



**INSTYTUT FARMAKOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

mgr Przemysław Eligiusz Cieślak

*ADAPTACYJNE PODEJMOWANIE DECYZJI U ZWIERZĄT
Z KOMÓRKOWO SPECYFICZNĄ INAKTYWACJĄ
RECEPTORÓW GLUTAMINIANU W UKŁADZIE
DOPAMINOWYM I NORADRENERGICZNYM*

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

PROMOTOR:
dr hab. Jan Rodriguez Parkitna

Kraków, 2018

Pragnę serdecznie podziękować

Jankowi za możliwość prowadzenia badań pod jego opieką i za owocną współpracę, którą mam nadzieję będziemy mogli kontynuować.

Kolegom i koleżankom z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej za spędzone razem lata, w tym Kamili i Magdzie za współdzielenie losu doktoranta; Łukaszowi, Marysi i Oli za pomoc w genotypowaniu zwierząt; Uli i Łucjom za pomoc w doświadczeniach; Lidce za nieocenione, a często niedoceniane wsparcie administracyjne.

Marii, Nereii i Tomkowi za pracę nad projektem noradrenergicznym. Rafałowi i Youngowi za pracę nad projektem dopaminowym. Kolegom i koleżankom z Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu w Linköping, Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie za realizację wspólnych projektów.

Nii, Joshowi, Ericowi i Laurze za to czego mogłem się od nich nauczyć podczas pobytu naukowego na Wydziale Psychiatrii Szkoły Medycznej Uniwersytetu Yale.

Marcie, Ignasiowi i Dobrusi za zaufanie i niekończącą się (mam nadzieję) cierpliwość. Rodzicom za bezwarunkową miłość i wsparcie.

Narodowemu Centrum Nauki oraz Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za udzielone wsparcie finansowe w postaci grantu PRELUDIUM (2014/15/N/NZ4/00761), stypendium ETIUDA (2016/20/T/NZ4/00503) i stypendium z dotacji KNOW.

Spis treści

Wprowadzenie	1
1. Rola układu dopaminowego w uczeniu się ze wzmocnieniem i motywacji do poszukiwania nagród	2
<i>Anatomia układu dopaminowego śródmózgowia</i>	2
<i>Uczenie się ze wzmocnieniem</i>	4
<i>Motywacja do poszukiwania nagród</i>	7
2. Rola układu noradrenergicznego w percepcyjnym podejmowaniu decyzji i adaptacji do zmieniających się wymagań otoczenia	9
<i>Anatomia ośrodkowego układu noradrenergicznego</i>	9
<i>Percepcyjne podejmowanie decyzji</i>	11
<i>Adaptacja do nieoczekiwanych zmian w otoczeniu</i>	12
3. Zależna od glutaminianu regulacja aktywności neuronów katecholaminergicznych i plastyczności neuronów dopaminoceptywnych prążkowie	15
<i>Aktywność neuronów dopaminergicznych śródmózgowia</i>	15
<i>Plastyczność neuronów dopaminoceptywnych prążkowie</i>	16
<i>Aktywność neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego</i>	17
Cel badań	19
Materiały i metody	21
1. Zwierzęta	21
<i>Myszy z inaktywacją receptorów NMDA</i>	22
<i>Myszy z inaktywacją receptorów mGluR5</i>	22

2. Procedury behawioralne	24
<i>Deprywacja</i>	24
<i>Klatki Skinnera</i>	24
<i>Test uczenia się z losowym wzmocnieniem</i>	24
<i>Test dyskontowania prawdopodobieństwa</i>	26
<i>Test uczenia się wartości predykcyjnej bodźców</i>	26
<i>Test warunkowego wzmocnienia</i>	27
<i>Procedura narastającego kryterium wzmocnienia</i>	27
<i>Test detekcji sygnału</i>	27
<i>Test selektywności uwagi</i>	28
<i>Test przerzutności uwagi</i>	29
3. Metody analizy danych	31
<i>Uogólnione prawo dopasowania</i>	31
<i>Model regresji logistycznej</i>	32
<i>Detekcja sygnału</i>	33
<i>Analiza statystyczna</i>	33
Wyniki	35
1. Wpływ utraty receptorów NMDA i mGluR5 w układzie dopaminowym na uczenie się ze wzmocnieniem i motywację do poszukiwania nagród	35
<i>Eksperyment 1: Uczenie się z losowym wzmocnieniem</i>	35
<i>Eksperyment 2: Ocena wartości nagród</i>	42
<i>Eksperyment 3: Ocena wartości predykcyjnej i motywacyjnej bodźców</i>	44
<i>Eksperyment 4: Ocena kosztu uzyskania nagrody</i>	45
2. Wpływ utraty receptorów NMDA w neuronach noradrenergicznych na percepcyjne podejmowanie decyzji i adaptację do zmieniających się wymagań otoczenia	48
<i>Eksperyment 5: Detekcja sygnału</i>	48
<i>Eksperyment 6: Selektywność uwagi</i>	49
<i>Eksperyment 7: Przerzutności uwagi</i>	51
<i>Eksperyment 8: Adaptacja do zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody</i>	53

Dyskusja	58
<i>Uczenie się ze wzmocnieniem</i>	58
<i>Ocena wartości nagród</i>	60
<i>Przypisanie wartości motywacyjnej bodźcom</i>	61
<i>Inicjacja działania i wydatkowanie wysiłku</i>	62
<i>Percepcyjne podejmowanie decyzji</i>	63
<i>Adaptacja do nieoczekiwanych zmian w otoczeniu</i>	63
<i>Podsumowanie i wnioski</i>	65
Streszczenie	66
Abstract	68
Literatura	70
Spis tabel	85
Spis rycin	86
Wykaz skrótów	87
Tabela statystyczna	88

Wprowadzenie

Kluczowym aspektem adaptacyjnego podejmowania decyzji jest zdolność do wyboru działań zwiększających szansę na przetrwanie w otaczającym środowisku. Mając na uwadze dynamikę otaczającego środowiska, dokonywanie adaptacyjnych wyborów nie jest jednak zadaniem łatwym. Wybór najkorzystniejszego kursu działania wymaga bowiem umiejętnego oszacowania sytuacji (np.: wartości dostępnych możliwości), podjęcia szybkiej decyzji czy elastycznej zmiany kursu działania, w odpowiedzi na zmianę wymagań otoczenia. Zaburzenie mechanizmów podejmowania decyzji może prowadzić do sztywności zachowania i dokonywania nieadaptacyjnych wyborów. Dlatego też, poznanie neuronalnych mechanizmów regulujących proces podejmowania decyzji może być pomocne w lepszym zrozumieniu pewnych aspektów zaburzeń zachowania, towarzyszących chorobom psychicznym.

Celem niniejszej rozprawy jest zmiernie się z problematyką badania neuronalnych mechanizmów podejmowania decyzji. Moje zainteresowania skoncentrowane są na roli układów katecholaminowych – dopaminowego i noradrenergicznego. Aktywność neuronów dopaminergicznych śródmózgowia i neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego ma bowiem istotne znaczenie dla regulacji różnych aspektów podejmowania decyzji związanych z nakierowaniem uwagi na rozpoznanie istotnych informacji w otoczeniu, wyborem i inicjacją działania oraz elastyczną zmianą jego kierunku. W pracy tej stawiam hipotezę, że inaktywacja receptorów dla glutaminianu w neuronach układu dopaminowego i noradrenergicznego zaburza aktywność oraz plastyczność badanych układów neuronalnych, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia mechanizmów uczenia się ze wzmocnieniem i podejmowania decyzji. W dalszej części Wprowadzenia przedstawiono zarys dotychczasowego stanu wiedzy uzasadniającego tą hipotezę i stanowiącego punkt wyjścia do podjętych przeze mnie badań.

1. Rola układu dopaminowego w uczeniu się ze wzmocnieniem i motywacji do poszukiwania nagród

Anatomia układu dopaminowego śródmózgowia

Neurony dopaminergiczne to komórki wykorzystujące dopaminę jako neuroprzekaźnik, a więc posiadające zdolność syntezy oraz uwalniania dopaminy. Dlatego też, markerem biochemicznym wykorzystywanym do identyfikacji komórek dopaminergicznych jest ekspresja hydroksylazy tyrozynowej (TH), enzymu niezbędnego do syntezy dopaminy (*Björklund i Dunnett, 2007; Morales i Margolis, 2017; Witten i in., 2011*). Ze względu jednak na obecność enzymu TH w komórkach nie-dopaminowych, bardziej selektywnym znacznikiem neuronów dopaminergicznych jest ekspresja transportera dopaminy (DAT), odpowiadającego za wychwyt zwrotny neuroprzekaźnika. Ekspresja transportera DAT wyrażana jest niemal wyłącznie przez komórki dopaminergiczne śródmózgowia (*Lammel i in., 2015*). Ciała tych komórek zgrupowane są w obszarze dwóch przylegających do siebie jąder, części zbitej istoty czarnej (SNc) i polu brzusznej nakrywki (VTA), a ich lokalizacja odpowiada grupie A9 i A10, według nomenklatury *Dahlström i Fuxe (Dahlström i Fuxe, 1964)*.

Głównym celem projekcji neuronów dopaminergicznych śródmózgowia jest prążkowie (*Björklund i Dunnett, 2007; Haber, 2014; Ikemoto, 2007; Schultz, 1998*). Zakończenia neuronów dopaminergicznych istoty czarnej znajdują się w grzbietowym prążkowie, tworzonym przez jądro ogoniaste i skorupę (CPu). Z kolei zakończenia neuronów wychodzących z pola brzusznej nakrywki docierają do brzusznej prążkowie, tworzonych przez jądro półleżące (NAc). Neurony wychodzące z istoty czarnej do grzbietowego prążkowie, tworzące szlak nigrostriatalny, odgrywają kluczową rolę w wykonaniu programów ruchowych i uczeniu instrumentalnym. Natomiast neurony wychodzące z pola brzusznej nakrywki do jądra półleżącego, tworzące szlak mezolimbiczny, mają istotne znaczenie dla przetwarzania informacji o nagrodzie, regulacji motywacji i uczenia asocjacyjnego. Oprócz połączeń z prążkowie, neurony dopaminergiczne śródmózgowia tworzą połączenia z przysrodkową korą przedczołową (mPFC) i podstawno-bocznym jądrem migdałowatym (BLA), zapewniając tym samym modulację procesów poznawczych i emocji. Warto więc zaznaczyć, że neurony dopaminergiczne śródmózgowia nie stanowią jednorodnej populacji. Tworzą one

heterogeniczne podgrupy, które w zależności od rodzaju tworzonych połączeń i właściwości fizjologicznych mogą pełnić wyspecjalizowane funkcje behawioralne (*Lammel i in., 2014; Morales i Margolis, 2017; Roeper, 2013*).

Charakterystyczną cechą neuronów dopaminergicznych śródmózgowia jest występowanie dwóch trybów aktywności elektrycznej i uwalniania neuroprzekaźnika, trybu tonicznego oraz fazowego (*Paladini i Roeper, 2014; Wightman i Robinson, 2002*). Bazowa aktywność elektryczna komórek dopaminergicznych *in vivo* charakteryzuje się występowaniem pojedynczych i nieregularnych potencjałów o niskiej częstotliwości wyładowań (<10 Hz), czemu towarzyszy równie powolne uwalnianie dopaminy – ten tryb nazywany jest trybem tonicznym. Pojawienie się chwilowej (<500 ms) serii trzech lub więcej potencjałów o wysokiej częstotliwości wyładowań (>10 Hz) oraz następujący po tym przejściowy, duży wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy, określane jest mianem trybu fazowego. Głównym regulatorem aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych śródmózgowia są wejścia glutaminianergiczne i cholinergiczne z jąder nakrywki mostu, jądra konarowo-mostowego (PPT) i grzbietowo-bocznego (LDT) (*Floresco i in., 2003; Lodge i Grace, 2006; Grace i in., 2007*). Oprócz gwałtownego wzrostu, aktywność neuronów dopaminergicznych może również ulegać gwałtownemu zahamowaniu. Występowanie tego rodzaju pauz mediowane jest przez hamowanie zależne od kwasu γ -aminomasłowego (GABA). Głównym źródłem GABA są projekcje z brzusznej części gałki bladej (VP), jądra brzuszno-przyśrodkowego nakrywki (RMT) oraz lokalnych neuronów GABA-ergicznych w VTA (*Paladini i Roeper, 2014*). Zarówno fazowa aktywacja neuronów dopaminergicznych, jak i pauzy mają istotne znaczenie dla regulacji mechanizmu uczenia się ze wzmocnieniem (*Schultz, 1998; Glimcher, 2011*).

Dopamina uwalniana z zakończeń komórek śródmózgowia wiąże się do dwóch typów receptorów dopaminowych, D1 i D2. Receptory te są receptorami metabotropowymi sprzężonymi odpowiednio z białkami $G\alpha_{s/olf}$ i $G\alpha_{i/o}$ (*Neve i in., 2004*). Dzięki temu, w zależności od typu receptora obecnego po stronie postsynaptycznej, dopamina pobudza lub hamuje aktywność neuronalną. Warto zaznaczyć, że dopamina pełni rolę modulacyjną, więc efekt pobudzenia/hamowania jest pośrednią konsekwencją zmian we wrażliwości neuronu postsynaptycznego na pobudzenie. Postsynaptyczne receptory D1 mają niskie powinowactwo do dopaminy, a receptory D2 wysokie. Dlatego też uważa się, że receptory D2 aktywowane są w warunkach podstawowych, podczas tonicznej aktywacji neuronów dopaminergicznych, natomiast aktywacja receptorów D1 ma miejsce podczas fazowej

aktywacji neuronów dopaminergicznych (*Dreyer i in., 2010; Goto i in., 2007*). Przerwy w aktywności neuronów dopaminergicznych, powodują dezaktywację obu typów receptorów (*Dreyer i in., 2010*). Receptory D2 pełnią również rolę autoreceptorów, które zapewniają zwrotne hamowanie aktywności neuronów dopaminergicznych. Oba typy receptorów wyrażane są w dużej ilości w jądrach podstawnych (BG), gdzie zlokalizowane są na średnich kolczystych neuronach GABA-ergicznym (MSNs) (*Dudman i Gerfen, 2015; Gerfen i Surmeier, 2011*). Te GABA-ergiczne neurony projekcyjne, tworzą dwa główne szlaki łączące prążkowie z jądrami wyjściowymi jąder podstawnych, wewnętrzną częścią gałki bladej (GPi) i częścią siatkowatą istoty czarnej (SNr). Neurony tworzące szlak bezpośredni docierają bezpośrednio z prążkowie do jąder wyjściowych, a neurony tworzące szlak pośredni dochodzą do części zewnętrznej gałki bladej (GPe) oraz jądra niskowzgórzowego (STN) i dopiero z tych struktur wychodzą projekcje do jąder wyjściowych jąder podstawnych. Charakterystyczną cechą tych połączeń jest selektywna ekspresja receptorów D1 lub D2. Neurony tworzące szlak bezpośredni wyrażają ekspresję receptora D1, a neurony tworzące szlak pośredni receptora D2 (*Gerfen i in., 1990; Surmeier i in., 1996; Valjent i in., 2009*). Dlatego też, neurony tworzące drogę bezpośrednią nazywa się umownie „neuronami D1”, a neurony tworzące drogę pośrednią „neuronami D2”. Klasyczny pogląd na funkcję obu szlaków zakłada, że drogi te zaangażowane są odpowiednio w inicjację i hamowanie ruchu. Współcześnie uważa się również, że neurony D1 i D2 odgrywają rolę w uczeniu się ze wzmocnieniem (*Kravitz i in., 2012; Tai i in., 2012*).

Uczenie się ze wzmocnieniem

W serii eksperymentów przeprowadzonych na początku lat 90 ubiegłego wieku, Wolfram Schultz i jego współpracownicy zaobserwowali, że neurony dopaminergiczne śródmózgowia u naczelnych, odpowiadają fazową aktywacją na nieoczekiwane dostarczenie zwierzęciu słodkiego płynu lub jedzenia (przegląd tych doświadczeń został omówiony w *Schultz, 1998*). Gdy dostarczenie nagrody poprzedzone było prezentacją bodźca, który w sposób pewny przewidywał przyszłe wzmocnienie, neurony dopaminergiczne reagowały wzrostem aktywności fazowej na pojawienie się owego bodźca, ale nie samej nagrody. Natomiast, gdy przewidywana nagroda była pominięta, neurony dopaminergiczne odpowiadały zahamowaniem aktywności poniżej poziomu bazowego. Opierając się

na obserwacjach Schultza, Read Montague i Peter Dayan zasugerowali, że aktywność neuronów dopaminergicznych może kodować informację o rozbieżności pomiędzy wynikiem oczekiwanym a wynikiem uzyskanym, tj. błędzie przewidywania nagrody (*Montague i in., 1996; Schultz i in., 1997*). Ów błąd sygnalizowany przez neurony dopaminergiczne umożliwia aktualizację posiadanej wiedzy na temat wartości działań prowadzących do uzyskania wzmocnienia i oczekiwanej przyszłej konsekwencji owych działań. Późniejsze badania wykazały również, że aktywność neuronów dopaminergicznych modulowana jest przez prawdopodobieństwo i wielkość nagrody (*Fiorillo i in., 2003; Tobler i in., 2005*). Obserwacje te stanowiły podstawę do przypuszczenia, że neurony dopaminergiczne kodują informacje o ryzyku i oczekiwanej wartości nagród – zmiennych ekonomicznych istotnych dla procesu podejmowania decyzji opartych o wartość.

Dowodem na bezpośredni związek pomiędzy aktywnością fazową neuronów dopaminergicznych a uczeniem się ze wzmocnieniem są obserwacje pokazujące, że stymulacja neuronów dopaminergicznych śródmózgowia prowadzi do wzmocnienia i powtarzania działań powiązanych ze stymulacją (*Phillips i in., 2003; Adamantidis i in., 2011; Ilango i in., 2014*). Proponowanym mechanizmem działania dopaminy jest jej wpływ na modyfikację plastyczności synaps korowo-prążkowiowych (*Calabresi i in., 2007; Surmeier i in., 2009; Wickens, 2009*). Uważa się, że fazowe uwalnianie dopaminy towarzyszące działaniu, które doprowadziło do nieoczekiwanej prezentacji nagrody, prowadzi do wzmocnienia połączeń synaptycznych w neuronach aktywnych podczas tego zdarzenia, zwiększając tym samym prawdopodobieństwo jego powtórzenia w przyszłości. Przykładem stanowiącym potwierdzenie tej hipotezy jest obserwacja, że stymulacja neuronów dopaminergicznych istoty czarnej, w sposób zależny od aktywacji receptora D1, wzmacnia połączenia synaptyczne między korą a neuronami projekcyjnymi prążkowie, a siła tego wzmocnienia dodatnio koreluje z szybkością uczenia się instrumentalnej reakcji samodrażnienia mózgu (*Reynolds i in., 2001*). Późniejsze badania wykazały również, że bezpośrednia aktywacja neuronów D1 jest wystarczająca do wywołania długotrwałego wzmocnienia zachowania, w sposób niezależny od aktywacji samych receptorów dopaminowych (*Kravitz i in., 2012*). Co więcej, w sytuacji wyboru między konkurencyjnymi kursami działania, aktywacja neuronów D1 lub D2 w grzbietowym prążkowie zmienia oczekiwaną wartość dostępnych działań i wpływała na dokonanie przyszłego wyboru (*Tai i in., 2012*). Obserwacje te są zgodne z poglądem, że prążkowie koduje informację o oczekiwanej wartości działań, a dopamina zapewnia sygnał niezbędny do jej aktualizacji

(*Lee i in., 2012; Samejima i in., 2005*). Z doświadczeń tych wynika więc, że aktywność fazowa neuronów dopaminergicznych oraz plastyczność neuronów dopaminoceptywnych prążkowiec stanowi neuronalny substrat uczenia się ze wzmocnieniem i podejmowania decyzji o wyborze działań o największej oczekiwanej wartości.

W badaniach wykorzystujących funkcjonalne obrazowanie mózgu wykazano, że sygnał zależny od poziomu natlenienia krwi (BOLD), rejestrowany w obszarze prążkowiec oraz śródmózgowia, koduje informację o błędzie przewidywania nagrody i jej oczekiwanej wartości (*D'Ardenne i in., 2008; Knutson i in., 2005; O'Doherty i in., 2004; Pessiglione i in., 2006; Rutledge i in., 2010*). Co więcej, w badaniu, w którym osobom badanym podawano prekursor dopaminy (lewodopę) oraz antagonistę receptorów dopaminowych D2 (haloperidol) wykazano, że leki te odpowiednio zwiększają lub zmniejszają prawdopodobieństwo wyboru częściej nagradzanego działania (*Pessiglione i in., 2006*). Ciekawym wnioskiem z tych badań jest to, że u ludzi nagroda pieniężna wywołuje taki sam efekt na aktywację obszarów mózgu zaangażowanych w ocenę działania co nagroda naturalna. Oznacza to, że u ludzi układ dopaminowy odgrywa rolę w podejmowaniu decyzji ekonomicznych. Interpretacja wyników tych badań nie jest wprawdzie wolna od ograniczeń, ponieważ sygnał BOLD nie odzwierciedla rzeczywistej aktywności układu dopaminowego. Niemniej jednak, obserwacje te wydają się potwierdzać, że neuronalny substrat kodowania błędu przewidywania nagrody i uczenia się ze wzmocnieniem jest ewolucyjnie zakonserwowany w mózgach ssaków i ma istotne znaczenie dla adaptacyjnego podejmowania decyzji.

Mając na uwadze rolę jaką układ dopaminowy odgrywa w kodowaniu informacji o nagrodzie przypuszcza się, że w przebiegu chorób neuropsychiatrycznych może dochodzić do rozregulowania mechanizmów uczenia się ze wzmocnieniem. Ciekawe w tym kontekście są badania prowadzone na pacjentach z chorobą Parkinsona, u których w wyniku procesu chorobowego dochodzi do znacznego ubytku dopaminy w jądrach podstawnych. Pacjenci ci charakteryzują się wolniejszym uczeniem na podstawie konsekwencji dokonywanych wyborów oraz skłonnością do kierowania się negatywnymi, a nie pozytywnymi informacjami zwrotnymi (*Frank i in., 2004; Rutledge i in., 2009*). Podanie pacjentom leków nasilających transmisję dopaminergiczną (np. lewodopy), przywraca wrażliwość na pozytywne informacje zwrotne i zwiększa szybkość uczenia się na podstawie pozytywnego wyniku działania. Zaburzenie kodowania informacji o nagrodzie i procesu uczenia się ze wzmocnieniem zaobserwowano także u osób cierpiących na inne

choroby, powiązane z dysfunkcją układu dopaminowego – depresję, schizofrenię czy uzależnienia (*Heinz i in., 2016; Whitton i in., 2015*). Z przytoczonych badań wynika więc, że zaburzenie funkcji układu dopaminowego prowadzić może do zaburzenia procesów uczenia się opartego o nagrodę.

Motywacja do poszukiwania nagród

Dopamina wpływa nie tylko na wybór kierunku działania, ale również na proces jego inicjacji i podtrzymania (*Salamone i Correa, 2012*). Obserwacje te wspierane są przez doświadczenia pokazujące, iż wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy w brzusznej prążkowiu poprzedza moment rozpoczęcia działania (*Phillips i in., 2003; Roitman i in., 2004; Syed i in., 2016*), zwłaszcza gdy działanie to charakteryzuje się wysokim wigorem (*Ko i Wanat, 2016*). Ponadto, doświadczenia farmakologiczne wskazują na to, że zablokowanie receptorów dopaminowych w obszarze brzusznej prążkowni wydłuża czas do zaangażowania się w wykonanie działania nakierowanego na zdobycie nagrody i obniża skłonność do wyboru działania wymagającego wykonania większego wysiłku (*Floresco i in., 2008; Nicola, 2010; Salamone i in., 2001*). Z badań tych wynika również, że zachowanie związane z samym celem działania, czyli podejście do podajnika do którego dostarczana jest nagroda oraz jej konsumpcja, pozostają niezmiennione. Oznacza to, że dopamina reguluje przede wszystkim fazę inicjacji działania i wydatkowania wysiłku, odpowiadając tym samym za aktywacyjny aspekt motywacji (*Salamone i Correa, 2012; Salamone i in., 2016*).

Także u ludzi zaobserwowano związek pomiędzy aktywacją układu dopaminowego a oceną kosztu działania i podejmowaniem decyzji o wyborze działania związanego z wysiłkiem (*Croxson i in., 2009; Kroemer i in., 2014; Treadway i in., 2012b*). Co więcej, w badaniach w których podawano ludziom lewodopę, obserwowano wzrost wigoru działania, nakierowanego na pozyskanie nagrody (*Beierholm i in., 2013; Guitart-Masip i in., 2012*). U osób z chorobą Parkinsona oraz depresją obserwowano natomiast mniejszą skłonność do wyboru działania związanego z wysiłkiem oraz obniżenie wigoru odpowiedzi (*Chong i in., 2015; Treadway i in., 2012a*). W przypadku osób chorych na Parkinsona nasilenie transmisji dopaminergicznej, związane z podaniem lewodopy, odwracało deficyty motywacyjne (*Chong i in., 2015*). Z badań tych wynika więc, że dopamina pełni istotną rolę w ocenie kosztu działania i regulacji wydatkowania wysiłku.

Zjawiskiem łączącym wpływ dopaminy na uczenie się ze wzmocnieniem i motywację jest proces atrybucji znaczenia, czyli przypisania wartości motywacyjnej bodźcom skojarzonym z nagrodą (*Berridge 2007; Berridge i Robinson, 1998; Flagel i in., 2011*). W wyniku tego procesu, bodźce skojarzone z nagrodą uzyskują kontrolę nad zachowaniem, nasilając zachowania nakierowane na jej zdobycie i stając się pożądane na równi z samą nagrodą. Przykładem tego jest zachowanie obserwowane u gryzoni, które oprócz eksploracji miejsca do którego dostarczana jest nagroda, tzw. śledzenie celu (ang. *goal-tracking*), eksplorują również miejsce gdzie prezentowany jest bodziec przewidujący nagrodę, tzw. śledzenie znaku (ang. *sign-tracking*). Zachowaniu nakierowanemu na śledzenie znaku towarzyszy nasilone fazowe uwalnianie dopaminy w brzuszny prążkowie (*Flagel i in., 2011*). Co więcej, zachowanie nakierowane na śledzenie znaku, ale nie zachowanie nakierowane na śledzenie celu, hamowane jest przez blokadę receptorów dopaminowych (*Flagel i in., 2011; Saunders i Robinson, 2012*). Oznacza to, że podczas uczenia asocjacyjnego, fazowa aktywacja neuronów dopaminergicznych umożliwia przypisanie wartości motywacyjnej bodźcom przewidującym nagrodę.

2. Rola układu noradrenergicznego w percepcyjnym podejmowaniu decyzji i adaptacji do zmieniających się wymagań otoczenia

Anatomia ośrodkowego układu noradrenergicznego

Głównym skupiskiem komórek noradrenergicznych w ośrodkowym układzie nerwowym jest miejsce sinawe (LC), zlokalizowane w obszarze mostu, tuż poniżej śródmózgowia. Jego lokalizacja odpowiada grupie A6, według nomenklatury Dahlström i Fuxe (*Dahlström i Fuxe, 1964*). Neurony noradrenergiczne, podobnie jak neurony dopaminergiczne, wyrażają TH. Dlatego też, markerem stosowanym do ich identyfikacji jest ekspresja enzymu β -hydroksylazy dopaminy (DBH), przekształcającego dopaminę w noradrenalinę.

Neurony noradrenergiczne miejsca sinawego wysyłają liczne i rozległe projekcje do przodomózgowia, unerwiając cały obszar kory mózgu, a także liczne struktury podkorowe, takie jak wzgórze, hipokamp czy ciało migdałowate (*Aston-Jones i Cohen, 2005; Aston-Jones i Waterhouse, 2016; Berridge i Waterhouse, 2003; Sara, 2009; Sara i Bouret, 2012*). Połączenia z korą i wzgórzem mają istotne znaczenie dla regulacji stanu pobudzenia oraz modulacji przetwarzania informacji sensorycznych. Połączenia z hipokampem i ciałem migdałowatym pełnią natomiast istotną rolę w konsolidacji pamięci. Unerwienie obszaru kory przedczołowej ma również istotne znaczenie dla modulacji pamięci roboczej, regulacji procesów uwagi i percepcyjnego podejmowania decyzji. Neurony noradrenergiczne miejsca sinawego tworzą więc heterogeniczne podgrupy, które w zależności od rodzaju tworzonych połączeń i właściwości fizjologicznych pełnią wyspecjalizowane funkcje behawioralne (*Chandler i in., 2014; Uematsu i in., 2017*).

Aktywność elektryczna neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego charakteryzuje się występowaniem dwóch trybów aktywności, trybu tonicznego oraz fazowego (*Aston-Jones i Cohen, 2005; Berridge i Waterhouse, 2003*). Mianem trybu tonicznego określa się podstawowy poziom aktywności neuronów noradrenergicznych o stosunkowo niskiej częstotliwości wyładowań (<5 Hz). Aktywność o charakterze tonicznym koreluje z poziomem pobudzenia, tj. wzrasta podczas wysokiego pobudzenia (np.: aktywnego poruszania się), maleje w okresie niskiego pobudzenia i zanika całkowicie podczas snu paradoksalnego (*Aston-Jones i Bloom, 1981a*). Tryb fazowy z kolei

charakteryzuje się występowaniem serii 2-3 potencjałów o wysokiej częstotliwości wyładowań (>10 Hz) i następującym po nich dłuższym okresie obniżonej pobudliwości. Fazowa aktywacja neuronów noradrenergicznych wywoływana jest przez bodźce sensoryczne towarzyszące zdarzeniom o istotnym znaczeniu. Dlatego też, ten rodzaj aktywności związany jest z nakierowaniem uwagi na pojawienie się w otoczeniu nowych bodźców oraz detekcją bodźców przewidujących nagrodę lub karę (*Aston-Jones i Bloom, 1981b; Aston-Jones i in., 1994; Foote i in., 1980; Sara i Segal, 1991*). Aktywność fazowa zależna jest od podstawowego poziomu aktywności tonicznej, albowiem zarówno zbyt niski, jak i zbyt wysoki poziom pobudzenia wpływa negatywnie na zdolność do generowania odpowiedzi fazowej neuronów noradrenergicznych (*Aston-Jones i Cohen, 2005*). Głównym regulatorem aktywności neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego są pobudzające projekcje glutaminianergiczne z jądra przyolbrzymiokomórkowego (PGi), które odpowiadają za generowanie aktywności fazowej (*Aston-Jones i in., 1986; Ennis i Aston-Jones, 1988*). Niewielkim, lecz mającym istotne znaczenie źródłem połączeń pobudzających jest również kora przedczołowa. Podczas stymulacji elektrycznej kory przedczołowej obserwowano zarówno pobudzenie jak i hamowanie aktywności neuronów miejsca sinawego (*Jodo i Aston-Jones, 1997; Sara i Hervé-Minvielle, 1995*). Przypuszcza się więc, że projekcje korowe mogą w sposób dwufazowy regulować aktywność neuronów noradrenergicznych.

Zewnątrzkomórkowy wzrost stężenia noradrenaliny jest liniowo związany z poziomem wzbudzenia aktywności komórek noradrenergicznych miejsca sinawego (*Berridge i Abercrombie, 1999*). Przypuszcza się, że fazowa aktywacja neuronów noradrenergicznych związana jest z uwalnianiem większej ilości neuroprzekaźnika (*Florin-Lechner i in., 1996*). Noradrenalina uwalniana z zakończeń synaptycznych moduluje aktywność oraz plastyczność neuronów postsynaptycznych, a jej działanie mediowane jest przez trzy typy receptorów: α_1 , α_2 i β , z których każdy posiada różne podtypy (*Berridge i Waterhouse, 2003; Ramos i Arnsten, 2007*). Receptory α_1 (sprzężone z białkiem G_q) i receptory β (sprzężone z białkiem G_s) to receptory zlokalizowane głównie po stronie postsynaptycznej. Receptory α_2 (sprzężone z białkiem $G_{i/o}$) obecne są po stronie postsynaptycznej, ale pełnią też rolę autoreceptorów, a ich aktywacja działa hamująco na aktywność neuronalną. Ze względu na zróżnicowaną dystrybucję receptorów adrenergicznych w mózgu, znaczenie poszczególnych typów receptorów dla regulacji aktywności i plastyczności neuronów postsynaptycznych wciąż stanowi przedmiot

intensywnych badań. Głównym postulowanym efektem działania noradrenaliny jest hamowanie bazowej aktywności neuronów postsynaptycznych i wzmocnienie ich odpowiedzi na dostarczenie stymulacji sensorycznej, czyli zwiększenie stosunku sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*). Dzięki temu noradrenalina moduluje przetwarzanie informacji sensorycznych o istotnym znaczeniu.

Percepcyjne podejmowanie decyzji

Bodźce sensoryczne towarzyszące zdarzeniom o istotnym znaczeniu wywołują fazową aktywację neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego. Zdarzeniem takim może być pojawienie się w otoczeniu nowego, nieznanego bodźca, czemu towarzyszy odruch orientacyjny, czyli nakierowanie uwagi na ów bodziec (*Aston-Jones i Bloom, 1981b; Foote i in., 1980*). W miarę powtarzania się prezentacji bodźca, fazowa odpowiedź neuronów noradrenergicznych ulega stopniowemu osłabieniu. Niemniej, jeżeli bodziec przewiduje mającą po nim nastąpić nagrodę, fazowa odpowiedź neuronów miejsca sinawego nie ulega habituacji. Jak wynika z badań nad selektywnością uwagi, prowadzonych na początku lat 90 przez Garyego Astona-Jonesa, neurony noradrenergiczne miejsca sinawego odpowiadają aktywacją o charakterze fazowym na spostrzeżenie rzadko prezentowanych bodźców, które sygnalizują możliwość uzyskania nagrody (*Aston-Jones i in., 1994; 1997; Rajkowski i in., 1994*). Detekcja bodźców niezwiązanych z nagrodą, nie wywoływała wzbudzenia aktywności miejsca sinawego. Podczas odwrócenia znaczenia między bodźcami fazowa odpowiedź na bodziec, który dotychczas przewidywał nagrodę zanikała, a w momencie rozpoznania nowego znaczenia bodźców neurony noradrenergiczne ponownie odpowiadały aktywacją fazową na bodziec będący właściwym sygnałem nagrody. Istotnym jest, że po fazowej aktywacji miejsca sinawego następowało wykonanie poprawnej reakcji behawioralnej, w odpowiedzi na prezentowany bodziec. Nie obserwowano bowiem fazowego wzbudzenia neuronów noradrenergicznych w sytuacji pominięcia znaczącego bodźca (niewykonania reakcji) (*Clayton i in., 2004; Rajkowski i in., 2004*). Na podstawie tych doświadczeń zaproponowano, że aktywność fazowa miejsca sinawego związana jest z detekcją znaczenia bodźca oraz podjęciem decyzji o wykonaniu odpowiedniego działania, aniżeli z odpowiedzią na fizyczne właściwości bodźca czy samym działaniem. Późniejsze badania wykorzystujące schemat „go/no-go” wykazały również, że aktywacja miejsca sinawego wyzwalana jest przez podjęcie decyzji o wykonaniu reakcji behawioralnej,

a nie przez oczekiwaną nagrodę, albowiem nie obserwowano fazowej aktywacji neuronów noradrenergicznych podczas również nagradzanego powstrzymania się od wykonania reakcji (*Kalwani i in., 2014*). Także w badaniach na ludziach, w których rejestrowano zmiany w rozszerzaniu się źrenic (reakcja zależna od aktywacji układu noradrenergicznego) zaobserwowano, że szybkie, przejściowe rozszerzanie się źrenic związane jest z detekcją znaczącego bodźca i podjęciem decyzji o wykonaniu działania (*Privitera i in., 2010*).

W badaniach prowadzonych przez zespół Astona-Jonesa zaobserwowano również, że epizodom słabego wykonania zadania, związanym z gorszym rozróżnianiem bodźców i wzrostem błędnych odpowiedzi, towarzyszył wzrost aktywności tonicznej. Podniesienie bazowego poziomu aktywności tonicznej obserwowano również podczas odwrócenia znaczenia bodźców, kiedy zwierzę poszukiwało poprawnego schematu działania. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że w odróżnieniu od aktywności fazowej, związanej z eksploatacją dotychczas nagradzanego działania, wzrost aktywności tonicznej prowadzi do eksploracji nowych, potencjalnie bardziej korzystnych możliwości (*Aston-Jones i Cohen, 2005*). Hipoteza dotycząca roli układu noradrenergicznego w regulacji równowagi pomiędzy wykorzystaniem strategii związanej z eksploatacją i eksploatacją znalazła później potwierdzenie w badaniach na ludziach (*Gilzenrat i in., 2010; Jepma i Nieuwenhuis, 2011*). W jednym z tych badań osoby badane musiały poradzić sobie z dylematem o podjęciu decyzji czy skupić się na działaniu, które miało wysoką skuteczność w przeszłości, czy też wybrać nowy schemat działania na wypadek gdyby miał on zapewnić jeszcze większy zysk (*Jepma i Nieuwenhuis, 2011*). Z badań tych wynikało, że wzrost podstawowego poziomu rozszerzenia źrenicy oka (kojarzony ze wzrostem aktywności tonicznej), związany był ze skłonnością do eksploracji, czyli wyboru nowego schematu działania. Z przytoczonych badań wynika więc, że aktywność układu noradrenergicznego ma istotne znaczenie dla regulacji percepcyjnego podejmowania decyzji oraz regulacji równowagi pomiędzy wyborem strategii związanej z eksploatacją znanych schematów działania, a eksploracją nowych, potencjalnie bardziej korzystnych możliwości.

Adaptacja do nieoczekiwanych zmian w otoczeniu

Oprócz roli w regulacji uwagi i percepcyjnego podejmowania decyzji uważa się, że aktywacja układu noradrenergicznego reguluje również zdolność do elastycznej zmiany kursu działania. Hipoteza ta wspierana jest przez wyniki doświadczeń pokazujące że,

farmakologiczne nasilenie transmisji noradrenergicznej, pozwala na szybką adaptację do nieoczekiwanego odwrócenia zależności między bodźcami przewidującymi nagrodę lub zmiany zasad jej uzyskania (*Devauges i Sara, 1990; Lapid i Morilak, 2006*) oraz dane pokazujące, iż osłabienie transmisji noradrenergicznej wywołane uszkodzeniem połączeń z miejsca sinawego do kory przedczołowej lub zahamowaniem aktywności neuronów miejsca sinawego, skutkuje wolniejszą adaptacją (*Janitzky i in., 2015; McGaughy i in., 2008; Tait i in., 2007*). Obserwacje te są zgodne z teorią „resetu sieci” (ang. *network reset*), postulującą, że fazowa aktywacja neuronów noradrenergicznych i towarzyszące temu uwalnianie noradrenaliny, pozwala na reorganizację połączeń w korze przedczołowej, tworzących reprezentację aktualnego stanu otoczenia (*Bouret i Sara, 2005*). Zgodnie z tą koncepcją reset umożliwia porzucenie niewłaściwego modelu i pozwala na przekierowanie uwagi na inny aspekt otoczenia, celem odnalezienia właściwej strategii działania.

W kontekście rozważanej roli układu noradrenergicznego w sygnalizowaniu nieoczekiwanych zmian w otoczeniu, interesująca jest również koncepcja Yu i Dayana mówiąca tym, że aktywność układu noradrenergicznego sygnalizuje nieoczekiwaną niepewność (ang. *unexpected uncertainty*), czyli rozbieżność pomiędzy aktualnymi obserwacjami otoczenia a jego przewidywaną zmiennością (*Yu i Dayan, 2005; Dayan i Yu, 2006*). W odróżnieniu od oczekiwanej niepewności, czyli znanej i spodziewanej zmienności otoczenia (np. ryzyka), nieoczekiwana niepewność odnosi się do sytuacji, w której dochodzi do pogwałcenia oczekiwań co do stanu otoczenia, które wydawały się być poprawne. Przykładem oczekiwanej niepewności jest wybór działania, które daje pewną szansę na uzyskanie nagrody (np.: $p = 0.8$). Zakładając, że wiemy, iż wybór działania związany jest z pewną szansą niepowodzenia, akceptujemy oczekiwane ryzyko. Niemniej, jeżeli decydując się na wybór tego działania w przyszłości zaistnieje sytuacja, w której nastąpi nieoczekiwany spadek prawdopodobieństwa uzyskania nagrody (np.: z $p = 0.8$ na $p = 0.2$), możemy uznać, że doszło do pogwałcenia naszych oczekiwań i wymagana jest aktualizacja wiedzy na temat spodziewanej zmienności wyniku owego działania. Koncepcja zakładająca, że aktywacja układu noradrenergicznego sygnalizuje nieoczekiwaną niepewność znalazła empiryczne potwierdzenie w badaniach na ludziach (*Nassar i in., 2012; Payzan-LeNestour i in., 2013; Preusschoff i in., 2011*). Z badań tych wynikało bowiem, że aktywacja układu noradrenergicznego koreluje z rozpoznaniem przez osoby badane nieoczekiwanych zmian prawdopodobieństwa uzyskania nagrody. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że analogicznie do sygnału dopaminowego kodującego błąd przewidywania nagrody,

sygnał noradrenergiczny koduje błąd przewidywania ryzyka, który informuje o tym, że konieczna jest aktualizacja przekonań co do zmienności otoczenia. Z przytoczonych badań wynika więc, że aktywacja układu noradrenergicznego może sygnalizować nieoczekiwane zmiany w otoczeniu, a tym samym usprawniać proces uczenia się i podejmowania decyzji o wyborze kierunku działania w dynamicznie zmieniającym się środowisku.

3. Zależna od glutaminianu regulacja aktywności neuronów katecholaminergicznych i plastyczności neuronów dopaminoceptywnych prążkowie

Aktywność neuronów dopaminergicznych śródmózgowia

Zgodnie z hipotezą kodowania błędu przewidywania nagrody, neurony dopaminergiczne śródmózgowia odpowiadają aktywacją o charakterze fazowym na dostarczenie zwierzęciu niespodziewanej nagrody lub nagrody większej niż oczekiwana. Uwalniana podczas tego zdarzenia dopamina, moduluje plastyczność neuronów dopaminoceptywnych prążkowie, które kodują wartość dokonanego wyboru. Większość wiedzy na temat mechanizmu generowania aktywności fazowej przez neurony dopaminergiczne oraz związanej z tym plastyczności synaptycznej neuronów prążkowie, pochodzi z doświadczeń wykonanych w anestezji lub na preparatach *in vitro*. U zwierząt uśpionych obserwuje się bowiem występowanie spontanicznych epizodów aktywności fazowej, które nie różnią się czasem trwania czy częstotliwością wyładowań od epizodów aktywności związanych z prezentacją nagrody (Hyland *i in.*, 2002; Paladini *i Roeper*, 2014). Dlatego też uważa się, że mechanizm powstawania aktywności fazowej u uśpionych oraz przytomnych zwierząt jest taki sam.

Głównym regulatorem aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych śródmózgowia są receptory NMDA – jonotropowe receptory dla glutaminianu aktywowane przez kwas *N*-metylo-D-asparginowy. Podanie kwasu *N*-metylo-D-asparginowego za pomocą jontoforezy prowadzi do gwałtownego wzrostu wyładowań o charakterze fazowym, a farmakologiczna blokada receptorów NMDA zaburza generowanie spontanicznych epizodów aktywności fazowej (Chergui *i in.*, 1993; Overton *i Clark*, 1992). Zahamowaniu zależnej od receptora NMDA aktywności elektrycznej neuronów dopaminergicznych, towarzyszy także zahamowanie fazowego uwalniania dopaminy w brzusznej prążkowie (Somers *i in.*, 2009; Wickham *i in.*, 2013). Na podstawie przytoczonych badań wysunięto przypuszczenie, że przekazywanie sygnału zależne od receptorów dla glutaminianu może pełnić kluczową rolę w sygnalizowaniu błędu przewidywania nagrody. Za hipotezą tą przemawiają badania, w których wykorzystano zwierzęta z genetyczną inaktywacją receptorów dla glutaminianu w neuronach układu dopaminowego. Badania te wykazały, że usunięcie funkcjonalnych

receptorów NMDA z neuronów dopaminergicznych hamuje aktywność fazową i osłabia fazowe uwalnianie dopaminy w prążkowie (*Zweifel i in., 2009; Parker i in., 2010; Wang i in., 2011*). Niemniej, wadą dotychczas stosowanych modeli było to, że mutacja zachodziła na wczesnym etapie rozwoju, co wiązało się z występowaniem zmian kompensacyjnych, np.: wzrostem spontanicznej aktywności neuronów dopaminergicznych śródmózgowia (*Engblom i in., 2008; Zweifel i in., 2008*). Rozwiązaniem tego problemu było wytworzenie zwierząt z indukowalnym wariantem rekombinazy Cre (CreERT2), który umożliwiał indukcję mutacji w dorosłości (*Engblom i in., 2008*). Nasze doświadczenia wykonane we współpracy z elektrofizjologami z Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wykazały, że indukcja mutacji u tych myszy prowadzi do całkowitego zahamowania zależnej od receptora NMDA aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych śródmózgowia oraz obniżenia ich spontanicznej aktywności (*Jastrzębska i in., 2016*).

Plastyczność neuronów dopaminoceptywnych prążkowie

Oprócz roli w regulacji aktywności neuronów dopaminergicznych receptory dla glutaminianu mają również istotne znaczenie dla regulacji plastyczności synaps korowo-prążkowiowych, która może odpowiadać za aktualizację wartości działania przez neurony dopaminoceptywne prążkowie (*Calabresi i in., 2007; Shen i in., 2008; Surmeier i in., 2009; Yagishita i in., 2014*). Z badań, w których analizowano zjawisko długotrwałego wzmocnienia (LTP) oraz osłabienia (LTD) synaptycznego wynika, że aktywacja receptorów NMDA zlokalizowanych na neuronach prążkowie wyrażających ekspresję receptora D1 (aktywowanych przez fazowo uwalnianą dopaminę), jest konieczna dla wywołania LTP oraz indukcji plastyczności strukturalnej (*Shen i in., 2008; Yagishita i in., 2014*). Aktywacja metabotropowych receptorów dla glutaminianu grupy I, zwłaszcza mGluR5, jest z kolei kluczowa dla wywołania LTD (*Shen i in., 2008*). W badaniach wykorzystujących zwierzęta modyfikowane genetycznie wykazano, że utrata receptorów NMDA w neuronach GABA-ergicznym prążkowie, powoduje zmiany w morfologii (mniejsze ciała komórkowe, krótsze dendryty) i aktywności tych neuronów oraz prowadzi do poważnego upośledzenia postnatalnego rozwoju zwierząt, co utrudnia wykorzystanie tych zwierząt do badań behawioralnych (*Beutler i in., 2011; Ohtsuka i in., 2008*). Całkiem niedawno wytworzono jednak myszy z indukowalnym wariantem mutacji, selektywnie w neuronach D1

(Sikora *i in.*, 2016). Zwierzęta te rozwijają się normalnie, a inaktywacja receptorów NMDA następuje w dorosłości. Nasze doświadczenia wykonane we współpracy z elektrofizjologami z Zakładu Fizjologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie wykazały, iż konsekwencją indukcji mutacji u tych myszy jest utrata zależnej od receptora NMDA komponenty pobudzającego prądu postsynaptycznego (EPSC) oraz osłabienie wzbudzenia LTP w jądrze półleżącym (Sikora *i in.*, 2016).

W przypadku zwierząt z inaktywacją metabotropowych receptorów dla glutaminianu grupy I, dostępne są zwierzęta z utratą receptora mGluR5, selektywnie w neuronach D1 (Novak *i in.*, 2010). Pomimo działania mutacji na wczesnym etapie rozwoju, u myszy z mutacją nie obserwuje się niepożądanych zmian w rozwoju postnatalnym (Rodriguez Parkitna *i in.*, 2013). W wyniku mutacji, ilość transkryptu mGluR5 w prądkowiu zredukowana jest do ~40%, czemu towarzyszy ~50% spadek ilości białka mGluR5 (Novak *i in.*, 2010). Elektrofizjologiczne konsekwencje utraty receptora mGluR5 w neuronach D1 dotychczas nie są znane. Mając jednak na uwadze znaczenie przekazywania sygnału zależnego od tego receptora dla powstawania LTD (Shen *i in.*, 2008), można przypuszczać, że właśnie ta forma plastyczności synaptycznej może być u tych zwierząt zaburzona. Z przytoczonych badań wynika więc, że wykorzystanie zwierząt z selektywną inaktywacją receptorów dla glutaminianu stanowi cenne narzędzie do badania zachowań zależnych od fazowo uwalnianej dopaminy i związanej z tym plastyczności synaptycznej neuronów dopaminoceptywnych.

Aktywność neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego

W porównaniu do badań nad mechanizmem aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych, badania nad mechanizmem aktywności neuronów noradrenergicznych są znacznie bardziej ubogie. W jednym z pierwszych doświadczeń wykonanych na preparacie *in vitro* zaobserwowano że, aplikacja agonistów jonotropowych receptorów dla glutaminianu (w tym kwasu *N*-metylo-*D*-asparginowego), aktywuje neurony noradrenergiczne, zwiększając częstotliwość ich wyładowań (Olpe *i in.*, 1989). Żaden z badanych związków nie miał jednak wpływu na indukcję aktywności fazowej. W badaniach *in vivo* wykonanych u uśpionych zwierząt, w których stymulowano główny szlak pobudzający z PGI zaobserwowano, że fazowa aktywacja neuronów noradrenergicznych hamowana jest przez dokomorowe podanie kwasu kynureninowego –

nieselektywnego antagonisty receptorów NMDA i AMPA/kainowych (*Ennis i Aston-Jones, 1988*). Podanie selektywnego antagonisty receptorów NMDA prowadziło do wzrostu bazowej aktywności neuronów noradrenergicznych, ale nie miało wpływu na aktywność fazową wywołaną stymulacją PGI. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że fazowa aktywacja neuronów noradrenergicznych może być regulowana głównie przez receptory AMPA/kainowe. Niemniej, wadą tych badań, utrudniającą interpretację uzyskanych w ich rezultacie wyników jest brak specyficzności dokomorowego podania leków. Późniejsze badania, w których wykonano podania leków bezpośrednio do miejsca sinawego wykazały, że selektywni antagoniści receptorów NMDA, podobnie jak receptory AMPA/kainowych, hamują aktywność neuronów noradrenergicznych wywołaną stymulacją mPFC (*Jodo i Aston-Jones, 1997*). Jednoczesne podanie obu leków, hamowało całkowicie aktywność rejestrowanych komórek. Z przytoczonych badań wynika więc, że w regulacji aktywności neuronów noradrenergicznych uczestniczą zarówno receptory NMDA, jak i nie-NMDA. Podobnie jak w przypadku neuronów dopaminergicznych, pomocnym w określeniu roli poszczególnych typów receptorów dla glutaminianu powinno być wykorzystanie zwierząt modyfikowanych genetycznie. Dotychczas dostępny jest jeden szczep zwierząt, u których w neuronach noradrenergicznych inaktywowane są receptory NMDA (*Rodriguez Parkitna i in., 2012*). U zwierząt tych obserwowano utratę kluczowej dla formowania funkcjonalnych receptorów NMDA podjednostki NR1 w miejscu sinawym oraz utratę zależnej od receptora NMDA komponenty EPSC w neuronach noradrenergicznych, potwierdzając tym samym skuteczność mutacji. Niedawno udało się również wykonać u tych zwierząt pomiar aktywności neuronów miejsca sinawego *in vivo*, we współpracy z elektrofizjologami z Uniwersytetu Kraju Basków w Leioa (*Cieślak i in., 2017*). Wyniki tych doświadczeń omówiono w Dyskusji.

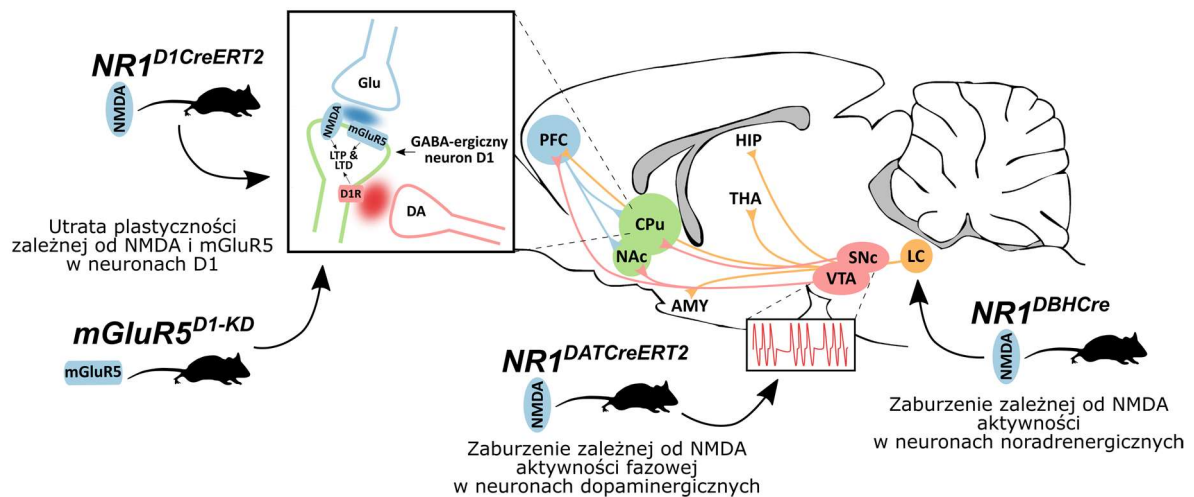
Cel badań

Zależna od glutaminianu aktywność oraz plastyczność neuronów układu dopaminowego i noradrenergicznego może odgrywać istotną rolę w regulacji adaptacyjnego podejmowania decyzji. Niemniej, dowody potwierdzające taką hipotezę są w znacznej mierze oparte o korelację, co uniemożliwia określenie zależności przyczynowo skutkowej między przekazywaniem sygnału zależnym od wybranych typów receptorów dla glutaminianu a zachowaniem.

W ramach niniejszej rozprawy podjąłem próbę określenia znaczenia przekazywania sygnału zależnego od receptorów NMDA i mGluR5 zlokalizowanych w układach katecholaminowych, dla regulacji wybranych aspektów adaptacyjnego podejmowania decyzji. W szczególności skupiłem się na dwóch zagadnieniach:

- (1) Jak utrata receptorów NMDA i mGluR5 w układzie dopaminowym wpłynie na uczenie się ze wzmocnieniem i motywację do poszukiwania nagród.
- (2) Jak utrata receptorów NMDA w neuronach noradrenergicznych wpłynie na percepcyjne podejmowanie decyzji i adaptację do zmieniających się wymagań otoczenia.

Aby zrealizować postawione cele, wykorzystałem cztery szczepy zwierząt modyfikowanych genetycznie (Rycina 1) pozbawione funkcjonalnych receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych i noradrenergicznych (myszy NR1^{DATCreERT2} i NR1^{DBHCre}) oraz pozbawione funkcjonalnych receptorów NMDA i mGluR5 w neuronach D1 (myszy NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{D1-KD}). Zwierzęta badane były w testach, w których optymalny poziom wykonania zależy od dostosowania dokonywanych wyborów do nieoczekiwanych zmian prawdopodobieństwa oraz wartości nagrody, zmian rodzaju bodźca przewidującego nagrodę lub zmiany zasad jej uzyskania. Wybór testów uzasadniony był chęcią zbadania konkretnych zmian w zachowaniu, zależnych od konkretnej funkcji układu dopaminowego bądź noradrenergicznego. Otrzymane wyniki powinny pomóc w lepszym zrozumieniu znaczenia badanych układów neuronalnych dla regulacji procesu podejmowania decyzji, a także wskazać potencjalny mechanizm dokonywania nieadaptacyjnych wyborów i sztywności zachowania, które to często towarzyszą zaburzeniom psychicznym.



Rycina 1. Graficzne podsumowanie badań.

Rycina prezentuje szczepy zwierząt modyfikowanych genetycznie, które zostały wykorzystane w doświadczeniach. U zwierząt tych zachodzi wybiórcze usunięcie wybranych typów receptorów dla glutaminianu (NMDA lub mGluR5), selektywnie w neuronach dopaminergicznych (posiadających transporter DAT), neuronach noradrenergicznych (posiadających enzym DBH) oraz neuronach posiadających receptor dopaminowy D1 (D1R). Spodziewane konsekwencje mutacji dla aktywności i plastyczności neuronalnej badanych układów zostały omówione w rozdziale 3 Wprowadzenia. Rozdział 1 Materiałów i Metod zawiera szczegółowy opis wykorzystanych zwierząt.

Materiały i metody

Wszystkie protokoły doświadczeń uzyskały akceptację II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (zgoda 1158/2015 z dnia 26 marca 2015 oraz 1000/2012 z dnia 26 listopada 2012). Badania zostały wykonane w zgodzie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

1. Zwierzęta

W doświadczeniach wykorzystano cztery szczepy zwierząt modyfikowanych genetycznie: myszy NR1^{DATCreERT2} (*Engblom i in., 2008*); myszy NR1^{D1CreERT2} (*Sikora i in., 2016*); myszy NR1^{DBHCre} (*Rodriguez Parkitna i in., 2012*) oraz myszy mGluR5^{KD-D1} (*Novak i in., 2010*). Wszystkie zwierzęta pochodziły z hodowli własnej Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, gdzie hodowane były kongenicznie do szczepu C57BL/6N. W hodowli, zwierzęta oddzielano od matek (osobno samce i osobno samice) w wieku 3-5 tygodni. Myszy umieszczano w klatkach wykonanych z pleksiglasu (od 2 do 5 osobników na klatkę, wyłącznie bracia lub siostry z jednego miotu), wypełnionych ściółką osikową (MIDI LTE 002, Abedd). Podczas rozdzielania miotów wykonywano biopsję końcówki ogona do późniejszego genotypowania. W doświadczeniach wykorzystano wyłącznie samce, które po rozdzieleniu przetransportowane zostały do pomieszczenia eksperymentalnego. W pomieszczeniu eksperymentalnym, zwierzęta przebywały na indywidualnie wentylowanych regałach (Bio.A.S. Vent, EHRET), w temperaturze 22 ± 2 °C i 12 godzinnym cyklu dzień/noc, przez cały czas, do momentu zakończenia doświadczeń. O ile nie zaznaczono inaczej, zwierzęta miały wolny dostęp do wody oraz paszy laboratoryjnej (RM1 A (P), Special Diets Services). Po zakończeniu doświadczeń, zwierzęta poddane zostały bezbolesnej eutanazji przy użyciu CO₂. Tabela 1 zawiera szczegółowe informacje dotyczące kohort zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach.

Myszy z inaktywacją receptorów NMDA

Myszy szczepów NR1^{DATCreERT2}, NR1^{D1CreERT2} i NR1^{DBHCre} wytworzone zostały z wykorzystaniem systemu Cre/loxP, który umożliwia komórkowo specyficzną delecję wybranego fragmentu genu (*Branda i Dymecki in., 2004; Rodriguez Parkitna i in., 2009*). U badanych zwierząt, ekspresja rekombinazy Cre kontrolowana jest przez promotor genu kodującego transporter DAT, receptor D1 lub enzym DBH. Rekombinaza Cre rozpoznaje sekwencje loxP, wprowadzone do genu *Grin1* kodującego podjednostkę NR1 receptora NMDA i poprzez rekombinację usuwała znajdujący się między nimi fragment genu. Podjednostka NR1 jest konieczna dla tworzenia funkcjonalnych receptorów NMDA (*Paoletti i in., 2013*), dlatego też delecja w genie *Grin1* uniemożliwia ich tworzenie w komórkach wyrażających rekombinazę Cre. W przypadku myszy NR1^{DBHCre} inaktywacja genu *Grin1* zachodziła w momencie, gdy gen promotora rekombinazy Cre zaczynał być aktywny, czyli około 13 dnia rozwoju embrionalnego. Natomiast w przypadku myszy z mutacją zależną od CreERT2, rekombinacja indukowana była u dorosłych osobników, w wieku 8-10 tygodni, przez podanie tamoksifenu. Tamoksifen (Sigma-Aldrich) rozpuszczony w oleju słonecznikowym i przefiltrowany przez membranę 0.22 µm, podawany był dootrzewnowo, raz dziennie przez pięć kolejnych dni, w dawce 100 mg/kg i objętości 5 µl/g. Doświadczenia behawioralne rozpoczynały się co najmniej 2 tygodnie po zakończeniu podań tamoksifenu. Genotypowanie zwierząt wykonane było zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (*Rodriguez Parkitna i in., 2012; Sikora i in., 2016*). Zwierzęta z mutacją (posiadające transgen Cre oraz oba allele genu *Grin1* z mutacją flox) miały genotyp [Cre Tg/0; *Grin1* flox/flox], a zwierzęta kontrolne genotyp [Cre 0/0; *Grin1* flox/flox] lub [Cre 0/0; *Grin1* flox/wt].

Myszy z inaktywacją receptorów mGluR5

Zwierzęta mGluR5^{KD-D1} posiadały transgen, zawierający promotor genu kodującego receptor dopaminy D1 i wyrażający dwa syntetyczne prekursorzy spinek miR, powodujących degradację transkryptu mGluR5 (*Grm5*). Konsekwencją działania transgeny było uniemożliwienie translacji białka receptora mGluR5. Promotor genu receptora dopaminy wykorzystany w transgenie był identyczny z zastosowanym u myszy NR1^{D1CreERT2}. Genotypowanie przeprowadzone było zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (*Novak i in.,*

2010). Zwierzęta z mutacją (posiadające transgen) miały genotyp [D1-miR-mGluR5 Tg/0], a zwierzęta kontrolne (nieposiadające transgeny) genotyp [D1-miR-mGluR5 0/0].

Tabela 1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.

Kohorta. Szczep	Liczba	Wiek (tyg.)**	Waga (g)**	Procedura
<u>I. NR1^{DATCreERT2}</u>				
kontrole	7	16.57 ± 1.15	29.43 ± 0.62	uczenie się z losowym wzmocnieniem; dyskонтowanie prawdopodobieństwa
mutanty	8	16.25 ± 1.05	25.6 ± 0.85	
<u>II. mGluR5^{KD-D1}</u>				
kontrole	8	13.56 ± 1.12	24.98 ± 1.02	uczenie się z losowym wzmocnieniem; dyskонтowanie prawdopodobieństwa
mutanty	9	13.38 ± 1.31	25.8 ± 1.1	
<u>III. NR1^{D1CreERT2}</u>				
kontrole	6	19.33 ± 1.08	27.85 ± 1.37	uczenie się z losowym wzmocnieniem; dyskонтowanie prawdopodobieństwa
mutanty	9	18.33 ± 0.94	26.39 ± 1.21	
<u>IV. NR1^{DATCreERT2}</u>				
kontrole	12	21.67 ± 0.83	27.98 ± 0.93	uczenie się wartości predykcyjnej bodźców; warunkowe wzmocnienie
mutanty	12	21.75 ± 0.88	26.84 ± 1.01	
<u>*V. NR1^{DATCreERT2}</u>				
kontrole	7	16.43 ± 0.3	27.89 ± 0.96	narastające kryterium wzmocnienia
mutanty	6	15.5 ± 0.56	28.56 ± 0.7	
<u>VI. NR1^{DBHCre}</u>				
kontrole	11	15.64 ± 1.5	27.28 ± 0.99	detekcja sygnału; selektywność uwagi; uczenie się z losowym wzmocnieniem
mutanty	10	13.4 ± 1.32	26.31 ± 1.02	
<u>VII. NR1^{DBHCre}</u>				
kontrole	14	16.57 ± 1.58	28.56 ± 0.74	przerzutność uwagi
mutanty	12	14.58 ± 1.38	29.35 ± 1.24	

* Zwierzęta trenowane były wcześniej przez kilka tygodni w procedurze oceny interwałów czasowych (ang. *peak-interval procedure*), wyniki te nie zostały ujęte w niniejszej rozprawie.

** Przed rozpoczęciem deprivacji.

2. Procedury behawioralne

Deprywacja

W czasie trwania eksperymentów zwierzęta miały ograniczony dostęp do wody lub pokarmu. W przypadku deprywacji wodnej, każde zwierzę otrzymywało indywidualnie 1-1.5 ml wody na dzień. W przypadku deprywacji pokarmowej, zwierzęta miały dostęp do pokarmu w klatce domowej, przez 1-2 godziny dziennie. W wyniku deprywacji waga zwierząt osiągała ~85% wagi początkowej. Stan zdrowia oraz waga kontrolowane były każdego dnia. W przypadku ubytku wagi poniżej 80% wagi wyjściowej, poszczególne osobniki mogły spożyć więcej wody lub pokarmu. Zwierzęta trenowane były 5-7 dni w tygodniu, a deprywacja stosowana była przez cały czas trwania doświadczeń behawioralnych. W dni eksperymentalne, myszy były pojone lub karmione po zakończeniu sesji treningowej, a w dni wolne, o porze zbliżonej do godzin trwania eksperymentów.

Klatki Skinnera

Zwierzęta trenowane były w klatkach firmy Med Associates (ENV-307W-CT, Med Associates Inc., USA) umieszczonych w drewnianych boksach ograniczający dostęp dźwięków z zewnątrz i wyposażonych w wiatrak zapewniający wentylację. Na jednej ze ścian klatki znajdował się centralnie umieszczony podajnik, do którego dostarczana była nagroda w postaci wody z sacharyną (0.01% roztwór sacharyny, Sigma-Aldrich), bądź jedzenia (20 mg Dustless Precision Pellets, Bio-Serv). Po obu stronach podajnika znajdowały się otwory z diodą emitującą światło, w które zwierzę mogło wetknąć nos. Podajnik oraz oba otwory wyposażone były w fotokomórkę, umożliwiającą rejestrację wetknięć pyszczką. Na przeciwległej ścianie umieszczony był emiter dźwięku (65 dB, 2.9 kHz) oraz lampka oświetlająca klatkę.

Test uczenia się z losowym wzmocnieniem

Zwierzęta trenowane były w klatkach Skinnera, opisanych powyżej. W czasie testu, otwory z fotokomórką miały losowo przypisane prawdopodobieństwo wzmocnienia (80 lub 20%). Zwierzę musiało ocenić na podstawie prób i błędów, która ze stron jest

częściej nagradzana. Sesja podzielona była na bloki o określonej liczbie prób. Układ prawdopodobieństw przypisanych do każdego otworu był stały wewnątrz bloku i ulegał odwróceniu pomiędzy blokami. W trakcie sesji, aby zmaksymalizować liczbę uzyskanych nagród, zwierzę musiało rozpoznać, że nastąpiła zamiana i odpowiednio dostosować swoje wybory. Zwierzęta testowane były przez 15 kolejnych dni. Główną miarą testu była proporcja wyborów częściej nagradzanego otworu.

W przypadku myszy NR1^{DATCreERT2}, NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{KD-D1} sesja składała się ze 120 prób, podzielonych na dwa bloki równej długości. Próby rozpoczynały się zapaleniem się światła w obu otworach. Wetknięcie nosa w jeden z nich skutkowało zgaszeniem światła w otworach i zakończeniem próby. Czas na dokonanie wyboru nie był ograniczony. Po dokonaniu wyboru początek kolejnej próby oddzielony był 5 sekundową przerwą. Nagrodzone wybory wzmacniane były przez dostarczenie do podajnika na nagrodę 10 μ l wody, a wybory nienagrodzone sygnalizowane były przez zapalenie się lampki oświetlającej klatkę (na czas trwania przerwy). Sesja kończyła się po zaliczeniu 120 prób lub po upływie 60 minut. Schemat testu dla zwierząt z mutacją w układzie dopaminowym prezentuje Rycina 2A.

W przypadku myszy NR1^{DBHCre}, sesja składała się ze 150 prób podzielonych na cztery bloki o losowej długości od 30 do 45 prób. Kolejne próby rozpoczynały się co 20 sekund. Początek sygnalizowany był przez zapalenie się lampki oświetlającej klatkę. Trzy sekundy później następowało zapalenie się diod w otworach. Wetknięcie nosa w jeden z nich kończyło próbę i skutkowało zgaszeniem światła w obu otworach. Zwierzę miało 10 sekund na dokonanie wyboru, brak wyboru rejestrowany był jako pominięcie. Nagrodzone wybory wzmacniane były przez dostarczenie do podajnika na nagrodę 20 mg pokarmu. Po nagrodzonym wyborze lampka oświetlająca klatkę była włączona jeszcze przez 3 sekundy, po których następowała przerwa. Wybory nienagrodzone skutkowały natychmiastowym zgaszeniem światła w klatce i rozpoczęciem przerwy. Ponieważ próby rozpoczynały się w równym odstępie 20 sekund, czas trwania przerwy zależny był od tego jak szybko zwierzę wykonało odpowiedź. Sesja kończyła się po 150 próbach. Schemat testu dla zwierząt z mutacją w układzie noradrenergicznym prezentuje Rycina 17A.

Test dyskutowania prawdopodobieństwa

Doświadczenie wykonane było w klatkach Skinnera. W teście tym zwierzę dokonywało wyboru między dwoma otworami, z których jeden zapewniał możliwość uzyskania małej nagrody (10 μ l wody), a drugi uzyskania dużej nagrody (20 μ l wody). Sesja składała się z 60 prób podzielonych na dwa bloki o długości 20 i 40 prób. W pierwszym bloku, w czasie kolejnych prób tylko jeden otwór był aktywny, co wymuszało na zwierzęciu wybór na przemian lewej i prawej strony. Celem tego zabiegu było umożliwienie zwierzęciu zapoznania się z wartością obu nagród. W drugim bloku, oba otwory były aktywne i zwierzę mogło swobodnie wybierać pomiędzy nimi. Próby w pierwszym bloku nazwano „próbami wymuszonymi”, a w bloku drugim „próbami wolnymi”. W obu przypadkach, początek próby sygnalizowany był odpowiednio przez zapalenie światła w jednym lub w obu otworach. Czas na dokonanie wyboru nie był ograniczony. Wetknięcie nosa w otwór aktywny kończyło próbę. Po dokonaniu wyboru, początek kolejnej próby oddzielony był 5 sekundową przerwą. Główną miarą testu był procent wyborów strony skojarzonej z możliwością uzyskania dużej nagrody w próbach wolnych. Z chwilą gdy preferencja dużej nagrody ustabilizowała się w czasie 5 kolejnych sesji, prawdopodobieństwo jej uzyskania ulegało stopniowemu zmniejszeniu w sesjach późniejszych. Sesje te połączone były w bloki (po 4-5 sesji na blok). Szansa na uzyskanie dużej nagrody w kolejnych blokach wynosiła odpowiednio 75%, 50% i 25%. Sesja kończyła się po zaliczeniu 60 prób, lub po upływie 60 minut. Schemat doświadczenia prezentuje Rycina 9A.

Test uczenia się wartości predykcyjnej bodźców

Doświadczenie wykonane było w klatkach Skinnera, gdzie zwierzę miało dostęp wyłącznie do podajnika na nagrodę. W czasie trwania eksperymentu zwierzęciu prezentowano dwa rodzaje bodźców: bodziec o charakterze tonu ciągłego (65 db, 2.9 kHz) oraz bodziec o charakterze światła migającego z częstotliwością 1 Hz (Rycina 11A). W przypadku każdego zwierzęcia, bodźce te przyporządkowano losowo do jednej z dwóch kategorii: bodziec skojarzony z dostarczeniem wzmocnienia w postaci 20 μ l wody (bodziec CS+) oraz bodziec, którego prezentacja nie była skojarzona z nagrodą (bodziec CS-). W czasie trwania sesji, bodźce prezentowane były losowo (po 20 prezentacji każdego z nich, łącznie 40 prezentacji) i oddzielone były przerwą o losowym czasie trwania, wynoszącym

od 30 do 90 sekund. Czas prezentacji bodźców wynosił 10 sekund. Wzmocnienie dostarczane było do podajnika na nagrodę w 5 sekundzie prezentacji bodźca CS+. W celu wyeliminowania wpływu dźwięku pompy infuzyjnej dostarczającej nagrodę, pompę umieszczono na zewnątrz klatki, tak więc zwierzę nie mogło słyszeć, w którym momencie dostarczono nagrodę. Zwierzęta trenowane były przez 11 kolejnych dni. Główną miarą testu była ilość wizyt w podajniku z nagrodą podczas prezentacji bodźca CS+ i bodźca CS-.

Test warunkowego wzmocnienia

Doświadczenie to stanowiło kontynuację testu opisanego powyżej i wykonane było dzień po jego zakończeniu. W procedurze warunkowego wzmocnienia, podajnik na nagrodę zastąpiono dwoma otworami, w które zwierzę mogło wetknąć nos. Wetknięcie nosa w jeden z otworów skutkowało prezentacją bodźca CS+, a wetknięcie nosa w drugi otwór wyzwało prezentację bodźca CS-. Test trwał 60 minut, a jego główną miarą była ilość wykonanych odpowiedzi, w każdym z otworów.

Procedura narastającego kryterium wzmocnienia

Doświadczenie wykonane było w klatkach Skinnera. Zwierzę miało dostęp do jednego otworu z fotokomórką oraz podajnika na nagrodę. Mysz musiała wykonać określoną ilość wetknięć nosa w otwór z fotokomórką, aby uzyskać wzmocnienie w postaci 10 µl wody. Kryterium ustawiono na dwa wetknięcia podczas pierwszej próby i podwajano je w każdej kolejnej, tak że druga próba wymagała czterech wetknięć, trzecia ośmiu, itd. (Rycina 12A). Czas trwania eksperymentu wynosił 90 minut, ale mógł zakończyć się wcześniej, jeżeli zwierzę nie wykonało żadnej odpowiedzi przez 3 minuty.

Test detekcji sygnału

Doświadczenie wykonano w klatkach Skinnera. Procedura oparta była o metodę opisaną przez McDonald i in. (McDonald i in., 1998). W teście tym zwierzę uczyło się wtykać nos w otwór aktywny, w odpowiedzi na pojawienie się sygnału (zapalenie światła w otworze), prezentowanego przez 5 sekund. Zwierzęta testowane były przez 5 kolejnych

sesji, z których każda składała się z 40 prób. Początek próby sygnalizowany był przez zapalenie światła w klatce, po którym następował czas oczekiwania na pojawienie się sygnału, wynoszący od 9 do 24 sekund. Zwierzę musiało czekać na moment pojawienia się sygnału i odpowiednio szybko zareagować, aby uzyskać nagrodę. Wetknięcie nosa w otwór aktywny podczas prezentacji sygnału rejestrowane było jako trafienie i skutkowało dostarczeniem 20 mg pokarmu do podajnika na nagrodę. Po nagrodzonym wyborze, lampka oświetlająca klatkę była włączona jeszcze przez 3 sekundy, po których następowała przerwa. Pominięcie sygnału nie było nagradzane i skutkowało natychmiastowym zgaszeniem światła w klatce oraz rozpoczęciem przerwy. Czas trwania przerwy wynosił 10 sekund. Wetknięcie nosa w otwór aktywny na trzy sekundy przed pojawieniem się sygnału, powodowało wznowienie (reset) okresu oczekiwania, zabieg ten służył wyeliminowaniu zaliczenia przypadkowych wetknięć jako poprawnych odpowiedzi. Główną miarą testu była proporcja trafień oraz ilość przedwczesnych odpowiedzi i resetów okresu oczekiwania. Schemat testu prezentuje Rycina 14A.

Test selektywności uwagi

Doświadczenie to stanowiło kontynuację testu opisanego powyżej. W procedurze, oprócz znanego już zwierzęciu sygnału (zapalenie światła w otworze aktywnym) prezentowany był również drugi sygnał (zapalenie światła w obu otworach połączone z emisją tonu ciągłego). Aby uzyskać nagrodę, zwierzę musiało wetknąć nos w aktywny otwór podczas 5 sekundowej prezentacji znanego już sygnału (*go*), oraz powstrzymać się przez 5 sekund od wykonania odpowiedzi, podczas prezentacji nowego sygnału (*no-go*). Wetknięcie nosa w którykolwiek z dwóch otworów z fotokomórką w trakcie prezentacji sygnału *no-go*, rejestrowane było jako fałszywy alarm. Początek próby sygnalizowany był przez zapalenie światła w klatce, po którym następował czas oczekiwania na pojawienie się sygnału, wynoszący od 9 do 24 sekund. Sygnały prezentowane były losowo, stąd też w trakcie trwania sesji możliwa była różna ilość prezentacji sygnału danego typu. Wetknięcie nosa w otwór aktywny na trzy sekundy przed pojawieniem się sygnału, powodowało wznowienie (reset) okresu oczekiwania. Po nagrodzonym wyborze, lampka oświetlająca klatkę była włączona jeszcze przez 3 sekundy, po których następowała przerwa. Próby nienagrodzone skutkowały natychmiastowym zgaszeniem światła w klatce oraz rozpoczęciem przerwy. Czas trwania przerwy wynosił 10 sekund. Zwierzęta testowane były

przez 10 kolejnych sesji, składających się z 40 prób. Główną miarą testu była proporcja trafień i fałszywych alarmów, a także ilość przedwczesnych odpowiedzi oraz resetów okresu oczekiwania. Schemat testu prezentuje Rycina 15A.

Test przerzutności uwagi

Test przygotowany był w oparciu o procedurę opisaną przez Birrell i Brown (*Birrell i Brown, 2000*). Eksperyment wykonano w aparacie opisanym przez Kos i in. (*Kos i in., 2011*). Zgodnie z modyfikacją wprowadzoną przez Kosa i in. (*Kos i in., 2011*), procedurę rozdzielono na dwa dni aby zminimalizować wpływ sytości na motywację do wykonania testu. Celem eksperymentu było zbadanie wpływu mutacji u myszy NR1^{DBHCre} na zdolność przełączania uwagi między dwoma aspektami otoczenia, które wymagają korzystania z odmiennych modalności zmysłowych. W teście tym zwierzę dokonywało wyboru między dwiema szklanymi zlewkami, oznakowanymi przez bodźce przynależące do dwóch kategorii: (1) rodzaj materiału, którym były wypełnione oraz (2) zapach naniesiony na ścianę naczynia (olejki eteryczne, Bamer). W jednym z naczyń znajdował się pokarm (20 mg Dustless Precision Pellets - chocolate flavor, Bio-Serv). Posługując się informacją o rodzaju wypełnienia i zapachu mysz miała możliwość nauczyć się, którą zlewkę należy wybrać aby uzyskać nagrodę.

Eksperyment podzielony był na następujące po sobie fazy. W pierwszej fazie, SD (ang. *simple discrimination*), wskazówką przewidującą miejsce ukrycia nagrody był rodzaj tworzywa wypełniającego naczynia. Zwierzę musiało nauczyć się, pod którym z dwóch wypełnień znajduje się nagroda. W kolejnej fazie, CD (ang. *compound discrimination*), dodawano drugą wskazówkę jaką jest zapach, ale wskazówką przewidującą miejsce ukrycia nagrody nadal pozostawał rodzaj wypełnienia. Zatem, zwierzę musiało dokonać wyboru posługując się wskazówką należącą do kategorii rodzaj wypełnienia, ignorując jednocześnie wskazówkę należącą do kategorii zapach. W późniejszych fazach, IDS (ang. *intra-dimentional shift*) i IDS2 (ang. *intra-dimentional shift 2*), zestawy stosowanych bodźców były zmieniane, ale reguła którą zwierzę miało się posłużyć była wciąż taka sama. Dzięki temu, uwaga zwierzęcia mogła być nakierowana na selektywne przetwarzanie bodźców nie należących do jednej kategorii (wypełnienie) i ignorowanie bodźców należących do drugiej kategorii (zapach). W najbardziej krytycznej fazie testu, fazie EDS (ang. *extra-dimentional shift*), reguła ulegała zmianie. Tym razem wskazówką

przewidującą miejsce ukrycia nagrody był zapach. Zatem, zwierzę musiało przekierować uwagę na przetwarzanie bodźców należących do kategorii, która dotychczas była pomijana. Fazy CDR (ang. *compound discrimination reversal*), IDSR (ang. *intra-dimensional shift reversal*), IDS2R (ang. *intra-dimensional shift 2 reversal*) oraz EDSR (ang. *extra-dimensional shift reversal*) polegały na odwróceniu znaczenia pomiędzy parą bodźców, w obrębie tej samej kategorii.

Niezależnie od fazy testu, kolejne próby rozpoczynały się od podniesienia przegrody oddzielającej miejsce w którym znajdowało się zwierzę, od miejsca w którym znajdowały się naczynia. W czasie próby, zwierzę mogło swobodnie eksplorować aparat. Dokonanie przez zwierzę wyboru, rozumiane jako aktywne kopanie w jednym z naczyń, kończyło próbę. Jeżeli wybór był nagrodzony, zwierzę mogło skosztować nagrodę, po czym było ponownie kierowane do miejsca startu. Po wyborze nienagrodzonym, zwierzę niezwłocznie kierowano do miejsca startu. Poziom wykonania w każdej z faz, określany był przez ilość zaliczonych prób do momentu osiągnięcia zadanego kryterium (8/10 poprawnych wyborów), ilość popełnionych błędów oraz czas trwania fazy. Schemat eksperymentu oraz zestawy bodźców wykorzystanych w doświadczeniu prezentuje Rycina 16A.

3. Metody analizy danych

W analizie danych behawioralnych wykorzystano metodę ilościowej analizy zachowania. W podejściu ilościowym zasady zachowania zdefiniowane są w kategoriach równań. Dopasowanie danych behawioralnych do modeli matematycznych pozwala wyjaśnić zachowanie, w oparciu o interpretację wartości współczynników modelu. W analizie danych behawioralnych w szczególności interesowało mnie, czy wybory dokonane w teście uczenia się z losowym wzmocnieniem są zgodne z regułą prawa dopasowania; czy poprzednie wybory (oraz ich wynik) mają wpływ na aktualny wybór; oraz czy mutacja w układzie noradrenergicznym wpływa na zdolność do właściwego rozróżniania sygnałów w teście selektywności uwagi.

Uogólnione prawo dopasowania

Prawo dopasowania stanowi o tym, że w warunkach wyboru między dwiema możliwościami o różnym kryterium wzmocnienia, wybór (tj. względna preferencja) może być przewidziany przez względną ilość wzmocnienia uzyskanego dla każdej z dostępnych możliwości (*Herrnstein, 1961*). Dane z testu uczenia się z losowym wzmocnieniem dopasowano do logarytmicznej postaci uogólnionego prawa dopasowania (*Baum, 1974*):

$$\log_2 \left(\frac{C_L}{C_R} \right) = a \cdot \log_2 \left(\frac{R_L}{R_R} \right) + \log_2 b \quad (1)$$

gdzie C_L i C_R oznaczają dokonane wybory a R_L i R_R otrzymane nagrody, odpowiednio dla lewej i prawej możliwości. Zgodnie z prawem dopasowania, wybory zwierzęcia powinny rozdzielić się pomiędzy dostępnymi możliwościami proporcjonalnie do częstości uzyskiwania w ich wyniku nagród. Przy pomocy regresji liniowej (metodą najmniejszych kwadratów), do zebranych danych dopasowano linię prostą. Współczynnik kierunkowy a , określający kąt nachylenia linii regresji względem osi odciętych, jest miarą wrażliwości na wzmocnienie, czyli czułości alokacji wyborów względem uzyskanych nagród. Natomiast współczynnik b , określający punkt przecięcia linii regresji z osią rzędnych, jest miarą tendencji wyboru jednej możliwości niezależnie od uzyskanego wzmocnienia. Współczynnik determinacji R^2 , określający procent wyjaśnionej zmienności uzyskanych

wyników, jest miarą jakości dopasowania modelu informującą o tym na ile model dobrze wyjaśnia zachowanie.

W przypadku myszy NR1^{DATCreERT2}, NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{KD-D1}, posługując się sposobem analizy opisanym przez Rutledgea i współpracowników (*Rutledge i in., 2009*), w analizie uwzględniono 40 ostatnich prób z każdego bloku, w trakcie których wybory dokonywane przez zwierzęta osiągały stan stabilny. W przypadku myszy NR1^{DBHCre}, ze względu na krótszą długość bloków, analizie uwzględniono próby od 11 wzwyż. Bloki w których jedna z możliwości nigdy nie została wybrana lub nagrodzona zostały wyłączone z analizy, albowiem w tych przypadkach policzenie wartości logarytmu nie było możliwe.

Model regresji logistycznej

W analizie wpływu poprzednich wyborów (oraz ich wyniku) na aktualny wybór, wykorzystano model regresji logistycznej opisany przez Parkera i in. (*Parker i in., 2016*):

$$\log\left(\frac{C(i)}{1-C(i)}\right) = \beta_0 + \sum_{j=1}^n \beta_j^R R(i-j) + \sum_{j=1}^n \beta_j^N N(i-j) \quad (2)$$

gdzie, $C(i)$ jest prawdopodobieństwem wyboru prawej strony w próbie i . $R(i)$ oraz $N(i)$ to zmienne określające odpowiednio nagrodzone oraz nienagrodzone wybory. Zmienna $R(i)$ przyjmuje wartość +1 gdy dana próba i była nagrodzona i miał miejsce prawy wybór, -1 gdy dana próba i była nagrodzona i miał miejsce lewy wybór oraz 0 gdy nie było nagrody. Natomiast zmienna $N(i)$ przyjmuje wartości +1 gdy dana próba i była nienagrodzona i miał miejsce prawy wybór, -1 gdy dana próba i była nienagrodzona i miał miejsce lewy wybór oraz 0 gdy była nagroda. β_j^R oraz β_j^N to współczynniki regresji, które odzwierciedlają siłę związku pomiędzy nagrodzonym (lub nienagrodzonym) wynikiem w poprzedniej próbie a aktualnym wyborem. Współczynniki regresji dla każdego zwierzęcia dopasowane były przy użyciu funkcji “glm” z biblioteki “stats” pakietu R. Dopasowanie modelu oceniono wykorzystując współczynnik pseudo- R^2 McFaddena.

Detekcja sygnału

Teoria detekcji sygnału stanowi o tym, że zdolność do właściwego rozróżniania sygnału jest zależna od czułości jednostki na bodziec (*Stanislaw i Todorov, 1991*). Indeks czułości określany jest przez parametr d' , który jest statystyką bezwymiarową (od $-\infty$ do $+\infty$). Przyjmuje się, że im wyższa jest wartość d' , tym wyższa jest zdolność do rozróżniania sygnału. Indeks czułości może być obliczony na podstawie współczynnika trafień i fałszywych alarmów przy założeniu, że ich odchylenia standardowe są równe. W obliczeniu wartości współczynnika d' posłużono się więc równaniem:

$$d' = z(\text{trafienia}) - z(\text{fałszywe alarmy}) \quad (3)$$

gdzie d' oznacza indeks czułości, a z oznacza standaryzację, w wyniku której zmienne uzyskują średnią wartość oczekiwaną równą 0 i odchylenie standardowe równe 1.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna i wizualizacja danych wykonane zostały przy użyciu programów Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software), SPSS (IBM Analytics) oraz pakietu R (r-project.org). Znamienność statystyczna oceniana była przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), w wariancie między grupowym lub wewnątrz grupowym. Tam gdzie było to uzasadnione, przeprowadzono analizę *post hoc* przy użyciu testu z poprawką Bonferroniego. W szczególnym przypadku odnoszącym się do Ryciny 13, gdzie ze względu na brakujące obserwacje nie było możliwe przeprowadzenie analizy wariancji, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem liniowych modeli mieszanych. W przypadku porównań dwóch grup zastosowano test t-Studenta. Znamienność statystyczna określona była na poziomie $p < 0.05$. Zestawienie wyników przeprowadzonych analiz zawiera tabela statystyczna (Tabela 5), zamieszczona na końcu rozprawy. W kilku przypadkach z analizy statystycznej wykluczono wybrane osobniki. Tabela 2 zawiera informację o zwierzętach usuniętych z analizy, wraz z uzasadnieniem decyzji o ich wykluczeniu.

Tabela 2. Osobniki wykluczone z analiz statystycznych.

Kohorta. Szczep	Procedura	Osobniki	Powód
<u>I. NR1^{DATCreERT2}</u>	uczenie się z losowym wzmocnieniem;	1 kontrola	obserwacja odstająca (test Grubbsa)
	dyskontowanie prawdopodobieństwa	1 mutant	brak preferencji dużej nagrody
<u>III. NR1^{D1CreERT2}</u>	dyskontowanie prawdopodobieństwa	1 kontrola	brak preferencji dużej nagrody
<u>IV. NR1^{DATCreERT2}</u>	warunkowe wzmocnienie	1 mutant	zwierzę nie wykonało żadnej odpowiedzi podczas testu i zmarło tego samego dnia
<u>V. NR1^{DATCreERT2}</u>	narastające kryterium wzmocnienia	3 mutanty	przedwczesne zakończenie zadania/nieosiągnięcie kryterium*
<u>VI. NR1^{DBHCre}</u>	uczenie się z losowym wzmocnieniem	2 kontrole 2 mutanty	niespełnienie kryterium włączenia do testu; jedno zwierzę zmarło w trakcie eksperymentu

* Wyniki uzyskane dla zwierząt, które przedwcześnie zakończyły zadanie i/lub nie osiągnęły kryterium w końcowych próbach, w części analiz traktowane były jako brakujące obserwacje.

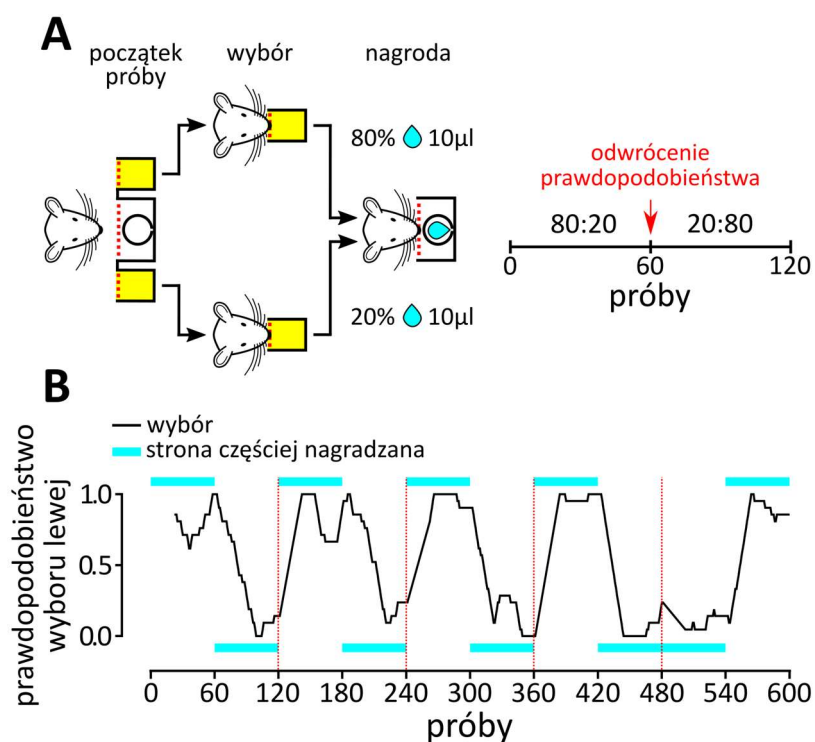
Wyniki

Opis uzyskanych wyników podzielono na dwie części. W części pierwszej omówiono wyniki badań wykonanych na zwierzętach z mutacjami w układzie dopaminowym, a w części drugiej wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach z mutacją w układzie noradrenergicznym. Szczegółowe zestawienie wyników analiz statystycznych zawarto w tabeli statystycznej (Tabela 5), umieszczonej na końcu rozprawy.

1. Wpływ utraty receptorów NMDA i mGluR5 w układzie dopaminowym na uczenie się ze wzmocnieniem i motywację do poszukiwania nagród

Eksperyment 1: Uczenie się z losowym wzmocnieniem

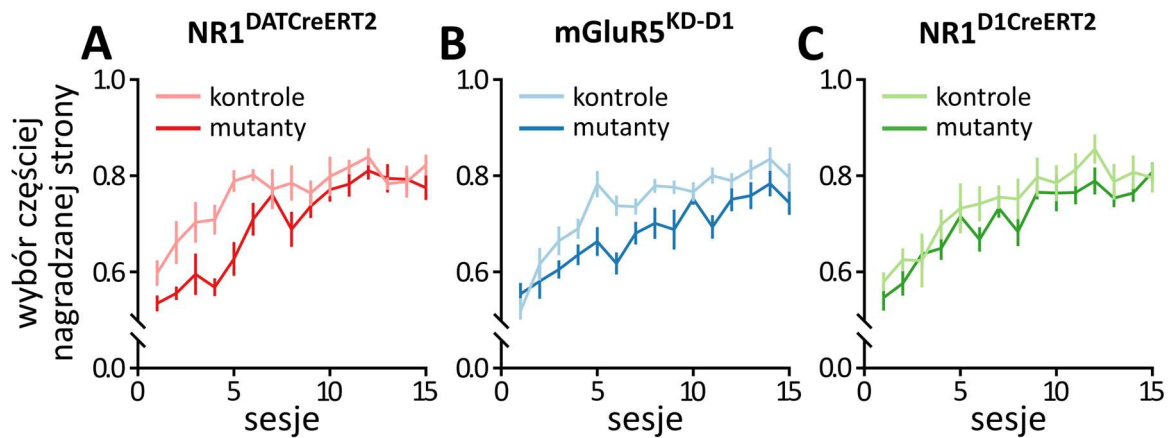
Celem eksperymentu było zbadanie wpływu utraty receptorów NMDA i mGluR5 w neuronach dopaminergicznych i neuronach D1 na proces uczenia się wartości działania i dokonywania wyboru, w warunkach zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody. Zwierzęta miały do wyboru dwa otwory, w które można było wetknąć nos (Rycina 2A). Prawdopodobieństwo uzyskania nagrody (10 μ l wody) wynoszące 80 i 20%, było losowo przypisane do obu otworów. W połowie sesji, prawdopodobieństwo to uległo odwróceniu. Aby uzyskać jak największą ilość nagród zwierzę musiało rozpoznać, która ze stron jest częściej nagradzana i dostosować swoje wybory do zmiany prawdopodobieństwa uzyskania nagrody. Przykład wykonania testu przez reprezentatywne zwierzę prezentuje Rycina 2B.



Rycina 2. Test uczenia się z losowym wzmocnieniem.

A, schemat doświadczenia. **B**, przykład wyborów dokonanych przez jedno reprezentatywne zwierzę w ciągu 5 kolejnych sesji (Sesje 6–10). Czarna linia reprezentuje prawdopodobieństwo wyboru lewego otworu (dane wygładzone przy użyciu 21 punktowej średniej kroczącej). Turkusowy pasek oznacza stronę z większą szansą uzyskania nagrody (góra – lewa strona, dół – prawa strona). Czerwona przerywana linia oznacza granicę sesji.

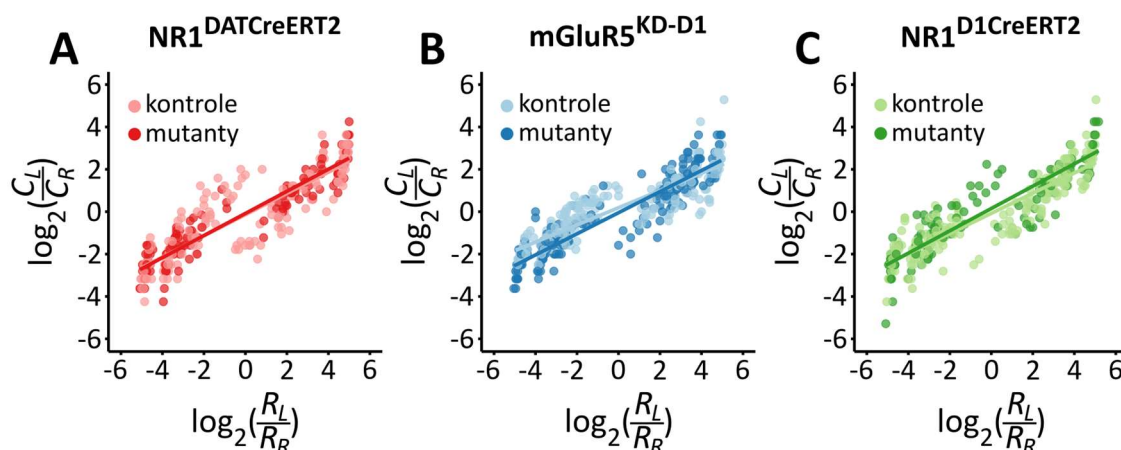
Niezależnie od genotypu, wszystkie grupy wykazały znamienne wzrost częstotliwości wyborów częściej nagradzanej strony, w kolejnych sesjach (Rycina 3). W przypadku myszy ze szczepu $NR1^{DATCreERT2}$, u zwierząt z mutacją można było początkowo zaobserwować wolniejszy wzrost liczby wyborów otworu z większą szansą uzyskania nagrody (Rycina 3A). Średnie prawdopodobieństwo wyboru bardziej korzystnej opcji przez zwierzęta z mutacją w początkowej fazie eksperymentu (sesje 1-5), wynosiło 0.58 ± 0.02 . Mogło to sugerować, iż dokonywane przez nie wybory miały losowy charakter i nie rozróżniały one ich wartości. Niemniej, pod koniec eksperymentu zwierzęta z mutacją osiągnęły poziom równy grupie kontrolnej. W przypadku myszy ze szczepu $mGluR5^{KD-D1}$, prawdopodobieństwo wyboru bardziej korzystnej opcji przez zwierzęta z mutacją było znamienne niższe niż w grupie kontrolnej (Rycina 3B). Natomiast w przypadku myszy ze szczepu $NR1^{D1CreERT2}$, wybory dokonane przez zwierzęta z mutacją nie różniły się od wyborów dokonanych przez zwierzęta kontrolne (Rycina 3C).



Rycina 3. Wybór części nagradzanej strony.

A, prawdopodobieństwo wyboru części nagradzanej strony przez zwierzęta ze szczepu $\text{NR1}^{\text{DATCreERT2}}$ (kontrola: $n = 8$; mutacja: $n = 6$); **B**, zwierzęta ze szczepu $\text{mGluR5}^{\text{KD-D1}}$ (kontrola: $n = 9$; mutacja: $n = 8$); **C**, zwierzęta ze szczepu $\text{NR1}^{\text{D1CreERT2}}$ (kontrola: $n = 9$; mutacja: $n = 6$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM.

Następnie, sprawdziłem czy wybory dokonane przez zwierzęta rozdzielały się pomiędzy obiema możliwościami proporcjonalnie do częstości uzyskiwania w ich wyniku nagród, spełniając tym samym regułę prawa dopasowania. Rycina 4 przedstawia proporcję dokonanych wyborów względem proporcji uzyskanych nagród, gdzie każdy punkt to wartość uzyskana dla jednego bloku. Przy pomocy regresji liniowej, do danych dopasowano linię prostą (oddzielnie dla zwierząt kontrolnych i zwierząt z mutacją). Współczynnik kierunkowy a , określający kąt nachylenia linii regresji względem osi odciętych oraz współczynnik b , określający punkt przecięcia linii regresji z osią rzędnych, informują odpowiednio o wrażliwości na wzmocnienie oraz tendencji do wybierania jednej strony niezależnie od uzyskanego wzmocnienia (wartości parametrów modelu zawarte są w Tabeli 3). Model wyjaśniał więcej niż 80% zaobserwowanej zmienności we wszystkich grupach (wartości R^2 w Tabeli 3). Oznacza to, iż zachowanie zwierząt było w znacznej mierze zgodne z prawem dopasowania, a ich wybory były w istocie zależne od proporcji uzyskanych nagród. Niemniej, u zwierząt ze szczepu $\text{mGluR5}^{\text{KD-D1}}$ wartość parametru a , określającego wrażliwość na wzmocnienie była znacząco niższa w grupie zwierząt z mutacją niż w odpowiadającej im grupie zwierząt kontrolnych. Oznacza to, że zwierzęta z mutacją były mniej wrażliwe na pozytywne wzmocnienie.



Rycina 4. Zgodność wyborów z prawem dopasowania.

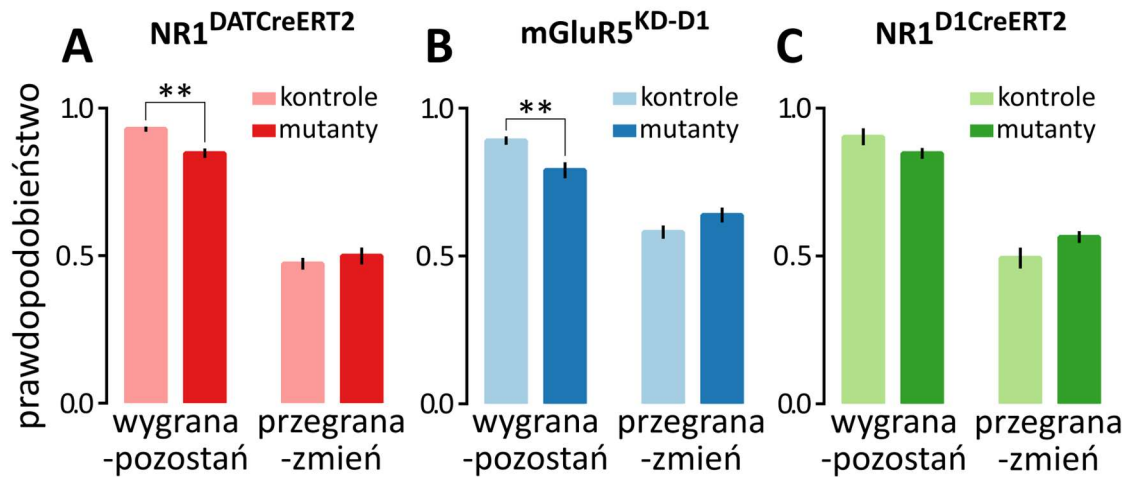
A, dopasowanie modelu do wyborów dokonanych przez zwierzęta ze szczepu NR1^{DATCreERT2} (kontrola: $n = 8$; mutanty: $n = 6$); **B**, zwierzęta ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$); **C**, zwierzęta ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola $n = 9$; mutanty: $n = 6$).

Tabela 3. Wartości parametrów modelu.

Szczep	Genotyp	N	Wrażliwość (a)	Tendencja (b)	R^2
NR1 ^{DATCreERT2}	kontrola	6	0.52 ± 0.02	-0.1 ± 0.03	0.90
	mutanty	8	0.47 ± 0.02	-0.14 ± 0.23	0.82
mGluR5 ^{KD-D1}	kontrola	8	0.49 ± 0.01	-0.03 ± 0.09	0.87
	mutanty	9	$0.40 \pm 0.02^{***}$	0.19 ± 0.11	0.81
NR1 ^{D1CreERT2}	kontrola	6	0.53 ± 0.04	0.20 ± 0.13	0.84
	mutanty	9	0.47 ± 0.01	-0.08 ± 0.11	0.83

*** $p < 0.001$ (test t-Studenta)

Dalej, sprawdziłem czy wynik poprzednich wyborów wpływał na decyzję o dokonaniu kolejnego wyboru. W tym celu obliczyłem prawdopodobieństwo powtórzenia tego samego wyboru, gdy poprzednia odpowiedź była nagrodzona (*wygrana-pozostań*) oraz prawdopodobieństwo dokonania wyboru alternatywnego, gdy poprzednia odpowiedź nie była nagrodzona (*przegrana-zmień*). Z analizy wynikało, iż myszy z mutacją ze szczepu NR1^{DATCreERT2} i mGluR5^{KD-D1} były mniej skłonne do powtórzenia poprzednio nagrodzonego wyboru niż odpowiadające im zwierzęta kontrolne (Rycina 5A-B). Jednak w przypadku wyborów nienagrodzonych, u zwierząt tych nie zaobserwowano wpływu mutacji na zmianę poprzednio wybranej strony. Z kolei u myszy ze szczepu NR1^{D1CreERT2} nie obserwowano wpływu mutacji na żaden z analizowanych parametrów (Rycina 5C).

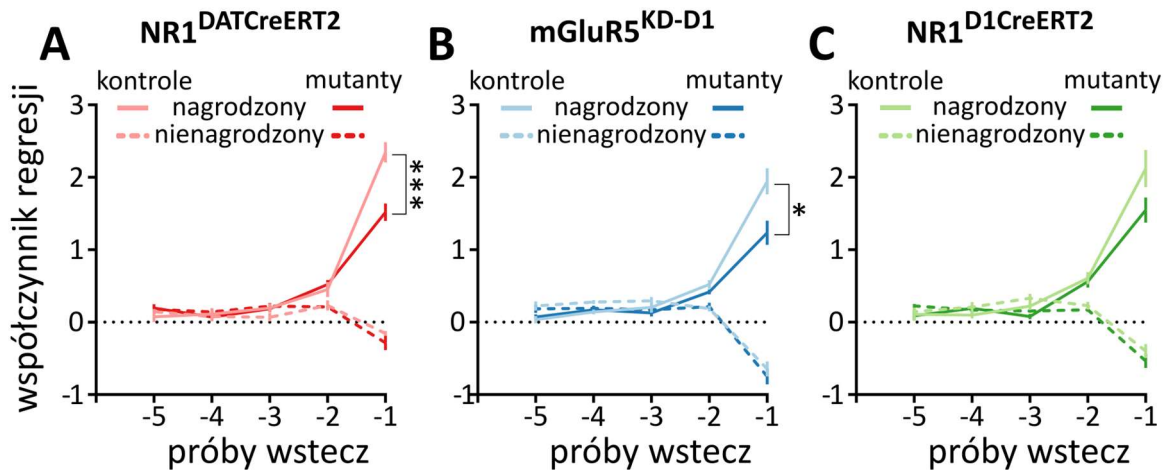


Rycina 5. Prawdopodobieństwo powtórzenia nagrodzonego wyboru.

A, prawdopodobieństwo danego zdarzenia dla zwierząt ze szczepu NR1^{DATCreERT2} (kontrola: $n = 8$; mutanty: $n = 6$); **B**, zwierząt ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$); **C**, zwierząt ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola $n = 9$; mutanty: $n = 6$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. ** $p < 0.01$ (test t-Studenta).

W celu rozszerzenia analizy i określenia wpływu pięciu poprzednich wyborów (oraz ich wyniku) na aktualny wybór, wykorzystałem model regresji logistycznej. Model zapewniał dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych, średnie wartości pseudo- R^2 McFaddena dla grup wynosiły odpowiednio: 0.32 i 0.47, dla myszy z mutacją i ich kontroli w szczepie NR1^{DATCreERT2}; 0.25 i 0.41 dla myszy z mutacją i ich kontroli w szczepie mGluR5^{D1-KD}; 0.32 i 0.45, dla myszy z mutacją i ich kontroli w szczepie NR1^{D1CreERT2}. Oznaczało to, że przy dokonywaniu kolejnych wyborów zwierzęta korzystały z informacji o poprzednim wyniku. W modelu tym, współczynniki regresji określają siłę związku pomiędzy wynikiem w poprzedniej próbie a aktualnym wyborem. Dodatni współczynnik regresji wskazuje na wzrost prawdopodobieństwa powtórzenia poprzednio dokonanego wyboru, a ujemny współczynnik regresji wskazuje na redukcję prawdopodobieństwa powtórzenia poprzedniego wyboru, czyli na większą szansę zmiany. Wszystkie grupy zwierząt były bardziej skłonne ponownie wybrać tą samą stronę, gdy poprzedni wybór był nagrodzony oraz mniej skłonne wybrać ją ponownie, gdy poprzedni wybór nie był nagrodzony (Rycina 6). Z analizy wynikało również, że wpływ poprzednich wyborów zmniejszał się wraz ze wzrastającą ilością prób wstecz, tak że wynik wyborów wykraczających poza drugą próbę nie miały znaczącego wpływu na aktualny wybór. Myszy z mutacją ze szczepu NR1^{DATCreERT2} i mGluR5^{KD-D1} były mniej skłonne niż odpowiadające im zwierzęta kontrolne do powtórzenia poprzedniego wyboru, gdy był

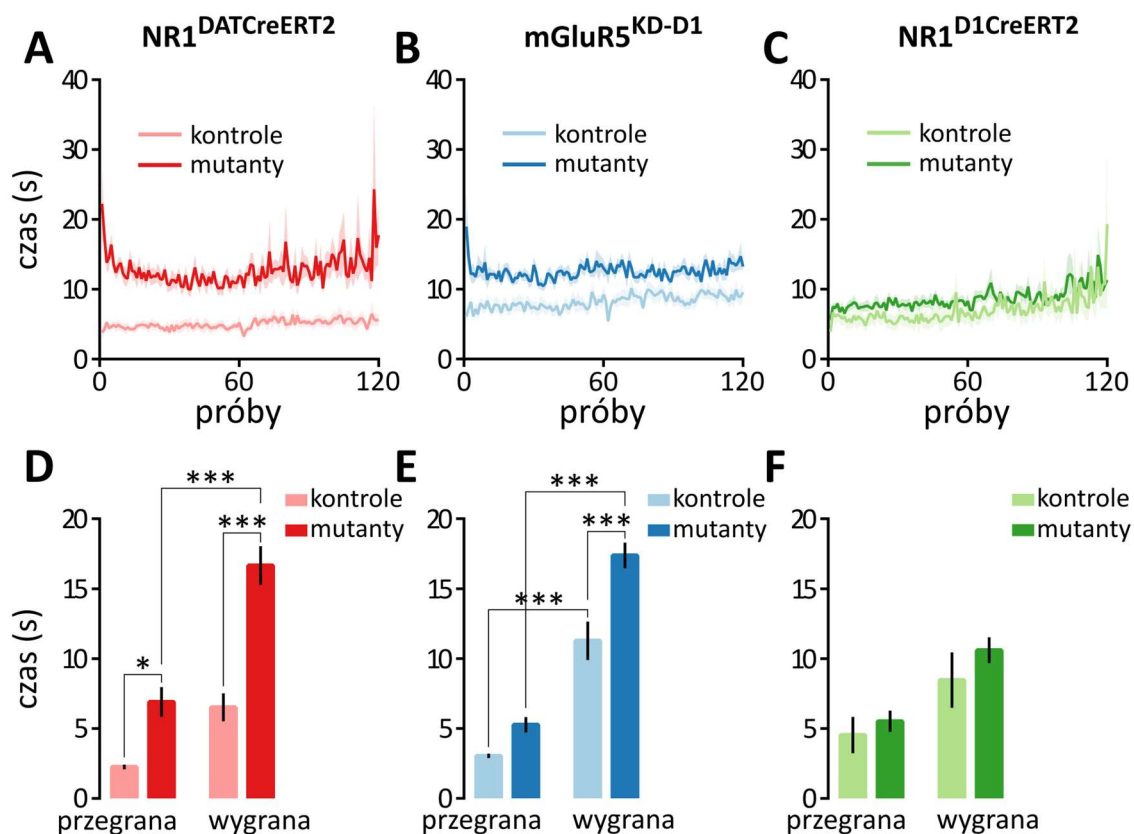
on nagrodzony (Rycina 6A-B). Podobny efekt można było obserwować u myszy ze szczepu NR1^{D1CreERT2}, niemniej w porównaniu z grupą kontrolną efekt mutacji nie był znamieny (Rycina 6C). W przypadku wyborów nienagrodzonych, żadna z mutacji nie miała znamienego wpływu na skłonność do zmiany poprzednio wybranej strony.



Rycina 6. Wpływ poprzednich wyborów na aktualny wybór.

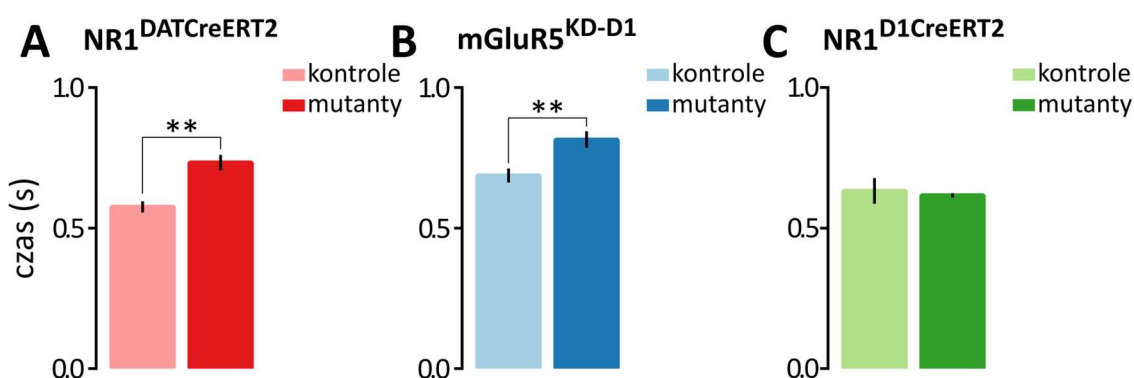
A, wartości współczynników regresji dla zwierząt ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola: $n = 8$; mutanty: $n = 6$). **B**, zwierząt ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$). **C**, zwierząt ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola $n = 9$; mutanty: $n = 6$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (test t-Studenta).

Dodatkowo, zmierzony został czas dokonania wyboru, czyli czas jaki upłynął od rozpoczęcia próby (zapalenie światła w otworach) do wetknięcia nosa w jeden z aktywnych otworów oraz czas pobrania nagrody, czyli czas jaki upłynął od dostarczenia nagrody do zajrzenia do podajnika na wodę. Analiza czasów reakcji wykazała, że myszy z mutacją ze szczepu NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{KD-D1} potrzebowały więcej czasu na dokonanie wyboru (Rycina 7A-B). Czas dokonania wyboru był zależny od wyniku uzyskanego w poprzedniej próbie, tak że opóźnienie u myszy z mutacją było dłuższe gdy poprzednia próba była nagrodzona (Rycina 7D-E). Dodatkowo, mutacja u myszy NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{KD-D1} miała znamieny, aczkolwiek nieduży wpływ na czas pobrania nagrody (Rycina 8A-B). Nie zaobserwowano wpływu mutacji na czas dokonania wyboru lub pobrania nagrody u myszy ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (Rycina 7C, 7F i 8C). Eksperyment 1 wykazał, iż zwierzęta z mutacją ze szczepu NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{KD-D1} były mniej skłonne do wyboru częściej nagradzanej opcji oraz mniej skłonne do powtórzenia poprzednio nagrodzonego działania. Potrzebowały one również więcej czasu na podjęcie decyzji o dokonaniu kolejnego wyboru.



Rycina 7. Czas dokonania wyboru.

A–C, czas podjęcia decyzji o dokonaniu wyboru (próba po próbie). D–F, wpływ wyniku poprzedniego wyboru na czas dokonania wyboru w kolejnej próbie. **A i D**, zwierzęta ze szczepu NR1^{DATCreERT2} (kontrola: $n = 8$; mutanty: $n = 6$); **B i E**, zwierzęta ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$); **C i F**, zwierzęta ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola $n = 9$; mutanty: $n = 6$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (test Bonferroniego).

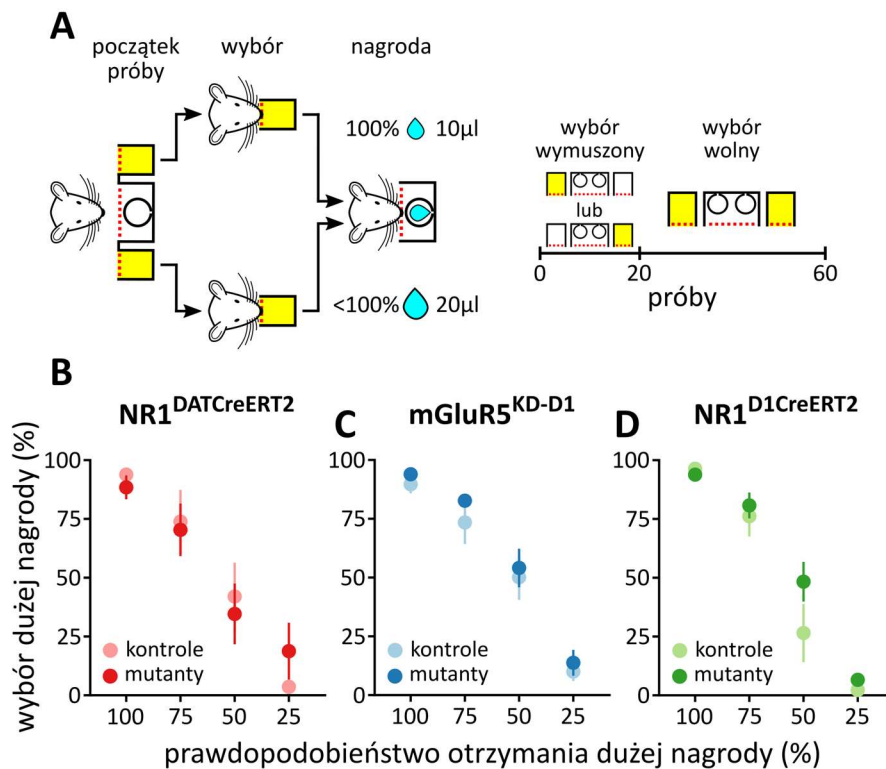


Rycina 8. Czas pobrania nagrody.

A, czas jaki upłynął od dostarczenia nagrody do zajrzenia do podajnika na wodę u zwierząt ze szczepu NR1^{DATCreERT2} (kontrola: $n = 8$; mutanty: $n = 6$); **B**, zwierzęta ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$); **C**, zwierzęta ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 6$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. ** $p < 0.01$ (test t-Studenta).

Eksperyment 2: Ocena wartości nagród

Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy usunięcie receptorów dla glutaminianu w układzie dopaminowym wpływa na ocenę wartości nagród. W doświadczeniu wykorzystano zwierzęta badane wcześniej w teście uczenia się z losowym wzmocnieniem. Tym razem dokonywały one wyboru między otworami zapewniającymi możliwość uzyskania 10 lub 20 μl wody (Rycina 9A). Każda sesja składała się z 20 prób „wymuszonych”, w których możliwy był wybór tylko jednej strony i 40 prób „wolnych”, zapewniających możliwość swobodnego wyboru preferowanej strony. W próbach wolnych, zwierzęta częściej wybierały stronę po której prezentowana była większa objętość wody (Rycina 9B–D). Przeciętna preferencja strony z dużą nagrodą (średnia z 5 dni) mieściła się w przedziale od 68.5% do 100% (średnia: $92.6\% \pm 1.25$).

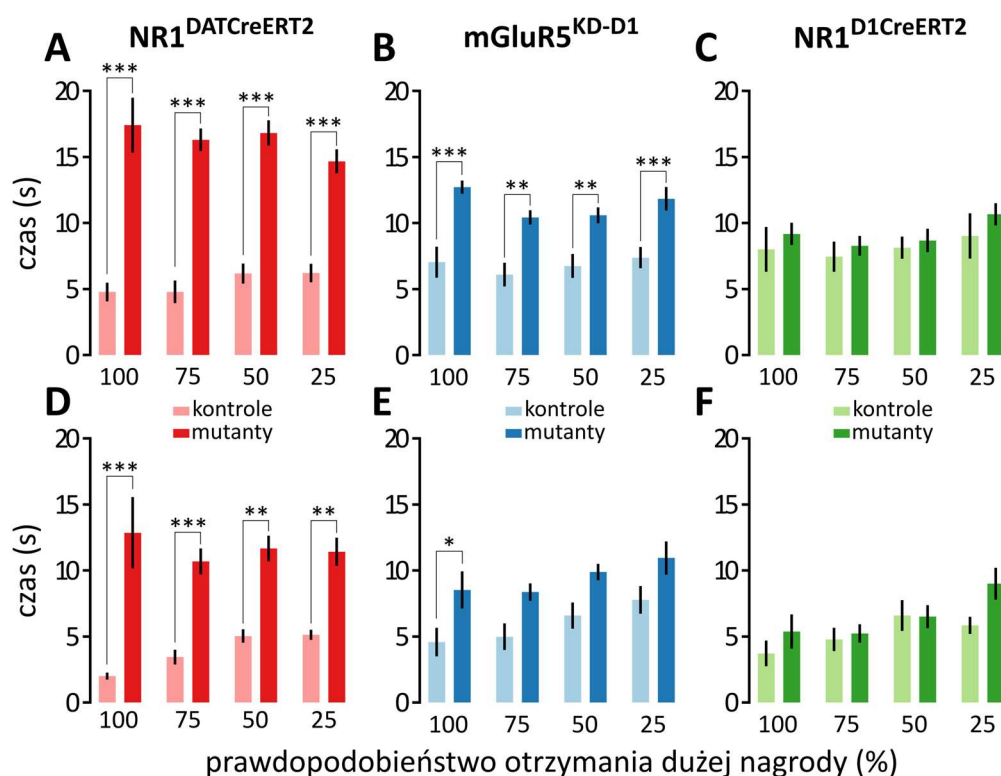


Rycina 9. Ocena wartości nagród.

A, schemat testu. **B**, procent wyboru dużej nagrody przez zwierzęta ze szczepu $\text{NR1}^{\text{DATCreERT2}}$ (kontrola: $n = 7$; mutanty: $n = 6$); **C**, zwierzęta ze szczepu $\text{mGluR5}^{\text{KD-D1}}$ (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$); **D**, zwierzęta ze szczepu $\text{NR1}^{\text{D1CreERT2}}$ (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 5$).

Następnie, sprawdziłem czy obniżenie wartości dużej nagrody, wywołane wzrostem niepewności jej uzyskania (dyskontowanie prawdopodobieństwa), ma wpływ na preferencję dużej nagrody. W tym celu prawdopodobieństwo uzyskania dużej nagrody było stopniowo

zmniejszane, tak iż wynosiło ono odpowiednio: 75, 50 i 25%. Zmiany następowały co 4-5 dni, tak więc każdy punkt na Rycinie 9 prezentuje średnią ilość wyborów dużej nagrody. Proporcjonalnie do spadku prawdopodobieństwa uzyskania dużej nagrody można było zaobserwować spadek ilości jej wyborów. Oznacza to, że zwierzęta postrzegały wybór strony z dużą nagrodą jako mniej korzystny i wybierały mniejszą, ale pewną nagrodę. Żadna z mutacji nie miała jednak wpływu na preferencję nagród. Można było natomiast zaobserwować wpływ mutacji na czas dokonania wyboru (Rycina 10). Czas podjęcia decyzji o dokonaniu wyboru u myszy z mutacją ze szczepu NR1^{DATCreERT2} i mGluR5^{KD-D1} był znacząco dłuższy niż u odpowiadających im zwierząt kontrolnych, zarówno w próbach wymuszonych (Rycina 10A-B), jak i próbach wolnych (Rycina 10D-E). Efektu tego nie obserwowano u myszy ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (Rycina 10C i F). Eksperyment 2 wykazał, że zależne od receptorów dla glutaminianu przekazywanie sygnału w neuronach układu dopaminowego, nie jest konieczne dla dokonania oceny wartości nagród.

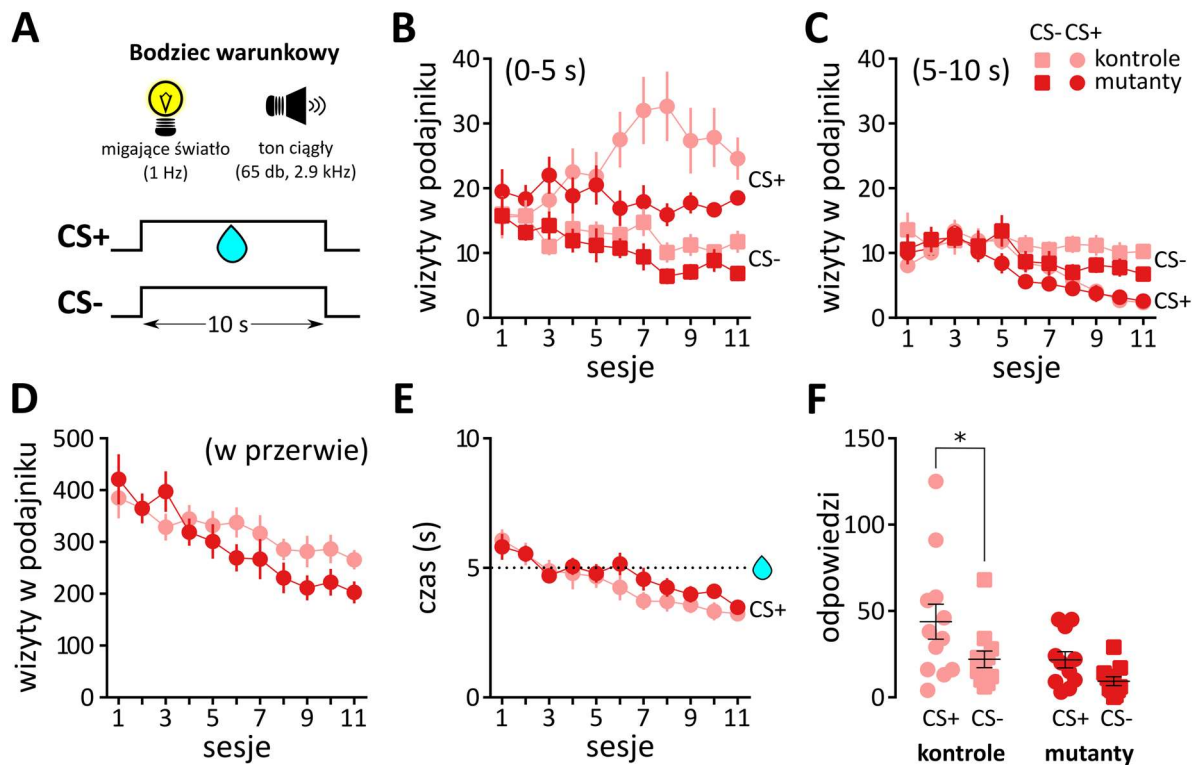


Rycina 10. Czas dokonania wyboru.

A–C, czas podjęcia decyzji o dokonaniu wyboru w próbach wymuszonych. D–F, w próbach wolnych. A i D, zwierzęta ze szczepu NR1^{DATCreERT2} (kontrola: $n = 7$; mutanci: $n = 6$); B i E, zwierzęta ze szczepu mGluR5^{KD-D1} (kontrola: $n = 9$; mutanci: $n = 8$); zwierzęta ze szczepu NR1^{D1CreERT2} (kontrola: $n = 9$; mutanci: $n = 5$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test Bonferroni).

Eksperyment 3: Ocena wartości predykcyjnej i motywacyjnej bodźców

Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy zahamowanie aktywności zależnej od receptora NMDA w neuronach dopaminergicznych u myszy ze szczepu NR1^{DATCreERT2} ma wpływ na ocenę wartości predykcyjnej oraz wartości motywacyjnej bodźców skojarzonych z nagrodą.



Rycina 11. Ocena wartości predykcyjnej i motywacyjnej bodźców.

A, bodźce warunkowe wykorzystane w doświadczeniu. **B**, ilość wizyt w podajniku przed przewidywanym czasem prezentacji nagrody. **C**, ilość wizyt w podajniku z nagrodą po przewidywanym czasie prezentacji nagrody. **D**, ilość wizyt w podajniku z nagrodą podczas przerw między prezentacjami. **E**, czas jaki upłynie od momentu prezentacji bodźca CS+ do pierwszej wizyty w podajniku na nagrodę. **F**, ilość odpowiedzi instrumentalnych związanych z prezentacją bodźców CS+ i CS- w teście warunkowego wzmocnienia. **B–E**, kontrolne: $n = 12$; mutanty: $n = 12$; **F**, kontrolne: $n = 12$; mutanty: $n = 11$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, (test Bonferroniego).

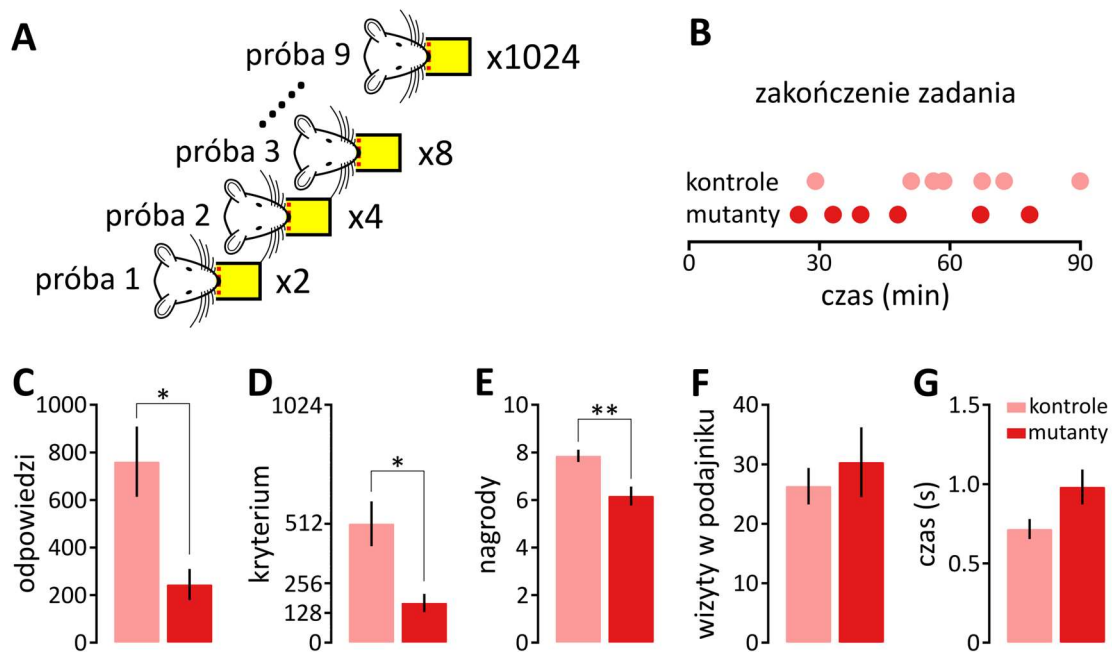
Zwierzętom prezentowano bodziec warunkowy (CS+) skojarzony z dostarczeniem 20 μ l wody oraz drugi bodziec (CS-), którego prezentacja nie była skojarzona z nagrodą (Rycina 11A). Zarówno zwierzęta kontrolne, jak i myszy z mutacją wykonywały więcej wetknięć pyszczką do podajnika na wodę podczas pierwszych 5 sekund prezentacji bodźca CS+ (przed pojawieniem się nagrody) niż podczas prezentacji bodźca CS- (Rycina 11B).

Liczba wizyt w podajniku na wodę w ostatnich 5 sekundach (po prezentacji nagrody), podczas prezentacji bodźca CS+, ulegała wygaszeniu (Rycina 11C), podobnie jak ilość wizyt podczas przerw między prezentacjami (Rycina 11D). W kolejnych sesjach, zwierzęta z obu grup zaglądały do podajnika tuż przed pojawieniem się nagrody (Rycina 11E). Oznacza to, że niezależnie od genotypu, zwierzęta były w stanie odróżnić, który z bodźców przewiduje nagrodę i oczekiwały na moment jej dostarczenia. Ilość wizyt w podajniku na nagrodę podczas prezentacji bodźca CS+, w kolejnych sesjach, była znacznie wyższa u zwierząt kontrolnych w porównaniu do myszy z mutacją (Rycina 11B). Mogło to oznaczać, iż dla zwierząt z mutacją bodziec CS+ nie zyskał wartości motywacyjnej, zachęcającej do wzmożonego poszukiwania nagrody. Aby to potwierdzić wykonałem test warunkowego wzmocnienia, w którym zwierzęta mogły wykonać odpowiedź instrumentalną (wetknięcie nosa w jeden z dwóch otworów). Wetknięcie nosa w pierwszy otwór skutkowało prezentacją bodźca CS+, a wetknięcie nosa w drugi otwór wyzwało prezentację bodźca CS-. U zwierząt kontrolnych można było zaobserwować znamienne wzrost odpowiedzi instrumentalnych związanych z prezentacją bodźca CS+, w porównaniu do ilości wetknięć nosa w otwór skojarzony z prezentacją bodźca CS- (Rycina 11F). Efektu tego nie obserwowano u zwierząt z mutacją. Oznacza to, iż dla zwierząt kontrolnych, ale nie dla mutantów, bodziec CS+ zyskał dodatkowo wartość nagradzającą samą w sobie i działał jako warunkowe wzmocnienie. Eksperyment 3 wykazał, że dla myszy z mutacją ze szczepu NR1^{DATCreERT2} bodziec przewidujący nagrodę nie zyskuje wartości motywacyjnej, zachęcającej do jej wzmożonego poszukiwania.

Eksperyment 4: Ocena kosztu uzyskania nagrody

Skutkiem usunięcia receptorów NMDA z neuronów dopaminergicznych, obserwowanym u zwierząt NR1^{DATCreERT2} w eksperymentach 1–3 było opóźnienie podjęcia działania oraz obniżenie motywacji do zaangażowania się w poszukiwanie nagrody. Celem tego eksperymentu było zbadanie wpływu mutacji w neuronach dopaminergicznych na motywację do zdobycia nagrody w sytuacji rosnącego kosztu jej uzyskania. Aby to sprawdzić wykorzystałem procedurę narastającego kryterium wzmocnienia, gdzie zwierzę musiało wykonać określoną ilość odpowiedzi, aby uzyskać nagrodę (10 µl wody). Kryterium ustalono na dwa wetknięcia nosa w otwór aktywny podczas pierwszej próby i podwajano je w każdej kolejnej (Rycina 12A). Jeżeli zwierzę przerwało

wykonywanie zadania i nie wykonało żadnej odpowiedzi przez 3 minuty, eksperyment ulegał zakończeniu. Wszystkie zwierzęta, z wyjątkiem jednego osobnika z grupy kontrolnej, zakończyły eksperyment przed czasem (Rycina 12B). W trakcie eksperymentu myszy z mutacją wykonały znacznie mniej odpowiedzi instrumentalnych niż zwierzęta kontrolne (Rycina 12C), osiągnęły niższe kryterium (Rycina 12D) i w konsekwencji uzyskały mniej nagród (Rycina 12E). Nie zaobserwowano znamiennego wpływu mutacji na ilość wizyt w podajniku na nagrodę (Rycina 12F) czy szybkość pobrania nagrody (Rycina 12G).

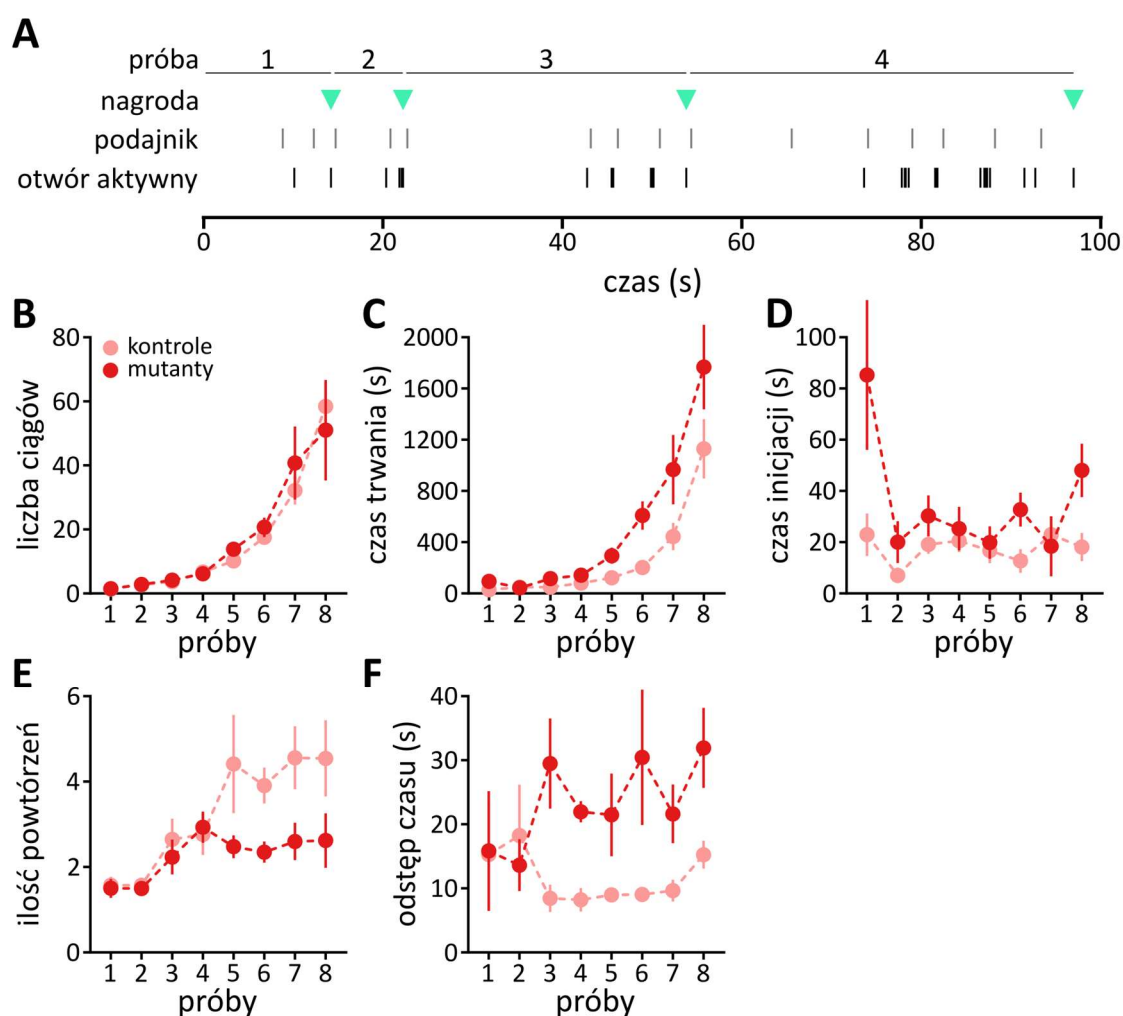


Rycina 12. Motywacja do zdobycia nagrody.

A, schemat doświadczenia. **B**, indywidualne czasy zakończenia zadania. **C**, wykonane odpowiedzi. **D**, osiągnięte kryterium. **E**, uzyskane nagrody. **F**, wizyty w podajniku na nagrodę. **G**, czas do pobrania nagrody. **B–G**, kontrole: $n = 7$; mutanty: $n = 6$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (test t-Studenta).

W czasie eksperymentu zachowanie zwierząt charakteryzowało się występowaniem dwóch typów działania: wetknięcie nosa w otwór aktywny lub wizyta w podajniku na nagrodę. Działania te rejestrowane były jako pojedyncze akcje lub ciąg zdarzeń tego samego rodzaju (Rycina 13A). Ponieważ mutacja miała znamieny wpływ na ilość wykonanych odpowiedzi instrumentalnych, ale nie na ilość wizyt w podajniku na nagrodę, skupiłem się na analizie sekwencji wetknięć nosa w otwór aktywny. W kolejnych próbach, liczba ciągów wetknięć nosa w otwór aktywny wzrastała proporcjonalnie do narastającego kryterium wzmocnienia (Rycina 13B), podobnie wydłużał się czas trwania kolejnych prób

(Rycina 13C). Zaangażowanie się w wykonanie zadania definiowane było przez czas inicjacji (pierwsze wetknięcie od momentu rozpoczęcia próby), liczbę powtórzeń akcji w ciągu oraz czas jaki upłynął od zakończenia poprzedniego ciągu wetknięć do rozpoczęcia kolejnego. Zwierzęta z mutacją charakteryzowały się dłuższym czasem inicjacji (Rycina 13D), mniejszą ilością powtórzeń w ciągu (Rycina 13E) oraz dłuższym odstępem pomiędzy kolejnymi ciągami (Rycina 13F). Eksperyment 4 wykazał, że zwierzęta z mutacją były mniej zmotywowane do zaangażowania się w wykonanie zadania i poniesienia wysokiego kosztu uzyskania nagrody, a ich działanie charakteryzowało się mniejszym wigorem.



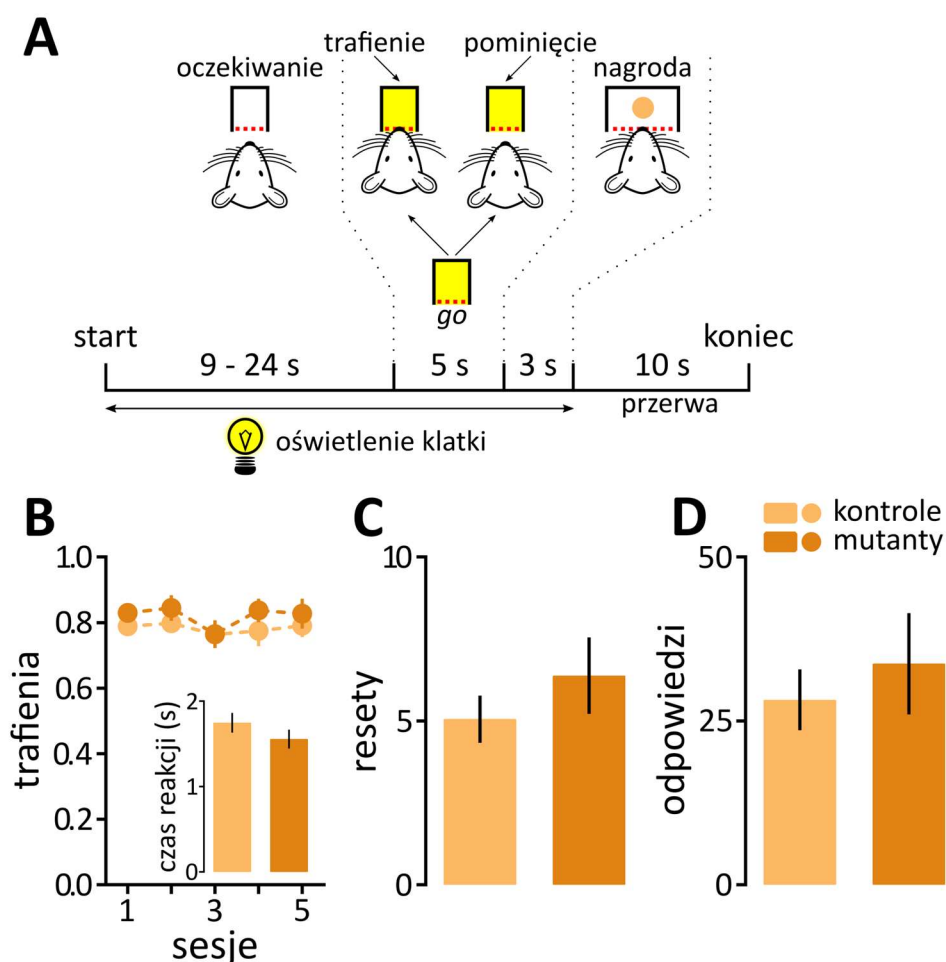
Rycina 13. Wigor działania.

A, przykład sekwencji zdarzeń u reprezentatywnego osobnika, w trakcie czterech pierwszych prób. **B**, liczba ciągów wetknięć nosa w otwór aktywny. **C**, czas trwania prób. **D**, czas jaki upłynął od momentu rozpoczęcia próby do pierwszego wetknięcia. **E**, średnia ilość powtórzeń wetknięć nosa w ciągu. **F**, średni odstęp czasu pomiędzy ciągami wetknięć nosa w otwór aktywny. **B–F**, kontrole: $n = 7$; mutanty: $n = 6$ (próby 1-6), $n = 4$ (próba 7), $n = 3$ (próba 8). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM.

2. Wpływ utraty receptorów NMDA w neuronach noradrenergicznych na percepcyjne podejmowanie decyzji i adaptację do zmieniających się wymagań otoczenia

Eksperyment 5: Detekcja sygnału

Jednym z procesów regulowanych przez neurony noradrenergiczne miejsca sinawego jest reakcja na bodźce sensoryczne towarzyszące zdarzeniom o istotnym znaczeniu. Celem eksperymentu było zbadanie wpływu usunięcia receptora NMDA z neuronów noradrenergicznych na zdolność do detekcji bodźca przewidującego możliwość uzyskania nagrody.



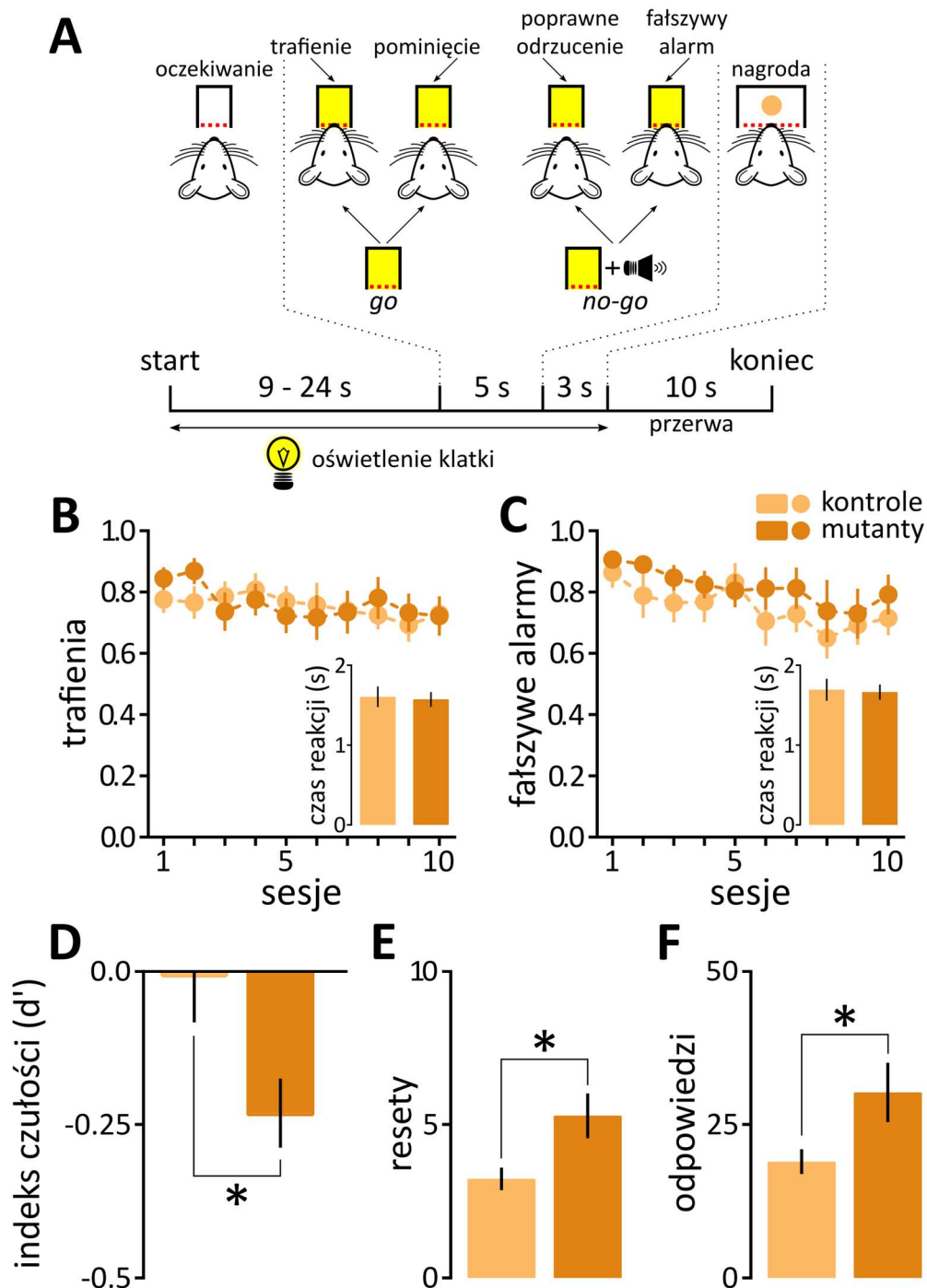
Rycina 14. Detekcja sygnału.

A, schemat doświadczenia. **B**, proporcja trafień oraz czas reakcji. **C**, liczba resetów okresu oczekiwania. **D**, liczba przedwczesnych odpowiedzi (przed pojawieniem się sygnału). **B–D**, kontrola: $n = 11$; mutanty: $n = 10$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM.

Zwierzęta ze szczepu NR1^{DBHCre} uczyły się wtykać nos w otwór aktywny w odpowiedzi na pojawienie się sygnału (zapalenie światła w otworze) prezentowanego przez 5 sekund (Rycina 14A). Wetknięcie nosa w otwór aktywny podczas prezentacji sygnału rejestrowane było jako trafienie i skutkowało dostarczeniem nagrody (20 mg pokarmu) do podajnika na jedzenie. Prezentacja sygnału poprzedzona była okresem oczekiwania. Jeżeli wetknięcie nosa w otwór aktywny nastąpiło na trzy sekundy przed pojawieniem się sygnału, okres oczekiwania był wznawiany (resetowany). Nie zaobserwowano wpływu mutacji na zdolność do detekcji sygnału. Zarówno myszy z mutacją, jak i zwierzęta kontrolne charakteryzowały się wysoką ilością trafień (średnia ilość trafień wynosiła odpowiednio: $80\% \pm 0.03$ i $79\% \pm 0.03$), która utrzymywała się na stabilnym poziomie przez cały czas trwania eksperymentu (Rycina 14B). Mutacja nie miała też wpływu na czas dokonania wyboru, czyli czas jaki upłynął od momentu prezentacji sygnału, do wetknięcia nosa w aktywny otwór (Rycina 14B), liczbę resetów okresu oczekiwania (Rycina 14C) czy całkowitą ilość przedwczesnych wetknięć nosa w aktywny otwór (Rycina 14D). Eksperyment 5 wykazał, że mutacja u myszy NR1^{DBHCre} nie miała wpływu na zdolność do detekcji sygnału przewidującego możliwość uzyskania nagrody i wykonania szybkiej reakcji w odpowiedzi na ten sygnał.

Eksperyment 6: Selektywność uwagi

Oprócz nakierowania uwagi na detekcję sygnału, aktywności miejsca sinawego reguluje proces selektywnego przetwarzania informacji percepcyjnych i podejmowania decyzji o wykonaniu właściwej reakcji. Celem eksperymentu było zbadanie wpływu zahamowania zależnego od receptora NMDA przekazywania sygnału w układzie noradrenergicznym na selektywność uwagi. W tym celu procedura opisana w poprzednim eksperymencie została zmodyfikowana w taki sposób, że w trakcie sesji oprócz znanego już zwierzęciu sygnału (zapalenie światła w otworze aktywnym) prezentowany był również drugi sygnał (zapalenie światła w obu otworach połączone z emisją tonu ciągłego). Aby uzyskać nagrodę (20 mg pokarmu), zwierzę musiało skupić uwagę na rozpoznaniu znanego sygnału (*go*) oraz powstrzymać się od wykonania odpowiedzi, podczas prezentacji nowego sygnału (*no-go*) (Rycina 15A). Wykonanie odpowiedzi w trakcie prezentacji sygnału *no-go* rejestrowane było jako fałszywy alarm.



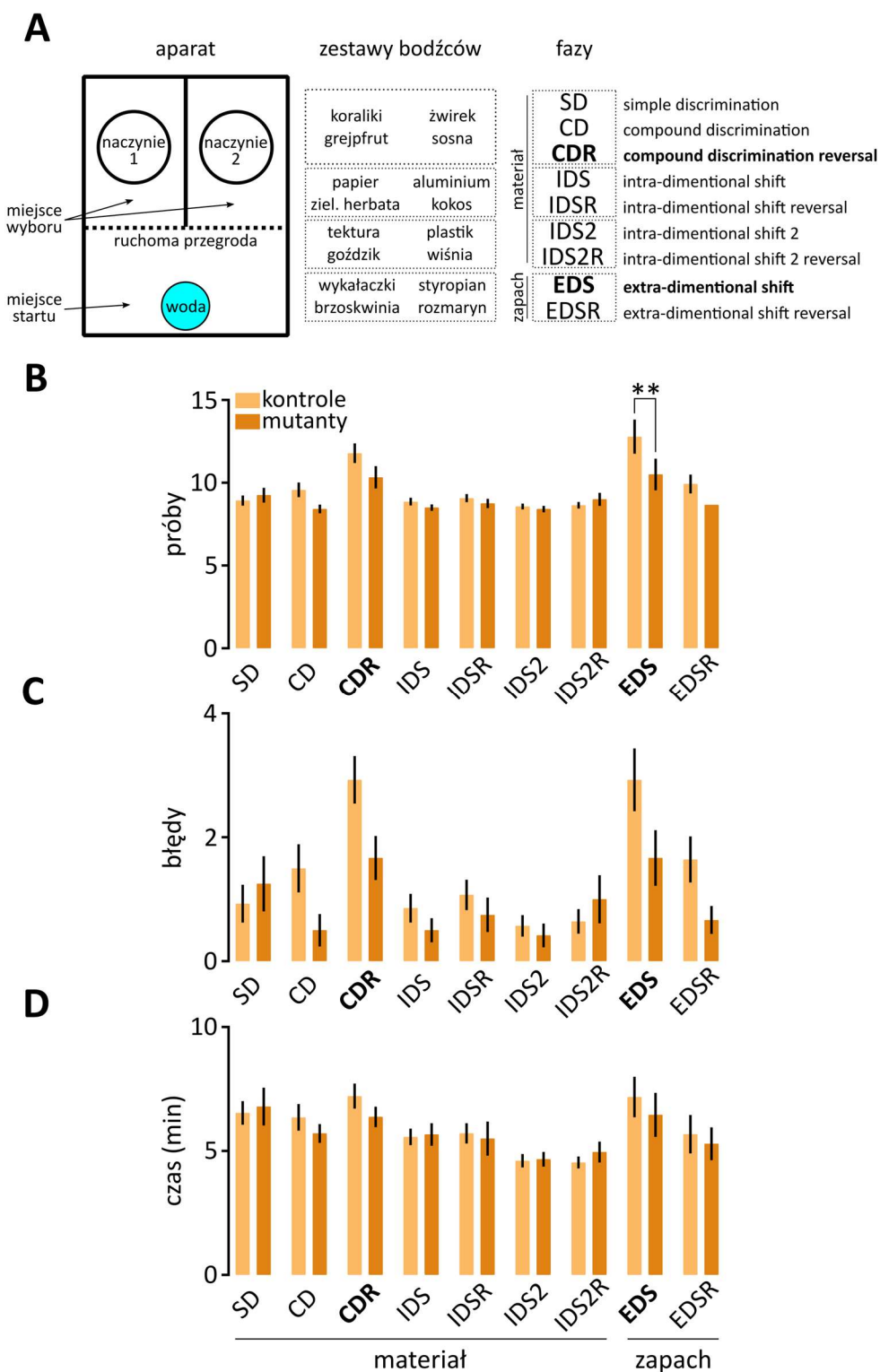
Rycina 15. Selektowność uwagi.

A, schemat doświadczenia. **B**, proporcja trafień oraz czas reakcji. **C**, proporcja fałszywych alarmów oraz czas reakcji. **D**, wartość współczynnika czułości. **E**, liczba resetów okresu oczekiwania. **F**, liczba przedwczesnych odpowiedzi (przed pojawieniem się sygnału). **B–F**, kontrola: $n = 11$; mutant: $n = 10$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$ (test t-Studenta).

Zarówno zwierzęta kontrolne jak i myszy z mutacją utrzymywały wysoki poziom trafień w odpowiedzi na sygnał *go* (średnia: $76\% \pm 0.04$ i $76\% \pm 0.05$), przez cały czas trwania eksperymentu (Rycina 15B). Niemniej, obie grupy charakteryzowały się również niską zdolnością do powstrzymania od wykonania odpowiedzi podczas prezentacji sygnału *no-go*, tj. wysoką liczbą fałszywych alarmów (średnia: $75\% \pm 0.05$ i $81\% \pm 0.05$) (Rycina 15C). Nie obserwowano przy tym wpływu mutacji na czas wykonania reakcji (Rycina 15B-C). Wysoka ilość trafień oraz równie wysoka ilość fałszywych alarmów mogła wynikać z trudności w rozróżnieniu obu sygnałów, ze względu na ich podobieństwo. Posługując się indeksem czułości zaczerpniętym z teorii detekcji sygnału mogłem wykazać, iż istotnie wynikało to z niskiej zdolności do rozróżnienia sygnałów (indeks d' bliski 0) (Rycina 15D). Wartość indeksu czułości była znamienne niższa u myszy z mutacją, co więcej u mutantów można było obserwować wyższą ilość resetów okresu oczekiwania na sygnał (Rycina 15E) oraz wyższą ilość przedwczesnych odpowiedzi (Rycina 15F). Eksperyment 6 nie wykazał w sposób jednoznaczny, czy mutacja u myszy NR1^{DBHCre} wpływa na selektywność uwagi. Niemniej jednak, w warunkach wymagających selektywnego skupienia uwagi, u myszy z mutacją można było zaobserwować wzrost przedwczesnych odpowiedzi.

Eksperyment 7: Przerzutności uwagi

Aktywność układu noradrenergicznego związana jest z adaptacją do zmieniających się wymagań otoczenia, np.: odwrócenia zależności między bodźcami przewidującymi nagrodę lub zmiany zasad jej uzyskania. Celem eksperymentu było zbadanie wpływu mutacji u myszy ze szczepu NR1^{DBHCre} na zdolność przełączania uwagi między dwoma aspektami otoczenia, które wymagają korzystania z odmiennych modalności zmysłowych. W teście tym zwierzęta dokonywały wyboru pomiędzy dwoma szklanymi naczyniami, oznakowanymi przez bodźce przynależące do dwóch kategorii: (1) rodzaj materiału, którym były wypełnione oraz (2) zapach naniesiony na ścianę naczynia (Rycina 16A). Posługując się informacją o rodzaju wypełnienia i zapachu, mysz miała możliwość nauczyć się, które naczynie należy wybrać aby uzyskać nagrodę (20 mg pokarmu o smaku czekolady). Eksperyment składał się z kilku faz, w trakcie których dochodziło do odwrócenia zależności między bodźcami przewidującymi nagrodę (fazy CDR, IDSR, IDS2R, EDSR) oraz zmiany zasad jej uzyskania (faza EDS).



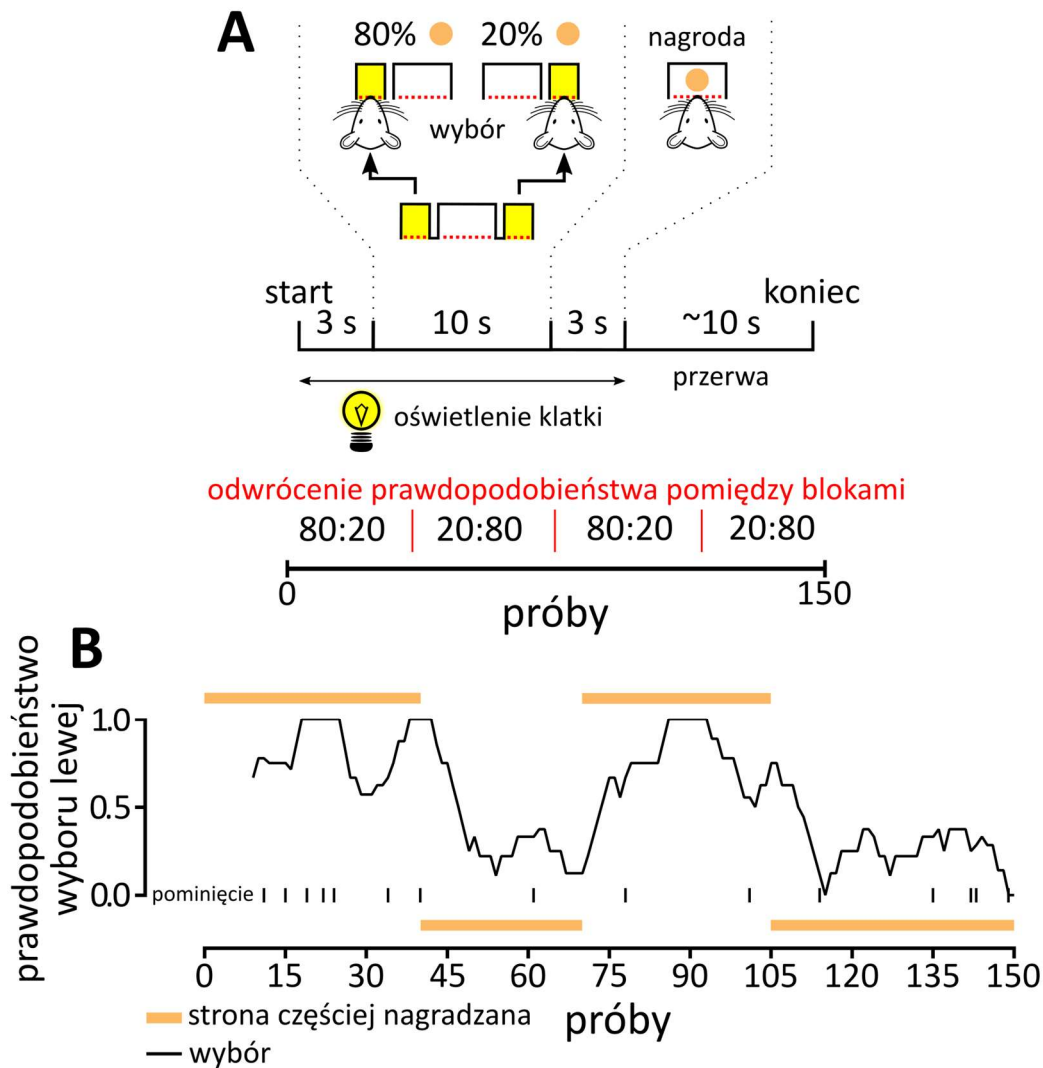
Rycina 16. Przerzutność uwagi.

A, schemat testu. W fazach od SD do IDS2R wskazówką przewidującą nagrodę był materiał wypełniający naczynie, a w fazach EDS i EDSR był to zapach. **B**, liczba prób do momentu osiągnięcia kryterium. **C**, liczba popełnionych błędów. **D**, czas ukończenia fazy. **B–C**, kontrole: $n = 14$; mutanty: $n = 12$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. ** $p < 0.01$, (test Bonferroniego).

Głównym zaobserwowanym efektem był wpływ genotypu na ilość zaliczonych prób do momentu osiągnięcia kryterium 8/10 poprawnych wyborów (Rycina 16B) oraz ilość popełnionych błędów (Rycina 16C). Analiza post-hoc wykazała, iż mutacja spowodowała znamiennej redukcję prób potrzebnych do zaliczenia kryterium w fazie EDS, która wymagała przekierowania uwagi na przetwarzanie bodźców należących do dotychczas pomijanej kategorii. Zaobserwować można również było trend w kierunku redukcji popełnionych błędów w fazie CDR i fazie EDS (w obu przypadkach $p = 0.0651$). Obserwacje te są o tyle istotne, iż w fazie CDR zwierzęta miały po raz pierwszy do czynienia z odwróceniem zależności między bodźcami przewidującymi nagrodę, a w fazie EDS ze zmianą zasad jej uzyskania. W obu przypadkach, mutacja ułatwiała adaptację do nieoczekiwanej zmiany wymagań testu. Nie zaobserwowano znamiennego wpływu mutacji na szybkość wykonania poszczególnych faz (Rycina 16D). Eksperyment 7 wykazał, że mutacja u myszy NR1^{DBHCre} sprzyjała łatwiejszemu przełączaniu uwagi między dwiema kategoriami bodźców. Dzięki temu, zwierzęta z mutacją mogły szybciej zaadaptować się do nieoczekiwanej zmiany wymagań otoczenia, a w konsekwencji szybciej wybrać właściwy sposób działania, prowadzący do zdobycia nagrody.

Eksperyment 8: Adaptacja do zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody

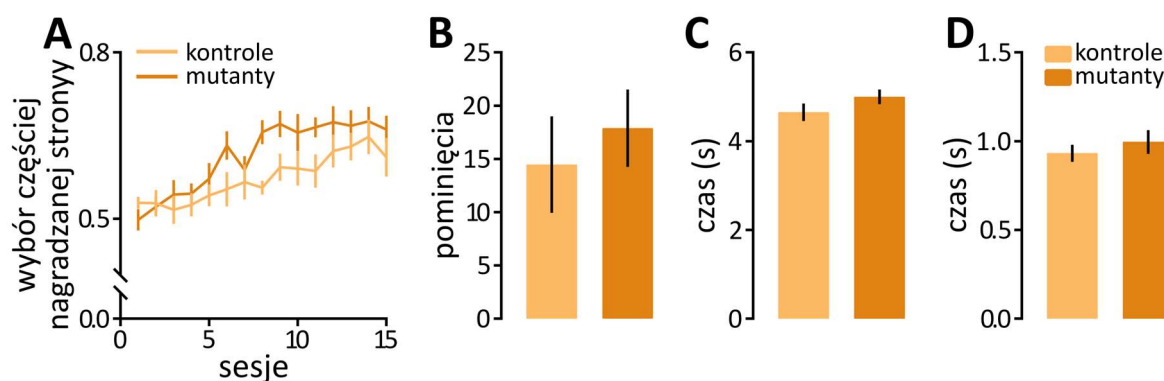
Poprzedni eksperyment wykazał, iż mutacja w układzie noradrenergicznym u myszy NR1^{DBHCre} wpływa na proces adaptacji do zmieniających się wymagań otoczenia. Celem tego eksperymentu było zbadanie wpływu mutacji na zdolność adaptacji do dynamicznie zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody w teście uczenia się z losowym wzmocnieniem. W teście tym zwierzę dokonywało wyboru między dwoma otworami zapewniającymi odpowiednio 80 i 20% szans na uzyskanie nagrody (20 mg pokarmu). Każda sesja składała się ze 150 prób podzielonych na bloki o długości od 30 do 45 prób (Rycina 17A). Prawdopodobieństwo uzyskania nagrody przypisane do obu otworów było stałe wewnątrz bloku i ulegało odwróceniu pomiędzy blokami. Czas trwania prób był ograniczony do 10 sekund, a brak odpowiedzi rejestrowany był jako pominięcie. Przez to, w porównaniu do eksperymentu 1, test był bardziej wymagający, generował większą niepewność co do stałości otoczenia i jednocześnie wymuszał szybkie podjęcie decyzji. Przykład wykonania testu przez reprezentatywne zwierzę prezentuje Rycina 17B.



Rycina 17. Test uczenia się z losowym wzmocnieniem.

A, schemat testu. B, przykład wyborów dokonanych przez jedno reprezentatywne zwierzę w trakcie jednej sesji. Czarna linia reprezentuje prawdopodobieństwo wyboru lewego otworu (dane wygładzone przy użyciu 9 punktowej średniej kroczącej). Beżowy pasek oznacza stronę z większą szansą uzyskania nagrody (górze – lewa strona, dół – prawa strona). Pionowe kreski reprezentują pominięte próby.

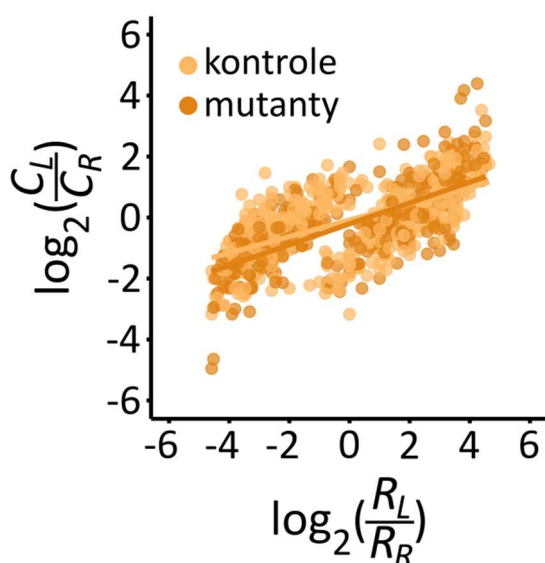
Niezależnie od genotypu, zwierzęta wykazały znamienne wzrost częstotliwości wyborów częściej nagradzanej strony, w kolejnych sesjach (Rycina 18A). U myszy z mutacją można było zaobserwować trend w kierunku większej skłonności do wyboru częściej nagradzanej strony, w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (efekt interakcji: $p = 0.0929$). Mogło to oznaczać, iż myszy z mutacją szybciej adaptowały się do wymagań testu. Mutacja nie miała wpływu na ilość pominiętych prób (Rycina 18B), szybkość podjęcia decyzji o dokonaniu wyboru (Rycina 18C) czy szybkość pobrania nagrody (Rycina 18D).



Rycina 18. Wybór częściej nagradzanej strony.

A, prawdopodobieństwo wyboru częściej nagradzanej strony. **B**, liczba pominiętych prób. **C**, czas dokonania wyboru. **D**, Czas pobrania nagrody. **A–D**, kontrole: $n = 9$; mutanty: $n = 8$. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM.

Następnie sprawdziłem, czy wybory dokonywane przez zwierzęta spełniają regułę prawa dopasowania. Rycina 19 przedstawia proporcję dokonanych wyborów względem proporcji uzyskanych nagród, natomiast Tabela 4 zawiera wartości parametrów modelu.



Rycina 19. Zgodność wyborów z prawem dopasowania.

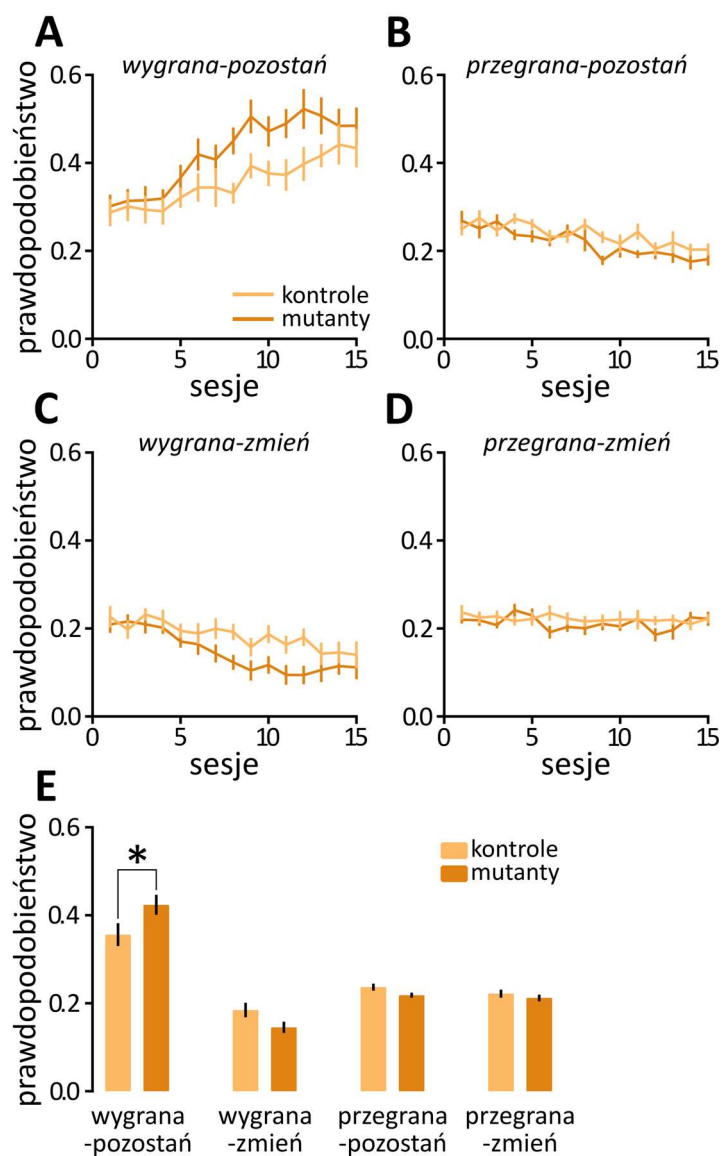
Dopasowanie modelu do wyborów dokonanych przez zwierzęta szczepu NR1^{DBHCre} (kontrole: $n = 9$; mutanty: $n = 8$).

Tabela 4. Wartości parametrów modelu.

Szczep	Genotyp	N	Wrażliwość (a)	Tendencja (b)	R^2
NR1 ^{DBHCre}	kontrole	9	0.29 ± 0.03	-0.06 ± 0.15	0.53
	mutanty	8	0.36 ± 0.02	-0.22 ± 0.16	0.65

Model wyjaśniał od 53% do 65% zaobserwowanej zmienności, odpowiednio w grupie kontrolnej i grupie zwierząt z mutacją (wartość R^2 w Tabeli 4). Wartości R^2 niższe niż u zwierząt z mutacjami w układzie dopaminowym (eksperyment 1) mogą oznaczać, iż wyższe wymagania testu (większa zmienność i ograniczenie czasu wyboru) miały wpływ na zdolność do zachowania się zgodnie z prawem dopasowania. Nie obserwowano jednak znamiennej różnicy w wartości parametrów a i b , które informują odpowiednio o wrażliwości na wzmocnienie oraz tendencji do wybierania jednej strony niezależnie od uzyskanego wzmocnienia.

Przeanalizowałem również wpływ mutacji na prawdopodobieństwo powtórzenia poprzednio dokonanego wyboru. Przyjąłem, że jeżeli zwierzę decydowało się na powtórzenie wyboru to miało skłonność do eksploatacji znanych schematów działania, natomiast jeżeli zwierzę decydowało się na zmianę wyboru, to miało skłonność do eksploracji. I tak, wybory typu *wygrana-pozostań* (Rycina 20A) oraz *przegrana-pozostań* (Rycina 20B) określiłem mianem strategii eksploatacyjnej, a wybory typu *wygrana-zmień* (Rycina 20C) oraz *przegrana-zmień* (Rycina 20D) mianem strategii eksploracyjnej. Analiza ta wykazała, iż myszy z mutacją były bardziej skłonne do powtarzania poprzednio nagradzanych wyborów (Rycina 20A i 20E). Eksperyment 8 wykazał, że mutacja u myszy $NR1^{DBHCre}$ sprzyja dokonywaniu adaptacyjnych wyborów w warunkach dynamicznie zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody i przesuwa strategię podejmowania decyzji w kierunku eksploatacji nagradzanego działania.

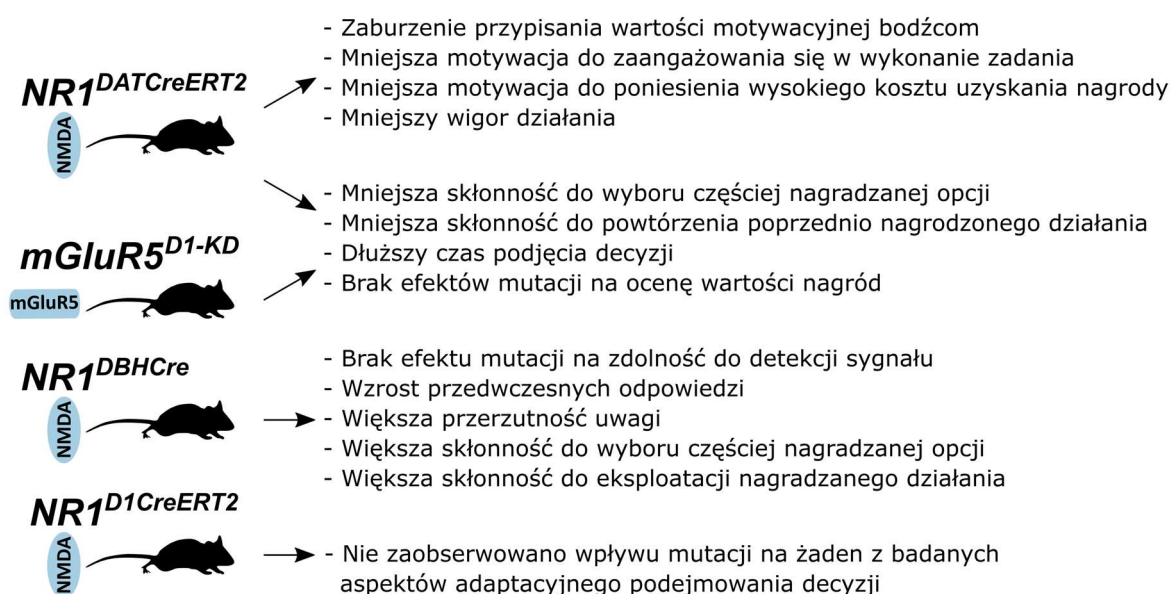


Rycina 20. Prawdopodobieństwo powtórzenia nagrodzonego wyboru.

A–D, prawdopodobieństwo danego zdarzenia. E, średnia wartość ze wszystkich sesji. A–E, zwierzęta ze szczepu NR1^{DBHCre} (kontrola: $n = 9$; mutanty: $n = 8$). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm standardowy błąd pomiaru, SEM. * $p < 0.05$, (test Bonferroniego).

Dyskusja

Celem moich badań było wskazanie wpływu utraty receptorów NMDA i mGluR5 w neuronach układu dopaminowego i noradrenergicznego na wybrane aspekty adaptacyjnego podejmowania decyzji. Rycina 21 prezentuje podsumowanie uzyskanych wyników.



Rycina 21. Podsumowanie uzyskanych wyników

Uczenie się ze wzmocnieniem

Aktywność fazowa neuronów dopaminergicznych śródmózgowia sygnalizuje błąd przewidywania nagrody, który zgodnie z formalnymi teoriami uczenia się ma kluczowe znaczenie dla zaistnienia procesu uczenia się opartego na wzmocnieniu (*Schultz i in., 1997; Waelti i in., 2001*). Mając to na uwadze przypuszczałem, że zahamowanie zależnej od receptora NMDA aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych będzie zaburzać sygnalizowanie błędu przewidywania nagrody, a w konsekwencji prowadzić do zaburzenia procesu uczenia się ze wzmocnieniem. Zgodnie z tym przypuszczeniem, myszy pozbawione receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych wolniej uczyły się na podstawie konsekwencji dokonywanych wyborów (eksperyment 1). W początkowej fazie

eksperymentu częstotliwość wyboru częściej nagradzanego otworu przez zwierzęta z mutacją wynosiła mniej niż 60%. Sugeruje to, iż dokonywane przez nie wybory miały losowy charakter i nie rozróżniały one ich wartości. Dodatkowo, zwierzęta te były mniej skłonne do powtórzenia poprzednio nagrodzonego wyboru. Jest to zgodne z doniesieniami sugerującymi, iż zahamowanie aktywności neuronów dopaminergicznych naśladuje negatywny błąd przewidywania nagrody i tym samym zmniejsza szansę na powtórzenie poprzednio nagrodzonego wyboru (*Hamid i in., 2016; Parker i in., 2016*). Niemniej jednak, pod koniec eksperymentu zwierzęta z mutacją wybierały bardziej korzystną opcję równie często jak zwierzęta kontrolne, a ich zachowanie było zgodne w znacznej mierze z prawem dopasowania. Oznacza to, iż zahamowanie zależnej od receptora NMDA aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych spowolniło proces uczenia się na podstawie konsekwencji własnych działań, ale nie uniemożliwiło zaistnienia procesu uczenia się. Podobne zjawisko obserwowano wcześniej u zwierząt z konstytutywną mutacją, u których zauważono odroczonego efekt nabierania wprawy w wykonaniu testów instrumentalnych wzmacnianych nagrodą w postaci pokarmu (*Zweifel i in., 2009; James i in., 2015*). Zatem, zależna od receptora NMDA aktywność fazowa neuronów dopaminergicznych wydaje się mieć istotne znaczenie dla szybkości i wydajności procesu uczenia się ze wzmocnieniem, ale nie jest ona konieczna dla zaistnienia samego procesu uczenia się.

Proponowanym postsynaptycznym mechanizmem działania fazowo uwalnianej dopaminy jest jej wpływ na modyfikację plastyczności synaps korowo-prążkowiowych. Plastyczność ta zależy w dużej mierze od aktywacji receptorów dla glutaminianu, głównie NMDA i mGluR5 (*Shen i in., 2008*). Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki wskazują, że utrata receptorów mGluR5 w neuronach wyrażających ekspresję receptora D1, u zwierząt ze szczepu mGluR5^{KD-D1} powoduje, iż zwierzęta z mutacją są mniej skłonne do powtórzenia poprzednio nagrodzonego wyboru oraz mniej skłonne do wybierania częściej nagradzanej opcji (eksperyment 1). Zjawisko to tłumaczyć można zaburzeniem zdolności do aktualizacji wartości działania przez neurony prążkowie. W wyniku zaburzenia tego procesu zwierzę jest mniej wrażliwe na pozytywne wzmocnienie, a dokonywane przez nie wybory charakteryzują się większą losowością. Nie zaobserwowano jednak podobnego efektu u zwierząt z indukowalną inaktywacją receptorów NMDA, co jest po części nieoczekiwane, ponieważ aktywacja receptorów NMDA w prążkowie ma istotne znaczenie dla uczenia się na podstawie konsekwencji podejmowanych działań (*Yin i in., 2005*). Potencjalnym wyjaśnieniem tego zjawiska może

być różnica w ekspresji mutacji u obu szczepów. Wcześniejsze badania wykazały, iż ekspresja transgenu u myszy $mGluR5^{KD-D1}$ jest wydajna w obszarze grzbietowego jak i brzuszego prążkowie (Novak *i in.*, 2010; Rodriguez Parkitna *i in.*, 2013). Z kolei u myszy $NR1^{D1CreERT2}$ mutacja jest skuteczna przede wszystkim w brzuszonym prążkowie (Sikora *i in.* 2016). Różnica w wydajności mutacji ma o tyle istotne znaczenie, iż brzuszna część prążkowie zaangażowana jest w proces kojarzenia bodźca z wynikiem, podczas gdy grzbietowe prążkowie odgrywa kluczową rolę w uczeniu się na podstawie konsekwencji dokonanych wyborów (Balleine *i in.*, 2007; Yin *i in.*, 2005; 2008). Znaczenie rozdziału roli brzuszego i grzbietowego prążkowie w teście analogicznym do testu uczenia się z losowym wzmocnieniem, zostało niedawno dobrze zilustrowane przez Parkera *i in.* (Parker *i in.*, 2016). Autorzy posługując się metodą obrazowania aktywności neuronalnej zależnej od wapnia wykazali, iż zakończenia neuronów dopaminergicznych w brzuszonym prążkowie są aktywowane w odpowiedzi na bodźce powiązane z nagrodą, podczas gdy zakończenia w grzbietowym prążkowie są aktywowane w odpowiedzi na dokonany wybór. Innymi słowy, to grzbietowe prążkowie prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w kodowaniu wartości dokonanego wyboru. Potwierdzeniem tej hipotezy są również doświadczenia, które wykazały, iż stymulacja neuronów D1 w grzbietowej części prążkowie naśladuje zmianę wartości działania, co wpływa na tendencyjność dokonywania wyboru (Tai *i in.*, 2012). Mając powyższe doniesienia na uwadze przypuszczam, że zależna od receptorów dla glutaminianu modyfikacja plastyczności synaptycznej w neuronach dopaminoceptywnych grzbietowego, lecz nie brzuszego prążkowie może mieć kluczowe znaczenie dla aktualizowania wartości działania. Gdy proces ten ulega zaburzeniu, jak ma to miejsce w przypadku mutacji u myszy $mGluR5^{KD-D1}$, skutkuje to większą losowością dokonywanych wyborów.

Ocena wartości nagród

Aktywność neuronów dopaminergicznych modulowana jest przez prawdopodobieństwo i wielkość nagrody (Fiorillo *i in.*, 2003; Tobler *i in.*, 2005). Przypuszcza się więc, że neurony dopaminergiczne kodują informacje o ryzyku i oczekiwanej wartości nagród – zmiennych ekonomicznych istotnych dla procesu podejmowania decyzji. Hipoteza ta wspierana jest przez obserwacje pokazujące, iż farmakologiczna blokada receptorów dopaminowych, podobnie jak zahamowanie

fazowej aktywności komórek dopaminergicznych śródmózgowia, obniża skłonność do wyboru dużych nagród w miarę wzrostu niepewności ich uzyskania (*St Onge i Floresco, 2009; St Onge i in., 2011; Stopper i in., 2013, 2014*). Mając to na uwadze przypuszczałem, że usunięcie receptorów dla glutaminianu w neuronach układu dopaminowego będzie wpływać na tendencyjność wyboru nagród różniących się prawdopodobieństwem uzyskania (eksperyment 2). Niemniej, u żadnego z badanych szczepów nie zaobserwowano wpływu mutacji na preferencję wyboru dużej nagrody, gdy obie nagrody były swobodnie dostępne czy wpływu mutacji na zmianę preferencji wyboru dużej nagrody, wywołaną spadkiem prawdopodobieństwa jej uzyskania. Oznacza to, że przekazywanie sygnału przez receptory dla glutaminianu w neuronach układu dopaminowego, nie jest konieczne do dokonania oceny wartości nagród.

Przypisanie wartości motywacyjnej bodźcom

Aktywność fazowa neuronów dopaminergicznych pośredniczy w procesie uczenia się asocjacyjnego i przypisania wartości motywacyjnej bodźcom przewidującym nagrodę (*Flagel i in., 2011*). W eksperymencie 3 zaobserwowano, iż myszy NR1^{DATCreERT2} uczą się wartości predykcyjnej bodźców prezentowanych w trakcie eksperymentu i częściej eksplorują podajnik na wodę, gdy prezentowany jest bodziec przewidujący dostarczenie nagrody. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami poczynionymi w badaniach, w których wykorzystano zwierzęta z konstytutywną mutacją (*Parker i in., 2010; James i in., 2015*), co potwierdza, iż zahamowanie zależnej od receptora NMDA aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych nie zaburza uczenia się asocjacyjnego i wykonania uwarunkowanej reakcji na bodziec. Interesującym jednak jest, że w kolejnych sesjach zachowanie związane z eksploracją podajnika było nasilone w grupie zwierząt kontrolnych, ale nie u zwierząt z mutacją. Co więcej, u części zwierząt kontrolnych można było zaobserwować dużą skłonność do samodostarczania bodźca CS+, nawet jeżeli nie towarzyszyła temu prezentacja nagrody. Oznacza to, że dla zwierząt kontrolnych, ale nie dla myszy z mutacją bodziec CS+ zyskał wartość nagradzającą samą w sobie i działał jako warunkowe wzmocnienie. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami wskazującymi na to, że doraźne zablokowanie receptorów NMDA w polu brzusznej nakrywki blokuje warunkowe wzmocnienie oraz że fazowe uwalnianie dopaminy pośredniczy w procesie przypisania wartości motywacyjnej bodźcom skojarzonym z nagrodą (*Flagel i in., 2011; Wickham i in., 2015*). W wyniku tego

procesu, bodźce skojarzone z nagrodą mogą nasilać zachowanie poszukiwawcze. Brak nasilenia zachowania poszukiwawczego podczas prezentacji bodźca CS+ oraz brak reakcji warunkowego wzmocnienia u myszy z mutacją sugeruje, że u tych zwierząt proces atrybucji znaczenia jest zaburzony. Oznacza to, że przekazywanie sygnału zależne od receptora NMDA w neuronach dopaminergicznych ma kluczowe znaczenie dla regulacji tego procesu.

Inicjację działania i wydatkowanie wysiłku

Wcześniejsze badania elektrochemiczne sugerowały, iż moment inicjacji działania poprzedzony jest wzrostem zewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy w brzuszny prążkowie, związanym z fazowym trybem uwalniania neuroprzekaźnika (*Phillips i in., 2003; Roitman i in., 2004; Syed i in., 2016*). Jednym z głównych efektów zaburzenia zależnej od receptora NMDA aktywności fazowej było opóźnienie podjęcia działania nakierowanego na zdobycie nagrody (eksperymenty 1 i 2). Efekt ten jest zgodny z obserwowanym wcześniej wpływem konstytutywnej inaktywacji receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych na wydłużenie czasu do dokonania wyboru w labiryncie typu T (*Zweifel i in., 2009*) oraz wpływem zahamowania przekazywania sygnału zależnego od receptorów dopaminowych w jądrze półleżącym na odroczenie zaangażowania się w poszukiwanie nagrody (*Nicola, 2010*). Co więcej, mutacja obniżała motywację do wzmózonego poszukiwania nagrody (eksperyment 3) i poniesienia rosnącego kosztu jej pozyskania (eksperyment 4). Jest to zgodne z obserwacjami pokazującymi, iż usunięcie zasobów dopaminy obniża, a podniesienie jej poziomu zwiększa motywację do pracy w warunkach narastającego kryterium wzmocnienia (*Salamone i in., 2001; Cagniard i in., 2006*). Eksperyment 4 pokazał również, że usunięciu receptorów NMDA z neuronów dopaminergicznych towarzyszyło obniżenie wigoru działania, widoczne jako występowanie krótszych oraz rzadszych sekwencji odpowiedzi instrumentalnych. Obserwacja ta jest w zgodzie z danymi elektrochemicznymi, które wskazują na to, że fazowe uwalnianie dopaminy w jądrze półleżącym poprzedza rozpoczęcie działań charakteryzujących się wysokim wigorem (*Ko i Wanat, 2016*). Zatem, zależna od receptora NMDA aktywność neuronów dopaminergicznych reguluje proces inicjacji działania oraz wydatkowania wysiłku, odpowiadając tym samym za aktywacyjny aspekt motywacji (*Salamone i Correa, 2012; Salamone i in., 2016*).

Percepcyjne podejmowanie decyzji

Neurony noradrenergiczne miejsca sinawego regulują proces nakierowania uwagi i przetwarzania informacji percepcyjnych. Mając to na uwadze przypuszczałem, że zaburzenie przekazywania sygnału zależnego od receptora NMDA w neuronach noradrenergicznych będzie mieć wpływ na zdolność do detekcji bodźców przewidujących nagrodę i wykonania właściwej reakcji, w oparciu o ocenę ich znaczenia. Myszy ze szczepu NR1^{DBHCre} wykazały normalną zdolność do detekcji sygnału przewidującego możliwość uzyskania nagrody (eksperyment 5). Niemniej, kiedy zwierzęta miały dokonać rozróżnienia między sygnałami wymagającymi odpowiednio wykonania lub powstrzymania się od wykonania reakcji (eksperyment 6), wykazywały one tendencję do wykonania reakcji niezależnie od rodzaju prezentowanego bodźca. W konsekwencji prowadziło to do wysokiej ilości błędnych odpowiedzi, tj. fałszywych alarmów. Efekt ten zaobserwowano zarówno u zwierząt z mutacją, jak i zwierząt kontrolnych. Niezależna od genotypu generalizacja odpowiedzi była związana ze słabą zdolnością do rozróżniania bodźców wzrokowo-słuchowych, stanowiących składową sygnału *go* i *no-go*. Wcześniejsze badania wykorzystujące taki sam układ eksperymentalny wykazały, że jest to charakterystyczne dla szczepu C57BL/6 stanowiącego tło genetyczne myszy NR1^{DBHCre} (Gubner i in., 2010). Mając powyższe na uwadze, ocena wpływu mutacji na podejmowanie decyzji percepcyjnych w teście *go/no-go* nie była do końca możliwa. Niezależnie od wpływu mutacji na podejmowanie decyzji o wykonaniu działania w oparciu o ocenę sygnału, u myszy z mutacją zaobserwowano wzrost przedwczesnych odpowiedzi. Mogło to oznaczać, że zwierzęta z mutacją charakteryzowały się większym poziomem pobudzenia lub większą motywacją do wykonania reakcji nakierowanej na zdobycie nagrody.

Adaptacja do nieoczekiwanych zmian w otoczeniu

Myszy ze szczepu NR1^{DBHCre} zbadano również w teście, w którym decyzje percepcyjne oparte były o wykorzystanie zmysłów zapachu i dotyku (eksperyment 7). W teście tym myszy z mutacją szybciej adaptowały się do nieoczekiwanego odwrócenia znaczenia pomiędzy bodźcami przewidującymi nagrodę (faza CDR) oraz zmiany reguły rządzącej testem (faza EDS), popełniając przy tym mniej błędów. Efekt ten jest zgodny z obserwacjami wskazującymi na to, że wzbudzenie aktywności neuronów noradrenergicznych oraz nasilenie przekazywania sygnału zależnego od receptorów

noradrenergicznych w korze przedczołowej ma kluczowe znaczenie dla przerzutności uwagi i elastyczności poznawczej (*Lapitz i Morilak, 2006; Tait i in., 2007; Janitzky i in., 2015*). Wynik ten sugeruje również, że myszy z mutacją mogły szybciej adaptować się do niespodziewanych zmian w strukturze zadania. Potwierdzeniem tej interpretacji jest obserwacja, że myszy z mutacją częściej dokonywały korzystnego wyboru w teście uczenia się z losowym wzmocnieniem (eksperyment 8), a więc zapewne szybciej rozpoznawały nieoczekiwane zmiany prawdopodobieństwa uzyskania nagrody. Obserwacje te są zgodne z koncepcją mówiącą o tym, że aktywność neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego sygnalizuje nieoczekiwane zmiany w otoczeniu, a tym samym usprawnia proces uczenia się i podejmowania decyzji o wyborze kierunku działania, w dynamicznie zmieniającym się środowisku (*Bouret i Sara, 2005; Yu i Dayan, 2005*).

W eksperymencie 8 zaobserwowano również, że myszy z mutacją były bardziej skłonne powtarzać poprzednio nagrodzone wybory. Zatem mutacja nie tylko zwiększała zdolność do adaptacji do zmieniających się wymagań otoczenia, ale również przesuwiała strategię dokonywania wyboru w kierunku eksploatacji częściej nagradzanego schematu działania. Obserwacja ta wydaje się być zgodna z teorią, zgodnie z którą aktywność neuronów miejsca sinawego reguluje równowagę pomiędzy eksploatacją znanych schematów działania, a eksploracją nowych potencjalnie bardziej korzystnych alternatyw (*Aston-Jones i Cohen, 2005*). W myśl tej teorii, epizodom eksploatacji towarzyszy wzrost, a epizodom eksploracji spadek aktywności fazowej neuronów noradrenergicznych. O ile teoria ta powstała w oparciu o wyniki badań, w których stosowano testy wymagające dokonania percepcyjnej oceny bodźców, późniejsze doświadczenia wykazały, że jej założenia można również uogólnić w odniesieniu do testów uczenia się z losowym wzmocnieniem (*Jepma i Nieuwenhuis, 2011*).

Obserwacja, że zwierzęta pozbawione receptorów NMDA uczestniczących w regulacji aktywność neuronów noradrenergicznych charakteryzują się poprawą wykonania w testach wymagających elastyczności poznawczej jest dość nieoczekiwana. Pomocnym wyjaśnieniu tego zjawiska są pomiary aktywności neuronów noradrenergicznych wykonane u tych zwierząt (*Cieślak i in., 2017*). W badaniach tych, podczas rejestracji spontanicznej aktywności, u myszy z mutacją zaobserwowano zmianę w kierunku zwiększonej częstotliwości wyładowań neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego. Ponadto, u zwierząt z mutacją obserwowano znamienne większą proporcję neuronów charakteryzujących się fazowym trybem aktywności. Możliwym jest,

że jest to wynik kompensacji związanej ze wzrostem ilości receptorów AMPA, które również regulują aktywność neuronów noradrenergicznych. Podobne zjawisko obserwowano także u zwierząt z konstytutywnym wariantem mutacji w neuronach dopaminergicznych (Engblom i in., 2008; Zweifel i in., 2008). A zatem, neurony noradrenergiczne myszy z mutacją ze szczepu NR1^{DBHCre} charakteryzują się zwiększoną częstotliwością wyładowań i większą szansą wystąpienia fazowego trybu aktywności. Może to tłumaczyć dlaczego mutacja u tych zwierząt wywiera pozytywny wpływ na te aspekty zachowania, które zależą od aktywności fazowej miejsca sinawego.

Podsumowanie i wnioski

Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki wskazują na to, że przekazywanie sygnału zależne od receptorów dla glutaminianu w układach katecholaminowych mózgu ma istotne znaczenie dla regulacji adaptacyjnego podejmowania decyzji.

Zaburzenie przekazywania sygnału zależnego od receptorów NMDA i mGluR5 w układzie dopaminowym prowadzi do nieprawidłowości w zakresie uczenia się ze wzmocnieniem oraz procesów motywacyjnych decydujących o szybkości podjęcia działania i jego wigorze. Zaburzenia motywacji i wrażliwości na działanie nagród stanowią często główną oś objawów towarzyszących chorobom psychicznym takim jak depresja, schizofrenia czy uzależnienia. Na podstawie uzyskanych wyników można wysunąć przypuszczenie, że mechanizmem leżącym u podłoża powstawania tych objawów mogą być zaburzenia w transmisji glutaminianergicznej, związanej z generowaniem aktywności fazowej neuronów dopaminergicznych i modulacją plastyczności neuronów dopaminoceptywnych. Oddziaływania farmakoterapeutyczne nakierowane na przywrócenie równowagi w zakresie przekazywania sygnału zależnego od receptorów dla glutaminianu w układzie dopaminowym mogłyby stanowić potencjalny cel terapii zaburzeń psychicznych.

Uzyskane wyniki wykazały również, że zależna od glutaminianu aktywności układu noradrenergicznego reguluje adaptację do zmieniających się wymagań otoczenia. Oddziaływania farmakoterapeutyczne nakierowane na zwiększenie aktywności fazowej neuronów noradrenergicznych mogłyby sprzyjać poprawie funkcji wykonawczych, zwłaszcza przerzutności uwagi i elastyczności poznawczej.

Streszczenie

Kluczowym aspektem adaptacji do dynamicznie zmieniającego się środowiska jest umiejętność wybierania najkorzystniejszych kierunków działania. Istotną rolę w tym procesie odgrywają układy katecholaminowe – dopaminowy i noradrenergiczny. Dopaminergiczne neurony śródmózgowia wraz z głównym celem ich projekcji, dopaminoceptywnymi neuronami prążkowiec regulują mechanizm uczenia się ze wzmocnieniem i motywację do poszukiwania nagród. Z kolei noradrenergiczne neurony miejsca sinawego regulują mechanizm percepcyjnego podejmowania decyzji i elastyczności poznawczej. Aktywność i plastyczność tych układów jest w znacznej mierze zależna od pobudzającej transmisji glutaminianergicznej. W szczególności istotne są receptory N-metylo-D-asparginowe (NMDA), które odpowiadają za regulację aktywność fazowej neuronów katecholaminergicznych. Receptory NMDA, podobnie jak i receptory metabotropowe mGluR5, pełnią również istotną rolę w regulacji plastyczności neuronów dopaminoceptywnych prążkowiec. W niniejszej pracy stawiam hipotezę, że zaburzenie przekazywania sygnału zależnego od tych receptorów w układach katecholaminowych mózgu, może być przyczyną sztywności zachowania oraz zmniejszonej wrażliwości na działanie nagród.

Aby zweryfikować tą hipotezę, wykorzystałem zwierzęta modyfikowane genetycznie pozbawione funkcjonalnych receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych i noradrenergicznych (myszy NR1^{DATCreERT2} i NR1^{DBHCre}) oraz myszy pozbawione receptorów NMDA i mGluR5 w neuronach posiadających receptor dopaminowy D1 (myszy NR1^{D1CreERT2} i mGluR5^{D1-KD}). Zwierzęta badane były w testach, w których optymalny poziom wykonania zależał od dostosowania dokonywanych wyborów do nieoczekiwanych zmian prawdopodobieństwa oraz wartości nagrody, zmian rodzaju bodźca przewidującego nagrodę czy zmiany zasad jej uzyskania. Wykorzystanie zwierząt transgenicznych oraz szeregu metod behawioralnych, pozwoliło mi w sposób bezpośredni zbadać jak zaburzenie przekazywania sygnału zależnego od konkretnych typów receptorów dla glutaminianu w układach katecholaminowych wpływa na różne aspekty adaptacyjnego dokonywania wyboru.

W pierwszej części rozprawy dotyczącej układu dopaminowego wykazałem, że inaktywacja receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych i receptorów mGluR5 w neuronach D1 zmniejszała prawdopodobieństwo wyboru częściej nagradzanej opcji oraz zmniejszała szansę na powtórzenia poprzednio nagrodzonego działania. Co więcej, zwierzęta pozbawione receptorów NMDA w neuronach dopaminergicznych i receptorów mGluR5 w neuronach D1 potrzebowały więcej czasu na podjęcie decyzji o dokonaniu wyboru. Ponadto, zaobserwowałem, że zależne od receptora NMDA przekazywanie sygnału w neuronach dopaminergicznych ma istotne znaczenie dla procesu przypisania wartości motywacyjnej bodźcom skojarzonym z nagrodą oraz regulacji motywacji do zaangażowania się w wykonanie zadania (wigor działania i poniesienia wysokiego kosztu uzyskania nagrody).

W drugiej części rozprawy dotyczącej układu noradrenergicznego wykazałem, że usunięcie receptorów NMDA z neuronów noradrenergicznych zwiększa sprawność przerzucania uwagi między różnymi aspektami otoczenia. Ponadto, zaobserwowałem, że mutacja w neuronach noradrenergicznych sprzyjała dokonywaniu adaptacyjnych wyborów w warunkach dynamicznie zmieniającego się prawdopodobieństwa uzyskania nagrody i przesuwała strategię podejmowania decyzji w kierunku eksploatacji nagradzanego działania (co prawdopodobnie związane jest z kompensacyjnym wzrostem przekazywania sygnału zależnego od receptorów AMPA).

Podsumowując, w ramach niniejszej rozprawy wykazałem, że przekazywanie sygnału zależne od receptorów dla glutaminianu w układach katecholaminowych mózgu reguluje proces adaptacyjnego podejmowania decyzji, motywację oraz elastyczność poznawczą. Oznacza to, że zaburzenia w transmisji glutaminianergicznej w układzie dopaminowym i noradrenergicznym mogą przyczyniać się do występowania nieadaptacyjnych zachowań, często obserwowanych w zaburzeniach psychicznych.

Abstract

The ability to select the most advantageous actions in dynamically changing environment is the key aspect of adaptive behavior. Catecholamine systems, including dopamine (DA) and noradrenaline (NA), play a crucial role in this process. Midbrain DA neurons along with the major target of their projections, dopaminergic neurons in striatum, regulate reinforcement learning and motivation, while NA neurons of the locus coeruleus regulate perceptual decision making and cognitive flexibility. The activity and plasticity in catecholaminergic systems are largely dependent on excitatory glutamatergic transmission. Glutamatergic inputs activate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and drive the phasic activity in catecholaminergic neurons. Moreover, NMDA and metabotropic glutamate 5 (mGluR5) receptors are crucial for the induction of plasticity in dopaminergic striatal medium spiny neurons. In this dissertation I hypothesized that impaired glutamate-dependent signaling in brain's catecholaminergic systems may be a cause of the cognitive inflexibility and reduced reward sensitivity.

To test this hypothesis, I have used genetically modified mice with cell-type specific ablation of NMDA receptors in DA and NA neurons ($NR1^{DATCreERT2}$ and $NR1^{DBHCre}$ strains), and mice with ablation of NMDA and mGluR5 receptors in D1 receptor-expressing neurons ($NR1^{D1CreERT2}$ and $mGluR5^{D1-KD}$ strains). Animals were tested in a range of behavioral paradigms in which optimal performance was dependent upon adapting choices to changes in reward contingency. The use of transgenic animals and combination of behavioral methods, allowed me to directly test how targeted loss of glutamate receptor-dependent signaling in catecholaminergic systems affects certain aspects of adaptive choice behavior.

In the first part of the dissertation, I show that inactivation of NMDA receptors in DA neurons and loss of mGluR5 receptors in D1 expressing neurons reduced the probability of selecting the more often rewarded alternative and lowered the likelihood of repeating the previously rewarded choice. Moreover, animals with targeted loss of NMDA receptors in DA neurons or mGluR5 receptors in D1 neurons were significantly slower to perform choices. In addition, I find that NMDA receptor-dependent signaling in DA neurons was crucial for the attribution of incentive motivational value

to reward-paired stimuli and regulation of motivated behavior by controlling the initiation vigor and the amount of effort exerted.

In the second part, I show that ablation of NMDA receptors in NA neurons facilitated attentional-set shifting. Moreover, I have observed that mutation in NA neurons increased the likelihood of selecting more often rewarded alternative under conditions of dynamically changing probability of reward delivery and shifted decision-making strategy towards exploitation of rewarded choices (possibly due to compensatory increase in AMPA receptor-dependent signaling).

In conclusion, I find that glutamate signaling in brain's catecholaminergic systems regulate adaptive decision-making, motivation and cognitive flexibility. This indicates that aberrant glutamate signaling in DA or NA systems may contribute to maladaptive behaviors, that are particularly often observed in mental disorders.

Literatura

- Adamantidis AR, Tsai H-C, Boutrel B, Zhang F, Stuber GD, Budygin EA, Touriño C, Bonci A, Deisseroth K, de Lecea L (2011) Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *J Neurosci* 31:10829–10835.
- Aston-Jones G, Bloom FE (1981a) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1:876–886.
- Aston-Jones G, Bloom FE (1981b) Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci* 1:887–900.
- Aston-Jones G, Cohen JD (2005) An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28:403–450.
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234:734–737.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P (1997) Conditioned responses of monkey locus coeruleus neurons anticipate acquisition of discriminative behavior in a vigilance task. *Neuroscience* 80:697–715.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P, Alexinsky T (1994) Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci* 14:4467–4480.
- Aston-Jones G, Waterhouse B (2016) Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain Res* 1645:75–78.
- Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O (2007) The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J Neurosci* 27:8161–8165.

- Baum WM (1974) On two types of deviation from the matching law: bias and undermatching. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 22:231–242.
- Beierholm U, Guitart-Masip M, Economides M, Chowdhury R, Düzel E, Dolan R, Dayan P (2013) Dopamine modulates reward-related vigor. *Neuropsychopharmacology* 38:1495–1503.
- Berridge CW, Abercrombie ED (1999) Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 93:1263–1270.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33–84.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191:391–431.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309–369.
- Beutler LR, Eldred KC, Quintana A, Keene CD, Rose SE, Postupna N, Montine TJ, Palmiter RD (2011) Severely impaired learning and altered neuronal morphology in mice lacking NMDA receptors in medium spiny neurons. *PLoS ONE* 6:e28168.
- Birrell JM, Brown VJ (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci* 20:4320–4324.
- Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202.
- Bouret S, Sara SJ (2005) Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends Neurosci* 28:574–582.
- Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6:7–28.

- Cagniard B, Balsam PD, Brunner D, Zhuang X (2006) Mice with chronically elevated dopamine exhibit enhanced motivation, but not learning, for a food reward. *Neuropsychopharmacology* 31:1362–1370.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211–219.
- Chandler DJ, Gao W-J, Waterhouse BD (2014) Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:6816–6821.
- Chergui K, Charléty PJ, Akaoka H, Saunier CF, Brunet JL, Buda M, Svensson TH, Chouvet G (1993) Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 5:137–144.
- Chong TT-J, Bonnelle V, Manohar S, Veromann K-R, Muhammed K, Tofaris GK, Hu M, Husain M (2015) Dopamine enhances willingness to exert effort for reward in Parkinson's disease. *Cortex* 69:40–46.
- Cieślak PE, Llamas N, Kos T, Ugedo L, Jastrzębska K, Torrecilla M, Rodriguez Parkitna J (2017) The role of NMDA receptor-dependent activity of noradrenergic neurons in attention, impulsivity and exploratory behaviors. *Genes Brain Behav* 16:812–822.
- Clayton EC, Rajkowski J, Cohen JD, Aston-Jones G (2004) Phasic activation of monkey locus ceruleus neurons by simple decisions in a forced-choice task. *J Neurosci* 24:9914–9920.
- Crosson PL, Walton ME, O'Reilly JX, Behrens TEJ, Rushworth MFS (2009) Effort-based cost-benefit valuation and the human brain. *J Neurosci* 29:4531–4541.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:1-55*.
- D'Ardenne K, McClure SM, Nystrom LE, Cohen JD (2008) BOLD responses reflecting dopaminergic signals in the human ventral tegmental area. *Science* 319:1264–1267.

- Dayan P, Yu AJ (2006) Phasic norepinephrine: a neural interrupt signal for unexpected events. *Network* 17:335–350.
- Devauges V, Sara SJ (1990) Activation of the noradrenergic system facilitates an attentional shift in the rat. *Behav Brain Res* 39:19–28.
- Dreyer JK, Herrik KF, Berg RW, Hounsgaard JD (2010) Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci* 30:14273–14283.
- Dudman JT, Gerfen CR (2015) The Basal Ganglia. In: *The Rat Nervous System*, pp 391–440.
- Engblom D, Bilbao A, Sanchis-Segura C, Dahan L, Perreau-Lenz S, Balland B, Rodriguez Parkitna J, Luján R, Halbout B, Mameli M, Parlato R, Sprengel R, Lüscher C, Schütz G, Spanagel R (2008) Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* 59:497–508.
- Ennis M, Aston-Jones G (1988) Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci* 8:3644–3657.
- Fiorillo CD, Tobler PN, Schultz W (2003) Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* 299:1898–1902.
- Flagel SB, Clark JJ, Robinson TE, Mayo L, Czuj A, Willuhn I, Akers CA, Clinton SM, Phillips PEM, Akil H (2011) A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature* 469:53–57.
- Floresco SB, Tse MTL, Ghods-Sharifi S (2008) Dopaminergic and glutamatergic regulation of effort- and delay-based decision making. *Neuropsychopharmacology* 33:1966–1979.
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968–973.

- Florin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ (1996) Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res* 742:89–97.
- Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3033–3037.
- Frank MJ, Seeberger LC, O'reilly RC (2004) By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science* 306:1940–1943.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441–466.
- Gilzenrat MS, Nieuwenhuis S, Jepma M, Cohen JD (2010) Pupil diameter tracks changes in control state predicted by the adaptive gain theory of locus coeruleus function. *Cogn Affect Behav Neurosci* 10:252–269.
- Glimcher PW (2011) Understanding dopamine and reinforcement learning: the dopamine reward prediction error hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 Suppl 3:15647–15654.
- Goto Y, Otani S, Grace AA (2007) The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53:583–587.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30:220–227.
- Gubner NR, Wilhelm CJ, Phillips TJ, Mitchell SH (2010) Strain differences in behavioral inhibition in a Go/No-go task demonstrated using 15 inbred mouse strains. *Alcohol Clin Exp Res* 34:1353–1362.

- Guitart-Masip M, Chowdhury R, Sharot T, Dayan P, Duzel E, Dolan RJ (2012) Action controls dopaminergic enhancement of reward representations. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7511–7516.
- Haber SN (2014) The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience* 282:248–257.
- Hamid AA, Pettibone JR, Mabrouk OS, Hetrick VL, Schmidt R, Vander Weele CM, Kennedy RT, Aragona BJ, Berke JD (2016) Mesolimbic dopamine signals the value of work. *Nat Neurosci* 19:117–126.
- Heinz A, Schlagenhauf F, Beck A, Wackerhagen C (2016) Dimensional psychiatry: mental disorders as dysfunctions of basic learning mechanisms. *J Neural Transm (Vienna)* 123:809–821.
- Herrnstein RJ (1961) Relative and absolute strength of response as a function of frequency of reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 4:267–272.
- Hyland BI, Reynolds JNJ, Hay J, Perk CG, Miller R (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114:475–492.
- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27–78.
- Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S (2014) Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *J Neurosci* 34:817–822.
- James AS, Pennington ZT, Tran P, Jentsch JD (2015) Compromised NMDA/Glutamate Receptor Expression in Dopaminergic Neurons Impairs Instrumental Learning, But Not Pavlovian Goal Tracking or Sign Tracking. *eNeuro* 2.
- Janitzky K, Lippert MT, Engelhorn A, Tegtmeier J, Goldschmidt J, Heinze H-J, Ohl FW (2015) Optogenetic silencing of locus coeruleus activity in mice impairs cognitive flexibility in an attentional set-shifting task. *Front Behav Neurosci* 9:286.

- Jastrzębska K, Walczak M, Cieślak PE, Szumiec Ł, Turbasa M, Engblom D, Błasiak T, Rodriguez Parkitna J (2016) Loss of NMDA receptors in dopamine neurons leads to the development of affective disorder-like symptoms in mice. *Sci Rep* 6:37171.
- Jepma M, Nieuwenhuis S (2011) Pupil diameter predicts changes in the exploration-exploitation trade-off: evidence for the adaptive gain theory. *J Cogn Neurosci* 23:1587–1596.
- Jodo E, Aston-Jones G (1997) Activation of locus coeruleus by prefrontal cortex is mediated by excitatory amino acid inputs. *Brain Res* 768:327–332.
- Kalwani RM, Joshi S, Gold JI (2014) Phasic activation of individual neurons in the locus ceruleus/subceruleus complex of monkeys reflects rewarded decisions to go but not stop. *J Neurosci* 34:13656–13669.
- Knutson B, Taylor J, Kaufman M, Peterson R, Glover G (2005) Distributed neural representation of expected value. *J Neurosci* 25:4806–4812.
- Ko D, Wanat MJ (2016) Phasic Dopamine Transmission Reflects Initiation Vigor and Exerted Effort in an Action- and Region-Specific Manner. *J Neurosci* 36:2202–2211.
- Kos T, Nikiforuk A, Rafa D, Popik P (2011) The effects of NMDA receptor antagonists on attentional set-shifting task performance in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 214:911–921.
- Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15:816–818.
- Kroemer NB, Guevara A, Ciocanea Teodorescu I, Wuttig F, Kobiella A, Smolka MN (2014) Balancing reward and work: anticipatory brain activation in NAcc and VTA predict effort differentially. *Neuroimage* 102 Pt 2:510–519.
- Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76 Pt B:351–359.
- Lammel S, Steinberg EE, Földy C, Wall NR, Beier K, Luo L, Malenka RC (2015) Diversity of transgenic mouse models for selective targeting of midbrain dopamine neurons. *Neuron* 85:429–438.

- Lapiz MDS, Morilak DA (2006) Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience* 137:1039–1049.
- Lee D, Seo H, Jung MW (2012) Neural basis of reinforcement learning and decision making. *Annu Rev Neurosci* 35:287–308.
- Lodge DJ, Grace AA (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5167–5172.
- McDonald MP, Wong R, Goldstein G, Weintraub B, Cheng SY, Crawley JN (1998) Hyperactivity and learning deficits in transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone beta1 receptor gene. *Learn Mem* 5:289–301.
- McGaughy J, Ross RS, Eichenbaum H (2008) Noradrenergic, but not cholinergic, deafferentation of prefrontal cortex impairs attentional set-shifting. *Neuroscience* 153:63–71.
- Montague PR, Dayan P, Sejnowski TJ (1996) A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *J Neurosci* 16:1936–1947.
- Morales M, Margolis EB (2017) Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18:73–85.
- Nassar MR, Rumsey KM, Wilson RC, Parikh K, Heasley B, Gold JI (2012) Rational regulation of learning dynamics by pupil-linked arousal systems. *Nat Neurosci* 15:1040–1046.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165–205.
- Nicola SM (2010) The flexible approach hypothesis: unification of effort and cue-responding hypotheses for the role of nucleus accumbens dopamine in the activation of reward-seeking behavior. *J Neurosci* 30:16585–16600.

- Novak M, Halbout B, O'Connor EC, Rodriguez Parkitna J, Su T, Chai M, Crombag HS, Bilbao A, Spanagel R, Stephens DN, Schütz G, Engblom D (2010) Incentive learning underlying cocaine-seeking requires mGluR5 receptors located on dopamine D1 receptor-expressing neurons. *J Neurosci* 30:11973–11982.
- O'Doherty J, Dayan P, Schultz J, Deichmann R, Friston K, Dolan RJ (2004) Dissociable roles of ventral and dorsal striatum in instrumental conditioning. *Science* 304:452–454.
- Ohtsuka N, Tansky MF, Kuang H, Kourrich S, Thomas MJ, Rubenstein JLR, Ekker M, Leeman SE, Tsien JZ (2008) Functional disturbances in the striatum by region-specific ablation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12961–12966.
- Olpe HR, Steinmann MW, Brugger F, Pozza MF (1989) Excitatory amino acid receptors in rat locus coeruleus. An extracellular in vitro study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 339:312–314.
- Overton P, Clark D (1992) Iontophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse* 10:131–140.
- Paladini CA, Roeper J (2014) Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience* 282:109–121.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14:383–400.
- Parker JG, Zweifel LS, Clark JJ, Evans SB, Phillips PEM, Palmiter RD (2010) Absence of NMDA receptors in dopamine neurons attenuates dopamine release but not conditioned approach during Pavlovian conditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13491–13496.
- Parker NF, Cameron CM, Taliaferro JP, Lee J, Choi JY, Davidson TJ, Daw ND, Witten IB (2016) Reward and choice encoding in terminals of midbrain dopamine neurons depends on striatal target. *Nat Neurosci* 19:845–854.

- Payzan-LeNestour E, Dunne S, Bossaerts P, O'Doherty JP (2013) The neural representation of unexpected uncertainty during value-based decision making. *Neuron* 79:191–201.
- Pessiglione M, Seymour B, Flandin G, Dolan RJ, Frith CD (2006) Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans. *Nature* 442:1042–1045.
- Phillips PEM, Stuber GD, Heien MLAV, Wightman RM, Carelli RM (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature* 422:614–618.
- Preuschoff K, 't Hart BM, Einhäuser W (2011) Pupil Dilation Signals Surprise: Evidence for Noradrenaline's Role in Decision Making. *Front Neurosci* 5:115.
- Privitera CM, Renninger LW, Carney T, Klein S, Aguilar M (2010) Pupil dilation during visual target detection. *J Vis* 10:3.
- Rajkowski J, Kubiak P, Aston-Jones G (1994) Locus coeruleus activity in monkey: phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res Bull* 35:607–616.
- Rajkowski J, Majczynski H, Clayton E, Aston-Jones G (2004) Activation of monkey locus coeruleus neurons varies with difficulty and performance in a target detection task. *J Neurophysiol* 92:361–371.
- Ramos BP, Arnsten AFT (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther* 113:523–536.
- Reynolds JN, Hyland BI, Wickens JR (2001) A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* 413:67–70.
- Rodriguez Parkitna J, Engblom D, Schütz G (2009) Generation of Cre recombinase-expressing transgenic mice using bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 530:325–342.
- Rodriguez Parkitna J, Sikora M, Gołda S, Gołombiowska K, Bystrowska B, Engblom D, Bilbao A, Przewlocki R (2013) Novelty-seeking behaviors and the escalation of alcohol drinking after abstinence in mice are controlled by metabotropic glutamate receptor 5 on neurons expressing dopamine d1 receptors. *Biol Psychiatry* 73:263–270.

- Rodriguez Parkitna J, Solecki W, Gołombiowska K, Tokarski K, Kubik J, Gołda S, Novak M, Parlato R, Hess G, Sprengel R, Przewłocki R (2012) Glutamate input to noradrenergic neurons plays an essential role in the development of morphine dependence and psychomotor sensitization. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:1457–1471.
- Roeper J (2013) Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci* 36:336–342.
- Roitman MF, Stuber GD, Phillips PEM, Wightman RM, Carelli RM (2004) Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J Neurosci* 24:1265–1271.
- Rutledge RB, Dean M, Caplin A, Glimcher PW (2010) Testing the reward prediction error hypothesis with an axiomatic model. *J Neurosci* 30:13525–13536.
- Rutledge RB, Lazzaro SC, Lau B, Myers CE, Gluck MA, Glimcher PW (2009) Dopaminergic drugs modulate learning rates and perseveration in Parkinson's patients in a dynamic foraging task. *J Neurosci* 29:15104–15114.
- Salamone JD, Correa M (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76:470–485.
- Salamone JD, Wisniecki A, Carlson BB, Correa M (2001) Nucleus accumbens dopamine depletions make animals highly sensitive to high fixed ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience* 105:863–870.
- Salamone JD, Yohn SE, López-Cruz L, San Miguel N, Correa M (2016) Activational and effort-related aspects of motivation: neural mechanisms and implications for psychopathology. *Brain* 139:1325–1347.
- Samejima K, Ueda Y, Doya K, Kimura M (2005) Representation of action-specific reward values in the striatum. *Science* 310:1337–1340.
- Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:211–223.
- Sara SJ, Bouret S (2012) Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* 76:130–141.

- Sara SJ, Hervé-Minvielle A (1995) Inhibitory influence of frontal cortex on locus coeruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6032–6036.
- Sara SJ, Segal M (1991) Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. *Prog Brain Res* 88:571–585.
- Saunders BT, Robinson TE (2012) The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian-conditioned responses. *Eur J Neurosci* 36:2521–2532.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1–27.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593–1599.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321:848–851.
- Sikora M, Tokarski K, Bobula B, Zajdel J, Jastrzębska K, Cieślak PE, Zygmunt M, Sowa J, Smutek M, Kamińska K, Gołombiowska K, Engblom D, Hess G, Przewlocki R, Rodriguez Parkitna J (2016) NMDA Receptors on Dopaminergic Neurons Are Essential for Drug-Induced Conditioned Place Preference. *eNeuro* 3.
- Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2009) Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 29:1735–1742.
- St Onge JR, Abhari H, Floresco SB (2011) Dissociable contributions by prefrontal D1 and D2 receptors to risk-based decision making. *J Neurosci* 31:8625–8633.
- St Onge JR, Floresco SB (2009) Dopaminergic modulation of risk-based decision making. *Neuropsychopharmacology* 34:681–697.
- Stanislaw H, Todorov N (1999) Calculation of signal detection theory measures. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 31:137–149.
- Stopper CM, Khayambashi S, Floresco SB (2013) Receptor-specific modulation of risk-based decision making by nucleus accumbens dopamine. *Neuropsychopharmacology* 38:715–728.

- Stopper CM, Tse MTL, Montes DR, Wiedman CR, Floresco SB (2014) Overriding phasic dopamine signals redirects action selection during risk/reward decision making. *Neuron* 84:177–189.
- Surmeier DJ, Plotkin J, Shen W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* 19:621–628.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579–6591.
- Syed ECJ, Grima LL, Magill PJ, Bogacz R, Brown P, Walton ME (2016) Action initiation shapes mesolimbic dopamine encoding of future rewards. *Nat Neurosci* 19:34–36.
- Tai L-H, Lee AM, Benavidez N, Bonci A, Wilbrecht L (2012) Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. *Nat Neurosci* 15:1281–1289.
- Tait DS, Brown VJ, Farovik A, Theobald DE, Dalley JW, Robbins TW (2007) Lesions of the dorsal noradrenergic bundle impair attentional set-shifting in the rat. *Eur J Neurosci* 25:3719–3724.
- Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W (2005) Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science* 307:1642–1645.
- Treadway MT, Bossaller NA, Shelton RC, Zald DH (2012a) Effort-based decision-making in major depressive disorder: A translational model of motivational anhedonia. *Journal of Abnormal Psychology* 121:553–558.
- Treadway MT, Buckholtz JW, Cowan RL, Woodward ND, Li R, Ansari MS, Baldwin RM, Schwartzman AN, Kessler RM, Zald DH (2012b) Dopaminergic mechanisms of individual differences in human effort-based decision-making. *J Neurosci* 32:6170–6176.
- Uematsu A, Tan BZ, Ycu EA, Cuevas JS, Koivumaa J, Junyent F, Kremer EJ, Witten IB, Deisseroth K, Johansen JP (2017) Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat Neurosci* 20:1602–1611.

- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault J-A (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538–547.
- Waelti P, Dickinson A, Schultz W (2001) Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature* 412:43–48.
- Wang LP, Li F, Wang D, Xie K, Wang D, Shen X, Tsien JZ (2011) NMDA receptors in dopaminergic neurons are crucial for habit learning. *Neuron* 72:1055–1066.
- Whitton AE, Treadway MT, Pizzagalli DA (2015) Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 28:7–12.
- Wickens JR (2009) Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behav Brain Res* 199:119–128.
- Wickham R, Solecki W, Rathbun L, McIntosh JM, Addy NA (2013) Ventral tegmental area $\alpha 6\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors modulate phasic dopamine release in the nucleus accumbens core. *Psychopharmacology (Berl)* 229:73–82.
- Wickham RJ, Solecki WB, Nunes EJ, Addy NA (2015) Distinct effects of ventral tegmental area NMDA and acetylcholine receptor blockade on conditioned reinforcement produced by food-associated cues. *Neuroscience* 301:384–394.
- Wightman RM, Robinson DL (2002) Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with “reward.” *J Neurochem* 82:721–735.
- Witten IB, Steinberg EE, Lee SY, Davidson TJ, Zalocusky KA, Brodsky M, Yizhar O, Cho SL, Gong S, Ramakrishnan C, Stuber GD, Tye KM, Janak PH, Deisseroth K (2011) Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 72:721–733.
- Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GCR, Urakubo H, Ishii S, Kasai H (2014) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345:1616–1620.
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22:505–512.

- Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008) Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur J Neurosci* 28:1437–1448.
- Yu AJ, Dayan P (2005) Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron* 46:681–692.
- Zweifel LS, Argilli E, Bonci A, Palmiter RD (2008) Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* 59:486–496.
- Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJY, Paladini CA, Phillips PEM, Palmiter RD (2009) Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7281–7288.

Spis tabel

Tabela 1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach	23
Tabela 2. Osobniki wykluczone z analiz statystycznych	34
Tabela 3. Wartości parametrów modelu	38
Tabela 4. Wartości parametrów modelu	55
Tabela 5. Szczegółowe zestawienie analiz statystycznych	88

Spis rycin

Rycina 1. Graficzne podsumowanie badań	20
Rycina 2. Test uczenia się z losowym wzmocnieniem	36
Rycina 3. Wybór częściej nagradzanej strony	37
Rycina 4. Zgodność wyborów z prawem dopasowania	38
Rycina 5. Prawdopodobieństwo powtórzenia nagrodzonego wyboru	39
Rycina 6. Wpływ poprzednich wyborów na aktualny wybór	40
Rycina 7. Czas dokonania wyboru	41
Rycina 8. Czas pobrania nagrody	41
Rycina 9. Ocena wartości nagród	42
Rycina 10. Czas dokonania wyboru	43
Rycina 11. Ocena wartości predykcyjnej i motywacyjnej bodźców	44
Rycina 12. Motywacja do zdobycia nagrody	46
Rycina 13. Wigor działania	47
Rycina 14. Detekcja sygnału	48
Rycina 15. Selektywność uwagi	50
Rycina 16. Przerzutność uwagi	52
Rycina 17. Test uczenia się z losowym wzmocnieniem	54
Rycina 18. Wybór częściej nagradzanej strony	55
Rycina 19. Zgodność wyborów z prawem dopasowania	55
Rycina 20. Prawdopodobieństwo powtórzenia nagrodzonego wyboru	57
Rycina 21. Podsumowanie uzyskanych wyników	58

Wykaz skrótów

AMPA, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate* –
α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionian

AMY, *amygdala* – ciało migdałowe

BG, *basal ganglia* – jądra podstawne

BLA, *basolateral amygdala* – część podstawno-boczna ciała migdałowego

BOLD, *blood oxygenation level dependent* – sygnał zależny od poziomu natlenienia krwi

CPu, *caudate-putamen* – jądro ogoniaste i skorupa

D1R, *D1 dopamine receptor* – receptor dopaminowy D1

DA, *dopamine* – dopamina

DAT, *dopamine active transporter* – transporter dopaminy

DBH, *dopamine beta-hydroxylase* – β -hydroksylaza dopaminy

EPSC, *excitatory postsynaptic current* – pobudzający prąd postsynaptyczny

GABA, *gamma-aminobutyric acid* – kwas *γ*-aminomasłowy

GLU, *glutamate* – glutaminian

GPe, *external globus pallidus* – część zewnętrzna gałki bladej

GPI, *internal globus pallidus* – część wewnętrzna gałki bladej

HIP, *hippocampus* – hipokamp

LC, *locus coeruleus* – miejsce sinawe

LDT, *laterodorsal tegmental nucleus* – jądro grzbietowo-boczne nakrywki mostu

LTD, *long-term depression* – długotrwałe osłabienie synaptyczne

LTP, *long-term potentiation* – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

mGluR5, *metabotropic glutamate receptor 5* – metabotropowy receptor dla glutaminianu mGluR5

mPFC, *medial prefrontal cortex* – przyśrodkowa część kory przedczołowej

MSNs, *medium spiny neurons* – neurony średnie kolczyste

NA, *noradrenaline* – noradrenalina

NAc, *nucleus accumbens* – jądro półleżące

NMDA, *N-methyl-D-aspartate* – N-metylo-D-asparaginian

TH, *tyrosine hydroxylase* – enzym hydroksylaza tyrozynowa

THA, *thalamus* – wzgórze

PFC, *prefrontal cortex* – kora przedczołowa

PGi, *nucleus paragigantocellularis* – jądro przyolbrzymiokomórkowe

PPT, *pedunculopontine tegmental nucleus* – jądro konarowo-mostowe nakrywki mostu

RMT, *rostromedial tegmental nucleus* – jądro brzuszno-przyśrodkowe nakrywki

SNC, *substantia nigra pars compacta* – część zbita istoty czarnej

SNr, *substantia nigra pars reticulata* – część siatkowata istoty czarnej

STN, *subthalamic nucleus* – jądro niskowzgórzowe

VP, *ventral pallidum* – brzuszna część gałki bladej

VTA, *ventral tegmental area* – pole brzuszne nakrywki

Tabela statystyczna

Tabela 5. Zestawienie wyników analiz statystycznych.

Rycina/Tabela	Zmienna zależna	Czynnik	Wynik
Rycina 3A	<i>P</i> wyboru częściej nagradzanej strony	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,168} = 1.9, p = 0.0298$ $F_{1,12} = 11.5, p = 0.0054$ $F_{14,168} = 17.15, p < 0.0001$
Rycina 3B	<i>P</i> wyboru częściej nagradzanej strony	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.49, p = 0.1180$ $F_{1,15} = 12.62, p = 0.0029$ $F_{14,210} = 20.69, p < 0.0001$
Rycina 3C	<i>P</i> wyboru częściej nagradzanej strony	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,182} = 0.53, p = 0.9103$ $F_{1,13} = 1.79, p = 0.2034$ $F_{14,182} = 19.17, p < 0.0001$
Rycina 4A Tabela 3	wrażliwość na wzmocnienie (<i>a</i>) tendencyjność wyboru (<i>b</i>)	genotyp genotyp	$t_{12} = 1.57, p = 0.1424$ $t_{12} = 0.13, p = 0.8954$
Rycina 4B Tabela 3	wrażliwość na wzmocnienie (<i>a</i>) tendencyjność wyboru (<i>b</i>)	genotyp genotyp	$t_{15} = 4.58, p = 0.0004$ $t_{15} = 1.54, p = 0.1449$
Rycina 4C Tabela 3	wrażliwość na wzmocnienie (<i>a</i>) tendencyjność wyboru (<i>b</i>)	genotyp genotyp	$t_{13} = 1.6, p = 0.1331$ $t_{13} = 1.67, p = 0.1132$
Rycina 5A	<i>P</i> wyboru wygrana-pozostań <i>P</i> wyboru przegrana-zmień	genotyp genotyp	$t_{12} = 4.06, p = 0.0016$ $t_{12} = 0.71, p = 0.4917$
Rycina 5B	<i>P</i> wyboru wygrana-pozostań <i>P</i> wyboru przegrana-zmień	genotyp genotyp	$t_{15} = 3.16, p = 0.0065$ $t_{15} = 1.68, p = 0.1139$
Rycina 5C	<i>P</i> wyboru wygrana-pozostań <i>P</i> wyboru przegrana-zmień	genotyp genotyp	$t_{13} = 1.72, p = 0.1091$ $t_{13} = 1.89, p = 0.0815$
Rycina 6A	'+' współczynnik regresji dla próby -1	genotyp	$t_{12} = 4.43, p = 0.0008$
Rycina 6B	'+' współczynnik regresji dla próby -1	genotyp	$t_{15} = 2.9, p = 0,0110$
Rycina 6C	'+' współczynnik regresji dla próby -1	genotyp	$t_{13} = 1.93, p = 0,0757$
Rycina 7A	czas dokonania wyboru	genotyp × próba genotyp próba	$F_{119,1428} = 0.9, p = 0.7764$ $F_{1,12} = 34.89, p < 0.0001$ $F_{119,1428} = 1.07, p = 0.2910$
Rycina 7B	czas dokonania wyboru	genotyp × próba genotyp próba	$F_{119,1785} = 1.52, p = 0.0004$ $F_{1,15} = 18.37, p = 0.0006$ $F_{119,1785} = 1.58, p = 0.0001$
Rycina 7C	czas dokonania wyboru	genotyp × próba genotyp próba	$F_{119,1547} = 0.93, p = 0.6885$ $F_{1,13} = 1.45, p = 0.2499$ $F_{119,1547} = 3.16, p < 0.0001$
Rycina 7D	czas dokonania wyboru	genotyp × wynik genotyp wynik	$F_{1,24} = 6.15, p = 0.0205$ $F_{1,24} = 44.66, p < 0.0001$ $F_{1,24} = 40.23, p < 0.0001$

TABELA STATYSTYCZNA

Rycina/Tabela	Zmienna zależna	Czynnik	Wynik
Rycina 7E	czas dokonania wyboru	genotyp × wynik genotyp wynik	$F_{1,30} = 5.04, p = 0.0323$ $F_{1,30} = 23.37, p < 0.0001$ $F_{1,30} = 139.21, p < 0.0001$
Rycina 7F	czas dokonania wyboru	genotyp × wynik genotyp wynik	$F_{1,26} = 0.23, p = 0.6347$ $F_{1,26} = 1.70, p = 0.2043$ $F_{1,26} = 14.08, p = 0.0009$
Rycina 8A	czas pobrania nagrody	genotyp	$t_{12} = 4.3, p = 0.0010$
Rycina 8B	czas pobrania nagrody	genotyp	$t_{15} = 3.24, p = 0.0055$
Rycina 8C	czas pobrania nagrody	genotyp	$t_{13} = 0.42, p = 0.6840$
Rycina 9B	% wyboru dużej nagrody	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,33} = 0.85, p = 0.4753$ $F_{1,11} < 0.01, p = 0.9831$ $F_{3,33} = 39.53, p < 0.0001$
Rycina 9C	% wyboru dużej nagrody	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,45} = 0.15, p = 0.9275$ $F_{1,15} = 0.67, p = 0.4250$ $F_{3,45} = 109.92, p < 0.0001$
Rycina 9D	% wyboru dużej nagrody	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,36} = 1.77, p = 0.1706$ $F_{1,12} = 1.39, p = 0.2614$ $F_{3,36} = 109.92, p < 0.0001$
Rycina 10A	czas dokonania wyboru (wymuszonego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,33} = 3.11, p = 0.0396$ $F_{1,11} = 67.02, p < 0.0001$ $F_{3,33} = 0.97, p = 0.4193$
Rycina 10B	czas dokonania wyboru (wymuszonego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,45} = 1.42, p = 0.2486$ $F_{1,15} = 21.96, p = 0.0003$ $F_{3,45} = 5.40, p = 0.0029$
Rycina 10C	czas dokonania wyboru (wymuszonego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,36} = 0.71, p = 0.5533$ $F_{1,12} = 0.53, p = 0.4815$ $F_{3,36} = 8.94, p = 0.0001$
Rycina 10D	czas dokonania wyboru (wolnego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,33} = 1.81, p = 0.1642$ $F_{1,11} = 42.73, p < 0.001$ $F_{3,33} = 0.66, p = 0.5816$
Rycina 10E	czas dokonania wyboru (wolnego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,45} = 0.10, p = 0.9605$ $F_{1,15} = 9.14, p = 0.0085$ $F_{3,45} = 6.11, p = 0.0014$
Rycina 10F	czas dokonania wyboru (wolnego)	genotyp × <i>P</i> genotyp <i>P</i>	$F_{3,36} = 2.61, p = 0.0665$ $F_{1,12} = 0.88, p = 0.3673$ $F_{3,36} = 9.09, p = 0.0001$
Rycina 11B	ilość wizyt w podajniku (kontrola)	bodziec × sesja bodziec sesja	$F_{10,220} = 4.13, p < 0.0001$ $F_{1,22} = 15.59, p = 0.0007$ $F_{10,220} = 2.07, p = 0.0278$
	ilość wizyt w podajniku (mutant)	bodziec × sesja bodziec sesja	$F_{10,220} = 0.76, p = 0.6701$ $F_{1,22} = 22.86, p < 0.0001$ $F_{10,220} = 2.73, p = 0.0035$

TABELA STATYSTYCZNA

Rycina/Tabela	Zmienna zależna	Czynnik	Wynik
Rycina 11B	ilość wizyt w podajniku (CS+)	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 3.60, p = 0.0002$ $F_{1,22} = 3.75, p = 0.0658$ $F_{10,220} = 1.61, p = 0.1049$
	ilość wizyt w podajniku (CS-)	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 1.07, p = 0.3860$ $F_{1,22} = 2.18, p = 0.1541$ $F_{10,220} = 4.19, p < 0.0001$
Rycina 11C	ilość wizyt w podajniku (kontrola)	bodziec × sesja bodziec sesja	$F_{10,220} = 3.28, p = 0.0006$ $F_{1,22} = 6.40, p = 0.0190$ $F_{10,220} = 5.70, p < 0.0001$
	ilość wizyt w podajniku (mutant)	bodziec × sesja bodziec sesja	$F_{10,220} = 1.23, p = 0.2755$ $F_{1,22} = 3.19, p = 0.0879$ $F_{10,220} = 11.40, p < 0.0001$
	ilość wizyt w podajniku (CS+)	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 1.47, p = 0.1528$ $F_{1,22} = 0.49, p = 0.4906$ $F_{10,220} = 26.99, p < 0.0001$
	ilość wizyt w podajniku (CS-)	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 0.82, p = 0.6128$ $F_{1,22} = 1.08, p = 0.3095$ $F_{10,220} = 2.13, p = 0.0236$
Rycina 11D	ilość wizyt w podajniku	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 2.71, p = 0.0037$ $F_{1,22} = 0.74, p = 0.3989$ $F_{10,220} = 15.65, p < 0.0001$
Rycina 11E	czas do pierwszej wizyty (CS+)	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{10,220} = 0.77, p = 0.6613$ $F_{1,22} = 0.96, p = 0.3369$ $F_{10,220} = 12.21, p < 0.0001$
Rycina 11F	ilość odpowiedzi (CS+ vs CS-)	genotyp × bodziec genotyp bodziec	$F_{1,42} = 0.55, p = 0.4645$ $F_{1,42} = 7.34, p = 0.0097$ $F_{1,42} = 7.11, p = 0.0109$
Rycina 12B	czas zakończenia zadania	genotyp	$t_{11} = 1.11, p = 0.2902$
Rycina 12C	ilość odpowiedzi	genotyp	$t_{11} = 3.02, p = 0.0117$
Rycina 12D	osiągnięte kryterium	genotyp	$t_{11} = 3.07, p = 0.0107$
Rycina 12E	ilość uzyskanych nagród	genotyp	$t_{11} = 3.63, p = 0.0039$
Rycina 12F	ilość wizyt w podajniku	genotyp	$t_{11} = 0.64, p = 0.5374$
Rycina 12G	czas pobrania nagrody	genotyp	$t_{11} = 2.17, p = 0.0524$
Rycina 13B	liczba ciągów	genotyp × próba genotyp próba	$F_{7,13} = 1.06, p = 0.438$ $F_{1,13} = 0.09, p = 0.760$ $F_{7,13} = 21.79, p < 0.001$
Rycina 13C	czas trwania próby	genotyp × próba genotyp próba	$F_{7,11} = 3.92, p = 0.021$ $F_{1,9} = 12.23, p = 0.006$ $F_{7,11} = 17.05, p < 0.001$
Rycina 13D	czas inicjacji	genotyp × próba genotyp próba	$F_{7,28} = 2.65, p = 0.030$ $F_{1,12} = 17.25, p = 0.001$ $F_{7,28} = 4.22, p = 0.003$

TABELA STATYSTYCZNA

Rycina/Tabela	Zmienna zależna	Czynnik	Wynik
Rycina 13E	ilość powtórzeń	genotyp × próba genotyp próba	$F_{7,10} = 3.32, p = 0.039$ $F_{1,11} = 2.68, p = 0.130$ $F_{7,10} = 83.05, p < 0.001$
Rycina 13F	odstęp czasu pomiędzy ciągami	genotyp × próba genotyp próba	$F_{7,10} = 2.98, p = 0.054$ $F_{1,14} = 10.65, p = 0.005$ $F_{7,10} = 3.65, p = 0.029$
Rycina 14B	proporcja trafień	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{4,76} = 0.42, p = 0.7930$ $F_{1,19} = 0.76, p = 0.3941$ $F_{4,76} = 1.58, p = 0.1877$
	czas reakcji	genotyp	$t_{19} = 1.19, p = 0.2490$
Rycina 14C	ilość resetów okresu oczekiwania	genotyp	$t_{19} = 0.99, p = 0.3356$
Rycina 14D	ilość przedwczesnych odpowiedzi	genotyp	$t_{19} = 0.63, p = 0.5386$
Rycina 15B	proporcja trafień	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{9,171} = 1.68, p = 0.0976$ $F_{1,19} = 0.02, p = 0.9037$ $F_{9,171} = 2.86, p = 0.0036$
	czas reakcji	genotyp	$t_{19} = 0.21, p = 0.8388$
Rycina 15C	proporcja fałszywych alarmów	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{9,171} = 0.58, p = 0.8105$ $F_{1,19} = 0.73, p = 0.4027$ $F_{9,171} = 4.97, p < 0.0001$
	czas reakcji	genotyp	$t_{19} = 0.17, p = 0.8675$
Rycina 15D	czułość (d')	genotyp	$t_{19} = 2.28, p = 0.0343$
Rycina 15E	ilość resetów okresu oczekiwania	genotyp	$t_{19} = 2.6, p = 0.0177$
Rycina 15F	ilość przedwczesnych odpowiedzi	genotyp	$t_{19} = 2.23, p = 0.0381$
Rycina 16B	ilość prób do kryterium	genotyp × faza genotyp faza	$F_{8,192} = 1.62, p = 0.1223$ $F_{1,24} = 11.36, p = 0.0025$ $F_{8,192} = 10.18, p < 0.0001$
Rycina 16C	ilość błędów do kryterium	genotyp × faza genotyp faza	$F_{8,192} = 1.81, p = 0.0773$ $F_{1,24} = 14.01, p = 0.0010$ $F_{8,192} = 7.79, p < 0.0001$
Rycina 16D	czas ukończenia fazy	genotyp × faza genotyp faza	$F_{8,192} = 0.53, p = 0.8306$ $F_{1,24} = 0.18, p = 0.6717$ $F_{8,192} = 7, p < 0.0001$
Rycina 18A	P wyboru częściej nagradzanej strony	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.56, p = 0.0929$ $F_{1,15} = 2.98, p = 0.1046$ $F_{14,210} = 13.16, p < 0.0001$
Rycina 18B	ilość pominięć	genotyp	$t_{15} = 0.58, p = 0.5715$
Rycina 18C	czas dokonania wyboru	genotyp	$t_{15} = 1.32, p = 0.2058$
Rycina 18D	czas pobrania nagrody	genotyp	$t_{15} = 0.79, p = 0.4431$
Rycina 19 Tabela 4	wrażliwość na wzmocnienie (a) tendencyjność wyboru (b)	genotyp genotyp	$t_{15} = 1.84, p = 0.0863$ $t_{15} = 0.75, p = 0.4651$

TABELA STATYSTYCZNA

Rycina/Tabela	Zmienna zależna	Czynnik	Wynik
Rycina 20A	<i>P</i> wyboru wygrana-pozostań	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.3, p = 0.2068$ $F_{1,15} = 3.77, p = 0.0711$ $F_{14,210} = 13.73, p < 0.0001$
Rycina 20B	<i>P</i> wyboru przegrana-pozostań	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.06, p = 0.3960$ $F_{1,15} = 3.45, p = 0.0830$ $F_{14,210} = 5.45, p < 0.0001$
Rycina 20C	<i>P</i> wyboru wygrana-zmien	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.41, p = 0.1511$ $F_{1,15} = 3.36, p = 0.0867$ $F_{14,210} = 9.67, p < 0.0001$
Rycina 20D	<i>P</i> wyboru przegrana-zmien	genotyp × sesja genotyp sesja	$F_{14,210} = 1.03, p = 0.4284$ $F_{1,15} = 0.69, p = 0.4193$ $F_{14,210} = 0.8, p = 0.6664$
Rycina 20E	<i>P</i> wyboru strategii	genotyp × strategia genotyp strategia	$F_{3,60} = 4.56, p = 0.0061$ $F_{1,60} = 0, p = 1$ $F_{3,60} = 79.39, p < 0.0001$