropsychologia*, 44(12), 2189–2208. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.05.023>
218. Swanson, L. W., i Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferet connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 172(1), 49–84. <https://doi.org/10.1002/cne.901720104>

219. Takahashi, N., Kawamura, M., Shiota, J., Kasahata, N., i Hirayama, K. (1997). Pure topographic disorientation due to right retrosplenial lesion. *Neurology*, *49*(2), 464–469. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.2.464>
220. Taube, J. S. (1995). Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(1 Pt 1), 70–86.
221. Taube, J. S. (2007). The head direction signal: Origins and sensory-motor integration. *Annual Review of Neuroscience*, *30*, 181–207. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854>
222. Taube, J. S., Muller, R. U., i Ranck, J. B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *Journal of Neuroscience*, *10*(2), 436–447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00436.1990>
223. Thiel, G., i Rössler, O. G. (2011). Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology*, *152*(11), 4211–4223. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1243>
224. Tolman, E. C. (1925). Purpose and cognition: The determiners of animal learning. *Psychological Review*, *32*(4), 285–297. <https://doi.org/10.1037/h0072784>
225. Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, *55*(4), 189–208. <https://doi.org/10.1037/h0061626>
226. Tolman, E. C., i Honzik, C. H. (1930). Introduction and removal of reward, and maze performance in rats. *University of California Publications in Psychology*, *4*, 257–275.
227. Tolman, E. C., Ritchie, B. F., i Kalish, D. (1946). Studies in spatial learning. I. Orientation and the short-cut. *Journal of Experimental Psychology*, *36*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1037/h0053944>
228. Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., i Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, *87*(5), 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>
229. Trask, S., i Helmstetter, F. J. (2022). Unique roles for the anterior and posterior retrosplenial cortices in encoding and retrieval of memory for context. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, *32*(17), 3602–3610. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab436>
230. Tsao, A., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2013). Traces of Experience in the Lateral Entorhinal Cortex. *Current Biology*, *23*(5), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>

231. Tsao, A., Sugar, J., Lu, L., Wang, C., Knierim, J. J., Moser, M.-B., i Moser, E. I. (2018). Integrating time from experience in the lateral entorhinal cortex. *Nature*, 561(7721), 57–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0459-6>
232. Tse, D., Langston, R. F., Takekuma, M., Bethus, I., Spooner, P. A., Wood, E. R., Witter, M. P., i Morris, R. G. (2007). Schemas and memory consolidation. *W Science* (T. 316, Numer 5821, s. 76–82). <https://doi.org/10.1126/science.1135935>
233. Tse, D., Takeuchi, T., Takekuma, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., Bitto, H., i Morris, R. G. M. (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science*, 333(6044), 891–895. <https://doi.org/10.1126/science.1205274>
234. Tulving, E. (1993). What Is Episodic Memory? *Current Directions in Psychological Science*, 2(3), 67–70. <https://doi.org/10.1111/1467-8721.ep10770899>
235. Valenstein, E., Bowers, D., Verfaellie, M., Heilman, K. M., Day, A., i Watson, R. T. (1987). Retrosplenial amnesia. *W Brain: T. 110 ( Pt 6)* (s. 1631–1646). <https://doi.org/10.1093/brain/110.6.1631>
236. van Groen, T., i Wyss, J. M. (1992). Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. *W Journal of Comparative Neurology* (T. 315, Numer 2, s. 200–216). <https://doi.org/10.1002/cne.903150207>
237. Vann, S. D., i Aggleton, J. P. (2002). Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behav Neurosci*, 116(1), 85–94.
238. Vann, S. D., i Aggleton, J. P. (2004). Testing the importance of the retrosplenial guidance system: Effects of different sized retrosplenial cortex lesions on heading direction and spatial working memory. *Behavioural Brain Research*, 155(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.005>
239. Vann, S. D., i Aggleton, J. P. (2005). Selective dysgranular retrosplenial cortex lesions in rats disrupt allocentric performance of the radial-arm maze task. *W Behavioral Neuroscience* (T. 119, Numer 6, s. 1682–1686). <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.6.1682>
240. Vann, S. D., Aggleton, J. P., i Maguire, E. A. (2009). What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci*, 10(11), 792–802.
241. Vann, S. D., i Albasser, M. M. (2009). Hippocampal, retrosplenial, and prefrontal hypoactivity in a model of diencephalic amnesia: Evidence towards an interdependent subcortical-cortical memory network. *Hippocampus*, 19(11), 1090–1102. <https://doi.org/10.1002/hipo.20574>

242. Vann, S. D., Brown, M. W., i Aggleton, J. P. (2000). Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience*, 101(4), 983–991. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00288-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00288-8)
243. Vann, S. D., Kristina Wilton, L. A., Muir, J. L., i Aggleton, J. P. (2003). Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats. *Behav Brain Res*, 140(1–2), 107–118.
244. Vedder, L. C., Miller, A. M. P., Harrison, M. B., i Smith, D. M. (2017). Retrosplenial Cortical Neurons Encode Navigational Cues, Trajectories and Reward Locations During Goal Directed Navigation. *Cerebral Cortex*, 27(7), 3713–3723. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw192>
245. Vesely, P. W., Staber, P. B., Hoefler, G., i Kenner, L. (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.01.001>
246. Warburton, E. C., Aggleton, J. P., i Muir, J. L. (1998). Comparing the effects of selective cingulate cortex lesions and cingulum bundle lesions on water maze performance by rats. *Eur J Neurosci*, 10(2), 622–634.
247. Watts, G. (2009). Henry Gustav Molaison, “HM”. *The Lancet*, 373(9662), 456. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60159-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60159-8)
248. Wenk, G. L. (1998). Assessment of Spatial Memory Using the T Maze. *Current Protocols in Neuroscience*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0805bs04>
249. Wesierska, M., Adamska, I., i Malinowska, M. (2009). Retrosplenial cortex lesion affected segregation of spatial information in place avoidance task in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.005>
250. Wishaw, I. Q., Maaswinkel, H., Gonzalez, C. L., i Kolb, B. (2001). Deficits in allothetic and idiothetic spatial behavior in rats with posterior cingulate cortex lesions. *Behav Brain Res*, 118(1), 67–76.
251. Wills, T. J., Cacucci, F., Burgess, N., i O’Keefe, J. (2010). Development of the hippocampal cognitive map in preweanling rats. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5985), 1573–1576. <https://doi.org/10.1126/science.1188224>
252. Wilson, M. A., i McNaughton, B. L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5172), 676–679. <https://doi.org/10.1126/science.8036517>

253. Wiltgen, B. J., Brown, R. A. M., Talton, L. E., i Silva, A. J. (2004). New circuits for old memories: The role of the neocortex in consolidation. *Neuron*, 44(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.015>
254. Wisdon, R., i Verma, I. M. (1993). Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), 7429–7438.
255. Wood, E. R., Dudchenko, P. A., i Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*, 397(6720), 613–616. <https://doi.org/10.1038/17605>
256. Xavier, G. F., i Costa, V. C. I. (2009). Dentate gyrus and spatial behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 762–773. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.036>
257. Yamawaki, N., Corcoran, K. A., Guedea, A. L., Shepherd, G. M. G., i Radulovic, J. (2019). Differential Contributions of Glutamatergic Hippocampal→Retrosplenial Cortical Projections to the Formation and Persistence of Context Memories. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 29(6), Article 6. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy142>
258. Yamawaki, N., Li, X., Lambot, L., Ren, L. Y., Radulovic, J., i Shepherd, G. M. G. (2019). Long-range inhibitory intersection of a retrosplenial thalamocortical circuit by apical tuft-targeting CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0355-x>
259. Yamawaki, N., Radulovic, J., i Shepherd, G. M. G. (2016). A Corticocortical Circuit Directly Links Retrosplenial Cortex to M2 in the Mouse. *Journal of Neuroscience*, 36(36), 9365–9374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1099-16.2016>
260. Yang, G. A., Koistinaho, J., Iadarola, M., Shenhua-Zhu, null, i Hervonen, A. (1990). Administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) enhances Fos expression in the rat adrenal cortex. *Regulatory Peptides*, 30(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(90\)90132-g](https://doi.org/10.1016/0167-0115(90)90132-g)
261. Yassa, M. A., i Stark, C. E. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *W Trends Neurosci* (T. 34, Numer 10, s. 515–525). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>
262. Yerkes, R. M. (1912). The intelligence of earthworms. *Journal of Animal Behavior*, 2(5), 332–352. <https://doi.org/10.1037/h0072456>
263. Yoder, R. M., Clark, B. J., i Taube, J. S. (2011). Origins of landmark encoding in the brain. *Trends in Neurosciences*, 34(11), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.004>

264. Yonelinas, A. P. (2002). The Nature of Recollection and Familiarity: A Review of 30 Years of Research. *Journal of Memory and Language*, 46(3), 441–517. <https://doi.org/10.1006/jmla.2002.2864>
265. Yonelinas, A. P. (2013). The hippocampus supports high-resolution binding in the service of perception, working memory and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 254, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.030>
266. Zheng, Y., Pearce, J. M., Vann, S. D., Good, M., Jenkins, T. A., Smith, P. F., & Aggleton, J. P. (2003). Using Idiopathic Cues to Swim a Path With a Fixed Trajectory and Distance: Necessary Involvement of the Hippocampus, but Not the Retrosplenial Cortex. *Behavioral Neuroscience*, 117(6), 1363–1377. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1363>
267. Zugaro, M. B., Arleo, A., Berthoz, A., & Wiener, S. I. (2003). Rapid Spatial Reorientation and Head Direction Cells. *Journal of Neuroscience*, 23(8), 3478–3482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03478.2003>

## 11 Spis opublikowanych prac naukowych

### Publikacje zawarte w niniejszej rozprawie:

**Balcerek E**, Włodkowska U, Czajkowski R. FOS mapping reveals two complementary circuits for spatial navigation in mouse. *Sci Rep.* 2024 Sep 11;14(1):21252. doi: 10.1038/s41598-024-72272-8. PMID: 39261637; PMCID: PMC11391074.

### Pozostałe publikacje:

Sadkowski T, Ciecierska A, Oprządek J, **Balcerek E**. Breed-dependent microRNA expression in the primary culture of skeletal muscle cells subjected to myogenic differentiation. *BMC Genomics.* 2018 Jan 31;19(1):109

**Balcerek E**, Włodkowska U, Czajkowski R. Retrosplenial cortex in spatial memory: focus on immediate early genes mapping. *Mol Brain.* 2021 Dec 4;14(1):172. doi: 10.1186/s13041-021-00880-w. PMID: 34863215; PMCID: PMC8642902.

## 12 Supplement

### 12.1 Skrypty użyte do analizy komórek c-Fos pozytywnych:

Do analizy zdjęć mikroskopowych i lokalizacji komórek c-Fos pozytywnych wykorzystano dwa skrypty napisane w języku programowania ImageJ Macro Language (skrypt I) oraz Python (skrypt II). Skrypty zostały stworzone przez mgr Urszulę Włodkowską na potrzeby Pracowni Pamięci Przestrzennej.

Skrypt I:

```
ret = File.openDialog("Choose a file");open(ret);
no_ext_name = File.getNameWithoutExtension(ret);
run("Set Measurements...", "centroid decimal=0");
run("Select None");
run("8-bit");
Stack.setXUnit("pixel");
run("Properties...", "channels=1 slices=1 frames=1 pixel_width=1 pixel_height=1
voxel_depth=1.0000000");
run("Smooth");
run("Duplicate...", " ");
run("Remove Outliers...", "radius=9 threshold=19 which=Dark");
imageCalculator("Subtract create", no_ext_name + "-1.tif",no_ext_name+".tif");
selectWindow("Result of " + no_ext_name + "-1.tif");
setAutoThreshold("Default dark");
run("Threshold...");
setThreshold(25, 255, "raw");
setThreshold(25, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Close");
run("Analyze Particles...", "display exclude add");
resname = ret.replace(".tif", ".csv")
```

```
saveAs("Results", resname);
close(no_ext_name + ".tif");
close(no_ext_name + "-1.tif");
close("Result of " + no_ext_name + "-1.tif");
runMacro (ścieżka zapisu SkryptuII_FOS.py", resname);
```

### **Skrypt II:**

```
from ij.gui import Overlay, OvalRoi, Plot
from ij.plugin.frame import RoiManager
from ij import IJ
from ij.measure import Measurements
import csv, os, ntpath
from java.awt import Color
from java.awt import Stroke, BasicStroke
def dot(arr1,arr2):
arr = []
for i in range(len(arr1)):
arr.append(arr1[i]*arr2[i])
return arr
def div(arr1,arr2):
arr = []
for i in range(len(arr1)):
arr.append(arr1[i]/arr2[i])
return arr
def subtract(arr1,arr2):
arr = []
for i in range(len(arr1)):
arr.append(arr1[i]-arr2[i])
return arr
def listsum(arr1,arr2):
arr = []
for i in range(len(arr1)):
arr.append(arr1[i]+arr2[i])
```

```

return arr
def power(arr, n):
return [i**n for i in arr]
def argmax(arr):
max_val = max(arr)
for i, el in enumerate(arr):
if el == max_val:
return i
return 0
def cumulative_sum(arr):
ret = []
sum_so_far = 0
for el in arr:
sum_so_far += el
ret.append(sum_so_far)
return ret
def histogram(arr):
min_ = min(arr)
max_ = max(arr)
step = (max_-min_)/256
bins_ = []
hist = []
bins_.append(min_)
for i in range(256):
bins_.append(min_+(i+1)*step)
hist.append(0)
bin_centers = listsum(bins_[:-1], bins_[1:])
bin_centers[:] = [x / 2 for x in bin_centers]
for el in arr:
if el == max_:
idx = -1
else:
idx = int((el-min_)//step)

```

```

hist[idx] += 1
return hist, bin_centers
def otsu_thre(arr):
hist, bin_centers = histogram(arr)
weight1 = cumulative_sum(hist)
weight2 = cumulative_sum(hist[::-1])[::-1]
mean1 = div(cumulative_sum(dot(hist, bin_centers)), weight1)
mean2 = (div(cumulative_sum(dot(hist, bin_centers)[::-1]), weight2[::-1]))[::-1]
variance12 = dot(dot(weight1[:-1], weight2[1:]), power(subtract(mean1[:-1], mean2[1:]), 2))
idx = argmax(variance12)
threshold = bin_centers[:-1][idx]
return threshold
def std(arr):
return (sum((x-(sum(arr) / len(arr)))**2 for x in arr) / len(arr))**0.5
def mean(arr):
return sum(arr)/len(arr)
def find_thres(arr, plt_xs, plt_ys, cutoff_coeff):
mean_arr = mean(arr)
std_arr = std(arr)
bin_width = plt_xs[1]-plt_xs[0]
thres = []
cutoff = (1-cutoff_coeff)* max(plt_ys)
ys_mask = [y > cutoff for y in plt_ys]
idx_start = ys_mask.index(True)
ys_mask.reverse()
idx_end = ys_mask.index(True)
return [plt_xs[idx_start]-bin_width/2]
def draw_histogram_with_thre(title, array, threshold = None):
plt = Plot(title, title, "liczba komorek")
plt.addHistogram(array)
plt.setColor(red)
plt.setLineWidth(5)
plt_limits = plt.getLimits()

```

```

thres = []
if threshold is not None:
plt.drawDottedLine(threshold, plt_limits[-2], threshold, len(array), 5)
else:
thres = find_thres(array, plt.getXValues(), plt.getYValues(), 0.409) #0.356
for th in thres:
plt.drawDottedLine(th, plt_limits[-2], th, len(array), 5)
plt.show()
return thres
red = Color(255, 0, 0)
orange = Color(255, 165, 0)
white = Color(255, 255, 255)
roi_diameter = 8
move_roi_center_x = 5
move_roi_center_y = 5
delete_border_rois = True
delete_low_intensity_rois = True
source_file = IJ.getFilePath("Select file to load roi coordinates ")
namebase = os.path.splitext(ntpath.basename(source_file))[0]
directory = os.path.dirname(source_file)
source_file = getArgument();
namebase = os.path.splitext(ntpath.basename(source_file))[0]
directory = os.path.dirname(source_file)
hist_title = 'srednia intensywnosc w obrebie roi'
print(directory + "/" + namebase + ".tif")
imp = IJ.openImage(directory + os.path.sep + namebase + ".tif")
imp.show()
rm = RoiManager.getInstance()
if not rm:
rm = RoiManager()
rm.reset()
roi_dict = {
'rois' : [],

```

```

'means' : [],
'stdev_arr' : []
}
with open(source_file,"r") as source:
rdr = csv.DictReader( source, delimiter=',')
for r in rdr:
roi = OvalRoi(int(r['X'])-move_roi_center_x, int(r['Y'])-move_roi_center_y, roi_diameter,
roi_diameter)
imp.setRoi(roi)
roi.setImage(imp)
stats = roi.getStatistics()
inverted_mean = 255-stats.mean
stats = roi.getStatistics()
stdev = stats.stdDev
roi_dict['means'].append(inverted_mean)
roi_dict['stdev_arr'].append(stdev)
roi_dict['rois'].append(roi)
= otsu_thre(roi_dict['stdev_arr'])
mean_threshold = otsu_thre(roi_dict['means'])
dashed = BasicStroke(1, BasicStroke.CAP_BUTT, BasicStroke.JOIN_BEVEL, 0, [3,3], 0);
overlay = Overlay()
thres = draw_histogram_with_thre(hist_title, roi_dict['means'])
IJ.selectWindow(hist_title);
IJ.save(directory+os.path.sep+namebase+"hist".tif");
for idx, roi in enumerate(roi_dict['rois']):
roi.setStrokeColor(white)
if(roi_dict['means'][idx] < thres[0]):
roi.setStrokeColor(orange)
if (delete_low_intensity_rois):
roi.setStrokeColor(red)
overlay.add(roi)
else:
rm.addRoi(roi)

```

else:

```
rm.addRoi(roi)
```

```
imp.setOverlay(overlay)
```

```
rm.runCommand("Save", directory+os.path.sep+namebase+".zip");
```