

Urszula Włodkowska

**Wewnątrzsobnicze różnice w reprezentacji neuronalnej
wizualnych wskazówek przestrzennych w korze
retrosplenialnej**

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

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

Warszawa, 2025

Dziękuję

*Dr hab. Rafałowi Czajkowskiemu, profesorowi Instytutu Nenckiego
Za zaufanie, otwartość i życzliwość.*

*Edycie Balcerek
Za nieocenioną przyjaźń, wsparcie, ciepło i inspirację w wielu aspektach życia.*

*Mateuszowi Kosteckiemu
Za stworzenie najbardziej wartościowego projektu, w jakim miałam szczęście brać udział.*

*Konradowi Danielewskiemu
Za wspólny czas w NOL i otwartość w dzieleniu się swoją wiedzą.*

*Jonasowi Verhellenowi
Za przyjaźń i zrozumienie.*

*Koleżankom i Kolegom – byłym i obecnym – z Pracowni Pamięci Przestrzennej,
a w szczególności: Bartkowi, Kasi, Adamowi i Monice
Za wsparcie i wspólnie spędzony czas.*

*Rodzicom i Markowi
Za to, że zawsze mogłam na Was liczyć i że byliście ze mną, kiedy było najtrudniej.*



Badania opisane w pracy doktorskiej zrealizowano dzięki funduszom z Narodowego Centrum Nauki NCN CEUS-Unisono 2020/02/Y/NZ4/00051 oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej TEAM POIR.04.04.00-00-1ACA/16-00.

STRESZCZENIE.....	6
ABSTRACT.....	8
WYKAZ SKRÓTÓW.....	10
1. WSTĘP.....	12
1.1. Pamięć przestrzenna i nawigacja.....	12
1.2. Obwód neuronalny pamięci przestrzennej.....	14
1.3. Rola kory retrosplenialnej w pamięci przestrzennej.....	20
1.4. Behawioralne metody badania pamięci.....	24
1.5. Geny wczesnej odpowiedzi w badaniach nad pamięcią.....	26
1.6. Cele pracy.....	29
2. MATERIAŁY I METODY.....	30
2.1. Oznaczenia grup eksperymentalnych i sesji testowych.....	30
2.2. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.....	30
2.3. Operacje stereotaktyczne.....	31
2.4. Zastosowany paradygmat behawioralny.....	33
2.4.1. Zautomatyzowany labirynt typu T.....	33
Cechy fizyczne labiryntu.....	33
Automatyzacja labiryntu.....	34
Zarys paradygmatu behawioralnego.....	36
2.4.2. Habitualizacja zwierząt do procedur doświadczalnych.....	36
2.4.3. Modyfikacja strategii przestrzennej (eksperyment 1).....	39
Trening.....	39
Test i obrazowanie.....	41
Odtwarzanie pamięci.....	42
2.4.4. Adaptacja do nawigacji w warunkach ograniczonej dostępności do wskazówek wizualnych o różnej złożoności.....	43
Trening.....	43
Test i obrazowanie.....	44
2.5. Przyżyciowe obrazowanie aktywności neuronalnej przy użyciu mikroskopii dwufotonowej.....	47
2.6. Analiza rozmieszczenia białka c-Fos w całym mózgu za pomocą metody iDISCO+.....	49
2.6.1. Utrwalenie tkanek w procesie perfuzji przezsercowej.....	49
2.6.2. Oczyszczanie mózgów i znakowanie białka c-Fos metodą iDISCO+.....	50
2.6.3. Obrazowanie oczyszczonych mózgów mikroskopem arkusza światła.....	51
2.6.4. Analiza rozmieszczenia białka c-Fos.....	51
2.7. Analiza obrazów zarejestrowanych przy pomocy mikroskopu dwufotonowego.....	52
2.8. Odczynniki i przeciwciała.....	55
2.9. Analiza statystyczna.....	56
2.9.1. Modele GEE.....	56
Konstrukcja modelu.....	56
Estymowane średnie marginalne (EMM).....	57

2.9.2. Zastosowane testy statystyczne.....	58
3. WYNIKI.....	60
3.1. Reprezentacja kontekstu w RSC w momencie zmiany strategii przestrzennej.....	60
3.1.1. Wyniki behawioralne.....	60
3.1.2. Zmiany aktywności komórek pomiędzy sesjami behawioralnymi.....	62
3.1.3. Zmienność intensywności fluorescencji pomiędzy sesjami.....	65
Analiza zmian w hierarchii intensywności komórek pomiędzy sesjami.....	67
Porównanie intensywności fluorescencji na poziomie komórkowym.....	68
3.1.4. Zmiany aktywności RSC pomiędzy sesjami w teście odtwarzania pamięci.....	74
3.2. Reprezentacja neuronalna wskazówek o różnej złożoności w RSC.....	77
3.2.1. Wyniki behawioralne.....	77
3.2.2. Liczba komórek c-Fos pozytywnych dla różnych sesji behawioralnych.....	81
3.2.3. Zmiany aktywności komórek pomiędzy sesjami behawioralnymi.....	82
3.2.4. Czynniki determinujące aktywność komórki.....	84
3.2.5. Zmienność intensywności fluorescencji na przestrzeni sesji.....	85
3.2.6. Zależność zmian w reprezentacji neuronalnej od płci.....	93
3.2.7. Neurony selektywne względem sesji.....	94
3.2.8. Aktywacja całego mózgu w odpowiedzi na wskazówki wizualne różnego typu...	96
4. DYSKUSJA.....	100
Zaangażowanie kory retrosplenialnej na różnych etapach procesu uczenia.....	101
Rola RSC w nawigacji w zależności od typu wskazówki.....	103
Obrazowanie całego mózgu nie wykazało globalnych różnic w przetwarzaniu różnych typów wskazówek.....	105
c-Fos jako narzędzie wizualizacji engramu.....	109
Wyniki behawioralne.....	110
Wpływ płci na uczenie strategii przestrzennej.....	111
Ograniczenia paradygmatu eksperymentalnego.....	112
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	114
6. BIBLIOGRAFIA.....	115
SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH.....	131

STRESZCZENIE

Kora retrosplenialna (ang. *retrosplenial cortex*, *RSC*) jest ważnym węzłem komunikacyjnym pomiędzy sensorycznymi obszarami mózgu a strukturami odpowiadającymi za pamięć i nawigację w przestrzeni. Liczne badania potwierdzają jej zaangażowanie w przetwarzanie bodźców wzrokowych, a jedna z wiodących hipotez dotyczy roli RSC w zmianie perspektywy podczas eksploracji przestrzeni.

W niniejszej pracy zbadano nawigację myszy w zmodyfikowanym automatycznym labiryncie typu T w sytuacji, gdy wymagane jest elastyczne dostosowanie zachowania do warunków. Zastosowany paradygmat pozwolił na analizę dwóch wariantów eksperymentalnych. W pierwszym zachodziła zmiana strategii nawigacji z naturalnej tendencji do alternacji między ramionami labiryntu na nawigację kierowaną wskazówkami zewnętrznymi. W drugiej – zwierzęta już używające strategii opartej na złożonych wskazówkach wzrokowych zostały przetestowane w warunkach, w których dostępna była tylko część informacji znanych z treningu.

Przy użyciu przyżyciowej mikroskopii dwufotonowej wykazano, że w korze retrosplenialnej różnice w retencji aktywnych i rekrutacji nowych komórek w odpowiedzi na trening behawioralny są silnie zależne od interwału czasowego pomiędzy sesjami. Nie pozwala to na jednoznaczne scharakteryzowanie mechanizmów przetwarzania prezentowanych bodźców.

Stwierdzono również, że komórki aktywne w więcej niż jednej sesji testowej przejawiają inne tendencje w zmianie intensywności fluorescencji w zależności od tego, czy porównywane są sesje z ekspozycją na ten sam bodziec, czy też na różne. Efekt ten nie jest całkowicie zależny od kolejności prezentacji bodźców, nie jest jednak możliwe pełne odseparowanie tego czynnika bez przeprowadzenia dodatkowych badań.

Zastosowano analizę ekspresji białka c-Fos w całym mózgu w celu weryfikacji, czy użyte w treningu wskazówki o różnej złożoności są przetwarzane na istotnie różne sposoby. Po ekspozycji dwóch grup zwierząt na inne typy wskazówek nie wykazano różnic w aktywacji na poziomie globalnym. Przeanalizowano również związek gęstości komórek c-Fos+ ze zmiennymi behawioralnymi. Stwierdzono negatywną korelację na granicznym poziomie istotności pomiędzy długością treningu a aktywacją struktur odpowiedzialnych za rozpoznawanie obiektów, w tym kory okołowęchowej (PRC). PRC charakteryzowała

również większa gęstość komórek c-Fos⁺ w grupie myszy eksponowanych na wskazówkę typu landmark.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na obecność w RSC odrębnych populacji komórek o zróżnicowanej roli w zależności od stopnia dojrzałości śladu pamięciowego. Zastosowane techniki obrazowania nie pozwoliły jednak na separację aktywności neuronalnej odpowiedzialnej za nawigację od innych procesów zachodzących równolegle w RSC. Zaobserwowano również trend wiążący sposób postrzegania złożonego otoczenia z szybkością adaptacji do nowej strategii przestrzennej.

ABSTRACT

Retrosplenial cortex (RSC) is an important hub connecting sensory areas with brain structures engaged in spatial memory and navigation. Numerous studies confirm its involvement in processing of visual stimuli. One of the leading hypotheses postulates that RSC plays a crucial role in the ability to shift perspective during exploration of the environment.

This work investigates the mechanisms of mouse navigation in an automated T-maze in a paradigm where flexible adaptation to environmental changes is required. The chosen experimental design allowed us to conduct two separate studies. In the first one, mice underwent training leading up to a strategy shift from egocentric alternation to external visual cue-based. In the second one, animals well adapted to the allocentric spatial strategy based on cues with different degrees of complexity were tested in conditions of only partial access to the cues available during the training period.

Using two-photon in vivo microscopy we have shown that the differences in the cell turnover (retention and recruitment) during behavioral training is strongly dependent on the time interval between sessions. This makes it difficult to elucidate the underlying mechanisms of processing the presented cues.

We show that cells that are active in more than one test session display different patterns of change in fluorescence when comparing sessions with the same cue type versus two distinct ones. This effect is only partially affected by the order of cue presentation, but the two factors cannot be separated without introducing an extended protocol.

We used whole-brain c-Fos protein distribution analysis as a tool to verify whether the cues we used are processed in a conceptually distinct way. After exposing two experimental groups to different cue types we were not able to prove the existence of an effect on a global level. We investigated a possible link between c-Fos⁺ cell density and two behavioral variables. We have found a negative correlation between training duration and the activation of brain structures involved in object recognition, notably the perirhinal cortex (PRC). In the landmark-cue condition PRC exhibited an increased level of c-Fos⁺ in comparison with the context-cue condition.

In summary, the conducted research points to the existence of distinct cellular subpopulations in the RSC, which are differentially engaged during various stages of memory maturation. However, the employed imaging techniques did not allow for separation of the neural activity related specifically to navigation from other processes occurring in parallel

within the RSC. In addition, we observed a trend connecting differences in scene perception to the rate of acquisition of a new spatial strategy.

WYKAZ SKRÓTÓW

- 2p** (ang. *two photon*) - dwufotonowy (mikroskop)
- ABA** (ang. *Allen Mouse Brain Atlas*) - atlas mysiego mózgu Allena
- ADN** (ang. *anterodorsal thalamic nucleus*) - grzbietowe jądro przednie wzgórza
- ATN** (ang. *anterior thalamic nuclei*) - przednie jądra wzgórza
- BA** (ang. *Brodmann area*) - pole Brodmanna
- BSA** (ang. *bovine serum albumin*) - surowicza albumina wołowa
- BVC** (ang. *boundary vector cells*) - komórki granicy
- CC** (ang. *conjunctive cells*) - komórki kodujące łączone cechy przestrzenne
- CI** (ang. *confidence interval*) - przedział ufności
- CLR** (ang. *centered log-ratio*) - centrowana transformacja ilorazowo-logarytmiczna
- DBE** - eter dibenzylu
- DCM** - dichlorometan
- DMN** (ang. *default mode network*) - sieć stanu domyślnego
- DMSO** - dimetylosulfotlenek
- DTN** (ang. *dorsal tegmental nucleus*) - jądro grzbietowe nakrywki
- DTT** (ang. *diffusion tensor tractography*) - traktografia tensora dyfuzji
- EGFP** (ang. *enhanced green fluorescent protein*) - ulepszone białko zielonej fluorescencji
- EMM** (ang. *estimated marginal means*) - estymowane średnie marginalne
- GC** (ang. *grid cells*) - komórki siatki
- GEE** (ang. *generalized estimating equations*) - uogólnione równania estymujące
- GFP** (ang. *green fluorescent protein*) - białko zielonej fluorescencji
- GLM** (ang. *generalized linear model*) - uogólniony model liniowy
- HD** (ang. *head direction (cells)*) - (komórki) kierunku głowy
- HF** (ang. *hippocampal formation*) - formacja hipokampa
- IEG** (ang. *immediate early gene*) - gen wczesnej odpowiedzi
- LD** (ang. *lateral dorsal nucleus of thalamus*) - jądro boczno-grzbietowe wzgórza
- LEC** (ang. *lateral entorhinal cortex*) - boczna część kory śródwęchowej
- LED** (ang. *light-emitting diode*) - dioda emitująca światło
- LMN** (ang. *lateral mammillary nuclei*) - boczne jądra suteczkowate podwzgórza
- LOSO** (ang. *leave one subject out*) - diagnostyka obserwacji odstających przez analizę z wykluczeniem pojedynczych osobników

LOWESS (ang. *locally weighted regression and smoothing scatterplots*) - lokalnie wazone wygładzanie regresyjne

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

MAD (ang. *median absolute deviation*) - mediana odchyleń bezwzględnych

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

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

NA (ang. *numerical aperture*) - apertura numeryczna

NLPZ - niesteroidowe leki przeciwzapalne

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

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) - buforowany roztwór soli fosforanowych

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

PERMANOVA (ang. *permutational multivariate analysis of variance*) - permutacyjna wieloczynnikowa analiza wariancji

PFA (ang. *paraformaldehyde*) - pafarormaldehyd

PRC (ang. *perirhinal cortex*) - kora okołowęchowa

QIC (ang. *quasi-likelihood under the independence model criterion*) - kryterium quasi-wiarygodności przy modelu niezależnym

ROI (ang. *region of interest*) - obszar zainteresowania

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

rSD (ang. *robust standard deviation*) - odporne odchylenie standardowe

RT (ang. *room temperature*) - temperatura pokojowa

RTF (ang. *regulatory transcription factors*) - regulacyjne czynniki transkrypcyjne

SNR (ang. *signal-to-noise ratio*) - stosunek sygnału do szumu

VR (ang. *virtual reality*) - rzeczywistość wirtualna

1. WSTĘP

1.1. Pamięć przestrzenna i nawigacja

Nawigacja oparta na tworzeniu i przechowywaniu informacji przestrzennych jest jedną z podstawowych zdolności poznawczych. Podczas eksploracji otoczenia wszystkie organizmy posiadające zdolność poruszania się mają dostęp do ogromnej ilości bodźców. Na ich podstawie mogą budować reprezentację środowiska, która umożliwia wykonywanie szeregu kluczowych dla przetrwania zadań takich jak lokalizowanie zasobów, odnajdywanie drogi powrotnej do schronienia, planowanie dróg ucieczki i wiele innych. Reprezentacja ta - zwaną również mapą kognitywną (Tolman 1948) – nie jest tylko bezpośrednim zapisem geometrii i cech środowiska rejestrowanych za pomocą zmysłów. Zachowania obserwowane u licznych gatunków zwierząt wskazują na powszechne występowanie mechanizmów pozwalających na wyznaczanie nowych, wcześniej nie eksplorowanych tras na podstawie wiedzy na temat środowiska, co uznawane jest za definiującą cechę mapy kognitywnej (Wiener i in. 2011). Jednym z najbardziej fascynujących przykładów są obserwacje rudawców nilowych (*Rousettus aegyptiacus*), które wykazały, że zwierzęta te są zdolne do tworzenia skrótów pomiędzy dwoma odwiedzionymi wcześniej punktami w trakcie żerowania. Co więcej, odnajdują one również drogę do żerowiska po przemieszczeniu we wcześniej nieznane miejsce, znajdujące się w pobliżu granic ich terytorium.

Odtworzenie obserwowanych w naturze zachowań w kontekście laboratoryjnym umożliwiło przejście od opisu behawioru do badania jego podłoża neuronalnego. Pionierskie eksperymenty Tolmana przeprowadzone na szczurach wykazały umiejętność odnajdywania przez nie w labiryncie skrótów, które minimalizowały czas przemieszczania się między punktami, w których zwierzęta otrzymywały nagrodę (Tolman i Honzik 1930). Szczury były również w stanie znaleźć alternatywne ścieżki, gdy wcześniej im znane zostały zablokowane (Tolman, Ritchie, i Kalish 1946). Znaczące jest, że już Tolman zaproponował rozszerzenie definicji mapy kognitywnej jako ogólnego, wykraczającego poza zagadnienia pamięci przestrzennej schematu organizacji informacji o świecie, pozwalającego na podejmowanie elastycznych decyzji i wyciąganie wniosków na podstawie wcześniejszych obserwacji. (Tolman 1948). Rozwój wielkoskalowych modeli mózgu umożliwił teoretyczną eksplorację tej hipotezy na wyższych poziomach abstrakcji (Behrens i in. 2018).

Chociaż w procesie powstawania mapy kognitywnej wykorzystywane są również pozostałe zmysły, takie jak węch, słuch czy zmysł magnetyczny, najlepiej przebadany jest udział informacji wzrokowej (Fischler-Ruiz i in. 2021; Shirdhankar i Malkemper 2024). W pewnym stopniu wyraża to przywiązanie do ludzkiej hierarchii zmysłów, ale też wiąże się ze stabilnością i względną łatwością kontroli nad wskazówkami wizualnymi. Na ich podstawie możliwa jest ogólna identyfikacja przestrzeni (kontekstu), w której znajduje się podmiot, jak i też określenie konkretnego położenia w danym środowisku. Dokładne ustalenie lokalizacji zależne jest od punktów orientacyjnych – dyskretnych, charakterystycznych elementów otoczenia lub nieciągłości w panoramie (Mitchell i in. 2018).

Nawigacja w oparciu o zewnętrzne wskazówki nie zawsze jest możliwa lub bywa znacząco utrudniona – przykładowo w obszarach pustynnych, polarnych lub w ciemności. W sytuacji braku stabilnych, unikalnych cech otoczenia, dominującym mechanizmem staje się integracja ścieżki (*path integration, dead reckoning*) (Mittelstaedt i Mittelstaedt 1980). Pustynne mrówki z rodzaju *Cataglyphis* znajdują najkrótszą ścieżkę powrotu do gniazda mimo przebycia w jednolitym środowisku znacznie dłuższej drogi z wieloma zmianami kierunku podczas żerowania (Wehner i Srinivasan 1981). Eksperymenty z manipulacją długości odnóży owadów wskazują, że mrówki te używają m. in. liczby i długości kroków do określenia położenia (Wittlinger, Wehner, i Wolf 2006). Obserwacje pszczoł sugerują, że są one w stanie znaleźć pokarm na podstawie przekazanych im przez innych członków roju informacji na temat odległości i kątów na drodze do źródła pożywienia (von Frisch 1967). Integracja ścieżki opiera się na śledzeniu własnego ruchu, na co składają się kierunek poruszania, prędkość oraz sygnały z układu przedsionkowego (McNaughton i in. 2006).

Nawigacja w oparciu o mapę kognitywną oraz integracja ścieżki to mechanizmy komplementarne i w wielu przypadkach ściśle współpracujące ze sobą. Poruszając się, zwierze na bieżąco szacuje swoje położenie względem punktu startowego i w miarę zdobywania nowych informacji, buduje mapę poznawczą. Stabilna mapa natomiast weryfikuje hipotezy postawione na bazie informacji skumulowanych w trakcie ruchu.

Komplementarność opisanych strategii zdefiniowana jest przez różnicę perspektywy, którą oferuje każda z nich. Mapa kognitywna opisuje środowisko przy użyciu jego obiektywnych cech, ich wzajemnych relacji i położenia względem zewnętrznego układu współrzędnych. W literaturze jest to określane mianem allocentrycznego układu odniesienia (*allocentric frame of reference*). Integracja ścieżki zakłada umiejscowienie agenta

eksplorującego dany obszar jako punktu referencyjnego. Obie perspektywy spotykają się przy badaniu interakcji podmiotu z otoczeniem w egocentrycznym układzie odniesienia. Analogiczna dychotomia istnieje w definicji dwóch rodzajów pamięci deklaratywnej: pamięć semantyczna odnosi się do ogólnej wiedzy o świecie, podczas gdy pamięć epizodyczna jest zapisem zdarzeń z perspektywy podmiotu, który ich doświadczył w konkretnym momencie swojej przeszłości (Tulving i Donaldson 1972). Buzsáki i Moser podkreślają analogię między zewnętrzną perspektywą w przypadku zarówno pamięci semantycznej, jak i mapy kognitywnej. Z drugiej strony wskazują na związek między egocentrycznym punktem odniesienia oraz istotną rolę czasu w pamięci epizodycznej oraz integracji ścieżki. Jest to punktem wyjścia do postawienia hipotezy, że mechanizmy nawigacji umożliwiły ewolucję procesów pamięciowych (Buzsáki i Moser 2013).

Chociaż posiadanie pamięci epizodycznej przez zwierzęta inne niż ludzie jest kwestią sporną, istnieją przykłady, gdzie pamięć przestrzenna wydaje się mieć z nią związek wykraczający poza stanowienie tła dla wspomnień (Morris 2001). Ptaki z rodziny kolibrowatych takie jak rudaczki północne (*Selasphorus rufus*) są w stanie zapamiętać nie tylko położenie kwiatów, ale również częstotliwość uzupełniania zasobów nektaru (Henderson i in. 2006). Modrowronki zaroślowe (*Aphelocoma coerulescens*) uzależniają kolejność odwiedzania kryjówek z żywnością od trwałości ukrytego w nich pokarmu, a po pewnym czasie porzucają te, w których znajdowały się najmniej trwałe zasoby (Clayton i Dickinson 1998). W badaniach zachowań tego typu używa się pojęcia “pamięć o cechach epizodycznych” (*episodic-like memory*), dla podkreślenia nadal istniejących na tym polu kontrowersji. Podjęto również próby zdefiniowania i zaobserwowania jej w warunkach laboratoryjnych, jako zjawiska szczególnie istotnego dla zrozumienia podstaw ludzkich chorób neurodegeneracyjnych (Sato 2021).

1.2. Obwód neuronalny pamięci przestrzennej

Początek badań nad neuronalnymi podstawami pamięci leży u zbiegu trzech nurtów naukowych, rozwijających się równolegle na przełomie XIX i XX wieku. Zainteresowanie pamięcią wykazywali naukowcy zajmujący się ludzką psychologią, naturalnym zachowaniem zwierząt i fizjologią układu nerwowego. Niemiecki zoolog Richard Semon zdefiniował pojęcie engramu, oznaczające trwałą zmianę zachodzącą w układzie nerwowym przy powstawaniu wspomnienia (Semon b.d.). Pierwotnie teorie Semonu były ignorowane jako

niewystarczająco precyzyjne i pozbawione poparcia w dowodach, okazały się jednak istotne dla rozwoju badań nad pamięcią w nadchodzących dekadach (Tonegawa i in. 2015).

Pierwsze jakościowe badania nad ludzką pamięcią przypisywane są H. Ebbinghausowi, który w drugiej połowie XIX wieku analizował procesy związane z tworzeniem i przywoływaniem pamięci (Ebbinghaus 1885; Moser, Kropff, i Moser 2008). Równolegle w laboratoriach wczesnych behawiorystów powstawały definicje i narzędzia do badań nad uczeniem u zwierząt. Eksperymenty Konorskiego, Hulla, Watsona, Skinnera i Pawłowa w znacznej mierze skupiały się na mechanizmach tworzenia zależności między bodźcem a reakcją (Hull 1950; Konorski 1967; Skinner 1934; Watson 1919). Na tym fundamencie powstawały bardziej abstrakcyjne teorie dotyczące funkcji poznawczych jak wcześniej wspomniane prace Tolmana oraz syntetyczne względem wcześniejszych hipotez propozycje Restle'a (Restle 1957). Trzecim elementem były badania nad neuronalnymi korelatami zachowania. Karl Lashley badał wpływ lezji obszarów kory mózgowej o różnej lokalizacji i rozległości na odnajdywanie przez szczury drogi w labiryncie. Choć nie doprowadziły one do wskazania konkretnej struktury odpowiedzialnej za pamięć i uczenie, dowiodły wyraźnego związku tych manipulacji z behawiorem (Lashley i McCarthy 1926). Wywarły też znaczący wpływ na idee Hebba, inspirując postrzeganie mózgu jako sieci współpracujących ośrodków, a nie wyłącznie niezależnych elementów. Wraz z pracami wczesnych elektrofizjologów stworzyło to grunt na którym powstała Hebbowska teoria uczenia (Hebb 1949). Należy przy tym wspomnieć, że chociaż koncepcja Hebba zyskała większy rozgłos na arenie międzynarodowej, wczesne prace teoretyczne Jerzego Konorskiego nad odruchami warunkowymi i powstawaniem skojarzeń synaptycznych poprzedzały jej publikację. Obaj badacze postulowali, że powtarzająca się współaktywacja neuronów może prowadzić do trwałych zmian w sile połączeń synaptycznych, co dziś uznaje się za podstawę plastyczności Hebbowskiej (Finger i Finger 2001; Zieliński 2006).

Przełom przyniósł słynny przypadek pacjenta HM, opisany w 1957 roku. Henry Molaison został poddany operacji, mającej na celu wyleczenie uciążliwej epilepsji. W jej trakcie usunięto część przyśrodkowego płata skroniowego, w tym hipokamp, ciało migdałowe i część kory śródwęczowej, czego skutkiem była utrata możliwości formowania nowych wspomnień. W konsekwencji hipokamp oraz powiązane z nim struktury płata skroniowego – formację hipokampa – znalazły się w centrum zainteresowania badań nad mechanizmami pamięci. (McClelland, McNaughton, i Oreilly 1995; Scoville i Milner 1957). Obserwacje tragicznych konsekwencji eksperymentalnej operacji mającej wyleczyć epilepsję

zaowocowały gwałtownym wzrostem zainteresowania eksperymentami nad funkcją hipokampa także u zwierząt. Szczury z uszkodzeniem hipokampa wykazywały deficyty w wykonywaniu zadań wymagających uczenia się i elastyczności zachowań w odpowiedzi na zmiany w środowisku. Pionierskie badania elektrofizjologiczne O'Keefe'a i Dostrovsky'ego doprowadziły do odkrycia neuronów miejsca (*place neurons*), których częstość wyładowań zależała od lokalizacji szczura w przestrzeni (O'Keefe i Dostrovsky 1971). Mając na uwadze różnorodność funkcji, na które wpływ ma dysfunkcja hipokampa, O'Keefe i Nadel zaproponowali kilka lat później teorię, według której mapa kognitywna jest fizycznie umiejscowiona w hipokampie. Tym samym wskrzesili oni idee Tolmana, jednocześnie wskazując lokalizację proponowanej mapy i opisując pierwsze jej poznane cechy (O'Keefe i Nadel 1978). Badania nad komórkami miejsca wykazały, że chociaż zwykle ich aktywność powiązana jest z wizualnymi cechami środowiska, w ciemności odpowiadają one na tę samą lokalizację. Przeprowadzono również eksperymenty wskazujące na kształtowanie komórek miejsca przez inne modalności sensoryczne. Oznacza to, że są one wysokopoziomowym efektem integracji prostszych składowych o znaczeniu przestrzennym i jest kolejnym dowodem na ścisły związek między strategią nawigacyjną opartą na mapie i integracją ścieżki (Jeffery 2007). Ważną cechą komórek miejsca jest ich wrażliwość na zmiany w środowisku. Modyfikacja fizycznych właściwości otoczenia powoduje, że niektóre z nich zmieniają swój wzorzec wyładowania. Proces ten jest określany mianem remapowania (*remapping*). Gdy zwierzę jest przeniesione w zupełnie inne miejsce lub cechy środowiska są trwale zmienione, zachodzi remapowanie globalne (*global remapping*) – komórki miejsca zmieniają lokalizację, w której następują ich wyładowania. W odpowiedzi na nowe informacje na temat znanego otoczenia zachodzi remapowanie częstościowe (*rate remapping*), polegające na zmianie natężenia wyładowań komórek bez zmiany pola miejsca (*place field*) (Kubie, Levy, i Fenton 2020; S. Leutgeb i in. 2005; O'Keefe i Conway 1978).

Doniosłość odkrycia komórek miejsca wpłynęła na dynamiczny rozwój badań nad reprezentacją przestrzeni w mózgu. Badacze usiłowali zrozumieć mechanizmy prowadzące do powstawania tego wzorca aktywności poprzez rejestrację aktywności neuronów zlokalizowanych w obszarach posiadających bezpośrednie połączenia z regionami hipokampa, w których zarejestrowano komórki miejsca. Doprowadziło to do odkrycia w grzbietowej części kompleksu podpory (ang. *dorsal presubiculum*, *postsubiculum*) komórek kierunku głowy (*head-direction cells*, HD) u swobodnie poruszających się szczurów. Ich aktywność jest związana z kierunkiem i zwrotem wektora przechodzącego

przez środek głowy i nos zwierzęcia w płaszczyźnie równoległej do podłoża i niezależna od innych składowych zachowania i położenia w danym momencie – pełnią więc rolę swego rodzaju kompasu (Ranck 1985; Taube, Muller, i Ranck 1990).

Podczas gdy wiele spośród typów komórek modulowanych przestrzennie zostało zidentyfikowanych w więcej niż jednej strukturze, komórki HD są wyraźnie najbardziej rozpowszechnione. Występują zarówno w strukturach podkorowych (bocznych jądrach suteczkowatych podwzgórza (LMN), grzbietowym jądrze przednim wzgórza (ADN), grzbietowym jądrze nakrywki (DTN)), formacji hipokampalnej (pre-, para-, postsubiculum, przyśrodkowej części kory śródwęchowej (MEC)), jak i w korze nowej (RSC), integrując bodźce wzrokowe, informacje motoryczne i sygnały z układu przedsionkowego (Peyrache i in. 2019; Sharp, Blair, i Cho 2001). W badaniach nad komórkami HD wszystkie te struktury określa się wspólnym mianem obwodu kierunku głowy (*head-direction circuit*). Wiele z tych struktur wchodzi również w skład klasycznego obwodu Papeza. Obwodowi temu pierwotnie przypisywano rolę w przetwarzaniu emocjonalnym, obecnie istnieje więcej dowodów wiążących go z pamięcią, w szczególności epizodyczną (Taube 1998).

Właściwości komórek HD czynią ten obwód idealnym kandydatem do opisanie za pomocą sieci atraktorowych – kodują zmienną ciągłą, która zmienia się płynnie, jest odporna na perturbacje i reprezentuje lokalne pobudzenie i globalne hamowanie. Topologia reprezentowana przez populację znajduje naturalne odwzorowanie w strukturze atraktora pierścieniowego (*ring attractor*). Przez lata powstały liczne modele wykorzystujące te cechy i integrujące nowe odkrycia z badań nad funkcją obwodu HD (Skaggs i in. 1995; Song i Wang 2005; Zhang 1996).

Kolejną klasą komórek, której odkrycie było monumentalnym przełomem w badaniach nad nawigacją przestrzenną, są komórki siatki (*grid cells*, GC). Są one aktywne w wielu punktach, tworzących trójkątną sieć pokrywającą środowisko, w którym znajduje się zwierzę. Po raz pierwszy odkryto ich obecność w środkowej części kory śródwęchowej (Fyhn i in. 2004), obecnie wiadomo, że występują również w pre- i parasubiculum (Boccaro i in. 2010). Stabilność komórek siatki w ciemności i badania wykorzystujące lezje MEC wskazują na pełnienie przez nie roli w integracji ścieżki (Allen i in. 2014). Do pewnego stopnia są modulowane przez wskazówki zewnętrzne – rotacja punktów orientacyjnych powoduje rotację sieci. Zmiana zachodzi w sposób zsynchronizowany w całej powiązanej ze sobą populacji komórek siatki, co sugeruje, że ich funkcjonowanie opiera się na dynamice

atraktorowej (Hafting i in. 2005; McNaughton i in. 2006). Analiza aktywności komórek sieci wykazuje, że powiązania między nimi ograniczają repertuar stanów reprezentowanych przez całą ich populację do nisko wymiarowej przestrzeni o topologii torusa (Gardner i in. 2022). Reprezentacja ta jest stała nawet w warunkach, w których zachodzi remapowanie komórek miejsca w hipokampie. Popiera to tezę o wewnętrznej strukturze odpowiadającej sieci atraktorowej.

Przez ponad 50 lat od odkrycia komórek miejsca wyróżniono liczne klasy neuronów modulowanych przestrzennie. Z geometrią środowiska powiązane są komórki granicy (*border cells*, *boundary vector cells*, BVC), reagujące na fizyczne granice obszaru. Odrębną grupą są komórki reprezentujące obiekty w środowisku. Wykazano istnienie zarówno komórek aktywnych w odpowiedzi na obecność przedmiotów (*object cells*), jak i ich usunięcie ze znanego obszaru (*object-trace cells*). Badacze wykazują jednak dużą ostrożność przy definiowaniu tego typu komórek jako typowo przestrzennych – wymaga to precyzyjnego rozgraniczenia między kodowaniem cech obiektu a jego położeniem (Knierim, Neunuebel, i Deshmukh 2014; O’Keefe 1999). Komórki śladu obiektu ponadto wprowadzają komponent czasowy, co może wiązać je z pamięcią epizodyczną (Grieves i Jeffery 2017). Komórki obiektu o cechach przestrzennych zidentyfikowano w przedmurzu (*claustrum*) (Jankowski i O’Mara 2015) i bocznej części kory śródwęczowej (*lateral entorhinal cortex*, LEC). LEC nie wykazuje modulacji przestrzennej ani w środowisku jednolitym, ani z odległymi punktami orientacyjnymi. Poza reagowaniem na przedmioty obecne w otoczeniu, zachowuje pamięć o obiektach usuniętych, w postaci neuronów śladu obiektu (Knierim i in. 2014; Tsao, Moser, i Moser 2013).

Szczególnie ważne w integracji ścieżki mogą być komórki, które nie kodują geometrii środowiska, a opisują wewnętrzne doświadczenie zwierzęcia związane z przemieszczaniem się w przestrzeni. Do takich należą przykładowo komórki prędkości (*speed cells*), znalezione w MEC (Kropff i in. 2015). Częstość wyładowań tych komórek pozytywnie koreluje z prędkością poruszania się zwierzęcia i jest niezależna od kierunku i kontekstu. Ta właściwość i umiejscowienie w obwodzie hipokampalnym sugeruje, że wraz z komórkami HD dostarczają one sygnału kształtującego sieć komórek GC. W obwodzie HD znaleziono również komórki prędkości kątowej, które determinują aktywność komórek kierunku głowy (Chen i in. 1994).

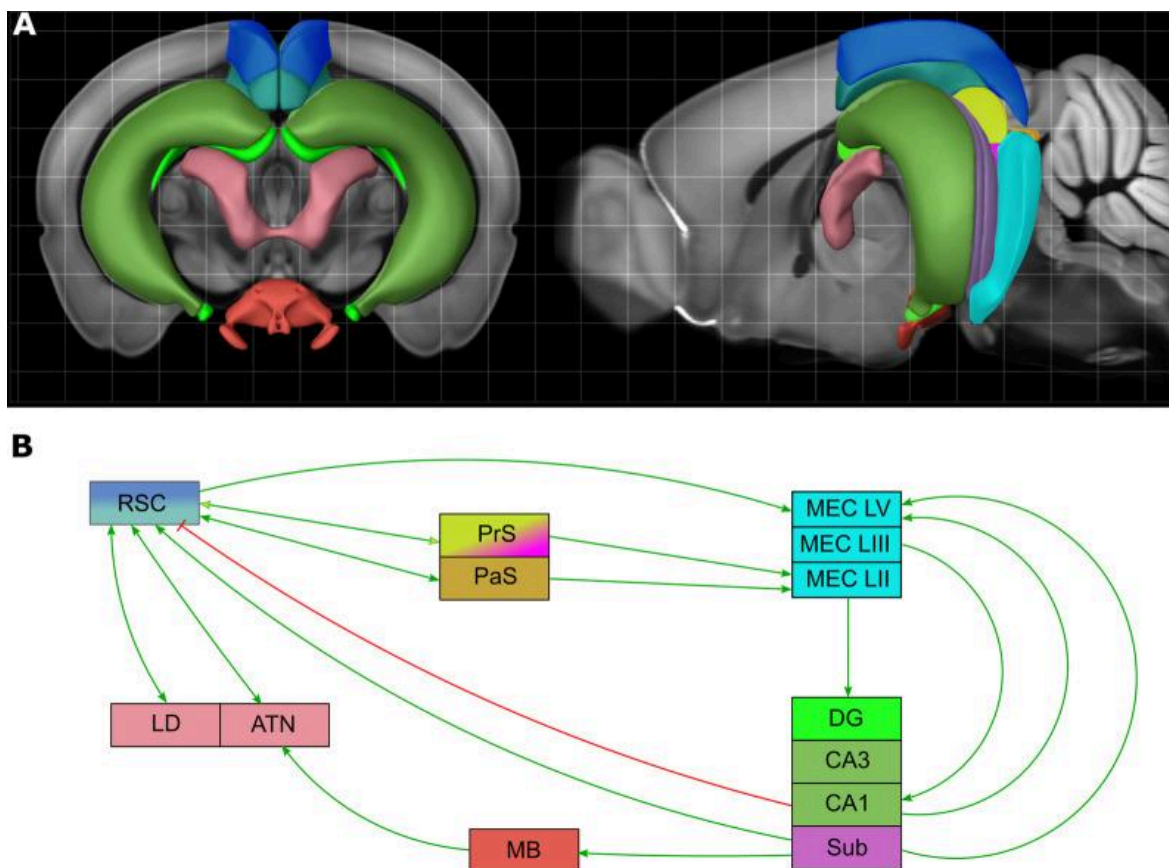
W wielu strukturach obwodu pamięci przestrzennej poza komórkami, których aktywność można powiązać z jedną, ściśle zdefiniowaną zmienną, występują takie, które kodują kilka aspektów jednocześnie (*conjunctive cells*, CC). Przykładowo, niektóre z komórek siatki w MEC są aktywne tylko gdy zwierzę zwrócone jest w konkretnym kierunku (Sargolini i in. 2006), podobnie istnieją też modulowane orientacją komórki miejsca w RSC (Cho i Sharp 2001). Co ciekawe, wiele z nich przewidzianych jest przez modele teoretyczne (Milford, Wyeth, i Prasser 2006). Ich obecność wyjaśnia m. in. przyjęcie Hebbowskiego modelu uczenia. Rolą CC może być integracja informacji w celu optymalizacji obliczeniowej i wzmocnienia odporności na szum w sygnale wejściowym.

Istnienie komórek CC pokazuje, że badanie i klasyfikacja komórek modulowanych przestrzennie wymaga uważnej konstrukcji zadania behawioralnego i grup kontrolnych. Ograniczenie repertuaru zachowań zwierzęcia lub dostępu do bodźców może prowadzić do zniekształcenia informacji kodowanej przez komórki. Paradygmat, który uniemożliwia eksplorację jednego z wymiarów, które koduje dana komórka typu CC skutkowałaby interpretacją nie odzwierciedlającą pełnego spektrum funkcji badanej populacji. Przykładem są różnice między eksperymentami na swobodnie poruszających się zwierzętach i przeprowadzonych w rzeczywistości wirtualnej (*virtual reality*, VR). Porównanie wyników ze zwierząt nawigujących w podobnych środowiskach, z czego jedno było rzeczywiste, a drugie było jego wersją VR, pokazały, że komórki miejsca mają większe pola odpowiedzi i mniejszą zawartość informacji przestrzennej (*spatial information content*) (Chen i in. 2018). U myszy, które w trakcie nawigacji w VR miały unieruchomione głowy, zidentyfikowano w RSC komórki odpowiadające definicji hipokampalnych PC. Takich komórek jednak nie znaleziono u swobodnie poruszających się szczurów. Ta różnica jest najprawdopodobniej efektem kumulacji czynników takich jak różnice paradygmatów i międzygatunkowe, eliminacja bodźców z układu przedsionkowego i ograniczenie perspektywy do jednej sceny wizualnej (Alexander i in. 2023).

Ogromna większość badań nad kodowaniem przestrzeni w mózgu skupia się na cechach geometrycznych środowiska. Coraz więcej uwagi przyciąga podejście naturalistyczne, biorące pod uwagę wpływ aspektów społecznych i terytorialnych na reprezentację przestrzeni (Duveller i Jeffery 2018; Omer i in. 2018; Robson i in. 2024).

1.3. Rola kory retrosplenialnej w pamięci przestrzennej

Ostatnie dekady przyniosły rozwój narzędzi i koncepcji, które zmieniły spojrzenie na funkcję kory retrosplenialnej. Unikalne położenie i gęsta sieć połączeń między RSC a formacją hipokampalną, korą wzrokową oraz wzgórzem wskazują na jej rolę jako węzła komunikacyjnego między obszarami sensorycznymi a strukturami odpowiedzialnymi za pamięć i nawigację (Ryc 1.). Bliższe spojrzenie na neuroanatomie obwodu pamięci przestrzennej pokazuje jednak, że między wzgórzem a HF występują także bezpośrednie połączenia, zatem szczególnie interesujące jest, co wyróżnia wkład RSC w tej konfiguracji (Sugar i in. 2011; Vann, Aggleton, i Maguire 2009). Rola RSC nie ogranicza się do jej udziału w pamięci przestrzennej – wykazano, że jest ona częścią sieci stanu domyślnego (*default mode network, DMN*), której aktywność związana jest ze stanami, w których uwaga nie jest skupiona na przetwarzaniu bodźców z otoczenia, a skierowana “do wewnątrz”. Zachodzą wtedy takie procesy jak przywoływanie wspomnień, planowanie, wyobrażanie i wiele innych abstrakcyjnych, wysokopoziomowych zadań poznawczych (Alexander i in. 2023; Raichle 2015). Ponadto, desynchronizacja pomiędzy RSC a wzgórzem prowadzi do powstawania stanów dysocjacyjnych, co również implikuje zaangażowanie w integrację pomiędzy perspektywą wewnętrzną a zewnętrzną (Vesuna i in. 2020).



Ryc. 1: Obwód pamięci przestrzennej. A. Rozmieszczenie poszczególnych struktur w mózgu myszy. Kolory odpowiadają schematowi B. Wizualizację wykonano na podstawie atlasu Mouse Common Coordinate Framework, Allen Institute. B. Diagram w uproszczeniu prezentujący połączenia RSC. DG zakręt zębaty, CA1, CA3 (łac. *cornu ammonu*) pola hipokampa, Sub kompleks podpory, PrS przedpodpora, PaS przypodpora, MEC kora śródwęchowa, ATN przednie jądra wzgórza, LD boczno-grzbietowe jądra wzgórza, MB ciała suteczkowate. Na podstawie publikacji własnej.

Uszkodzenia kory retrosplenialnej u ludzi były związane z dezorientacją przestrzenną już w 1929 roku (Ironsides i Guttmacher 1929). Jednak te i późniejsze podobne doniesienia wiążą się z niepewnością wynikającą z niemożności wykluczenia wpływu sąsiadujących struktur. Już zresztą sama definicja RSC u ludzi jak i innych naczelnych jest niejednoznaczna w związku z różnicami występującymi w zależności od kryterium klasyfikacji - anatomicznego, histologicznego lub połączeniowego. Każde z tych kryteriów wiąże się z odrębnymi wyzwaniami – na obecnym etapie mapowanie aktywności zarejestrowanej przy pomocy funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI) na histologię często nie jest możliwe. Z kolei większość danych dotyczących połączeń RSC u naczelnych pochodzi od makaków (Alexander i in. 2023; Vann i in. 2009).

U naczelnych RSC znajduje się wzdłuż grzbietowo-tylnego odcinka bruzdy ciała modelowatego, na przyśrodkowej powierzchni płata potyliczno-ciemieniowego. Jest położona głęboko i w dużej mierze niewidoczna na powierzchni przyśrodkowej, co czyni ją strukturą trudno dostępną. Dla porównania, u gryzoni leży ona tuż pod powierzchnią czaszki, zajmuje też znacznie większy obszar w stosunku do wielkości mózgu. Pozwala to na prowadzenie szczegółowych badań bez naruszania innych struktur – co za tym idzie, mając pewność, że za efekt odpowiedzialna jest RSC. Ponadto u gryzoni rozgraniczenie między częścią granularną (*granular retrosplenial cortex*, RSCg), a agrularną (*agranular retrosplenial cortex*, RSCa) jest bardziej wyraźne, podczas gdy u naczelnych to przejście jest bardziej płynne. U gryzoni RSCg w zasadzie odpowiada polu Brodmanna 29 (BA29), a RSCa – polu Brodmanna 30 (BA30) (Kobayashi i Amaral 2000; Milczarek i Vann 2020; Vogt i Paxinos 2014). Cechy te ułatwiają pracę eksperymentalną od strony technicznej, jednak wyzwaniem pozostaje konstrukcja paradygmatów badawczych w taki sposób, by wykorzystując repertuar zachowań gryzoni móc wyciągać wnioski dotyczące złożonych hipotez dotyczących RSC.

Rozważania nad rolą RSC w pamięci przestrzennej obejmują wiele aspektów i rodzą kilka zasadniczych pytań. Jakie jest zaangażowanie tej struktury na różnych etapach tworzenia wspomnień? Na jaki rodzaj wskazówek odpowiada RSC? Jaki jest funkcjonalny związek między RSC i HF?

Istnieje obecnie wiele wersji teorii konsolidacji pamięci, łączy je jednak założenie, że wraz z dojrzewaniem śladu pamięciowego rośnie udział struktur korowych w jego utrzymaniu i odtwarzaniu, pierwotnie zależnym od hipokampa (Anagnostaras, Maren, i Fanselow 1999; Bontempi i in. 1999; Cowansage i in. 2014; Marr 1971). Rola RSC w przechowywaniu wiedzy zdobytej przed upływem dłuższego czasu (ang. *remote memory*) jest dobrze udokumentowana. W niektórych badaniach uszkodzenia RSC wkrótce po utworzeniu śladu pamięciowego miały znacznie mniejszy wpływ na jego utrzymanie niż kiedy między uczeniem a leżą minęły przynajmniej 24 h (Buckley i Mitchell 2016). Jednocześnie dowiedziono, że w niektórych zadaniach behawioralnych RSC jest aktywowana już we wczesnych etapach treningu, nawet w skali minut (Nonaka i in. 2017). Może być to związane z teorią schematu przestrzennego (*spatial schema*) – według której uczenie odbywa się na bazie stopniowo gromadzonych informacji na temat środowiska i panujących w nim reguł. Gdy taki schemat już istnieje, uczenie się nowych relacji między jego elementami polega na wprowadzaniu do niego zmian, nie zaś na tworzeniu całkowicie nowych

reprezentacji neuronalnych. Rolę schematu może pełnić przykładowo trening w labiryncie T – rodzaj i geometria labiryntu oraz sposób dostarczania nagród są niezmiennie. Nagroda jest wydawana po skręcie w odpowiednie ramię, powiązane ze wskazówką. Jeżeli zwierzę nauczy się tych zasad, a po pewnym czasie zostaną wprowadzone nowe rodzaje wskazówek – kora może być angażowana już na początkowym etapie ich uczenia (Mitchell i in. 2018; Morris 2006; Tse i in. 2011).

Bezpośrednie połączenie kory wzrokowej z RSC wskazują na istotność bodźców wizualnych dla procesów w niej zachodzących. Pokazują to bezpośrednio eksperymenty na myszach przebywających pod anestezją, eksponowanych selektywnie na bodźce wzrokowe (Murakami i in. 2015).

Badania funkcjonalne w rezonansie magnetycznym wykorzystujące traktografię tensora dyfuzji (*diffusion tensor tractography*, DTT) wykazują, że obszary wzrokowe u ludzi łączą się głównie z regionem RSC znanym też jako pole 30 według Brodmanna (BA30) (Li i in. 2018). U szczurów większość informacji wzrokowej trafia również do agranularnej części RSC (sygnał z pierwotnej kory wzrokowej BA17 oraz wtórnej kory wzrokowej BA18), wtórna kora wzrokowa łączy się jednak jednokierunkowo również z RSCg. Sugeruje to niejako podział obowiązków między obszarami RSC, szczególnie wyraźny przy wzięciu pod uwagę pozostałych połączeń (van Groen i Wyss 1990, 1992, 2003). RSCa na bieżąco przetwarza bodźce wzrokowe, a RSCg, gęsto połączona z HF, korzysta już ze wstępnie przetworzonej przez wtórną korę wzrokową informacji o wizualnych cechach otoczenia i rozpatruje ją w kontekście przestrzennym (Aggleton i in. 2021). Taka interpretacja jest zgodna z obserwacjami zachowania szczurów z leżą w obrębie RSCg, które wykazują deficyty w nawigacji (van Groen, Kadish, i Wyss 2004).

Komórki kierunku głowy są modulowane poprzez sygnał wzrokowy, jak i pochodzący z układu przedsionkowego – na ich aktywność wpływa rotacja wskazówek zewnętrznych i ruch głowy zwierzęcia (Blair i Sharp 1996). Wykazano, że w RSC występują komórki HD powiązane z każdym z tych rodzajów bodźców osobno, ale również zależne od obu jednocześnie – łączą one zatem perspektywę wewnętrzną i zewnętrzną (Sit i Goard 2023). Dla komórek HD modulowanych wizualnie, ważnym rodzajem wskazówki wizualnej jest w tym przypadku punkt orientacyjny (*landmark*), ze względu na wyraźne ograniczenie przestrzenne i wyróżnianie się z panoramy tła. Potwierdzono, że neurony w RSC tworzą stabilne reprezentacje punktów orientacyjnych i rozróżniają je pomiędzy sobą, gdy

w otoczeniu znajduje się ich więcej (Jacob i in. 2017; Lozano i in. 2017). Kodują również związek przestrzenny pomiędzy wskazówką a nagrodą (Fischer i in. 2020). RSC tworzy zatem reprezentacje punktów orientacyjnych i szeregu informacji na temat ich położenia względem podmiotu oraz innych istotnych elementów środowiska oraz związku z kontekstem, ponownie łącząc ramy odniesienia (Chang i in. 2020).

Jednym z interesujących aspektów kodowania punktów orientacyjnych, ponieważ wychodzących poza ich cechy wizualne, jest ich stabilność, definiowana jako przydatność w nawigacji. Co ciekawe, w badaniach na ten temat ponownie pojawiają się zewnętrzna i wewnętrzna rama odniesienia. Eksperymenty na szczurach poddawanych dezorientacji przestrzennej pokazują, że wskazówki, których podmiot nie jest w stanie powiązać z wewnętrznym poczuciem kierunku, nie modulują aktywności komórek kierunku głowy (Knierim, Kudrimoti, i McNoughton 1995). U ludzi natomiast pokazano, że prezentacja wskazówek, które występują w wielu kontekstach, nie powoduje aktywacji RSC, w przeciwieństwie do tych, które związane są z konkretnym, wyjątkowym miejscem (Auger, Mullally, i Maguire 2012; Auger, Zeidman, i Maguire 2015).

Zarówno trwała jak i przejściowa inaktywacja RSC prowadzi do deficytów w zadaniach przestrzennych w ciemności, bez wpływu na wyniki tych samych zwierząt wykonujących to samo zadanie w oświetlonym pomieszczeniu (Cooper i Mizumori 1999; Elduayen i Save 2014). Wskazuje to na ważną rolę kodowanych w RSC zmiennych powiązanych z prędkością kątową zwierzęcia w minimalizacji błędu akumulowanego w procesie integracji ścieżki. Eksperymenty w ciemności pokazują również, że RSC rejestruje informację dotykową. Co ciekawe, sposób reprezentacji tych danych wykazuje podobieństwa do tego, jak kodowane są wizualne punkty orientacyjne – zidentyfikowano m. in. neurony kodujące odległość od lokalizacji, gdzie nastąpił bodziec i jego powiązanie z kontekstem i nagrodą (Lande i in. 2023).

1.4. Behawioralne metody badania pamięci

Wprowadzenie przez Ebbinghause pod koniec XIX wieku metod ilościowych w badaniach nad pamięcią oraz rozwój koncepcji wczesnych behawiorystów umożliwiły zdefiniowanie obserwowalnych aspektów procesów uczenia, wychodząc poza ramy introspekcji. Wśród paradygmatów behawioralnych szczególne miejsce zajmują labirynty różnego typu. Jednym z pierwszych opisanych przypadków zastosowania labiryntu są

badania Willarda Smalla z przełomu XIX. i XX. wieku (Small 1901). Intencją badaczy było stworzenie narzędzia, w którym będą oni w stanie precyzyjnie kontrolować warunki, jednocześnie tworząc środowisko zbliżone do naturalnego poprzez imitację struktury tuneli budowanych przez szczury. Warto podkreślić, że osiągnięcie balansu między tymi dwoma aspektami układu behawioralnego jest dążeniem również wielu współczesnych eksperymentatorów. To pionierskie badanie było skupione przede wszystkim na obserwacji zachowania zwierząt i stawianiu hipotez na temat wewnętrznych procesów mentalnych będących jego podłożem. Chociaż z perspektywy czasu wnioski z niego wyciągnięte przyjmowano ze sceptycyzmem ze względu na silną antropomorfizację biorących udział w badaniu szczurów, Small zwrócił uwagę na liczne czynniki eksplorowane przez jego następców, oraz wzbudził zainteresowanie narzędziem, którego użył.

Bazując na eksperymentach Smalla, pionierzy behawiorystyki tworzyli własne labirynty, dostosowując je do swoich potrzeb. Słynny eksperyment Lashleya, w którym poszukiwał on siedliska engramu pamięciowego, wykorzystywał uproszczony labirynt, w którym zwierzę przebywało zawsze tę samą drogę. Wczesne labirynty opierały się przede wszystkim na uczeniu się przez zwierzę drogi do pożywienia lub schronienia. Swego rodzaju przełomem był projekt Burtta (Burt 1916) – był to labirynt wielokrotnego wyboru, w którym szczury musiały nauczyć się pewnych zasad (ang. *rule learning*), aby znaleźć nagrodę.

Szeroko obecnie rozpowszechniony labirynt typu T miał swój początek jako narzędzie do badania uczenia się dżdżownic (*Allolobophora fetida*) (Yerkes 1912). Kilka lat później schemat ten został zaadaptowany do doświadczeń na szczurach – Hunter jako pierwszy wprowadził protokół alternacyjny. Zauważył też, że choć szczury skutecznie internalizują tę strategię, nie potrafią jednak nauczyć się podwójnej alternacji (dwa skrety w lewo naprzemiennie z dwoma skrętami w prawo), wymagającej pamięci sekwencji (Hunter 1920). Alternacja została pierwszy raz opisana 5 lat później przez Tolmana (Tolman 1925). Od tego czasu jest to fenomen szeroko stosowany m. in. w badaniu pamięci roboczej. Wykazano też jego istnienie u wielu gatunków, w tym ludzi (Dember i Fowler 1958; Rothacher i in. 2020).

Wkrótce pojawiła się niejako druga gałąź rodziny labiryntów, wymagająca od zwierząt nawigacji na podstawie różnych wskazówek – m. in. słuchowych i wzrokowych (Muenzinger 1938). Do tego momentu zadaniem zwierzęcia w typowym eksperymencie w labiryncie było odnajdywanie drogi na podstawie położenia własnego ciała, lokomocji

i zwykle pamięci poprzedniej akcji. Wszystkie te sygnały pochodzą z wewnątrz. Nawigacja w tych warunkach jest określana mianem **egocentrycznej**. Wprowadzenie zewnętrznych wskazówek, punktów, które pozwalają zakotwiczyć się w układzie współrzędnych poza własnym ciałem tworzy podstawy strategii **allocentrycznej**.

Od czasów Smalla powstała niezliczona liczba aparatów behawioralnych określanych jako labirynty. Co więcej, często jeden typ labiryntu pozwala na realizację zróżnicowanych paradygmatów, a wykorzystanie metod wirtualnej rzeczywistości rozszerzyło definicję nawigacji w przestrzeni. Przy tym bogactwie dostępnych technik zadanie trafnego, nowatorskiego pytania badawczego jest ważniejsze niż kiedykolwiek.

1.5. Geny wczesnej odpowiedzi w badaniach nad pamięcią

Geny wczesnej odpowiedzi (*immediate early genes*, IEG) są to geny, których aktywacja następuje w krótkim czasie po stymulacji komórki, a w stanie spoczynku pozostaje na w przybliżeniu stałym, niskim poziomie. Nie można jej zatrzymać za pomocą inhibitorów syntezy białek, jako że szlaki sygnałowe prowadzące do ekspresji IEG wykorzystują substraty konstytutywnie obecne w komórce. Geny te kodują w większości przypadków czynniki transkrypcyjne, zatem ich rola wiąże zewnętrzny bodziec z długotrwałą zmianą fenotypu komórki (Kaczmarek i Nikolajew 1990; Morgan i Curran 1991). W odniesieniu do neuronów kryterium to przywodzi na myśl definicję engramu pamięciowego Ebbinghausa (Ebbinghaus 1885). W latach 80. potwierdzono obecność i indukowalność w układzie nerwowym białka jądrowego będącego produktem transkrypcji genu c-Fos, należącego do opisywanej grupy. Wkrótce szereg badaczy niezależnie zaproponował, że powiązanie funkcji genów IEG z plastycznością neuronalną może stać się podstawą do stworzenia nowych narzędzi do badania procesów uczenia, zwiększając rozdzielczość do poziomu obwodów, a ostatecznie nawet pojedynczych komórek (Balcerek, Włodkowska, i Czajkowski 2021).

Ogólny związek ekspresji genów z uczeniem opisuje hipoteza uzupełniania zasobów. Uczenie wiąże się w licznych przypadkach z nagłymi, gwałtownymi wyładowaniami neuronu przebywającego dotychczas w spoczynku, prowadząc do utraty rezerwy czynników odpowiedzialnych za funkcjonowanie komórki i synapsy, a co za tym idzie, potrzebą ich uzupełnienia (Kaczmarek 2000). Takie ujęcie jest zgodne z wnioskami z badań nad wpływem okna czasowego hamowania syntezy białek na uczenie. Wykazały one, że im krótszy jest

czas podania inhibitora po treningu, tym większy deficyt długoterminowej pamięci (Davis i Squire 1984).

Po odkryciu indukcji genu c-Fos w neuronach w wyniku napadów padaczkowych postawiono tezę o podobieństwie między procesami długotrwałej odpowiedzi neuronalnej a mechanizmem wzrostu komórkowego (Morgan i in. 1987). Podjęto więc poszukiwania w neuronach genów zidentyfikowanych w fibroblastach stymulowanych czynnikami wzrostu (Cole i in. 1989). Doprowadziło to do wykazania, że ekspresja genu *zif268* jest indukowana przez te same bodźce, które wywołują długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*long-term potentiation*, LTP), a oba mechanizmy są zależne od aktywacji receptorów *N*-metylo-D-asparaginowych (NMDA). W celu uzyskania efektów podobnych do LTP w bardziej powtarzalny i łatwy do modulacji sposób, wykorzystano metodę maksymalnych napadów elektrowstrząsowych (*maximal electroconvulsive seizure*, MECS). Odkryto, że modulacja intensywności bodźca prowadzi do indukcji szerokiego wachlarza genów IEG, pełniących różne funkcje (Lanahan i Worley 1998). Wyróżniono dwie ważne grupy: regulacyjne czynniki transkrypcyjne (*regulatory transcription factors*, RTF) oraz geny efektorowe. Pierwsza grupa koduje białka transportowane do jądra komórkowego, gdzie regulują one transkrypcję innych genów, należą do nich m. in. rodziny genów Fos i Jun. Geny efektorowe natomiast bezpośrednio modulują funkcje komórkowe – przykładowo poprzez wpływ na strukturę, rozmieszczenie i przewodzenie sygnału poprzez kluczowe receptory (Lanahan i Worley 1998).

Szczególnie rozpowszechnionym narzędziem jest monitorowanie ekspresji genu c-Fos, pełniącego ważną rolę od początku badań nad związkiem ekspresji genów z plastycznością neuronalną. Białka z rodzin FOS i JUN tworzą dimery wchodzące w skład czynnika transkrypcyjnego AP-1 (*activator protein-1*) o szeroko przebadanej roli w integracji informacji podczas uczenia (Kaczmarek 1993). Celem AP-1 są geny kodujące białka reorganizujące strukturę synaps, m. in. białko metaloproteazy macierzowej-9 (MMP-9) i hamujący jej aktywność tkankowy inhibitor metaloproteinazy TIMP-1 (Jaworski i in. 1999; Yap i Greenberg 2018).

Cechy, dzięki którym c-Fos stał się popularnym markerem zwiększonej aktywności neuronalnej to przede wszystkim niski, stały poziom podstawowej ekspresji w większości obszarów mózgu oraz szybka i krótkotrwała transkrypcja. Już po 15 minutach od pojawienia się bodźca można wykryć mRNA genu c-Fos, a istotnie zwiększony poziom białka jest

obserwowalny już po 30 minutach z maksymalnym wzrostem po 90 minutach. Wzrost ten następuje w odpowiedzi na wiele zróżnicowanych bodźców, takich jak napad padaczkowy (Lanahan i Worley 1998), ból (Naranjo i in. 1991), ekspozycja na zapach (Guthrie i Gall 1995), stymulacja dotykowa (Mack i Mack 1992), przetwarzanie nagród (Bijoch i in. 2023).

Od momentu odkrycia roli c-Fos w plastyczności neuronalnej powstało wiele narzędzi wykorzystujących ten mechanizm. Do najwcześniejszych należy wykrywanie produktu białkowego za pomocą immunohistochemii (w tym immunofluorescencji) w utrwalonej tkance, zebranej w momencie odpowiadającym maksymalnemu jego poziomowi 90-120 minut po indukcji behawioralnej. Pozwala to na analizę aktywności mózgu odpowiadającej jednemu punktowi czasowemu. Opracowanie na początku lat dwutysięcznych transgenicznych myszy reporterowych umożliwiło wielokrotną rejestrację aktywności neuronalnej u jednego osobnika. U zwierząt tych fluorescencja GFP jest kontrolowana przez promotor genu c-Fos. Był to pierwszy przypadek wykrycia fluorescencyjnego markera ekspresji IEG w żywych komórkach bez potrzeby wzmacniania sygnału (Barth, Gerkin, i Dean 2004).

1.6. Cele pracy

Mimo wzrostu zainteresowania rolą kory retrosplenialnej (ang. *retrosplenial cortex*, RSC) w procesie nawigacji, nie powstała dotychczas ogólna teoria unifikująca niezależne odkrycia na jej temat. Położenie i gęsta sieć połączeń z obszarami sensorycznymi oraz formacją hipokampalną powodują, że w systemowym spojrzeniu na mózg na pierwszy plan wysuwa się funkcja RSC jako węzła sieci, integrującego informacje i mediującego pomiędzy punktami widzenia. Głównym zagadnieniem eksplorowanym w niniejszej rozprawie było sprawdzenie, czy w ramach tych procesów RSC tworzy stabilną reprezentację neuronalną kontekstu przestrzennego lub kategorii bodźca, na podstawie którego został on zidentyfikowany.

W poniższej pracy wykorzystano zautomatyzowany labirynt typu T. W Pracowni stworzono jego wersję służącą do treningu myszy, w którego wyniku zmieniają one strategię z wewnętrznej tendencji do alternacji (strategii egocentrycznej, będącej podstawą klasycznej wersji badań w labiryncie T) na nawigację opartą na wskazówkach wizualnych (strategię allocentryczną). W tym paradygmacie realizowano następujące cele szczegółowe:

- 1) opracowanie wspólnego dla przeprowadzonych eksperymentów schematu analizy obrazów z mikroskopii dwufotonowej;
- 2) weryfikacja, czy w momencie zmiany strategii z egocentrycznej na allocentryczną możliwe jest rozróżnienie na poziomie wewnątrzsobniczym populacji neuronalnych kodujących poszczególne konteksty;
- 3) ocena, w jakim stopniu zmienia się charakterystyka populacji neuronalnych kodujących kontekst pomiędzy uczeniem a fazą odtwarzania pamięci;
- 4) porównanie aktywacji RSC w odpowiedzi na wskazówki o różnym poziomie złożoności na poziomie wewnątrzsobniczym;
- 5) ocena różnic w postrzeganiu przez myszy zaprojektowanych wskazówek o różnym poziomie złożoności w perspektywie całego mózgu;
- 6) identyfikacja struktur mózgowych wykazujących różnice w aktywacji skorelowane ze zmiennymi behawioralnymi w zastosowanym paradygmacie.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. Oznaczenia grup eksperymentalnych i sesji testowych

Poniżej przedstawiono w porządku chronologicznym skróty i oznaczenia sesji oraz grup eksperymentalnych.

ABB - kolejność prezentacji kontekstów w eksperymencie 1: w pierwszym teście kontekst A powiązany ze skrętem w lewo, w kolejnych dniach dwukrotna ekspozycja na kontekst B - skręt w lewo

S1, S2, S3 - ogólne określenie kolejnych sesji testowych, wspólne dla eksperymentów

R1, R2, R3 - oznaczenia kolejnych sesji w fazie odtwarzania pamięci

L - ang. *landmark*, jeden z typów wskazówek użytych w eksperymentach 2 i 3, punkt orientacyjny, wskazówka schematyczna

C/Ctx - kontekst, drugi typ prezentowanej wskazówki - wskazówka złożona

LCC - grupa eksperymentalna, w której w kolejnych testach myszy były eksponowane na wskazówki w kolejności: 1 dzień - landmark, 2 dzień - kontekst, 3 dzień - kontekst

CLL - grupa eksperymentalna, w której w kolejnych testach myszy były eksponowane na wskazówki w kolejności: 1 dzień - kontekst, 2 dzień - landmark, 3 dzień - landmark

LLC - grupa eksperymentalna, w której w kolejnych testach myszy były eksponowane na wskazówki w kolejności: 1 dzień - landmark, 2 dzień - landmark, 3 dzień - kontekst

S0 - bazowa sesja obrazowania, przeprowadzona po ostatniej sesji treningowej

grupa rozszerzona - grupa eksperymentalna, w której przeprowadzono obrazowanie po sesji treningowej oraz po dodatkowej sesji behawioralnej z ekspozycją na kontekst

UP - model estymujący odsetek komórek ulegających wzmocnieniu pomiędzy dwiema sesjami

DOWN - model estymujący odsetek komórek ulegających osłabieniu pomiędzy dwiema sesjami

2.2. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach

Opisane w niniejszej pracy procedury doświadczalne przeprowadzono zgodnie z obowiązującą Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE

w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr zgody LKE 905/2019). Zwierzęta pochodziły z hodowli znajdujących się z Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

Eksperymenty przeprowadzone były z wykorzystaniem zwierząt w wieku między 12 a 16 tygodni. Przed rozpoczęciem badań myszy utrzymywane były w klatkach w grupach do 5 osobników z nieograniczonym dostępem do wody i paszy. W pomieszczeniach hodowlanych zachowany był cykl dobowy z 12 godzinami światła i 12 godzinami ciemności. Zapewniono optymalną temperaturę otoczenia (20-24 °C), wilgotność powietrza (50-60%) oraz wentylację. Zwierzęta rozdzielono do osobnych klatek przed przeprowadzeniem operacji chirurgicznych (eksperyment 1 i 2) lub parę dni przed rozpoczęciem procesu habituacji (eksperyment 3 i 4).

W eksperymentach 1 i 2 użyto myszy obu płci. Ostateczna proporcja między liczbą samców i samic zależała od dostępności w hodowli i przeżywalności operacji stereotaktycznych. W eksperymentach 1 było to 7 samic i 16 samców, w eksperymentach 2 – 11 samic, 22 samców. Płeć uwzględniono jako zmienną w analizie wyników. W eksperymentach 3 użyto 22 myszy, wyłącznie samców.

Eksperyment 3 przeprowadzono z wykorzystaniem myszy hybrydowych typu dzikiego B6129SF1/J (The Jackson Laboratory, nr katalogowy 101043). W pozostałych doświadczeniach użyto szczepu B6.Cg-Tg(Fos/EGFP)1-3Brth/J (The Jackson Laboratory, nr katalogowy 014135). U zwierząt tej linii genetycznej wprowadzono transgen kodujący białko fuzyjne FosGFP, którego ekspresja pozostaje pod kontrolą promotora genu wczesnej odpowiedzi *c-fos*. Domenę C-kończową tego białka stanowi EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*), zmodyfikowana wersja białka zielonej fluorescencji (GFP), charakteryzującą się silniejszą fluorescencją i większą stabilnością (Barth i in. 2004).

2.3. Operacje stereotaktyczne

Aby umożliwić wielokrotną wewnątrzsobniczą wizualizację poziomu białka fuzyjnego fosGFP w neuronach, nad obszarem RSC myszy biorących udział w eksperymentach umieszczano chroniczne okienko czaszkowe. Operacje przeprowadzono zgodnie z poprzednio opracowanym protokołem, z niewielkimi modyfikacjami dotyczącymi umieszczanego na głowie myszy implantu (Łukasiewicz i in. 2016). Zwierzę poddawano

anestezji wziewnej izofluranem (indukcja – 5%, podtrzymanie – 1.5-2% w tlenie). Podczas trwania operacji zapewniano utrzymanie optymalnej temperatury ciała przez zastosowanie podkładki grzewczej. Po umieszczeniu myszy w ramie stereotaktycznej podawano podskórnio leki: opioidowy lek przeciwbólowy (Butomidor, winian butorfanolu 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.), lek przeciwzapalny (Tolfedine, kwas tolfenamowy 40 mg/ml, dawka 4 mg/kg m.c.) oraz antybiotyk (Baytril, enrofloksacyna 25 mg/ml, dawka 2,5 mg/kg m.c.). Skórę głowy golono, oczyszczano, po czym dezynfekowano 3% roztworem jodyny, a następnie 70% roztworem alkoholu etylowego. Odsłoniętą skórę znieczulano miejscowo lidokainą w żelu (Lignocainum 20 mg/g). Po potwierdzeniu zaniku odruchu rogówkowego, oczy zabezpieczano przed wyschnięciem za pomocą żelu nawilżającego Lubrithal. Głowę zwierzęcia unieruchamiano i stabilizowano przez wprowadzenie do zewnętrznego kanału słuchowego kołków (ang. *ear bars*). Następnie potwierdzano zanik odruchów bólowych przez obserwację odpowiedzi na ucisk ogona i paliczków. Skalp nacinano i usuwano płat skóry o minimalnej powierzchni pozwalającej na stabilne umieszczenie implantu. Z tego obszaru usuwano okostną i osuszano czaszkę. Krawędzie skóry zabezpieczano klejem cyjanoakrylowym. W kolejnym kroku na czaszce umieszczano sterylne szkiełko nakrywkowe o średnicy 3 mm (Knittel Glass, nr kat. CD10003Y1A.01), tak by jego środek pokrył się z koordynatami -2.8 mm w osi przód-tył oraz 0 mm w osi lewo/prawo względem punktu bregma. Zaznaczano krawędzie szkiełka, po czym umieszczano je ponownie w 70% roztworze alkoholu etylowego. Następnie wiertłem dentystycznym typu różyczka o średnicy 0,5 mm zaznaczano obrys szkiełka. Po oczyszczeniu powierzchni z pyłu kostnego potwierdzano właściwe umiejscowienie i rozmiar otworu i kontynuowano wiercenie. Okresowo oczyszczano i schładzano obszar fizjologicznym roztworem soli, kontrolując jednocześnie grubość kości na obwodzie kraniotomii. Po stwierdzeniu, że pozostała warstwa jest cienka i elastyczna pod naciskiem pęsety, pole wiercenia nawilżano sterylnym roztworem soli, a płat kości usuwano precyzyjnie przy użyciu narzędzia mikrochirurgicznego (pęseta Dumont #5, końcówka 0,05 × 0,01 mm, nr kat. 11295-10). Odkrytą tkankę przykrywano nasączonym fizjologicznym roztworem soli opatrunkiem hemostatycznym wykonanym z oczyszczonej wieprzowej pianki żelatynowej (Spongostan, Ferrosan) w celu zatamowania krwawienia. Po jego ustaniu umieszczano sterylne szkiełko nakrywkowe na powierzchni opony twardej i unieruchamiano je przy pomocy igły przytwierdzonej do ramienia stereotaktycznego. Krawędzie szkiełka przytwierdzano do czaszki klejem cyjanoakrylowym, wiązanie kleju przyspieszono

aktywatorem. Powierzchnię czaszki lekko frezowano, po czym pokrywano samoutwardzalnym akrylem dentystycznym (Duracryl, Spofa Dental). Wokół szkiełka nakładano grubsza warstwę akrylu, tworząc “studzienkę”, która ułatwia utrzymanie cieczy immersyjnej w trakcie późniejszego obrazowania. Na koniec przytwierdzano do akrylu 4 magnesy neodymowe o średnicy $\frac{1}{16}$ cala i wysokości $\frac{1}{32}$ cala (typ N52, Enes Magnesy) używając szablonu. Przed wybudzeniem mysz otrzymywała podskórny zastrzyk z ogrzanego do temperatury ciała wodnego roztworu chlorku sodu (NaCl, 1 ml, 0,9%) w celu uzupełnienia płynów. Następnie była przenoszona do czystej klatki, umieszczanej na kocu grzewczym w wentylowanej szafie. Stan zwierzęcia monitorowano do wybudzenia. Przez następnych 5 dni zwierzę było objęte opieką pooperacyjną. Codziennie monitorowano stan zwierzęcia i podawano podskórnie antybiotyk oraz lek przeciwbólowy.

2.4. Zastosowany paradygmat behawioralny

2.4.1. Zautomatyzowany labirynt typu T

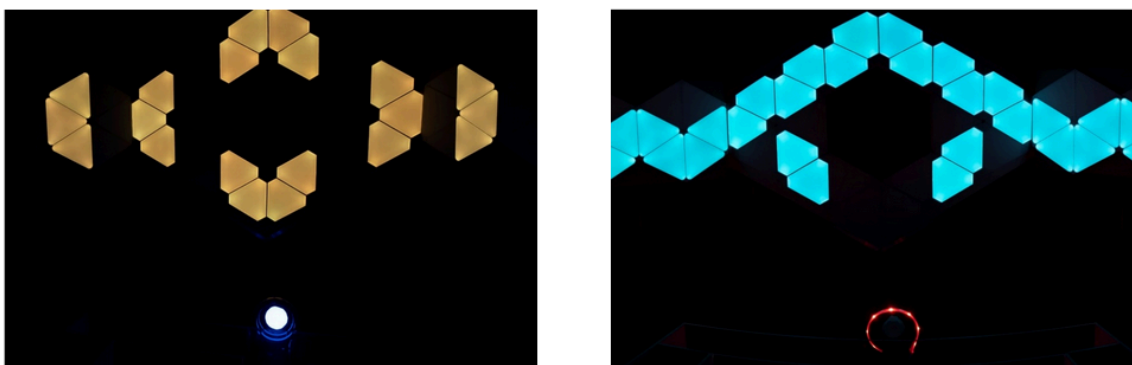
W zawartych w pracy eksperymentach wykorzystano autorską wersję automatycznego labiryntu T, stworzoną w Pracowni Pamięci Przestrzennej (Balcerek, Włodkowska, i Czajkowski 2024). Dodatkową modyfikacją względem klasycznej wersji jest przezroczysta przednia ściana, dzięki której możliwe jest warunkowanie wskazówkami wizualnymi. Wykazano, że trening w tym labiryncie prowadzi do wytworzenia przez myszy nowej strategii nawigacyjnej – są one w stanie podejmować decyzje przestrzenne w oparciu o bodźce wzrokowe, nawet gdy są one w sprzeczności z opisaną w literaturze tendencją gryzoni do alternacji.

Cechy fizyczne labiryntu

Labirynt zbudowany jest na planie prostokąta o wymiarach 45 cm na 80 cm. Szerokie na 10 cm korytarze tworzą kształt cyfry 8 – do klasycznej formy litery T dodano przejścia umożliwiające samodzielny powrót zwierzęcia do punktu startu. Na podstawie rozmieszczenia 7 drzwiczek można wyróżnić główne części labiryntu: punkt startowy, korytarz wyboru, lewe i prawe ramię, oraz lewy i prawy korytarz powrotny. Ściany mają wysokość 25 cm, co uniemożliwia myszom wdrapywanie się na nie i zabezpiecza przed ucieczką. W korytarzu wyboru oraz w ramionach ściany są przezroczyste, po opuszczeniu

miejsca startowego zwierzę widzi więc wskazówki wyświetlane z przodu pod szerokim kątem, co ma na celu zwiększenie immersyjności doświadczenia.

Wskazówki wizualne wykonano z inteligentnych urządzeń świetlnych firmy Nanoleaf – mozaiki paneli LED, paska LED oraz żarówki. Z paneli LED (Nanoleaf Light Panels) stworzono kontekst, element wspólny dla wszystkich eksperymentów opisanych w pracy. Zaprojektowano kilka wzorów wyświetlanych na trójkątnych panelach, imitujących różne pomieszczenia. W eksperymencie 1 wykorzystano jedynie centralny segment mozaiki, zawieszony 100 cm przed przednią, przezroczystą ścianą labiryntu, centralnie względem jego środka w osi pionowej i poziomej. W kolejnych eksperymentach kontekst rozbudowano: dodano boczne segmenty, zwiększając szerokość mozaiki z 170 do 250 cm. Zostały one zamontowane pod kątem ok. 140° względem panelu centralnego, co potęgowało wrażenie otoczenia labiryntu przez kontekst. Pasek LED (Nanoleaf Essentials Lightstrip) oraz żarówka (Nanoleaf Essentials Smart Bulb) umieszczone na statywie w połowie odległości między przednią ścianą labiryntu a panelami LED służyły jako wskazówki imitujące punkty orientacyjne (ang. *landmark*) – wyróżniające się z tła trójwymiarowe obiekty.



Ryc. 2: Układ wskazówek o różnym poziomie złożoności. W tle widoczna mozaika paneli LED, na pierwszym planie wskazówka – punkt orientacyjny: żarówka świecąca niebieskim światłem (po lewej) lub pasek ledowy świecący na czerwono (po prawej). Każdy z prezentowanych układów powiązany jest ze skrzętem w jedną stronę.

Automatyzacja labiryntu

Nagrodę wydawano przez podajnik opracowany na bazie zaworu elektromagnetycznego zamkniętego w pozycji spoczynkowej, przepuszczającego płyn po podaniu napięcia 12V (Botland, MOD-09448). Czas otwarcia kontrolowany był przez

Arduino z nakładką Adafruit Motor/Stepper/Servo Shield v2.3. Zastosowanie tej nakładki, zawierającej wbudowane mostki H oraz diody zabezpieczające przed przepięciami indukcyjnymi, uprościło układ zwiększyło bezpieczeństwo. Wydłużyło też żywotność całego systemu, zapewniając ochronę tranzystorów sterujących w mostkach przed uszkodzeniem spowodowanym nagłym zanikiem pola magnetycznego w cewce, występującym po wyłączeniu zaworu. Biblioteki programistyczne udostępniane przez producenta uprościły również kod kontrolujący zawory.

Ruch drzwiczek realizowano za pomocą systemu pneumatycznego, obejmującego siłowniki zamocowane u ich podstawy, sprężarkę olejową z układem doprowadzającym sprężone powietrze, oraz baterię elektrozaworów sterowanych przez Arduino z nakładką Adafruit. Ze względu na zbliżone parametry techniczne zaworów układu pneumatycznego oraz tych użytych w podajnikach nagrody można było nimi sterować według tego samego schematu. Hałas mogący wywoływać stres u zwierząt został zredukowany poprzez odpowiednie rozmieszczenie sprzętu oraz zastosowanie tłumików.

Na potrzeby projektu opracowano zestaw skryptów sterujących przebiegiem eksperymentu. Wysokopoziomowa logika zadania behawioralnego została zaimplementowana w formie pętli zamkniętej (ang. *closed-loop experiment*) sterowanej zdarzeniami, przy użyciu wizualnego języka programowania Bonsai (Lopes i in. 2015). Z poziomu środowiska Bonsai uruchamiane były mikrokontrolery Arduino, odpowiadające za funkcjonowanie elementów pneumatycznych oraz podajników nagrody. Skrypt ten umożliwiał również komunikację z panelami LED poprzez funkcję napisaną w języku Python, wykorzystującą protokół HTTP i REST API udostępniane przez producenta paneli. Cały kod został udostępniony w repozytorium na platformie GitHub: <https://github.com/uwlodkowska/tmaze>.

Labirynt był oświetlony z góry przy pomocy 4 lamp emitujących światło podczerwone. Jest ono niewidoczne dla myszy, dzięki czemu nie zaburza funkcjonowania zwierzęcia aktywnego w fazie ciemnej. Pozwoliło to na rejestrację obrazu przy użyciu wrażliwej na podczerwień kamery ArduCam B0506. Lampy rozmieszczono nad rogami labiryntu, aby zapewnić możliwie równomierne oświetlenie i zminimalizować wpływ cienia rzucanego przez ściany labiryntu w korytarzach powrotnych na śledzenie zwierzęcia.

Na podstawie obrazu z kamery w środowisku Bonsai identyfikowane było położenie myszy, co uruchamiało odpowiednie akcje. Przed rozpoczęciem eksperymentu konieczne

było zdefiniowanie liczby, kierunku i trybu kolejnych skrętów w pliku konfiguracyjnym. Możliwe były dwa tryby: tryb wymuszony i tryb wyboru. W pierwszym z nich mysz znajdująca się w głównym korytarzu labiryntu miała otwarte drzwi tylko do ramienia, w którym znajdowała się nagroda – drugie ramię było zablokowane przez zamknięte drzwi. W trybie wyboru drzwi po obu stronach były otwarte, zatem zwierzę mogło skrócić też w ramię, w którym nie było nagrodzone.

Zarys paradygmatu behawioralnego

Sesję treningową rozpoczynało umieszczenie myszy w punkcie startowym labiryntu. Wszystkie drzwi były zamknięte, a na panelach był wyświetlany kontekst neutralny. Eksperymentator uruchamiał sekwencję prób. Po wyświetleniu kontekstu odpowiedniego dla danej próby, otwierane były drzwi do obu ramion labiryntu (tryb wyboru) lub do ramienia nagrodzonego (tryb wymuszony). Następnie otwierane były drzwi między punktem startowym a głównym korytarzem. W momencie wykrycia przez system obecności myszy w wyróżnionym punkcie w połowie korytarza (ang. ROI, *region of interest*), pierwsze drzwi zamykały się, odcinając drogę powrotu do punktu startowego. Kolejną akcję wywoływało wybranie przez zwierzę jednego z ramion – gdy znalazło się ono wraz z całym ogonem po jednej ze stron, drzwi do ramion zamykały się. Jeżeli wykonany skręt był zgodny z wyświetlaną wskazówką, wydawana była nagroda, a następnie otwierały się drzwi do korytarza powrotnego oraz między tym korytarzem a punktem startowym. Przez pierwsze cztery dni treningu następowało to z pięciosekundowym opóźnieniem, aby umożliwić zwierzęciu lokalizację nagrody w nowych okolicznościach. Okrążenie kończyło się, gdy mysz wykryto w korytarzu powrotnym. Drzwi do ramienia zamykały się. Następowala zmiana wskazówki na kolejną na podstawie pliku konfiguracyjnego, po czym rozpoczynało się nowe okrążenie.

2.4.2. Habitucja zwierząt do procedur doświadczalnych

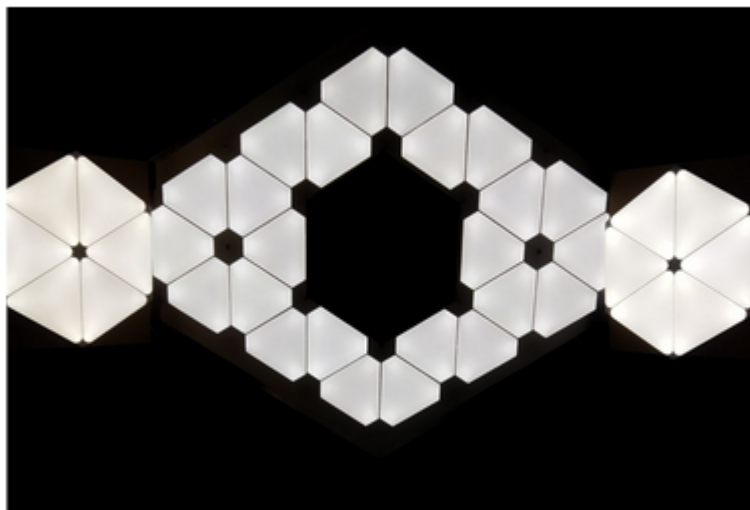
W celu minimalizacji stresu u zwierząt oraz eliminacji wpływu ich interakcji z eksperymentatorem na przebieg doświadczenia, myszy poddano habituacji. Procedura ta polegała na stopniowym wprowadzaniu kontaktu z człowiekiem, a następnie kolejnych elementów paradygmatu eksperymentalnego. W przypadku eksperymentów, w których zwierzęta były poddawane operacjom chirurgicznym, habituacja rozpoczynała się po

zakończeniu okresu opieki pooperacyjnej. Pierwszego dnia habituacji eksperymentator wkładał dłonie w rękawiczkach do klatki domowej, aby zwierzęta mogły przyzwyczać się do nowego zapachu i obecności dłoni w klatce. Przez następne dwa dni eksperymentator ostrożnie dotykał zwierzęcia, pozostawiając dłonie w obrębie klatki i nie podnosząc go. W kolejnych dwóch dniach zwierzęta były delikatnie podnoszone, w momencie gdy same zbliżyły się do dłoni. Przez wszystkie 5 dni tego etapu habituacji interakcja z każdym zwierzęciem trwała ok. 5 minut. Po zakończeniu tej części procesu habituacji zwierzęta transportowano do pokoju eksperymentalnego. Umieszczano je w przezroczystych klatkach przykrytych metalową kratą, dzięki czemu myszy miały kontakt wzrokowy oraz mogły słyszeć i czuć zapach pozostałych zwierząt biorących udział w eksperymencie. U zwierząt społecznych jest to istotny czynnik redukujący stres, zwłaszcza gdy uprzednio utrzymywane były w jednej klatce. Jest to forma społecznego buforowania stresu (ang. *social buffering*) (Klein i in. 2015; Liu i Yuan 2016). W klatkach umieszczono również wzbogacenie w postaci dodatkowego materiału do budowy gniazda oraz kartonowych tuneli. Kolejne dwa dni (6.-7. dzień habituacji) myszy spędzały bez bezpośredniego kontaktu z eksperymentatorem w celu adaptacji do odwróconego cyklu dobowego w pomieszczeniu eksperymentalnym – pozwalało to na przeprowadzenie doświadczenia w fazie aktywnej zwierząt.

W kolejnych etapach stopniowo wprowadzano czynniki, z którymi myszy mają styczność w trakcie eksperymentu. Przez dwa dni (8.-9.) były one ekspozowane na nagrodę. Od dnia 8. wprowadzano minimalną restrykcję pokarmową, aby wzmocnić pozytywny efekt nagrody. Każda mysz otrzymywała 3,5 grama standardowej paszy na dobę, monitorowano wagę zwierząt, która nie spadała poniżej 90% wyjściowej masy ciała. Zarówno podajnik, jak i nagroda w postaci słodkiego mleka skondensowanego rozcieńczonego wodą w proporcji 1:1 były takie same, jak te stosowane w trakcie właściwego eksperymentu. Końcówka podajnika nagrody była wprowadzana przez otwór w ścianie klatki domowej. Przez okres 5 minut zwierzę było nagradzane po każdym zbliżeniu się do dyspensera mleka. Procedurę tę wykonywano w godzinach porannych, po około 4 godzinach kontynuowano habituację do dotyku człowieka. Eksperymentator delikatnie wyjmował zwierzę z klatki i przenosił je do części pomieszczenia, w której umieszczony był labirynt, a następnie wkładał je do klatki domowej.

Od 10. dnia habituacji wprowadzano kontakt z aparatem eksperymentalnym. W pierwszych dwóch dniach opuszczano wszystkie drzwiczki w labiryncie i wyłączano ich ruch. Ustawiano jednolite białe oświetlenie o niskim natężeniu (kontekst neutralny). Po

umieszczeniu zwierzęcia w labiryncie, pozwalano mu na swobodną eksplorację przez 5 minut, a zbliżenie się do podajnika mleka każdorazowo nagradzano. W dniach 12.-13. wprowadzano ruch 5 spośród 7 drzewiczek, aby przyzwyczajać stopniowo zwierzęta do ukierunkowanego ruchu. W tym celu wprowadzono również ograniczenie w wydawaniu nagrody. Po opuszczeniu punktu startowego mysz mogła otrzymać nagrodę jednorazowo w każdym ramieniu, aż do momentu powrotu do startu i rozpoczęciu nowego okrążenia. Również w tym przypadku czas na eksplorację wynosił 5 minut.



Ryc. 3: Kontekst neutralny stosowany w habituacji. Kontekst neutralny stanowią emitujące białe światło panele LED. Jasność zredukowano do połowy intensywności ustalonej dla kontekstów treningowych.

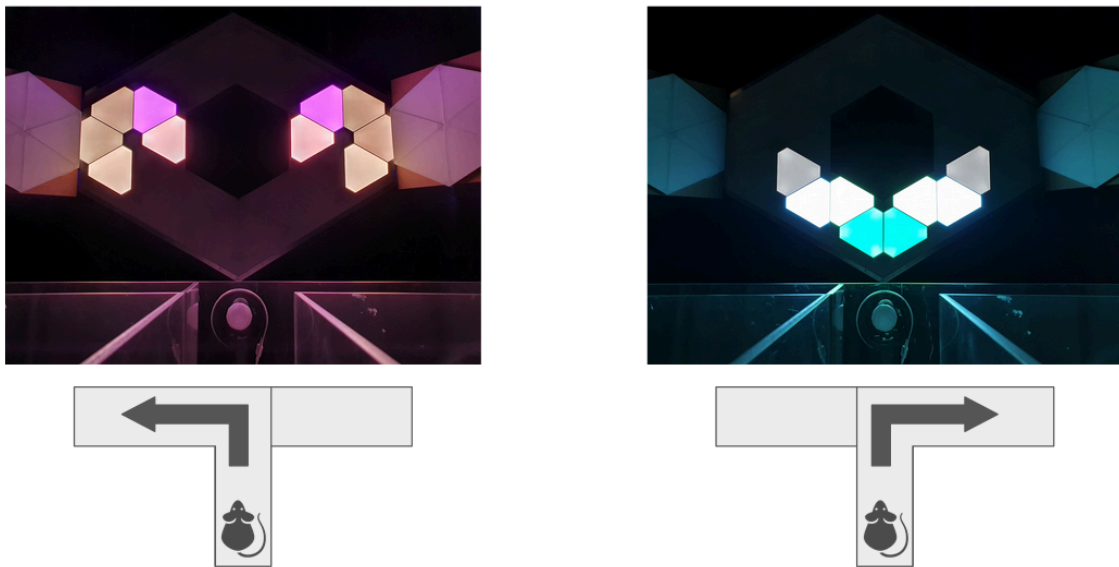
Do habituacji należy też zaliczyć procedurę wprowadzaną w późniejszej fazie eksperymentu, czyli po tygodniu pełnego treningu – lub w dniu, w którym mysz osiągała po raz pierwszy skuteczność wyborów w labiryncie na poziomie 80%, jeśli taki nastąpił wcześniej (w przypadku eksperymentów 2 i 4). Po zakończeniu eksperymentu, zwierzę było umieszczane w zaciemnionej skrzyni transportowej wraz z klatką domową. Następnie była przenoszona w kierunku pracowni mikroskopii, gdzie przeprowadzano później obrazowanie. Miało to na celu przyzwyczaić zwierzęta do skrzyni transportowej i czynności przenoszenia, tak by nie powodowało to dodatkowego stresu i nie wprowadzało elementu nowości w czasie przeprowadzania testu. Czynność powtarzano do końca eksperymentu.

2.4.3. Modyfikacja strategii przestrzennej (eksperyment 1)

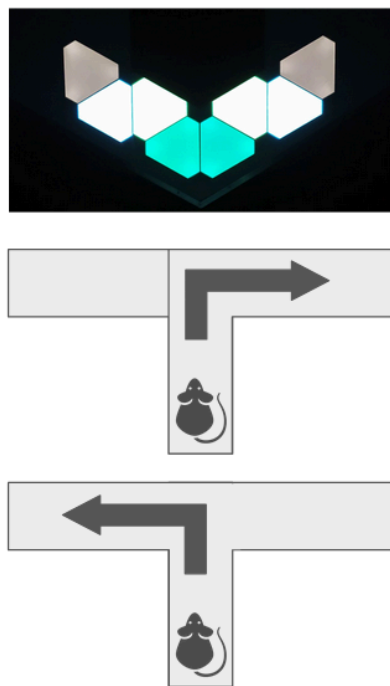
Trening

W pierwszym eksperymencie przeprowadzono trening w labiryncie T, w wyniku którego myszy zmieniły strategię przestrzenną wyboru ramion. Na początku doświadczenia kierowały się one egocentryczną strategią alternacyjną, obserwowaną u gryzoni bez treningu (Tolman 1925). Trening miał na celu adaptację do wyboru ramienia na podstawie wyświetlanej wskazówki wizualnej. Zwierzętom zaimplantowano układ umożliwiający obrazowanie RSC pod mikroskopem dwufotonowym zgodnie z opisem w rozdziale 2.2. Po okresie rekonwalescencji i habituacji do eksperymentatora oraz układu doświadczalnego, myszy przechodziły trening zgodny z protokołem uprzednio stosowanym w Pracowni Pamięci Przestrzennej (Balcerek i in. 2024). W treningu użyto wskazówek kontekstowych - złożonych wzorów wyświetlonych na panelach LED, imitujących różne środowiska. Każdy z dwóch kontekstów (nazywanych dalej A i B) oznaczał, że po skręcie w odpowiadające mu ramię wydana zostanie nagroda. Dla kontekstu A było to lewe ramię, dla B – prawe.

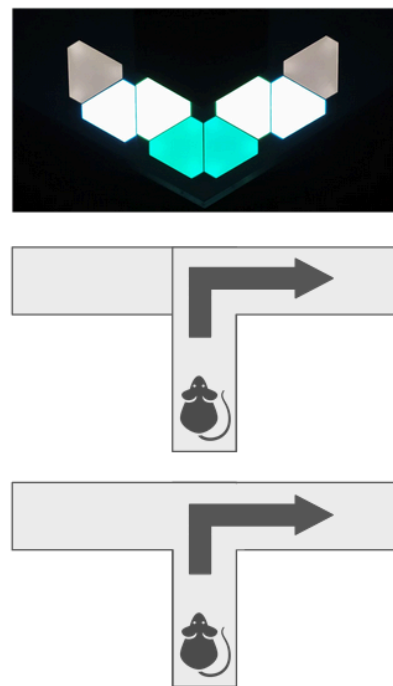
A



B1



B2



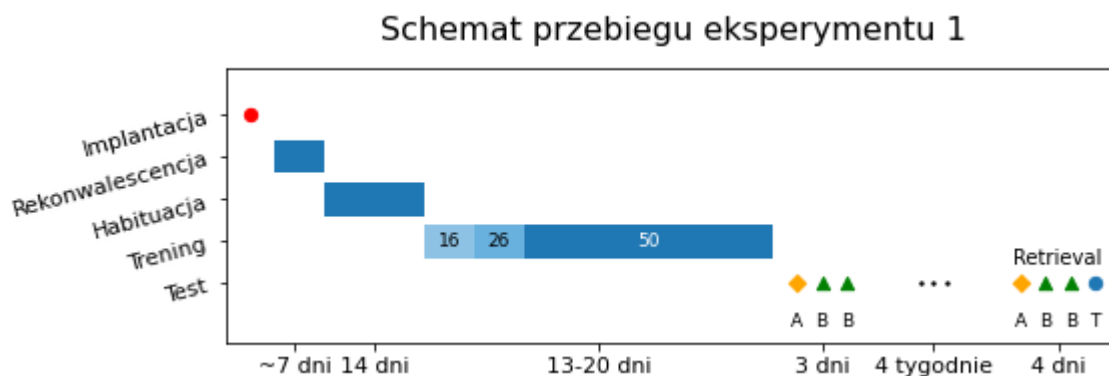
Ryc. 4: Schematyczne ujęcie celu treningu w eksperymencie 1. A. Zaprojektowano dwa konteksty różniące się pod względem koloru i geometrii. W fazie wymuszonej treningu budowano asocjację między kierunkiem skrętu a wyświetlonym wzorem. B1. Na początku treningu zwierzęta kierowały się strategią egocentryczną, opartą na poprzednim wyborze – wybierały ramię labiryntu, które nie było przez nie odwiedzone w poprzednim okrążeniu, niezależnie od wyświetlonej wskazówki. B2. Trening miał na celu internalizację przez zwierzęta strategii allocentrycznej - opartej na zewnętrznych wskazówkach. W tej strategii zwierzę podąża za asocjacją kierunku i wskazówki, nawet jeśli poprzedni skręt wykonany był w tę samą stronę.

W trakcie treningu stopniowo zwiększano liczbę okrążeń, które zwierzę musiało pokonać każdego dnia. Przez pierwsze 2 dni było to 16 okrążeń, przez kolejne 2 – 26 okrążeń, a począwszy od 5. dnia treningu do jego zakończenia – 25. W każdej sesji oba konteksty wyświetlane były równą liczbą razy. Okrążenia odbywały się naprzemiennie w trybie wymuszonym i wyboru, w połowie tych par dwa razy z rzędu był wyświetlany ten sam kontekst – wskazówki wizualne stały w sprzeczności z tendencją do alternacji.

Głównym celem tego eksperymentu była ocena, czy w momencie, w którym mysz zaczyna kierować się wskazówkami wizualnymi, w RSC powstają osobne reprezentacje przestrzenne wiążące bodziec wzrokowy z położeniem nagrody. Za punkt graniczny uznano moment, w którym (1) w trakcie treningu zwierzę dokona poprawnego wyboru w przynajmniej 50% okrążeń, w których nagroda jest umiejscowiona w tym samym ramieniu, co w poprzednim, wymuszonym okrążeniu (dwukrotny skręt w tę samą stronę) (2) ogólna liczba poprawnych skrętów w fazie wyboru będzie na poziomie przynajmniej 80%. Dzień po osiągnięciu tego wyniku rozpoczynano sekwencję testów.

Test i obrazowanie

Myszy poddawano sekwencji trzech testów. Tak jak sesje treningowe, sesje testowe rozdzielało ok. 24 h, co pozwalało na powrót ekspresji białka fuzyjnego c-FosGFP do poziomu bazowego. W sesji testowej zwierzę było przez 5 minut ekspozowane na tylko jeden z kontekstów, powiązanych z obecnością nagrody w jednym z ramion. Tak jak w trakcie treningu, sesje w trybie wyboru były przedzielone wymuszonymi skrętami, a nagroda była wydawana tylko w przypadku poprawnego wyboru. Po zakończeniu testu zwierzę wracało do klatki domowej, w której pozostawało przez około 80 minut. Po upływie tego czasu było przenoszone do pracowni mikroskopowej w zaciemnionej klatce transportowej, do której były uprzednio zhabituowane. Następnie myszy przechodziły procedurę obrazowania, opisaną w punkcie 2.4.



Ryc. 5: Oś czasu eksperymentu 1. Myszy poddawano operacji implantacji szkiełka czaszkowego. Po okresie opieki pooperacyjnej i rekonwalescencji rozpoczynano habituację zwierząt do eksperymentatora i układu doświadczalnego. Bezpośrednio po zakończeniu tego etapu zwierzęta rozpoczynały trening przestrzenny. Stopniowo zwiększano liczbę okrążeń w sesji, zaczynając od 16, a kończąc na 50 okrążeniach, z których połowa odbywała się w trybie wymuszonym. Po osiągnięciu kryterium stop (skuteczność 75%), myszy poddawano serii 3 testów, z ekspozycją kolejno na konteksty A, B, B. Następnie myszy przechodziły trening uzupełniający, który kończył się w momencie, gdy osobnik osiągał plateau skuteczności. Po tym etapie przerywano trening na 4 tygodnie. Po upływie tego czasu następowała faza odtwarzania pamięci (ang. *memory retrieval*). Składała się ona z 3 testów w tym samym schemacie, który zastosowano w pierwszej serii testów. Na zakończenie myszy przechodziły trening przypominający, mający na celu ocenę stopnia zapamiętania strategii.

Odtwarzanie pamięci

Po procedurze obrazowania zwierzęta były trenowane do osiągnięcia plateau (wahania skuteczności do 5% pomiędzy kolejnymi dniami treningu). Po zakończeniu tego etapu myszy pozostawały w pomieszczeniu eksperymentalnym na okres 4 tygodni. W tym czasie ingerencja eksperymentatora była minimalna – monitorowany był stan zwierząt, uzupełniano wodę i paszę oraz wymieniano ściółkę. Myszy miały dostęp do paszy *ad libitum*, restrykcję wprowadzano ponownie na 3 dni przed rozpoczęciem fazy odtwarzania pamięci (ang. *retrieval*). Ten etap obejmował 4 dni. W ciągu pierwszych 3 z nich zwierzęta przechodziły testy połączone z obrazowaniem w takim samym schemacie jak w poprzedniej części eksperymentu. Ostatniego dnia ponownie przechodziły procedurę treningową z 50 okrążeniami w schemacie używanym w trakcie całego treningu – miało to na celu ocenę, na ile wyuczona wcześniej strategia została zachowana.

2.4.4. Adaptacja do nawigacji w warunkach ograniczonej dostępności do wskazówek wizualnych o różnej złożoności

Ze względu na szczególną rolę RSC w kodowaniu wskazówek o cechach punktu orientacyjnego (wyraźne granice, wyróżnianie się z tła, ograniczone wymiary), przygotowano układ, w którym obok kontekstu obecne są wskazówki tego typu. Eksperymenty przeprowadzano zgodnie ze schematem mającym na celu testowanie odpowiedzi behawioralnej i neuronalnej myszy na sytuację, w której w znanym środowisku zachodzi zmiana, w wyniku której tracą dostęp do kompletnego zestawu cech wizualnych otoczenia. W tym paradygmacie przeprowadzono dwa eksperymenty. Schemat treningu w obu przypadkach był ten sam, różnił je nadrzędny cel, a w związku z tym przygotowanie do doświadczenia i przeprowadzone testy.

Pierwszy z tych eksperymentów (eksperyment 2 w rozprawie) dotyczył wewnątrzsobniczych różnic w przetwarzaniu wskazówek o różnym poziomie złożoności w RSC. W tym celu zastosowane zostały myszy transgeniczne z ekspresją białka FosGFP, u których implantowano szkiełko czaszkowe (zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 2.2.) umożliwiające rejestrację aktywności neuronalnej pod mikroskopem dwufotonowym.

Drugie doświadczenie (eksperyment 3 w rozprawie) miało na celu zbadanie różnic w przetwarzaniu obu typów wskazówek w skali całego mózgu. Dzięki obrazowaniu całego mózgu możliwe było określenie relacji pomiędzy poszczególnymi składowymi obwodu pamięci przestrzennej, a także weryfikację, czy różnice w przetwarzaniu dotyczą również obszarów wzrokowych.

Trening

Po zakończonej habituacji myszy zaczynały trening w labiryncie. Trening przebiegał przy dostępności dwóch typów wskazówek: kontekstowych i schematycznych. Obecności nagrody w każdym z ramion była przypisana stała para kontekst + landmark (Ryc. 6). Schemat treningu był zmodyfikowany względem protokołu zastosowanego w eksperymencie 1. W pierwszych czterech dniach eksperymentu, jak poprzednio, stopniowo zwiększano liczbę okrążeń przypadających na sesję (dzień 1.-2.: 16 okrążeń, dzień 3.-4.: 32 okrążenia), jednak tym razem każde okrążenie odbywało się w trybie wymuszonym. Miało to na celu zbudowanie jak najsilniejszej asocjacji między wykonaniem okrążenia a otrzymaniem nagrody, a w konsekwencji większy kontrast między oczekiwaniami a rezultatem

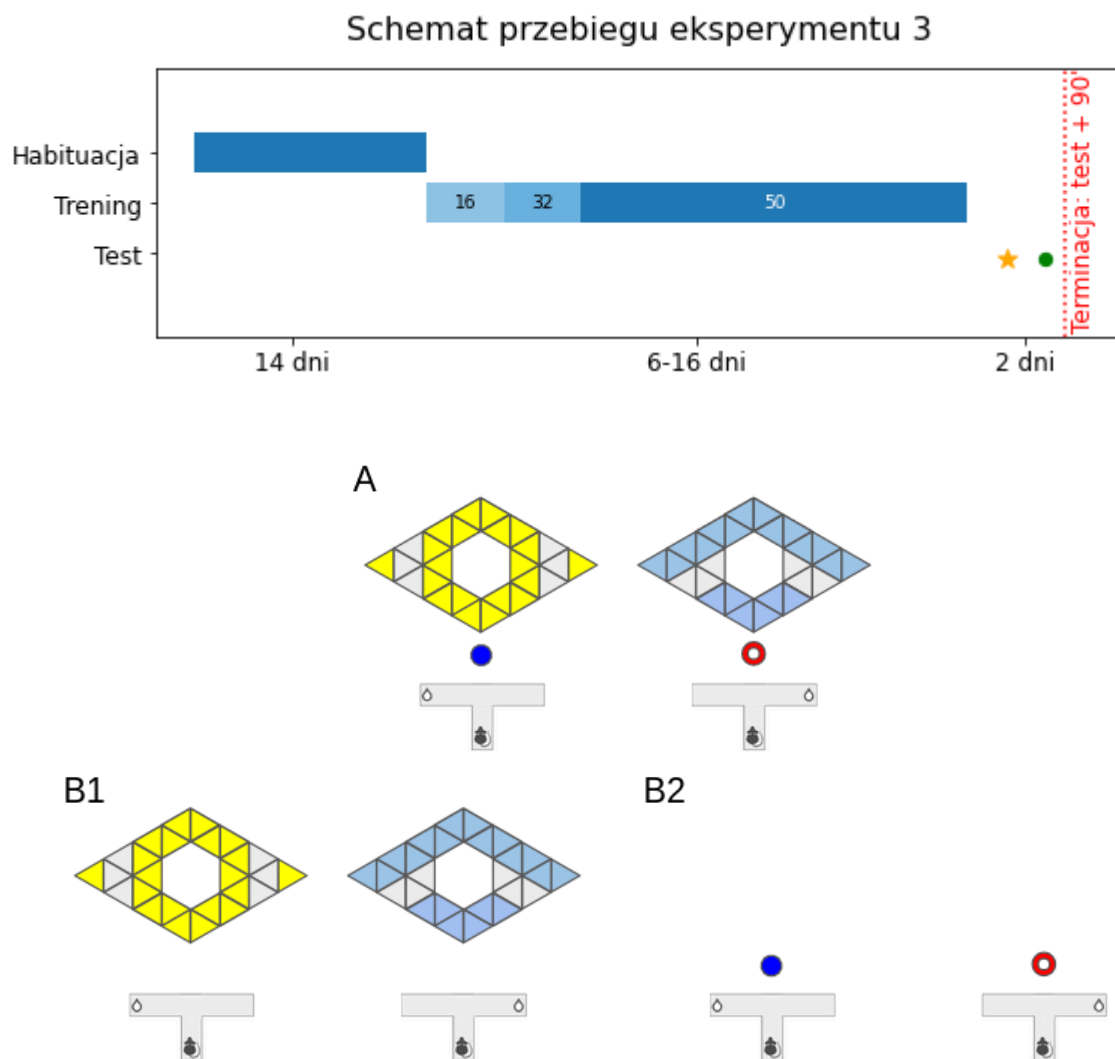
w przypadku dokonania błędnego wyboru w kolejnych dniach. Po fazie wstępnej następowała główna część treningu, w której wszystkie okrążenia były w trybie wyboru. Każdego dnia sesja składała się z pseudolosowo wygenerowanej sekwencji 50 wyborów, przy zachowaniu równej liczby skrętów w obie strony. Użycie innej kolejności skrętów każdego dnia wyeliminowało możliwość zapamiętywania przez zwierzęta sekwencji lub powtarzalnych wzorców w ich konstrukcji. W kontraście do eksperymentu ze wskazówką kontekstową, gdzie przedmiotem badanym była charakterystyka nowo wyłaniającej się reprezentacji przestrzennej, w tym eksperymencie planowano zbadanie reakcji zwierząt przejawiających stabilną zależność decyzji od bodźców wizualnych na wprowadzenie zmian do środowiska. W związku z tym zmodyfikowano kryterium przejścia do etapu testowego – wymagane było dokonanie przynajmniej 80% poprawnych wyborów w sesji przez trzy następujące po sobie dni.

Test i obrazowanie

W eksperymencie 2. przeprowadzano trzy testy w odstępie przynajmniej 24 godzin. Myszy osiągające kryterium zakończenia treningu naprzemiennie przydzielano do grup – uzyskując w ten sposób zbalansowany udział zwierząt uczących się w różnym tempie w każdej z nich. W trakcie testu myszy wykonywały 50 okrążeń z równą liczbą zaplanowanych skrętów w obie strony, w przeciwieństwie do treningu wyświetlano jednak tylko jeden typ wskazówki przez całą sesję. Dla dwóch grup zwierząt drugiego dnia zmieniono typ wskazówki, trzeciego dnia powtarzano wskazówkę z poprzedniego dnia. W trzeciej grupie myszy drugiego dnia powtarzano wskazówkę z pierwszego dnia, a trzeciego dnia ją zmieniano. Wskazówki były zatem wyświetlane w następującej kolejności dla każdej z grup: grupa LCC: test I – landmark, test II – kontekst, test III – kontekst; grupa CLL: test I - kontekst, test II – landmark, test III – landmark; grupa LLC: test I – landmark, test II - landmark, test III – kontekst. Ostatnia grupa miała test także czwartego dnia, była to sesja z ekspozycją na kontekst. Dzięki temu możliwe było eksploracyjne porównanie sesji kontekst i landmark w układzie symetrycznym. Zwierzęta były nagradzane po każdym okrążeniu, niezależnie od tego, czy dokonały prawidłowego wyboru, tak by nie wprowadzać uczenia asocjacji wskazówki z nagrodą, a obserwować decyzje podejmowane na podstawie zdobytej dotychczas wiedzy. Czas 90 minut do maksimum ekspresji c-Fos obliczano od punktu zerowego ustalonego na 5 minut po rozpoczęciu sesji behawioralnej. Obrazowanie przeprowadzano zgodnie ze schematem opisanym w punkcie 2.4. Myszy z grupy LLC (określanej też jako rozszerzona) były obrazowane również po ostatniej sesji treningowej,

aby umożliwić porównanie populacji neuronalnej aktywowanej w odpowiedzi na test z potencjalnym engramem pamięciowym treningu.

W eksperymencie 3. przeprowadzano dwa testy zgodnie z opisanym powyżej wzorcem – po jednym z każdym typem wskazówki. Zwierzęta podzielono na dwie grupy, różniące się kolejnością wskazówek w testach. W dalszym tekście, kiedy grupy te nazywane są grupą kontekst lub landmark, odnosi się to do ostatniej sesji testowej – przeprowadzonej przed uśmierceniem zwierząt i zebraniem mózgów. Przeprowadzono dwie sesje testowe, aby mieć informację o wyniku nawigacji każdego osobnika na podstawie obu typów wskazówek i móc ocenić, która z nich miała dominujące znaczenie dla danej myszy. Zwierzęta były uśmiercane 90 minut od punktu zerowego (5 minut po rozpoczęciu sesji testowej) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 2.5.1. Po ok. 4 tygodniach mózgi były poddawane procedurze oczyszczania iDISCO+ (punkt 2.5.1.).

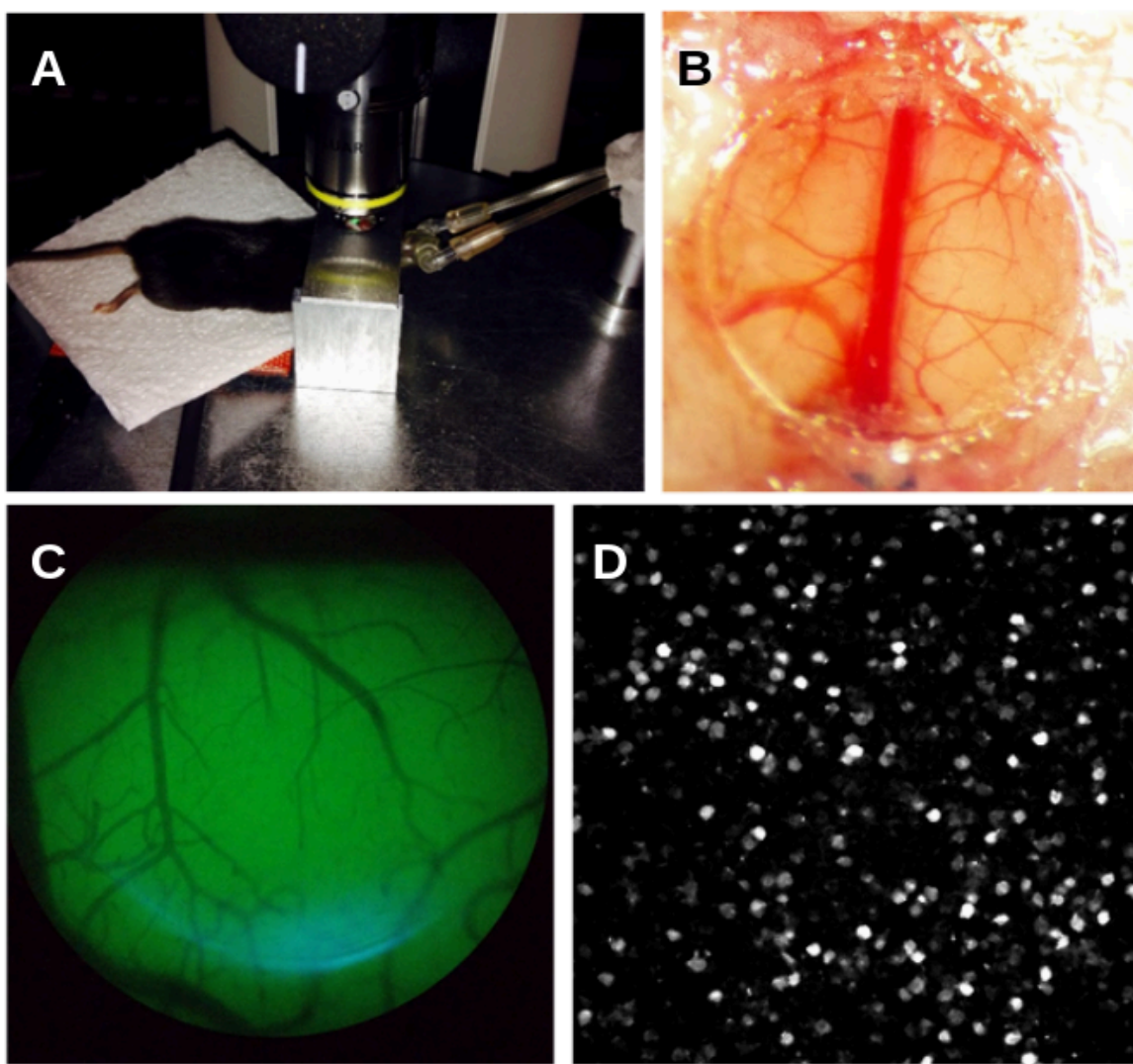


Ryc. 6: Przebieg eksperymentów 2 i 3. Na osi czasu przedstawiono kolejne etapy procedury doświadczalnej. Po habituacji zwierzęta poddawano treningowi wstępnemu, w którym kierunek skrętu w każdym okrążeniu był wymuszony przez zamknięcie drzwi do przeciwnego ramienia. Następnie rozpoczynał się właściwy trening, gdzie myszy uczyły się nawigacji na podstawie złożonego zestawu wskazówek (A). Trening dla każdego zwierzęcia kończył się w momencie osiągnięcia kryterium stopu. Eksperyment zamykała sekwencja dwóch testów. Jedna grupa zwierząt w pierwszym teście miała za zadanie podejmować decyzje na podstawie wyłącznie wskazówki kontekstowej (B1), drugiego dnia kierując się tylko schematycznym landmarkiem (B2). W drugiej grupie kolejność testów była odwrócona.

2.5. Przyżyciowe obrazowanie aktywności neuronalnej przy użyciu mikroskopii dwufotonowej

Obrazowanie wykonywano za pomocą mikroskopu dwufotonowego Zeiss 7 MultiPhoton InVivo z laserem Coherent Chameleon Pulsed Laser 690-1040 nm o szerokości pulsu 140 fs.

Zwierzę wprowadzano w stan narkozy poprzez zastosowanie anestetyku wziewnego – izofluranu (indukcja – 5%, podtrzymanie – 1% w tlenie). Na czas obrazowania mysz była umieszczana w światłoszczelnej komorze mikroskopu. Zwierzę było unieruchomione poprzez umieszczenie w specjalnie wykonanym statywie z magnesami neodymowymi ułożonymi w tym samym układzie, ale o przeciwnych biegunach względem magnesów znajdujących się na głowie zwierzęcia. Zapewniono utrzymanie optymalnej temperatury ciała przez umieszczenie zwierzęcia na macie grzewczej. Okienko czaszkowe oczyszczano, po czym dokonywano oceny procesów gojenia i rozmieszczenia unaczynienia w trybie szerokopółowym, wykorzystując autofluorescencję tkanek przy wzbudzeniu lampą fluorescencyjną. Używano obiektywu suchego EC-Plan-Neofluar 10× z aperturą numeryczną $NA = 0,1$. Podczas pierwszej sesji miało to na celu wybór regionów o optymalnej jakości obrazu. W następnych dniach na tym etapie lokalizowano wybrane uprzednio rejony zainteresowania. Po wyborze obszaru obrazowania, obiektyw zmieniano na model W Plan-Apochromat 20× z aperturą numeryczną $NA = 1,0$ oraz z imersją wodną. Na okienku umieszczano kroplę wody ultraczystej i obniżano obiektyw do momentu zanurzenia w cieczy. Następnie przełączano układ optyczny i wykonywano obrazowanie dwufotonowe.



Ryc. 7: Obrazowanie z użyciem mikroskopu dwufotonowego. A. Umieszczenie zwierzęcia pod mikroskopem. Mysz jest umieszczona na podkładce grzewczej i przytwierdzona do statywu w formie stolika za pomocą układu magnesów neodymowych. Za pomocą maski doprowadzana jest mieszanina tlenu z anestetykiem wziewnym izofluranem, w celu utrzymania zwierzęcia w stanie lekkiej narkozy. B. Kraniotomia przykryta szkiełkiem czaszkowym z widoczną zatoką górną strzałkową (superior sagittal sinus). C. Obrazowanie z użyciem mikroskopu dwufotonowego. D. Zbliżenie na pojedyncze komórki.

W celu wzbudzenia domeny GFP białka fuzyjnego fosGFP, długość fali lasera ustawiono na 904 nm. Moc lasera obniżano o 3 punkty procentowe względem mocy, dla której najjaśniejsze obserwowane jądra stawały się wysyczone – tak aby nie utracić informacji w przypadku silniejszej odpowiedzi na bodźce prezentowane w następnych dniach. Jako górną granicę rejestracji przyjmowano głębokość, na której obserwowane były pierwsze pojedyncze komórki, co odpowiada przejściu z I do II warstwy korowej. Rejestrowano

8-bitowe stosy 60 – 80 płaszczyzn oddalonych o 2 μm o wymiarach 512 x 512 pikseli ($\sim 1,19 \mu\text{m/px}$). Dla każdej myszy przeprowadzono 1 – 2 rejestracje, co łącznie trwało do 30 minut.

2.6. Analiza rozmieszczenia białka c-Fos w całym mózgu za pomocą metody iDISCO+

2.6.1. Utrwalenie tkanek w procesie perfuzji przezsercowej

Biorąc pod uwagę, że maksymalny poziom białka c-Fos w mózgu obserwuje się 90-120 minut po stymulacji, 90 minut po rozpoczęciu ostatniego testu behawioralnego w eksperymencie 3 przeprowadzono perfuzję przezsercową. Zwierzęta poddano wstępnej anestezji wziewnej mieszaniną powietrza z 5% izofluranu, po czym podano dootrzewnową iniekcję roztworu ketaminy z medetomidyną. Po zaniku odruchów bólowych zwierzęta uśmiercano dootrzewnowym podaniem pentobarbitalu sodu. Po ustaniu oddechu i potwierdzeniu braku wrażliwości na bodźce zewnętrzne, otwierano klatkę piersiową i wprowadzano igłę połączoną z przewodami pompy perystaltycznej do lewej komory serca. Następnie przy jednoczesnym rozcięciu prawego przedsionka serca uruchamiano system tłoczący. W pierwszym etapie przy pomocy roztworu soli buforowanej fosforanami (PBS, *phosphate-buffered saline*) z dodatkiem 0,01 M heparyny w temperaturze 4°C (50 ml/3 min) wypłukiwano płyny ustrojowe. Następnie w celu utrwalenia tkanek, wpompowywano 4% roztwór paraformaldehydu (PFA) w PBS, pH = 7,4 (50 ml/3 min). Po zakończeniu perfuzji mózgi wypreparowano i umieszczono na 24 godziny w pojemnikach wypełnionych 4% roztworem PFA. Po inkubacji utrwalone mózgi przepłukano roztworem PBS i przechowywano w 4°C w PBS z dodatkiem azydku sodu w stężeniu 0,02 M.

Lek	Dawka
Ketamina (100 mg/ml)	75 mg/kg
Cepetor (Metedomidyna, 1 mg/ml)	0,5-1 mg/kg
Morbital (Pentobarbital sodowy, 133,3 mg/ml, Pentobarbital 26,7 mg/ml)	150 mg/kg

Tabela 1. Leki oraz dawki użyte w procedurze perfuzji przezsercowej.

2.6.2. Oczyszczanie mózgów i znakowanie białka c-Fos metodą iDISCO+

Oczyszczanie optyczne mózgów oraz immunofluorescencyjne znakowanie białka c-Fos przeprowadzano zgodnie z ustalonym protokołem (Renier i in. 2014). Mózgi przekrojono na pół i do dalszej obróbki wybierano połówkę z mniejszą liczbą uszkodzeń mechanicznych. Kolejne kroki procedury przeprowadzono w szczelnie zamkniętych i dokładnie wypełnionych roztworem probówek o objętości 5 ml. Po trzykrotnym płukaniu mózgów w roztworze PBS przeprowadzono odwadnianie. Mózgi umieszczono w roztworach wodnych metanolu o wzrastającym co 20% stężeniu – kolejno 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Każde płukanie odbywało się na rotatorze w temperaturze pokojowej (RT) i trwało 1 godzinę. Płukanie w roztworze 100% wykonano dwukrotnie, po czym schłodzono preparaty do 4°C. Następnie mózgi inkubowano przez noc na rotatorze w RT w roztworze 66% dichlorometanu (DCM) i 33% metanolu. Po zakończeniu inkubacji próbki wypłukano dwukrotnie w roztworze 100% metanolu i schłodzono do 4°C. W kolejnym etapie mózgi poddano wybieleniu, umieszczając je w 5% roztworze H₂O₂ w metanolu na rotatorze w 4°C. Następnego dnia próbki ponownie uwodniono, umieszczając je w szeregu roztworów wodnych metanolu o malejącym stężeniu (60%, 40%, 20%) i w roztworze PBS, po czym dwukrotnie przeprowadzono płukanie w roztworze PTx.2 (0,2% Triton X-100 w PBS). Wszystkie płukania tego dnia wykonano w RT i trwały 1 godzinę.

Następne kroki przeprowadzono na rotatorze w 37°C. Mózgi inkubowano przez 2 dni w roztworze permeabilizującym (0,3 M glicyny, 20% dimetylosulfotlenku (DMSO) w PTx.2). Po tym czasie próbki umieszczono na 2 dni w roztworze blokującym (10% DMSO, 3% surowiczej albuminy wołowej (BSA) w PTx.2). Następnie przygotowano roztwór przeciwciała pierwszorzędowego przeciw c-Fos (Synaptic Systems 226 008, 1:1000) w PTwH (0,2% Tween-20, 0,1% heparyny (10 mg/ml) w PBS) z 5% DMSO i 3% BSA. W tym roztworze próbki inkubowano przez 5 dni. Po inkubacji mózgi przepłukano czterokrotnie przez pół godziny w PTwH, po czym przeprowadzono kolejne płukanie przez noc. W dniu płukania odwirowano również przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z barwnikiem Alexa Fluor 647 (ThermoFisher A-21244) przez 10 minut w RT z siłą 20000 g w celu uniknięcia niespecyficznego znakowania. Kolejnego dnia rozpoczęto pięciodniową inkubację w roztworze przeciwciała drugorzędowego (rozcieńczenie 1:200) w PTwH z 3% BSA i 120 μM kwasu askorbinowego. Po zakończeniu znakowania mózgi przepłukano

pięciokrotnie w PTwH, przy czym pierwsze 4 płukania trwały godzinę każde, a ostatnie do następnego dnia.

Pozostałe kroki procedury wykonano w temperaturze pokojowej. Najpierw ponownie odwodniono próbki umieszczając je na godzinę w roztworach metanolu o stężeniach kolejno 20%, 40%, 60%, 80% i 100%. Przez noc przeprowadzono kolejne płukanie w 100% metanolu. Następnego dnia mózgi umieszczono w roztworze DCM i metanolu w proporcji 2:1 na 3 godziny na wytrząsarce, po czym trzykrotnie zmieniono roztwór na czysty DCM co 15 minut. Wytrząsanie kontynuowano do momentu opadnięcia mózgów na dno probówek, po czym osuszono je i umieszczono w eterze dibenzylu (DBE). Po ok. 24 godzinach próbki stały się przezroczyste. Przechowywano je przez tydzień w temperaturze pokojowej, po czym poddano obrazowaniu.

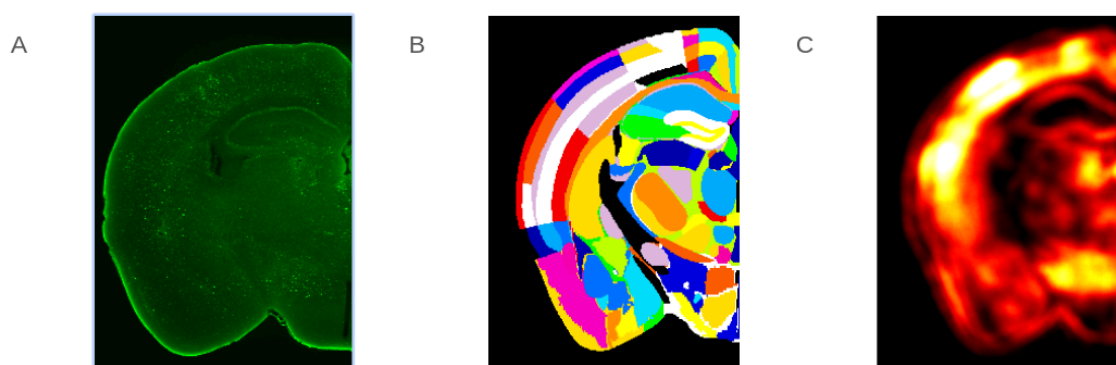
2.6.3. Obrazowanie oczyszczonych mózgów mikroskopem arkusza światła

Obrazowanie przeprowadzono z użyciem mikroskopu arkusza światła LaVision BioTec UltraMicroscope II w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN przy wsparciu dr. Marcina Barańskiego i dr. hab. Marzeny Stefaniuk. Rejestrowano obraz w dwóch kanałach: sygnał z wyznakowanych jąder c-Fos pozytywnych, wzbudzany falą o długości 638 nm, oraz autofluorescencję tkanki po wzbudzeniu falą o długości 288 nm. Półkule mózgowe obrazowano w płaszczyźnie strzałkowej. Jako że pole widzenia mikroskopu nie obejmowało całej próbki, dla każdej kroku w osi Z zbierano obraz w 12 kafelkach (ang. *tiles*) – 3 w osi brzuszno-grzbietowej x 4 w osi rostralno-kaudalnej. Każdy kafelek miał wymiary 2048 na 2048 px, przy wielkości piksela 1,45 x 1,45 μm . Odstępy w osi z wynosiły 5 μm .

2.6.4. Analiza rozmieszczenia białka c-Fos

W wyniku obrazowania półkul mózgowych mikroskopem arkusza światła uzyskano dla każdej próbki zestaw kilkudziesięciu tysięcy obrazów – między 1000 a 1400 kroków w osi z po 12 kafelków, w dwóch kanałach. W pierwszej kolejności złożono je w posortowane serie zawierające wszystkie obrazy dla jednego kafelka. Następnie wykorzystano skrypty z pakietu ClearMap2, stworzonego do analizy danych z obrazowania mózgów poddanych procedurze iDISCO+ (Kirst i in. 2020; Renier i in. 2016). Pierwszym

z nich był WobblyStitcher, algorytm do nieliniowego zszywania (ang. *stitching*) dużych obrazów uzyskanych przez sekwencyjne obrazowanie obszarów większych niż pole widzenia mikroskopu. Na podstawie obrazu z autofluorescencji szacowane są względne przesunięcia w każdej z osi oraz przekształcenia, którym należy poddać zachodzące na siebie krawędzie, by uniknąć duplikacji obiektów. Wyliczonej transformacji są poddawane obrazy z obu kanałów. Po złożeniu ich w całość kanały są dopasowywane do siebie, a następnie do referencji z Atlasu Mysiego Mózgu Allena (ang. *Allen Mouse Brain Atlas, ABA*), ze zmapowanymi strukturami mózgu (Ryc. 8). Następnie, po korekcie iluminacji w tkance, identyfikowane są pojedyncze komórki c-Fos pozytywne. Zwracany jest plik w formacie .csv, zawierający położenie centroidu każdego jądra i numer identyfikacyjny z ABA, określający przynależność do struktury mózgowej. Przed dalszym przetwarzaniem danych wybierano poziom szczegółowości, na którym przeprowadzano analizę. Odrzucano również obszary, w których liczba zliczonych komórek była na poziomie artefaktu, oraz struktury, których dopasowanie mogło być obarczone znacznym błędem ze względu na ich położenie.



Ryc. 8: Etapy przetwarzania obrazów mózgów oczyszczonych metodą iDISCO+ uzyskanych metodą mikroskopii arkusza światła. A. Obraz połówki mózgu był zszywany z kilkudziesięciu pojedynczych kafelków. B. Preparat był dopasowywany do referencji z ABA. C. Komórki c-Fos pozytywne były identyfikowane i przypisywane strukturom. C. Określano gęstość wyznakowanych neuronów w zależności od obszaru mózgu.

2.7. Analiza obrazów zarejestrowanych przy pomocy mikroskopu dwufotonowego

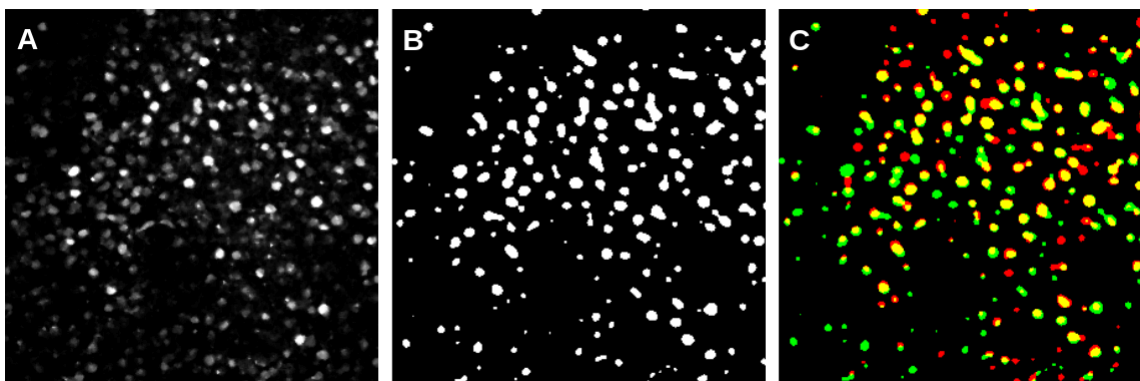
Analizę danych z obrazowania dwufotonowego przeprowadzono przy użyciu autorskich skryptów w językach Python oraz ImageJ Macro Language, a także protokołu w programie Icy (de Chaumont i in. 2012). Stworzony kod umieszczono w repozytorium

w serwisie GitHub pod adresem <https://github.com/uwlodkowska/twophoton>. W procesie analizy można wyróżnić 5 najważniejszych etapów:

1. Dopasowanie obrazów między sesjami (ang. *alignment*)
2. Detekcja komórek
3. Identyfikacja komórek obecnych w więcej niż jednej sesji
4. Analiza statystyczna zmian fluorescencji między sesjami

W pierwszym kroku zarejestrowane stosy obrazów (ang. *image stack*) poddano binaryzacji. Ze względu na rozpraszanie światła w tkance, zarejestrowana intensywność fluorescencji spada wraz ze wzrostem głębokości. W związku z tym metoda binaryzacji oparta na progowaniu (ang. *thresholding*) faworyzowałaby obiekty położone bliżej powierzchni. W związku z tym zastosowano zaimplementowaną w oprogramowaniu Icy transformację falkową, która pozwoliła na wykrycie obiektów o rozmiarze zbliżonym wielkości jądra neuronu oraz lokalnej zmianie intensywności. Następnie wykonano dopasowanie zbinaryzowanych obrazów między sesjami, po czym przycięto je tak, by w każdym pliku zachować część wspólną zarejestrowaną we wszystkich dniach obrazowania. Dopasowanie w płaszczyźnie x-y wykonano dla każdej serii wielokrotnie, każdorazowo dla podzbioru kolejnych 5 obrazów, aby zminimalizować wpływ przesunięć powstających w trakcie obrazowania, wynikających z szeregu czynników takich jak ewaporacja cieczy imersyjnej i powolne fizjologiczne zmiany objętości mózgu wywołane spadkiem nawodnienia i długotrwałym unieruchomieniem (Grienberger i in. 2022).

Na dopasowanych obrazach ponownie zastosowano transformację falkową, która poza wskazaniem dla każdego piksela, czy należy on do jądra komórki, czy do tła (co wykorzystano w poprzednim kroku), wykonuje również segmentację. Obrazy zostały poddane również segmentacji wododziałowej (ang. *watershed*) w celu rozdzielenia nakładających się obiektów. Dla zapewnienia jak największej standaryzacji, intensywność każdej komórki obliczano dla tej samej liczby wokseli. Usunięto detekcje bliskie krawędzi przyciętego obrazu, w których część jądra nie była zawarta w jego granicach, oraz te o niskiej liczbie wokseli – zwykle były to artefakty i komórki tła o niskim kontraście.



Ryc. 9: Etapy obróbki obrazów z mikroskopu 2P. **A.** Oryginalny obraz po wygładzeniu filtrem medianowym o średnicy 3 px. **B.** Obraz zbinaryzowany. Komórki wykryto na podstawie kształtu i kontrastu względem otoczenia, bez narzucania globalnego progu odcięcia intensywności. **C.** Nałożone na siebie obrazy z dwóch kolejnych sesji. Komórki z pierwszej i drugiej sesji są oznaczone odpowiednio czerwonym i zielonym kolorem. W miejscach, w których się nakładają (kolor żółty) znajdują się neurony aktywne w obu sesjach.

Dla każdego zarejestrowanego obszaru sumowano komórki wykryte w poszczególnych sesjach obrazowania. Następnie skonstruowano graf, w którym każda komórka stanowiła wierzchołek, krawędzie ustanowiono pomiędzy komórkami, których centroidy były od siebie oddalone o wartość poniżej ustalonego progu. Komórki obecne w więcej niż jednej sesji tworzyły spójne składowe grafu, co umożliwiło identyfikację i usunięcie duplikatów. Uzyskane zbiory komórek analizowano pod kątem tego, w których sesjach zostały wykryte, a także jak zmieniała się ich intensywność fluorescencji pomiędzy tymi sesjami. W związku z rozpraszaniem światła przez tkanki, intensywność obrazu - zarówno tła, jak i neuronów - maleje wraz ze wzrostem głębokości obrazowania. W obróbce danych po rejestracji wiąże się to z niedoskonałością technik korygujących te straty, stąd bezpośrednie porównywanie wartości fluorescencji pomiędzy komórkami jest obciążone szeregiem założeń przyjętych przez algorytm wybrany do korekcji. W związku z tym zdecydowano o użyciu lokalnie ważonego wygładzania regresyjnego (ang. *LOWESS*, *Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots*) w celu usunięcia trendu warunkowanego przez zmianę głębokości. Użyto standaryzacji metodą bezwzględnego odchylenia od mediany, przy ograniczeniu do 5 najbliższych obrazów w serii (Cleveland 1979). Podejście to nie wypłaszcza nieliniowych zależności w danych i pozwala na porównywanie zmienności komórek przy użyciu z góry ustalonego stałego progu dla każdego osobnika.

2.8. Odczynniki i przeciwciała

Nazwa	Producent	Nr katalogowy
Odczynniki		
Azydek sodu	Avantor Performance Materials Poland S.A.	PA-06-792770426#250G
Buforowany roztwór soli fosforanowych (PBS)	Medicago	09-9400-100
Dichlorometan (DCM)	Sigma (Merck)	270997-12X100ML
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich	34869-1L
Eter dibenzylu (DBE)	Sigma (Merck)	108014-1KG
Etylowy alkohol (99,8%)	Avantor Performance Materials Poland S.A.	64-17-5
Heparyna	Polfa Warszawa S.A.	100028610
Metylowy alkohol	Sigma (Merck)	322415-2L
Nadtlenek wodoru (30%)	Alchem Grupa Sp. z o. o.	363-118851934-500ML
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	30525-89-4
Surowicza albumina wołowa (BSA)	Sigma-Aldrich	A3294-100G
Triton X-100	Sigma-Aldrich	9036-19-5
Tween 20	Sigma-Aldrich	9005-64-5
Przeciwciała		
Przeciwciało pierwszorzędowe królicze anty-c-Fos	Synaptic Systems	226 008
Przeciwciało drugorzędowe kozie przeciwko IgG królika z AlexaFluor 647	ThermoFisher Scientific	A-21244

Tabela 2. Odczynniki i przeciwciała wykorzystane w procedurach doświadczalnych

2.9. Analiza statystyczna

2.9.1. Modele GEE

Konstrukcja modelu

Główną metodą analizy populacji komórek ze względu na złożoność danych były modele oparte na uogólnionych równaniach estymujących (ang. *generalized estimating equations, GEE*). GEE jest podejściem marginalnym (uśredniającym efekt w populacji), rozszerzającym uogólnione modele liniowe (*GLM, generalized linear model*), znajdującym zastosowanie dla danych wewnątrznie skorelowanych, jak dane z powtarzanymi pomiarami (in. dane podłużne, ang. *longitudinal data*) (Ghisletta i Spini 2004; Liang i Zeger 1986). Zmienna zależna Y może mieć rozkład ciągły lub dyskretny (np. dwumianowy dla danych 0/1 i proporcji, wielomianowy dla >2 kategorii). W niniejszej rozprawie GEE używane są do modelowania odsetka komórek spełniających zero-jedynkowy warunek w zależności od pary sesji (obecność – podpunkty 3.1.2 i 3.2.3 – lub zmienność – podpunkty 3.1.3 i 3.2.5). W tych analizach zmienna zależna ma charakter binarny – modelowane jest prawdopodobieństwo $p_{ij} = P(\text{komórka} = 1|i, j)$ (średnia marginalna po komórkach) dla osobnika i oraz pary sesji j . Eksperyment przeprowadzony na n zwierzętach z k pomiarami (tutaj: parami sesji) dostarcza $n \times k$ obserwacji zmiennej objaśnianej Y_{ij} (populacji komórek). Ponadto w GEE można uwzględnić szereg zmiennych objaśniających (kowariat) – dyskretnych lub ciągłych. W modelu z l kowariatami daje to dla każdego osobnika macierz projektującą X_i o wymiarach $N_i \times q$, gdzie N_i jest liczbą obserwacji dla osobnika (komórek), a $q = 1 + (K - 1) + l$ (wyraz wolny, liczba poziomów czynnika pary sesji z pominięciem poziomu referencyjnego, liczba kowariat). Należy zaznaczyć, że GEE znajdują zastosowanie także w przypadku gdy nie każdy z osobników ma pełną liczbę pomiarów (sesji) – jednak w przypadku niewielkiej liczby myszy (< 30) w przeprowadzonych w niniejszej pracy analizach mogłoby to prowadzić do zaburzenia estymowanych współczynników, dlatego zwierzęta z niepełną liczbą sesji wyłączano z analiz dotyczących pełnego zestawu obserwacji.

W języku GEE łączy jest funkcją, która łączy średnią wartości modelowanej zmiennej z liniowym predyktorem. Dla łączy g główne równanie modelu ma postać $g(E[Y|X]) = g(\mu_i) = X \beta$, gdzie β jest wektorem współczynników określających wpływ

zmiennych objaśniających i kowariat na modelowane prawdopodobieństwo. W przypadku binarnej zmiennej zależnej stosowane jest łącze logit: $g(p) = \log \frac{p}{1-p}$, które mapuje prawdopodobieństwo z przedziału (0,1) na zbiór liczb rzeczywistych, co pozwala na użycie liniowego predyktora w regresji logistycznej (Hanley i in. 2003).

W punktach 3.1.2. oraz 3.2.3., w których porównywany był poziom stabilności reprezentacji neuronalnej w parach sesji z uwzględnieniem wpływu SNR na wykrywalność neuronów, skonstruowany model miał postać:

$$(*) \quad g(\mu_i) = \beta_0 + k_{s1s2,i} \beta_{s1s2} + SNR_i \beta_{SNR}$$

Wyraz $k_{s1s2,i}$ ma wartość 0 lub 1, w zależności od tego, czy modelowana jest para sesji S1, S2, czy para referencyjna. Równanie główne dla analizy poziomu zmienności komórek (w górę lub w dół), co było przedmiotem analizy w podrozdziałach 3.1.3. i 3.2.5., miało analogiczną formę, z uwzględnieniem większej liczby kowariat.

Dla tak zdefiniowanego modelu, estymacja polega na wyznaczeniu współczynników β , poprzez rozwiązanie następującego układu równań, sumowanego po n myszach:

$$\sum_{i=1}^n (A_i X_i)^T V_i^{-1} (y_i - \mu_i) = 0,$$

gdzie y_i to wartości zaobserwowane eksperymentalnie dla myszy, $\mu_i = g^{-1}(X_i \beta)$ – średnia (wartość oczekiwana) prawdopodobieństwa spełnienia warunku przez komórkę, A_i – funkcja wariancji, której forma determinowana jest przez rodzinę rozkładu oraz modelowaną średnią, a V_i to robocza macierz kowariancji (ang. *working covariance*), wyznaczany z użyciem funkcji wariancji i struktury kowariancji. Struktura kowariancji z założenia powinna odzwierciedlać wewnętrzną korelację wartości obserwacji (komórek) myszy na przestrzeni kolejnych pomiarów (pary sesji), jednak niewłaściwy jej wybór daje poprawne estymaty, błąd wpływa jedynie na efektywność estymacji.

W skryptach użyto implementacji GEE z modułu *statsmodels*.

Estymowane średnie marginalne (EMM)

Estymowane średnie marginalne przenoszą wynik w skali łącza do domeny prawdopodobieństwa. W przypadku pierwszego modelu użytego w rozprawie, opisanego równaniem głównym (*), oznacza to, że estymowany odsetek komórek spełniających warunek wynosi:

$$EMM_{s1s2} = g^{-1}(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_{s1s2} + SNR^* \hat{\beta}_{SNR}) \text{ dla pary } s1s2,$$

$$EMM_{ref} = g^{-1}(\hat{\beta}_0 + SNR^* \hat{\beta}_{SNR}) - \text{dla pary referencyjnej.}$$

W niniejszej rozprawie jako parę referencyjną przyjęto parę sesji S2 i S3 – we wszystkich bazowych eksperymentach. $\hat{\beta}$ to współczynniki z dopasowanego modelu. SNR^* to ustalona dla wszystkich myszy ta sama wartość SNR (zwykle średnia lub mediana po myszach) – co ma zniwelować efekt różnej jakości obrazowania pomiędzy zwierzętami. Można też uśrednić EMM po zwierzętach – wtedy oblicza się powyższą wartość dla SNR z każdej myszy i uśrednia wynik.

Istotność statystyczna kontrastów pomiędzy EMM jest określana na podstawie testu Walda z $H_0: EMM_{s1s2} - EMM_{ref} = 0$. Test Walda opiera się na błędach standardowych obliczonych z odpornej macierzy kowariancji, którą wyznacza się na podstawie obserwacji zmiennej zależnej, estymowanych współczynników β , oraz wybranej w trakcie konstrukcji modelu funkcji łączy i struktury kowariancji.

2.9.2. Zastosowane testy statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem skryptów w języku Python, korzystając z bibliotek *statsmodels*, *SciPy stats* oraz *scikit-bio*. Za istotny uznawany był wynik, dla którego $p < 0,05$, za graniczny – $p < 0,10$. Używano testów dwustronnych, o ile nie zaznaczono inaczej.

W przypadkach, w których konieczne było sprawdzenie czy dane mają rozkład normalny, zastosowano test Shapiro-Wilka.

Efekty treningu behawioralnego porównywano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami RM-ANOVA. Test ten był wykorzystany również w ocenie wewnątrzsobniczych różnic w liczebności komórek aktywnych w różnych sesjach behawioralnych. Założenie o sferyczności weryfikowano testem Mauchly'ego.

Dla par powtórzonych pomiarów obrębie osobnika stosowano sparowany test t Studenta – dla rozkładu normalnego lub test rangowy Wilcoxona – w przeciwnym przypadku.

Przy porównaniu różnicy między dwoma pomiarami wyrażonej jako krotność zmiany użyto jednopróbkowego testu t Studenta.

Różnice w treningu behawioralnym dla dwóch niezależnych grup eksperymentalnych porównano testem t Welcha (przy rozkładzie normalnym w obu grupach) lub testem U Manna-Whineya (brak normalności w dowolnej grupie).

Wpływ sesji początkowej na współczynnik zaniku komórek między sesjami w zależności od interwału czasowego pomiędzy nimi oceniono testem rang Friedmana w przypadku więcej niż 2 możliwych punktów odniesienia.

Do całościowego porównania różnic między gęstością komórek c-Fos+ w mózgach oczyszczonych i wyznakowanych metodą iDISCO+ zastosowano permutacyjną wieloczynnikową analizę wariancji (ang. *permutational multivariate analysis of variance*, *PERMANOVA*). Analizę na poziomie pojedynczych struktur przeprowadzono z zastosowaniem testu t Welcha z poprawką Benjaminiego-Hochberga. W celu oceny związku między wynikami behawioralnymi a aktywacją obszarów mózgu obliczono korelację rang Spearmana.

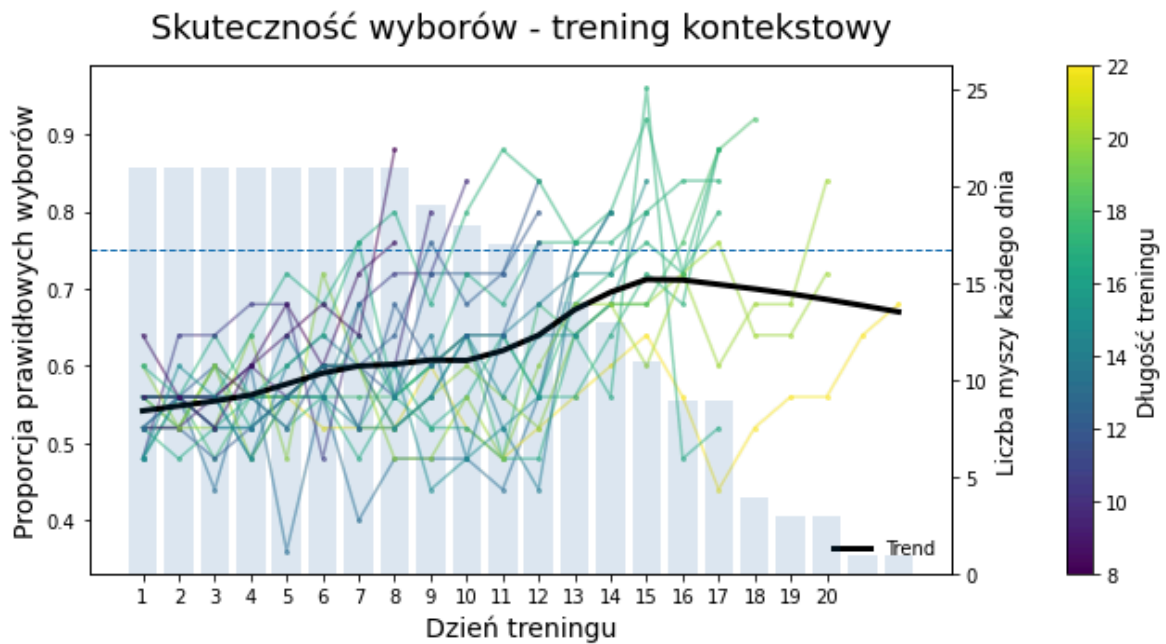
3. WYNIKI

3.1. Reprezentacja kontekstu w RSC w momencie zmiany strategii przestrzennej

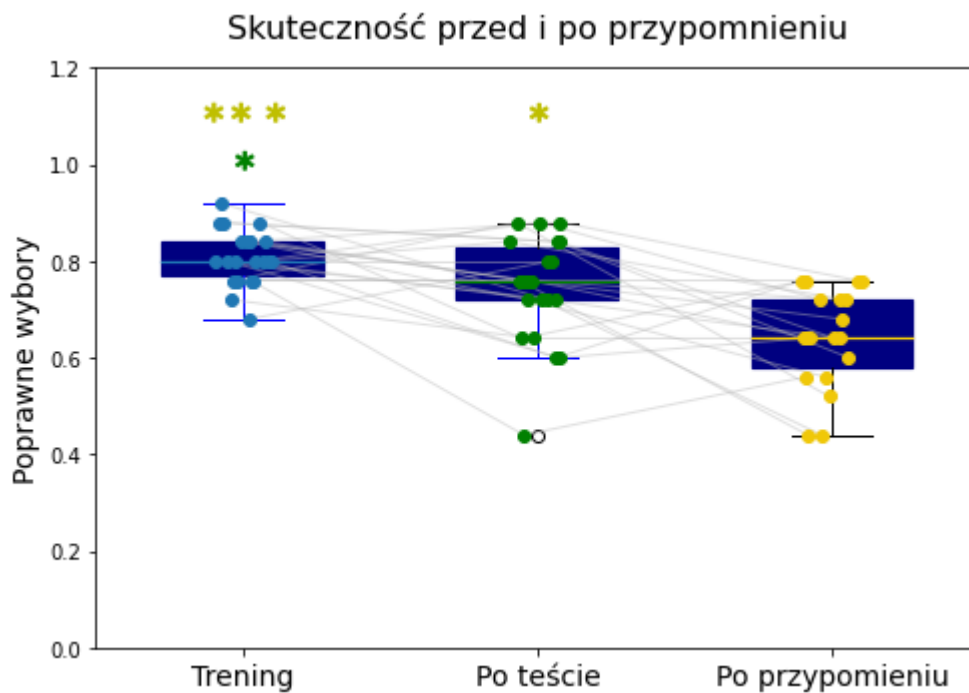
3.1.1. Wyniki behawioralne

W eksperymencie 1. zamiast ustalonego z góry czasu trwania eksperymentu wprowadzono zależność długości treningu od osiągniętego wyniku. Miało to na celu stworzenie warunków, w których nacisk będzie położony na porównanie różnic wewnątrzsobniczych u myszy o jak najbardziej zbliżonym poziomie internalizacji strategii nawigacyjnej bazującej na sygnałach wizualnych. Jednocześnie brano pod uwagę, że długość trwania treningu do momentu osiągnięcia kryterium stopu jest cenną informacją dotyczącą różnic międzysobniczych. W eksperymencie brało udział łącznie 25 myszy, z czego 3 nie osiągnęły wymaganego progu skuteczności po 25 dniach treningu i nie zostały uwzględnione w analizie. Zaobserwowano spadek poprawnych wyborów myszy po 3 dniach testowych ($W = 37$, $p = 0,038$, $n = 22$) i dalszy spadek, gdy porównano skuteczność w sesji przypominającej po pierwszym teście i w sesji po teście odtwarzanie pamięci (porównanie tylko dla zwierząt biorących udział w etapie *retrieval*, $W = 28$, $p=0,023$, $n = 19$). Spadek po sesjach testowych może oznaczać, że u zwierząt, które dopiero zaczynają internalizować nową strategię przestrzenną, test z ekspozycją tylko na jeden z kontekstów każdego dnia wprowadza nowy schemat zachowania. Chociaż relacja między wskazówką a nagrodą pozostaje taka sama, konieczność skrętu zawsze w jedną stronę może być odbierana jako inna strategia, w momencie gdy asocjacja kierunek – kontekst nie jest ugruntowana.

A



B



Ryc. 10: Wyniki treningu kontekstowego w labiryncie T. A. Krzywa uczenia zwierząt. Trening uznawano za zakończony, gdy myszy osiągnęły z góry ustalony próg skuteczności na poziomie 75%. Zaobserwowano różnice w długości treningu pomiędzy osobnikami. B. Porównanie końcowej sesji treningowej z wynikiem uzyskanym po przejściu przez procedury testowe oraz po czterotygodniowej przerwie eksperymentalnej. Zauważono sukcesywny spadek skuteczności.

Jako że w eksperymencie użyto zarówno samców, jak i samic, porównano wyniki treningu dla obu płci. Z eksperymentu wykluczono dwie samice, ze względu na to, że w ciągu dwóch tygodni treningu osiągały one wyniki na poziomie skuteczności przy wyborze losowym, nie wykazując tendencji wzrostowej. Pozostało 7 samic i 16 samców. Przeprowadzono test t Welcha w celu porównania szybkości uczenia (liczby dni do osiągnięcia kryterium), skuteczności po pierwszej serii testów, oraz skuteczności w trakcie sesji przypominającej. Nie wykazano różnic pomiędzy grupami. Dla szybkości uczenia: $t(21,00) = 1,31$, $p = 0,21$, średnia różnica -1,63 (krótszy trening w grupie samic); dla wyniku po serii testowej: $t(16,87) = -0,41$, $p = 0,69$, średnia różnica 5 pp; dla wyniku w serii przypominającej: $t(6,51) = -0,53$, $p = 0,61$, średnia różnica 3 pp.

W kolejnych podrozdziałach analizę przeprowadzono dla myszy, dla których obraz z mikroskopu dwufotonowego spełniał szereg warunków: był odpowiedniej jakości, nie był zaburzony przez artefakt oddechowy oraz był stabilny pomiędzy sesjami w stopniu pozwalającym na precyzyjne dopasowanie obszarów pomiędzy rejestracjami. Jako że w tej grupie znalazła się jedna samica, przeprowadzono analizę tylko dla samców (10 osobników).

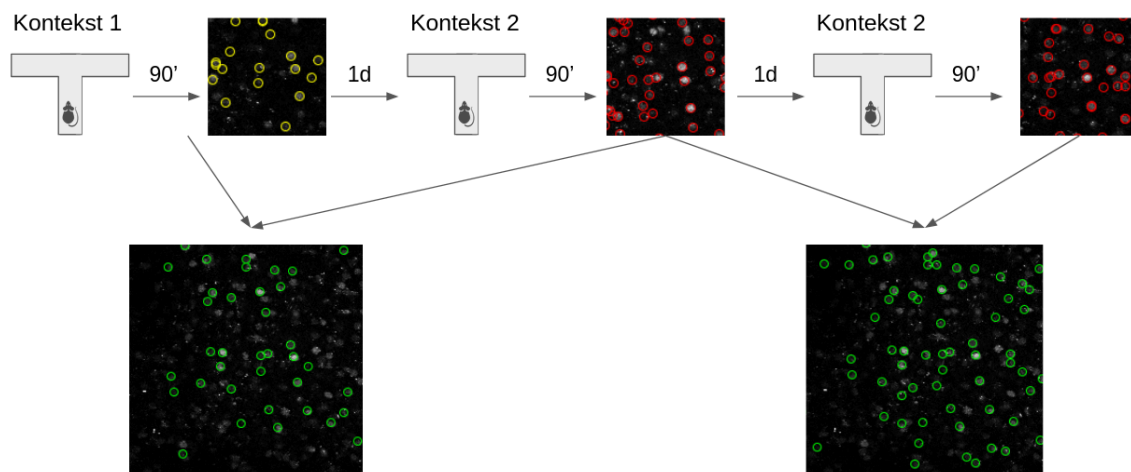
3.1.2. Zmiany aktywności komórek pomiędzy sesjami behawioralnymi

W czasie każdej z sesji testowych myszy były eksponowane tylko na jeden z kontekstów – związany ze skrętem w określoną stronę. Po przeprowadzeniu eksperymentu przeanalizowano uzyskane obrazy z mikroskopu dwufotonowego. Po wstępnej obróbce danych opisanej w rozdziale 2.6. sprawdzono, czy na podstawie wewnątrzsobniczych różnic w liczbie komórek c-Fos(+) można stwierdzić, że w RSC powstała osobna reprezentacja kontekstów wiążących bodziec wizualny z lokalizacją nagrody. W tym celu sprawdzono, czy populacje aktywnych neuronów zarejestrowane po każdej z sesji testowych wykazują się większym podobieństwem, gdy zwierzę było eksponowane na kontekst związany z tym samym kierunkiem skrętu niż w przypadku przeciwnych kierunków.

W badaniach śledzących wyznakowane populacje neuronalne na przestrzeni wielu sesji znaczną uwagę poświęcono tendencjom przejawianym przez neurony przy tranzycji pomiędzy kolejnymi sesjami (Czajkowski i in. 2014; J. Lee i in. 2021; Poll i in. 2020). Najprostszym sposobem klasyfikacji tego rodzaju jest skategoryzowanie komórki dla każdej z par kolejnych sesji jako włączanej (**on** – nieobecna w pierwszej sesji, obecna w kolejnej, B\A), wyłączanej (**off** – obecna w pierwszej sesji, nieobecna w drugiej A\B), stabilnej (**const**

– obecna w obu $A \cap B$). Po normalizacji liczby neuronów w każdej kategorii względem liczby wszystkich komórek aktywnych w przynajmniej jednej z tych sesji ($A \cup B$), można porównać dynamikę tranzycji pomiędzy sesjami w badanej grupie myszy i zbadać wpływ sesji na proporcje między kategoriami neuronów.

Proporcje każdej z tych kategorii względem mianownika $A \cup B$ spełniają tożsamość $on+off+const=1$, co wprowadza współzależność między poziomami czynnika “kategoria”. Dlatego porównania przeprowadzono w dwóch etapach. Oceniano kolejno wpływ pary sesji na (1) stabilność reprezentacji neuronalnej przy przejściu pomiędzy sesjami – zmienną zależną była frakcja komórek obecnych w obu sesjach ($\frac{const}{n}$) – oraz na (2) kierunek zmiany wśród komórek zmiennych, zmienna zależna – frakcja komórek *on* względem liczby komórek zmiennych ($\frac{on}{on+off}$). Ten sposób normalizacji zapewniał porównywalność wartości i eliminował wpływ liczby komórek w różnych sesjach. W pierwszej kolejności, po sprawdzeniu założeń, stosowano sparowany test t-studenta. Następnie, ze względu na konstrukcję danych (różne mianowniki, stała suma kategorii) zweryfikowano zasadność użytej metody z zastosowaniem modelu GEE z kowariatami.



Ryc. 11: Wizualna interpretacja stabilności reprezentacji neuronalnej pomiędzy sesjami. 90 minut po sesji testowej obrazowano pod mikroskopem dwufotonowym jądra komórkowe z ekspresją białka fuzyjnego FosGFP. Rejestrowano populacje pojawiające się po ekspozycji na kontekst A (kolor żółty) i na kontekst B (dwie sesje, kolor czerwony). Następnie identyfikowano, jaki procent ogółu stanowiły komórki obecne w dwóch sesjach z rzędu (kolor zielony). Porównywano te frakcje dla pary sesji z tym samym bodźcem i z różnymi bodźcami.

Analizę przeprowadzono dla $n = 10$ zwierząt. Łącznie na obrazach mikroskopowych zidentyfikowano 16266 komórek (średnio 1627, min = 969, max = 2435). Znaczna część zarejestrowanych neuronów pojawiła się we wszystkich sesjach obrazowania. Możliwe, że ich funkcja fizjologiczna jest inna niż w przypadku neuronów o silnej zmienności. Dlatego w testach uwzględniono je jako oddzielną populację.

Sparowany test t-studenta nie wykazał istotnej różnicy w stabilności reprezentacji neuronalnej na przestrzeni sesji ($t = 0,14$, $df = 10$, $p = 0,891$, $d_z = 0,04$, średnia różnica < 1 pp (95% CI -0,03; 0,03)). Test przeprowadzono również wyłączając z analizowanej puli komórki zawsze aktywne, stanowiące średnio $0,57 \pm 0,05$ spośród tych stabilnych w przynajmniej jednej parze sesji. Nie przyniosło to jednak innych konkluzji, a wielkość efektu nadal była zdecydowanie nieznacząca ($d_z = -0,07$). Analiza kierunku zmian także nie wykazała różnic pomiędzy parami sesji w żadnej z dwóch opisanych populacji komórek ($p > 0,1$, $d_z < 0,2$).

Równolegle przeprowadzono analizę z zastosowaniem modelu marginalnego opartego na uogólnionych równaniach estymujących z rodziny dwumianowej, z łączem logit. Wprowadzono go ze względu na strukturę danych (nierówne mianowniki, suma kategorii = 1), a także ze względu na możliwość włączenia do analizy kowariat jakości obrazu (SNR (*signal to noise ratio*), względna głębokość w rejestrowanej serii). Co istotne, modele GEE pozwalają na analizę wpływu kowariat na poziomie komórek, a poprzez dodanie wag możliwe jest zrównanie wkładu każdego z osobników i uzyskanie odpowiedzi na poziomie populacyjnym. Przy tym komórki traktowane są jako skorelowane wewnątrz jednego osobnika i niezależne między myszami.

Zastosowano poprawkę dla małej liczby klastrów (w tym przypadku – myszy) (Mancini i DeRouen 2001). Model ze strukturą exchangeable napotkał problemy ze zbieżnością, wybrano więc strukturę z założeniem niezależności. W GEE wybór taki wpływa przede wszystkim na efektywność i wielkość błędów standardowych (dla wybranej struktury – w stronę bardziej konserwatywną), a nie na estymowany średni efekt populacyjny (Liang i Zeger 1986). Po ustaleniu struktury kowariancji, przeprowadzono porównanie dopasowania po włączeniu do modelu kowariat: ustandaryzowanego SNR (z-score) i względnej głębokości znormalizowanej do przedziału (0,1). Analiza dopasowania modeli wykazała, że ze względu na korelację między głębokością a SNR, najskuteczniejszy model uwzględnia tylko SNR ($\Delta QIC > 4000$ względem modelu bez kowariat).

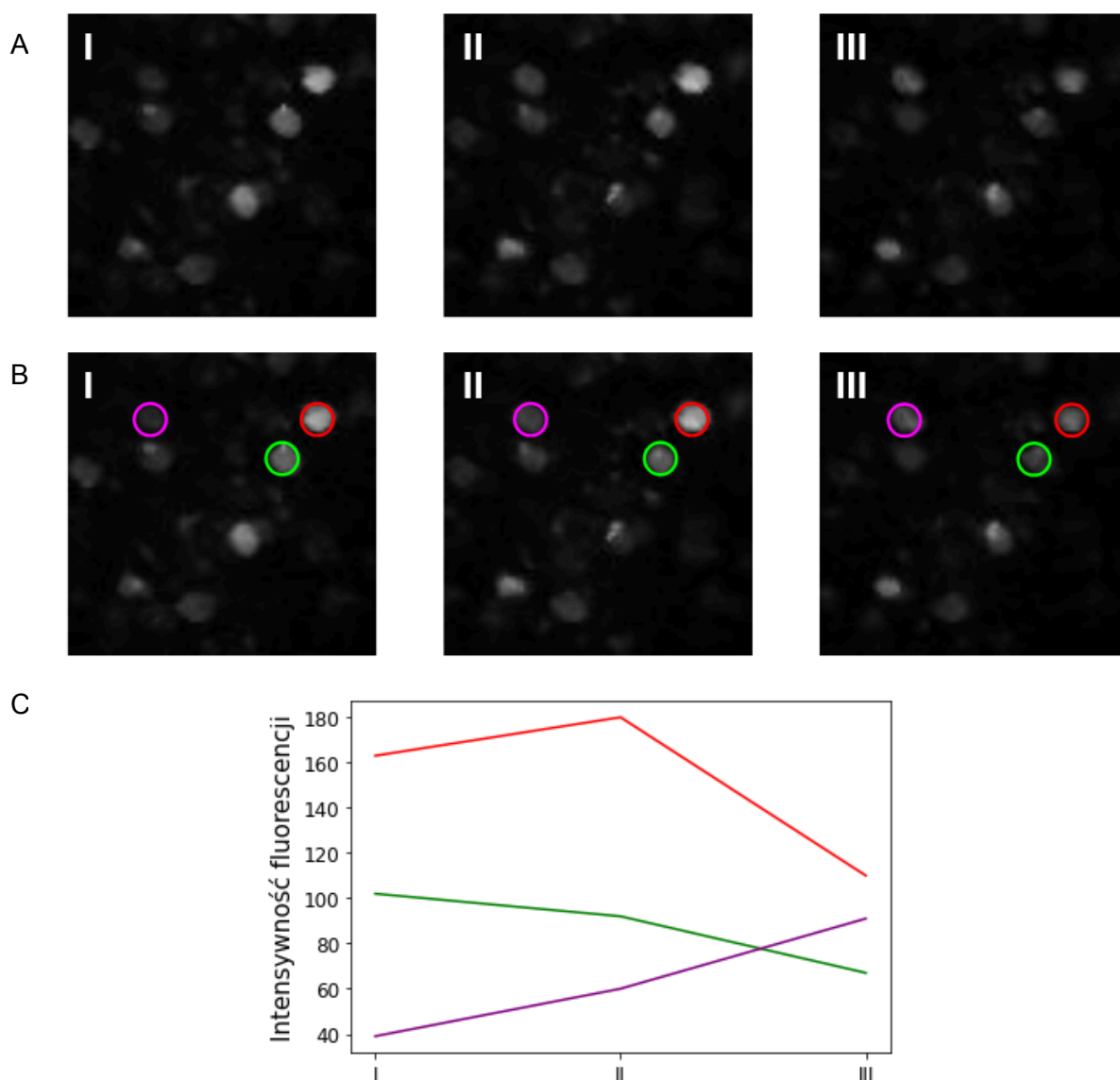
Z dopasowanego dwumianowego modelu wyznaczano dla każdego przejścia estymowane średnie marginalne (EMM), tym samym transformując oszacowanie z natywnej skali logitowej modelu na biologicznie interpretowalną skalę prawdopodobieństw. Uzyskano przewidywane prawdopodobieństwa klasyfikacji komórek jako stabilnych, z uśrednieniem po myszach. Obliczono wynik również z SNR ustalonym na 0, raportowano oba wyniki tylko w przypadku istotnych rozbieżności. Różnice między przejściami porównano skorygowanymi testami Walda na kontrastach EMM z użyciem macierzy kowariancji modelu.

Mimo tego, że GEE umożliwił włączenie do wnioskowania SNR, który okazał się czynnikiem istotnym dla dopasowania modelu, nie wpłynęło to na rezultat, który był spójny z wynikami uzyskanymi ze sparowanego testu t-studenta. Dla szacowanych proporcji komórek stabilnych: $p = 0,743$, średnia różnica $-0,3$ pp, 95% CI $(-0,03; 0,02)$, w pozostałych przypadkach wielkość efektu również nie przekroczyła 1 pp, $p > 0,1$.

3.1.3. Zmienność intensywności fluorescencji pomiędzy sesjami

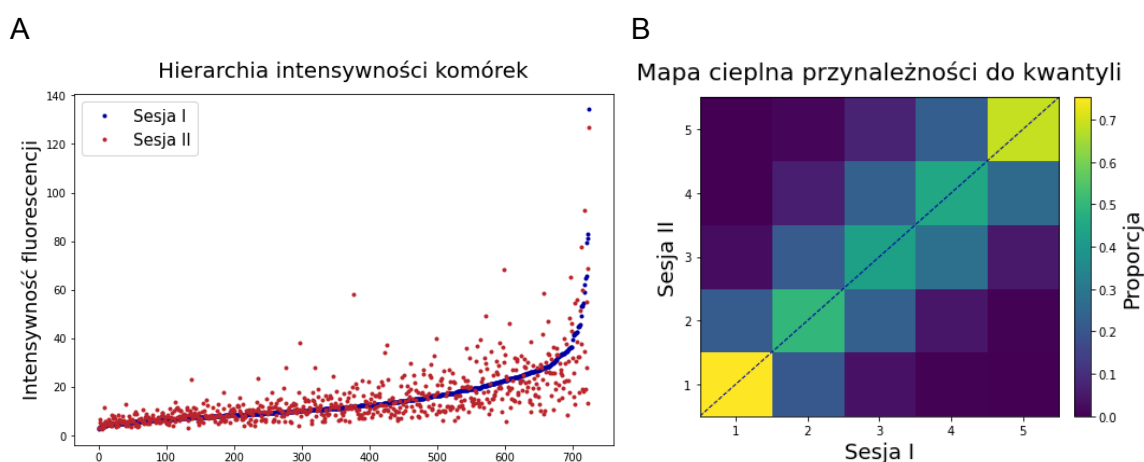
Poza zero-jedynkową klasyfikacją neuronów w każdej sesji jako wykryty/nie wykryty, przeanalizowano także zmiany intensywności pomiędzy kolejnymi sesjami, w których komórka została zidentyfikowana. Tak uproszczone podejście ułatwia koncepcyjnie analizę danych, pomija jednak niuanse dotyczące siły odpowiedzi pojedynczego neuronu (Ryc. 12). Jak zostało to opisane we wstępie, RSC położone jest u zbiegu licznych strumieni informacji i trudno byłoby wskazać z całkowitą pewnością obszar poświęcony wyłącznie jednemu procesowi, dlatego istotne jest uwzględnienie nie tylko obecności odpowiedzi, ale też jej zmienności. Analiza zmian fluorescencji stawia jednak szereg wyzwań. Aby określić efekt, jaki wywołuje ekspozycja na konkretną wskazówkę, konieczne jest porównanie wyników z różnych dni rejestracji. Mimo ścisłej kontroli nad warunkami obrazowania należy uwzględnić, że bezpośrednie porównywanie wartości z różnych sesji może być obarczone błędem. W celu jego ograniczenia odejmowano intensywność tła. Ponadto, aby określić efekt dla całej populacji neuronów, należy uwzględnić spadek mocy wzbudzenia wraz z głębokością, rozpraszanie sygnału w tkance i wiele innych czynników powodujących zmniejszenie zarejestrowanej intensywności fluorescencji wzdłuż osi Z. Zastosowano algorytmy korekcji efektu głębokości, jednak precyzyjne wyznaczenie krzywej zaniku jest złożonym zagadnieniem optycznym.

Porównywanie magnitudy zmian pomiędzy różnymi osobnikami jest bardziej złożone. Rejestracje te mogą się znacząco różnić w konsekwencji różnic anatomicznych, jakości operacji, kąta obrazowania, liczby obrazów zarejestrowanych w osi Z i wielu innych czynników. Wymaga to wprowadzenia standaryzacji, umożliwiającej porównywanie efektów, dla których istotna jest skala.



Ryc. 12: Zmienność fluorescencji na przestrzeni sesji. A. Komórki c-Fos+ widoczne na wycinkach obrazu z mikroskopu 2p przedstawiających ten sam obszar w trzech kolejnych sesjach. B. Kolorami zaznaczono wystąpienia 3 komórek na każdym z obrazów. C. Wykres fluorescencji na przestrzeni sesji dla każdej z komórek. Kolory linii odpowiadają oznaczeniu komórek, które reprezentują.

Możliwe jest też porównanie zmiennych wolnych od skali takich jak zachowanie hierarchii komórek pomiędzy sesjami (Ryc. 13). Ze względu na liczbę komórek zidentyfikowanych u każdej z myszy, test tau Kendalla nie dostarcza praktycznej informacji na temat statystycznej istotności różnicy w uszeregowaniu komórek w dwóch sesjach – wartość p zawsze będzie wiele rzędów wielkości niższa niż próg 0,001. Wartość statystyki tau jest jednak wiarygodną miarą wielkości efektu, który można porównać pomiędzy parami sesji. W tym celu użyto metody permutacyjnej z hipotezą zerową $H_0: \Delta\tau = 0$, gdzie $\Delta\tau = \tau(s2, s3) - \tau(s1, s2)$. Innymi słowy, H_0 odpowiada równemu “przemeblowaniu” między sesją I a II oraz między sesją I a II (hierarchia w dwóch sesjach z tym samym kontekstem jest zachowana w takim samym stopniu co pomiędzy różnymi kontekstami). Wykonano 10 000 losowych zamian etykiet wartości τ między sesją I a III wewnątrz myszy – z ustaloną sesją II. Procedurę przeprowadzono dla komórek obecnych we wszystkich sesjach, ze względu na trudność w interpretacji wyników zawierających “ogon” rozkładu. Wynik nie dał podstaw do odrzucenia H_0 : $\Delta\tau = -0,01$, $p = 0,723$



Ryc. 13: Sposoby oceny zmian w uszeregowaniu komórek pomiędzy sesjami. A. Wykres intensywności komórek zarejestrowanych u jednej z myszy w dwóch sesjach. Kolorem niebieskim oznaczona jest pierwsza z sesji, zgodnie z którą zostały posortowane komórki. Na czerwono zaznaczone są wartości intensywności fluorescencji tych samych neuronów w sesji II. Widoczna jest dyspersja, jednak przy ogólnym zachowaniu monotoniczności. B. Mapa cieplna obrazująca, do których kwantyli w sesji II (oś y) należą komórki z poszczególnych kwantyli sesji I (oś x).

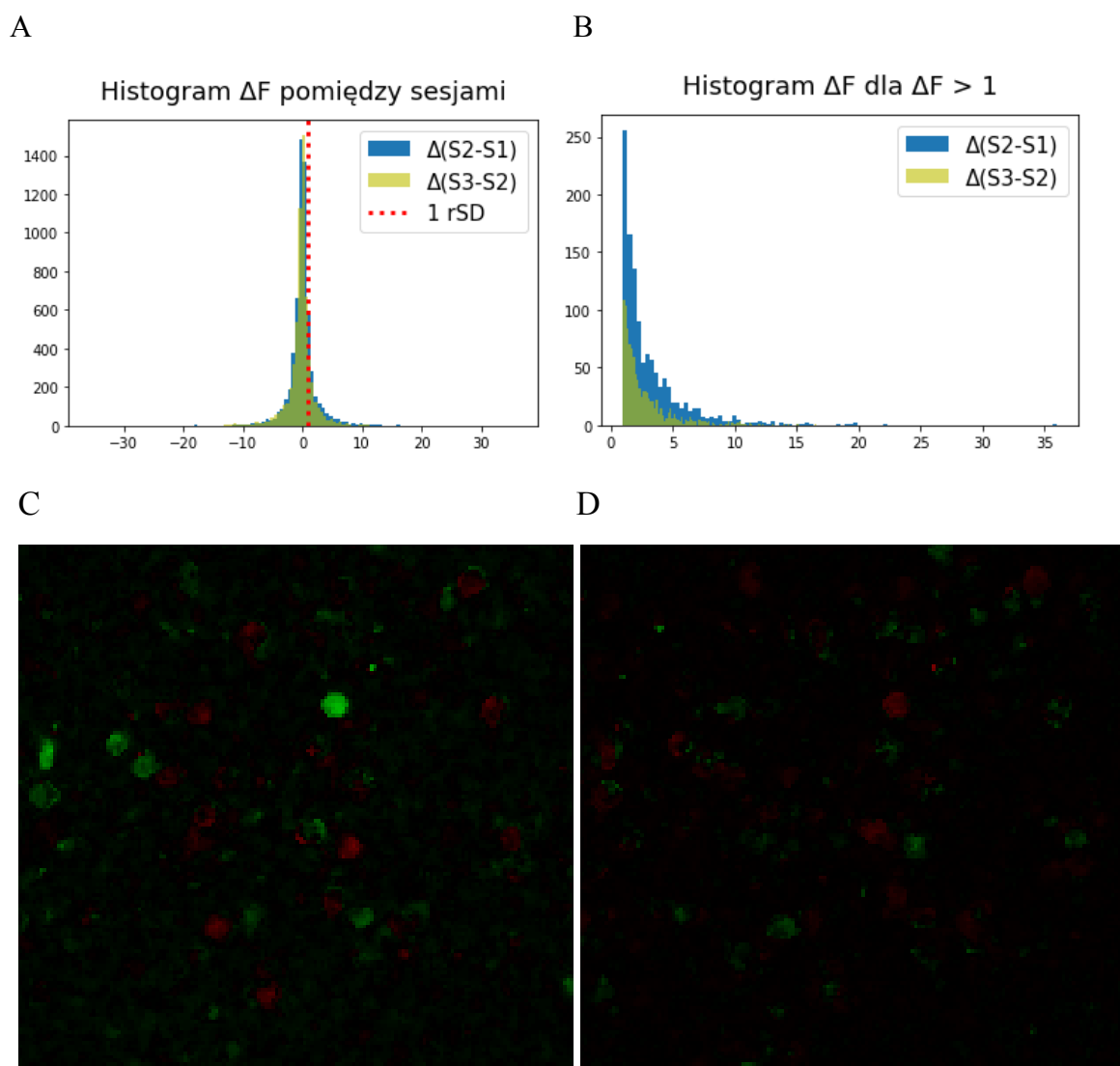
Innym – zdyskretyzowanym – sposobem analizy zmian w hierarchii jest ich ujęcie jako mapy cieplnej (Ryc. 13B). W ten sposób można ocenić, ile komórek w danym kwantylu

pozostaje w nim w następnej sesji, a ile znajdzie się w innych kwantylach. Podejście to priorytetyzuje duże zmiany w hierarchii. Użyto map cieplnych z jednakowym udziałem każdej myszy (wartości ułamków w macierzy uśrednione po myszach). Zakładając, że H_{12} to macierz, na której zbudowano mapę cieplną przejścia z sesji I do II, a $H_{12}(i, j)$ to procent komórek z i-tego kwantyla pierwszej sesji, który w drugiej sesji znalazł się w j-tym kwantylu, jako odległość między mapami przyjęto sumę odległości bezwzględnych pomiędzy komórkami macierzy, czyli $D(H_{12}, H_{23}) = \sum_{ij} |H_{12}(i, j) - H_{23}(i, j)|$. Ocenę istotności statystycznej przeprowadzono jak w przypadku porównania zmian w hierarchii – w 10000 permutacji zamieniono losowo etykiety pomiędzy sesją I a III wewnątrz myszy, obliczono odległość $H_{12} - H_{23}$, a następnie uśredniano ją po myszach. Obliczano prawostronną p dla uzyskanego rozkładu. W tym eksperymencie odległość między macierzami kolejnych par sesji wyniosła $D(H_{12}, H_{23}) = 0,91$. Test permutacyjny nie dał podstaw do odrzucenia hipotezy wymienności sesji I i III względem II macierzy – $p = 0,797$. Większość wartości w macierzy skupia się wokół jej przekątnej, wskazując na nieliczne przetasowania między kwantylami.

Porównanie intensywności fluorescencji na poziomie komórkowym

Standaryzując intensywność fluorescencji komórek między osobnikami, przyjmując dla każdej myszy wspólną medianę intensywności, obliczoną z uwzględnieniem wartości fluorescencji komórki w każdej sesji, można porównać wielkość zmiany fluorescencji między sesjami. Przykładowo, dla analizowanego eksperymentu, przy przejściu z sesji z kontekstem A do kontekstu B spodziewany jest **spadek** intensywności fluorescencji wśród komórek należących do neuronalnej reprezentacji kontekstu A. Z drugiej strony, dla komórek specyficznych dla kontekstu B spodziewane jest **zwiększenie** aktywacji. W przypadku porównywania dwóch obrazów zarejestrowanych po ekspozycji na kontekst B, spodziewana jest większa stabilność reprezentacji i mniejsza ilość zmian w każdym kierunku (Ryc. 14D). Dla każdego przejścia między sesjami można obliczyć, jaki procent komórek zmienił się w każdym z kierunków i określić, czy nastąpiła istotna zmiana w dynamice wzrostu lub osłabienia intensywności. W tym celu komórki podzielono na klasy – za wzmocnione uznano neurony, których intensywność wzrosła i jedno odchylenia od mediany rSD (ang. *robust standard deviation*), dla osłabionych zastosowano symetryczne kryterium. Ustalenie progu odcięcia eliminuje szum związany z niewielkimi fluktuacjami między sesjami – analiza

histogramów wskazuje, że obraz zmienności zdominowany jest przez bardzo małe przesunięcia (Ryc. 14A).



Ryc. 14: Wizualizacja różnic w dynamice zmian między sesjami. A. W analizie zmian fluorescencji o dowolnej magnitudzie dominują minimalne przesunięcia. B. Różnice uwydatnia ustalenie progu odcięcia. C. Zielonym kolorem oznaczono komórki, których intensywność fluorescencji **wzrosła** między sesją I a II, czerwonym – których intensywność **spadła**. D. Ta sama obróbka i kolory oznaczenia zastosowane dla tego samego obszaru w przejściu pomiędzy sesjami II a III. Obrazy otrzymano w trzech etapach: od drugiej sesji odjęto pierwszą – pozostały tylko komórki, których intensywność wzrosła w sesji II względem I. Następnie obliczono różnicę w przeciwnym kierunku, otrzymując obraz zawierający komórki osłabione w sesji II względem I. Rezultaty nałożono na siebie, z komórkami wzmocnionymi w kanale zielonym, osłabionymi w czerwonym. Widoczna jest większa dynamika zmian w parze sesji I i II niż między II a III.

Dynamika zmian w parze sesji wyrażona jest jako procentowy udział w populacji neuronalnej komórek zmiennych w każdym kierunku. Ze względu na tę konstrukcję danych, zastosowano model GEE z rodziny dwumianowej z łączem logit, grupując obserwacje na poziomie myszy. Zdecydowano się na takie podejście analityczne również ze względu na to, że wprowadzenie kowariat, na co pozwalają GEE, jest istotne dla kompensacji potencjalnych różnic jakości rejestracji między sesjami w ramach jednego osobnika. Różnice te mogą wpływać na wyniki, jako że została zastosowana normalizacja względem wspólnej mediany.

Na potrzeby porównania par sesji zbudowano dwa modele – (1) komórki osłabione w hierarchii vs. pozostałe (model DOWN), oraz (2) komórki wzmocnione vs. pozostałe (model UP). Zmienną zależną była obecność w danej klasie, czyli prawdopodobieństwo zaklasyfikowania komórki jako osłabionej/wzmocnionej. Użyto modelu ważonego, aby uzyskać oszacowanie marginalne ze zrównoważonym wpływem każdego osobnika. Ze względu na niewielkie różnice QIC między testowanymi dla modelu strukturami korelacji, wybrano strukturę z założeniem niezależności.

Modele dopasowano oddzielnie dla dwóch populacji neuronalnych, które w ujęciu rozdziału 3.1.2. były uznane za “stabilne”. Były to (1) komórki **stałe w ramach pary**, czyli komórki obecne w dwóch kolejnych sesjach, ale nie w trzeciej oraz (2) **stałe w całym eksperymencie** – obecne we wszystkich sesjach testowych. Pozwoliło to na uchwycenie zmienności nieuwzględnionej w podejściu bazowym. Rozdzielenie populacji neuronalnej na dwie grupy pozwoliło też uchwycić mechanizmy w grupie “plastycznej”, czyli neuronów stabilnych lokalnie, między kolejnymi dniami, ale nie występujących we wszystkich sesjach, oraz w grupie komórek stabilnych w całym teście. Jako główny próg odcięcia klasyfikacji komórek jako zmiennych przyjęto $SDr = 1$, dla weryfikacji stabilności wyników powtórzono dopasowanie modeli również przy progach odcięcia 0,5, 0,75 i 1,25 rSD. Spodziewano się spójnych wyników dla umiarkowanych wartości granicznych i ewentualnego rozszerzenia przedziałów ufności przy wprowadzeniu szumu przez zaakceptowane niewielkich zmian (próg 0,5) lub destabilizację modelu przy rygorystycznym progu ograniczającym zmienność do pojedynczych komórek w niektórych z klastrów (próg 1,25).

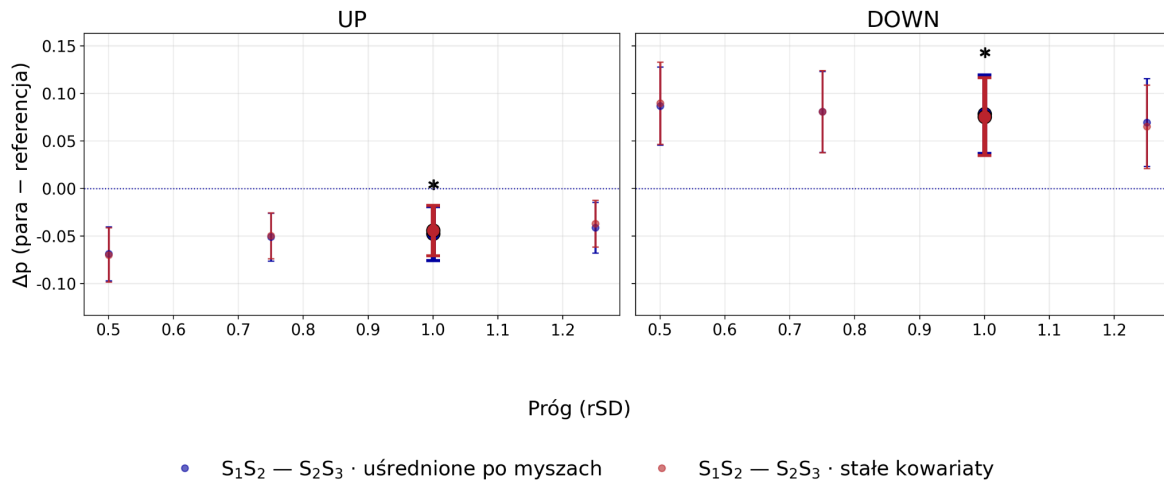
Przeanalizowano wpływ kowariat na dopasowanie modelu. Za optymalny ($rSD = 1$: $\Delta QIC > 20$ dla modeli wzmocnienia i osłabienia) uznano zestaw zawierający SNR obu sesji oraz tło rozłożone na komponent wewnątrzosobniczy i międzyosobniczy (dekompozycja Mundlaka (Mundlak 1978)).

W przypadku niewielkiej liczby klastrów (10 myszy) standardowy estymator odpornej macierzy kowariancji bywa obciążony w dół, co prowadzi do zaniżania błędów standardowych i zawyżania istotności testów. Co za tym idzie, konieczne było zastosowanie poprawki na małą liczbę klastrów (Mancl i DeRouen 2001). Ze względu na ograniczenia implementacji modelu ważonego, użyto kowariancji typu robust wraz z korektą t/F dla skończonej liczby klastrów ($df = G-1$, gdzie G to liczba myszy) zamiast estymatora bias-reduced. Zmiany dynamiki między parami sesji porównano skorygowanymi testami Walda na kontrastach EMM z użyciem macierzy kowariancji modelu.

Analiza dopasowania obu modeli dla populacji komórek aktywnych we wszystkich 3 sesjach (6078 komórek, min = 266, max = 890) nie wykazała różnic pomiędzy parami sesji. Odsetek komórek osłabionych przy przejściu z S1 do S2 był mniejszy o około 1 pp w porównaniu z przejściem S2 do S3, wynik jednak nie był istotny: 95% CI: (-0,09, 0,07), $p = 0,767$. W przypadku komórek ulegających wzmocnieniu, w przejściu z S1 do S2 było ich o 3 pp więcej niż w przejściu z S2 do S3, nie był to wynik istotny statystycznie: 95% CI: (-0,06, 0,10), $p = 0,505$. Odnosząc wielkość efektu do populacji komórek można zauważyć, że dotyczy on pojedynczych neuronów u każdego osobnika, nie ma więc także potencjalnego znaczenia biologicznego.

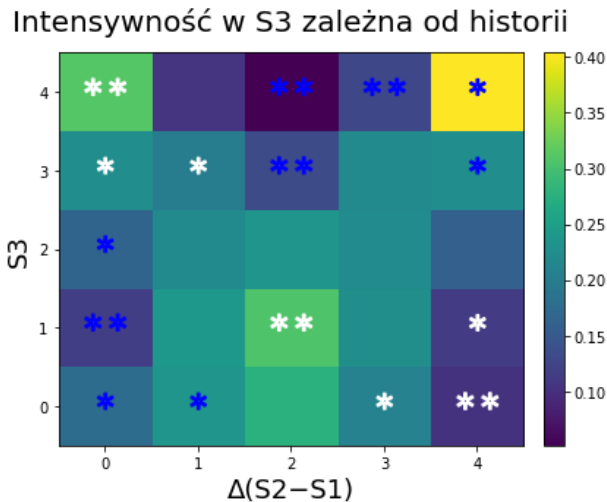
W przypadku komórek obecnych tylko w parze (3227 komórek łącznie, min = 94, max = 270 na parę i osobnika), sytuacja była nieco inna. Test Walda na średnich marginalnych wykazał istotny efekt w obu modelach: model UP – $\chi(9) = -3,77$, $\Delta EMM = -5$ pp, 95% CI (-0,08, -0,02), $p = 0,004$; model DOWN – $\chi(9) = 4,28$, $\Delta EMM = 8$ pp, 95% CI (0,04, 0,12), $p = 0,002$. Oznacza to większy odsetek komórek ulegających osłabieniu pomiędzy sesją S1 a S2 (różne konteksty) i większy odsetek komórek wzmocnionych między S2 a S3 (ten sam kontekst). Nadal są to niewielkie efekty (do kilkunastu komórek na parę i osobnika), jednak ich stabilność na przestrzeni progów odcięcia przemawia za ich wiarygodnością (Ryc. 15).

Wielkość efektu dla komórek aktywnych w parze - grupa kontekst



Ryc. 15: Zmiany intensywności komórek pomiędzy sesjami. Komórki selektywne wobec pary sesji przejawiają **silniejszą** tendencję do **wzrostu** pomiędzy sesjami z tą samą wskazówką. Tendencja do spadku jest odwrotna: neurony tej populacji **rzadziej** ulegają **osłabieniu**, gdy prezentowana jest drugi raz ta sama wskazówka. W tym przypadku wszystkie ΔEMM były istotne statystycznie, zaznaczenie dodano tylko przy z góry wybranym progu.

Porównanie par sesji w modelu dostarcza informacji o ogólnym poziomie zmienności między parami, pomijając aspekt wpływu zmian w przejściu między sesjami w obrębie pojedynczej komórki na jej aktywność w kolejnych sesjach. Można w tym celu posłużyć się wcześniej już wykorzystaną do oceny zmienności w hierarchii komórek metodą analizy przynależności do kwantyli. Aby ocenić, czy różnica w intensywności fluorescencji pomiędzy dwiema pierwszymi sesjami wykazuje nietrywialne relacje z intensywnością w trzeciej sesji, wykonano test permutacyjny. Jako hipotezę zerową przyjęto założenie, że kształt macierzy przejść między kwantylami różnicy $S1S2$ a intensywnością w $S3$ wynika wyłącznie z wartości macierzy przejść $S1S2$ i $S2S3$. Test wykazał, że zachowanie pojedynczej komórki na przestrzeni wszystkich sesji nie jest uwarunkowane wyłącznie stabilnością pomiędzy dniami – istnieją populacje, które są rekrutowane w sesjach wbrew tej tendencji. Nie są one jednak rozmieszczone w hierarchii w sposób, który pozwolił by je zidentyfikować wyłącznie na podstawie intensywności w jednym punkcie czasowym, co byłoby pożądane przykładowo w analizie histologicznej po zakończeniu eksperymentu.

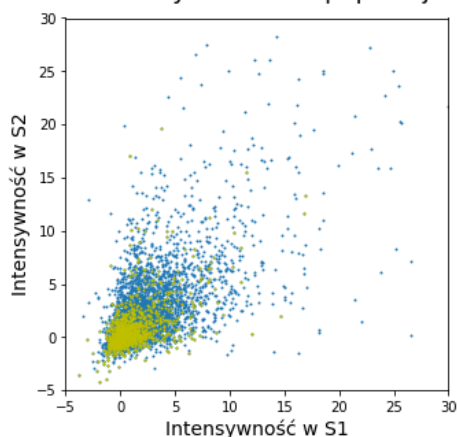


Ryc. 16: Zależność intensywności komórki w sesji S3 od dynamiki zmian w poprzedzających sesjach. A. Mapa cieplna przynależności komórek do kwantyli w S3 w zależności od wielkości i kierunku zmian między S1 s S2. B. Oznaczono komórki macierzy przejść, których wartość odbiegała istotnie od oczekiwanej wartości w macierzy. Na niebiesko oznaczono istotnie niższe wartości, na białą – istotny wzrost. Liczba gwiazdek odpowiada poziomowi istotności: * oznacza $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$. Przykładowo, spadek w prawym górnym rogu oznacza, że komórek, które po gwałtownym wzroście w sesji drugiej trafiły do najwyższego kwantyla w sesji trzeciej jest mniej niż wynikałoby to z tendencji do zachowania stabilnego poziomu fluorescencji. W lewym górnym rogu – nadspodziewanie wysoki odsetek najjaśniejszych komórek w sesji 3, które doświadczyły dużego osłabienia między sesją 1 a 2.

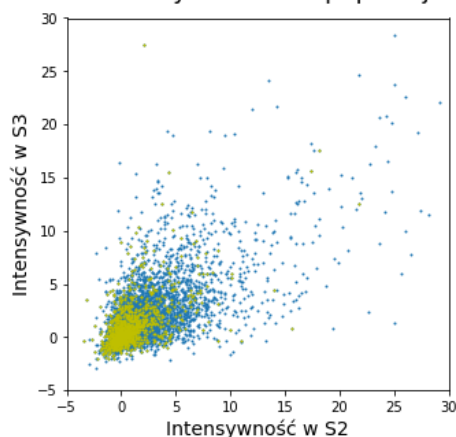
Przeprowadzono także wstępną wizualizację sprawdzającą czy komórki selektywne dla pary tworzą wyraźne klastry, na podstawie których możliwa byłaby ich identyfikacja. Nie istniała naturalna separacja wizualna między wyróżnionymi komórkami a pozostałą częścią populacji. Na wykresie obie grupy tworzą charakterystyczny kształt klina, dla którego można wyznaczyć dwusieczną i rozwartość kąta. Możliwe jest wtedy porównanie kątów pomiędzy populacjami i sesjami, także na poziomie myszy. Są to jednak informacje pokrewne z uzyskanymi mapami cieplnymi i modelem zmian fluorescencji. Nie włączono tej analizy do rozprawy ze względu na jej redundancję (Ryc. 17).

A

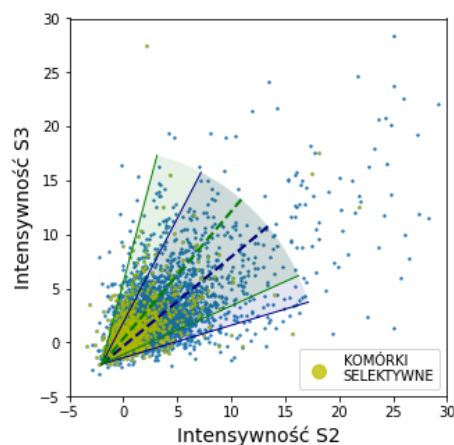
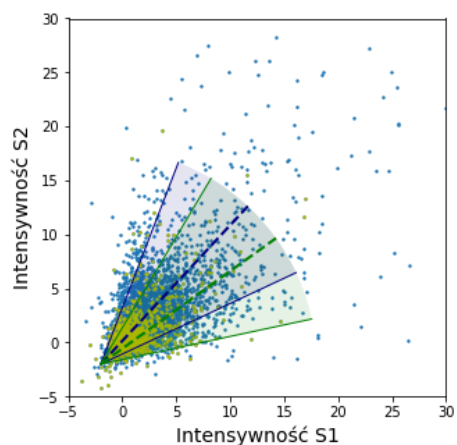
Komórki selektywne na tle populacji - S1S2



Komórki selektywne na tle populacji - S2S3



B



Ryc. 17: Wizualizacja intensywności fluorescencji komórek selektywnych na tle populacji.

A. Brak widocznej separacji między komórkami selektywnymi a pozostałą częścią populacji.

B. Aproksymacja dyspersji populacji przez wyznaczenie kąta i dwusiecznej klina obejmującego komórki na wykresie punktowym.

3.1.4. Zmiany aktywności RSC pomiędzy sesjami w teście odtwarzania pamięci

Po czterotygodniowej przerwie od treningu w labiryncie T, zwierzęta ponownie poddano testowi kontekstowemu. Jakość obrazu znacząco spadła, co u części zwierząt uniemożliwiło rejestrację na poziomie koniecznym do uzyskania wiarygodnych wyników. Obrazowaniu poddano 6 zwierząt, co zmniejszyło znacznie moc wnioskowania. Ponadto, porównanie z poprzednimi sesjami na poziomie pojedynczych komórek było utrudnione ze względu na spadek jakości jak i przemieszczenie obrazu względem uprzednich rejestracji.

Zidentyfikowane populacje komórkowe poddano analizie w trzech aspektach: stabilności w parze sesji z kontekstem B w porównaniu z parą sesji z ekspozycją na różne konteksty, zmian w hierarchii intensywności komórek pomiędzy sesjami, oraz zmienności fluorescencji.

Aby określić, czy odsetek komórek obecnych w dwóch sesjach jest większy w przypadku pary sesji, w których eksponowano mysz dwukrotnie na ten sam kontekst, dopasowano model GEE skonstruowany zgodnie z opisem w 3.1.2. Uzyskany wynik nie wykazał istotnej przewagi tej pary sesji ($p = 0,410$), efekt był na poziomie 1 pp na korzyść sesji z tym samym kontekstem.

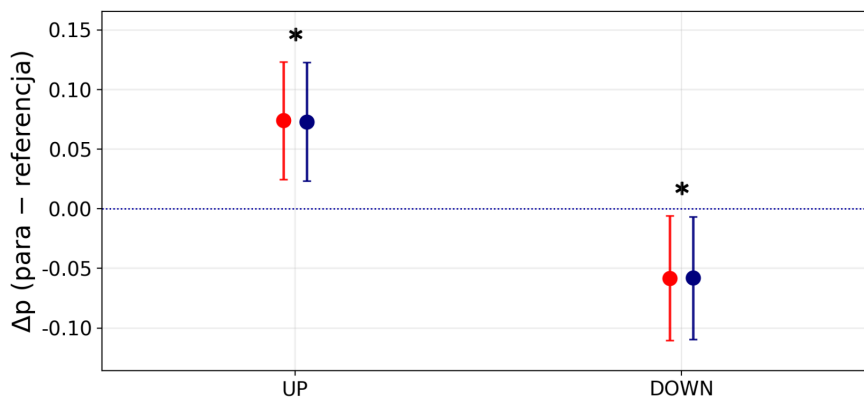
Następnie przeanalizowano zmiany w hierarchii intensywności komórek na przestrzeni testów odtwarzania pamięci. Testy były przeprowadzone zgodnie z tym samym schematem co bezpośrednio po treningu: kontekst A wyświetlany pierwszego dnia, kontekst B w kolejnych dwóch testach. Nie wykazano różnic w poziomie, w jakim zmieniała się hierarchia między kolejnymi parami sesji – $p = 0,969$, średnia $\Delta\tau = 0,003$, przy czym znak różnicy zmieniał się pomiędzy osobnikami.

W kolejnym kroku przeanalizowano dynamikę zmian fluorescencji przy porównywaniu par sesji, dopasowując model opisany w podpunkcie 3.1.3. W populacji komórek aktywnych we wszystkich sesjach testowych (średnio 671 komórek, min = 389, max = 890) zaobserwowano istotnie większy odsetek komórek o rosnącej fluorescencji między pierwszym a drugim testem: $\chi(5) = 3,87$, $\Delta\text{EMM} = 7$ pp, 95% CI: (0,02, 0,12), $p = 0,012$. Natomiast w drugiej parze sesji było więcej komórek, które obniżyły poziom intensywności: $\chi(5) = -2,86$, $\Delta\text{EMM} = -6$ pp, 95% CI: (-0,11, -0,01), $p = 0,035$. Jako że efektu dla tej populacji nie zaobserwowano w pierwszej serii testów, model dopasowano dla komórek zidentyfikowanych w początkowych testach, ale dla osobników, które były obrazowane na etapie odtwarzania pamięci. Miało to na celu potwierdzenie, że efekt jest kwestią konsolidacji pamięci lub innego procesu biologicznego – nie artefaktem zmniejszenia populacji. Dopasowanie modelu nie wykazało istotnego efektu – dla obu kierunków zmian $p > 0,3$.

W przypadku komórek specyficznych dla par sesji (obecnych w obu sesjach w parze, nieobecnych w trzeciej; średnio 194 komórki, min = 114, max = 288) efekt był jakościowo zbliżony do zaobserwowanego w pierwszej serii testów – dla obu kierunków zmian fluorescencji. Utracił jednak istotność (Ryc. 18).

A

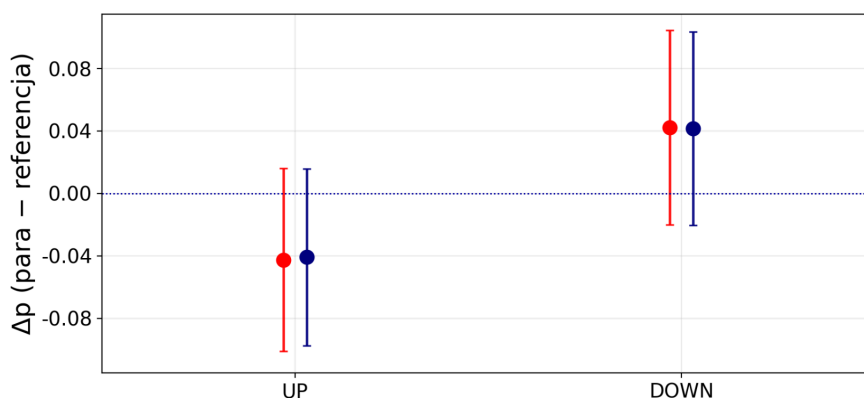
Wielkość efektu dla komórek aktywnych we wszystkich sesjach odtwarzania pamięci



● $R_1R_2 - R_2R_3$ · uśrednione po myszach ● $R_1R_2 - R_2R_3$ · stałe kowariaty

B

Wielkość efektu dla komórek aktywnych w parze w odtwarzaniu pamięci



● $R_1R_2 - R_2R_3$ · uśrednione po myszach ● $R_1R_2 - R_2R_3$ · stałe kowariaty

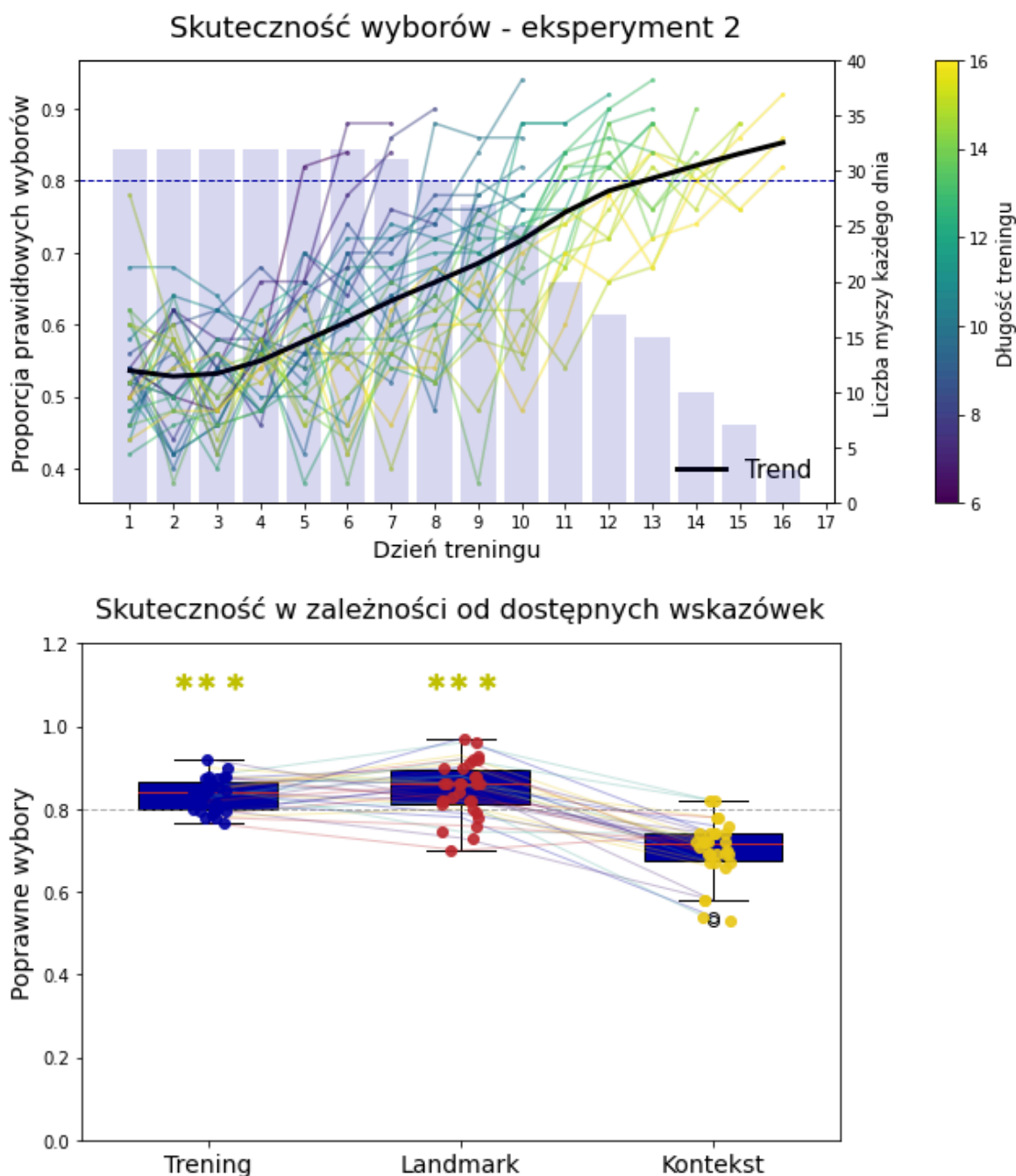
Ryc. 18: Różnice w dynamice fluorescencji pomiędzy sesjami odtwarzania pamięci.

A. W odtwarzaniu pamięci dominujące znaczenie miała populacja komórek stabilnych, w której na etapie akwizycji pamięci nie stwierdzono istotnych różnic między parami sesji. Zmiana wyświetlanego kontekstu pomiędzy sesjami wiązała się z większym odsetkiem komórek, których fluorescencja wzrosła. Większy odsetek komórek ulegających osłabieniu zaobserwowano pomiędzy sesjami z tym samym kontekstem. **B.** W poprzednio dominującej grupie “plastycznej” nie stwierdzono istotnych różnic między parami.

3.2. Reprezentacja neuronalna wskazówek o różnej złożoności w RSC

3.2.1. Wyniki behawioralne

W eksperymentach 2 i 3, przeprowadzonych z wykorzystaniem złożonego układu wskazówek myszy były w stanie nawigować w oparciu o obie wskazówki prezentowane osobno. W obu doświadczeniach test RM-ANOVA wskazał na istotne różnice między sesjami testowymi i średnim wynikiem z ostatnich 3 dni treningu – w eksperymencie 2: $F(2, 58) = 81,13$, $p < 0,001$, w eksperymencie 3 $F(2, 42) = 11,59$, $p < 0,001$. Porównano wyniki parami, stosując test rang Wilcoxona i korektę Holma. W eksperymencie 2 skuteczność nawigacji myszy przy użyciu wskazówki landmark nie różniła w istotny sposób od sytuacji, w której był dostępny pełny zestaw wskazówek ($p = 0,328$). Natomiast w nawigacji na podstawie wyświetlanego kontekstu myszy popełniały więcej błędów niż w końcowej fazie treningu ($p < 0,001$), jak i w teście z użyciem landmarku ($p < 0,001$) (Ryc. 19).



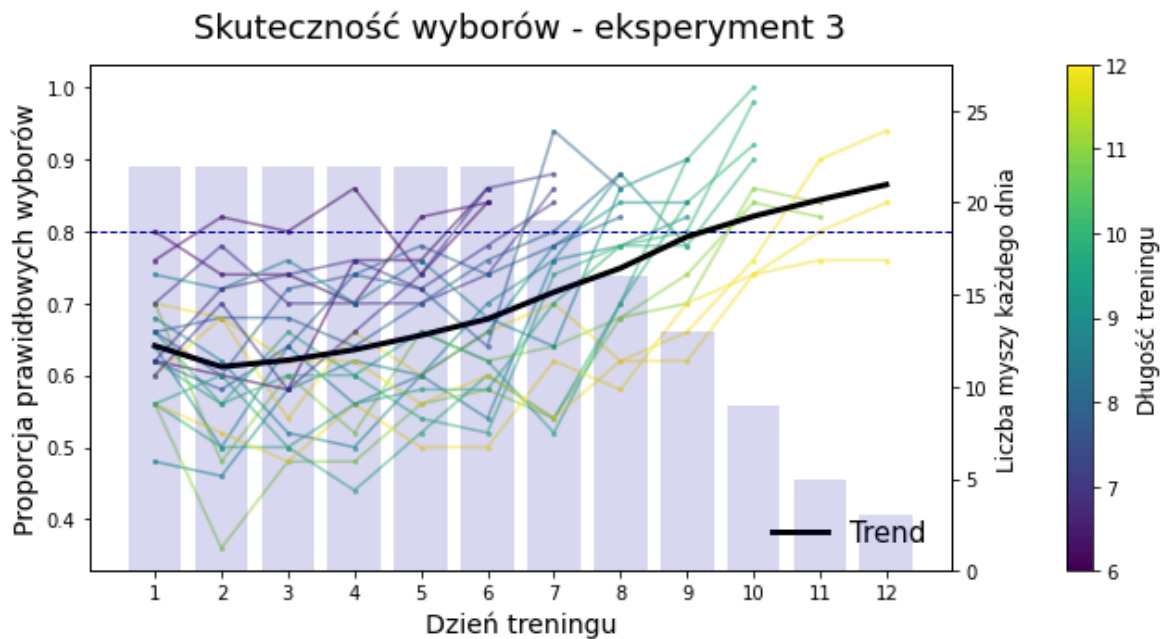
Ryc. 19: Wyniki treningu w eksperymencie 2. Krzywa uczenia i wyniki testów w porównaniu do średniej skuteczności w ostatnich dniach treningu. Zwierzęta były w stanie skutecznie nawigować na podstawie obu typów wskazówek, zauważono jednak wyraźny spadek odsetka prawidłowych wyborów w teście kontekstowym, zarówno względem treningu ($p < 0,001$) jak i wskazówki landmark ($p < 0,001$)

Zbliżone wyniki uzyskano w eksperymencie 3 – również zaobserwowano większą liczbę pomyłek przy nawigacji z użyciem kontekstu w porównaniu zarówno z treningiem ($p = 0,025$) jak i z testem landmark ($p = 0,002$). W tym przypadku zauważalny był też wzrost

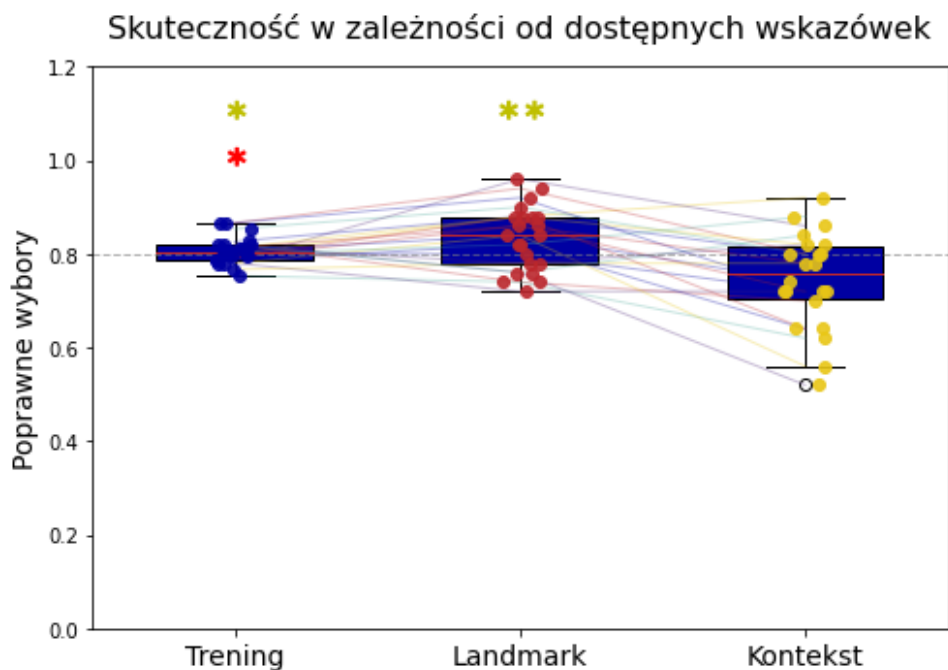
poprawnych wyborów w teście landmark w stosunku do sesji treningowych ($p = 0,05$). Zauważalne były również różnice w dynamice treningu – skuteczność zwierząt w pierwszym treningu z wolnym wyborem, po 4 dniach treningu wstępnego składającego się wyłącznie z fazy wymuszonej, była wyższa w kohorcie z eksperymentu 3. Różnicę potwierdzono testem Manna-Whitneya, ze względu na brak rozkładu normalnego dla myszy z eksperymentu 2. Przewaga myszy z eksperymentu 3 była silnie istotna: $U = 620,5$, $p < 0,001$, wielkość efektu (δ Cliffa) $\delta = 0,71$. Grupy różniła również długość treningu – aby odseparować efekt szybkości uczenia od przewagi po treningu wstępnym, zamiast liczby dni do osiągnięcia kryterium, porównano nachylenia krzywych uczenia poszczególnych myszy. Ponownie użyto testu Manna-Whitneya, który nie wskazał na istotnie szybszy proces uczenia w żadnej grupie: $U = 318$, $p = 0,445$, $\delta = -0,12$.

W eksperymencie 2, podobnie jak w 1, wykorzystano myszy obu płci. Wykluczono jedną samicę, wykazującą oznaki silnego stresu w trakcie treningu, pozostawiając 11 samic i 22 samców. Dla obu płci porównano szybkość uczenia, średni wynik ostatnich 3 dni treningu oraz wynik w obu testach pomiędzy myszami obu płci. Nie wykazano różnic. Dla szybkości uczenia: $t(21,24) = -0,65$, $p = 0,52$, średnia różnica $-0,59$ dnia (krótszy trening do osiągnięcia kryterium w grupie samic); dla wyniku treningu: $t(16,74) = -0,87$, $p = 0,40$, średnia różnica -3 pp; dla testu landmark: $t(17,47) = -1,22$, $p = 0,24$, średnia różnica -6 pp; dla testu kontekst: $t(28,27) = -0,63$, $p = 0,54$, średnia różnica 3 pp.

A



B



Ryc. 20: Wyniki treningu w eksperymencie 3. A. Krzywa uczenia. Widoczna wyraźnie większa skuteczność w pierwszym dniu po zakończeniu treningu wstępnego ($p < 0,001$ w porównaniu do kohorty z eksperymentu 2). B. Wyniki testów w porównaniu ze średnią z ostatnich 3 dni treningu. Widoczna istotnie niższa skuteczność w nawigacji na podstawie wskazówek kontekstowych ($p = 0,002$ względem testu L, $p = 0,025$ względem treningu). Skuteczność w teście L była istotnie wyższa od tej uzyskanej w trakcie treningu ($p = 0,05$).

Tak jak w eksperymencie 1, analiza w kolejnych podrozdziałach ograniczona była do zwierząt, dla których zarejestrowany obraz był odpowiedniej jakości. Dla grupy LCC było to 8 zwierząt, dla CLL oraz LLC – 9 zwierząt. Mimo różnych proporcji między płciami (dla grupy LCC – 4 samice, CLL i LLC – po 2), w analizie zachowano wszystkie zwierzęta. W modelach GEE uwzględniono czynnik interakcji pomiędzy efektem a płcią – z zastrzeżeniem, że wnioskowanie o różnicach międzypłciowych oraz porównania pomiędzy grupami z inną proporcją samiec i samic służą przede wszystkim jako informacja o istotnych czynnikach w planowaniu dalszych eksperymentów.

3.2.2. Liczba komórek c-Fos pozytywnych dla różnych sesji behawioralnych

Po obróbce danych przeprowadzonej zgodnie ze schematem użytym również w poprzednim eksperymencie, sprawdzono, czy możliwe jest uchwycenie różnic w przetwarzaniu przez RSC wskazówek o różnej złożoności na poziomie wewnątrzsobniczych różnic w liczbie komórek c-Fos(+). Głównym celem – zarówno w tym, jak i w kolejnych testach – było sprawdzenie, czy obserwowane reprezentacje są bardziej zbliżone między sesjami z ekspozycją na ten sam typ wskazówki niż między sesjami z różnymi wskazówkami. Ponadto, weryfikowano hipotezę, że ekspozycja na schematyczną wskazówkę typu landmark wiąże się z większą aktywacją w RSC.

Dla każdej myszy zliczono komórki w kolejnych sesjach. Aby móc przeprowadzić porównanie między osobnikami, obliczono ilorazy względem poprzedniej sesji – tym samym analizując różnice odpowiedzi na różne typy wskazówek, jak i na ten sam typ wskazówki prezentowany w dwóch sesjach. Porównanie przeprowadzono oddzielnie dla grup LCC i CLL. Analizę prowadzono na logarytmach ilorazów (*log-ratio*), co symetryzuje efekty i stabilizuje wariancję. Hipotezę H_0 : średnia krotność zmiany wśród myszy wynosi 1 (nie ma systematycznego wzrostu ani spadku względem referencji) przetestowano jednopróbkowym testem t-Studenta. W żadnym z obu porównań nie osiągnięto istotności statystycznej (Tabela 3). Analogiczną analizę przeprowadzono po wykluczeniu neuronów aktywnych we wszystkich trzech sesjach – wyniki były zgodne z analizą pełnej populacji.

Grupa	Porównanie	Wartość statystyki	df	p	Średnia geometryczna (95% CI)
LCC	$\frac{N_{C1}}{N_L}$	t = -0,88	7	0,407	0,97 (0,92; 1,04)
LCC	$\frac{N_{C2}}{N_{C1}}$	t = 0,11	7	0,647	1,00 (0,96; 1,05)
CLL	$\frac{N_C}{N_{L1}}$	t = -1,04	8	0,328	0,98 (0,95; 1,02)
CLL	$\frac{N_{L2}}{N_{L1}}$	t = -0,65	8	0,537	0,99 (0,97; 1,02)

Tabela 3. Analiza wielkości populacji komórek aktywnych w każdej z sesji. Nie wykazano istotnych różnic w rozmiarze reprezentacji neuronalnych

W rozszerzonej wersji eksperymentu (5 sesji) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami (RM-ANOVA) do oceny, czy liczebność komórek różniła się między sesjami testowymi. Dane znormalizowano względem sesji treningowej S0, a do RM-ANOVA włączano sesje testowe (L1, L2, C1, C2). Test Shapiro-Wilka dla różnic par wewnątrzsobniczych (po normalizacji względem S0) nie wskazał odchylenia od normalności, a test Mauchly'ego nie wykazał naruszenia założenia sferyczności. Przeprowadzona analiza RM-ANOVA nie ujawniła różnic między sesjami: $F(3, 21) = 0,32$, $p = 0,813$. Po potwierdzeniu normalności rozkładu logarytm ilorazów (test Shapiro-Wilka), zgodnie z założonym wcześniej kontrastem sprawdzono dodatkowo efekt wprowadzenia nowego bodźca w rozpoczynającej serię testów sesji L1 – tj. czy $\log(\frac{N_{L1}}{N_{S0}})$ odbiega od zera (jednopróbkowy test t-Studenta). Również w tym przypadku nie wykazano istotnych różnic: $t = 0,24$, $df = 8$, $p = 0,809$, średnia geometryczna 1,00 (95% CI 0,96; 1,06). Dla populacji komórek z wykluczeniem aktywnych w każdej sesji wynik był zbliżony.

3.2.3. Zmiany aktywności komórek pomiędzy sesjami behawioralnymi

W kolejnych krokach przeprowadzono analizę zgodnie ze schematem wykorzystanym w rozdziale 3.1.2, ze względu na tę samą strukturę danych, schemat testów i nadrzędny cel: porównanie dynamiki w przejściu między sesjami różnymi od siebie z przejściem między

testami o wspólnych cechach. Dodatkowo, w tym eksperymencie zakładano asymetrię między rodzajami testów, dlatego grupy różniące się kolejnością ekspozycji analizowano oddzielnie.

Dla grup LCC i CLL przeprowadzono porównania stabilności i kierunku zmiany pomiędzy parami sesji obejmującymi ekspozycję na ten sam typ wskazówki oraz na wskazówki różnego typu: w LCC: LC vs CC (L→C minus C→C), w CLL: CL vs LL (C→L minus L→L). Wartości dodatnie oznaczają większą wartość zmiennej zależnej dla przejścia między sesjami z różnymi wskazówkami. Po potwierdzeniu normalności różnic w każdej parze sesji zastosowano sparowany test t. Do określenia wielkości efektu użyto wskaźnika d_z Cohena (wersja dla prób zależnych). Nie uzyskano istotności w żadnym z porównań, a wartość $d_z < 0,3$ dla wszystkich poza jednym z testów wskazywała na faktyczny brak efektu. W jednym porównaniu – (stabilne komórki w LC vs CC) dla populacji neuronów z wyłączeniem zawsze aktywnych – wielkość efektu mogła wskazywać na istnienie różnicy, nie można jej było jednak potwierdzić dla $n = 8$: $t = -1,65$, $p = 0,143$, $d_z = -0,58$, różnica proporcji $-0,03$ (95% CI: $-0,08$; $0,01$).

Jak uprzednio, równolegle dopasowano model GEE z rodziny dwumianowej, z łączem logit i strukturą kowariancji z założeniem niezależności. Uwzględniono SNR jako kowariatę jakości obrazowania i zastosowano poprawkę dla małej liczby klastrów. Wyznaczono estymowane średnie marginalne. Porównano wyniki ze znormalizowanym SNR ustalonym na 0 i uśrednione po myszach.

Wynik dopasowania modelu i tym razem był w znacznej mierze spójny z wynikami otrzymanymi w sparowanym teście t. Pewne zmiany można było zauważyć jedynie dla GEE estymującego proporcję komórek stabilnych. Dodanie informacji na poziomie komórki zwężyło przedziały ufności, jednak na poziomie nie zmieniającym wniosków – poniżej 1 pp. W przypadku kontrastu, dla którego wielkość efektu była najbardziej znacząca – LC vs CC – dla populacji neuronów z wyłączeniem zawsze obecnego “tła” wynik pozostał nieistotny $t = -1,75$, $p = 0,123$, różnica proporcji $-0,03$ (95% CI: $-0,08$; $0,01$).

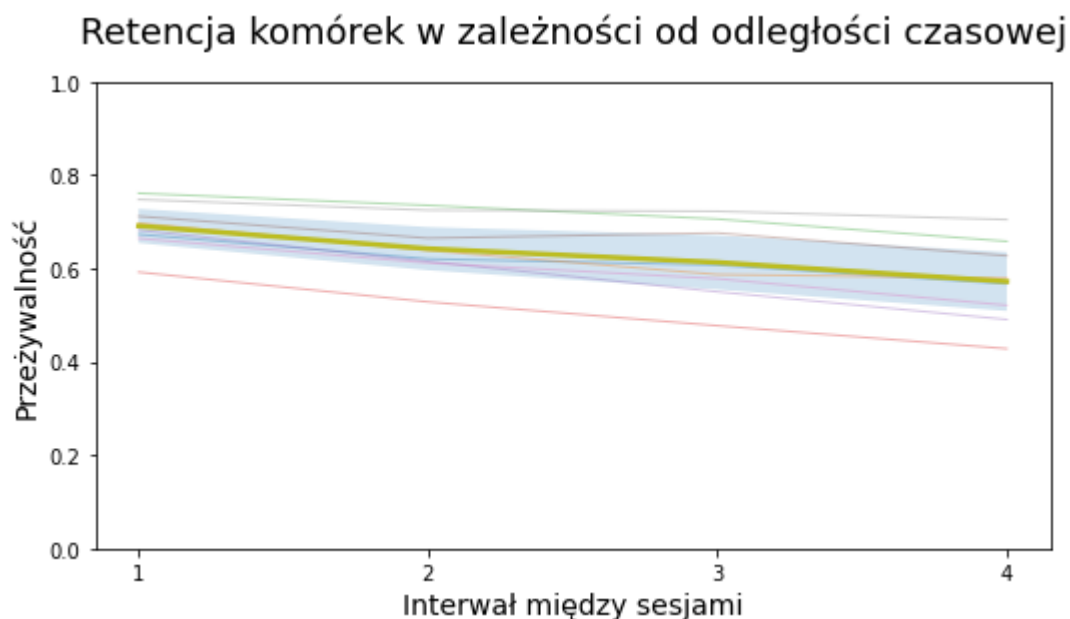
Analogiczny model dopasowano dla eksperymentu z 5 dniami obrazowania. Obrazowania te odbywały się kolejno po: 1 – sesji treningowej (baseline), 2, 3 – ekspozycja na landmark, 4, 5 – ekspozycja na kontekst. Aby zweryfikować spójność z poprzednimi testami, jako parę referencyjną wybrano CC – dzięki czemu (1) wykonano porównanie CC vs LC dla sesji w tej samej kolejności (L2C1C2), (2) odseparowano efekt wprowadzenia

nowości w pierwszym dniu testowym. Test omnibusowy Walda nie wykazał istotnego efektu pary sesji: $F(2, 7) = 1,03$, $p = 0,242$. Planowane kontrasty dawały różnice rzędu 1 – 2 pp. Kontrast CC vs LC nie był istotny statystycznie ($p = 0,319$, po korekcie Holma 0,426). Kontrast CC vs LL był graniczny ($p = 0,08$), po korekcie jednak był zdecydowanie nieistotny ($p_{\text{Holm}} = 0,244$).

3.2.4. Czynniki determinujące aktywność komórki

Przedstawione dotychczas wyniki nie były wewnętrznie spójne w świetle stawianych hipotez, a wielkość efektu (różnicy) w proporcji komórek stabilnych w przejściu między sesjami wskazywała na to, że potwierdzenie jego istnienia nie jest możliwe dla obecnej próby. Dodatkowo na zbiorze złożonym ze wszystkich myszy z połączonych grup LLC i CLL dopasowano dwumianowy GLM z łączem logit, klastrowany po myszach, z dniem kodowanym kategorycznie i tożsamością sesji jako czynnikami; zmienną objaśnianą była proporcja komórek aktywnych w danej sesji względem populacji referencyjnej. Nie wykazano efektu tożsamości sesji ($p = 0,996$, średni marginalny efekt : $-0,00$ pp z 95% CI $-1,71$; $+1,70$). Efekty dnia były małe i nieistotne, więc uwzględnienie dnia/„nowości” nie ujawniło ukrytego efektu. W konsekwencji ewentualna różnica L vs C w detekcji wynosi co najwyżej ± 2 pp i nie ma praktycznego znaczenia.

Przeanalizowano również jak zmienia się retencja komórek na przestrzeni dni. Ze względu na największą liczbę dostępnych sesji, wybrano grupę rozszerzoną jako punkt startowy. Dla wszystkich par sesji obliczono, jaki ułamek komórek zarejestrowanych w pierwszej z dwóch sesji występuje również w drugiej, i czy jest to zależne od odległości między sesjami. Zaobserwowano trend spadku retencji wraz ze wzrostem odległości czasowej między sesjami (Ryc. 21).



Ryc. 21: Retencja komórek w zależności od odległości czasowej. Kolorem zielonym zaznaczono linię trendu odsetka komórek, które pozostały aktywne po upływie zaznaczonej na osi x liczby dni testowych.

Następnie użyto testu rang Friedmana, aby ocenić, czy dla przeżywalności przy tym samym interwale ma znaczenie sesja startowa. Jako że test ten wymaga przynajmniej trzech grup zależnych, użyto go dla odległości jednej lub dwóch sesji. Nie wykazano istotnego wpływu punktu startowego – dla sesji następujących po sobie: $Q(3, 8) = 3,15$, $p = 0,369$, wielkość efektu $W = 0,13$ (mały), dla odległości dwóch sesji: $Q(3, 8) = 1,75$, $p = 0,417$, wielkość efektu $W = 0,11$ (mały).

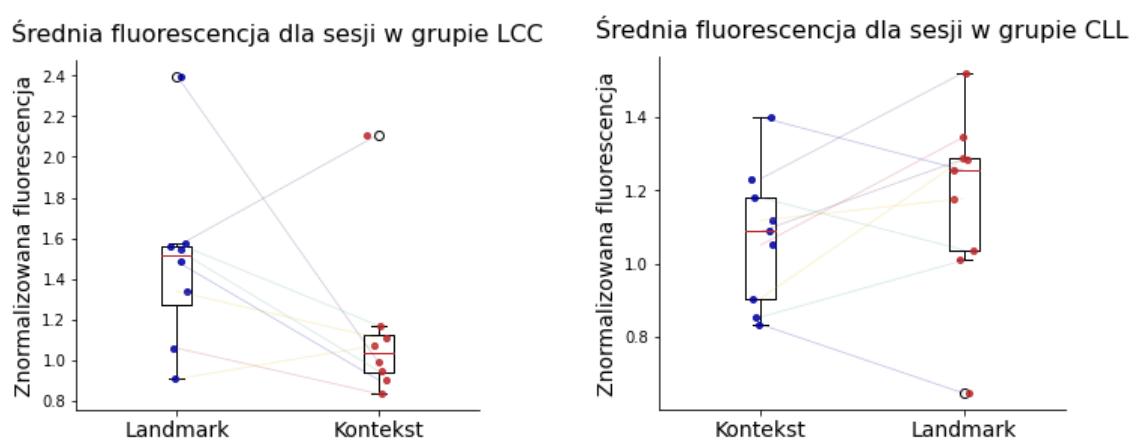
Wiele wskazuje na to, że tak silny efekt odległości czasowej może maskować potencjalne – niewielkie – efekty tożsamości sesji, mimo utrzymywania między sesjami odległości, po której wzrost poziomu białka FosGFP związany z bodźcem nie powinien być wykrywalny (Barth i in. 2004).

3.2.5. Zmienność intensywności fluorescencji na przestrzeni sesji

Mając na uwadze założenie o asymetrii między sesjami landmark i kontekst, porównano średnie wartości fluorescencji w różnych sesjach. Jest to dobry punkt wyjścia do bardziej pogłębionych testów, jako samodzielna analiza porównanie to jest obciążone z natury danych. Kompensacja zaniku fluorescencji wraz z głębokością nie zrównuje wartości na różnych poziomach, a jedynie łagodzi efekt. Przez zastosowanie lokalnego

wygładzania i wyznaczenia mediany użytej w normalizacji sprowadzono dane do postaci, gdzie bezpiecznie można porównywać komórki położone na zbliżonej głębokości, globalne wnioski należy jednak dodatkowo weryfikować.

Wynik porównania intensywności testem rang Wilcozona nie wykazał istotnych statystycznie różnic: dla porównania sesji, gdzie chronologicznie pierwszą była L – $W(8) = 6$, $t = 0,109$, dla odwrotnej kolejności: $W(9) = 10$, $p = 0,164$. Wizualizacja wyników ujawniła potencjalny trend, zgodny z założeniami eksperymentu.



Ryc. 22: Średnia intensywność fluorescencji po ekspozycji na wskazówki wizualne. Obliczona dla każdego osobnika średnia wszystkich komórek zarejestrowanych w danej sesji porównywana jest z wartością wyznaczoną dla drugiej sesji. Zaobserwowano zgodny z założeniami trend, charakteryzujący się jednak znaczną dyspersją i nieistotny statystycznie.

W kolejnych krokach podążano za schematem analizy eksperymentu 1. Oceniono zmienność w hierarchii na przestrzeni sesji, mierzoną przy użyciu τ Kendalla. W pierwszej kolejności testem permutacyjnym porównano zmiany hierarchii pomiędzy sesjami dla grup CLL, LCC i LLC. W przypadku CLL, wynik był graniczny – $\Delta\tau = \tau(L, L) - \tau(C, L)$ wyniosła 0,03 przy $p = 0,054$ – co oznacza ok. 1,5 pp **mniej** zamian w parach w przypadku przejścia między dwiema sesjami typu landmark. Zbliżony wynik otrzymano dla grupy LCC: $\Delta\tau = \tau(C, C) - \tau(L, C) = 0,04$, $p = 0,059$, czyli 2 pp mniej zamian w parach przy przejściu między sesjami tego samego typu. Dla grupy LLC efektu nie zaobserwowano – wynik zmienił znak $\Delta\tau = \tau(L, C) - \tau(L, L) = -0,008$, ale nie osiągnął istotności: $p = 0,652$. Eksploracyjnie porównano również poziom zachowania hierarchii pomiędzy sesją bazową a pierwszym testem z zachowaniem hierarchii pomiędzy sesjami testowymi LL. Test przeprowadzono na komórkach obecnych we wszystkich 5 sesjach zarejestrowanych dla tej

grupy – stąd wynik nie jest porównywalny z poprzednimi w tym rozdziale. Uzyskano nieistotny **wzrost** nieuporządkowania pomiędzy LL względem S_0L : $\Delta\tau = \tau(L, L) - \tau(S_0, L) = -0,02, p = 0,364$.

Przeanalizowano również przemieszczenia pomiędzy kwantylami dla każdej z grup. W żadnym przypadku test permutacyjny nie dał podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej zakładającej wymiennosc sesji I i III względem II: dla $L \rightarrow C$ vs $C \rightarrow C$: $p = 0,175$; $C \rightarrow L$ vs $L \rightarrow L$: $p = 0,311$, dla $L \rightarrow L$ vs $L \rightarrow C$: $p = 0,987$. W grupie rozszerzonej do porównania włączono także sesję referencyjną. Miało to na celu wstępne zbadanie efektu nowości przy wprowadzeniu pierwszej sesji testowej. Porównanie $S_0 \rightarrow L$ z parą $L \rightarrow L$ takiego efektu nie wykazało ($p = 0,120$).

Podążając dalej za schematem analizy danych opracowanym przy eksperymencie 1, użyto GEE z kowariatami do oceny różnic w dynamice fluorescencji komórek pomiędzy sesjami z różnymi wskazówkami i sesjami ze wskazówką tego samego typu. Dla każdej grupy eksperymentalnej model dopasowano oddzielnie – aby nie zaburzyć równowagi pomiędzy liczbą par sesji każdego typu i nie mieszać par o przeciwnej chronologii. W przypadku eksperymentu rozszerzonego, GEE dopasowano dla par z 3 pierwszych sesji testowych – czyli bez uwzględnienia pary łączącej sesję bazowej z pierwszą ekspozycją na landmark, oraz ostatniej pary dwóch sesji kontekstowych.

Jak poprzednio, dla każdego przejścia wyznaczono EMM. Dla zapewnienia wiarygodności obliczeń porównano wyniki z uśrednianiem po myszach z faktycznymi wartościami kowariat dla każdej z nich, jak i przy ustaleniu kowariat na wartość średnią. Na wykresach dla grup z trzema sesjami przedstawiono obie wartości, w tekście raportowano wersję z uśrednieniem po myszach, jako że wyniki były w znacznej mierze spójne. Różnice między przejściami porównano skorygowanymi testami Walda na kontrastach EMM z użyciem macierzy kowariancji modelu. Różnice propocji komórek obliczano odejmując wynik dla pary sesji późniejszych od pary wcześniejszej – przykładowo, wartość dodatnia efektu oznacza, że dynamika zmniejszyła się z czasem.

Dla grupy eksperymentalnej, w której obrazowanie było rozszerzone o referencyjną sesję treningową i dodatkowy dzień testowy, możliwe było także wewnątrzsobnicze porównanie zachowania populacji neuronalnej przy przejściu między sesjami ze wskazówką tego samego typu zarówno dla kontekstu, jak i punktu orientacyjnego. Można było także

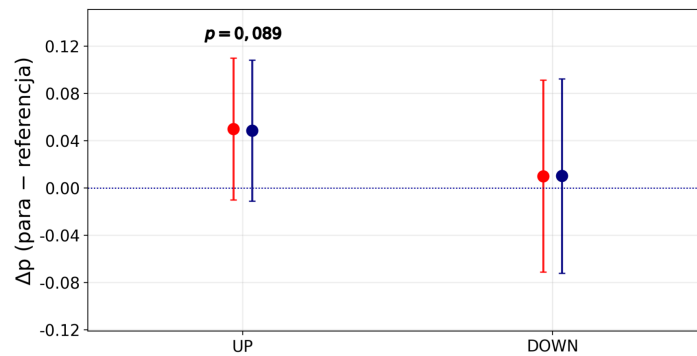
porównać przejścia między testami z przejściem od treningu do testu. Potraktowano to jako osobną analizę o charakterze eksploracyjnym. Główna analiza dotyczyła pierwszych 3 sesji testowych (dalej zwanymi grupą LLC) – części schematu eksperymentalnego, którego porównanie z grupami LCC i CLL jest zasadne ze względu na ten sam rodzaj wszystkich sesji (test) i te same dni protokołu eksperymentalnego. Taki układ pozwala na uwzględnienie wpływu kolejności testów na potencjalne efekty.

Analiza wyników dopasowania modeli dla komórek aktywnych we wszystkich sesjach nie wykazała istotnych różnic w dynamice zmian przy porównaniu zmienności między sesjami z tym samym typem wskazówki ze zmiennością w sesjach z ekspozycją na różne wskazówki (Ryc. 23). Dla grupy CLL trendy były zauważalne – pomiędzy sesją kontekstową a sesją z landmarkiem wzmocnieniu uległo o 5 pp **więcej** neuronów, a osłabieniu o 4 pp **mniej** niż w przejściu między dwiema sesjami typu landmark. Oba efekty były nieistotne (odpowiednio $p = 0,151$ i $p = 0,150$), z szerokimi przedziałami ufności zawierającymi 0, ale stabilne względem progu odcięcia. Przy średniej liczbie komórek na parę i mysz wynoszącej 628 (min = 269, max = 954) jest to zmiana o kilkadziesiąt komórek, mniej więcej o $\frac{1}{4}$ spośród komórek z danej kategorii zmienności.

Dla LCC (śr. liczba komórek 609, min = 237, max = 925) różnice w odsetku komórek słabnących były zaniedbywalne (efekt ok. 1 pp, $p = 0,774$), natomiast pomiędzy różnymi sesjami wzmocnieniu uległo o 5 pp komórek więcej niż pomiędzy sesjami kontekstowymi, wynik był graniczny ($p = 0,089$).

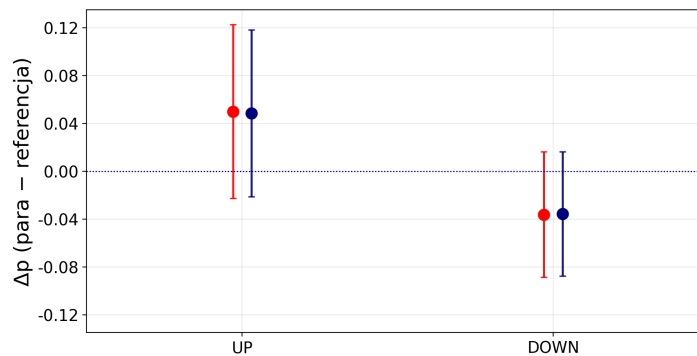
W grupie z odwróconą kolejnością LLC zmiany w obu kierunkach były nieistotne (UP: $\Delta\text{EMM} = -4$ pp, $p = 0,145$, DOWN: $\Delta\text{EMM} = 5$ pp, $p = 0,151$). Jednak zauważalne było, że w LLC i CLL trendy są analogiczne, z dokładnością do kolejności chronologicznej w parze zawierającej C i L: $\text{LL-CL} \approx \text{LL-LC}$.

Wielkość efektu dla komórek aktywnych zawsze - grupa LCC



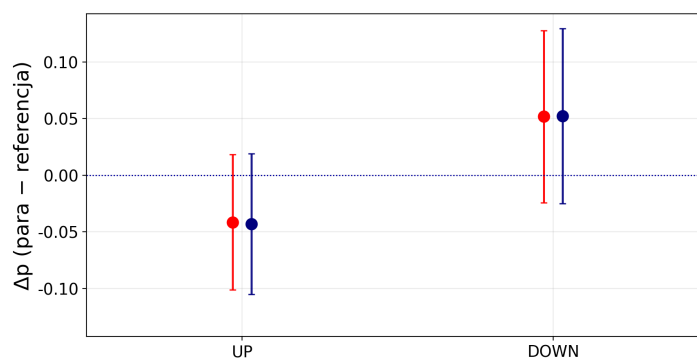
● LC — CC · uśrednione po myszach ● LC — CC · stałe kowariaty

Wielkość efektu dla komórek aktywnych zawsze - grupa CLL



● CL — LL · uśrednione po myszach ● CL — LL · stałe kowariaty

Wielkość efektu dla komórek aktywnych zawsze - grupa LLC



● LL — LC · uśrednione po myszach ● LL — LC · stałe kowariaty

Ryc. 23: Dynamika zmian w populacji komórek stabilnych. W grupie LCC obie pary sesji miały ten sam odsetek komórek słabnących. Między sesją L a C wzmocnieniu uległo więcej komórek niż między C a C. W grupach CLL i LLC można było zaobserwować symetryczne trendy. W obu przypadkach w parze LL było więcej komórek osłabionych i mniej wzmocnionych.

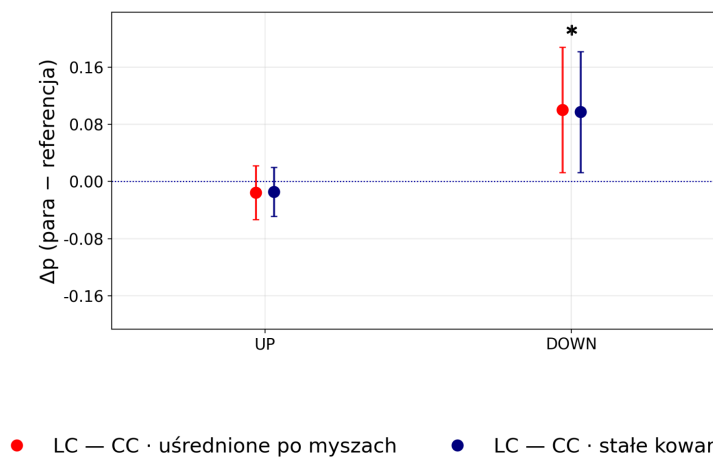
Następnie przeprowadzono analizę dynamiki wśród komórek aktywnych w dwóch kolejnych sesjach z pary, które jednak nie były aktywne zawsze. W tym przypadku w grupach LCC i CLL zaobserwowano stabilny na przestrzeni progów odcięcia efekt wśród komórek ulegających **osłabieniu**, który był istotny (LCC) lub graniczny (CLL) (Tabela 4). W grupie LLC nie zaobserwowano żadnych istotnych efektów.

Grupa	Porównanie	Kierunek	Δ EMM (95% CI)	p	n	średnia liczba obserwacji
LCC	LC - CC	DOWN	10 pp (0,01; 0,19)	0,031	8	168 (min = 69, max = 272)
CLL	CL - LL		3 pp (-0,01; 0,08)	0,099	9	142 (min = 72, max = 203)
LLC	LL - LC		1 pp (-0,06; 0,08)	0,773	9	140 (min = 40, max = 217)

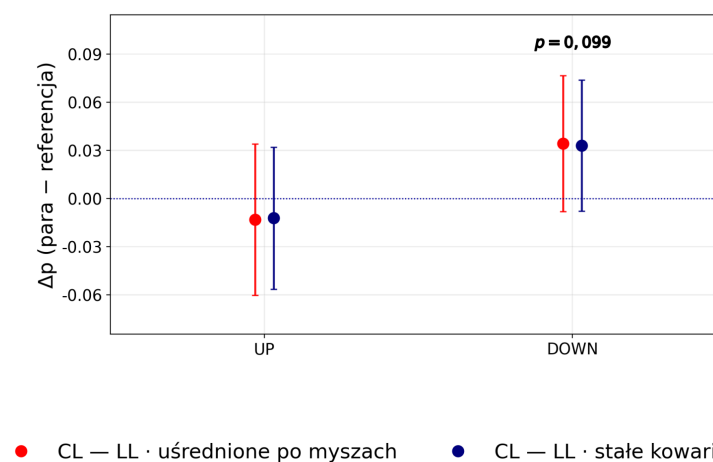
Tabela 4. Wyniki dopasowania modelu DOWN na populacji komórek selektywnych wobec pary sesji

Zweryfikowano metodą LOSO (ang. *leave one subject out*), że całkowity zanik efektu dla grupy LLC nie jest kwestią osobników o skrajnie małej liczbie komórek, jednak uzyskany wynik nadal nie wskazuje na biologicznie istotny efekt, który można powiązać z tożsamością sesji lub ich kolejnością. Badana populacja komórek specyficznych w parach jest bardzo mała, a efekty odniesione do liczby neuronów przy wybranym progu odcięcia dotyczą nie więcej niż kilkunastu komórek. Jakiegokolwiek wnioskowanie zyskałoby na włączeniu metod o wyższej rozdzielczości czasowej lub monitorowaniu komórek pomiędzy stymulacją a spodziewanym maksimum akumulacji białka FosGFP.

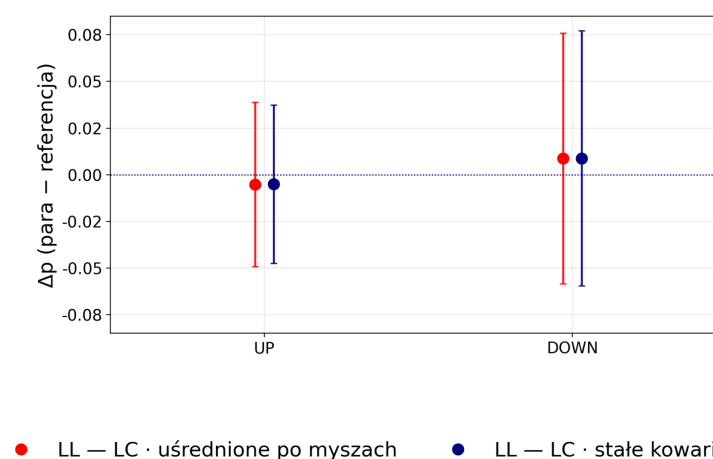
Wielkość efektu dla komórek aktywnych w parze - grupa LCC



Wielkość efektu dla komórek aktywnych w parze - grupa CLL



Wielkość efektu dla komórek aktywnych w parze - grupa LLC



Ryc. 24: Dynamika zmian w populacji komórek selektywnych dla pary. W grupie LCC i CLL zaobserwowano odpowiednio istotną ($p = 0,031$) i graniczną ($p = 0,099$) różnicę w odsetku komórek o obniżonej fluorescencji w drugiej sesji z pary. Dla obu grup więcej komórek ulega osłabieniu w drugiej sesji z tym samym typem wskazówki z rzędu.

W ostatnim etapie przeprowadzono eksploracyjną analizę dynamiki zmian w sesjach testowych z przejściem między sesją bazową (obrazowanie po treningu) a pierwszym testem. Porównano również przejście między dwiema sesjami kontekstowymi oraz dwiema sesjami typu landmark. Z analizy wyłączono jedno ze zwierząt, dla którego z przyczyn technicznych nie zarejestrowano obrazu po ostatniej sesji doświadczalnej. Przy dużej liczbie klastrów GEE wykazuje tolerancję wobec niepełnych danych, jednak w tym przypadku analiza porównawcza z wykluczeniem każdej myszy pojedynczo (LOSO) wykazała nieproporcjonalny wpływ obecności tego osobnika na współczynniki dla pary dwóch ostatnich sesji. Przeprowadzono dopasowanie modelu dla populacji komórek aktywnych we wszystkich sesjach, łącznie z bazową, oraz aktywnych w parze, ale nie zawsze. Ze względu na branie pod uwagę sesji treningowej, uzyskane wyniki nie są bezpośrednio porównywalne z opisanymi powyżej. W szczególności poprzednio wykluczenie z analizy parami komórek aktywnych zawsze wykluczało ich obecność w pozostałej, trzeciej sesji - były to niejako komórki selektywne wobec pary. W tym przypadku jest to nieco inna populacja, jednak komórkom selektywnym wobec wskazówki poświęcono osobną analizę w kolejnym podrozdziale.

Na wyniki naniesiono korektę Holma, uwzględniając poprawkę dla wszystkich 4 porównań. Test omnibusowy Walda nie wykazał istotnego efektu pary w żadnym z branych pod uwagę przypadków: komórki aktywne zawsze, model UP: $p = 0,316$, model DOWN: $p = 0,139$; komórki aktywne w parze, model UP: $p = 0,661$, model DOWN: $p = 0,167$.

Analiza planowanych kontrastów również nie wykazała istotnych różnic. Próg istotności nie został przekroczony dla żadnego z nich nawet przed naniesieniem korekty Holma. Może to wynikać z faktu, że populacje komórek, na których dopasowano modele nie odzwierciedlają tych samych cech, co ich odpowiedniki dla testów biorących pod uwagę tylko 3 sesje testowe.

Dla grup CLL, LCC i LLC przeanalizowano również macierze tranzykcji pomiędzy kwantylami, porównując różnicę fluorescencji w dwóch pierwszych sesjach z intensywnością w trzeciej sesji. Podobnie jak miało to miejsce w podrozdziale 3.1.3. (Ryc. 16), uzyskane macierze istotnie odbiegały od wzorca przewidzianego na podstawie macierzy tranzykcji między kwantylami intensywności (Ryc. 13B). Porównano parami, czy

różnią się one pomiędzy grupami z analizowanego eksperymentu, stosując test permutacyjny z losową zamianą przynależności myszy do grupy. W żadnym przypadku nie wykryto istotnej różnicy – najmniejsza wartość $p = 0,230$ (dla porównania CLL i LLC przy podziale na 10 kwantyli).

3.2.6. Zależność zmian w reprezentacji neuronalnej od płci

Modele GEE opisane w podrozdziałach 3.2.3. oraz 3.2.5. dopasowano dodając czynnik interakcji płci z efektem. W przypadku gdy dopasowanie okazywało się lepsze (oceniając na podstawie ΔQIC) niż bez jego uwzględnienia, porównywano wcześniej zaraportowany wynik z EMM dla poziomu czynnika płeć = samiec.

W przypadku modeli z podrozdziału 3.2.3., gdzie brana była pod uwagę tylko obecność komórki w danej sesji, nie zauważono zwiększonej skuteczności dopasowania GEE ($\Delta QIC < 1$ dla każdego). Inaczej wyglądała sytuacja dla modeli zmiany intensywności. Dla większości wariantów (grupa $\times$ populacja $\times$ kierunek zmiany) ΔQIC przekroczyło 4. Nie skutkowało to jednak zmianą wnioskowania w żadnym z analizowanych przypadków – zaobserwowano zmniejszenie efektu (oba modele dla grupy LLC i komórek aktywnych we wszystkich sesjach) lub zwężenie przedziałów ufności (pozostałe modele). Szczegółowe wartości umieszczono w Tabeli 5A oraz 5B.

Grupa	Porównanie	Kierunek	ΔEMM (95% CI)	p
LCC	LC - CC	UP	5 pp (-0,01; 0,11)	0,084 ~
CLL	CL - LL		5 pp (-0,02; 0,11)	0,122 ↓
LLC	LL - LC		-3 pp (-0,09; 0,02) ↓	0,221 ↑
CLL	CL - LL	DOWN	-4 pp (-0,02; 0,11)	0,113 ↓
LLC	LL - LC		6 pp (-0,03; 0,14) ↓	0,195 ↑

Tabela 5A. Wartości ΔEMM dla modeli uwzględniających płeć, dopasowanych dla populacji komórek aktywnych w każdej sesji. Strzałkami oznaczono zmiany względem modeli bez czynnika płci. W kolumnie ΔEMM informują one o wzroście/spadku efektu, w kolumnie p – o kierunku zmiany wartości p (↓ – obniżenie p – wzrost istotności, ↑ – analogicznie).

Grupa	Porównanie	Kierunek	Δ EMM (95% CI)	p
LCC	LC - CC	UP	-2 pp (-0,05; 0,01)	0,218 ↓
LLC	LL - LC		-1 pp (-0,06; 0,03)	0,482 ↓
LCC	LC - CC	DOWN	10 pp (0,03; 0,16)	0,010 ↓
LLC	LL - LC		-1 pp (-0,04; 0,07)	0,581 ↓

Tabela 5B. Wartości Δ EMM dla modeli uwzględniających płeć, dopasowanych dla populacji komórek selektywnych wobec pary sesji. Oznaczenia jak w Tabeli 5A.

Przy dysproporcji między płciami w eksperymencie uzyskane wyniki nie pozwalają stwierdzić, że efekt jest niezależny od tego czynnika. Wskazują jednak na to, że wnioskowanie nie jest zaburzone przez dodanie samic (grupy CLL i LLC), a potencjalne różnice między płciami wymagają zwiększenia grup eksperymentalnych (LCC).

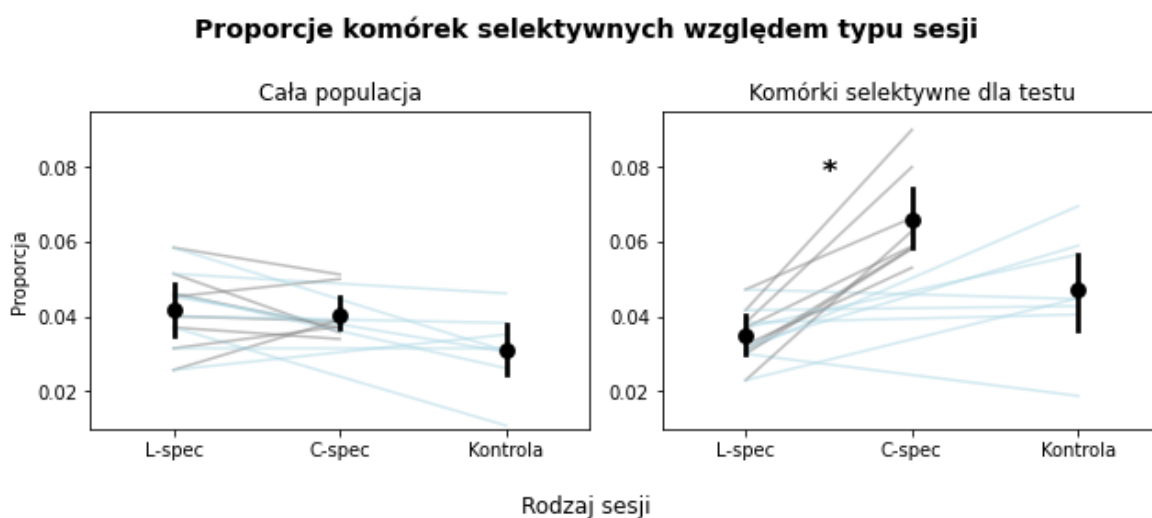
3.2.7. Neurony selektywne względem sesji

Analizie poddano także populacje neuronów selektywnych względem sesji behawioralnych. Rozszerzenie eksperymentu z 3 do 4 sesji testowych pozwoliło na symetryczne zdefiniowanie selektywności. Komórki landmark-specyficzne definiowano jako obecne w obu sesjach typu landmark (L1 i L2) oraz nieobecne w sesjach kontekstowych (C1, C2). Komórki kontekst-specyficzne określono analogicznie. Grupę kontrolną stanowiły neurony obecne w parze kolejnych sesji o różnych wskazówkach (L2 i C1) i nieobecne w L1 oraz C2. Proporcje policzono osobno dla myszy, względem wszystkich komórek zarejestrowanych dla osobnika. Porównano różnice między udziałem komórek landmark-selektywnych i kontekst-selektywnych, a także między selektywnymi względem landmarku i grupą kontrolną. Do porównania użyto testu rangowego Wilcoxona dla prób zależnych oraz metody bootstrap (10 000 losowań ze zwracaniem) dla uzyskania przedziałów ufności. Porównanie wykonano osobno dla wszystkich wykrytych komórek oraz dla komórek specyficznych dla sesji testowych (z wykluczeniem sesji S0).

W przypadku pełnej populacji, różnice między proporcjami neuronów landmark-specyficznych i kontekst-specyficznych były bliskie zera (mediana = 0,0022,

W = 14, 95% CI: (-0,006; 0,009), $p = 0,64$). Przy porównaniu między komórkami landmark-specyficznymi a kontrolą, różnice były nieco większe, nie osiągnęły jednak istotności statystycznej (mediana = 0,01, W = 3, 95% CI: (0,0; 0,026), $p = 0,078$).

Po ograniczeniu populacji do komórek aktywnych tylko w sesjach testowych (LLCC), zaobserwowano niewielką (~3 pp), ale statystycznie istotną przewagę liczebności komórek kontekst-specyficznym nad landmark-specyficznymi (mediana = -0,028, W = 0, 95% CI: (-0,042; -0,021, $p = 0,008$). Zaobserwowana przewaga proporcji komórek kontrolnych nad landmark-specyficznymi (ok. 1 pp) nie uzyskała istotności statystycznej (mediana = -0,011, W = 7, 95% CI: (-0,027; 0,0), $p = 0,148$).



Ryc. 25: Komórki selektywne. Obliczono proporcje komórek aktywnych w dwóch sesjach z pary i w żadnej z pozostałych sesjach. Porównano uzyskany odsetek neuronów landmark-specyficznym z parą kontrolną i parą kontekstową. Wbrew przewidywaniom, w jedynym porównaniu, które osiągnęło istotność statystyczną komórek L-spec było mniej od pozostałych klas.

Zweryfikowano również, czy intensywność fluorescencji wyróżnia komórki specyficzne dla poszczególnych zdefiniowanych klas na tle ogólnej populacji aktywnej w odpowiednich im sesjach. Obliczono średnią znormalizowanej intensywności komórek i porównano ją ze średnią intensywnością dla danej sesji i osobnika.

Przeanalizowano również rozmieszczenie komórek selektywnych w poszczególnych kwartylach intensywności fluorescencji (per sesja/mysz) – obliczono różnicę między proporcją komórek selektywnych obecnych w najwyższym kwartylu z jego rozmiarem (25%).

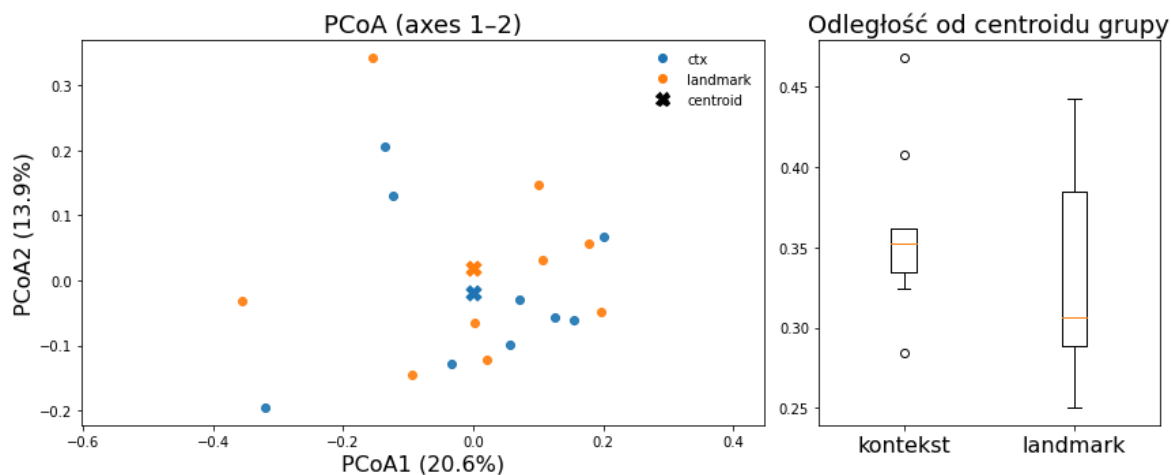
Dla analizy uwzględniającej **wszystkie neurony**, zarówno komórki landmark-specyficzne jak i kontekst-specyficzne były nieco **ciemniejsze** niż przeciętne komórki aktywne podczas danego testu – landmark: $W = 4$, $p = 0,055$, mediana = -0,24; kontekst: $W = 0$, $p = 0,008$, mediana = -0,26. Obecność w najwyższym kwartylu pod względem jasności nie odbiegała od reszty populacji – landmark: $W = 1$, $p = 0,016$, mediana = 0,005 (ze względu na wielkość efektu istotność statystyczna uznana za artefakt), kontekst: $W = 15$, $p = 0,742$, mediana = -0,003. Dla populacji komórek **specyficznych dla testu** efekt obniżonej fluorescencji zanikał (brak istotności statystycznej i mediana bliska 0), a rozbieżność w przynależności do najwyższego kwartyla pozostawała na poziomie artefaktu.

3.2.8. Aktywacja całego mózgu w odpowiedzi na wskazówki wizualne różnego typu

Jako uzupełnienie wyników eksperymentów dwufotonowych przeprowadzono analizę rozmieszczenia białka c-Fos w całym mózgu. Najpierw poddano dane filtrowaniu – usunięto obszary, dla których liczba zliczonych komórek mogła nie być wiarygodna ze względu na ograniczenia dokładności dopasowania wynikające z rozdzielczości metody. Były to struktury, dla których liczba zliczonych komórek wynosiła mniej niż 500, oraz struktury o objętości mniejszej niż $0,01 \text{ mm}^3$. Wykluczono również mózdzek, który w atlasie referencyjnym nie jest objęty w całości, co wiąże się z mniejszą precyzją dopasowania, a także opuszkę węchową, ze względu na uszkodzenia obecne u kilku osobników. Analizę wykonano dla (1) dwóch poziomów szczegółowości zdefiniowanych w Atlasie Mózgu Allena (ang. *ABA, Allen Brain Atlas*) – piątego (141 struktur) i szóstego (216 struktur), (2) dla struktur obwodu pamięci przestrzennej (Ryc. 1), również dla obu poziomów. Analizę przeprowadzono na 18 zwierzętach (9 – landmark i 9 – kontekst).

W pierwszym kroku przeprowadzono test nieparametryczny PERMANOVA (ang. *permutational multivariate analysis of variance*) z 1000 permutacji, ze standaryzacją Hellingera, dla odległości euklidesowej. Standaryzacja Hellingera zmniejsza wpływ skrajnych wartości wśród struktur i stabilizuje wariancję (Legendre i Legendre 2012). W teście tym porównywane były odległości między próbkami w przestrzeni N-wymiarowej (N = liczba struktur mózgowych na danym poziomie atlasu). Odległość w tym przypadku obliczana jest na podstawie gęstości komórek c-Fos pozytywnych w danym obszarze. Hipoteza zerowa zakłada brak różnic między centroidami grup w wybranej przestrzeni odległości. Test PERMANOVA dla całego mózgu nie wykazał istotnego efektu grupy na

rozmieszczenie wyznakowanych neuronów – dla poziomu piątego: $F(1, 16) = 0,63$, $p = 0,88$, dla szóstego – $F(1, 16) = 0,86$, $p = 0,650$.



Ryc. 26: Wizualizacja relacji między grupami eksperymentalnymi w przestrzeni odległości euklidesowych między wektorami gęstości komórek c-Fos+ dla poziomu szóstego w ABA: A. Brak separacji w przestrzeni rozpiętej na dwóch koordynatach głównych wyjaśniających najwięcej wariacji między danymi. **B.** Odległości poszczególnych osobników od centroidu grupy.

Przeprowadzono również test Welcha z poprawką Benjaminiego-Hochberga, aby uwzględnić różnice na poziomie struktur. Uwzględniono dwa aspekty: kompozycyjny, przy założeniu porównywalnej aktywacji mózgu u każdego ze zwierząt eksperymentalnych, oraz bezwzględny, dopuszczający różnice skali na poziomie całego mózgu. W pierwszym przypadku dane poddano transformacji CLR (ang. *centered log-ratio*), w drugim – testowano nieprzetworzone gęstości. Żaden z tych dwóch testów nie wykazał istotności, w większości przypadków nawet przed zastosowaniem korekty. Dla podejścia kompozycyjnego na poziomie 6. ABA $p \leq 0,05$ miały dwie struktury: warstwa I kory smakowej (ang. *gustatory area, layer I*), $t(8,04) = 2,99$, $p = 0,017$ oraz warstwa I kory okołowęchowej (ang. *perirhinal area (PRC), layer I*), $t(14,82) = 2,11$, $p = 0,050$. W porównaniu wartości bezwzględnych wartość p przed poprawką była poniżej progu 0,05 również dla dwóch struktur: jądra przyśmowego wzgórza (ang. *parataenial nucleus, PTN*), $t(12,43) = -2,76$, $p = 0,017$, oraz części ruchowej wzgórka górnego (ang. *superior colliculus, motor related*), $t(13,5) = -2,30$, $p = 0,036$. Przy przeprowadzonej liczbie porównań, naniesienie korekty Benjaminiego-Hochberga powoduje, że wymienione wartości p stają się bliskie 1.

Zweryfikowano również korelację między aktywnością neuronalną a dwiema zmiennymi związanymi z zachowaniem: (1) procentem poprawnych wyborów w trakcie ostatniego testu i (2) liczbę dni treningu do osiągnięcia kryterium eksperta – czyli odwrotność szybkości adaptacji do nowej strategii. Dla każdej struktury obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana, po czym zastosowano poprawkę Benjaminiego-Hochberga. Na poziomie 6. ABA nie wykazano korelacji między liczbą poprawnych wyborów w ostatnim teście a gęstością neuronów c-Fos+ w żadnym obszarze. Najsilniejszą korelację przejawiały jądro przedsionkowe górne (ang. *superior vestibular nucleus, SVN*) – $\rho = 0,72$, $p = 0,159$ (przed korektą: $< 0,001$) oraz warstwę 6a kory asocjacyjnej skroniowej (ang. *temporal association areas*) – $\rho = -0,66$, $p = 0,209$ (przed korektą: $0,003$). W przypadku długości treningu żadne porównanie nie przetrwało korekty B-H, jednak osiem struktur było blisko granicy istotności (po korekcie $p = 0,106$), w szczególności biorąc pod uwagę, że w analizie danych z obrazowania całego mózgu jako wartość graniczną często przyjmuje się $p = 0,1$ (Tabela 6).

Struktura	Wartość ρ	Wartość p (przed korektą)
Kora ektorynalna, warstwa 6a (ang. <i>ectorhinal area, layer 6a</i>)	-0,70	0,106 (0,001)
Gałka biała, część wewnętrzna (ang. <i>globus pallidus, internal segment</i>)	0,69	0,106 (0,001)
Boczny obszar podwzgórza (ang. <i>lateral hypothalamic area, LHA</i>)	0,68	0,106 (0,002)
Jądro podpęczkowe, część drobnokomórkowa (ang. <i>subparafascicular nucleus, parvicellular part</i>)	0,67	0,106 (0,003)
Warstwa 5 kory okołowęchowej (ang. <i>perirhinal cortex layer 5</i>)	-0,65	0,106 (0,003)
Kora przedlimbiczna, warstwa 2/3 (ang. <i>prelimbic area, layer 2/3</i>)	-0,65	0,106 (0,003)
Przyśrodkowy obszar przedwzrokowy (ang. <i>medial preoptic area</i>)	0,65	0,106 (0,004)
Warstwa 6a kory okołowęchowej (ang. <i>perirhinal cortex layer 6a</i>)	-0,64	0,106 (0,004)

Tabela 6. Struktury o granicznej istotności korelacji między gęstością c-Fos a długością treningu

Po ograniczeniu analizowanych struktur do obwodu pamięci przestrzennej również nie zaobserwowano efektu grupy: $F(1,16) = 1,08$, $p = 0,341$. Nie było też wyraźnej korelacji ze wskaźnikami behawioralnymi. Warto jednak zauważyć, że w przypadku wyniku ostatniego testu, cztery obszary o najwyższej korelacji należały do wzgórza: kompleks tylny wzgórza (ang. *posterior complex of the thalamus*) – $\rho = 0,37$, jądro graniczne tylne wzgórza (ang. *posterior limiting nucleus of the thalamus*) – $\rho = 0,31$, jądro interanterodorsalne wzgórza (ang. *interanterodorsal nucleus of the thalamus*) – $\rho = 0,27$, boczna część tylnego jądra wzgórza (ang. *lateral posterior nucleus of the thalamus*) – $\rho = 0,27$. Wynik był jednak nieistotny – dla każdego obszaru $p > 0,1$, po korekcie bliskie 1. Może to wskazywać na nadmierną fragmentację jąder wzgórza na poziomie 6 atlasu. W przypadku długości treningu, najwyższą – nadal daleką od istotności – korelację wykazała boczna część arganularnej kory retrosplenialnej – $\rho = -0,39$, $p = 0,689$, przed korektą 0,105.

4. DYSKUSJA

W niniejszej rozprawie opisano wyniki wielopoziomowej analizy aktywacji neuronalnej w nawigacji przestrzennej. Zastosowano paradygmat, który zgodnie z hipotezą miał w szczególny sposób angażować korę retrosplenialną (Balcerek i in. 2021). Podjęto próbę identyfikacji populacji neuronalnych w korze retrosplenialnej, zaangażowanych w kodowanie relacji między różnymi aspektami eksplorowanego przez myszy środowiska. Wykorzystano techniki obrazowania pozwalające na wielopoziomowe zbadanie różnic w aktywności komórkowej. Na jednym końcu spektrum była mikroskopia dwufotonowa, która pozwala na obrazowanie ograniczonego obszaru w wielu punktach czasowych. Umożliwia też szczegółową analizę na poziomie zmian w sile odpowiedzi pojedynczej komórki w różnych punktach czasowych, wychodząc poza binarne postrzeganie neuronów obrazowanych z użyciem genów wczesnej odpowiedzi. Po drugiej stronie znajduje się obrazowanie całego mózgu, które obejmuje tylko jeden punkt czasowy, ale pozwala na wnioskowanie na temat relacji pomiędzy strukturami mózgu w ujęciu systemowym. Podejścia uzupełniały się wzajemnie. Ze względu na dodanie wymiaru czasowego w doświadczeniach wykorzystujących mikroskopię dwufotonową, a także zwiększenie liczby stopni swobody w analizie komórek poprzez dodanie intensywności fluorescencji, główne wnioski formułowano na podstawie wyników uzyskanych w eksperymencie 1 i 2. Struktura danych umożliwiła analizę szerokiego repertuaru cech opisujących zarejestrowaną populację komórek. Globalne podejście z kolei umożliwiło swego rodzaju weryfikację, czy postrzeganie przez zwierzęta zaprojektowanego zadania zgodne jest z intencją projektanta. Trening w labiryncie T był z założenia zadaniem przestrzennym, i to w strukturach powszechnie uznanych za odpowiedzialne za nawigację szukano populacji neuronalnych, które służą identyfikacji i rozróżnianiu elementów środowiska pozwalających na zlokalizowanie nagrody. Czy faktycznie jednak dominujące znaczenie miał aspekt przestrzenny, czy decyzyjny? Czy różnice między skutecznością nawigacji opartej na wskazówkach o zróżnicowanym poziomie złożoności opierały się na ich jakościowej różnicy, czy były warunkowane uwagą i możliwościami wzrokowymi zwierząt? Czy kluczowa jest liczba komórek odpowiadających na bodziec, czy balans między aktywacją na poziomie różnych struktur?

Zaangażowanie kory retrosplenialnej na różnych etapach procesu uczenia

Zgodnie z dominującą teorią, w procesie konsolidacji pamięci zachodzi stopniowa stabilizacja i reorganizacja reprezentacji neuronalnej pamięci, zachodzą też zmiany w relacji między hipokampem a strukturami korowymi pod względem ich komplementarnej roli w uczeniu (Albo i Gräff 2018; Nadel i Moscovitch 1997; Wiltgen i in. 2004). Pierwotnie większy nacisk kładziono na zrozumienie roli RSC w pamięci długotrwałej, jako że lezje nie wykazywały spektakularnych zmian na etapie uczenia (Alexander i in. 2023; Daselaar, Fleck, i Cabeza 2006). Badania z ostatniej dekady wykazały jednak, że rola RSC jest istotna już od wczesnych faz nabywania pamięci. Obrazowanie tensora dyfuzji (DTI) wykazało, że w całym procesie uczenia zachodzą zmiany w strukturze istoty szarej RSC, nasilające się wraz z upływem czasu (Milczarek i Vann 2020; Milczarek, Vann, i Sengpiel 2018). Wykazano również istotne zaangażowanie RSC w konkretnych etapach akwizycji pamięci, jak przykładowo tworzenie asocjacji między kontekstem przestrzennym a nagrodą (Sun i in. 2021).

W niniejszej rozprawie przeanalizowano populację komórek, którą zarejestrowano w momencie uznanym za przełomowy w treningu w labiryncie T – kiedy zwierzęta osiągają skuteczność powyżej poziomu losowego w wyborze opartym na wskazówkach allocentrycznych. Obrazowanie powtórzono po czterotygodniowej przerwie, w celu oceny, na ile cechy reprezentacji z poprzedniego etapu zostały zachowane. Sprawdzone, czy dwa prezentowane konteksty wizualne są rozróżnialne na poziomie komórkowym. W literaturze istnieją doniesienia o specyficznych wzorcach aktywności elektrofizjologicznej w odpowiedzi na wskazówki związane z różnymi lokalizacjami nagrody (Vedder i in. 2017). Wskazówki te były umieszczone w bezpośrednim sąsiedztwie nagrody. W pracy doktorskiej wykorzystano wskazówki umiejscowione symetrycznie, neutralnie względem nagrody, co wymaga pewnego poziomu abstrakcji.

Po osiągnięciu kryterium zakończenia treningu, wykonano testy, w których zwierzęta były eksponowane na każdy z nich osobno w kolejności ABB, z interwałem przynajmniej 24 h. Następnie sprawdzono, czy rejestracje są bardziej podobne, kiedy porównuje się obrazy z dwóch sesji z tym samym kontekstem (BB), niż kiedy prezentowane były różne konteksty (AB). Porównanie na poziomie zliczania neuronów nie wykazało różnic – co nie jest wynikiem niespodziewanym, biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe. Zgodnie z opublikowanymi badaniami, wśród komórek rejestrowanych w trakcie obrazowania

bezpośrednią odpowiedź na bodziec może prezentować zaledwie 3 – 5% (Milczarek i in. 2018). Jest to jednak odsetek zależny od zadania behawioralnego i faktyczna wartość odpowiadająca paradygmatowi z części empirycznej tej pracy musiałaby być potwierdzona eksperymentalnie. Wymagałoby to wielokrotnego obrazowania tego samego regionu zainteresowania w czasie pomiędzy testem a spodziewanym punktem szczytowym ekspresji c-fos. W ten sposób można zidentyfikować neurony, u których widoczny był przyrost wywołany sesją behawioralną, zgodny z krzywą przyrostu białka c-Fos. Włączenie tej procedury powoduje jednak znaczne zmniejszenie rozmiaru badanej kohorty zwierząt ze względu na ograniczenia czasowe. Tak długi czas pod anestezją, narażający zwierzę na odwodnienie i wychłodzenie, a także wielokrotne wystawianie tkanki mózgowej na działanie lasera nie są pożądane również ze względu na dobrostan i wyniki treningowe myszy.

Jako że obrazowanie dwufotonowe ma wystarczającą rozdzielczość, by porównywać poziom intensywności fluorescencji pomiędzy dniami, przeanalizowano, jak zmieniają się komórki występujące w dwóch parach sesji. Przyjęto istnienie dwóch hipotetycznych populacji – “stabilnej”, czyli komórek zarejestrowanych w każdej z 3 ekspozycji na kontekst, oraz “plastycznej” – obserwowanej dla pary dwóch następujących po sobie sesji. Ponownie porównano pary sesji AB i BB, tym razem pod kątem odsetka obu populacji, który prezentuje trend wzrostowy lub spadkowy pomiędzy sesjami z danej pary. Podział zarejestrowanych neuronów okazał się trafny – wykazały one przeciwne trendy aktywności. Wśród komórek stabilnych zaobserwowano zwiększenie tendencji wzrostowej w parze sesji z różnymi kontekstami – wynik jednak nie był istotny statystycznie. Odsetek komórek ulegających osłabieniu pozostawał na tym samym poziomie. Większą rolę na tym etapie miała populacja “plastyczna”. W tym przypadku większy odsetek komórek o rosnącej fluorescencji zaobserwowano między sesjami z tym samym kontekstem. Komórek osłabionych było w tej parze mniej. Ta różnica może mieć podłoże fizjologiczne, zależne od połączeń między neuronami zaangażowanymi w zadanie. Możliwe jest również, że retencja komórek pomiędzy sesjami zbliżonymi w czasie (3.2.4.) jest mechanizmem umożliwiającym rekrutację neuronów do tworzonego engramu. Jeśli bodziec będzie się powtarzał, zjawisko retencji spowoduje ugruntowanie funkcjonalnego połączenia między komórkami aktywnymi w tej sesji. W przeciwnym wypadku, z czasem odpowiedź tych komórek będzie słabnąć.

Co ciekawe, w fazie odtwarzania pamięci role sugerowanych populacji były odwrócone. Istotny efekt zaobserwowano w populacji stabilnej. Przejście do sesji z innym kontekstem (A→B) wywoływało wzrost aktywności w większej liczbie komórek niż gdy

porównywano sesje z tą samą wskazówką ($B \rightarrow B$). Z kolei komórek słabnących było więcej przy dwukrotnej teście z tym samym kontekstem ($B \rightarrow B$). Innymi słowy, populacja ta była bardziej czuła na zmienność. Wśród komórek z populacji plastycznej trend był zachowany w stosunku do etapu poprzedniego, jednak utracił istotność, co przemawia na korzyść hipotezy o zaangażowaniu tej grupy w komórki w tworzenie i stabilizację nowych reprezentacji.

Różnice w odpowiedzi na prezentowane wskazówki miały przede wszystkim charakter funkcjonalny. Trudno byłoby wskazać odrębne populacje komórek zajmujące szczególne miejsce w hierarchii intensywności lub pod względem przestrzennym.

Rola RSC w nawigacji w zależności od typu wskazówki

Szczególne role RSC w przetwarzaniu schematycznych wskazówek o charakterze punktu orientacyjnego jest poparta licznymi badaniami (Fischer i in. 2020; Jeffery, Page, i Stringer 2016; Knierim i in. 1995). Wskazówki tego typu służą zakotwiczeniu sygnału z obwodu kierunku głowy (Bicanski i Burgess 2016; Jacob i in. 2017) oraz wspomagają zmianę perspektywy (Alexander i in. 2023; Sulpizio i in. 2013). Zastosowany schemat eksperymentalny miał na celu wykorzystać tę zależność i uchwycić przełączenie pomiędzy postulowanymi hipokampalnym i retrosplenialnym trybem nawigacji. Zwierzęta, które na wysokim poziomie opanowały opartą na wskazówkach wzrokowych nawigację w labiryncie T zostały postawione w sytuacji, gdy dobrze im znane środowisko przeszło znaczną zmianę i muszą odnaleźć w nim drogę do nagrody przy ograniczonym dostępie do elementów składowych otoczenia. Sprawdzono, czy mikroskopia dwufotonowa jest wystarczającym narzędziem, by uchwycić różnice w strumieniach przetwarzania wskazówek tła i wyróżniających się z niego elementów.

Znaczna część analizy przeprowadzona została zgodnie ze schematem opracowanym na potrzeby eksperymentu 1. Doświadczenia te łączyła ta sama struktura danych i analogiczny schemat testów. W przypadku wskazówek o różnej złożoności zakładano jednak asymetrię i preferencyjne przetwarzanie schematycznych punktów orientacyjnych, stąd procedurę analizy rozszerzono o testy uwzględniające ten aspekt. Sprawdzono, czy populację neuronów aktywnych po ekspozycji na landmark wyróżnia rozmiar lub zwiększona średnia intensywność. W obu przypadkach nie wykazano efektu, w porównaniu fluorescencji można jednak zauważyć trend zgodny z przewidywaniami. Jak wspomniano, bezpośrednie

porównywanie intensywności pomiędzy osobnikami, a nawet sesjami w ramach jednej myszy, nie jest wiarygodne jako osobna analiza. Jest to jeden z głównych powodów, dla których zdecydowano o wprowadzeniu modelowania statystycznego jako centralnego narzędzia analizy. Precyzja w przetwarzaniu danych dotyczących dynamiki fluorescencji była szczególnie istotna w obliczu zdecydowanie negatywnych wyników w testach opierających się na zliczaniu komórek. Skłania to do odejścia od postrzegania neuronu jako samodzielnej jednostki obliczeniowej i przeniesienia punktu ciężkości na postrzeganie go w kontekście sieci, która przemieszcza się między stanami nie w sposób dyskretny, ale po ciągłej trajektorii stanów pośrednich (Ebitz i Hayden 2021; J. K. Leutgeb i in. 2005).

Analiza zmian w hierarchii wykazała, że pomiędzy sesjami tego samego typu reorganizacja zachodzi na mniejszą skalę. Większa stabilizacja charakteryzowała jednak parę tych samych wskazówek, niezależnie od ich typu, nie zaobserwowano więc spodziewanej asymetrii. Efekt mógł być więc równoważny dla obu wskazówek, ale mógł też wynikać z kolejności sesji testowych. Aby móc kontrolować wpływ kolejności wprowadzono grupę, w której para sesji tego samego typu poprzedzała sesję z inną wskazówką (LLC jako grupa komplementarna do CLL). Zaobserwowano wygaszenie efektu w tej grupie, co dało podstawy, aby sądzić, że w tym układzie eksperymentalnym może występować superpozycja przynajmniej dwóch silnych czynników: tożsamości i kolejności sesji.

W kolejnym kroku przeanalizowano zmienność fluorescencji w zdefiniowanych populacjach “plastycznej” i “stabilnej”, stosując GEE z kompensacją wpływu jakości obrazowania. Dla populacji stabilnej nie wykazano istotnego efektu, zaobserwowano jednak wyłaniające się trendy, których kierunek był zgodny z wynikami analizy eksperymentu 1. Wielkość efektu wzrosła w stosunku do tego, co zaobserwowano u myszy dopiero adaptujących się do nowej strategii. Mniejsza – a dla modelu UP w grupie LCC graniczna – wartość p daje obraz analizowanej populacji jako punktu pośredniego pomiędzy dopiero tworzącą się (eksperyment 1, pierwsza seria testów) a dojrzałą reprezentacją neuronalną (faza odtwarzania pamięci). Jest to zgodne z aspektem behawioralnym doświadczenia. Myszy w eksperymencie 2 obrazowano, gdy strategia oparta na wskazówkach wizualnych była już przez nie w pełni zintegrowana. Były one jednak do tego momentu stale ekspozowane na zadanie, więc omawiana reprezentacja nie przeszła przez proces konsolidacji i redystrybucji. Proces ten może zachować “geometrię” sieci kodującej pamięć strategii, ale oprzeć ją na innych komórkach (Moscovitch i in. 2016; Rule i in. 2020).

Warto również zauważyć spójność między grupami LLC i CLL – zgodną z założeniami eksperymentu. Przemawia ona za tym, że efekt w tym przypadku nie jest maskowany przez wpływ kolejności sesji. Istotne jest też to, że według obserwacji średnie marginalne w obu modelach spełniają zależność $LL - LC \approx LL - CL$, a zatem EMM w LC i CL mają ten sam znak, mimo odwrotnej kolejności chronologicznej. Sugeruje to, że reprezentacja neuronalna wskazuje na zmianę typu sesji, ale nie faworyzuje sesji typu landmark (brak asymetrii).

Ponadto, w grupach z dwiema sesjami typu landmark efekt w obu modelach jest na poziomie ok. 4 pp, a w grupie LCC – bardzo blisko zera, co może być przesłanką co do asymetrii między typami wskazówek. W obecnie zgromadzonych danych nie ma jednak podstaw do weryfikacji tego przypuszczenia.

Aktywność neuronów selektywnych dla pary (“plastycznych”) w grupach LCC i CLL różniła się pod względem odsetka komórek słabnących między sesjami – było ich więcej w parze z różnymi wskazówkami. W grupę LLC efekt całkowicie zanikał. W tym przypadku nie ma analogii z eksperymentem 1, a wynik jest trudny w interpretacji. Brak zwiększonego odsetka komórek z rosnącą istotnością przy powtarzającym się bodźcu można przypisać dojrzałości strategii i braku konieczności rekrutowania nowych komórek do engramu. Efektu tego jednak nie zaobserwowano w poprzednim eksperymencie. Aby uzyskać stosowną odpowiedź, należałoby rozszerzyć eksperyment drugi o fazę odtwarzania pamięci, optymalne byłoby cykliczne monitorowanie kształtującej się reprezentacji. Na ten moment wnioskowanie przez porównywanie eksperymentu badającego rozróżnianie **typów** wskazówek (eksperyment 2) z doświadczeniem opartym na identyfikacji **instancji** wskazówki o z góry określonym typie nie jest uprawnione.

Obrazowanie całego mózgu nie wykazało globalnych różnic w przetwarzaniu różnych typów wskazówek

Przeprowadzono immunofluorescencyjne znakowanie komórek c-Fos pozytywnych w całym mózgu. Obrazowanie w skali globalnej mogło udzielić odpowiedzi na szereg pytań istotnych dla interpretacji wyników również pozostałych eksperymentów. Oryginalna hipoteza będąca podstawą do przeprowadzonych badań postulowała komplementarne role hipokampa i RSC w przetwarzaniu wskazówek o różnej złożoności (Balcerek i in. 2021). Zastosowana metoda uzupełnia analizy histologiczne wybranych punktów, pozwalając na

całościowe spojrzenie na obwód pamięci przestrzennej i ocenę związków pomiędzy poszczególnymi jego elementami. Analizę rozpoczęto od obliczenia odległości między mózgami osobników w przestrzeni, w której każda struktura stanowi wymiar, a obliczona gęstość komórek c-Fos⁺ jest wartością tej współrzędnej. Zastosowana metoda (PERMANOVA) wywodzi się z ekologii i stosowana jest do analizy złożonych relacji w populacji. Na poziomie 5. i 6. ABA test nie wykazał różnic kompozycyjnych na poziomie całego mózgu, co zgodnie z intuicją świadczy o lokalnym charakterze zmian, kiedy takie występują. Ograniczono więc testowany obszar do obwodu pamięci przestrzennej, gdzie wynik nadal nie wskazał na obecność istotnych rozbieżności.

Przeanalizowano indywidualnie struktury na obu poziomach poddanych analizie globalnej. Jako że wstępne testy wskazywały na lokalny charakter potencjalnej różnicy, miało to charakter wyłącznie eksploracyjny, ze względu na znaczną liczbę struktur i konieczność zastosowania poprawki kontrolującej współczynnik fałszywych odkryć. Niemniej, wyniki wskazały na potencjalnie interesujące kierunki, które w przyszłości można włączyć przy planowaniu eksperymentów. Zaobserwowany wzrost aktywacji obszarów kory okołowęchowej w grupie z ekspozycją na landmark w porównaniu z grupą kontekstową daje wgląd w to, w jaki sposób myszy mogą postrzegać zaprojektowane wskazówki. Kora okołowęchowa najogólniej wiązana jest z przetwarzaniem różnych aspektów rozpoznawania obiektów – m. in. nowości (ang. *novelty*) (Ameen-Ali i in. 2021; Brown i Aggleton 2001), a także odtwarzaniem znaczenia obiektu w szerszym kontekście, przykładowo poprzez wiązanie go z obecnością nagrody (S. Lee i in. 2021; Liu i Richmond 2000; Miyashita 2019). Sposób, w jaki zaprojektowana została wskazówka landmark, może powodować, że jest on postrzegany jako obiekt. Hipoteza, że PRC bierze udział w rozpoznawaniu składowych obiektów, które można koncepcyjnie powiązać w jedną całość o wspólnym znaczeniu wiąże się z założeniami, jakie przyświecały przy projektowaniu zastosowanych w eksperymentach wskazówek (Fiorilli i in. 2021). Dodatkowo, postulowana jest rola PRC w rozpoznawaniu obiektów w sytuacji dezorientacji ich przestrzennymi lub koncepcyjnymi relacjami (Kivisaari i in. 2012). Aspekt dezorientacji można łączyć z faktem, że część dobrze znanego otoczenia została usunięta. Wiąże się to też z rolą PRC w postrzeganiu nowości – mysz musi rozstrzygnąć, czy to obiekt jest nowy, czy jego otoczenie, oraz czy wcześniejsze zasady przypisujące obiektom wartości nadal obowiązują.

Zwiększenie aktywacji kory smakowej w grupie kontekstowej jest trudniejsze w interpretacji. Wiele badań potwierdziło udział tej struktury przy uczeniu się zadania,

w którym od podjętej decyzji zależało otrzymanie pokarmu. Zaobserwowano też aktywację w odpowiedzi na wskazówki wizualne powiązane z nagrodą. Zwykle jednak dotyczyło to sytuacji, gdy wybór był dokonywany pomiędzy różnymi rodzajami pożywienia, lub między ekspozycją na pozytywny lub nieprzyjemny bodziec smakowy (de Araujo, Geha, i Small 2012; Gardner i Schoenbaum 2020; Vincis i in. 2020). Przypisanie korze smakowej roli w wyborze o charakterze ekonomicznym (Jezzini i Padoa-Schioppa 2024) można ostrożnie rozszerzyć na wybór między nagrodą lub jej brakiem. Wtedy jednak spodziewana byłaby zwiększona aktywacja w sytuacji ekspozycji na kontekst, gdzie mniejsza skuteczność wiąże się z rosnącym ryzykiem nieotrzymania pożywienia w nagrodę.

Część ruchowa wzgórka górnego również ma interesujący związek z nawigacją. Nie bierze wprawdzie bezpośredniego udziału w podejmowaniu decyzji na poziomie koncepcyjnym, poprzez przetwarzanie informacji wartościującej możliwe wybory – rola tej struktury polega na podejmowaniu decyzji ruchowych, które służą kognitywnemu celowi wybranemu w innych obszarach. W szczególności dotyczy to ruchów głowy i oczu (Gandhi i Katnani 2011; Taube 1998; Thomas i in. 2023). Większa aktywacja przy ekspozycji na kontekst może świadczyć o konieczności dokładniejszego obejrzenia wskazówki, która jest bardziej rozległa, a jednocześnie nie priorytetyzowania przez myszy. Zastanawiające jest jednak, dlaczego w parze z tym nie idzie wzrost ekspresji c-fos w obszarach wzrokowych.

Zwiększona aktywacja jądra przyśmowego wzgórza jest zastanawiająca z dwóch powodów. Jest to struktura, która ze względu na sieć połączeń wiązana jest z przekazywaniem informacji z pnia mózgu i podwzgórza do kory śródwęchowej i kompleksu podpory. Informacje te dotyczą przede wszystkim stanu pobudzenia i uwagi zwierzęcia (Vertes i Hoover 2008). Może mieć to znaczenie z paradygmacie związanym z wyborem, w szczególności motywowanym pokarmem (Kelley, Baldo, i Pratt 2005). Położenie tego jądra budzi jednak wątpliwości natury technicznej – w okolicy komór mózgowych dopasowanie mózgów po procesie oczyszczania może być mniej precyzyjne ze względu na większy potencjał odkształceń. W obszarze wzgórza znajdują się też grzbietowe jądro przednie i boczne wzgórza (ATN i MD), tradycyjnie silniej łączone z zagadnieniami nawigacyjnymi, m. in. ze względu na połączenia z RSC i obecność komórek HD (Peyrache i in. 2019). Na poziomie 6 ABA wzgórze jest podzielone na wiele struktur, przy tym poziomie szczegółowości sugeruje to konieczność ostrożności we wnioskowaniu i dodatkowej kontroli dopasowania.

Na koniec przeanalizowano korelację między aktywacją poszczególnych struktur a zmiennymi behawioralnymi. Pierwszą z nich była skuteczność wyborów myszy w ostatnim treningu, co miało odpowiedzieć na pytanie, czy są struktury których aktywność wiąże się z aktualnym poziomem wytrenowania zwierzęcia. Z drugiej strony włączono długość treningu, aby zweryfikować, czy większa efektywność w uczeniu wynika z innego podłoża neuronalnego na poziomie systemowym. W przypadku drugiej z tych zmiennych, szereg struktur po korekcie B-H był bliski granicznej istotności statystycznej. Szczególnie interesująca jest obecność w tej grupie dwóch podstruktur kory okołowęchowej. Negatywna korelacja z długością treningu może wskazywać na to, że opisane wyżej mechanizmy przypisywane PRC mogą wspierać skuteczną nawigację przy złożonych wskazówkach. Podobną tendencję i równie silną negatywną korelację wykazała kora ektoryalna, której, podobnie jak PRC, przypisywana jest rola we wzrokowym przetwarzaniu wskazówek na poziomie ich tożsamości (Nishio i in. 2018) – sugeruje to, że dla efektywnego uczenia w wykorzystanym paradygmacie istotna jest identyfikacja obiektów – odpowiedź na pytanie “co”, w kontraście do zakładanego przy konstrukcji zadania pytania “gdzie”. Jest to wynik wart głębszej analizy, ze względu na spójność wyniku i implikacji dla kilku zidentyfikowanych struktur.

Interesująco, struktury pozytywnie skorelowane z długością treningu (Tabela 6) również łączy wspólny wątek. Są to struktury podkorowe, które przekładają stan wewnętrzny osobnika na akcje służące zaspokajaniu podstawowych potrzeb i utrzymaniu energetycznej homeostazy (Fang i Vachez 2024; Kumar, Scheffler, i Grodd 2023; Tsuneoka i Funato 2021). Pozytywna korelacja z długością treningu jest w tym przypadku nieintuicyjna. Struktury te w odpowiedzi na głód wzmacniają motywację do poszukiwania pożywienia i wyczulają na obecne w otoczeniu wskazówki, które mogą do niego prowadzić. Przykładowo, dowiedziono, że aktywność neuronów oreksynowych podwzgórza promuje zwiększenie uwagi wizualnej i polepsza pamięć przestrzenną (Barson 2020), co powinno prowadzić do szybszej adaptacji do nowej strategii.

Analiza aktywności całego mózgu jest potężnym narzędziem w analizie procesów, które prowadzą do reorganizacji relacji między strukturami w stopniu globalnym. Procesy na mniejszą skalę można oczywiście porównywać, ograniczając się do wybranego obszaru, aby nie tracić mocy statystycznej. Jednak w przypadku opisanym w pracy problematyczna była również natura i hierarchia podziałów na struktury, jaką oferuje Atlas Mózgu Allena. W celu zachowania standaryzacji, zastosowano podział zgodny z ontologią ABA, która jednak nie

zapewnia jednakowej szczegółowości na przestrzeni różnych obszarów mózgu. Przykładowo, na poziomie 6. RSC podzielona jest na część granularną i agranularną, podczas gdy w PRC wyróżnione są poszczególne warstwy. W rozdziale 3.2.8. wyniki sugerowały nadmierną fragmentację jąder wzgórza. Natomiast na wyższym poziomie, gdzie każde z jąder było traktowane jako pojedyncza, odrębna struktura, pozostałe elementy obwodu pamięci przestrzennej były agregowane w sposób, który zacierał spodziewane różnice – hipokamp był traktowany jako całość, podobnie RSC. Brak balansu w tym zakresie nie pozwalał na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków przy ograniczeniu do struktur przestrzennych. Utrudniał też kontrolę nad mocą testów statystycznych – nadmierne rozbieżności struktur spoza obszaru zainteresowania wpływało na efekty zastosowanej korekty dla wielokrotnych porównań. W skali całego mózgu za najbardziej rzetelne uznano wyniki obejmujące kilka sąsiednich struktur przy wysokim poziomie fragmentacji i spójne pomiędzy poszczególnymi etapami analizy – jak to miało miejsce w przypadku kory okołowęchowej. Struktura ABA jest także przede wszystkim oparta na różnicach anatomicznych, pomija podziały funkcjonalne – jak na przykład istotny dla stosowanego paradygmatu gradient obserwowany w osi przód – tył RSC, różnicujący udział w przetwarzaniu informacji przestrzennych i wzrokowych (Balcerek i in. 2024; Vann i in. 2003, 2009). Badania nad konektomiką wykazały istotne różnice między anatomicznymi i funkcjonalnymi połączeniami RSC wzdłuż jej osi (Kondo i Zaborszky 2025; Reep i in. 1987; Shibata 1998; Sugar i in. 2011), na ten moment jednak atlasy oparte na połączeniach nie oferują takiej elastyczności i rozdzielczości jak ABA (Oh i in. 2014).

Na koniec warto wspomnieć o jednej kwestii – genowi c-fos przypisuje się często większą ekspresję w sytuacjach z elementem nowości. W eksperymencie 3, aby mieć dane na temat nawigacji na podstawie obu typów wskazówek u każdego osobnika przeprowadzono po 2 testy. Terminacja i zebranie mózgów odbyło się zatem po drugiej ekspozycji na warunki testowe, co mogło nieco osłabić efekt nowości i przyczynić się do małej mocy statystycznej porównań na poziomie pojedynczych struktur.

c-Fos jako narzędzie wizualizacji engramu

Właściwości genów wczesnej odpowiedzi wiążą je nierozdzielnie z pierwszą definicją engramu zaproponowaną przez Ebbinghaus (Ebbinghaus 1885). W rozpoczynającym tę pracę rozdziale ujęto liczne powody, które czynią c-Fos tak szeroko rozpowszechnionym narzędziem badania populacji neuronalnych. Dzięki tej popularności

możliwe było zastosowanie w części eksperymentalnej metod bazujących na ekspresji ekspresji c-fos w diametralnie różnych technikach obrazowania, zwiększając spójność wyników. Należy jednak pamiętać, że c-Fos jest przede wszystkim **pośrednikiem** aktywności neuronalnej i przy wnioskowaniu na jego podstawie należy brać pod uwagę ten dodatkowy stopień separacji. Jak pokazano w tej pracy, aktywność nie zawsze przejawia się jako zwiększenie liczebności komórek. Różny poziom bazowy c-Fosa w obszarach mózgu, a także często niewielki rozmiar populacji neuronalnej zaangażowanej w zachowanie powodują, że efekt będący głównym przedmiotem zainteresowania może zostać przeoczony (McReynolds i in. 2018). Sam poziom bazowy także może ulegać zmianom, wpływając jednocześnie na pobudliwość neuronów w otoczeniu (Whitaker i in. 2017). Z kolei badania na myszach FosGFP wykazały, że neurony zawierające to białko fuzyjne charakteryzowały się większą częstotliwością wyładowań i tworzyły preferencyjnie połączenia z innymi komórkami FosGFP+. Prowadziło to do powstawania sieci neuronalnej rekurencyjnie podtrzymującej aktywność i poziom białka FosGFP znacznie dłużej niż wskazywałaby na to dynamika jego degradacji (Yassin i in. 2010).

Obecność białka c-Fos w komórce nie daje też informacji o ścieżkach sygnałowych, które doprowadziły do jego akumulacji, ani o procesach następnych. Dlatego jeżeli celem jest wizualizacja plastyczności, lepiej dostosowane do tego zadania są geny efektorowe (przykładowo arc), bezpośrednio biorące udział w procesach synaptycznych. Stosowany jako wyłączna sygnatura engramu c-Fos pomija również komponent hamujący engramu, w ostatnich latach uznawany za jego istotną część o osobnej roli (Giorgi i Marinelli 2021).

Wyniki behawioralne

Mimo zapewnienia możliwie zbliżonych warunków w czasie każdego z eksperymentów, zauważono istotne różnice w procesie uczenia w dwóch grupach. Myszy szczepu B6129SF1/J (eksperyment 3) po treningu wstępnym osiągały wyraźnie lepsze wyniki. Jest to szczególnie ciekawe, jako że w treningu wstępnym wszystkie okrażenia w sesji są w trybie wymuszonym – zwierzęta za każdym razem otrzymują nagrodę, nie mają więc negatywnej asocjacji ze skrętem w niewłaściwe ramię.

W analizie różnic między grupami, które mogły wpłynąć na różnice w początkowym stadium procesu uczenia można wskazać na dwa czynniki: różnica szczepu i interwencja chirurgiczna w jednej z grup. Nie zaobserwowano wcześniej wyraźnych różnic w szybkości

uczenia między myszami po operacjach, a grupami bez. Istnieją za to doniesienia literaturowe wskazujące na lepsze wyniki w testach przestrzennych u B6129SF1/J w porównaniu z innymi szczepami (Merritt i Rhodes 2015). Wpływ na wyniki może mieć również zjawisko heterozji (ang. *hybrid vigor*). Nie znaleziono doniesień na temat wyróżniającej czułości wzroku szczepu B6129SF1/J.

Pojawia się pytanie – jaki ma to wpływ na interpretację wyników w eksperymencie 3? Istotną część wniosków z tego eksperymentu sformułowano na podstawie korelacji między gęstością c-Fos w poszczególnych strukturach, a długością treningu – zmienną która najbardziej odróżniała grupy. Dodatkowo, wydaje się, że różnica w szybkości uczenia może wynikać z czynników jakościowych, sposobu postrzegania zadania – ze względu na skuteczność wyborów powyżej poziomu szansy mimo ekspozycji wyłącznie na fazę wymuszoną. Jest to kwestia warta rozstrzygnięcia – użycie tego szczepu mogłoby skrócić czas trwania eksperymentu i zwiększyć efektywność.

Wpływ płci na uczenie strategii przestrzennej

Kwestia stosowania zwierząt obu płci w badaniach podstawowych stała się szczególnie istotna w ostatnich latach w wyniku zmian społecznych. Uwzględnienie samic w badaniach podstawowych jest ważnym pierwszym krokiem na drodze do uzupełnienia luk w wiedzy na temat organizmów kobiet. Przyjęcie większej wariancji w grupach składających się z samic – ze względu na potencjalny wpływ fazy cyklu estralnego – implikowało konieczność zwiększenia rozmiaru grup eksperymentalnych, co często znacząco wydłuża czas prowadzonych badań. W ostatniej dekadzie pojawiły się jednak badania, które wykazują, że założenie to nie zawsze jest słuszne (Beery 2018). Co więcej, wykazano, że w zadaniach behawioralnych zmienność wewnątrz grup tej samej płci jest większa niż pomiędzy grupami (Levy i in. 2023). W podrozdziałach 3.1.1. oraz 3.2.1. dowiedziono, że jest tak również w przypadku treningu w labiryncie typu T.

W przypadku badania reprezentacji neuronalnych ważne jest projektowanie eksperymentu przy wykorzystaniu analizy czynnikowej. W opisanych doświadczeniach wybór grup nie pozwolił na równoważne wnioskowanie na temat efektów dla obu płci. W przyszłych eksperymentach z użyciem tych samych technik szczególnie ważne będzie uwzględnienie różnic w operacjach stereotaktycznych. Mniejsza masa samic w niektórych sytuacjach negatywnie wpływa na przeżywalność procedury implantacji. Rozmiar głowy oraz mniejsza grubość czaszki mogą również skutkować mniejszą stabilnością implantu. Warto

w związku z tym przy podziale na grupy uwzględnić nie tylko szybkość uczenia, ale także jakość obrazu, co będzie wymagało weryfikacji na wcześniejszym etapie eksperymentu.

Ograniczenia paradygmatu eksperymentalnego

Pierwszy z zastosowanych schematów doświadczalnych umożliwił wzdlużne obrazowanie dwufotonowe populacji neuronalnych u jednego osobnika. Daje pewną przewagę nad metodami histologicznymi, często ograniczającymi analizę do jednego punktu czasowego, ale odbywa się jednocześnie kosztem rozległości analizowanego obszaru. W eksperymentach opisanych w tej pracy planowano uwzględnić położenie badanych obszarów wzdluż osi przód-tył RSC, w nawiązaniu do wspomnianego gradientu. Przy zastosowanych szkiełkach o średnicy 3 mm, obszary RSC które można zakwalifikować jako z całą pewnością należące do przedniej lub tylnej części RSC znajdowały się blisko krawędzi kraniotomii. Powtarzalne obrazowanie tych obszarów było więc utrudnione ze względu na przyrost kości wokół krawędzi i często również zmiany w unaczynieniu (Cramer i in. 2021; Roome i Kuhn 2014). Liczba regionów położona w tych skrajnych częściach pola obrazowania była więc niewielka i nie pozwoliła na zidentyfikowanie wyraźnej różnicy w dynamice neuronów w tych regionach. Rozwiązaniem może być stosowanie większych szkiełek o zakrzywionej powierzchni dostosowanej do powierzchni czaszki (Kim i in. 2016).

Istotnym problemem była również bardzo ograniczona rozdzielczość czasowa. Z jednej strony była to kwestia akumulacji natywnego białka c-Fos, która pozwalała na obrazowanie odpowiedzi na sesję behawioralną w całości, bez możliwości położenia nacisku na konkretny aspekt nawigacji lub podejmowania decyzji. Z drugiej strony ograniczające było oczekiwanie na powrót poziomu białka fuzyjnego do poziomu bazowego. Żeby w pełni wykluczyć wpływ poprzedniej sesji na obrazowanie, należało odczekać przynajmniej 24 h pomiędzy testami. Stało się to istotną przeszkodą w momencie, kiedy wstępne wyniki wykazały, że pełny obraz odpowiedzi neuronalnej na bodziec uzyskanej opisaną metodą wymagałoby licznych permutacji kolejności wyświetlania wybranych wskazówek. Przy cyklu eksperymentalnym trwającym nawet do 2 miesięcy, ograniczonej liczbie zwierząt, które można włączyć do eksperymentu, zachowując odpowiednie odstępy pomiędzy sesjami obrazowania, a przy tym konieczności zwiększenia grup dla mocy statystycznej - eksperyment mógłby rozciągać się na wiele lat.

W ostatnim dziesięcioleciu można zaobserwować istotny wzrost w dążeniu do standaryzacji protokołów eksperymentalnych, a w szczególności procesu analizy danych. W literaturze dotyczącej dwufotonowego obrazowania genów wczesnej odpowiedzi widoczne są liczne rozbieżności, poczynając od rejestracji obrazów, przez wstępną obróbkę danych, po klasyfikację neuronów. Brak też spójnego zestawu cech, które byłyby aplikowalne dla różnych paradygmatów. W pewnym sensie inspiruje to kreatywne podejście do planowania analizy, brakuje jednak wspólnego fundamentu.

Sama obróbka danych jest istotnym wyzwaniem. To, jakie pytania można zadać, jakie wartości można porównywać między sobą, zależy od zastosowanej metody korekty głębokości. Podobnie wygląda sytuacja korekcji różnic pomiędzy poziomem tła. Znaczny rozdźwięk istnieje między metodami stosowanymi w obliczeniowej obróbce obrazu, a korektami, które w zaawansowanych układach możliwe są już na poziomie akwizycji, przez precyzyjne dostosowywanie mocy lasera na bieżąco (Entenberg i in. 2011; Poll i in. 2020). W tej pracy poza technikami obróbki obrazu zastosowano modele statystyczne (GEE), które pozwoliły stwierdzić, czy artefakty zostały usunięte, czy też konieczna była dodatkowa kompensacja, którą rzeczony model umożliwiał. W porównywaniu wniosków z badań, w których zastosowano sprzętową kompensację z nałożonymi korektami w obróbce obrazów należy zachować ostrożność. Odtworzenie utraconych na etapie akwizycji informacji technikami obliczeniowymi zawsze jest obciążone pewnym błędem.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zidentyfikowano dwie komplementarne populacje neuronalne w korze retrosplenialnej o postulowanej roli odpowiednio w tworzeniu i stabilizowaniu śladu pamięciowego. Wykazano, że pierwsza z nich dominuje na etapie tworzenia asocjacji między wskazówką a lokalizacją nagrody, a druga po okresie konsolidacji pamięci.

Zaobserwowano asymetrię w przetwarzaniu prezentowanych bodźców wizualnych. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na jednoznaczne wskazanie dominacji jednego z zastosowanych typów wskazówek. Można wnioskować, że podłożem tej asymetrii jest superpozycja czynników związanych z tożsamością wskazówki, kolejnością prezentacji bodźców oraz wewnętrzną dynamiką sieci neuronalnych zaangażowanych w procesy nawigacyjne. Wpływ na rezultat może mieć też zróżnicowanie postrzegania otoczenia pomiędzy osobnikami.

Wykazano graniczną korelację między szybkością adaptacji do nowej strategii a zaangażowaniem struktur odpowiedzialnych za identyfikację obiektów i ich relacji z otoczeniem. Można zatem przypuszczać, że zaprojektowane rodzaje wskazówek są rozróżniane przez myszy na poziomie koncepcyjnym. Zwierzęta, które postrzegają te różnice bardziej wyraźnie, uczą się nowej strategii szybciej.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Aggleton, John P., Steliana Yanakieva, Frank Sengpiel, i Andrew J. Nelson. 2021. „The Separate and Combined Properties of the Granular (Area 29) and Dysgranular (Area 30) Retrosplenial Cortex”. *Neurobiology of Learning and Memory* 185:107516. doi:10.1016/j.nlm.2021.107516.
2. Albo, Zimbul, i Johannes Gräff. 2018. „The Mysteries of Remote Memory”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 373(1742):20170029. doi:10.1098/rstb.2017.0029.
3. Alexander, Andrew S., Ryan Place, Michael J. Starrett, Elizabeth R. Chrastil, i Douglas A. Nitz. 2023. „Rethinking Retrosplenial Cortex: Perspectives and Predictions”. *Neuron* 111(2):150–75. doi:10.1016/j.neuron.2022.11.006.
4. Allen, K., M. Gil, E. Resnik, O. Toader, P. Seeburg, i H. Monyer. 2014. „Impaired path integration and grid cell spatial periodicity in mice lacking GluA1-containing AMPA receptors”. *Journal of Neuroscience* 34(18):6245–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.4330-13.2014.
5. Ameen-Ali, Kamar E., Magali H. Sivakumaran, Madeline J. Eacott, Akira R. O'Connor, James A. Ainge, i Alexander Easton. 2021. „Perirhinal cortex and the recognition of relative familiarity”. *Neurobiology of Learning and Memory* 182:107439. doi:10.1016/j.nlm.2021.107439.
6. Anagnostaras, Stephan G., Stephen Maren, i Michael S. Fanselow. 1999. „Temporally Graded Retrograde Amnesia of Contextual Fear after Hippocampal Damage in Rats: Within-Subjects Examination”. *The Journal of Neuroscience* 19(3):1106–14. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-03-01106.1999.
7. de Araujo, Ivan E., Paul Geha, i Dana M. Small. 2012. „Orosensory and Homeostatic Functions of the Insular Taste Cortex”. *Chemosensory perception* 5(1):64–79. doi:10.1007/s12078-012-9117-9.
8. Auger, Stephen D., Sinéad L. Mullally, i Eleanor A. Maguire. 2012. „Retrosplenial Cortex Codes for Permanent Landmarks”. *PLoS ONE* 7(8):e43620. doi:10.1371/journal.pone.0043620.
9. Auger, Stephen D., Peter Zeidman, i Eleanor A. Maguire. 2015. „A central role for the retrosplenial cortex in de novo environmental learning”. *eLife* 4:e09031. doi:10.7554/eLife.09031.
10. Balcerek, Edyta, Urszula Włodkowska, i Rafał Czajkowski. 2021. „Retrosplenial cortex in spatial memory: focus on immediate early genes mapping”. *Molecular Brain* 14(1):172. doi:10.1186/s13041-021-00880-w.
11. Balcerek, Edyta, Urszula Włodkowska, i Rafał Czajkowski. 2024. „FOS Mapping Reveals Two Complementary Circuits for Spatial Navigation in Mouse”. *Scientific Reports* 14(1):21252. doi:10.1038/s41598-024-72272-8.
12. Barson, Jessica R. 2020. „Orexin/Hypocretin and Dysregulated Eating: Promotion of Foraging Behavior”. *Brain Research* 1731:145915.

doi:10.1016/j.brainres.2018.08.018.

13. Barth, A. L., R. C. Gerkin, i K. L. Dean. 2004. „Alteration of neuronal firing properties after in vivo experience in a FosGFP transgenic mouse”. *J Neurosci* 24(29):6466–75.
14. Beery, Annaliese K. 2018. „Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies”. *Current opinion in behavioral sciences* 23:143–49. doi:10.1016/j.cobeha.2018.06.016.
15. Behrens, Timothy E. J., Timothy H. Muller, James C. R. Whittington, Shirley Mark, Alon B. Baram, Kimberly L. Stachenfeld, i Zeb Kurth-Nelson. 2018. „What Is a Cognitive Map? Organizing Knowledge for Flexible Behavior”. *Neuron* 100(2):490–509. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.002.
16. Bicanski, Andrej, i Neil Burgess. 2016. „Environmental Anchoring of Head Direction in a Computational Model of Retrosplenial Cortex”. *The Journal of Neuroscience* 36(46):11601–18. doi:10.1523/JNEUROSCI.0516-16.2016.
17. Bijoch, Łukasz, Joanna Klos, Monika Pawłowska, Justyna Wiśniewska, Diana Legutko, Urszula Szachowicz, Leszek Kaczmarek, i Anna Beroun. 2023. „Whole-Brain Tracking of Cocaine and Sugar Rewards Processing”. *Translational Psychiatry* 13(1):1–14. doi:10.1038/s41398-023-02318-4.
18. Blair, Hugh T., i Patricia E. Sharp. 1996. „Visual and vestibular influences on head-direction cells in the anterior thalamus of the rat”. *Behavioral Neuroscience* 110(4):643–60. doi:10.1037/0735-7044.110.4.643.
19. Boccara, Charlotte N., Francesca Sargolini, Veslemøy Hult Thoresen, Trygve Solstad, Menno P. Witter, Edvard I. Moser, i May-Britt Moser. 2010. „Grid Cells in Pre- and Parasubiculum”. *Nature Neuroscience* 13(8):987–94. doi:10.1038/nn.2602.
20. Bontempi, B., C. Laurent-Demir, C. Destrade, i R. Jaffard. 1999. „Time-Dependent Reorganization of Brain Circuitry Underlying Long-Term Memory Storage”. *Nature* 400(6745):671–75. doi:10.1038/23270.
21. Brown, Malcolm W., i John P. Aggleton. 2001. „Recognition Memory: What Are the Roles of the Perirhinal Cortex and Hippocampus?”. *Nature Reviews Neuroscience* 2(1):51–61. doi:10.1038/35049064.
22. Buckley, Mark J., i Anna S. Mitchell. 2016. „Retrosplenial Cortical Contributions to Anterograde and Retrograde Memory in the Monkey”. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 26(6):2905–18. doi:10.1093/cercor/bhw054.
23. Burr, Harold E. 1916. „A study of the behavior of the white rat by the multiple choice method”. *Journal of Animal Behavior* 6(3):222–46. doi:10.1037/h0074872.
24. Buzsáki, György, i Edvard I. Moser. 2013. „Memory, Navigation and Theta Rhythm in the Hippocampal-Entorhinal System”. *Nature Neuroscience* 16(2):130–38. doi:10.1038/nn.3304.
25. Chang, HaoRan, Ingrid M. Esteves, Adam R. Neumann, Jianjun Sun, Majid H. Mohajerani, i Bruce L. McNaughton. 2020. „Coordinated activities of retrosplenial ensembles during resting-state encode spatial landmarks”. *Philosophical Transactions*

of the Royal Society B: Biological Sciences 375(1799):20190228.
doi:10.1098/rstb.2019.0228.

26. de Chaumont, Fabrice, Stéphane Dallongeville, Nicolas Chenouard, Nicolas Hervé, Sorin Pop, Thomas Provoost, Vannary Meas-Yedid, Praveen Pankajakshan, Timothée Lecomte, Yoann Le Montagner, Thibault Lagache, Alexandre Dufour, i Jean-Christophe Olivo-Marin. 2012. „Icy: An Open Bioimage Informatics Platform for Extended Reproducible Research”. *Nature Methods* 9(7):690–96.
doi:10.1038/nmeth.2075.
27. Chen, Guifen, John Andrew King, Yi Lu, Francesca Cacucci, i Neil Burgess. 2018. „Spatial cell firing during virtual navigation of open arenas by head-restrained mice”. *eLife* 7:e34789. doi:10.7554/eLife.34789.
28. Chen, L. L., L. H. Lin, C. A. Barnes, i B. L. McNaughton. 1994. „Head-Direction Cells in the Rat Posterior Cortex. II. Contributions of Visual and Ideothetic Information to the Directional Firing”. *Experimental Brain Research* 101(1):24–34.
doi:10.1007/BF00243213.
29. Cho, J., i P. E. Sharp. 2001. „Head Direction, Place, and Movement Correlates for Cells in the Rat Retrosplenial Cortex”. *Behavioral Neuroscience* 115(1):3–25.
doi:10.1037/0735-7044.115.1.3.
30. Clayton, Nicola S., i Anthony Dickinson. 1998. „Episodic-like Memory during Cache Recovery by Scrub Jays”. *Nature* 395(6699):272–74. doi:10.1038/26216.
31. Cleveland, William S. 1979. „Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots”. *Journal of the American Statistical Association* 74(368):829–36.
doi:10.1080/01621459.1979.10481038.
32. Cole, Andrew J., David W. Saffen, Jay M. Baraban, i Paul F. Worley. 1989. „Rapid Increase of an Immediate Early Gene Messenger RNA in Hippocampal Neurons by Synaptic NMDA Receptor Activation”. *Nature* 340(6233):474–76.
doi:10.1038/340474a0.
33. Cooper, B. G., i S. J. Y. Mizumori. 1999. „Retrosplenial cortex inactivation selectivity impairs navigation in darkness”. *NeuroReport* 10(3):625–30.
doi:10.1097/00001756-199902250-00033.
34. Cowansage, Kiriana Kater, Tristan Shuman, Blythe Christine Dillingham, Allene Chang, Peyman Golshani, i Mark Mayford. 2014. „Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context”. *Neuron* 84(2):432–41.
doi:10.1016/j.neuron.2014.09.022.
35. Cramer, Samuel W., Russell E. Carter, Justin D. Aronson, Suhasa B. Kodandaramaiah, Timothy J. Ebner, i Clark C. Chen. 2021. „Through the looking glass: a review of cranial window technology for optical access to the brain”. *Journal of neuroscience methods* 354:109100. doi:10.1016/j.jneumeth.2021.109100.
36. Czajkowski, Rafał, Balaji Jayaprakash, Brian Wiltgen, Thomas Rogerson, Mikael C. Guzman-Karlsson, Alison L. Barth, Joshua T. Trachtenberg, i Alcino J. Silva. 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):8661–66. doi:10.1073/pnas.1313222111.
37. Daselaar, S. M., M. S. Fleck, i R. Cabeza. 2006. „Triple Dissociation in the Medial Temporal Lobes: Recollection, Familiarity, and Novelty”. *Journal of Neurophysiology* 96(4):1902–11. doi:10.1152/jn.01029.2005.
 38. Davis, Hasker P., i Larry R. Squire. 1984. „Protein synthesis and memory: A review”. *Psychological Bulletin* 96(3):518–59. doi:10.1037/0033-2909.96.3.518.
 39. Dember, W. N., i H. Fowler. 1958. „Spontaneous Alternation Behavior”. *Psychological Bulletin* 55(6):412–28. doi:10.1037/h0045446.
 40. Duvelle, É., i K. J. Jeffery. 2018. „Social Spaces: Place Cells Represent the Locations of Others”. *Current Biology* 28(6):R271–73. doi:10.1016/j.cub.2018.02.017.
 41. Ebbinghaus, Hermann. 1885. *Über das Gedächtnis*. 1. Auflage. Leipzig: Duncker & Humblot.
 42. Ebitz, R. Becket, i Benjamin Y. Hayden. 2021. „The population doctrine in cognitive neuroscience”. *Neuron* 109(19):3055–68. doi:10.1016/j.neuron.2021.07.011.
 43. Elduayen, Coralie, i Etienne Save. 2014. „The retrosplenial cortex is necessary for path integration in the dark”. *Behavioural Brain Research* 272:303–7. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.009.
 44. Entenberg, David, Jeffrey Wyckoff, Bojana Gligorijevic, Evanthia T. Roussos, Vladislav V. Verkhusa, Jeffrey W. Pollard, i John Condeelis. 2011. „Setup and use of a two-laser multiphoton microscope for multichannel intravital fluorescence imaging”. *Nature protocols* 6(10):1500–1520. doi:10.1038/nprot.2011.376.
 45. Fang, Lisa Z., i Yvan M. Vachez. 2024. „Targeting the ventral pallidum in obesity”. *Addiction Neuroscience* 13:100179. doi:10.1016/j.addicn.2024.100179.
 46. Finger, Stanley, i Stanley Finger. 2001. *Origins of Neuroscience: A History of Explorations into Brain Function*. Oxford, New York: Oxford University Press.
 47. Fiorilli, Julien, Jeroen J. Bos, Xenia Grande, Judith Lim, Emrah Düzel, i Cyriel M. A. Pennartz. 2021. „Reconciling the object and spatial processing views of the perirhinal cortex through task-relevant unitization”. *Hippocampus* 31(7):737–55. doi:10.1002/hipo.23304.
 48. Fischer, Lukas F., Raul Mojica Soto-Albors, Friederike Buck, i Mark T. Harnett. 2020. „Representation of visual landmarks in retrosplenial cortex” zredagowane przez B. Bathellier i L. L. Colgin. *eLife* 9:e51458. doi:10.7554/eLife.51458.
 49. Fischler-Ruiz, Walter, David G. Clark, Narendra R. Joshi, Virginia Devi-Chou, Lacey Kitch, Mark Schnitzer, L. F. Abbott, i Richard Axel. 2021. „Olfactory Landmarks and Path Integration Converge to Form a Cognitive Spatial Map”. *Neuron* 109(24):4036–4049.e5. doi:10.1016/j.neuron.2021.09.055.
 50. von Frisch, Karl. 1967. *The dance language and orientation of bees*. The dance language and orientation of bees. Cambridge, MA, US: Harvard University Press.
 51. Fyhn, M., S. Molden, M. P. Witter, E. I. Moser, i M. B. Moser. 2004. „Spatial

- representation in the entorhinal cortex". *Science* 305(5688):1258–64.
doi:10.1126/science.1099901.
52. Gandhi, Neeraj J., i Husam A. Katnani. 2011. „Motor Functions of the Superior Colliculus". *Annual review of neuroscience* 34:205–31.
doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113728.
 53. Gardner, Matthew P. H., i Geoffrey Schoenbaum. 2020. „Neuroscience: From Sensory Discrimination to Choice in Gustatory Cortex". *Current Biology* 30(10):R444–46.
doi:10.1016/j.cub.2020.03.003.
 54. Gardner, Richard J., Erik Hermansen, Marius Pachitariu, Yoram Burak, Nils A. Baas, Benjamin A. Dunn, May-Britt Moser, i Edvard I. Moser. 2022. „Toroidal Topology of Population Activity in Grid Cells". *Nature* 602(7895):123–28.
doi:10.1038/s41586-021-04268-7.
 55. Ghisletta, Paolo, i Dario Spini. 2004. „An Introduction to Generalized Estimating Equations and an Application to Assess Selectivity Effects in a Longitudinal Study on Very Old Individuals". *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 29(4):421–37. doi:10.3102/10769986029004421.
 56. Giorgi, Corinna, i Silvia Marinelli. 2021. „Roles and Transcriptional Responses of Inhibitory Neurons in Learning and Memory". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14:689952. doi:10.3389/fnmol.2021.689952.
 57. Grienberger, Christine, Andrea Giovannucci, William Zeiger, i Carlos Portera-Cailliau. 2022. „Two-photon calcium imaging of neuronal activity". *Nature reviews. Methods primers* 2(1):67. doi:10.1038/s43586-022-00147-1.
 58. Grieves, Roddy M., i Kate J. Jeffery. 2017. „The representation of space in the brain". *Behavioural Processes* 135:113–31. doi:10.1016/j.beproc.2016.12.012.
 59. van Groen, T., i J. M. Wyss. 1990. „Connections of the Retrosplenial Granular a Cortex in the Rat". *The Journal of Comparative Neurology* 300(4):593–606.
doi:10.1002/cne.903000412.
 60. van Groen, T., i J. M. Wyss. 1992. „Connections of the Retrosplenial Dysgranular Cortex in the Rat". *The Journal of Comparative Neurology* 315(2):200–216.
doi:10.1002/cne.903150207.
 61. van Groen, T., i J. M. Wyss. 2003. „Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat". *Journal of Comparative Neurology* 463(3):249–63.
doi:10.1002/cne.10757.
 62. van Groen, Thomas, Inga Kadish, i J. Michael Wyss. 2004. „Retrosplenial Cortex Lesions of Area Rgb (but Not of Area Rga) Impair Spatial Learning and Memory in the Rat". *Behavioural Brain Research* 154(2):483–91. doi:10.1016/j.bbr.2004.03.016.
 63. Guthrie, K. M., i C. M. Gall. 1995. „Functional Mapping of Odor-Activated Neurons in the Olfactory Bulb". *Chemical Senses* 20(2):271–82. doi:10.1093/chemse/20.2.271.
 64. Hafting, Torkel, Marianne Fyhn, Sturla Molden, May-Britt Moser, i Edvard I. Moser. 2005. „Microstructure of a Spatial Map in the Entorhinal Cortex". *Nature* 436(7052):801–6. doi:10.1038/nature03721.

65. Hanley, James A., Abdissa Negassa, Michael D. deB. Edwardes, i Janet E. Forrester. 2003. „Statistical Analysis of Correlated Data Using Generalized Estimating Equations: An Orientation”. *American Journal of Epidemiology* 157(4):364–75. doi:10.1093/aje/kwf215.
66. Hebb, D. O. 1949. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. The organization of behavior; a neuropsychological theory. Oxford, England: Wiley.
67. Henderson, Jonathan, T. Andrew Hurly, Melissa Bateson, i Susan D. Healy. 2006. „Timing in Free-Living Rufous Hummingbirds, *Selasphorus rufus*”. *Current Biology* 16(5):512–15. doi:10.1016/j.cub.2006.01.054.
68. Hull, Clark L. 1950. „Behavior postulates and corollaries—1949”. *Psychological Review* 57(3):173–80. doi:10.1037/h0062809.
69. Hunter, Walter S. 1920. „The temporal maze and kinaesthetic sensory processes in the white rat”. *Psychobiology* 2(1):1–17. doi:10.1037/h0073855.
70. Ironside, REDVERS, i MANFRED Guttmacher. 1929. „THE CORPUS CALLOSUM AND ITS TUMOURS”. *Brain* 52(4):442–83. doi:10.1093/brain/52.4.442.
71. Jacob, Pierre-Yves, Giulio Casali, Laure Spieser, Hector Page, Dorothy Overington, i Kate Jeffery. 2017. „An independent, landmark-dominated head direction signal in dysgranular retrosplenial cortex”. *Nature neuroscience* 20(2):173–75. doi:10.1038/nn.4465.
72. Jankowski, M. M., i S. M. O’Mara. 2015. „Dynamics of place, boundary and object encoding in rat anterior claustrum”. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9(OCT). doi:10.3389/fnbeh.2015.00250.
73. Jaworski, Jacek, Ireneusz W. Biedermann, Joanna Lapinska, Arek Szklarczyk, Izabela Figiel, Dorota Konopka, Dorota Nowicka, Robert K. Filipkowski, Michal Hetman, Anna Kowalczyk, i Leszek Kaczmarek. 1999. „Neuronal Excitation-driven and AP-1-dependent Activation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Gene Expression in Rodent Hippocampus*”. *Journal of Biological Chemistry* 274(40):28106–12. doi:10.1074/jbc.274.40.28106.
74. Jeffery, Kate J., Hector J. I. Page, i Simon M. Stringer. 2016. „Optimal Cue Combination and Landmark-stability Learning in the Head Direction System”. *The Journal of Physiology* 594(22):6527. doi:10.1113/JP272945.
75. Jeffery, Kathryn J. 2007. „Integration of the Sensory Inputs to Place Cells: What, Where, Why, and How?” *Hippocampus* 17(9):775–85. doi:10.1002/hipo.20322.
76. Jezzini, Ahmad, i Camillo Padoa-Schioppa. 2024. „Neuronal Activity in the Gustatory Cortex during Economic Choice”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 44(33):e2150232024. doi:10.1523/JNEUROSCI.2150-23.2024.
77. Kaczmarek, L. 1993. „Molecular Biology of Vertebrate Learning: Is c-Fos a New Beginning?” *Journal of Neuroscience Research* 34(4):377–81. doi:https://doi.org/10.1002/jnr.490340402.
78. Kaczmarek, L. 2000. „Gene Expression in Learning Processes”. *Acta Neurobiologiae*

Experimentalis 60(3):419–24.

79. Kaczmarek, L., i E. Nikolajew. 1990. „C-Fos Protooncogene Expression and Neuronal Plasticity”. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 50(4–5):173–79.
80. Kelley, Ann E., Brian A. Baldo, i Wayne E. Pratt. 2005. „A Proposed Hypothalamic–Thalamic–Striatal Axis for the Integration of Energy Balance, Arousal, and Food Reward”. *Journal of Comparative Neurology* 493(1):72–85.
doi:10.1002/cne.20769.
81. Kim, Tony Hyun, Yanping Zhang, Jérôme Lecoq, Juergen C. Jung, Jane Li, Hongkui Zeng, Cristopher M. Niell, i Mark J. Schnitzer. 2016. „Long-Term Optical Access to an Estimated One Million Neurons in the Live Mouse Cortex”. *Cell Reports* 17(12):3385–94. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.004.
82. Kirst, Christoph, Sophie Skriabine, Alba Vieites-Prado, Thomas Topilko, Paul Bertin, Gaspard Gerschenfeld, Florine Verny, Piotr Topilko, Nicolas Michalski, Marc Tessier-Lavigne, i Nicolas Renier. 2020. „Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature”. *Cell* 180(4):780–795.e25.
doi:10.1016/j.cell.2020.01.028.
83. Kivisaari, Sasa L., Lorraine K. Tyler, Andreas U. Monsch, i Kirsten I. Taylor. 2012. „Medial Perirhinal Cortex Disambiguates Confusable Objects”. *Brain: A Journal of Neurology* 135(Pt 12):3757–69. doi:10.1093/brain/aws277.
84. Klein, Bettina, Verena Bautze, Anna-Maria Maier, Jan Deussing, Heinz Breer, i Jörg Strotmann. 2015. „Activation of the Mouse Odorant Receptor 37 Subsystem Coincides with a Reduction of Novel Environment-Induced Activity within the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus”. *European Journal of Neuroscience* 41(6):793–801. doi:10.1111/ejn.12838.
85. Knierim, James J., Joshua P. Neunuebel, i Sachin S. Deshmukh. 2014. „Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local–global reference frames”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1635):20130369. doi:10.1098/rstb.2013.0369.
86. Knierim, JJ, HS Kudrimoti, i BL McNaughton. 1995. „Place cells, head direction cells, and the learning of landmark stability”. *The Journal of Neuroscience* 15(3):1648–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-03-01648.1995.
87. Kobayashi, Y., i D. G. Amaral. 2000. „Macaque monkey retrosplenial cortex: I. Three-dimensional and cytoarchitectonic organization”. *Journal of Comparative Neurology* 426(3):339–65.
doi:10.1002/1096-9861(20001023)426:3<339::AID-CNE1>3.0.CO;2-8.
88. Kondo, Hideki, i Laszlo Zaborszky. 2025. „Basal Forebrain Projections to the Retrosplenial and Cingulate Cortex in Rats”. *The Journal of Comparative Neurology* 533(2):e70027. doi:10.1002/cne.70027.
89. Konorski, J. 1967. *Integrative activity of the brain*. Integrative activity of the brain. University of Chicago Press: Chicago.
90. Kropff, Emilio, James E. Carmichael, May-Britt Moser, i Edvard I. Moser. 2015.

- „Speed Cells in the Medial Entorhinal Cortex”. *Nature* 523(7561):419–24. doi:10.1038/nature14622.
91. Kubie, John L., Elliott R. J. Levy, i André A. Fenton. 2020. „Is hippocampal remapping the physiological basis for context?” *Hippocampus* 30(8):851–64. doi:10.1002/hipo.23160.
 92. Kumar, Vinod Jangir, Klaus Scheffler, i Wolfgang Grodd. 2023. „The structural connectivity mapping of the intralaminar thalamic nuclei”. *Scientific Reports* 13:11938. doi:10.1038/s41598-023-38967-0.
 93. Lanahan, Anthony, i Paul Worley. 1998. „Immediate-Early Genes and Synaptic Function”. *Neurobiology of Learning and Memory* 70(1):37–43. doi:10.1006/nlme.1998.3836.
 94. Lande, Andreas Sigstad, Anna Christina Garvert, Nora Cecilie Ebbesen, Sondre Valentin Jordbræk, i Koen Vervaeke. 2023. „Representations of Tactile Object Location in the Retrosplenial Cortex”. *Current Biology: CB* 33(21):4599–4610.e7. doi:10.1016/j.cub.2023.09.019.
 95. Lashley, K. S., i D. A. McCarthy. 1926. „The survival of the maze habit after cerebellar injuries”. *Journal of Comparative Psychology* 6(6):423–33. doi:10.1037/h0073391.
 96. Lee, Jiseok, Joanna Urban-Ciecko, Eunsol Park, Mo Zhu, Stephanie E. Myal, David J. Margolis, i Alison L. Barth. 2021. „FosGFP Expression Does Not Capture a Sensory Learning-Related Engram in Superficial Layers of Mouse Barrel Cortex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(52):e2112212118. doi:10.1073/pnas.2112212118.
 97. Lee, Su-Min, Seung-Woo Jin, Seong-Beom Park, Eun-Hye Park, Choong-Hee Lee, Hyun-Woo Lee, Heung-Yeol Lim, Seung-Woo Yoo, Jae Rong Ahn, Jhoseph Shin, Sang Ah Lee, i Inah Lee. 2021. „Goal-directed interaction of stimulus and task demand in the parahippocampal region”. *Hippocampus* 31(7):717–36. doi:10.1002/hipo.23295.
 98. Legendre, Pierre, i Louis Legendre. 2012. „Chapter 7 - Ecological resemblance”. S. 265–335 w *Developments in Environmental Modelling*. T. 24, *Numerical Ecology*, zredagowane przez P. Legendre i L. Legendre. Elsevier.
 99. Leutgeb, Jill K., Stefan Leutgeb, Alessandro Treves, Retsina Meyer, Carol A. Barnes, Bruce L. McNaughton, May-Britt Moser, i Edvard I. Moser. 2005. „Progressive Transformation of Hippocampal Neuronal Representations in “Morphed” Environments”. *Neuron* 48(2):345–58. doi:10.1016/j.neuron.2005.09.007.
 100. Leutgeb, Stefan, Jill K. Leutgeb, Carol A. Barnes, Edvard I. Moser, Bruce L. McNaughton, i May-Britt Moser. 2005. „Independent Codes for Spatial and Episodic Memory in Hippocampal Neuronal Ensembles”. *Science* 309(5734):619–23. doi:10.1126/science.1114037.
 101. Levy, Dana Rubi, Nigel Hunter, Sherry Lin, Emma Marie Robinson, Winthrop Gillis, Eli Benjamin Conlin, Rockwell Anyoha, Rebecca M. Shansky, i Sandeep Robert Datta. 2023. „Mouse Spontaneous Behavior Reflects Individual Variation

Rather than Estrous State”. *Current Biology: CB* 33(7):1358-1364.e4.
doi:10.1016/j.cub.2023.02.035.

102. Li, Panlong, Han Shan, Shengxiang Liang, Binbin Nie, Shaofeng Duan, Qi Huang, Tianhao Zhang, Xi Sun, Ting Feng, Lin Ma, Baoci Shan, Demin Li, i Hua Liu. 2018. „Structural and functional brain network of human retrosplenial cortex”. *Neuroscience Letters* 674:24–29. doi:10.1016/j.neulet.2018.03.016.
103. Liang, K., i SCOTT L. Zeger. 1986. „Longitudinal data analysis using generalized linear models”. *Biometrika* 73(1):13–22. doi:10.1093/biomet/73.1.13.
104. Liu, Hou, i Ti-Fei Yuan. 2016. „Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific”. *Scientific Reports* 6(1):39788. doi:10.1038/srep39788.
105. Liu, Zheng, i Barry J. Richmond. 2000. „Response Differences in Monkey TE and Perirhinal Cortex: Stimulus Association Related to Reward Schedules”. *Journal of Neurophysiology* 83(3):1677–92. doi:10.1152/jn.2000.83.3.1677.
106. Lopes, Gonçalo, Niccolò Bonacchi, João Frazão, Joana P. Neto, Bassam V. Atallah, Sofia Soares, Luís Moreira, Sara Matias, Pavel M. Itskov, Patrícia A. Correia, Roberto E. Medina, Lorenza Calcaterra, Elena Dreosti, Joseph J. Paton, i Adam R. Kampff. 2015. „Bonsai: an event-based framework for processing and controlling data streams”. *Frontiers in Neuroinformatics* 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fninf.2015.00007>.
107. Lozano, Yave Roberto, Hector Page, Pierre-Yves Jacob, Eleonora Lomi, James Street, i Kate Jeffery. 2017. „Retrosplenial and postsubicular head direction cells compared during visual landmark discrimination”. *Brain and Neuroscience Advances* 1:2398212817721859. doi:10.1177/2398212817721859.
108. Łukasiewicz, Kacper, Magdalena Robacha, Łukasz Bożycki, Kasia Radwanska, i Rafał Czajkowski. 2016. „Simultaneous Two-Photon in Vivo Imaging of Synaptic Inputs and Postsynaptic Targets in the Mouse Retrosplenial Cortex”. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (109). doi:10.3791/53528.
109. Mack, Kenneth J., i Pat A. Mack. 1992. „Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation”. *Molecular Brain Research* 12(1):141–47. doi:10.1016/0169-328X(92)90077-O.
110. Mancl, Lloyd A., i Timothy A. DeRouen. 2001. „A Covariance Estimator for GEE with Improved Small-Sample Properties”. *Biometrics* 57(1):126–34. doi:10.1111/j.0006-341X.2001.00126.x.
111. Marr, D. 1971. „Simple Memory: A Theory for Archicortex”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 262(841):23–81. doi:10.1098/rstb.1971.0078.
112. McClelland, J. L., B. L. McNaughton, i R. C. O'Reilly. 1995. „WHY THERE ARE COMPLEMENTARY LEARNING-SYSTEMS IN THE HIPPOCAMPUS AND NEOCORTEX - INSIGHTS FROM THE SUCCESSES AND FAILURES OF CONNECTIONIST MODELS OF LEARNING AND MEMORY”. *Psychological Review* 102(3):419–57.

113. McNaughton, Bruce L., Francesco P. Battaglia, Ole Jensen, Edvard I. Moser, i May-Britt Moser. 2006. „Path Integration and the Neural Basis of the «Cognitive Map»”. *Nature Reviews Neuroscience* 7(8):663–78. doi:10.1038/nrn1932.
114. McReynolds, Jayme R., John P. Christianson, Jordan M. Blacktop, i John R. Mantsch. 2018. „What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders”. *Neurobiology of Stress* 9:271–85. doi:10.1016/j.ynstr.2018.05.004.
115. Merritt, Jennifer R., i Justin S. Rhodes. 2015. „Mouse Genetic Differences in Voluntary Wheel Running, Adult Hippocampal Neurogenesis and Learning on the Multi-Strain-Adapted plus Water Maze”. *Behavioural Brain Research* 280:62–71. doi:10.1016/j.bbr.2014.11.030.
116. Milczarek, M. M., i S. D. Vann. 2020. „The retrosplenial cortex and long-term spatial memory: from the cell to the network”. *Curr Opin Behav Sci* 32:50–56.
117. Milczarek, Michal M., Seralynne D. Vann, i Frank Sengpiel. 2018. „Spatial Memory Engram in the Mouse Retrosplenial Cortex”. *Current Biology: CB* 28(12):1975–1980.e6. doi:10.1016/j.cub.2018.05.002.
118. Milford, Michael, Gordon Wyeth, i David Prasser. 2006. „RatSLAM on the Edge: Revealing a Coherent Representation from an Overloaded Rat Brain”. S. 4060–65 w 2006 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems.
119. Mitchell, Anna S., Rafal Czajkowski, Ningyu Zhang, Kate Jeffery, i Andrew J. D. Nelson. 2018. „Retrosplenial Cortex and Its Role in Spatial Cognition”. *Brain and Neuroscience Advances* 2:2398212818757098. doi:10.1177/2398212818757098.
120. Mittelstaedt, M. L., i H. Mittelstaedt. 1980. „Homing by Path Integration in a Mammal”. *Naturwissenschaften* 67(11):566–67. doi:10.1007/BF00450672.
121. Miyashita, Yasushi. 2019. „Perirhinal Circuits for Memory Processing”. *Nature Reviews Neuroscience* 20(10):577–92. doi:10.1038/s41583-019-0213-6.
122. Morgan, J. I., D. R. Cohen, J. L. Hempstead, i T. Curran. 1987. „Mapping Patterns of C-Fos Expression in the Central Nervous System after Seizure”. *Science (New York, N.Y.)* 237(4811):192–97. doi:10.1126/science.3037702.
123. Morgan, J. I., i T. Curran. 1991. „Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes Fos and Jun”. *Annual Review of Neuroscience* 14:421–51. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002225.
124. Morris, R. G. 2001. „Episodic-like Memory in Animals: Psychological Criteria, Neural Mechanisms and the Value of Episodic-like Tasks to Investigate Animal Models of Neurodegenerative Disease”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 356(1413):1453–65. doi:10.1098/rstb.2001.0945.
125. Morris, R. G. M. 2006. „Elements of a Neurobiological Theory of Hippocampal Function: The Role of Synaptic Plasticity, Synaptic Tagging and Schemas”. *The European Journal of Neuroscience* 23(11):2829–46. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04888.x.

126. Moscovitch, Morris, Roberto Cabeza, Gordon Winocur, i Lynn Nadel. 2016. „Episodic Memory and Beyond: The Hippocampus and Neocortex in Transformation”. *Annual review of psychology* 67:105–34. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143733.
127. Moser, Edvard I., Emilio Kropff, i May-Britt Moser. 2008. „Place Cells, Grid Cells, and the Brain’s Spatial Representation System”. *Annual Review of Neuroscience* 31:69–89. doi:10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723.
128. Muenzinger, K. F. 1938. „Vicarious trial and error at a point of choice: I. A general survey of its relation to learning efficiency”. *The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology* 53:75–86. doi:10.1080/08856559.1938.10533799.
129. Mundlak, Yair. 1978. „On the Pooling of Time Series and Cross Section Data”. *Econometrica* 46(1):69–85. doi:10.2307/1913646.
130. Murakami, T., T. Yoshida, T. Matsui, i K. Ohki. 2015. „Wide-field Ca²⁺ imaging reveals visually evoked activity in the retrosplenial area”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8(June). doi:10.3389/fnmol.2015.00020.
131. Nadel, L., i M. Moscovitch. 1997. „Memory Consolidation, Retrograde Amnesia and the Hippocampal Complex”. *Current Opinion in Neurobiology* 7(2):217–27. doi:10.1016/s0959-4388(97)80010-4.
132. Naranjo, J. R., B. Mellström, M. Achaval, J. J. Lucas, J. Del Rio, i P. Sassone-Corsi. 1991. „Co-Induction of Jun B and c-Fos in a Subset of Neurons in the Spinal Cord”. *Oncogene* 6(2):223–27.
133. Nishio, Nana, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Manabu Abe, Junichi Nakai, Meiko Kawamura, Atsushi Aiba, Kenji Sakimura, i Katsuei Shibuki. 2018. „Higher Visual Responses in the Temporal Cortex of Mice”. *Scientific Reports* 8(1):11136. doi:10.1038/s41598-018-29530-3.
134. Nonaka, Mio, Richard Fitzpatrick, Jennifer Lapira, Damian Wheeler, Patrick A. Spooner, Marta Corcoles-Parada, Mónica Muñoz-López, Tim Tully, Marco Peters, i Richard G. M. Morris. 2017. „Everyday Memory: Towards a Translationally Effective Method of Modelling the Encoding, Forgetting and Enhancement of Memory”. *The European Journal of Neuroscience* 46(4):1937–53. doi:10.1111/ejn.13637.
135. Oh, Seung Wook, Julie A. Harris, Lydia Ng, Brent Winslow, Nicholas Cain, Stefan Mihalas, Quanxin Wang, Chris Lau, Leonard Kuan, Alex M. Henry, Marty T. Mortrud, Benjamin Ouellette, Thuc Nghi Nguyen, Staci A. Sorensen, Clifford R. Slaughterbeck, Wayne Wakeman, Yang Li, David Feng, Anh Ho, Eric Nicholas, Karla E. Hirokawa, Phillip Bohn, Kevin M. Joines, Hanchuan Peng, Michael J. Hawrylycz, John W. Phillips, John G. Hohmann, Paul Wohnoutka, Charles R. Gerfen, Christof Koch, Amy Bernard, Chinh Dang, Allan R. Jones, i Hongkui Zeng. 2014. „A mesoscale connectome of the mouse brain”. *Nature* 508(7495):207–14. doi:10.1038/nature13186.
136. O’Keefe, J. 1999. „Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information?” *Hippocampus* 9(4):352–64. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:4<352::AID-HIPO3>3.0.CO;2-1.

137. O'Keefe, J., i D. H. Conway. 1978. „Hippocampal Place Units in the Freely Moving Rat: Why They Fire Where They Fire”. *Experimental Brain Research* 31(4):573–90. doi:10.1007/BF00239813.
138. O'Keefe, J., i J. Dostrovsky. 1971. „The Hippocampus as a Spatial Map. Preliminary Evidence from Unit Activity in the Freely-Moving Rat”. *Brain Research* 34(1):171–75. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1.
139. O'Keefe, J., i L. Nadel. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford, UK: Oxford University Press.
140. Omer, David B., Shir R. Maimon, Liora Las, i Nachum Ulanovsky. 2018. „Social place-cells in the bat hippocampus”. *Science* 359(6372):218–24. doi:10.1126/science.aao3474.
141. Peyrache, Adrien, Adrian J. Duszkiwicz, Guillaume Viejo, i Sandybel Angeles-Duran. 2019. „Thalamocortical processing of the head-direction sense”. *Progress in Neurobiology* 183:101693. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101693.
142. Poll, Stefanie, Manuel Mittag, Fabrizio Musacchio, Lena C. Justus, Eleonora Ambrad Giovannetti, Julia Steffen, Jens Wagner, Lioba Zohren, Susanne Schoch, Boris Schmidt, Walker S. Jackson, Dan Ehninger, i Martin Fuhrmann. 2020. „Memory Trace Interference Impairs Recall in a Mouse Model of Alzheimer's Disease”. *Nature Neuroscience* 23(8):952–58. doi:10.1038/s41593-020-0652-4.
143. Raichle, Marcus E. 2015. „The Brain's Default Mode Network”. *Annual Review of Neuroscience* 38(Volume 38, 2015):433–47. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014030.
144. Ranck, J. B. 1985. „Head direction cells in the deep cell layer of dorsolateral pre-subiculum in freely moving rats”. *Electrical Activity of the Archicortex*. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543025164843648>.
145. Reep, R. L., J. V. Corwin, A. Hashimoto, i R. T. Watson. 1987. „Efferent connections of the rostral portion of medial agranular cortex in rats”. *Brain Res Bull* 19(2):203–21.
146. Renier, Nicolas, Eliza L. Adams, Christoph Kirst, Zhuhao Wu, Ricardo Azevedo, Johannes Kohl, Anita E. Autry, Lolahon Kadiri, Kannan Umadevi Venkataraju, Yu Zhou, Victoria X. Wang, Cheuk Y. Tang, Olav Olsen, Catherine Dulac, Pavel Osten, i Marc Tessier-Lavigne. 2016. „Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes”. *Cell* 165(7):1789–1802. doi:10.1016/j.cell.2016.05.007.
147. Renier, Nicolas, Zhuhao Wu, David J. Simon, Jing Yang, Pablo Ariel, i Marc Tessier-Lavigne. 2014. „iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging”. *Cell* 159(4):896–910. doi:10.1016/j.cell.2014.10.010.
148. Restle, Frank. 1957. „Discrimination of cues in mazes: A resolution of the «place-vs.-response» question”. *Psychological Review* 64(4):217–28. doi:10.1037/h0040678.

149. Robson, Emma, Margaret M. Donahue, Alexandra J. Mably, Peyton G. Demetrovich, Lauren T. Hewitt, i Laura Lee Colgin. 2024. „Social odors drive hippocampal CA2 place cell responses to social stimuli”. *bioRxiv* 2024.07.16.603738. doi:10.1101/2024.07.16.603738.
150. Roome, Christopher J., i Bernd Kuhn. 2014. „Chronic Cranial Window with Access Port for Repeated Cellular Manipulations, Drug Application, and Electrophysiology”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00379.
151. Rothacher, Yannick, Anh Nguyen, Bigna Lenggenhager, Andreas Kunz, i Peter Brugger. 2020. „Walking through Virtual Mazes: Spontaneous Alternation Behaviour in Human Adults”. *Cortex; a Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior* 127:1–16. doi:10.1016/j.cortex.2020.01.018.
152. Rule, Michael E., Adrianna R. Loback, Dhruva V. Raman, Laura N. Driscoll, Christopher D. Harvey, i Timothy O’Leary. 2020. „Stable task information from an unstable neural population”. *eLife* 9:e51121. doi:10.7554/eLife.51121.
153. Sargolini, Francesca, Marianne Fyhn, Torkel Hafting, Bruce L. McNaughton, Menno P. Witter, May-Britt Moser, i Edvard I. Moser. 2006. „Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex”. *Science (New York, N.Y.)* 312(5774):758–62. doi:10.1126/science.1125572.
154. Sato, Nobuya. 2021. „Episodic-like Memory of Rats as Retrospective Retrieval of Incidentally Encoded Locations and Involvement of the Retrosplenial Cortex”. *Scientific Reports* 11(1):2217. doi:10.1038/s41598-021-81943-9.
155. Scoville, W. B., i B. Milner. 1957. „Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions”. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20(1):11–21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11.
156. Semon, R. W. b.d. *The Mneme*. Рипол Классик.
157. Sharp, Patricia E., Hugh T. Blair, i Jeiwon Cho. 2001. „The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal”. *Trends in Neurosciences* 24(5):289–94. doi:10.1016/S0166-2236(00)01797-5.
158. Shibata, H. 1998. „Organization of Projections of Rat Retrosplenial Cortex to the Anterior Thalamic Nuclei”. *The European Journal of Neuroscience* 10(10):3210–19. doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00328.x.
159. Shirdhankar, Runita N., i E. Pascal Malkemper. 2024. „Cognitive Maps and the Magnetic Sense in Vertebrates”. *Current Opinion in Neurobiology* 86:102880. doi:10.1016/j.conb.2024.102880.
160. Sit, Kevin K., i Michael J. Goard. 2023. „Coregistration of Heading to Visual Cues in Retrosplenial Cortex”. *Nature Communications* 14(1):1992. doi:10.1038/s41467-023-37704-5.
161. Skaggs, W. E., J. J. Knierim, H. S. Kudrimoti, i B. L. McNaughton. 1995. „A Model of the Neural Basis of the Rat’s Sense of Direction”. *Advances in Neural Information Processing Systems* 7:173–80.

162. Skinner, B. F. 1934. „A Discrimination without Previous Conditioning”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 20(9):532–36. doi:10.1073/pnas.20.9.532.
163. Small, Willard S. 1901. „Experimental Study of the Mental Processes of the Rat. II”. *The American Journal of Psychology* 12(2):206–39. doi:10.2307/1412534.
164. Song, Pengcheng, i Xiao-Jing Wang. 2005. „Angular Path Integration by Moving “Hill of Activity”: A Spiking Neuron Model without Recurrent Excitation of the Head-Direction System”. *Journal of Neuroscience* 25(4):1002–14. doi:10.1523/JNEUROSCI.4172-04.2005.
165. Sugar, Jorgen, Menno Witter, Niels van Strien, i Natalie Cappaert. 2011. „The Retrosplenial Cortex: Intrinsic Connectivity and Connections with the (Para)Hippocampal Region in the Rat. An Interactive Connectome”. *Frontiers in Neuroinformatics* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fninf.2011.00007>.
166. Sulpizio, Valentina, Giorgia Committeri, Simon Lambrey, Alain Berthoz, i Gaspare Galati. 2013. „Selective role of lingual/parahippocampal gyrus and retrosplenial complex in spatial memory across viewpoint changes relative to the environmental reference frame”. *Behavioural Brain Research* 242:62–75. doi:10.1016/j.bbr.2012.12.031.
167. Sun, Weilun, Ilseob Choi, Stoyan Stoyanov, Oleg Senkov, Evgeni Ponimaskin, York Winter, Janelle M. P. Pakan, i Alexander Dityatev. 2021. „Context value updating and multidimensional neuronal encoding in the retrosplenial cortex”. *Nature Communications* 12:6045. doi:10.1038/s41467-021-26301-z.
168. Taube, J. S. 1998. „Head Direction Cells and the Neurophysiological Basis for a Sense of Direction”. *Progress in Neurobiology* 55(3):225–56. doi:10.1016/s0301-0082(98)00004-5.
169. Taube, J. S., R. U. Muller, i J. B. Ranck. 1990. „Head-Direction Cells Recorded from the Postsubiculum in Freely Moving Rats. I. Description and Quantitative Analysis”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10(2):420–35. doi:10.1523/JNEUROSCI.10-02-00420.1990.
170. Thomas, Alyse, Weiguo Yang, Catherine Wang, Sri Laasya Tipparaju, Guang Chen, Brennan Sullivan, Kylie Swiekatowski, Mahima Tatam, Charles Gerfen, i Nuo Li. 2023. „Superior Colliculus Bidirectionally Modulates Choice Activity in Frontal Cortex”. *Nature Communications* 14(1):7358. doi:10.1038/s41467-023-43252-9.
171. Tolman, E. C. 1925. „Purpose and cognition: the determiners of animal learning”. *Psychological Review* 32:285–97. doi:10.1037/h0072784.
172. Tolman, E. C., i C. H. Honzik. 1930. „Introduction and removal of reward, and maze performance in rats”. *University of California Publications in Psychology* 4:257–75.
173. Tolman, E. C., B. F. Ritchie, i D. Kalish. 1946. „Studies in spatial learning. I. Orientation and the short-cut”. *Journal of Experimental Psychology* 36(1):13–24. doi:10.1037/h0053944.

174. Tolman, Edward C. 1948. „Cognitive maps in rats and men”. *Psychological Review* 55(4):189–208. doi:10.1037/h0061626.
175. Tonegawa, Susumu, Xu Liu, Steve Ramirez, i Roger Redondo. 2015. „Memory Engram Cells Have Come of Age”. *Neuron* 87(5):918–31. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.002.
176. Tsao, A., M. B. Moser, i E. I. Moser. 2013. „Traces of experience in the lateral entorhinal cortex”. *Current Biology* 23(5):399–405. doi:10.1016/j.cub.2013.01.036.
177. Tse, Dorothy, Tomonori Takeuchi, Masaki Takekuma, Yasushi Kajii, Hiroyuki Okuno, Chiharu Tohyama, Haruhiko Bito, i Richard G. M. Morris. 2011. „Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex”. *Science (New York, N.Y.)* 333(6044):891–95. doi:10.1126/science.1205274.
178. Tsuneoka, Yousuke, i Hiromasa Funato. 2021. „Cellular Composition of the Preoptic Area Regulating Sleep, Parental, and Sexual Behavior”. *Frontiers in Neuroscience* 15. doi:10.3389/fnins.2021.649159.
179. Tulving, Endel, i Wayne Donaldson. 1972. *Organization of memory*. Organization of memory. Oxford, England: Academic Press.
180. Vann, Seralynne D., John P. Aggleton, i Eleanor A. Maguire. 2009. „What Does the Retrosplenial Cortex Do?” *Nature Reviews Neuroscience* 10(11):792–802. doi:10.1038/nrn2733.
181. Vann, Seralynne D., L. A. Kristina Wilton, Janice L. Muir, i John P. Aggleton. 2003. „Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats”. *Behavioural Brain Research* 140(1):107–18. doi:10.1016/S0166-4328(02)00274-7.
182. Vedder, Lindsey C., Adam M. P. Miller, Marc B. Harrison, i David M. Smith. 2017. „Retrosplenial Cortical Neurons Encode Navigational Cues, Trajectories and Reward Locations During Goal Directed Navigation”. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 27(7):3713–23. doi:10.1093/cercor/bhw192.
183. Vertes, Robert P., i Walter B. Hoover. 2008. „Projections of the Paraventricular and Paratenial Nuclei of the Dorsal Midline Thalamus in the Rat”. *The Journal of Comparative Neurology* 508(2):212–37. doi:10.1002/cne.21679.
184. Vesuna, Sam, Isaac V. Kauvar, Ethan Richman, Felicity Gore, Tomiko Oskotsky, Clara Sava-Segal, Liqun Luo, Robert C. Malenka, Jaimie M. Henderson, Paul Nuyujukian, Josef Parvizi, i Karl Deisseroth. 2020. „Deep Posteromedial Cortical Rhythm in Dissociation”. *Nature* 586(7827):87–94. doi:10.1038/s41586-020-2731-9.
185. Vincis, Roberto, Ke Chen, Lindsey Czarnecki, John Chen, i Alfredo Fontanini. 2020. „Dynamic Representation of Taste-Related Decisions in the Gustatory Insular Cortex of Mice”. *Current Biology* 30(10):1834–1844.e5. doi:10.1016/j.cub.2020.03.012.
186. Vogt, Brent A., i George Paxinos. 2014. „Cytoarchitecture of Mouse and Rat Cingulate Cortex with Human Homologies”. *Brain Structure & Function* 219(1):185–92. doi:10.1007/s00429-012-0493-3.

187. Watson, John B. 1919. *Psychology from the standpoint of a behaviorist*. Psychology from the standpoint of a behaviorist. Philadelphia, PA, US: J B Lippincott Company.
188. Wehner, Rüdiger, i Mandyam V. Srinivasan. 1981. „Searching Behaviour of Desert Ants, genus *Cataglyphis* (Formicidae, Hymenoptera)”. *Journal of Comparative Physiology* 142(3):315–38. doi:10.1007/BF00605445.
189. Whitaker, Leslie R., Brandon L. Warren, Marco Venniro, Tyler C. Harte, Kylie B. McPherson, Jennifer Beidel, Jennifer M. Bossert, Yavin Shaham, Antonello Bonci, i Bruce T. Hope. 2017. „Bidirectional Modulation of Intrinsic Excitability in Rat Prelimbic Cortex Neuronal Ensembles and Non-Ensembles after Operant Learning”. *The Journal of Neuroscience* 37(36):8845–56. doi:10.1523/JNEUROSCI.3761-16.2017.
190. Wiener, Jan, Sara Shettleworth, Verner P. Bingman, Ken Cheng, Susan Healy, Lucia F. Jacobs, Kathryn J. Jeffery, Hanspeter A. Mallot, Randolph Menzel, i Nora S. Newcombe. 2011. „Animal Navigation: A Synthesis”. doi:10.7551/mitpress/9187.003.0008.
191. Wiltgen, Brian J., Robert A. M. Brown, Lynn E. Talton, i Alcino J. Silva. 2004. „New Circuits for Old Memories: The Role of the Neocortex in Consolidation”. *Neuron* 44(1):101–8. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.015.
192. Wittlinger, Matthias, Rüdiger Wehner, i Harald Wolf. 2006. „The Ant Odometer: Stepping on Stilts and Stumps”. *Science* 312(5782):1965–67. doi:10.1126/science.1126912.
193. Yap, Ee-Lynn, i Michael E. Greenberg. 2018. „Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior”. *Neuron* 100(2):330–48. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.013.
194. Yassin, L., B. L. Benedetti, J. S. Jouhanneau, J. Wen, J. F. A. Poulet, i A. L. Barth. 2010. „An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex”. *Neuron* 68(6):1043–50. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.029.
195. Yerkes, Robert M. 1912. „Habit and Its Relations to the Nervous System in the Earthworm”. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 10(1):16–18. doi:10.3181/00379727-10-11.
196. Zhang, K. 1996. „Representation of Spatial Orientation by the Intrinsic Dynamics of the Head-Direction Cell Ensemble: A Theory”. *Journal of Neuroscience* 16(6):2112–26. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-06-02112.1996.
197. Zieliński, Kazimierz. 2006. „Jerzy Konorski on Brain Associations”. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 66(1):75–90. doi:10.55782/ane-2006-1589.

SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH

Hamed, A., Kursa, M. B., Mrozek, W., Piwoński, K. P., Falińska, M., Danielewski, K., Rejmak, E., **Włodkowska, U.**, Kubik, S., & Czajkowski, R. (2025). Spatio-temporal mechanisms of consolidation, recall and reconsolidation in reward-related memory trace. *Molecular Psychiatry*, 30(4), 1319–1328. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02738-8>

Balcerek, E., **Włodkowska, U.**, & Czajkowski, R. (2024). FOS mapping reveals two complementary circuits for spatial navigation in mouse. *Scientific Reports*, 14(1), 21252. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72272-8>

Bijoch, Ł., **Włodkowska, U.**, Kasztelanic, R., Pawłowska, M., Pysz, D., Kaczmarek, L., Lapkiewicz, R., Buczyński, R., & Czajkowski, R. (2023). Novel Design and Application of High-NA Fiber Imaging Bundles for In Vivo Brain Imaging with Two-Photon Scanning Fluorescence Microscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(10), 12831–12841. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c22985> (Współautor z równym wkładem jako pierwszy autor)

Balcerek, E., **Włodkowska, U.**, & 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> (Współautor z równym wkładem jako pierwszy autor)