

# USPOSTAVLJANJE NOVOG PREDLOŠKA VIZUALNE DISKRIMINACIJE KOD IMOBILIZIRANIH MIŠEVA KORISTEĆI OKRUŽENJE VIRTUALNE STVARNOSTI

---

Oršolić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:428258>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
ODJEL ZA BIOLOGIJU**

**Diplomski znanstveni studij biologije**

**Ivana Oršolić**

**USPOSTAVLJANJE NOVOG PREDLOŠKA VIZUALNE DISKRIMINACIJE KOD  
IMOBILIZIRANIH MIŠEVA KORISTEĆI OKRUŽENJE VIRTUALNE STVARNOSTI**

**Diplomski rad**

*Osijek, 2013.*

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Diplomski znanstveni studij biologije

Diplomski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

## USPOSTAVLJANJE NOVOG PREDLOŠKA VIZUALNE DISKRIMINACIJE KOD IMOBILIZIRANIH MIŠEVA KORISTEĆI OKRUŽENJE VIRTUALNE STVARNOSTI

Ivana Oršolić

**Rad je izrađen:** Odjel za neuroznanost, fiziologiju i farmakologiju, University College London, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.

**Mentor:** Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön

**Komentor:** Prof.dr.sc. Thomas D. Mrsic-Flogel

Tradicionalan pogled na senzoričke regije mozga držao je kako je aktivnost neurona u tim regijama vođena isključivo osjetnim informacijama istog modaliteta kao i regija u pitanju. Međutim, novija saznanja upućuju na to kako su senzoričke regije mozga pod utjecajem informacija kao što su kretanje ili pozornost životinje, očekivanje nagrade, prijašnje iskustvo. Kako bi se obrađivanje osjetne informacije moglo promatrati u tim različitim kontekstima, nužno je omogućiti snimanje aktivnosti pojedinog neurona istraživane regije kod budnih životinja koje se aktivno ponašaju. Ovaj diplomski rad opisuje bihevioralni zadatak vizualne diskriminacije kojeg miš kao modelna životinja može lako savladati i ispoljiti stabilno ponašanje čak i u uvjetima snimanja visoke rezolucije.

**Broj stranica:** 47

**Broj slika:** 24

**Broj literaturnih navoda:** 87

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** osjetni sustav, vidna diskriminacija, pozornost, učenje, ponašanje životinje,

**Datum obrane:** 23.09.2013.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

- 1. Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön**, Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- 2. Prof.dr.sc. Marija Heffer**, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- 3. Doc.dr.sc. Ivna Štolfa**, Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Biology**  
**Graduate Study of Biology**

**Master Thesis**

**Scientific Area:** Natural science  
**Scientific Field:** Biology

### **ESTABLISHING A NOVEL VISUAL DISCRIMINATION PARADIGM IN HEAD-FIXED MICE USING VIRTUAL REALITY ENVIRONMENT**

**Ivana Oršolić**

**Thesis performed at:** Department of Neuroscience, Physiology and Pharmacology, University College London, London, United Kingdom.

**Supervisor:** Elizabeta Has-Schön, PhD, Full Professor

**Cosupervisor:** Thomas D. Mrsic-Flogel, PhD, Associate Professor

Traditionally it was thought how activity of neurons in sensory brain regions is driven by sensory information of the same modality as the region in question. However, recent findings are showing how brain sensory regions are also affected by non-sensory information such as locomotion, attention, reward expectation or previous experience. In order to observe sensory information processing in various contexts mentioned, one must observe neural activity at the single cell level in region of interest while animal is awake and behaving. This thesis is describing a novel behavioral visual discrimination paradigm that is easily learned by mouse as the model animal, and that gives out stable behavior even in condition of high resolution imaging.

**Number of pages:** 47

**Number of figures:** 24

**Number of references:** 87

**Original in:** Croatian

**Key words:** sensory system, visual discrimination, attention, learning, animal behaviour

**Date of the thesis defence:** 23.09.2013.

#### **Reviewers:**

**1. Elizabeta Has-Schön, PhD, Full Professor,** Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.

**2. Marija Heffer, MD, PhD, Full Professor,** School of Medicine, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.

**3. Ivna Štolfa, PhD, Assistant Professor,** Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.

*Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.*

*Neizmjerno se zahvaljujem prof.dr.sc. Thomasu D. Mršić-Flögelu na njegovom mentorstvu te što mi je omogućio izradu ovog diplomskog rada u njegovom laboratoriju na UCL Sveučilištu u Londonu. Posebice bih se zahvalila dr.sc. Adil G. Khanu, dr.sc. Jasperu Poortu te dr.sc. Abdellatifu Nemriju na njihovoj nesebičnoj pomoći i savjetima. Zahvale upućujem i prof.dr.sc. Elizabeti Has-Schön na iskazanoj podršci i pomoći tijekom mojeg studija.*

*Željela bih se zahvaliti i prof.dr.sc. Mariji Heffer što mi je omogućila da napravim svoje prve znanstvene korake u njezinom laboratoriju i pomogla mi da bolje oblikujem i slijedim svoje znanstvene interese. Hvala i dr.sc. Rosemary Vuković na prenesenoj hrabrosti i sabranosti u trenucima kada je meni iste nedostajalo.*

*Naposljetku, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz cijelo vrijeme mojeg studija te svima ostalima koji su doprinijeli u izradi ovog rada.*

## **Sadržaj:**

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Povijesni pregled proučavanja vidnog sustava.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Miš kao predmet istraživanja neuroznanosti vidnog sustava .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2. Osnovni anatomski pregled retinotalamokortikalnog puta kod miša</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Pregled proučavanja ponašanja u neuroznanosti vidnog sustava miša</b>	<b>7</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Osmišljavanje i podešavanje parametara bihevioralnog zadatka .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Određivanje bihevioralnih parametara mjerenih tijekom zadatka.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Bihevioralni trening.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Analiza podataka .....</b>	<b>17</b>
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Kratak pregled rezultata.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Analiza piezo signala .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Analiza brzine trčanja životinje .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Aktivnost stanica vidnog korteksa tijekom bihevioralnog zadatka ....</b>	<b>31</b>
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Bihevioralni odgovor životinje – piezo signali.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Utjecaj kretanja na ponašanje životinje.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3. Brzina savladavanja bihevioralnog zadatka.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4. Korištenje kreni-stani dizajna zadatka.....</b>	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>

## 1. UVOD

### 1.1. POVIJESNI PREGLED PROUČAVANJA VIDNOG SUSTAVA

Proučavanje vidnog sustava kao modela u istraživanju neuronskih krugova i procesuiranja informacija u mozgu nosi iste prednosti kao i proučavanje bilo kojeg osjetnog sustava: unos (engl. *input*) u sustav je poznat i moguće ga je kontrolirati, a odgovor (engl. *output*) sustava može se očitati kao aktivnost pojedinih stanica ili kao promjena ponašanja na razini cijelog organizma. Kao i kod ostalih osjetnih sustava, tok informacije u vidnom sustavu usmjeren je iz okoline prema senzoru osjetljivom na taj tip informacije. Strukturu svakog osjetnog sustava možemo podijeliti u osnovne gradivne jedinice koje uključuju:

- (1) receptorski organ koji prikuplja određeni vid energije iz okoliša i pretvara ju u elektrokemijsku energiju (u slučaju vidnog sustava složena mreža neurona prisutna je već na ovoj razini – razini mrežnice),
- (2) živac koji prenosi te informacije do mozga,
- (3) neuronske krugove u mozgu odgovorne za procesiranje prikupljenih informacija i pokretanje efektorskih sustava.

Proučavanjem fizikalnih struktura bilo kojeg osjetnog sustava možemo doći do zaključaka kako taj sustav i njegove komponente funkcioniraju. Taj pristup je maksimalno iskorišten na razini senzora osjetnih sustava gdje je čisti fizikalni pristup bio plodonosan u rasvjetljivanju osnova ranih optičkih događaja u procesu vida. Prije nego dođe do mrežnice, svjetlo mora proći kroz optičke dijelove oka koji su postavljeni tako da usmjeravaju svjetlost iz okruženja na mrežu receptora koji su smješteni u mrežnici. Glavni optički dijelovi oka su zjenica koja utječe na količinu svjetla koje biva propušteno u unutrašnjost oka i leća koja usmjerava propušteno svjetlo na stražnji dio oka. Svaka od ovih struktura utječe na jedan od dva glavna parametra vida koji moraju ostati prilagodljivi uvjetima u okolišu, a to su jarkost slike i fokus slike.

U najranijim pokušajima objašnjenja vida, većina teorija smatrala je da je leća oka fotoosjetljivi dio oka. Tek u sedamnaestom stoljeću znanstveno obrazloženje optike oka i nastanka slike predložio je Johannes Kepler (1604) koji je ustvrdio kako je mrežnica senzorni dio oka i tako ju postavio u središte istraživanja vidnog sustava za nadolazeća stoljeća (Wade & Finger, 2001).

Najraniji uvid u anatomska svojstva mrežnice dao je Schultze (1866) koji je opisao dva

različita tipa fotoreceptora. Više o staničnoj arhitekturi bilo je jasno iz rada Cajala koji je upotrijebio Golgievu tehniku bojanja stanica. On je i opisao tijek informacije od fotoreceptora kroz horizontalne, bipolarne i amakrine stanice sve do ganglijskih stanica mrežnice, koje svojim aksonima čine optički živac (Cajal, 1892). Proučavanje vida ubrzo je doseglo i subkortikalnu (npr. Brouwer & Zeeman, 1926), a potom i kortikalnu razinu (npr. Munk, 1881), uglavnom temeljem istraživanja na životinjama, ali i na ljudima žrtvama ratnih stradanja i ozljeda.

## 1.2. MIŠ KAO PREDMET ISTRAŽIVANJA NEUROZNANOSTI VIDNOG SUSTAVA

Nakon iscrpnog istraživanja vidnog sustava mačke, naglo je poraslo zanimanje za vidni sustav miša. Ispitivanje vidnog sustava kod, kako je tradicionalno smatrano, nevizualne nokturnalne životinje, čini se krajnje neintuitivnim. Međutim, treba spomenuti kako se miševi ponašaju kao isključivo nokturnalne životinje u uvjetima neograničene (*ad libitum*) dostupnosti hrane, uvjetima kakvi vladaju u laboratoriju. Miševi se mogu ponašati diuralno uslijed nedostatka hrane ili zbog opasnosti od predatora (Hut et al., 2011), a slično ponašanje je zabilježeno i kod drugih primarno noćnih glodavaca (Gattermann et al., 2008; Levy et al., 2007). Prilikom navigacije u prostoru, miševi se primarno oslanjaju na vizualne tragove u okolišu, prema tome ne mogu se jednostavno odbaciti kao nevizualne životinje (G. Chen et al., 2013). Oko miša karakterizira velika rožnica i leća koje mogu zauzeti i do 60 % oka (Remtulla, 1985) što je karakteristika noćnih životinja. Međutim, mišje oko je atapetalno, tj. nedostaje mu reflektivni sloj *tapetum lucidum* koji je uobičajen za noćne životinje (Kispert & Gossler, 2004).

Kod istraživanja vidnog sustava na bilo kojem subjektu, oštrina vida koju posjeduje istraživani model je jedno od svojstava koje nužno mora biti poznato. Oštrina vida je sposobnost razlučivanja dvaju pojedinosti, nazivamo ju još i oštrinom razlučivanja. Oštrinu razlučivanja izražavamo kao broj naizmjeničnih crnih i bijelih paralelnih crta jednake širine u jednom kutnom stupnju koje ispitanik doživljava kao zasebne crte (broj ponavljanja po kutnom stupnju – engl. *cycle per degree*, CPD). Oštrina vida kod miša određena je teoretski (kombinacijom optičkih svojstava oka i gustoće ganglijskih stanica) gdje je gornja vrijednost postavljena na 1.3 CPD (Remtulla, 1985), a potom procijenjena iz optokinetičkog refleksa (~0.4 - 0.52 CPD) (Prusky et al., 2004; Abdeljalil et al., 2005) ili korištenjem bihevioralnog zadatka koji je ispitivao vidnu diskriminaciju (Gianfranceschi et al., 1999; Prusky et al., 2000a) s gornjom granicom od ~0.4 - 0.5 CPD. Neka istraživanja



predlažu da je oštrina vida kod miševa plastično svojstvo koje se može poboljšati upražnjavanjem tzv. obogaćivanjem okoliša u ranoj dobi miša (Prusky et al., 2000b). Provedene su i brojne detaljne studije drugih vidnih sposobnosti miša kao što su npr. prepoznavanje obrazaca (Hyde & Denenberg, 1999), diskriminacija svjetline (Balkema et al., 1983) kao i općenita ispitivanja oštrine vida (Brown & Wong, 2007).

#### 1.2.1. Prednosti korištenja miša kao modela u istraživanjima vidnog sustava

Lakoća i raznolikost dostupnih genetskih manipulacija dale su mišu ogromnu prednost u neuroznanosti vidnog sustava. Miš kao model istraživanja omogućava manipulaciju samo određenih pod-populacija živčanih stanica tako da je omogućeno mijenjanje njihove aktivnosti ili ih je moguće lako prikazati (vizualizirati) drugim metodama. Dva glavna pristupa u ostvarenju ovih ciljeva su:

- (1) genetska manipulacija somatskih stanica koja koristi *in-utero* elektroporaciju ili viralne konstrukte kako bi dostavila željene gene u određeni tip stanica. Ovakav pristup je moguć i kod ostalih animalnih modela, primjerice štakora. Najučestalija primjena, kod miševa, leži u vizualizaciji staničnih linija i njihove morfologije korištenjem histokemijskih obilježivača kao što su primjerice alkalna fosfataza (AP) (Badea & Nathans, 2004) i zeleni fluorescentni protein GFP (Moriyoshi et al., 1996), te vizualizacija njihove aktivnost primjenom fluorescentnih indikatora iona kalcija kao što je GCaMP (T.W. Chen et al., 2013). Novije razvijeni neuronski obilježivači su neurotropni virusi koji se kreću trans-neuronalno poput herpes virusa (Ekstrand et al., 2008) ili virusa bjesnoće (Kelly & Strick, 2000; Marshel et al., 2010).
- (2) genetske manipulacije zametnih stanica koje se usredotočuju na dostavljanje transgenih DNA konstrukta ili bakterijskih umjetnih kromosoma (BAC) (Heintz, 2001) koji su osmišljeni tako da se reporterski gen dostavlja pod promotorom koji je specifičan samo za određeni tip stanice. Reporterski gen omogućava da se transgene linije jednostavno detektiraju a najučestaliji, među ostalima, su  $\beta$ -galaktozidaza i zeleni fluorescentni protein. Takvi transgeni produkti se injektiraju u oplođenu jajnu stanicu, a uspješnost zahvata je lako prepoznati koristeći standardne metode molekularne biologije poput lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction - PCR).

Druga skupina genetskih manipulacija zametnih stanica uključuje genetsku rekombinaciju DNA konstrukta s ciljanim slijedom DNA putem homologne

rekombinacije embrionskih matičnih stanica. Takva rekombinacija može uključivati promjenu domaćinskih stanica ubacivanjem reporterskih gena (*knock-in*) ili brisanjem ciljanih gena (*knock-out*), čak i kombinaciju navedenoga. Razvijanjem Cre/loxP rekombinacijskog sustava ovaj pristup je dospio korak dalje: umetanjem loxP slijeda oko ciljanog DNA slijeda moguće je izvesti Cre-posredovano izrezivanje, integraciju, translokaciju i inverziju dva DNA slijeda, a navedeni procesi mogu se kontrolirati u vremenu i u prostoru (Kuhn & Torres, 2002). Među ostalim, u određenu populaciju živčanih stanica mogu se dostaviti i kanalni-rodopsini osjetljivi na svjetlost (Arenkiel et al., 2007). Ove mogućnosti demonstriraju raznolikost dostupnih i lako izvedenih transgenih linija kao i raznolikost genetskih metoda koje mogu biti prilagođene individualnim interesima istraživača, a koje su, barem za sada, u najvećoj mjeri dostupne samo kod miša kao modela istraživanja.

## 1.2.2. Osnovni anatomske pregled retinotalamokortikalnog puta kod miša

### 1.2.2.1. Obrađivanje informacija u perifernom vidnom sustavu

Nakon prolaska kroz optičke dijelove oka, fotoni se sudaraju s fotoreceptorima mrežnice, strukturama koje više nisu optičko nego živčano tkivo. Vidna informacija biva prenesena tako da susjedne točke u vidnom polju odgovaraju susjednim točkama na mrežnici. Takva organizacija se naziva retinotopija i jedno je od glavnih svojstava vidnog sustava kako čovjeka tako i miša. Za pregled vidi Hübener, 2003.

Mrežnica se sastoji iz tri sloja. Najdublje je smješten sloj mrežnice u kojem se nalaze fotoreceptori, drugi je sloj bipolarnih stanica, a treći ganglijskih stanica. U prvom sloju razlikujemo dva tipa fotoreceptora: štapiće i čunjiće. Čunjići mogu biti aktivirani svjetlosti različitih valnih duljina. Kod čovjeka, čunjići su najosjetljiviji na valne duljine dugog (565 nm), srednjeg (530 nm) ili kratkog (420 nm) dijela spektra dok se štapići mogu aktivirati širokim rasponom valnih duljina što im onemogućava raspoznavanje boja (Dacey, 2000). Kod miša, štapići su najosjetljiviji u rasponu 497-500 nm (Soucy et al., 1998), a prisutno je dva tipa čunjića koji su maksimalno osjetljiviji na 360 nm (UV-tip) i 508 nm (Nikonov et al., 2006). U mrežnici miša štapići su zastupljeniji od čunjića u omjeru 20:1 (Dräger & Olsen, 1980), a prosječna gustoća čunjića ista je kao i kod majmuna makakija (Jeon et al., 1998). Mrežnica miša ne posjeduje središnju jamicu - *fovea centralis* (područje koje je najbogatije fotoreceptorima u središtu žute pjege - *macula lutea*) ali, poput drugih ne-fovealnih

životinja, vrhunac u brojnosti ganglijskih stanica mrežnice nalazi se u središnjem dijelu mrežnice - *area centralis* (Dräger & Olsen, 1980).

Nakon aktivacije fotoreceptora, dolazi do procesa transdukcije (Stryer, 1986). Transdukcija uzrokuje depolarizaciju fotoreceptora (-40 mV) koji postaje hiperpolariziran (-65 mV) i koji uslijed te promjene smanjuje otpuštanje glutamata. To izravno utječe na idući tip stanica u mrežnici, na bipolarne stanice smještene u drugom sloju. Učinak glutamata na bipolarne stanice je dvojak, a određen je tipom receptora koji se nalazi na bipolarnim stanicama. U skladu sa svojstvom retinotopije, svaka bipolarna stanica prima podražaje od fotoreceptora smještenih u točno određenom dijelu mrežnice. Tako dio vidnog polja koji baca svjetlo na određeni dio fotoreceptora na mrežnici, predstavlja receptivno polje tog fotoreceptora. Fotoreceptori koji čine sinapse s bipolarnom stanicom čine receptivno polje te bipolarne stanice. Isti princip vrijedi u bilo kojem dijelu vidnog puta, a jedno od svojstava receptivnog polja je da ono posjeduje središte i antagonističku okolinu. Tako bipolarne stanice mogu biti stanice s "on"- ili "off"-središtem. Smanjeno otpuštanje glutamata od strane fotoreceptora kod dva tipa bipolarnih stanica uzrokuje dva oprečna događaja gdje "on"-stanice postaju depolarizirane dok "off"-stanice postaju hiperpolarizirane (Purves, 2004).

Bipolarne stanice čine sinapse s ganglijskim stanicama mrežnice (retinalne ganglijske stanice - RGS), jedinim tipom stanica u mrežnici koje mogu dati akcijske potencijale, sve promjene membranskog potencijala do ganglijskih stanica bile su stupnjevite što odgovara receptorskim potencijalima. Prva istraživanja u ganglijskim stanicama mrežnice kod sisavaca proveo je Stephen Kuffler (1953). Ovisno o bipolarnim stanicama koje im prethode, ganglijske stanice također mogu imati "on"- ili "off"-središte. Ova dva tipa ganglijskih stanica prisutna su u istom omjeru, ali se njihova receptivna polja preklapaju tako da je ista točka u vidnom polju detektirana putem nekoliko ganglijskih stanica svakog tipa. Utišavanje stanica s "on"-središtem onemogućava sposobnost percepcije podražaja svjetlijih od pozadine na kojoj se nalaze. To je zato što „on“ stanice reagiraju na porast a „off“ stanice na smanjenje intenziteta svjetlosti (Schiller et al., 1986).

Obrada informacija u mrežnici nije isključivo pravocrtna, postoje lateralne veze putem vodoravnih i amakrinih stanica. Oba tipa otpuštaju inhibitorne neurotransmitere na stupnjeviti način (Leicester & Stone, 1967; Gallego 1971; Wässle, 2004).

Svaki tip stanica mrežnice također ima i brojne podtipove stanica. Kod primata ukupni broj različitih stanica u mrežnici se kreće oko 80 (Dacey, 2000).

Ganglijske stanice mrežnice svojim aksonima čine optički živac koji vodi do različitih jezgara i centara u mozgu. Najmanje 70% ganglijskih stanica mrežnice miša projicira u jezgru smještenu u srednjem mozgu, gornje kulikule ili *colliculi superiores* (CS) (Hofbauer & Drager, 1985), gdje kontroliraju refleksne pokrete očiju, glave i vrata. Drugi dio ganglijskih stanica mrežnice projicira u suprahijazmatsku jezgru - *nucleus suprachiasmaticus* (NSC) hipotalamusa gdje utječu na cirkadijalni ritam (Provencio et al. 1998; Hofbauer & Drager 1985) dok samo mali dio njih projicira u *nucleus geniculatus lateralis dorsalis* – dorzalni lateralni genikulatni nukleus (jezgru) (dLGN). To je jedna od razlika, uspoređujući s vidnim sustavom čovjeka i drugih viših vizualnih životinje, gdje većina ganglijskih stanica mrežnice projiciraju genikulatno. S obzirom na istraživanja provedena kod štakora, pretpostavlja se kako se i kod miša udio ganglijskih stanica koje projiciraju genikulatno kreće oko 30% (Dreher et al., 1985). Iako te stanice čine manjinu, u opisu retinokortikalnog puta koji vodi preko genikulatnog nukleusa, u idućem odlomku će biti detaljnije opisan upravo dLGN.

#### 1.2.2.2. Genikulokortikalni put vidnog sustava

Kod karnivora i primata dLGN je slojevita struktura u talamusu koja se sastoji iz magnocelularnih slojeva (dva ventralna sloja), parvocelularnih slojeva (četiri dorzalna sloja) i koniocelularnih slojeva (smještenih između prethodno navedenih slojeva). Svojstva dLGN neurona su desetljećima detaljno proučavana (Hubel & Wiesel, 1961; Wiesel & Hubel, 1966; Merigan & Manusell, 1993). Međutim, dLGN miša nije laminarno organiziran (Paxinos & Franklin, 2004) i stanice mišjeg dLGN pokazuju veliku funkcionalnu homogenost (Grubb & Thompson, 2003) što nije slučaj kod gLGN-a viših vizualnih životinja. Iako većina literaturnih navoda kaže kako su u dLGN receptivna polja tipična, poput onih u ganglijskih stanica mrežnice ("on/off"-središte), skoriji radovi upućuju na prisutnost kompleksnih svojstava kao što su orijentacija i selektivnost smjera podražaja, a koja su obično zastupljena u korteksu (Piscopo et al. 2013). Različiti slojevi dLGN-a projiciraju u različite populacije kortikalnih neurona primarnog vidnog korteksa. Međutim, LGN nije samo puko mjesto prespajanja putova koji vode od mrežnice do primarnog vidnog korteksa, LGN također prima i povratne informacije od korteksa (Cudeiro & Sillito, 2006). Genikulokortikalna vlakna mahom završavaju u sloju IV primarnog vidnog korteksa i do neke mjere u III, V i VI (Caviness, 1980; Constantinople & Bruno, 2013).

### 1.2.2.3. Kortikalno procesiranje informacija - primarni vidni korteks

Primarni vidni korteks miša (V1) je struktura načinjena od šest slojeva (Caviness, 1975; Wang & Burkhalter, 2007) poput korteksa svih sisavaca koji su do sada proučavani. Lokalna neuronska mreža i organizacija vidnog korteksa iscrpno je istraživana u elektrofiziološkim studijama koje su omogućile ispitivanje neuronskih odgovora na prezentirane vidne podražaje kod budnih životinja. Receptivna polja neurona u primarnom vidnom korteksu su drugačija od onih koje je Kuffler opisao u dLGN i ganglijskim stanicama mrežnice: obična točka svjetla ne može izazvati odgovor kod neurona vidnog korteksa. Hubel i Wiesel (1978) su doveli do otkrića neurona osjetljivih na orijentaciju podražaja. Mišji vidni korteks razlikuje se od onog kod primata u tome što većina neurona mišjeg V1 nije osjetljiva na orijentaciju podražaja i takvi „neosjetljivi“ neuroni su uglavnom smješteni u IV sloju (Wagor et al., 1980; Mangini & Pearlman, 1980). Broj neurona koji jesu osjetljivi na orijentaciju podražaja kreće se od 34%-43% gdje 50% tih neurona ima jednostavna ili kompleksna receptivna polja (Drager, 1975). Mišji V1 također se razlikuje od vidnog korteksa primata u tome što ne posjeduje kolumnarnu organizaciju. Uz sve te razlike, brojne studije su pokazale kako neuroni mišjeg V1 posjeduju ista svojstva kao ona kod viših vizualnih životinja (Dräger, 1975; Wagor et al., 1980; Niell & Stryker, 2008; Gao et al., 2010; Huberman & Niell, 2011), što je činjenica koja je dodatno učvrstila ulogu miša u neuroznanosti vidnog sustava.

### 1.3. PREGLED PROUČAVANJA PONAŠANJA U NEUROZNANOSTI VIDNOG SUSTAVA MIŠA

Kako je etologija postajala sve interdisciplinarnija i zastupljenija u raznim znanstvenim disciplinama (Marler, 2005), proučavanje ponašanja je bivalo sve više i više zastupljeno i u istraživanju mozga. Kombinacijom psihofizike s drugim metodama, posebice s *teorijom detekcije signala* (Green & Swets, 1966), praćenje ponašanja postalo je način mjerenja osjetne percepcije i svojstava osjetnog sustava. Ubrzo su osmišljeni brojni bihevioralni zadaci u svrhu ispitivanja vizualnih svojstava životinjskih modela u vizualnoj neuroznanosti. Neki od osmišljenih zadataka su zahtijevali aktivnu uključenost životinje, ili u slučaju ranih elektrofizioloških eksperimenata, uspavane ili budne životinje su pasivno promatrale predstavljene podražaje. Kod onih zadataka koji su iziskivali aktivno ponašanje, s obzirom na broj podražaja i broj mogućih odgovora na podražaj razlikujemo

tri osnovne kategorije bihevioralnih zadataka.

(1) “kreni-stani” (eng. *go-nogo*) dizajn gdje je životinji predstavljen jedan podražaj i od životinje se očekuje jedan odgovor;

(2) “da-ne” metoda gdje na jedan prezentirani podražaj životinja može dati dva različita odgovora;

(3) “metoda prisiljenog izbora” gdje na dva predstavljena podražaja životinja može dati dva odgovora, detaljniji pregled prema Carandini & Churchland, 2013.

Prva aparatura namijenjena ispitivanju vidnog sustava kod miševa datira iz 1907. god. (Yerkes) i osmišljena je kako bi ispitala diskriminaciju između crnih i bijelih podražaja kod miševa. Miševi su mogli birati hoće li ući u kutiju obojenu bijelom ili crnom bojom. Jedna boja je bila nagrađivana, a druga kažnjavana blagim električnim šokom. Ista diskriminacija crnih i bijelih podražaja testirana je u T-labirintu s kracima labirinta obojenim crnom ili bijelom bojom (Wimer & Weller, 1965). Slično tome, labirint s šest krakova je upotrijebljen kako bi se procijenila diskriminacija kontrasta jarkosti kod miševa (Balkema, 1983) dok je vidna oštrina bila mjerena raznim studijama (Prusky et al., 2000a; Prusky et al., 2004; Gianfranceschi et al., 1999; Abdeljalil et al., 2005).

### 1.3.1. Virtualna stvarnost kao platforma za ispitivanje ponašanja vođenog osjetom vida

Životinje koje se aktivno kreću u okolišu doživljavaju prirodnu interakciju s njihovim okruženjem, međutim, u uvjetima slobodnog kretanja je teško izvesti osjetljiva mjerenja. Slobodno kretanje životinje također umanjuje i kontrolu podražaja koji se prezentira životinji. Neke studije su prevladale taj problem ugrađivanjem aparature u određenu regiju mozga životinje, primjerice elektroda (Zornetzer 1970; Lin et al. 2006), optičkih vlakana (Ung & Arenkiel 2012) ili kombinaciju navedenoga (Siegle et al. 2011; Anikeeva et al. 2011). I uz ove iznimno složene procedure, problem nedovoljne kontrole prezentiranog podražaja i dalje preostaje. Drugo moguće rješenje je onemogućavanje kretanja životinje što se najuspješnije postiže imobilizacijom i fiksacijom životinje za aparaturu putem metalne pločice na glavi. Takav postupak imobilizacije narušava slobodnu interakciju životinje s okolišem što je važna komponenta kod studija osjetnog sustava. Kompromis između fiksiranja životinje u svrhu snimanja te omogućavanja životinji interakciju s okolišem, postiže se korištenjem okruženja virtualne stvarnosti (OVS), pregled dostupan prema Carandini & Churchland 2013. Dokaz da miševi percipiraju OVS kao njihovo

okruženje a ne samo kao složeni vidni podražaj dolaze iz studija hipokampusa gdje je zabilježeno kako je vidna informacija sama dostatna za pobuđivanje stanica koje odgovaraju na određeno mjesto u okolišu – tzv. stanice mjesta (engl. *place cells*) hipokampusa (G. Chen et al. 2013; Harvey et al. 2009), ali kako jedna studija pokazuje (Ravassard et al. 2013) u manjoj mjeri nego što se to događaju stvarnom okruženju.

U okruženju virtualne stvarnosti životinja može izvesti brojna ponavljanja bihevioralnog zadatka tokom samo jedne seanse uvježbavanja. Mnogostruka ponavljanja zadatka stabiliziraju ponašanje što je nužno u ispravnom tumačenju osjetnih mogućnosti i procesa donošenja odluka, kao i za otkrivanje suptilnijih razlika u ponašanju. Isprva se mislilo kako su samo primati sposobni percipirati 2-D projekcije na monitoru kao 3-D prostor koji sadrži vizualne vodilje za navigaciju (za pregled i daljnju literaturu: Holscher 2003). Kako se ispostavilo, aparatura tih ranih pokušaja nije bila prilagođena onome što je poznato o oku i vidu glodavaca, a to su slaba oštrina vida, niska razlučivost, te veliko vidno polje. Nakon prilagodbe tim saznanjima, pristigli su dokazi kako su štakori sposobni koristiti okruženje virtualne stvarnosti za navigaciju (Hölscher et al. 2005). Prva istraživanja budnih životinja koje su bile fiksirane za aparaturu uključivala su jednostavne bihevioralne zadatke ili pasivno promatranje podražaja (Andermann et al. 2010; Dombeck et al. 2007). Nasuprot ranim istraživanjima na uspavanim životinjama, ispitivanje budnih životinja koje aktivno sudjeluju u zadatku za vrijeme korištenja metoda visoke prostorne i vremenske razlučivosti postaje zaštitni znak moderne neuroznanosti vidnog sustava. Jedan od tih pristupa uključuje kombinaciju ponašanja vođenog osjetom vida s ultraosjetljivim senzorima kalcija koji mogu otkriti pojedinačne akcijske potencijale u neuronu (T.-W. Chen et al. 2013).

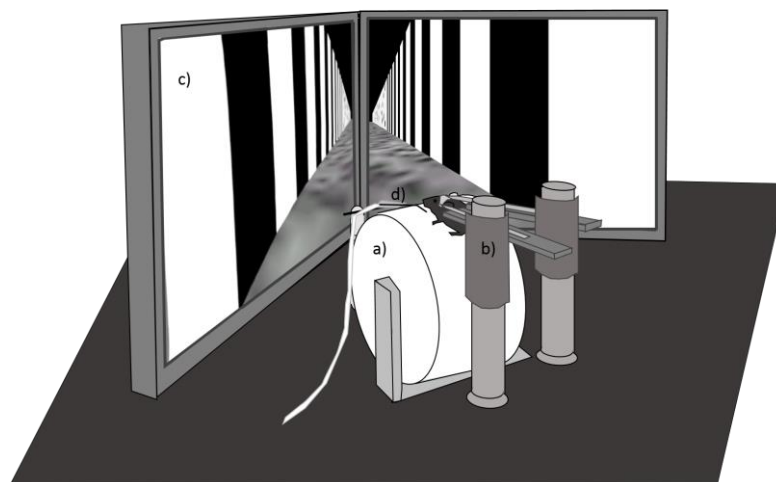
#### 1.4. CILJ RADA

Cilj ovog rada je osmisliti bihevioralni zadatak koji bi omogućio uspostavljanje novog i dugoročno stabilnog obrasca ponašanja vizualne diskriminacije miševa, u relativno kratkom vremenskom periodu. Ovako dizajniran bihevioralni zadatak bi se mogao koristiti u kombinaciji s kroničnim snimanjima razine kalcija, optogenetikom ili elektrofiziološkim eksperimentima, što bi na staničnoj razini i na razini ponašanja omogućilo procjenu vizualnih sposobnosti, ispitivanje vizualne pozornosti te učenja u primarnom vidnom korteksu miša ili drugim kortikalnim područjima.

## 2. MATERIJALI I METODE

Svi zahvati na životinjama izvedeni su u skladu s etičkim smjernicama i protokolima prema UK Home Office i Animal (Scientific Procedures) aktom (1986) na Odjelu neuroznanosti, fiziologije i farmakologije University College London, London, Ujedinjeno Kraljevstvo. U eksperimentu je korišteno pet mužjaka C56BL/6 laboratorijskog miša koji su eksprimirali osjetljivi kalcijски senzor - GCaMP6 (Chen et al., 2013) i kojima su kirurški implantirani kranijalni prozori te metalne pločice (Holtmaat et al., 2009). Budući da je tema ovog diplomskog rada uspostavljanje novog stabilnog obrasca ponašanja, same kirurške procedure koje su prethodile bihevioralnom treningu neće biti detaljnije opisane.

Za vrijeme cijelog bihevioralnog treninga primarni vidni korteks miša (V1) bio je promatran korištenjem dvo-fotonskog mikroskopa. Slobodno kretanje životinje u aparaturi bilo je ograničeno na način da su životinje bile fiksirane za metalne šipke putem ugrađenih metalnih pločica na glavi životinje. Kako bi se životinjama omogućilo kretanje, ispod životinje smješten je cilindar za trčanje (Slika 1). Ispred životinje su bila smještena dva monitora koja su dostavljala vidne podražaje koje je životinja trebala razlikovati. Zadatak životinja bio je da prijave prisutnost podražaja A - uspravne rešetke koja je povezana s nagradom, a da podražaj B - nakošene rešetke ignoriraju. Potvrdu o prisutnosti uspravnih rešetki životinja je davala tako da je jezikom dodirivala cijev koja donosi nagradu, a koja je na svojoj drugoj strani bila povezana s osjetljivim piezoelektričnim senzorom. Piezoelektrični senzor je pod mehaničkim pritiskom pomicanja cijevi proizvodio naponske pulseve – *piezo* signale koji su bili neprekidno očitavani, njihova prisutnost smatrana je prijavom prisutnosti uspravne rešetke od strane životinje.



Slika 1. Shematski prikaz eksperimentalne aparature. Životinji je bilo omogućeno kretanje

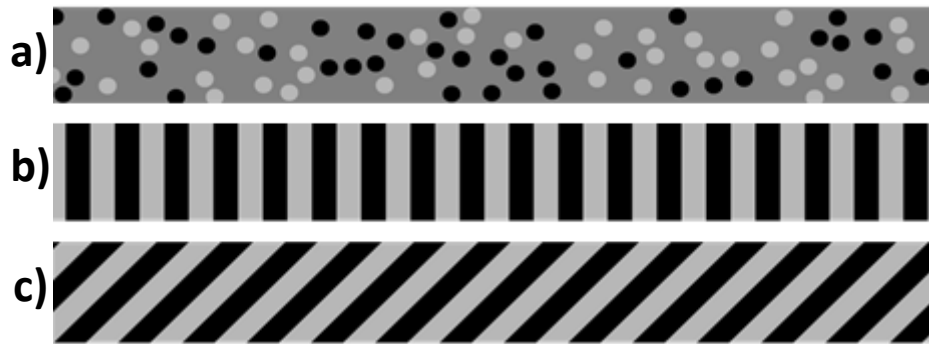


po cilindru za trčanje - a, čija se rotacija očitavala optičkim mišem i prenosila na kretanje virtualne scene. Životinja je bila fiksirana za dvije cijevi putem metalne pločice koja je implantirana na glavi i koja je pričvršćena na čelične šipke -b. Ispred životinje smještena su dva monitora -c, tako da pokrivaju veliki dio vidnog polja životinje. Monitori su korišteni za prezentaciju vidnih podražaja koje je životinja trebala razlikovati. Ispred životinje je smještena cijev -d koja je dostavljala nagradu u slučaju točnog prepoznavanja od strane životinje. Ista cijev korištena je i za detekciju odgovora životinje tako da je bila povezana s piezoelektričnim senzorom koji je uslijed dodirivanja cijevi jezikom odavao naponske pulseve.

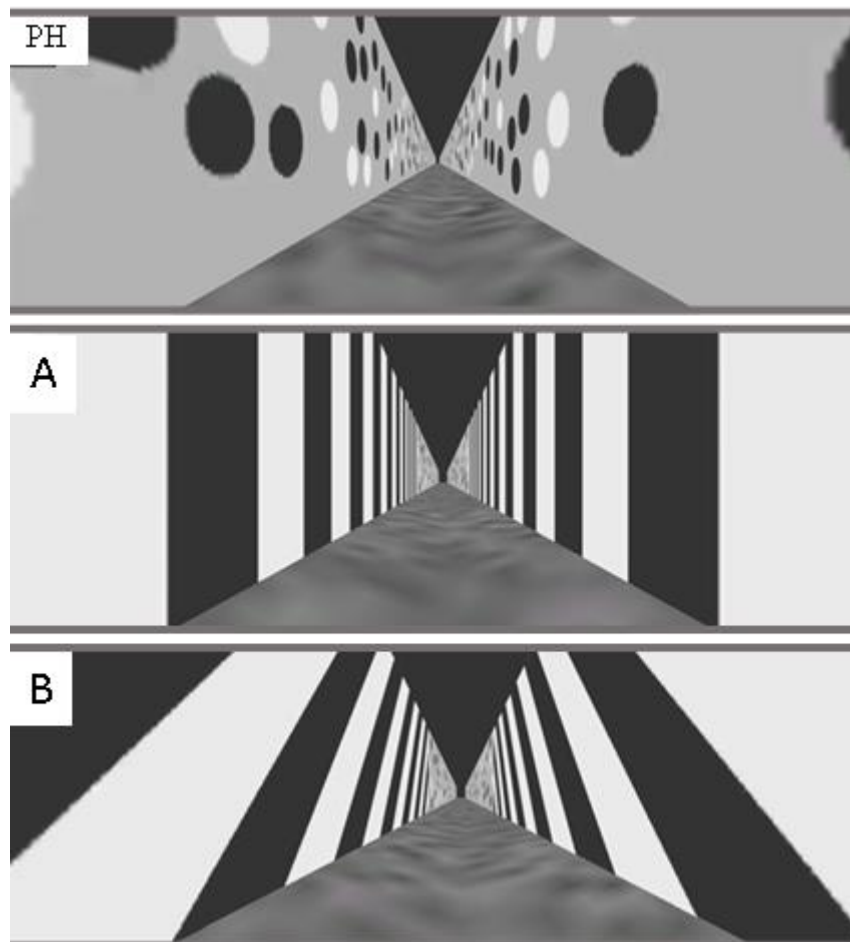
## 2.1. OSMIŠLJAVANJE I PODEŠAVANJE PARAMETARA BIHEVIORALNOG ZADATKA

Bihevioralni zadatak koga su životinje trebale savladati bio je dizajniran koristeći okruženje virtualne stvarnosti za čiji je razvoj korišten Unity3D program (Unity Technologies, San Francisco, SAD). Virtualna stvarnost bila je predstavljena životinji putem dva Dell 22" monitora (P2210, Round Rock, Texas, SAD). Monitori su bili orijentirani tako da su pokrivali veliki dio vidnog polja miša (~ 90 stupnjeva). Zadatak je osmišljen tako da se životinja prividno kreće kroz beskonačno dug virtualni hodnik na čijim zidovima su bili predstavljeni podražaji na koje je životinja trebala reagirati (Slika 2). Kretanje životinje u stvarnosti odgovaralo je kretanju životinje u virtualnoj stvarnosti: trčanje po površini cilindra preneseno je u kretanje životinje kroz virtualni hodnik. Pod i strop virtualnog hodnika su bili nepromjenjivi tijekom prolaska životinje kroz virtualni hodnik, a promjena vizualne scene ovisila je o podražaju koji je bio prikazan na zidu tog hodnika (Slika 3). Podražaji korišteni na zidu virtualnog hodnika bili su:

- (1) Tekstura pristupnog hodnika: tekstura načinjena od nasumično raspoređenih crnih i bijelih krugova nasuprot sive pozadine. Ova tekstura je korištena kao pristupni hodnik koji je vodio do jednog od dva podražaja koje je životinja trebala diskriminirati.
- (2) Podražaj A: uspravna rešetka načinjena iz naizmjeničnih crnih i bijelih prečki.
- (3) Podražaj B: nakošena rešetka načinjena iz naizmjeničnih bijelih i crnih prečki pod kutom od 40 stupnjeva.



Slika 2. Vidni podražaji koji su bili predstavljeni životinji na zidu virtualnog hodnika: 1) tekstura pristupnog hodnika; 2) vertikalna rešetka koja čini podražaj A; 3) nakošena rešetka koja čini podražaj B.



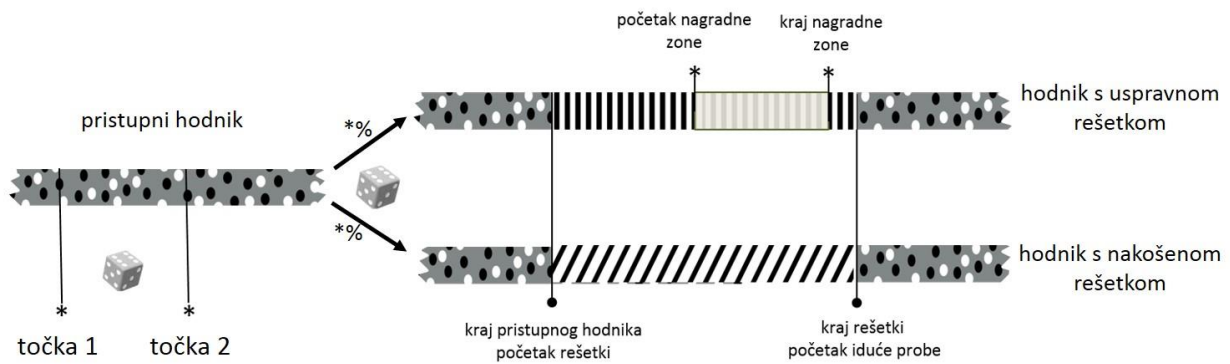
Slika 3. Virtualna scena predočena životinji za vrijeme kada se životinja nalazila u: pristupnom hodniku (PH), uspravnim (A) ili nakošenim (B) rešetkama.

Tri navedene teksture bile su kombinirane na dva moguća načina, čineći tako dvije različite probe samog bihevioralnog zadatka:

1) nagrađivana proba koja se sastojala od teksture pristupnog hodnika i uspravne rešetke (podražaj A)

(2) nenagrađivana proba koja se sastojala od pristupnog hodnika i nakošene rešetke (podražaj B).

Životinja je trebala reagirati na prisutnost vertikalne rešetke koja je bila povezana s nagradom, dok je trebala ignorirati prisutnost nakošene rešetke. Na početku svake probe, životinja je zadatak započinjala s nasumično određene točke između dvije fiksne podesive točke u pristupnom hodniku (Slika 4). Kada je životinja dosegla kraj tog hodnika, virtualna scena predstavljena životinji se promijenila i životinji je bila predočena rešetka s vertikalnim (podražaj A) ili nakošenim prečkama (podražaj B). Vjerojatnost nastupanja svakog tipa probe poslije pristupnog hodnika je bila podesiva, dok je sam slijed probi bio nasumičan. Kada je životinja zašla u dio virtualnog hodnika s područjem uspravne rešetke, na kraju nagradne zone je zaprimila nagradu u obliku kapi 10% vodene otopine sojinog mlijeka (SMA Wysoy, SMA Nutrition, Berks, UK). Početak i kraj zone unutar uspravne rešetke u kojoj je nagrada bila dostupna je bio podesiv, a sama zona se nije vidno razlikovala od ostatka vertikalne rešetke. Međutim, ako je životinja ranije prepoznala prečke rešetke kao uspravne, nagrada je uslijedila ranije od točke automatske dodijele nagrade, a najranije na početku nagradne zone. Prepoznavanje od strane životinje značilo je očitu demonstraciju iščekivanja nagrade koje se očitalo u dodirivanju cijevi koja donosi nagradu jezikom što je bilo zabilježeno putem osjetljivog *piezo* senzora koji se nalazio na drugoj strani cijevi. Ako se životinja nalazila u hodniku s rešetkom s nakošenim prečkama (podražaj B) nije dobila nagradu ni u kojem slučaju. Nakon izlaska iz područja predstavljanja bilo koje vidne rešetke, životinja je vraćena na početak pristupnog hodnika na ponovno nasumično odabranu startnu točku.



(\*) – parametri zadatka koji su podesivi  
 - nasumičan izbor između dvije vrijednosti označene s (\*)

Slika 4. Shematski prikaz osmišljenog zadatka. Nakon pristupnog hodnika životinja je ušla u hodnik koji je mogao sadržavati uspravnu ili nakošenu rešetku. Ako je životinji bila predstavljena vertikalna rešetka, životinja je mogla dobiti nagradu ili na početku nagradne zone, ako je uslijedilo prepoznavanje, ili na kraju nagradne zone automatskim putem. Omjer između probi s uspravnim i nakošenim rešetkama bio je ručno podesiv, ali redoslijed proba je bio nasumičan. Nakon izlaska iz područja rešetki, životinja je vraćena na nasumično odabranu startnu točku s koje je započinjala nova proba.

## 2.2. ODREĐIVANJE BIHEVIORALNIH PARAMETARA MJERENIH TIJEKOM ZADATKA

U svrhu procijene izvedbe životinje, dva glavna bihevioralna parametra (brzina životinje i zaprimljeni *piezo* signal) mjereni su tijekom cijelog uvježbavanja životinja. Kako bi se omogućila kontrola nad svim parametrima zadatka, kao mogućnost i očitavanje bihevioralnih parametara u realnom vremenu, razvijeno je posebno korisničko sučelje u LabView programu (National Instruments, Austin, Texas, SAD).

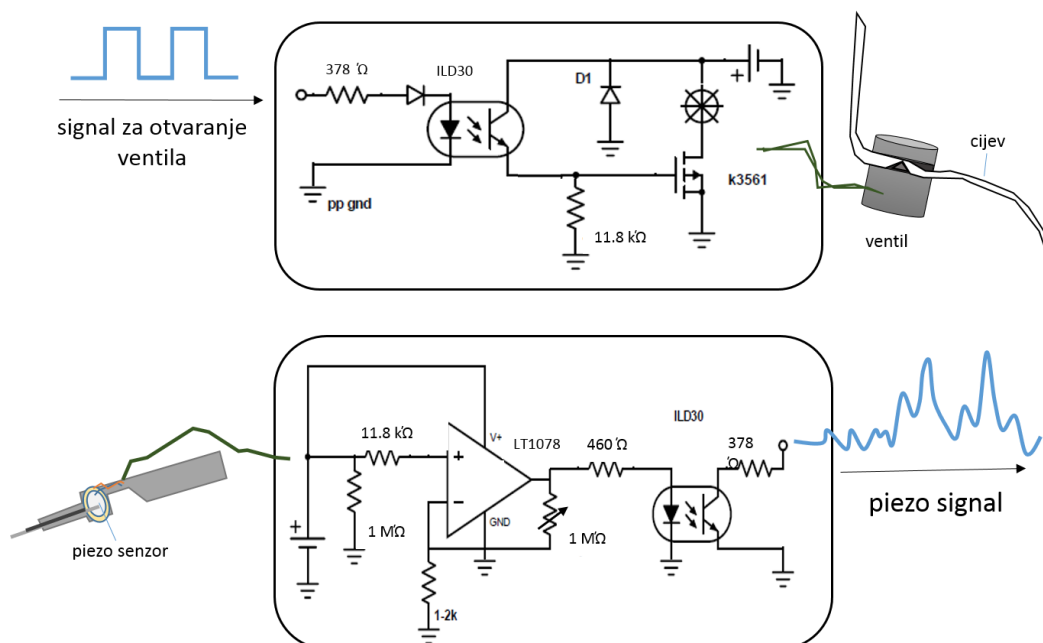
Kako su mjerena dva glavna bihevioralna parametra, dvije glavne grane kontrole i detekcije činile su korisničko sučelje:

- 1) Očitavanje brzine životinje koje je za krajnji cilj imalo sparivanje kretanja životinje s kretanjem u virtualnoj stvarnosti. Trčanje životinje je očitavano putem optičkog računalnog miša (Logitech G700, Morges, Švicarska) i zabilježeno putem korisničkog sučelja. Okretanje cilindra uslijed kretanja životinje spareno je s kretanjem u virtualnoj stvarnosti tako da je vrijednost jedne rotacije u stvarnosti koja iznosi 60 cm jednaka kretanju 40 cm u virtualnoj stvarnosti. Koordinate u prostoru virtualne stvarnosti su zabilježene putem korisničkog sučelja kako bi se iduća proba mogla pripremiti i predstaviti životinji čineći tako uvjete zatvorene petlje između

proba. Točne koordinate životinje u virtualnoj stvarnosti korištene su i kako bi se kontroliralo otvaranje ventila koji je propuštao nagradu, što će biti opisano u idućem odjeljku.

## 2) Kontrola sustava za nagrađivanje i očitavanje *piezo* signala.

Sustav za nagrađivanje sastojao se iz spremnika za mlijeko s izlazom za silikonsku odvodnu cijev, solenoidnog ventila smještenog na odvodnoj cijevi koji je vodio iz spremnika, te metalne cijevi na kraju odvodne cijevi. Ventil je otvaran putem malog naponskog pulsa poslanog od strane korisničkog sučelja. Otvaranje ventila moglo je nastupiti u dva slučaja: (1) kad je životinja dosegla kraj nagradne zone - automatskim putem ili (2) ako je životinja demonstrirala prepoznavanje podražaja za vrijeme nagradne zone. Kako bi se spriječilo naponsko preopterećenje sustava, između naponskog signala i solenoidnog ventila smješten je opto-izolator (Vishay ild30, Malvern, PA, SAD), a da bi se snimili signali kada životinja iščekuje nagradu na metalnu cijev je smješten piezoelektrični senzor (MULTICOMP, Leeds, Engleska). Dodirivanjem metalne cijevi jezikom životinja stvara pritisak na piezoelektrični senzor koji proizvodi napon koji je dalje amplificiran putem izmjenjivog pojačavača (Linear Technology LT1078, Milpitas, CA, SAD) i zabilježen od strane korisničkog sučelja.



Slika 5. Shematski prikaz korištenih elektroničkih krugova:

a) Otvaranje ventila i dostavljanje nagrade. Korisničko sučelje odašilje signal za

otvaranje ventila putem naponskog pulsa koji prolazi kroz opto-izolator koji štiti sustav od prekomjernog napona i koji je onda dostavljen do ventila. Otvaranje ventila događa se samo u slučaju proba s uspravnim rešetkama.

- b) Zaprimanje signala prepoznavanja od strane životinje i dostavljanje nagrade životinji. Životinja može prijaviti prisutnost vertikalne rešetke bilo gdje u virtualnom hodniku ali ako to učini tijekom nagradne zone dolazi do otvaranja ventila koji propušta nagradu na način opisan pod a). Svi signali prepoznavanja od strane životinje su zabilježeni putem piezoelektrčnog senzora smještenog ispod metalne cijevi putem koje životinje dobiva nagradu. *Piezo* signal se potom usmjerava na pojačivač signala i potom se bilježi putem korisničkog sučelja.

### 2.3. BIHEVIORALNI TRENING

Uvježbavanje životinja bilo je podijeljeno u nekoliko uzastopnih faza koje je životinja morala savladati:

#### 1) Pred-uvježbavanje

Prije bilo kakvog bihevioralnog treninga životinjama je najprije dopušteno vrijeme za prilagođavanje na prostor laboratorija kao i na podizanje i držanje u ruci od strane ispitivača. Svim životinjama je bila uskraćena dostupnost hrane *ad libitum*. Gubitak težine je redovito nadziran te je ukupna težina životinje održavana na najmanje 85% prvobitne tjelesne težine odn. težine prije uskraćivanja hrane. Period privikavanja životinja na rukovanje trajao je 1-2 dana sve dok se životinje nisu same bez straha uspinjale na ruku koja im je bila ponuđena te su bile mirne za vrijeme držanja. Životinjama je tad predstavljena eksperimentalna aparatura gdje su najprije započele s uvježbavanje trčanja. Tijekom uvježbavanja trčanja životinje su bile glavom pričvršćene za metalne šipke kako bi se priviknule na uvjete imobilizacije, dok je udove životinja mogla slobodno pokretati po cilindru za trčanje. Za vrijeme uvježbavanja trčanja monitori su bili isključeni, nikakav podražaj nije bio predstavljen životinji u ovom stadiju. Sustav za nagrađivanje je bio uključen, te se tako nagrađivalo hodanje i trčanje životinje po cilindru, što je životinja nužno morala savladati prije samog bihevioralnog uvježbavanja.

#### 2) Bihevioralno uvježbavanje

Na početku prvog dana uvježbavanja monitori su bili uključeni, i po prvi puta

životinjama je predstavljena virtualna stvarnost, kao i sam bihevioralni zadatak. Od tog trenutka uvježbavanje je nastavljeno svaki dan s prosječnim brojem proba od 100, na početku uvježbavanja, do 200 - 250 proba dnevno u kasnom dijelu uvježbavanja. Razlika u broju proba po danu uvježbavanja prouzročena je promjenom dužine pristupnog hodnika gdje se ona kretala od vrlo kratkih do vrlo dugih poteza, dok je vrijeme uvježbavanja po danu ostalo isto (~45 min). S uvježbavanjem miševa nastavilo se dok nisu dosegli visoke postotke točnih izvedbi u obje probe, tj. pri postizanju postotka iznad onih vrijednosti koje su mogle nastati uslijed slučajnog odabira (> 50 %)

## 2.4. ANALIZA PODATAKA

Neobrađeni podaci su se prikazali koristeći posebno napisan MatLab (The MathWorks, Massachusetts, SAD) programski kod u obliku rasterskih grafičkih prikaza. Korisničko sučelje je svim izmjerenim bihevioralnim parametrima i parametrima zadatka dodijelilo posebni vremenski biljeg koji je korišten kako bi se svi parametri međusobno mogli poravnati. Tako je za svaki trenutak uvježbavanja bila poznata vizualna scena u kojoj se životinja nalazila, brzina trčanja, prepoznavanje životinje u obliku *piezo* signala, kao i snimka aktivnosti stanica promatranih dvo-fotonskim mikroskopom.

Zabilježeni *piezo* signali koji su se podudarali s vremenom kada je na virtualnom hodniku bila predstavljena uspravna rešetka smatrani su točnim prepoznavanjem (T) i takve probe su se smatrale točnim uspravnim probama. Ako je životinja propustila reagirati na uspravnu rešetku proba se smatrala netočnom uspravnim probom. Ako životinja nije reagirala na nakošenu rešetku, odgovor životinje se smatrao točnim odbacivanjem i proba je smatrana kao točna nakošena proba. Međutim, ako je životinja reagirala na nakošene rešetke, odgovor je smatran lažnom uzbuđenom (LU) i proba se smatrala netočnom nakošenom probom. Za netočne odgovore životinja nije bila kažnjavana. Suzdržavanje životinje u uvjetima kada nije trebala dati odgovor (za vrijeme nakošene rešetke) vođeno je jedino odlukom životinje da ne gubi vrijeme i energiju na nenagrađivane probe. Mjera mogućnosti raspoznavanja između dva podražaja izračunata je putem teorije detekcije signala (Green and Swets 1966) i izražena kao vrijednost  $d'$  (d-prim).  $d'$  je predstavljen slijedećim matematičkim izrazom:  $d' = z(T) - z(LU)$ . Veća vrijednost  $d'$  označava veću diskriminaciju životinje između dva podražaja.

Brzina životinje izražena kao funkcija vremena (cm/s) zabilježena je u svakom trenutku i

izražena je prosječnom vrijednosti za svakih 200 ms za obje probe odvojeno i prikazana grafički koristeći posebno napisan MatLab programski kod. Dvije distribucije prosječne brzine potom su uspoređene Mann-Whitney-Wilcoxon testom te je izračunata p-vrijednost koristeći posebno napisan MatLab programski kod.

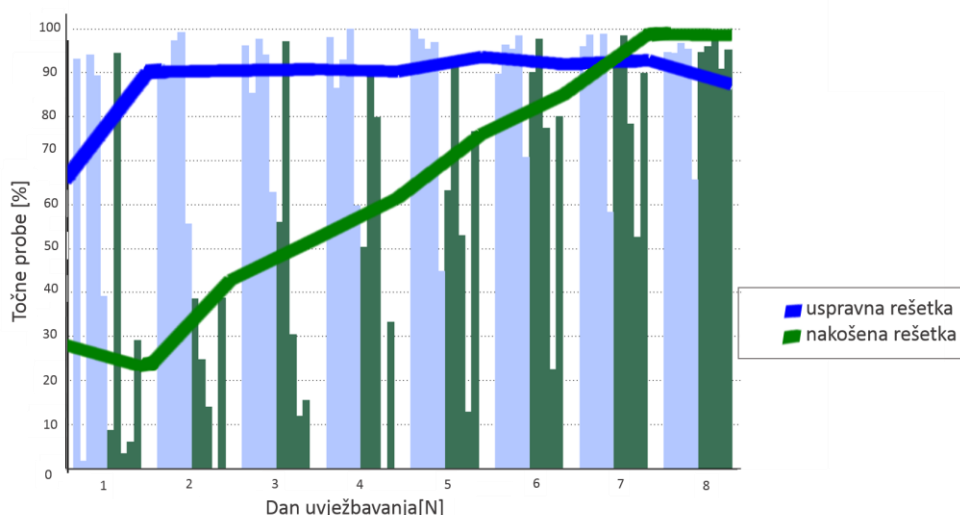


### 3. REZULTATI

#### 3.1. KRATAK PREGLED REZULTATA

Pet miševa uvježbano je u diskriminiranju dva vidna podražaja u kreni-stani zadatku (Vidi 1.3. Uvoda). Sljedeći odlomci će sažeti rezultate dvaju mjerenih parametara, brzine trčanja i odgovora životinje na vizualni podražaj odn. *piezo* signala. Na kraju, kao potvrda stabilnosti ovog obrasca ponašanja te mogućnosti njegove kombinacije s metodama vizualizacije visoke razlučivosti, nekoliko stanica vidnog korteksa će biti opisano kao primjer odgovora na vidne podražaje.

U bihevioralnom zadatku miševi su morali reagirati na podražaj uspravne rešetke tako da su jezikom dodirivali metalnu cijev koja je donosila nagradu. Za vrijeme prikaza nakošene rešetke, miševi su morali istu reakciju potisnuti te tako ignorirati podražaj nakošenih rešetki (Vidi 2.1. Materijala i metoda). Samo uvježbavanje je bilo podijeljeno u dva stupnja: 1) pred-uvježbavanje životinja za vrijeme kojeg nije bio predstavljen niti jedan podražaj i 2) bihevioralno uvježbavanje koje je okarakterizirano prisutnošću podražaja koji su životinjama bili predstavljenih putem virtualne stvarnosti. Nakon 8 treninga svi miševi su savladali zadatak s različitim stopom učenja gdje je izvedba životinja porasla s one na razini pogađanja (50%) na ~ 90% točnih proba. Postotak točnih proba prikazuje Slika 6. Najniži rezultat kod uspravnih točnih proba ostvario je miš 5 (~ 65%) a najniži rezultat kod nakošenih točnih probi pokazao je miš 4 (~ 90%).

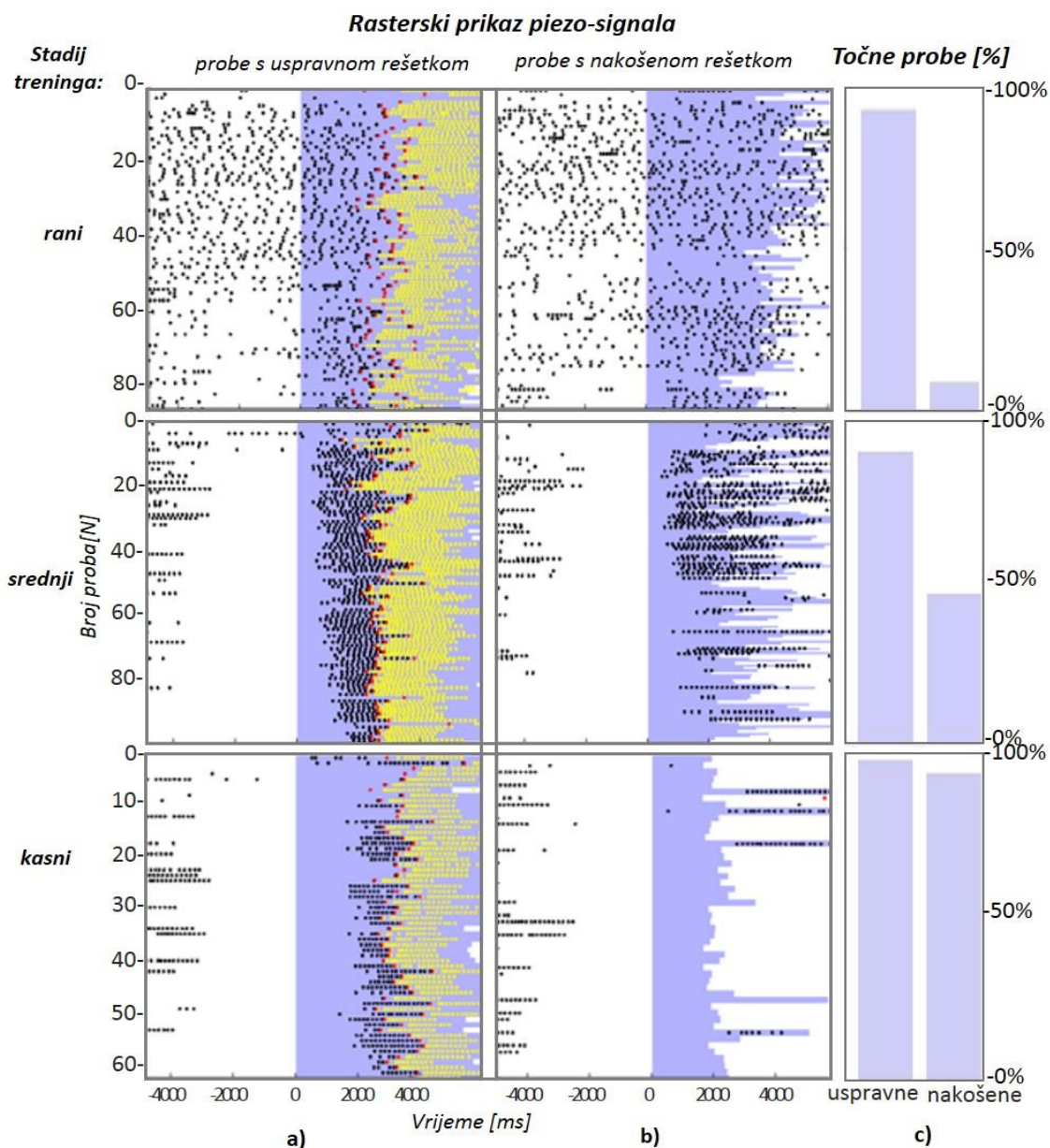


Slika 6. Prosječan postotak točnih proba po pojedinačnoj seansi za vrijeme prikaza nakošenih (zeleni) i uspravnih (plavi) pravac. Postotak točnih pojedinačnih proba prikazan je plavom (uspravne) i zelenom (nakošene) rešetkom, s lijeva na desno za Miša 1-5.

### 3.2. ANALIZA PIEZO SIGNALA

*Piezo* signali su zabilježeni naponski signali nastali uslijed direktnog odgovora životinje na predstavljene podražaje (vidi 2.2. Materijala i metoda). Rasterski prikaz ukupnog broja zabilježenih *piezo* signala prikazan je kao funkcija vremena poravnatog prema pojavi vidnog podražaja (Slike 7 - 11), gdje u vremenu 0 prestaje pristupni hodnik i dolazi do prezentacije vidnog podražaja (uspravne ili nakošene rešetke).

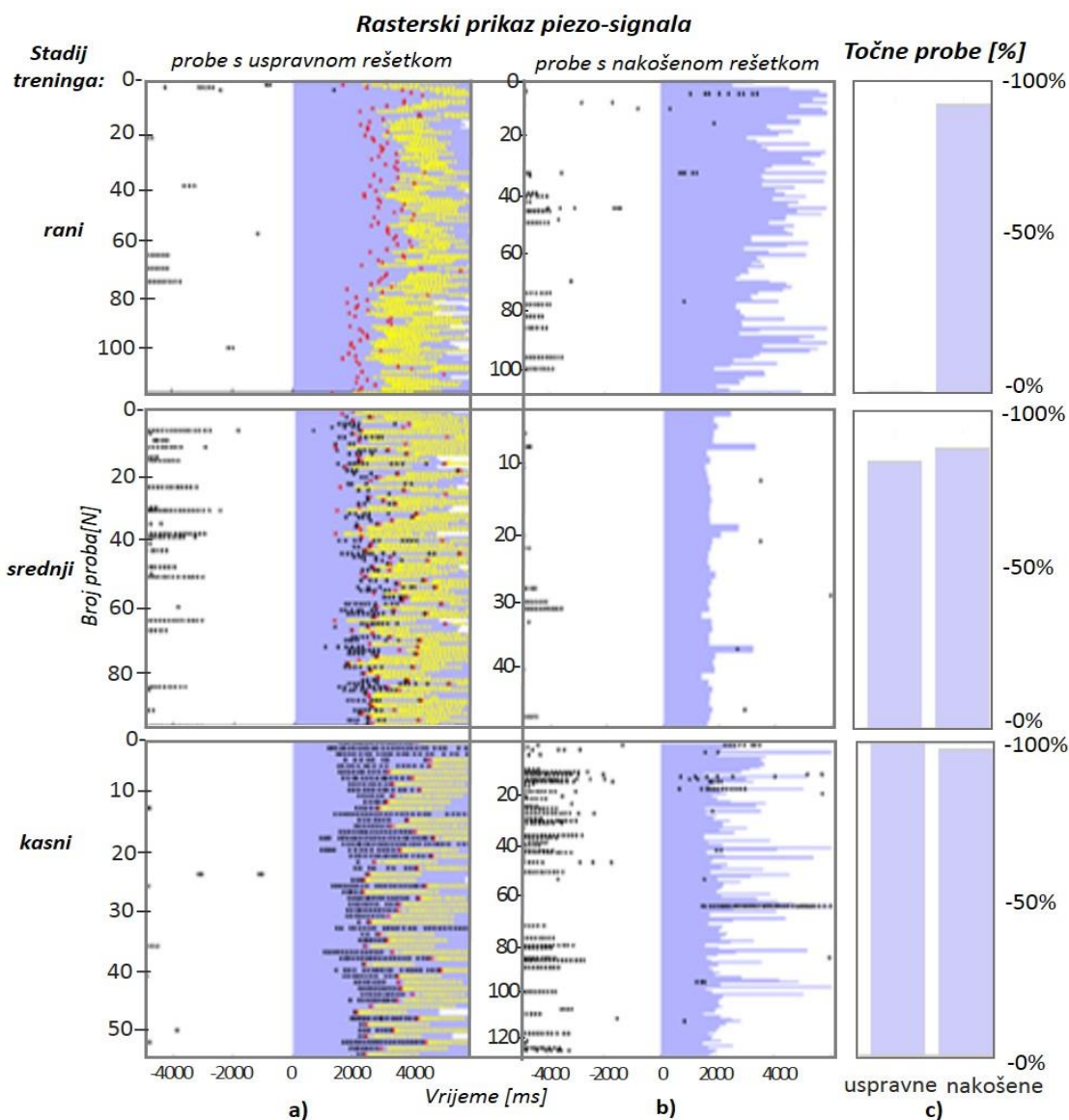
**Miš: 1**



Slika 7. Rasterski prikaz *piezo* signala Miša 1 kod uspravnih (panel a) i nakošenih (panel b) rešetki kao i postotka točnih proba u oba slučaja (panel c).

Kao primjer *piezo* signala tijekom uvježbavanja prikazana su 3 stadija uvježbavanja: rani (1. seansa), srednji (4. seansa) i kasni (7. seansa) od ukupno 8 seansi. Panel –a Slika 7 - 11 prikazuju broj zabilježenih *piezo* signala (crne točke) za vrijeme nagrađivane probe s uspravnom rešetkom (osjenčano područje). Žute točke nakon trenutka otvaranja ventila (prikazano crvenom točkom) predstavljaju signale nastale uslijed uzimanja nagrade te oni nisu uvažavani u daljnjim analizama.

**Miš: 2**

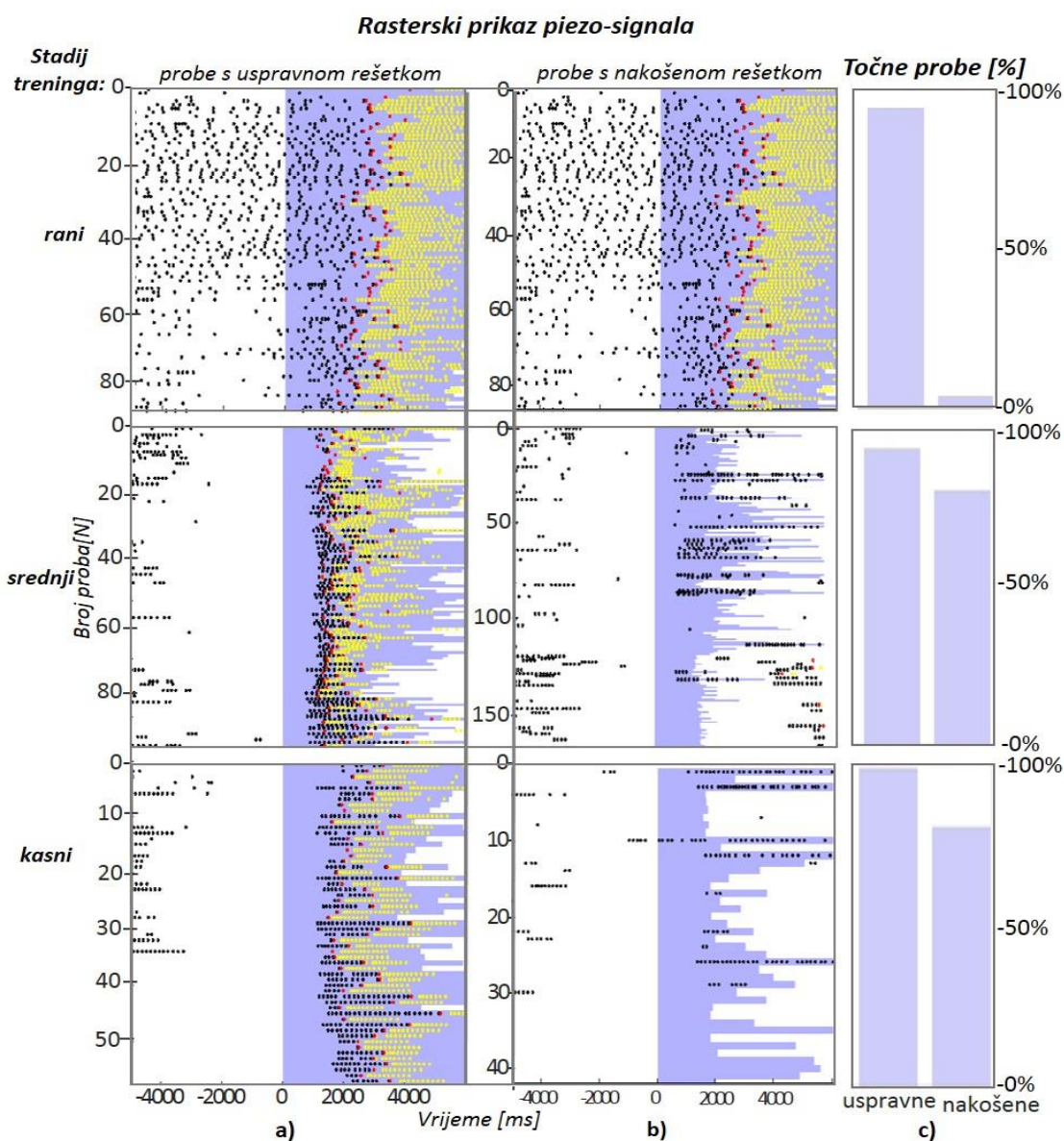


Slika 8. Rasterski prikaz *piezo* signala Miša 2 kod uspravnih (panel a) i nakošenih (panel b) rešetki kao i postotka točnih proba u oba slučaja (panel c).

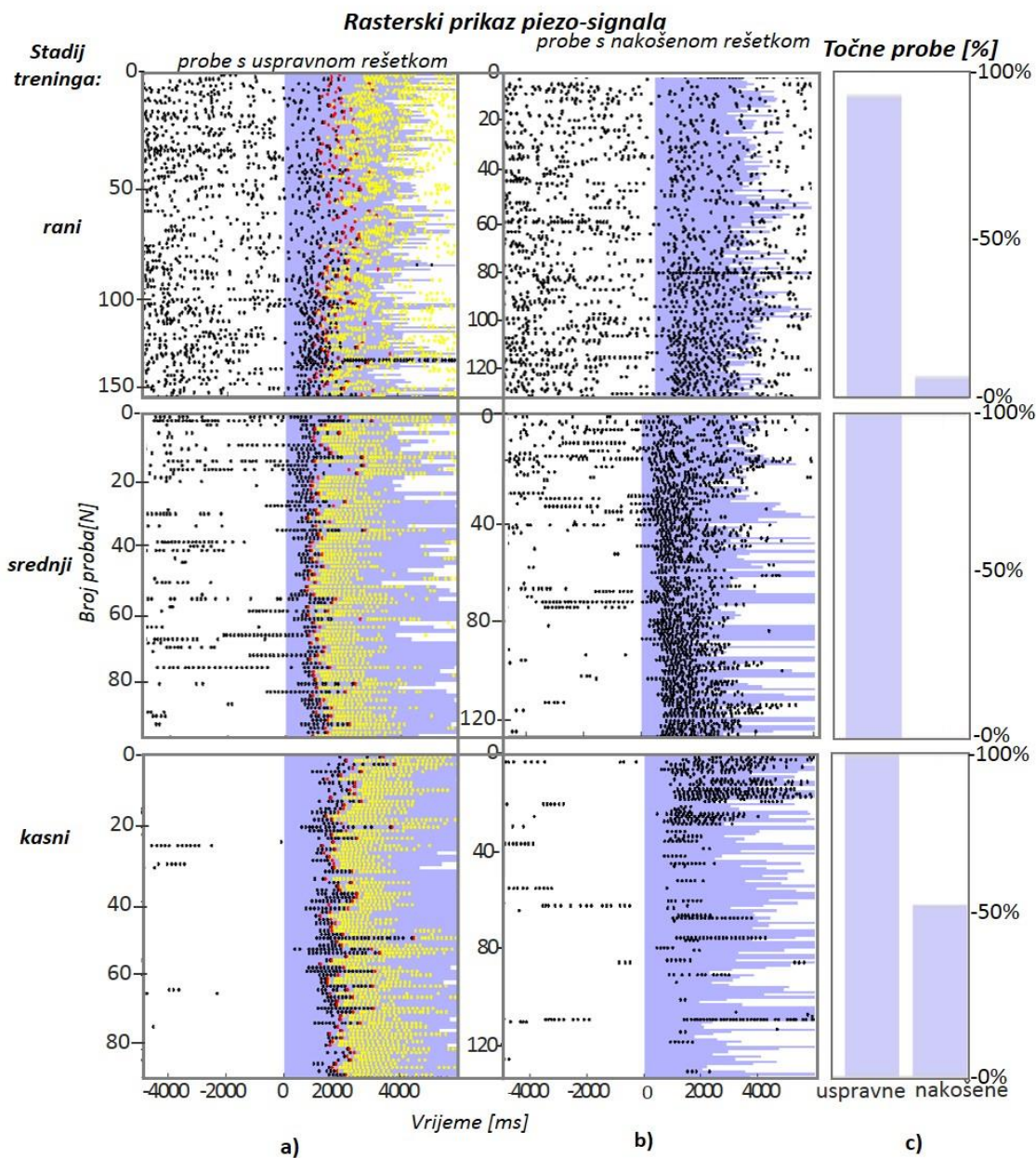
Neosjenčano područje predstavlja *piezo* signal povezan s prethodnom probom ili pristupnim hodnikom probe čiji se podražaji prikazuju. Ukupan broj zabilježenih *piezo*

signala u nenagrađivanim probama prikazan je u panelu -b Slika 7 - 11. Kao i u prethodnom slučaju, osjenčano područje predstavlja područje nakošenih rešetki dok neosjenčano područje predstavlja pristupni hodnik ili podražaj iz prethodne probe. U analizu ponašanja životinje pojedinačnih proba u obzir su uzeti samo oni *piezo* signali koji su bili smješteni u osjenčanom području (izuzev *piezo* signala nastalih nakon dostavljanja nagrade, kako je gore objašnjeno). Panel –c Slika 7-11 prikazuje postotak točnih proba u slučaju oba vidna podražaja za svaku prikazanu seansu.

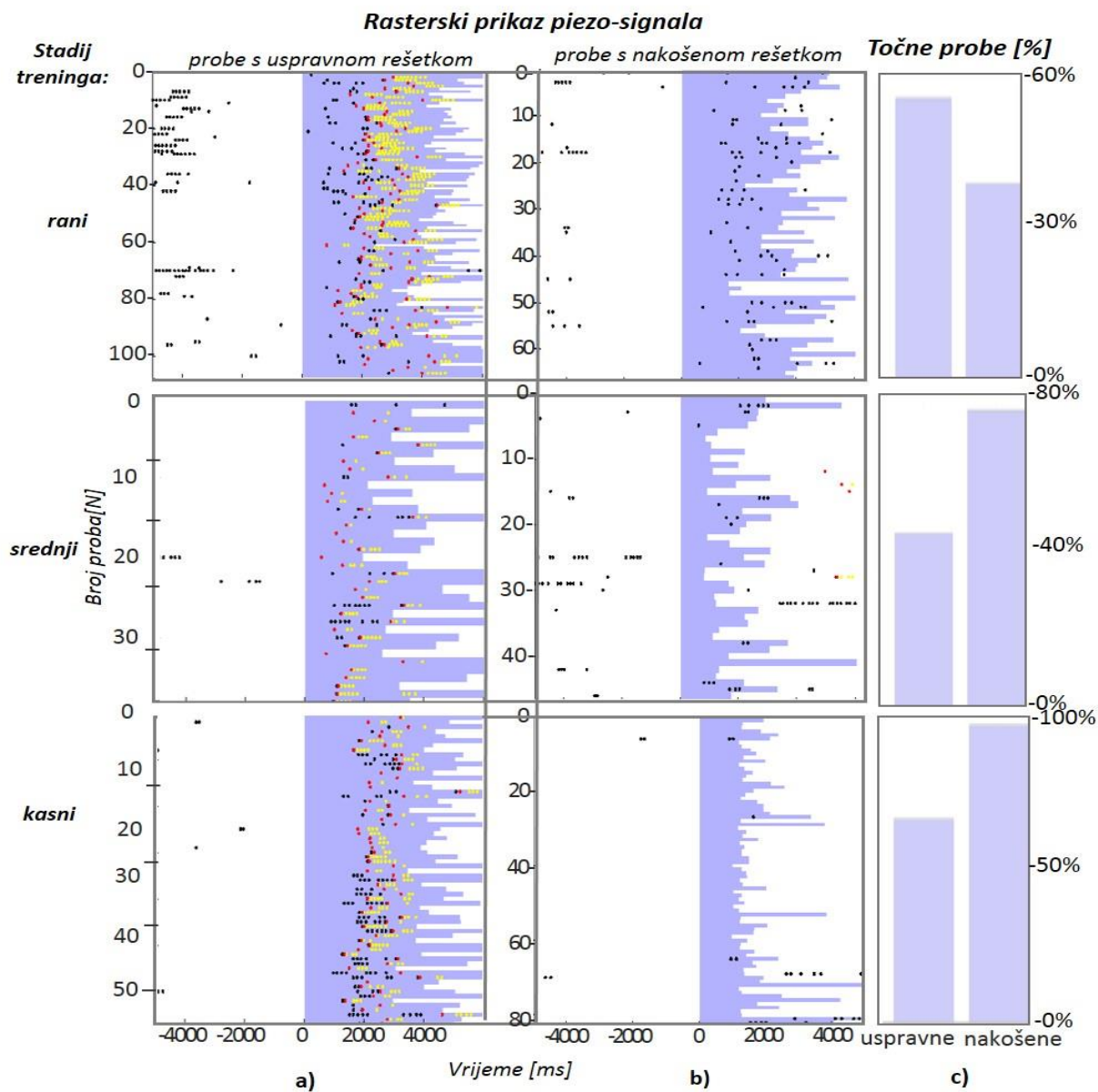
**Miš: 3**



Slika 9. Rasterski prikaz *piezo* signala Miša 3 kod uspravnih (panel a) i nakošenih (panel b) rešetki kao i postotka točnih proba u oba slučaja (panel c).

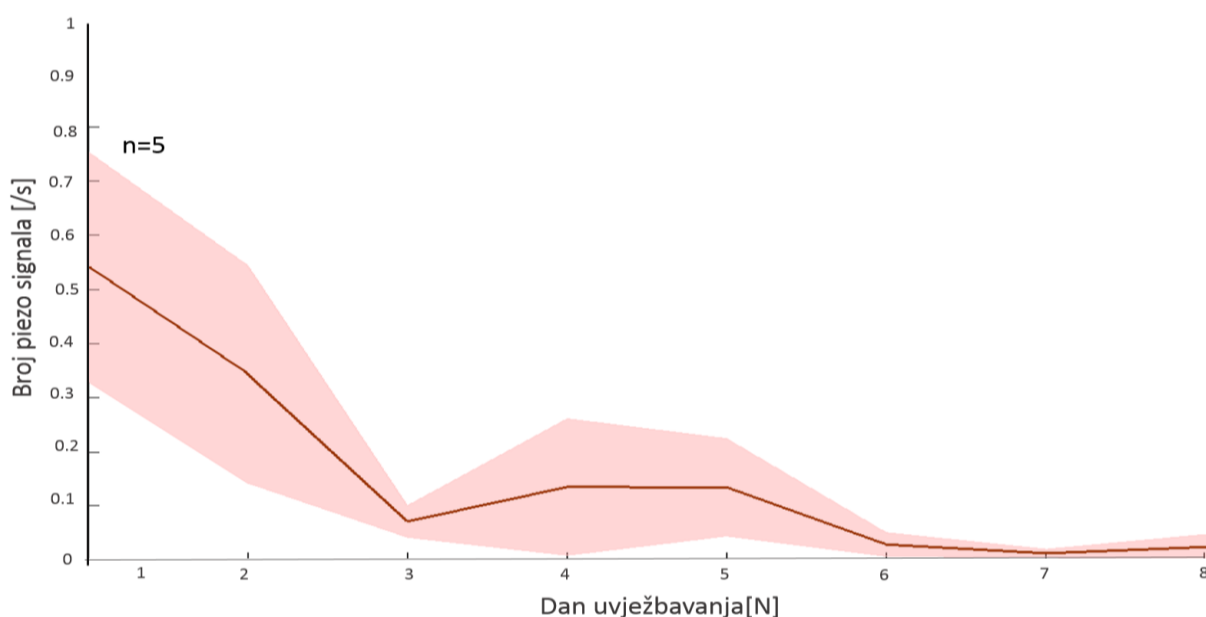


Slika 10. Rasterski prikaz *piezo* signala Miša 4 kod uspravnih (panel a) i nakošenih (panel b) rešetki kao i postotka točnih proba u oba slučaja (panel c).



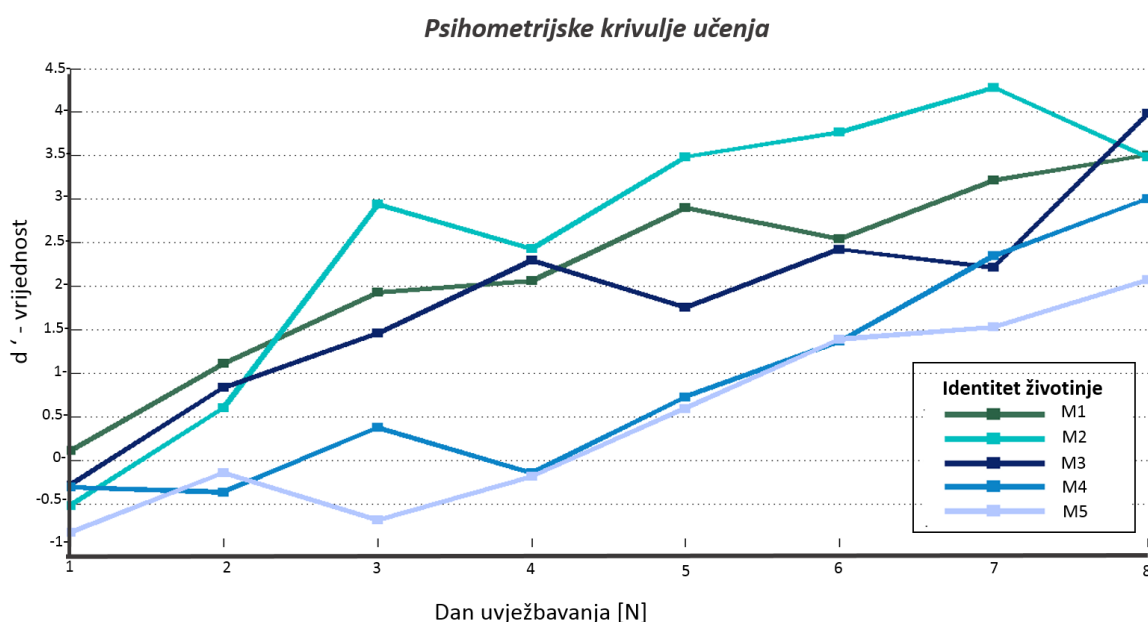
Slika 11. Rasterski prikaz piezo signala Miša 5 kod uspravnih (panel a) i nakošenih (panel b) rešetki kao i postotka točnih proba u oba slučaja (panel c).

Prosječan broj *piezo* signala u pristupnom hodniku kroz period uvježbavanja za sve miševe sažima Slika 12. Kao i kod nakošenih rešetki, nestanak odgovora životinje u slučaju pristupnog hodnika vođeno je jedino željom životinje da uštedi vrijeme i energiju, nikakvo kažnjavanje odgovora životinje tijekom ovog hodnika nije bilo korišteno. Raspoznavanje pristupnog hodnika od područja rešetki je prvi korak raspoznavanja kod svih miševa. U ranoj fazi uvježbavanja (rana faza -a i -b u Slikama 7-11) životinje ne pokazuju diskriminaciju između dva podražaja, te je *piezo* signal prisutan za vrijeme trajanja bilo koje rešetke kao i za vrijeme pristupnog hodnika. To je točno za Miša 1,3,4. Dok su Miševi 2 i 5 dali slab broj *piezo* signala u ovoj fazi uvježbavanja. Ovo najbolje oslikava različitost među miševima s obzirom na to jesu li skloni u početku reagirati na bilo koji podražaj kako ne bi propustili niti jednu nagradu. U ovom slučaju radi se o privrženosti davanju odgovora potvrdnosti o prisutnosti uspravne rešetke, odn. o sklonosti miša da daje *piezo* signale kako ne bi propustio niti jednu nagradu što je u slučaju ovih miševa uzrokovalo velik broj lažnih uzbuna (LU) i netočnih nakošenih proba dok je postotak uspravnih proba bio jako visok. Miševi 2 i 5 su pak imali veću sklonost ne-reagirati dodirivanjem metalne cijevi što je rezultiralo smanjenim ukupnim brojem *piezo* signala kao i većim brojem netočnih uspravnih proba, dok je postotak točnih nakošenih proba bio jako visok. Daljnjim uvježbavanjem, tijekom srednje faze dolazi do smanjenja *piezo* signala za vrijeme pristupnog hodnika za životinje 1,3 i 4, dok dolazi do sveukupnog povećanja u broju *piezo* signala za životinje 2 i 5 koje počinju davati odgovor na prisutnost podražaja.



Slika 12. Prosječna frekvencija *piezo* signala za n=5 miševa (puna linija); standardna pogreška aritmetičke sredine (osjenčano područje).

Ukoliko bismo kao mjeru izvedbe životinje uzimali samo postotak točnih proba, s obzirom na različite sklonosti životinja na početku uvježbavanja, rezultati bi mogli navoditi na lažne i nespretno zaključke. To je bio razlog zašto smo kao mjeru izvedbe životinje uzimali  $d'$  koja je u obzir uzimala odgovor na oba tipa podražaja (vidi 2.4. Materijala i metoda). Vrijednost  $d'$  tijekom uvježbavanja za svaku životinju pojedinačno prikazana je Slikom 13. Nula označava područje na kome nema razlike u odgovoru na uspravnu i nakošenu rešetku. Negativna vrijednost odražava sklonost odgovora na nakošene rešetke dok pozitivnija  $d'$  označava bolje raspoznavanje uspravnih i nakošenih rešetki. Sve životinje su uspješno savladale bihevioralni zadatak, ali s različitim stopama učenja, gdje je i dalje najmanju razinu izvedbe pokazala životinja br. 5 (2.1), a najvišu životinja 3 (4.0).



Slika 13. Krivulje učenja za sve životinje ( $n=5$ ) kao vrijednost  $d'$  tijekom svih seansa uvježbavanja.

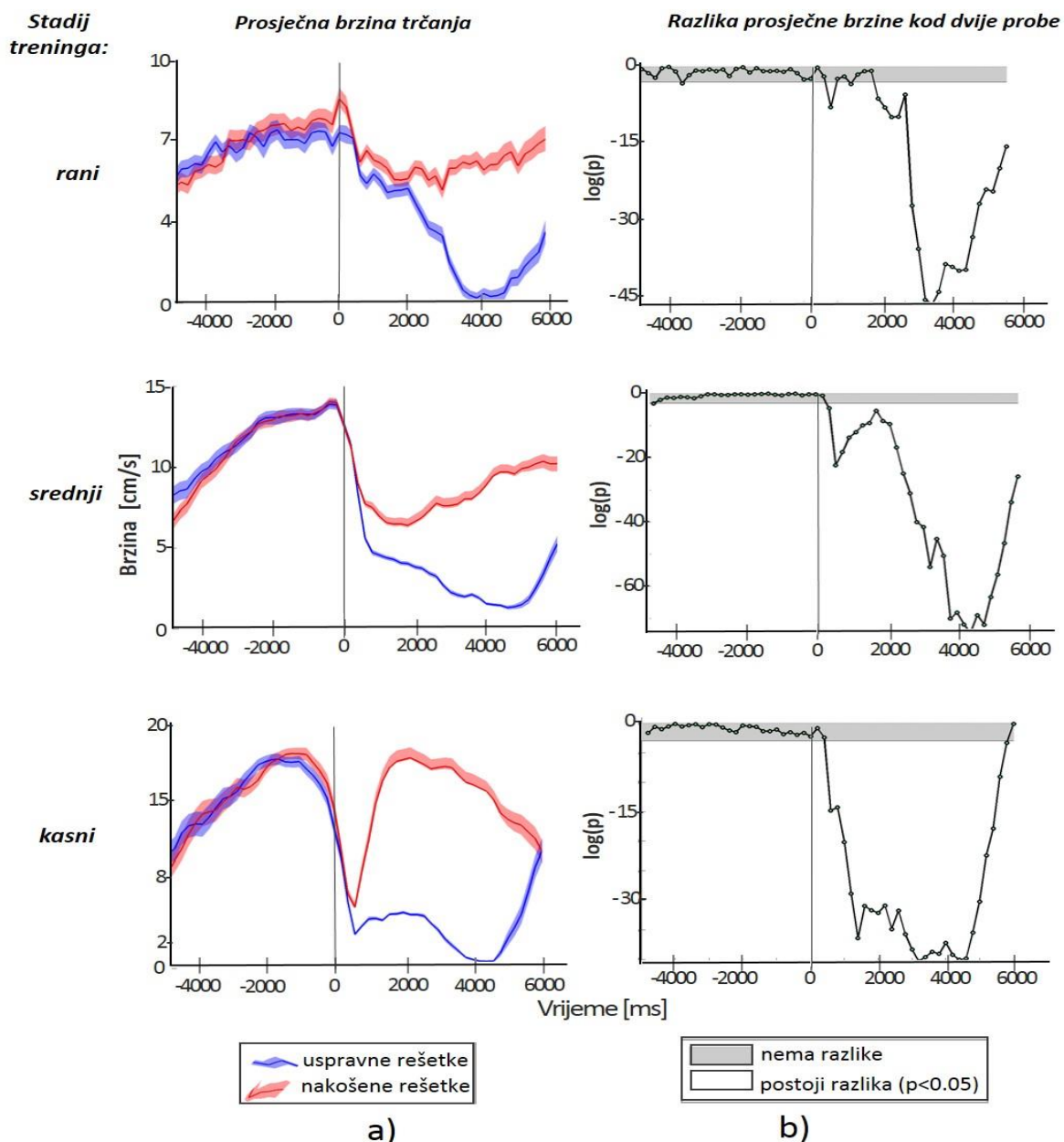
### 3.3. ANALIZA BRZINE TRČANJA ŽIVOTINJE

Brzina trčanja životinje, kao drugi analizirani parametar, bila je detektirana putem kompjuterskog optičkog miša (vidi 2.2. Materijala i metoda). Parametar brzine je pokazao veću varijabilnost među životinjama. Prosječna brzina životinje u seansama koje su date kao primjer prikazana je na Slikama 14 - 18, panelom –a. Prosječne vrijednosti brzine iskazane su u slučaju uspravne (plavo) i nakošene rešetke (crveno). Okomica na  $x=0$  predstavlja trenutak kad je završio pristupni hodnik i kada je prikazana ili nakošena ili

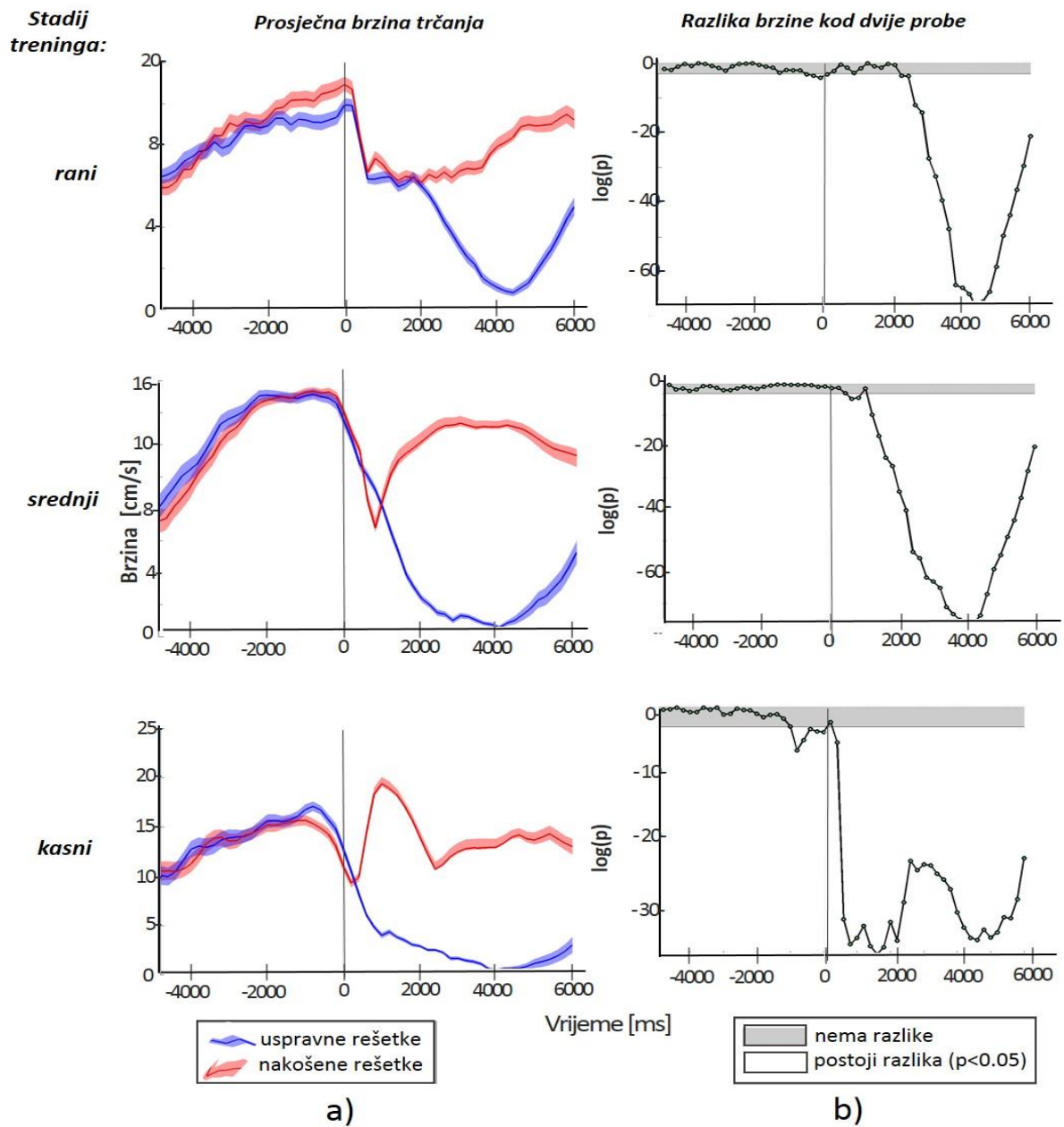


uspravna rešetka. Razlika u ponašanju vezana uz brzinu životinje izračunata je međusobnom usporedbom dvije distribucije koristeći Mann-Whitney-Wilcoxon test. Svaki 200 ms treninga je izraženo kao jedna točka s prosječnom vrijednosti. Rezultati su prikazani panelom -b Slika 14 - 18 gdje osjenčano područje predstavlja dio koji nije statistički značajan ( $p > 0.05$ ) dok neosjenčani dio izražava statistički značajnu razliku između dvije distribucije brzina.

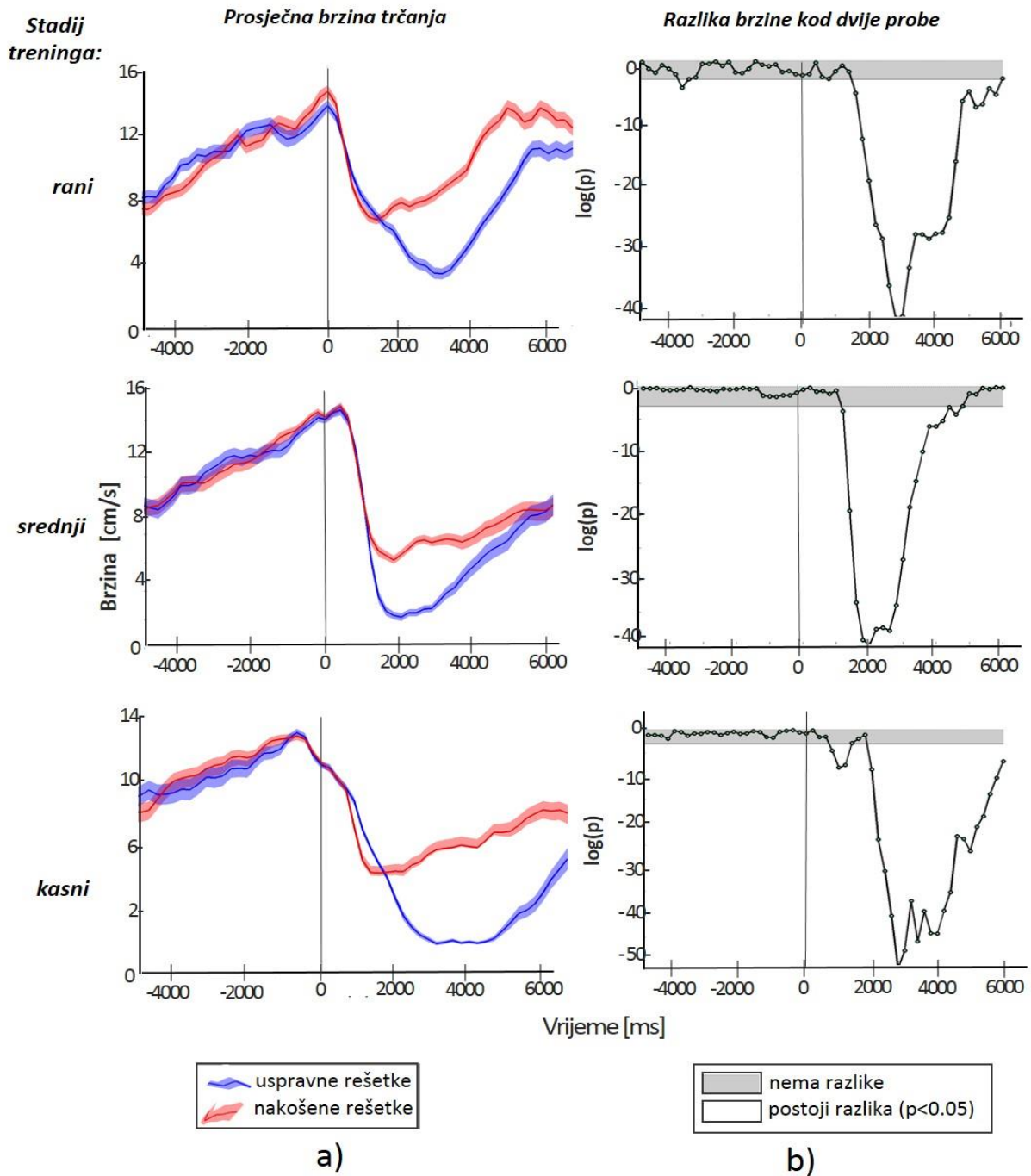
**Miš: 1**



Slika 14. a) Prosječna brzina trčanja Miša 1 u probama s vertikalnim (plavi) i nakošenim (crveni) pravac. Osjenčano je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine; b) razlika između brzine u nakošenim i uspravnim probama iskazana kao  $\log(p)$ .

**Miš: 2**

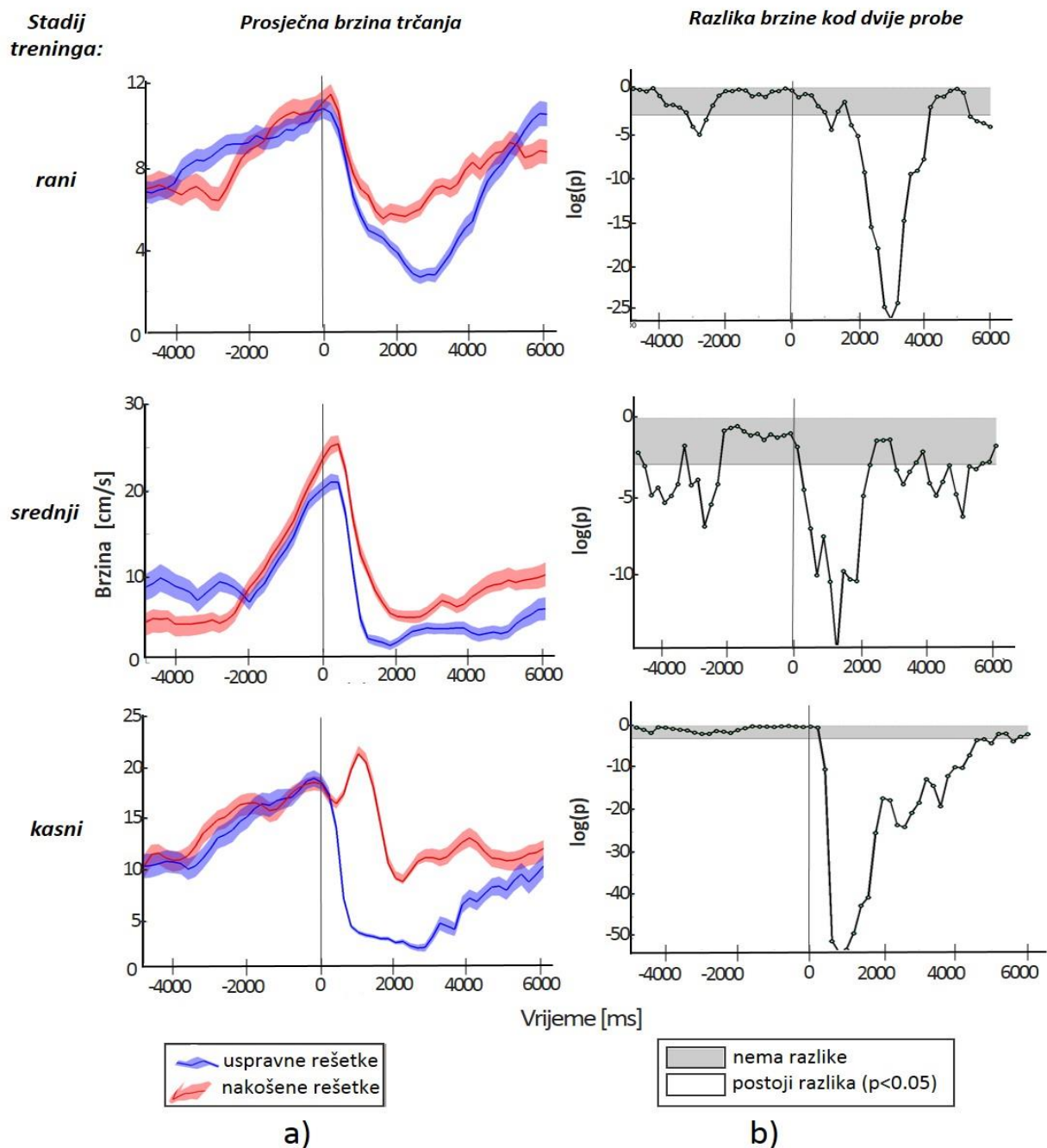
Slika 15. a) Prosječna brzina trčanja Miša 2 u probama s vertikalnim (plavi) i nakošenim (crveni) pravac. Osjenčano je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine; b) razlika između brzine u nakošenim i uspravnim probama iskazana kao  $\log(p)$ .



Slika 16. a) Prosječna brzina trčanja Miša 3 u probama s vertikalnim (plavi) i nakošenim (crveni) pravac. Osjenčano je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine; b) razlika između brzine u nakošenim i uspravnim probama iskazana kao  $\log(p)$ .

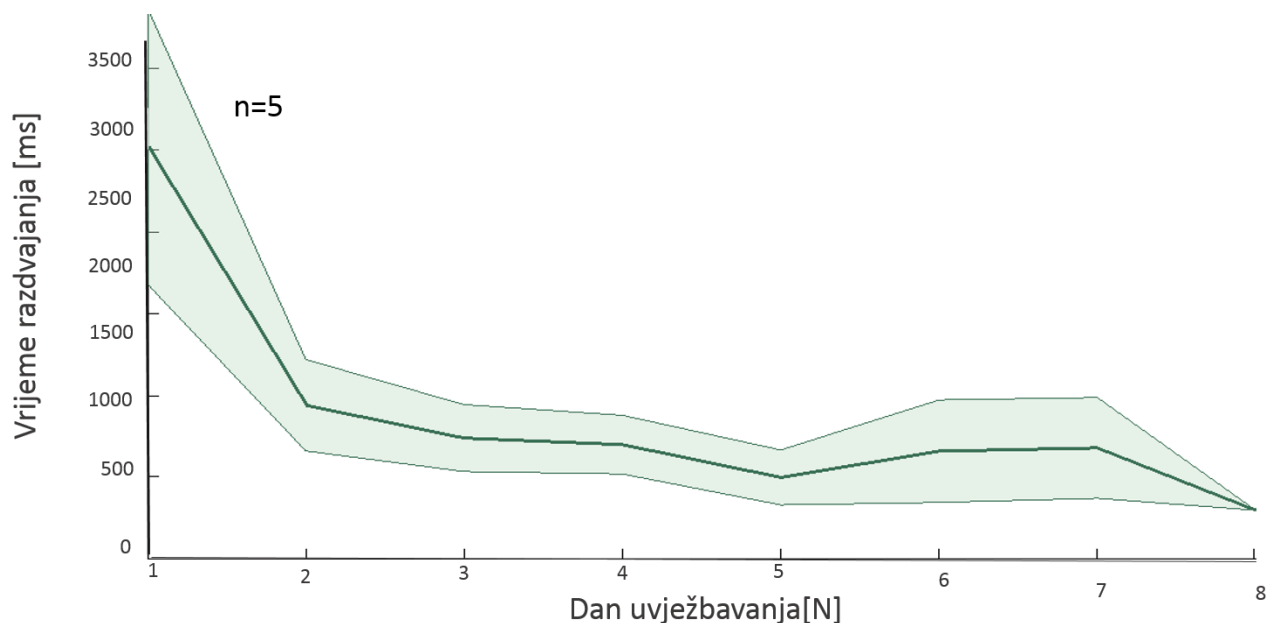
Slika 17. a) Prosječna brzina trčanja Miša 4 u probama s vertikalnim (plavi) i nakošenim (crveni) pravac. Osjenčano je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine; b) razlika između brzine u nakošenim i uspravnim probama iskazana kao  $\log(p)$ .

**Miš: 5**



lika 18. a) Prosječna brzina trčanja Miša 5 u probama s vertikalnim (plavi) i nakošenim (crveni) pravac. Osjenčano je prikazana standardna pogreška aritmetičke sredine; b) razlika između brzine u nakošenim i uspravnim probama iskazana kao  $\log(p)$ .

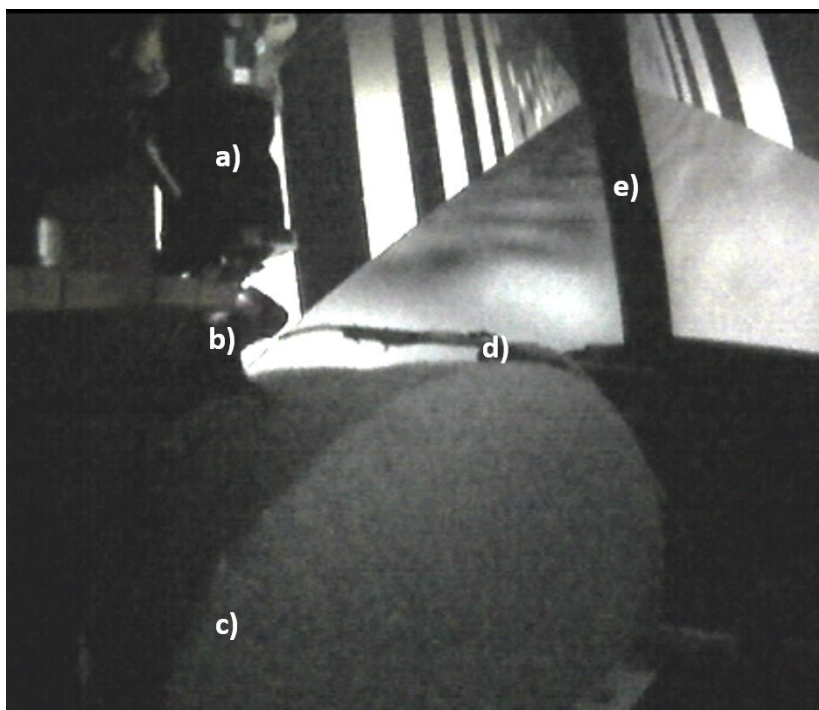
Prosječno vrijeme gdje dolazi do razdvajanja dvije brzine prikazuje Slika 19, gdje je vidljivo kako u početku uvježbavanja životinjama treba više vremena za reakciju ~3.0 s, dok kasnije tijekom uvježbavanja kod svih životinja to vrijeme razdvajanja brzine konvergira u jedinstvenu točku od 400 ms gdje se dva profila brzine trčanja razdvajaju.



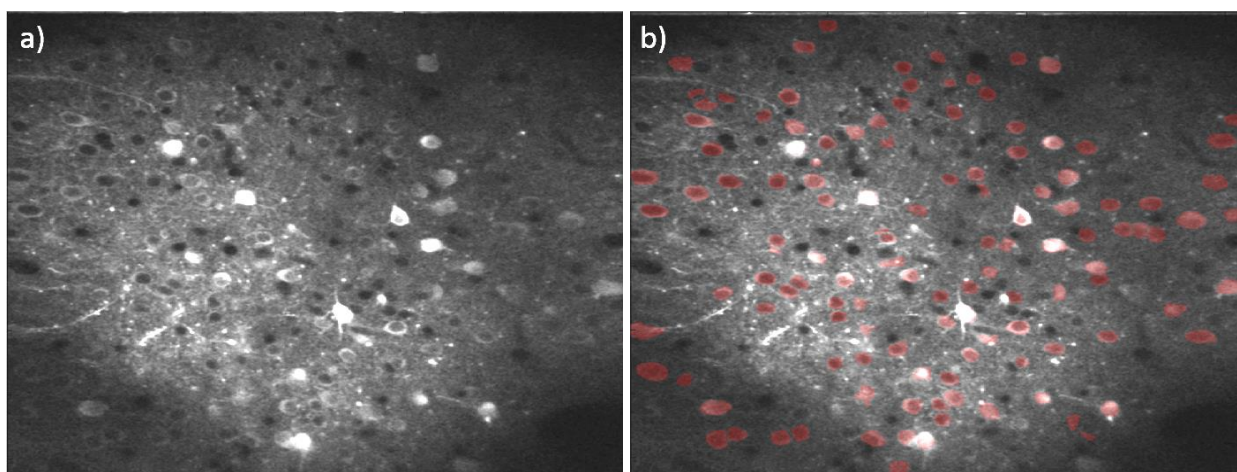
Slika 19. Prosječno vrijeme razdvajanja vrijednosti brzina nakon prikazivanja podražaja rešetki (n=5, puna linija), dok je standardna pogreška aritmetičke sredine prikazana osjenčanim područjem.

#### 3.4. AKTIVNOST STANICA VIDNOG KORTEKSA TIJEKOM BIHEVIORALNOG ZADATAKA

Dok je životinja bila uključena u bihevioralni zadatak (Slika 20) u isto vrijeme aktivnost stanica vidnog korteksa bila je promatrana dvo-fotonskim mikroskopom. Aktivnost stanica vizualizirana je dostavljanjem genetički kodiranih indikatora kalcija GCaMP6 putem virusnog vektora (za daljnju literaturu, vidi Uvod 1.2.1.). Neuroni vidnog sustava su detektirani putem semi-automatskog algoritma koji je prepoznao regije od interesa (Slika 21) načinjenog koristeći MatLab. Svako mjesto odabrano od strane algoritma bilo je ručno revidirano kako bi se izbjegle pogreške kao što su kontaminacija signala stanice signalima aksona, dendrita ili neuropila.



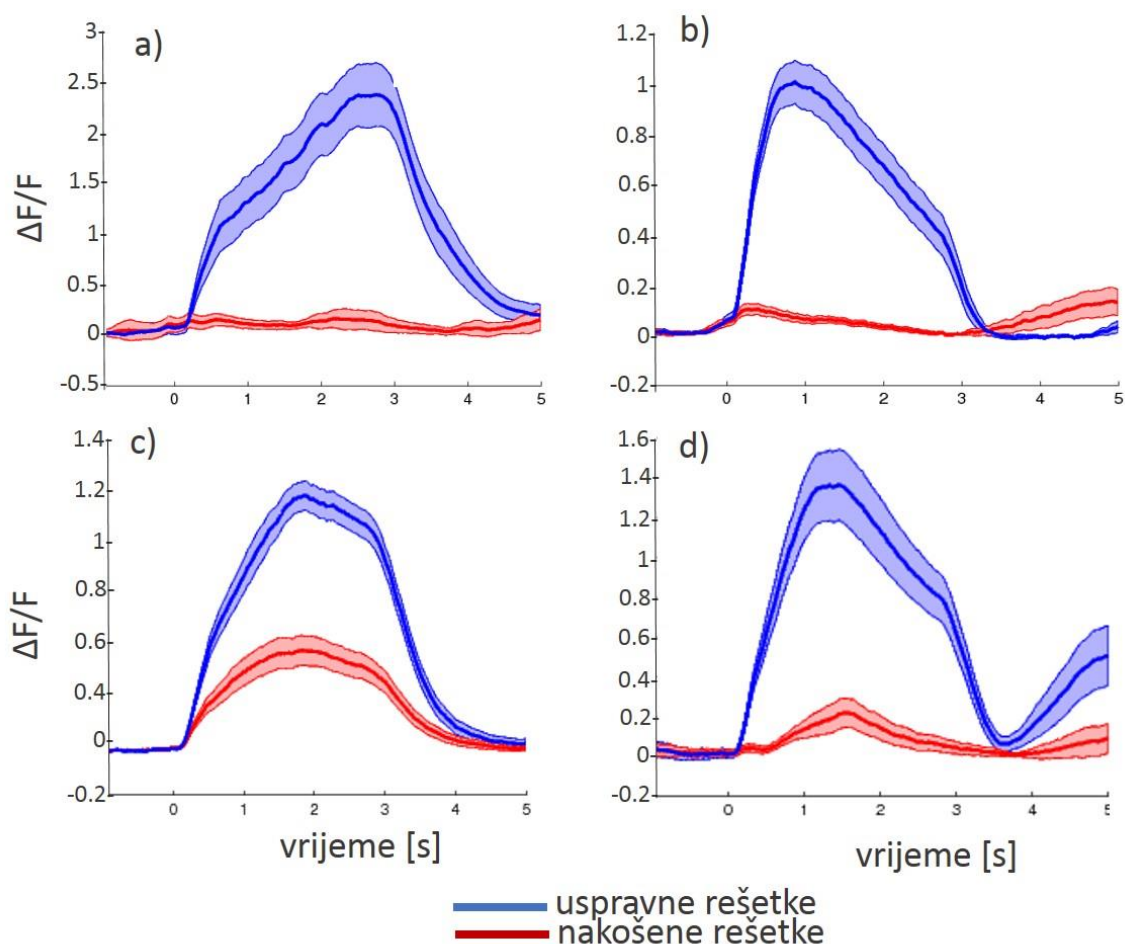
Slika 20) Isječak načinjen infracrvenom kamerom smještenom u unutrašnjosti aparature korištene za uvježbavanje. a) objektiv korišten za promatranje aktivnosti stanica smješten je iznad vidnog korteksa; b) životinja je glavom fiksirana za metalne šipke dok je tijelo u kontaktu s c) cilindrom za trčanje. Ispred životinje smještena je cijev za dostavljanje nagrade d); koja je na drugom kraju spojena na *piezo* senzor u svrhu detekcije kada životinje dodiruje cijev kao odgovor na vidne podražaje predstavljene putem dva monitora e).



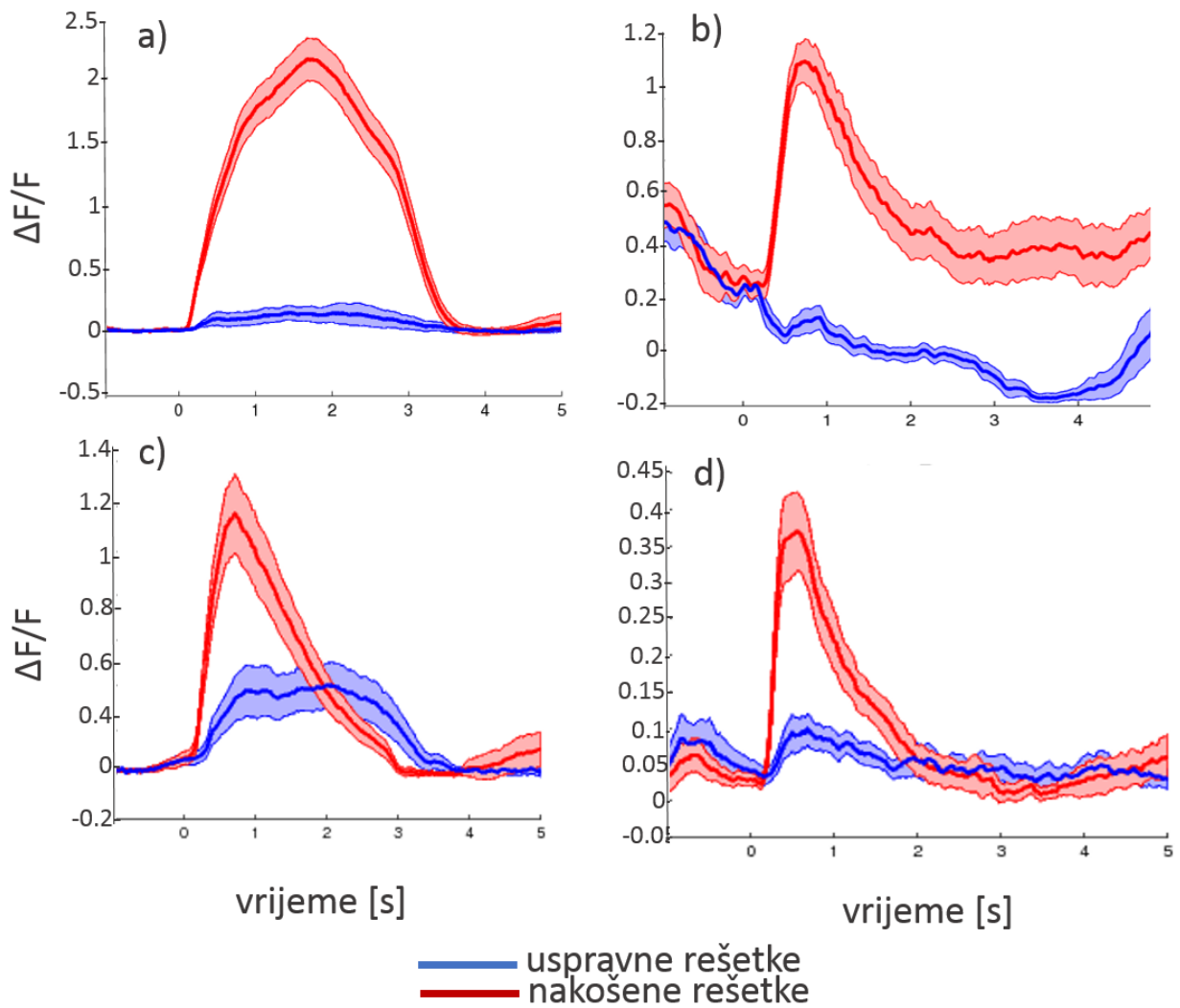
Slika 21. Stanice vidnog korteksa promatrane dvo-fotonskim mikroskopom. a) stanice su inficirane virusom koji je u stanice unio fluorescentni protein GCaMP6, osjetljiv na povećanje razine kalcija. Stanice su bile detektirane semi-automatski kako bi se označile regije interesa (RI) (crvene površine na slici b), koje predstavljaju regije slike u kojima će se analizirati prikupljeni kalcijev signal.

Pri definiranju regija interesa (RI) korišten je konzervativni kriterij gdje se stanicom smatrala regija koja je makar jednom dala odgovor tijekom bilo koje od seansi. Odgovorom stanica smatrana je promjena u fluorescenciji ( $\Delta F/F$ ) gdje je fluorescencija u točno određenom trenutku uspoređena s prosječnom razinom fluorescencije u prethodnom vremenskom periodu te iste stanice.

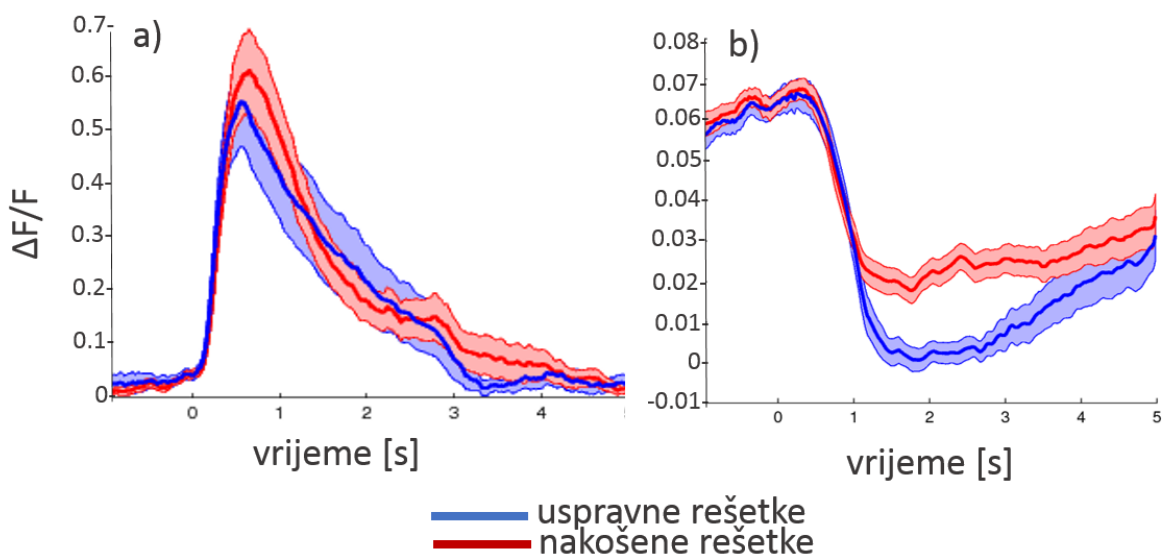
Aktivnost stanica promatrana je u kontekstu virtualne scene koju je životinja tada imala kao vidni podražaj. Promjena u fluorescenciji kao funkcija vremena tijekom prikazivanja dva podražaja prikazana je slikama 22-24 koje prikazuju odgovore na razini pojedinačne stanice.



Slika 22. Promjena u fluorescenciji kod 4 stanice koje preferiraju vertikalnu rešetku (a-d) kao funkcija vremena prikazivanja uspravne (plavo) i nakošene rešetke (crveno).



Slika 23. Promjena u fluorescenciji kod 4 stanice koje preferiraju nakošenu rešetku (a-d) kao funkcija vremena prikazivanja uspravne (plavo) i nakošene (crveno) rešetke.



Slika 24. Promjena u fluorescenciji kod 2 stanice koje reaguju na prisutnost oba tipa rešetki s povećanjem aktivnosti a) ili smanjenjem aktivnosti b).



## 4. RASPRAVA

Novije studije u neuroznanosti, a posebice u neuroznanosti osjetnih sustava, okreću se proučavanju moždane aktivnosti na razini pojedinačne stanice i to za vrijeme dok je subjekt aktivno uključen u bihevioralni zadatak. Budući da taj pothvat zahtjeva primjenu metoda visoke razlučivosti koje su invazivne, njihova dostupnost na humanim subjektima je ograničena. Iako je jako vrijedno, istraživanje na primatima kao modelima je dodatno otežano njihovom nedostupnošću te zahtjevnim održavanjem. S druge strane, miš kao model je lako dostupan, genetički homogen i dodatno favoriziran mogućnošću korištenja brojnih genetičkih oruđa. Ovaj diplomski rad opisuje uspostavljanje novog obrasca ponašanja koristeći kreni-stani dizajn zadatka u okruženju virtualne stvarnosti. Pet miševa uvježbano je u raspoznavanju dva vidna podražaja u obliku dva tipa rešetki. Miševi su trebali prepoznati podražaj s uspravnom rešetkom, dok su podražaj s nakošenom rešetkom trebali ignorirati. Izvedba životinja bila je postojana i uvjerljiva kroz sve seanse uvježbavanja, čak i u uvjetima snimanja. Nakon sedam dana uvježbavanja životinje su dosegle razinu točnosti od preko 90% što ovaj protokol čini idealnim u slučajevima kada je potrebno skratiti vrijeme uvježbavanja, ali na kraju dobiti ponašanje koje je stabilno i koje omogućava kronično praćenje samog ponašanja životinje ili drugih parametara istraživanja poput praćenja aktivnosti stanica.

U sljedećim odjeljcima bit će detaljnije opisani praćeni bihevioralni parametri kao što su profil trčanja životinje te promjena obrasca *piezo* signala tijekom učenja životinje u raspoznavanju dva vidna podražaja, kao i primjena i usporedba ovog obrasca ponašanja u studijama vidnog, ali i drugih sustava.

### 4.1 BIHEVIORALNI ODGOVOR ŽIVOTINJE – *PIEZO* SIGNALI

U opisanom dizajnu zadatka, životinji su bila predstavljena dva podražaja te je životinja na jedan podražaj trebala pokazati bihevioralni odgovor, dok se u slučaju drugog podražaja životinja trebala suzdržati od istog odgovora. Odgovor je životinja davala tako da je jezikom dodirivala cijev koja je bila postavljena ispred glave životinje, a ista cijev služila je i za dostavljanje nagrade životinji. Prema tome, odgovor životinje na vidni podražaj bilo je lizanje koje je uzrokovalo mehanički pritisak na cijev koje se prenosilo na *piezo* senzor smješten ispod cijevi. Jedna od slabosti ovakvog načina detekcije odgovora je ta što je sam odgovor (lizanje životinje) uobičajena bihevioralna pojava koja se može

pojaviti i nevezano uz bihevioralni zadatak. Budući da odgovor životinje tijekom nenagrađivanih proba, i tijekom pristupnog hodnika nije bio kažnjavan, životinje su znale pokazivati istraživačko ponašanje i davati odgovor koji nije povezani s bihevioralnim zadatkom. Međutim, raspoznavanje između: 1) podražajem izazvanih signala; od 2) signala nastalih uslijed istraživačkog ponašanja; ili 3) signala uzrokovanih nekim unutarnjim podražajem; nije bilo moguće. Imajući tu činjenicu u vidu, pri analizi signala pribjegli smo konzervativnom načinu mjerenja i tumačenja signala te je tako svaki odgovor životinje (bez obzira je li nastao uslijed odgovora na prezentirani vidni podražaj ili neki unutarnji podražaj) bilježen ravnopravno. Tako je svaki signal zabilježen izvan područja uspravne rešetke smatran pogreškom životinje. Jedino su se lako mogli prepoznati podražajem ne-uvjetovani odgovori nastali uslijed ponašanja vezanog uz uređivanje životinje. Takvi odgovori imali su visoku frekvenciju *piezo* signala uslijed nehotičnog dodirivanja cijevi tijekom uređivanja životinje i tijekom nastanka tih signala životinja nije trčala. U nekim studijama put dostavljanja nagrade i bilježenja signala je razdvojen te je tako nagrada dostavljana putem cijevi, a životinja je davala odgovor putem povlačenja poluge ili pomicanjem kugle u različite strane (za pregled vidi Carandini and Churchland, 2013). Ako bi to bilo potrebno, isto rješenje bi se lako moglo implementirati i u ovaj dizajn zadatka.

#### 4.2. UTJECAJ KRETANJA NA PONAŠANJE ŽIVOTINJE

Imobilizacija predstavlja stresan događaj za životinje i uvelike može utjecati na motivaciju te na općenito ponašanje životinje. Štoviše, jedan od najučestalijih protokola korištenih u istraživanju kroničnog i akutnog stresa kod glodavaca uključuje upravo stres imobilizacijom (primjerice Ricart-Jan et al., 2002; Lee et al., 2006; Hynie, 2007). Ako želimo proučiti utjecaj viših kognitivnih funkcija na aktivnost određene populacije neurona (primjerice, proučavanja kako se odgovor stanica vidnog korteksa mijenja kada životinja očekuje ili obraća pozornost na podražaj u odnosu kada podražaj dođe iznenada ili ga životinja ignorira) jedini zasada mogući pristup je izazvati ponašajne životinje koje će dati bihevioralni kontekst promatranoj aktivnosti. Smatra se kako se poticanjem životinje da izrazi određeno ponašanje neizbježno i potiče aktivnost neuronskih krugova odgovornih za to ponašanje. Međutim, kako bi se omogućilo promatranje aktivnosti stanica u visokoj prostornoj i vremenskoj razlučivosti, nužno je ograničiti kretanje životinje (Andermann et al., 2010; Histed et al., 2012). Održavanje regije interesa mozga što mirnijom i

postojanijom je nužno pri upotrebi metoda s visokom vremenskom i prostornom razlučivosti kao što su elektrofiziologija ili dvo-fotonska mikroskopija koje mogu zabilježiti aktivnost moždanih stanica s razlučivošću na razini pojedine stanice. Iz navedenih razloga, kako bi se takva osjetljiva mjerenja mogla upotrijebiti i u uvjetima gdje je neophodno aktivno ponašanje životinje, moguće je izvršiti svojevrsni kompromis te imobilizaciju cijele životinje svesti samo na fiksiranje glave životinje. Tako se životinji omogućava slobodno trčanje po pokretljivoj površini smještenoj ispod tijela životinje dok je istovremeno životinja fiksirana, što omogućava snimanje ili mjerenje aktivnosti stanica. To se najčešće postiže tako da se životinji omogući trčanje po površini kugle koja lebdi na zraku, s uzgonom zraka smještenim ispod kugle (Dombeck et al., 2007), a koje je široko primjenjivano u studijama hipokampusa (Harvey et al., 2009; Chen et al., 2013) ili studijama vidnog korteksa (Niell and Stryker, 2010; Keller et al., 2012). Kako bi se životinji omogućila interakcija s okolišem, (za vrijeme kretanja očekujemo i kretanje vizualne scene oko nas) životinje su u takvim istraživanjima okružene monitorima te su tako smještene u okruženje virtualne stvarnosti gdje kretanje životinje po površini kugle odgovara kretanju životinje u virtualnoj stvarnosti. Međutim, kod ovog pristupa, životinjama je potrebno duže vrijeme kako bi naučile kontrolirati rotaciju kugle (Carandini and Churchland, 2013). U našem dizajnu, umjesto kugle koristili smo cilindar koji je životinja rotirala oko središta pričvršćenog na bazu cilindra. Tijekom prvog postavljanja životinje na cilindar, često se događalo da bi životinje odmah počele brzo hodati ili čak trčati, što je uvelike smanjilo vrijeme potrebno kako bi životinja naučila kontrolirati cilindar. Korištenje cilindra životinji omogućava kretanje samo u smjeru rotacije cilindra, prema tome, i dostavljanje virtualne stvarnosti je jednostavnije i može biti izvedeno kombinacijom dva monitora koji postrance okružuju životinju.

Budući da se životinji omogućava kretanje, time se uvodi još jedan mjerljiv parametar ponašanja. Analiza trčanja i kretanja je dala bolji uvid u suptilnije i osjetljivije bihevioralne odgovore životinje od gore opisanog mjerenja *piezo* signala. Tijekom uspostavljanja ovog eksperimenta nije promatrana samo ukupna brzina trčanja životinje, nego i razlika u brzini trčanja u različitim bihevioralnim stanjima: ubrzavanje ili usporavanje povezano s bihevioralnim kontekstom, čak i različiti načini kretanja (sporo hodanje, brzo hodanje, trčanje, puzanje). Za vrijeme uvježbavanja životinje prve promjene u ponašanju bile su upravo promjene u trčanju kao bihevioralnom parametru. Primjerice, prije nego što su životinje naučile suprimirati odgovor na nakošenu rešetku najprije su promijenile način trčanja tijekom predstavljanja nakošene rešetke. Na početku uvježbavanja, životinje su

trčale kroz pristupni hodnik i naglo se zaustavljale na početku predstavljanja bilo kojeg tipa rešetki. U prvom stupnju promjene ponašanja, koje je vodilo do pravilnog raspoznavanja rešetki, životinje su najprije nastavile trčati za vrijeme predstavljanja nakošene rešetke iako su u tim uvjetima zabilježeni odgovori *piezo* senzorom. Kada bismo kao mjeru diskriminacije uzeli samo *piezo* signal, zaključak bi bio da životinja još ne razlikuje uspravnu od nakošene rešetke. Međutim, ako se bolje pogleda profil trčanja životinje, očito je kako se trčanje razlikuje u nastupanju dva tipa rešetki prije zone nagrade, što ukazuje na to da životinja ipak raspoznaje ova dva tipa rešetki prije nego se odluči ne reagirati na nakošenu rešetku. Brzina trčanja se tijekom ostalih faza uvježbavanja još više profilirala te su životinje tijekom nakošenih rešetki trčale brzinom jednakom onoj tijekom pristupnog hodnika, a u nekim slučajevima čak i brže nego u pristupnom hodniku. Ovo čini opisani dizajn zanimljivim čak i za istraživanja motornog korteksa gdje bi bilo moguće promatrati ove promjene na staničnoj razini, u smislu odgovora promatrane populacije stanica (Dombeck et al., 2009). Međutim, motorni odgovor životinja također je zanimljiv i istraživanjima vidnog sustava gdje je pokazano kako trčanje utječe na aktivnost barem dijela ukupnog broja neurona u vidnom korteksu (Niell and Stryker, 2010; Keller et al., 2012).

#### 4.3. BRZINA SAVLADAVANJA BIHEVIORALNOG ZADATKA

Uvođenje uvjetovanog ponašanja u vidu kažnjavanja netočnih proba često je korištena strategija u svrhu ubrzavanja učenja. Opisani su razni načini negativnog uvjetovanja biheviornog zadatka. Neki od najkorištenijih su prisilno plivanje (Prusky et al., 2000; Brown and Wong, 2006), naglo ispuhivanje zraka u smjeru subjekta ili jednostavno isključivanje iz biheviornog zadatka (e.g. Andermann et al., 2010; Busse et al., 2011). Naš biheviornalni zadatak nije uključivao nikakav tip kažnjavanja koji bi mogao ubrzati proces učenja na takav način. Jedina sila koja je djelovala na brzinu učenja bila je odluka životinje da ne troši vrijeme i energiju na nenagrađivane probe. Kako je dokazano, glodavci su sposobni akumulirati informacije tijekom proba (Brunton et al., 2013). U našem dizajnu testirali smo vidnu diskriminaciju, ali isti se može upotrijebiti i za ispitivanje kontrastne osjetljivosti (Busse 2011) u kombinaciji s optogenetikom ili u kombinaciji s mirisima ili zvukovima, tako omogućavajući istraživanje raznih osjetnih sustava, interakcije osjetnih modaliteta kao i pozornosti u percepciji. Naše životinje su pokazale visoko uspješnu izvedbu nakon samo 6-7 seansi od 45 min uvježbavanja, što je dalo stabilno

ponašanje s visokom stopom diskriminacije nakon samo 6-7 dana. Jedna od stavki koja je pridonijela brzom učenju svakako je mogućnost slobodnog kretanja životinje opisana u prethodnom odjeljku, uspoređujući sa sličnim studijama gdje se životinja nije mogla kretati i gdje je uvježbavanje trajao tjednima (Andermann et al., 2010).

#### 4.4. KORIŠTENJE KRENI-STANI DIZAJNA ZADATKA

Iako se pokazalo da glodavci vrlo brzo nauče takav tip zadatka, kreni-stani dizajn ima i svojih slabosti (Carandini and Churchland, 2013). Jedna od njih je osjetljivost na kriterij životinje gdje životinja može sniziti razinu uspješnosti točnih proba promjenom kriterija donošenja odluka (u našem slučaju odluku da ne troši vrijeme i energiju na reagiranje na nakošene rešetke ili pristupni hodnik). Neki od ovih problema mogu se izbjeći kombinacijom kreni-stani dizajna s teorijom detekcije signala. Tako je moguće mjeriti ne samo udio točnih prepoznavanja, nego i udio pogrešnih prepoznavanja, što na kraju daje mjeru razlikovanja nazvanu  $d'$  koja je neovisna o kriteriju životinje i koju smo i mi koristili kao kriterij napredovanja životinje. Problem koji preostaje je osjetljivost kreni-stani dizajna na motiviranost životinje da sudjeluje u zadatku. Taj problem moguće je nadvladati ograničavanjem dostupnosti hrane životinji. Tako su životinje tijekom treninga držane na 85% tjelesne težine prije početka zadatka i bile su zainteresirane za sudjelovanje u zadatku koji je bio nagrađivan hranom. Naš dizajn bi se lagano mogao prilagoditi u zadatak koji bi koristio dva alternativna izbora gdje bi životinje mogle davati dva različita odgovora na jedan podražaj. To bi se moglo omogućiti uvođenjem drugog neovisnog *piezo* senzora i dvije neovisne cijevi za dostavljanje nagrade i detekciju odgovora. Uvođenjem dva odgovora životinja bi bila prisiljena reagirati na svaki od dva podražaja, ali na različite načine, čime bi se isključila osjetljivost odgovora na motivaciju životinje.

## 5. ZAKLJUČAK

Iako promatranje ponašanja subjekta ne može dati uvid u aktivnost pojedinih stanica mozga tijekom obrade informacija, ponašanje može omogućiti promatranje aktivnosti stanica u kompleksnim kognitivnim stanjima kao što su pozornost, učenje ili iščekivanje. Ako životinja iskazuje određeno ponašanje, pretpostavka je da su neuralni krugovi odgovorni za ispoljavanje tog ponašanja također aktivni. Aktivnost tih krugova, maskirana u sveukupnu aktivnost promatrane populacije stanica, može se zabilježiti dvofotonskim mikroskopom, a tada je na istraživaču da osmisli zadatak koji će moći usporediti aktivnosti stanica u različitim bihevioralnim kontekstima.

Opisani dizajn bihevioralnog zadatka u ovom diplomskom radu nudi nove mogućnosti u istraživanju vidnog sustava kao i u istraživanju drugih osjetnih modaliteta kao i međumodalitetnog utjecaja na obradu informacija. Našim dizajnom moguće je proučavati, ne samo osnovnu obradu osjetnih informacija, nego i utjecaj učenja, iščekivanja, pozornosti kao i kretanja životinje. To je moguće tako što je opisani bihevioralni zadatak lako savladan od strane životinje, ali u isto vrijeme je i veoma fleksibilan, tj. ostavlja dosta prostora za promjene postojećih parametara kao i za uvođenje novih parametara, ovisno o napretku životinje i cilju istraživanja (primjerice ispitivanja utjecaja pozornosti na obradu vizualne informacije).

Nadalje, dizajn je moguće koristiti i s transgeničnim životinjama ili optogenetičkim metodama u svrhu detaljnijeg ispitivanja neuralnih krugova koji su ishodište ponašanja tako da bi se određene pod-populacije stanica ciljano mogle utišati ili aktivirati. Ovaj dizajn se može koristiti i u čisto bihevioralnim studijama jer ostavlja prostora za detaljna psihofizička mjerenja nužna u istraživanju procesa donošenja odluka ili viših kognitivnih stanja, bez proučavanja samog procesa obrade informacija u centrima mozga.

## 6. LITERATURA

1. Abdeljalil, J. et al., 2005. The optomotor response: a robust first-line visual screening method for mice. *Vision research*, 45(11), pp.1439–46.
2. Andermann, M.L., Kerlin, a M. & Reid, R.C., 2010. Chronic cellular imaging of mouse visual cortex during operant behavior and passive viewing. *Frontiers in cellular neuroscience*, 4(March), p.3.
3. Anikeeva, P. et al., 2011. teChnICal repOrtS Optetrode : a multichannel readout for optogenetic control in freely moving mice. *Nature Neuroscience*, 15(1), pp.163–170.
4. Arenkiel, B.R. et al., 2007. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, 54(2), pp.205–18.
5. Badea, T. C., and Nathans, J. (2004). Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J. Comp. Neurol.* 480(4):331–351.
6. Balkema, G. W., Mangini, N. J., and Pinto, L. H. (1983). Discrete visual defects in pearl mutant mice. *Science* 219:1085–1087.
7. Brouwer, B., and W. Zeeman, 1926. The projection of the retina in the primary optic neuron in monkeys, *Brain*, 49:1–35.
8. Brown, R.E. & Wong, A.A., 2007. The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice., pp.134–144.
9. Brunton BW, Botvinick MM, Brody CD (2013) Rats and humans can optimally accumulate evidence for decision-making. *Science* (New York, NY) 340:95–98.
10. Busse L, Ayaz A, Dhruv NT, Katzner S, Saleem AB, Schölvinck ML, Zaharia AD, Carandini M (2011) The detection of visual contrast in the behaving mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:11351–11361.
11. Cajal, S. S. 1892. *La rétine des vertébrés (La Cellule, English trans.; S. Thorpe and M. Glickstein, trans., 1972)*, Springfield:
12. Carandini, M. & Churchland, A.K., 2013. Probing perceptual decisions in rodents. *Nature Neuroscience*, 16(7), pp.824–831.

13. Caviness, V S, 1975. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *The Journal of comparative neurology*, 164(2), pp.247–63.
14. Caviness, Verne S, 1980. Tang en t i al Organization of Thalamic Projections to the Neocortex in the Mouse. , 367.
15. Chen, G. et al., 2013. How vision and movement combine in the hippocampal place code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), pp.378–83.
16. Chen, T.-W. et al., 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), pp.295–300.
17. Constantinople, C.M. & Bruno, R.M., 2013. Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6140), pp.1591–4.
18. Cudeiro, J. & Sillito, A.M., 2006. Looking back: corticothalamic feedback and early visual processing. *Trends in neurosciences*, 29(6), pp.298–306.
19. Dacey, D.M., 2000. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annual review of neuroscience*, 23, pp.743–75.
20. Dale Purves (2004). *Neuroscience*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, United States: Sinauer Associates. 236-240.
21. Dombeck, D. a et al., 2007. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron*, 56(1), pp.43–57.
22. Dombeck D a, Graziano MS, Tank DW (2009) Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13751–13760.
23. Dräger, U. (1975). Receptive fi elds of single cells and topography in mouse visual cortex. *Comp. Neurol.* 160(3): 269–290.
24. Dräger, U.C. & Olsen, J.F., 1980. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *The Journal of comparative neurology*, 191(3), pp.383–412.
25. Dreher, B. et al., 1985. The Morphology, Number, Distribution and Central



- Projections of Class I Retinal Ganglion Cells in Albino and Hooded Rats (Part 1 of 3). *Brain, Behavior and Evolution*, 26(1), pp.10–22.
26. Ekstrand, M.I., Enquist, L.W. & Pomeranz, L.E., 2008. The alpha-herpesviruses: molecular pathfinders in nervous system circuits. *Trends in molecular medicine*, 14(3), pp.134–40.
  27. Gallego, a, 1971. Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision research, Suppl 3*, pp.33–50.
  28. Gao, E., Deangelis, G.C. & Burkhalter, A., 2010. Parallel Input Channels to Mouse Primary Visual Cortex. , 30(17), pp.5912–5926.
  29. Gattermann, R. et al., 2008. Golden hamsters are nocturnal in captivity but diurnal in nature. , (April), pp.253–255.
  30. Gianfranceschi, L., Fiorentini, A. & Maffei, L., 1999. Behavioural visual acuity of wild type and bcl 2 transgenic mouse. , 39, pp.569–574.
  31. Green, D.M. & Swets, J.A. *Signal Detection Theory and Psychophysics* (Wiley, New York, 1966).
  32. Grubb, M.S. & Thompson, I.D., 2003. Quantitative characterization of visual response properties in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of neurophysiology*, 90(6), pp.3594–607.
  33. Harvey, C.D. et al., 2009. Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature*, 461(7266), pp.941–946.
  34. Heintz, N., 2001. BAC to the future: the use of BAC transgenic mice. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(December), pp.1–10.
  35. Hofbauer, A. & Drager, U.C., 1985. Depth Segregation of Retinal Ganglion Cells Projecting to Mouse Superior Colliculus. *The Journal of comparative neurology*, 474, pp.465–474.
  36. Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow DK, Chuckowree J, De Paola V, Hofer SB, Hübener M, Keck T, Knott G, Lee W-C a, Mostany R, Mrsic-Flogel TD, Nedivi E, Portera-Cailliau C, Svoboda K, Trachtenberg JT, Wilbrecht L (2009) Long-term,

high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window.  
Nature protocols 4:1128–1144.

37. Hölscher, C. et al., 2005. Rats are able to navigate in virtual environments. *The Journal of experimental biology*, 208(Pt 3), pp.561–9.
38. Histed MH, Carvalho L a, Maunsell JHR (2012) Psychophysical measurement of contrast sensitivity in the behaving mouse. *Journal of neurophysiology* 107:758–765.
39. Hubel, D. H., Wiesel, T. N., and Stryker, M. P. (1978). Anatomical demonstration of orientation columns in macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 177(3):361–380.
40. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. (1961). Integrative action in the cat's lateral geniculate body. *J. Physiol.* 155:385–398.
41. Hübener, M., 2003. Mouse visual cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), pp.413–420.
42. Huberman, A.D. & Niell, C.M., 2011. What can mice tell us about how vision works? *Trends in neurosciences*, 34(9), pp.464–73
43. Hut, R.A. et al., 2011. Working for Food Shifts Nocturnal Mouse Activity into the Day. , 6(3), pp.1–6.
44. Hyde, L. a & Denenberg, V.H., 1999. BXSB mice can learn complex visual pattern discriminations. *Physiology & behavior*, 66(3), pp.437–9.
45. Hynie S (2007) Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of sprague-dawley and lewis rats. :83–94.
46. Jeon, C., Strettoi, E. & Masland, R.H., 1998. The Major Cell Populations of the Mouse Retina. , 18(21), pp.8936–8946.
47. Keller GB, Bonhoeffer T, Hübener M (2012) Sensorimotor mismatch signals in primary visual cortex of the behaving mouse. *Neuron* 74:809–815.
48. Kelly, R.M. & Strick, P.L., 2000. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. , 103, pp.63–71.
49. Kepler, J., 1604. *Ad Vitellionem*, Frankfurt: Marnium and Haez.
50. Kispert, A.; Gossler, A. (2004). *The Laboratory Mouse*. Waltham, Massachusetts: Academic Press Inc. 185.

51. Kuffler, S.W., 1953. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of neurophysiology*, 16(1), pp.37–68.
52. Kühn R.; Torres R. M. (2002). *Transgenesis Techniques*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press. 175-204.
53. Lee YJ, Choi B, Lee EH, Choi KS, Sohn S (2006) Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex. *Neuroscience letters* 392:27–31.
54. Leicester, J. & Stone, J., 1967. Ganglion, amacrine and horizontal cells of the cat's retina. *Vision Res.* Sep;7(9):695–705.
55. Levy, O. et al., 2007. THE RELATIONSHIP BETWEEN THE GOLDEN SPINY MOUSE CIRCADIAN SYSTEM AND ITS DIURNAL ACTIVITY : , 24(4), pp.599–613
56. Lin, L. et al., 2006. Large-scale neural ensemble recording in the brains of freely behaving mice. , 155, pp.28–38.
57. Mangini, N. J., and Pearlman, A. L. (1980). Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 193(1):203–222.
58. Marler, P., 2005. Ethology and the origins of behavioral endocrinology. *Hormones and behavior*, 47(4), pp.493–502.
59. Marshel, J.H. et al., 2010. Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron*, 67(4), pp.562–74.
60. Merigan, W. H., and Maunsell, J. H. (1993). How parallel are the primate visual pathways? *Annu. Rev. Neurosci.* 16:369–402.
61. Moriyoshi, K. et al., 1996. Using Adenoviral Gene Transfer of Membrane-Targeted GFP. , 16, pp.255–260.
62. Munk, H., 1881. *Über die Funktionen der Grosshirnrinde*, Berlin: Hirschwald.
63. Niell, C.M. & Stryker, M.P., 2008. Highly Selective Receptive Fields in Mouse Visual Cortex. , 28(30), pp.7520–7536.
64. Nikonov, S.S. et al., 2006. Physiological Features of the S- and M-cone Photoreceptors of Wild-type Mice from Single-cell Recordings. , 127(4), pp.359–

374.

65. Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Oxford: Academic Press.
66. Piscopo, D.M. et al., 2013. Diverse Visual Features Encoded in Mouse Lateral Geniculate Nucleus. , 33(11), pp.4642–4656.
67. Provencio, I., Cooper, H.M. & Foster, R.G., 1998. Retinal Projections in Mice With Inherited Retinal Degeneration : , 439(January 1997), pp.417–439.
68. Prusky, G T, Reidel, C. & Douglas, R M, 2000b. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. Behavioural brain research, 114(1-2), pp.11–5.
69. Prusky, G T, West, P.W. & Douglas, R M, 2000a. Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. Vision research, 40(16), pp.2201–9.
70. Prusky, Glen T et al., 2004. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. Investigative ophthalmology & visual science, 45(12), pp.4611–6.
71. Ravassard, P. et al., 2013. Multisensory Control of Hippocampal Spatiotemporal Selectivity. Science (New York, N.Y.), 1342.
72. Remtulla, S., 1985. A schematic eye for the mouse , comparisons with the rat. , 25, pp.21–31.
73. Ricart-Jan[eacute] D, Rodr[iacute]guez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, L[oacute]pez-Tejero MD, Llobera M (2002) Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. Metabolism 51:925–931.
74. Schiller, P. H., J. H. Sandell and J. H. R. Maunsell (1986) Functions of the “on” and “off” channels of the visual system. Nature 322: 824–825.
75. Schultze, M., 1866. Zur Anatomie und Physiologie der Retina, Arch. Mikro Anat., 2:175–286.
76. Siegle, J.H. et al., 2011. Chronically Implanted Hyperdrive for Cortical Recording and Optogenetic Control in Behaving Mice. , pp.7529–7532.

77. Soucy, E. et al., 1998. A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron*, 21(3), pp.481–93.
78. Stryer, L., 1986. Cyclic GMP Cascade of Vision. *Annual Review of Neuroscience*, 9(1), pp.87–119.
79. Ung, K. & Arenkiel, B.R., 2012. Fiber-optic Implantation for Chronic Optogenetic Stimulation of Brain Tissue. , (October), pp.1–6.
80. Wade, N.J. & Finger, S., 2001. The eye as an optical instrument: from camera obscura to Helmholtz's perspective. *Perception*, 30(10), pp.1157–1177.
81. Wagor, E., Mangini, N.J. & Pearlman, A.L., 1980. Retinotopic Organization of Striate and Extrastriate Visual Cortex in the Mouse. , 202, pp.187–202.
82. Wang, Q. & Burkhalter, A., 2007. Area Map of Mouse Visual Cortex. , 357(October 2006), pp.339–357.
83. Wässle, H., 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(10), pp.747–57.
84. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1966). Spatial and chromatic interactions in the lateral geniculate body of the rhesus monkey *J. Neurophysiol.* 29:1115–1156.
85. Wimer, R., and Weller, S. (1965). Evaluation of a visual discrimination task for the analysis of the genetics of a mouse behavior. *Percept. Mot. Skills* 20:203–208.
86. Yerkes, R. M. (1907). *The dancing mouse*. New York: Arno Press.
87. *Zornetzer, S., 1970. BRIEF COMMUNICATION A Simple and Reliable Chronic Brain Implantation Technique for the Mouse', 5(220), pp.1197–1199.*