



VYBRANÉ METODY VE VÝZKUMU CHOVÁNÍ

Jan Svoboda

VZTAH MEZI VÝZKUMEM PAMĚTI A CHOVÁNÍM

- Mnohaúrovňový výzkum paměti
 - Chování jedince – přirozené, v behav. testech
 - Chování neuronální sítě – LFP, PET, fMRI, EEG
 - Chování neuronu – extra-, intra-celulárně
 - Děje na synapsi – např. LTP
- Sledování korelací mezi jednotlivými úrovněmi
- Korelace ale nemusí znamenat kauzalitu
- Tu lze zjistit kontrolovanými změnami parametrů a pečlivou volbou kontrolních skupin/podmínek



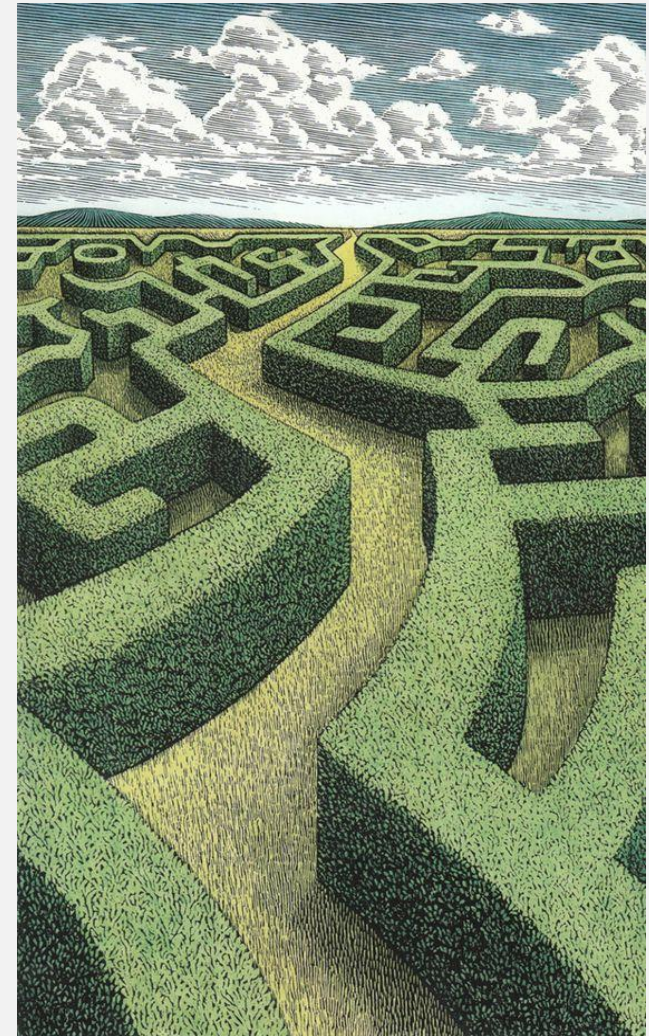
VZTAH MEZI VÝZKUMEM PAMĚTI A CHOVÁNÍM

- Mnohaúrovňový výzkum paměti
 - Chování jedince – přirozené, v behav. testech
 - Chování neuronální sítě – LFP, PET, fMRI, EEG
 - Chování neuronu – extra-, intra-celulárně
 - Děje na synapsi – např. LTP
- Sledování korelací mezi jednotlivými úrovněmi
- Korelace ale nemusí znamenat kauzalitu
- Tu lze zjistit kontrolovanými změnami parametrů a pečlivou volbou kontrolních skupin/podmínek



PŘEHLED BEHAVIORÁLNÍCH TESTŮ

- **Úzkost**
 - Otevřené pole, Vyvýšené křížové bludiště, Kruhové bludiště, Test světlo-tma
- **Pozornost**
 - Prepulzní inhibice, Test reakčního času s pěti výběry
- **Paměť**
 - Prostorová
 - Radiální bludiště, + a Y bludiště, Morrisovo vodní bludiště, Bludiště Barnesové
 - Objektová
 - Rozpoznání nového objektu
 - Sociální
 - Tříkomorový test
 - Strachová
 - Strachové podmiňování
 - Operantní podmiňování
 - Touch screen aparatury



TESTY ÚZKOSTI



test otevřeného pole



test světlo-tma

TESTY ÚZKOSTI



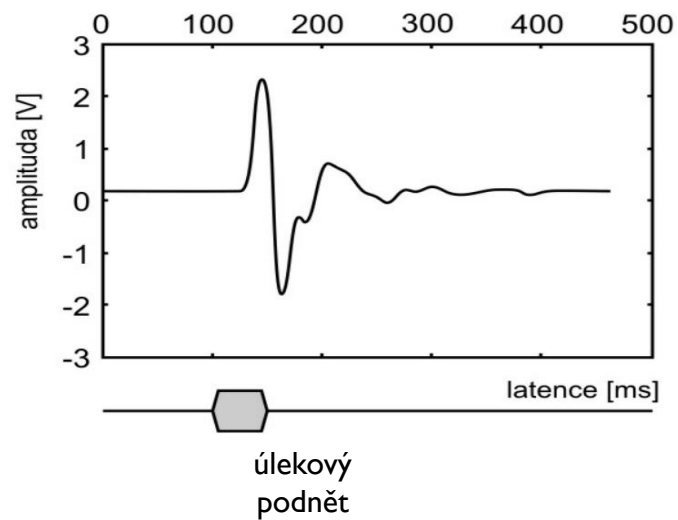
kruhové vyvýšené bludiště



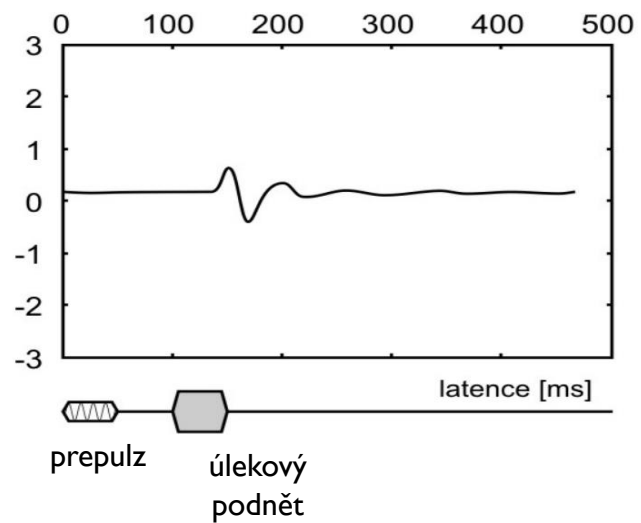
křížové vyvýšené bludiště

TESTY POZORNOSTI

ÚLEKOVÁ REAKCE



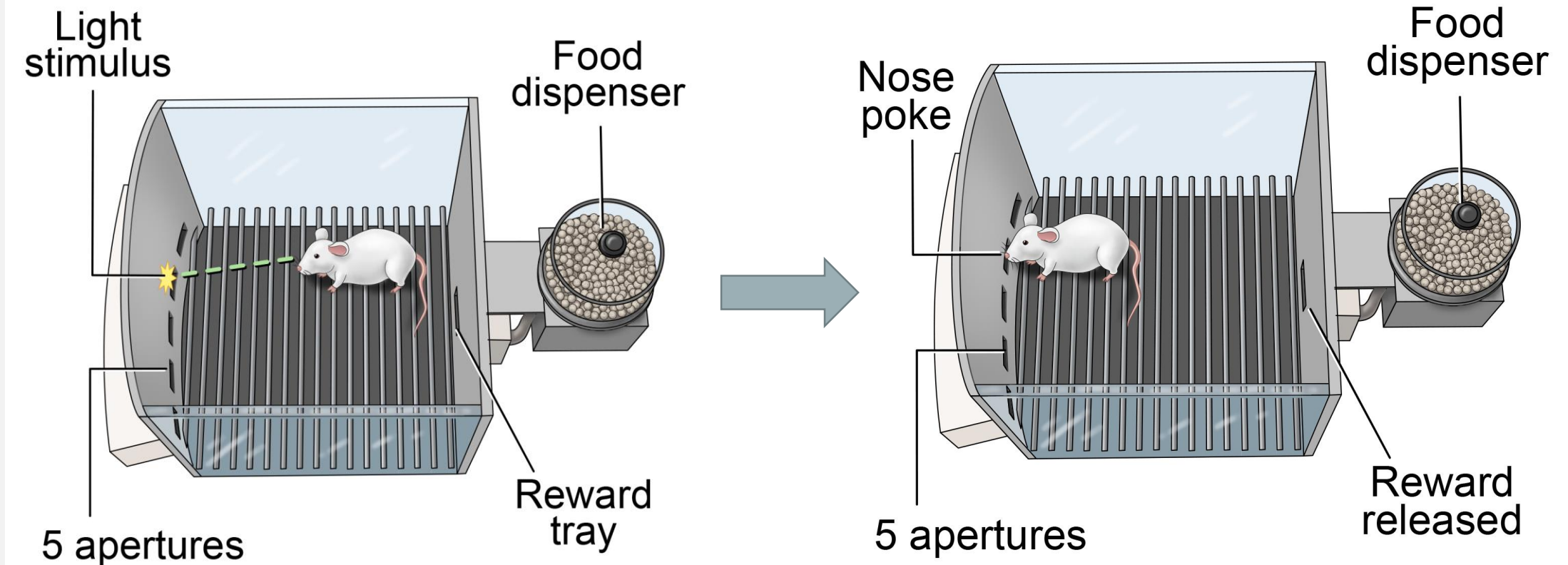
PREPULZNÍ INHIBICE



test prepulzní inhibice úlekové reakce

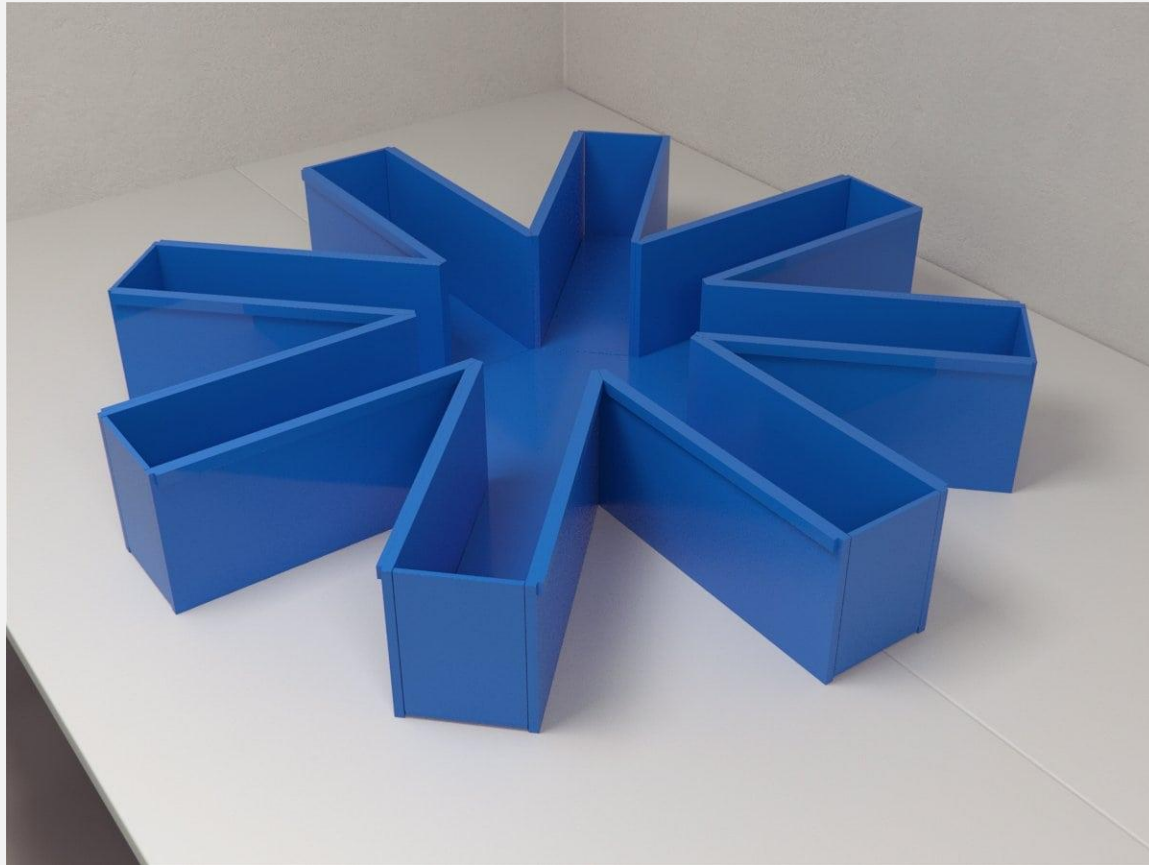


TESTY POZORNOSTI



test reakčního času s pěti výběry (5-choice serial reaction task)

PAMĚŤOVÉ TESTY – APETITIVNÍ



radiální bludiště



Y bludiště

PAMĚŤOVÉ TESTY – AVERZIVNÍ



klasické Morrisovo vodní bludiště



vodní bludiště ve tvaru T

PAMĚŤOVÉ TESTY – AVERZIVNÍ



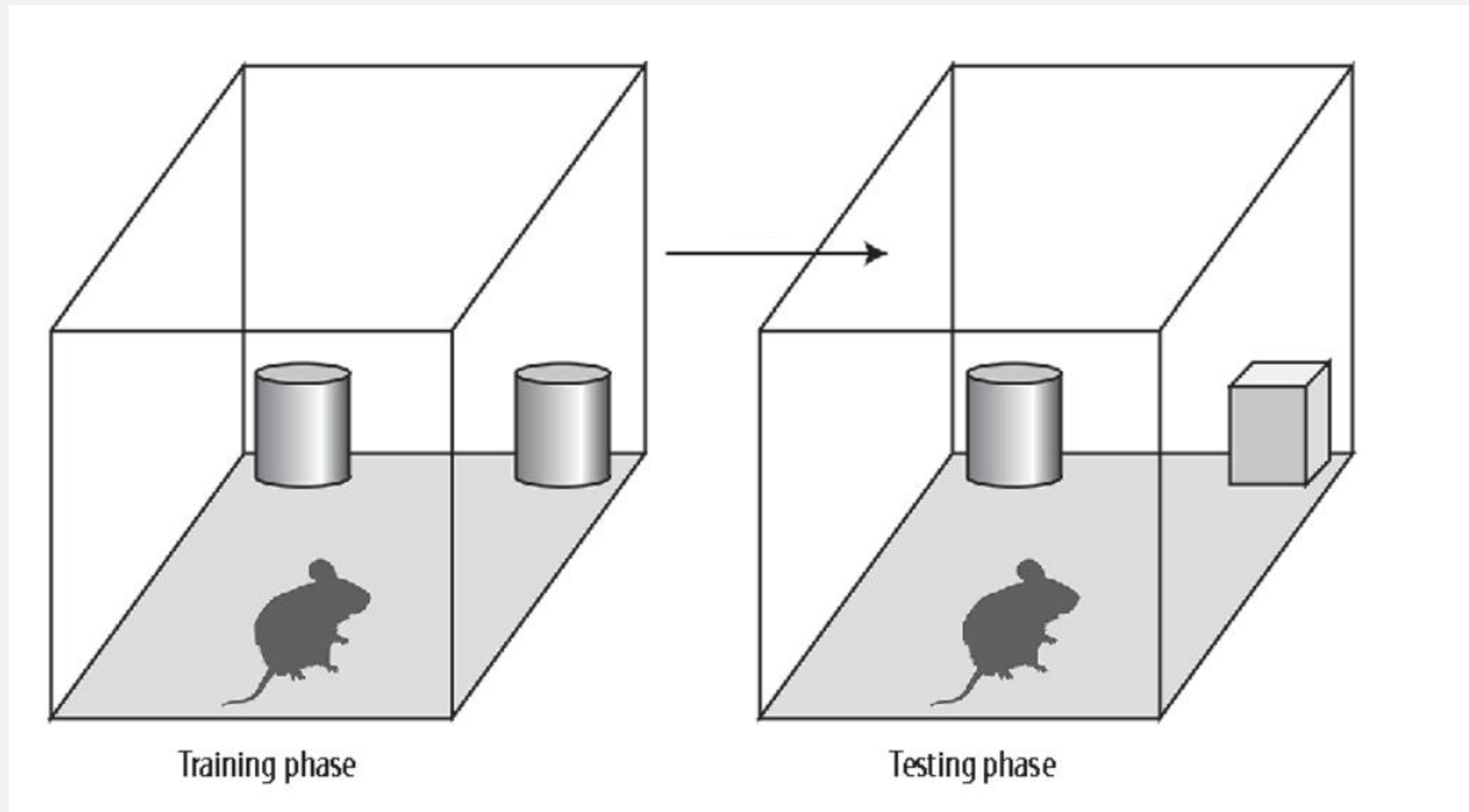
křížovatkové bludiště – Khazal maze

PAMĚŤOVÉ TESTY – AVERZIVNÍ



bludiště Barnesové

PAMĚŤOVÉ TESTY – EXPLORAČNÍ



test rozpoznání nového objektu

PAMĚŤOVÉ TESTY – EXPLORAČNÍ



tříkomorový test

- test sociability (objekt vs. zvíře)
- test sociálního rozpoznání (známé vs. neznámé zvíře)

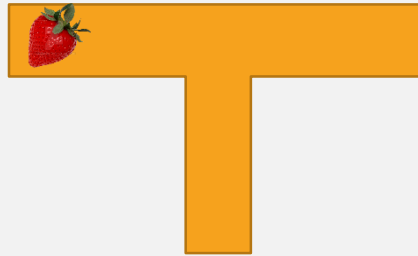
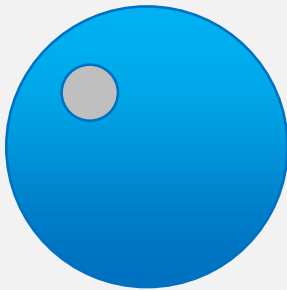
FLEXIBILITA PAMĚTI

- často označována jako behaviorální či **kognitivní flexibilita**
- když naučený behaviorální vzorec nevede ke kýženému výsledku
- definice: adaptivní změna v chování zvířete v reakci na změnu kontingence podnětu a posílení (reinforcer)
- 2 procesy
 - potlačení staré odpovědi
 - nalezení nového řešení
- mezi flexibilitu patří i pouhá extinkce – vyhasínání odpovědi, když není posilována
- 2 typy flexibility
 - **přeučování (reversal)**
 - **změna pozornostních setů (attentional set-shifting)**

KOGNITIVNÍ FLEXIBILITA

přeučování (reversal)

- původně neodměňovaný podnět (objekt, místo, činnost) se stává odměňovaný
- $A^+ \rightarrow A$ $B \rightarrow B^+$

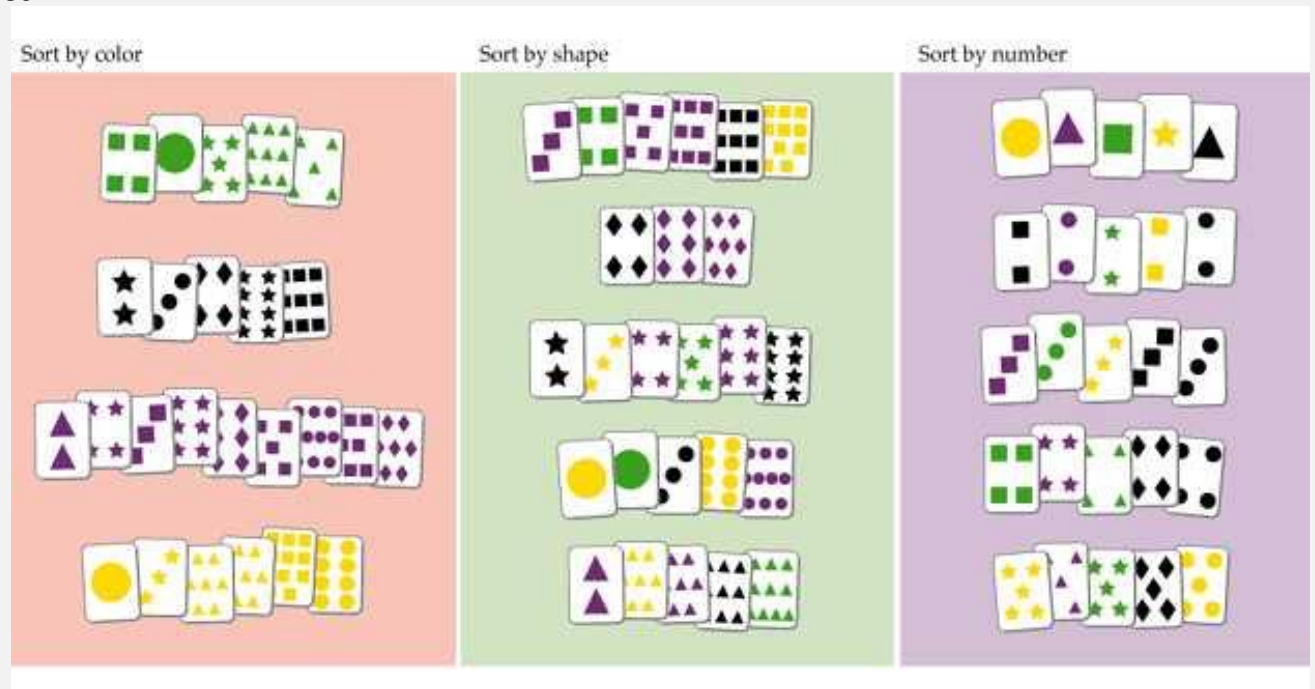


- při asociativním učení se vytváří vazba pozornosti s asociovaným podnětem, ostatní podněty bývají potlačeny. Proto se při přeučování můžeme setkat s těmito jevy:
 - Blokování (blocking): $A \rightarrow A^+$, $AB \rightarrow AB^+$, $B \rightarrow$ žádná asociace
 - Přehlížení (overshadowing): $AB \rightarrow AB^+$, menší asociace pro B než při $B \rightarrow B^+$
 - Latentní inhibice: $A \rightarrow A$; hůře se pak učí $A \rightarrow A^+$

KOGNITIVNÍ FLEXIBILITA

Změna pozornostních setů (set-shifting)

- Wisconsinský test třídění karet
- odměna se po určité době pojí s odlišným pozornostním setem
- testuje tedy schopnost překonat pozornostní set
- pozornostní sety se zpravidla vyskytují v různých „dimenzích“
- Wisconsinské třídění karet má tři dimenze
- pozornostní set je typem mentálního setu



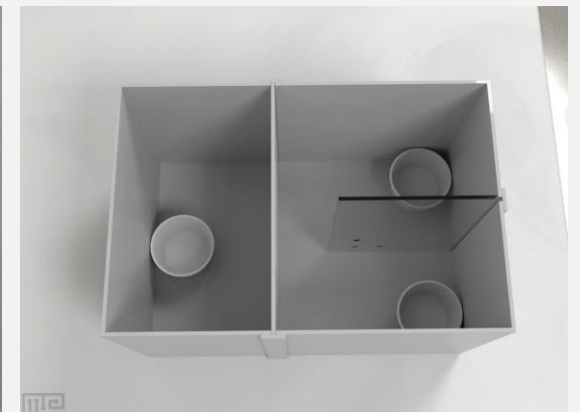
MENTÁLNÍ SETY

- naučené kognitivní vzorce, které ovlivňují následné cílené chování (čili způsob, jak selektivně vnímáme realitu; jak si ji účelově redukuje)
- součást **učení založeného na modelu** (model-based learning)
vytváření reprezentací prostředí, očekávání, predikcí
- mentální sety nám do jisté míry brání ve flexibilní změně chování

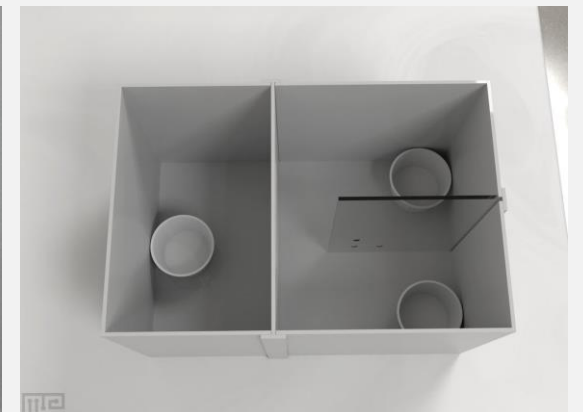


KOGNITIVNÍ FLEXIBILITA

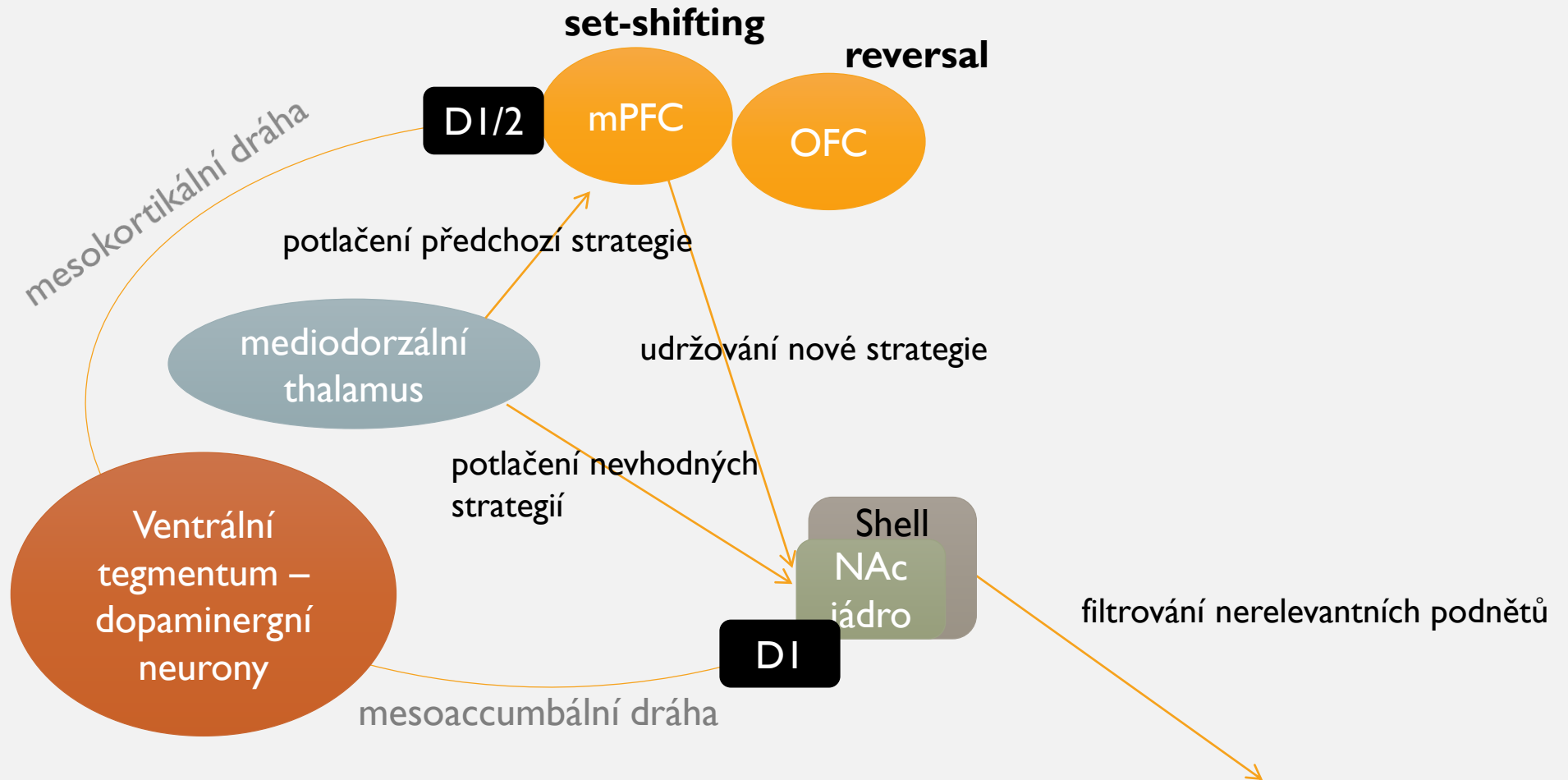
- standardizovaný soubor kognitivních testů Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB)
- intradimensional/extradimensional task (ID/ED test) – obsahuje reversal i set-shifting; uzpůsobený pro lidské subjekty a pro primáty
- analog pro hlodavce – pozornostní set-shifting úloha (ASST) dle Birrell a Brown (2000)
- odměna zahrabaná v misce
- dva sety podnětů (2 smyslové modality/dimenze)
 - **vůně** (bazalka, citrón, šeřík...)
 - **hrbací médium** (piliny, vata, papír...)



rozlišování (discrimination)	relevantní dimenze	irelevantní dimenze	odměňovaná kombinace	neodměňovaná kombinace
jednoduché	vůně		bazalka	libeček
složené	vůně	médium	bazalka/papír bazalka/piliny	libeček/papír libeček/piliny
reversal 1	vůně	médium	libeček/papír libeček/piliny	bazalka/papír bazalka/piliny
změna v rámci dimenze (intra-dimensional shift)	vůně	médium	oregano/písek oregano/hobliny	citron/písek citron/hobliny
reversal 2	vůně	médium	citron/písek citron/hobliny	oregano/písek oregano/hobliny
změna mimo dimenzi (extra-dimensional shift)	médium	vůně	polystyren/česnek polystyren/růže	guma/česnek guma/růže
reversal 3	médium	vůně	guma/česnek guma/růže	polystyren/česnek polystyren/růže

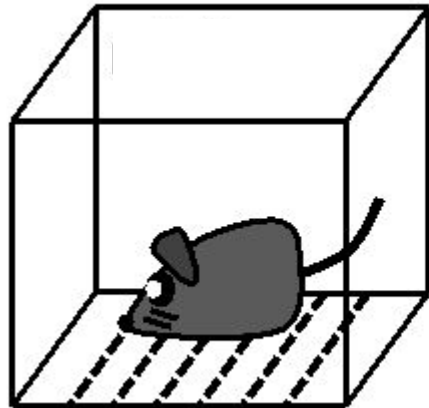


NEUROANATOMIE BEHAVIORÁLNÍ FLEXIBILITY

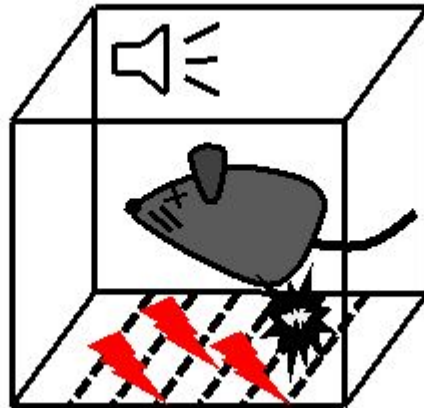


STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ

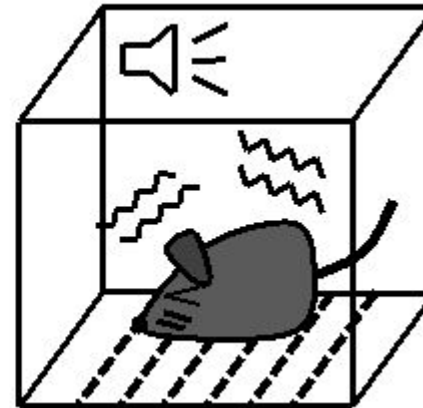
habituační



učení



test

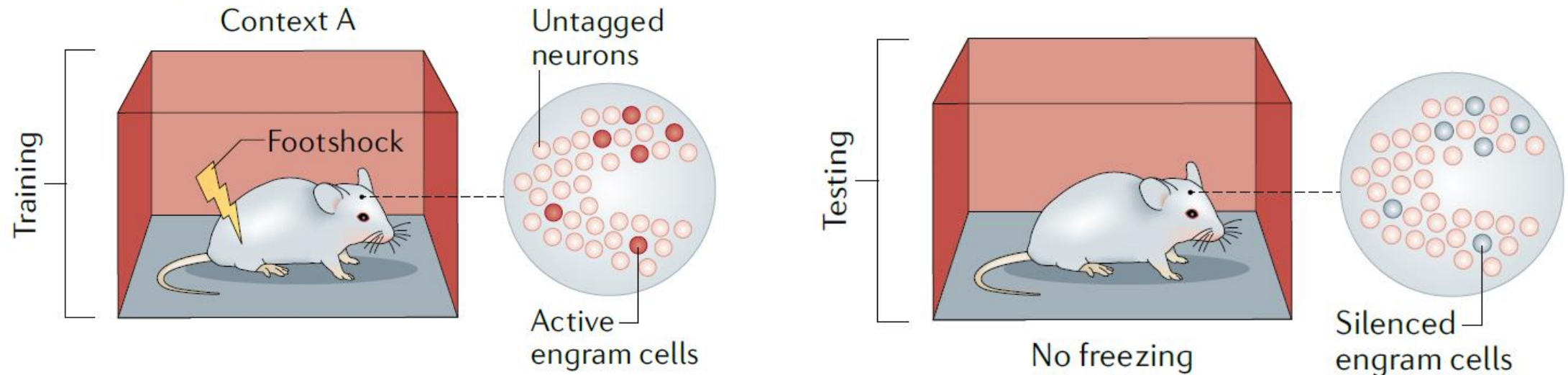


podmíněný podnět – zvuk
nepodmíněný podnět – šok

Podmíněná
odpověď - freezing

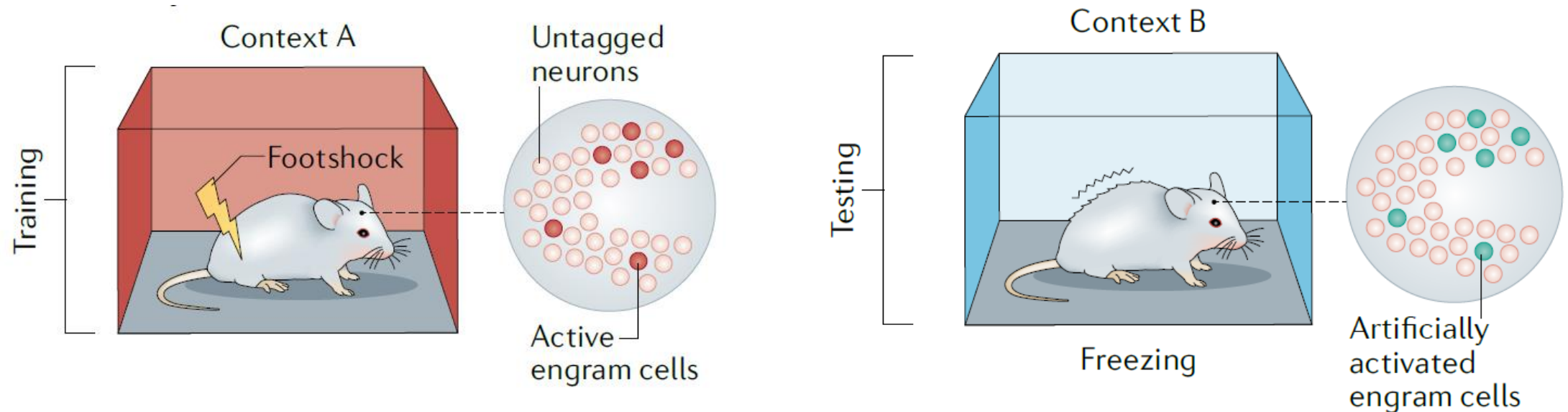
STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM

- taggování engramových neuronů – označení neuronů, které jsou aktivní během vytváření strachové vzpomínky
- využití exprese raného genu c-fos
- pod jeho promotorem může být exprimována např. fluorescenční barvička
- a/nebo např. archeorhodopsin, což je světločivný kanál (protonová pumpa), jehož aktivace způsobí hyperpolarizaci neuronu
- světlem pak dokážeme engram vypnout

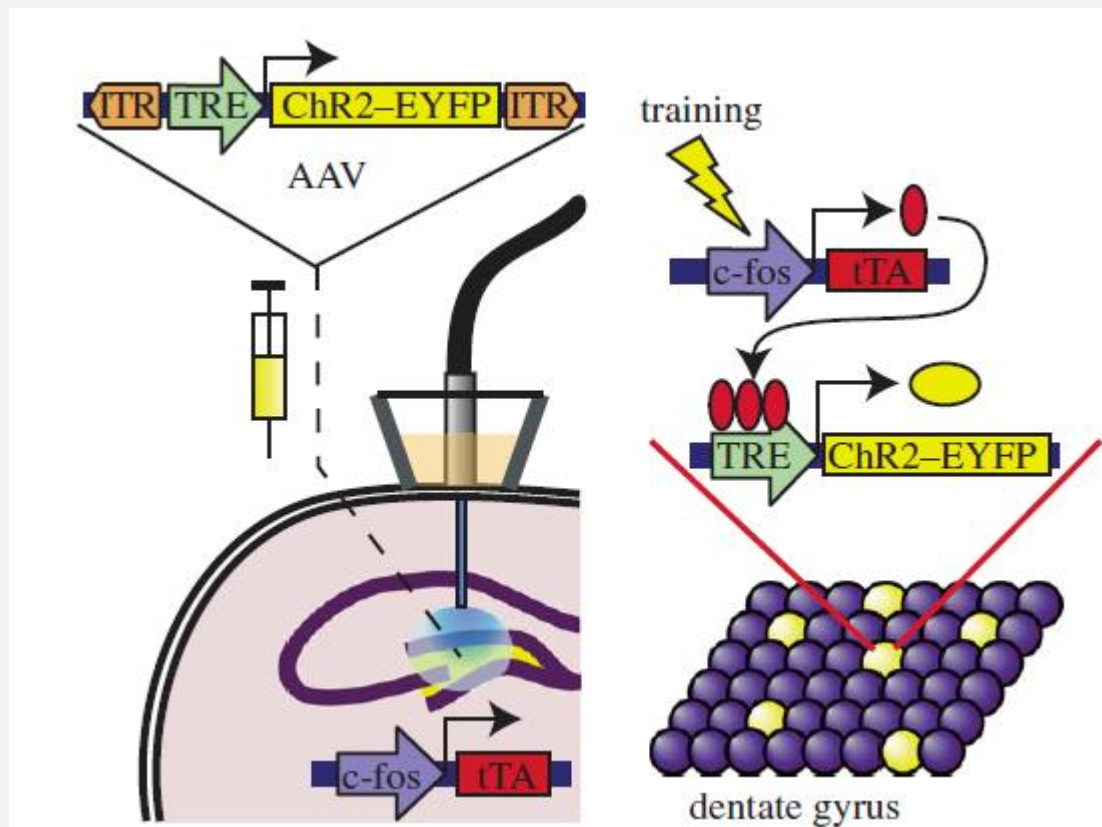


STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM

- taggování engramových neuronů – označení neuronů, které jsou aktivní během vytváření strachové vzpomínky
- využití exprese raného genu c-fos
- pod jeho promotorem může být exprimována např. fluorescenční barvička
- a/nebo např. channelrhodopsin2, což je světločivný kanál, jehož aktivace způsobí depolarizaci neuronu
- světlem pak dokážeme engram aktivovat a vyvolat ve zvířeti vzpomínku i mimo původní kontext



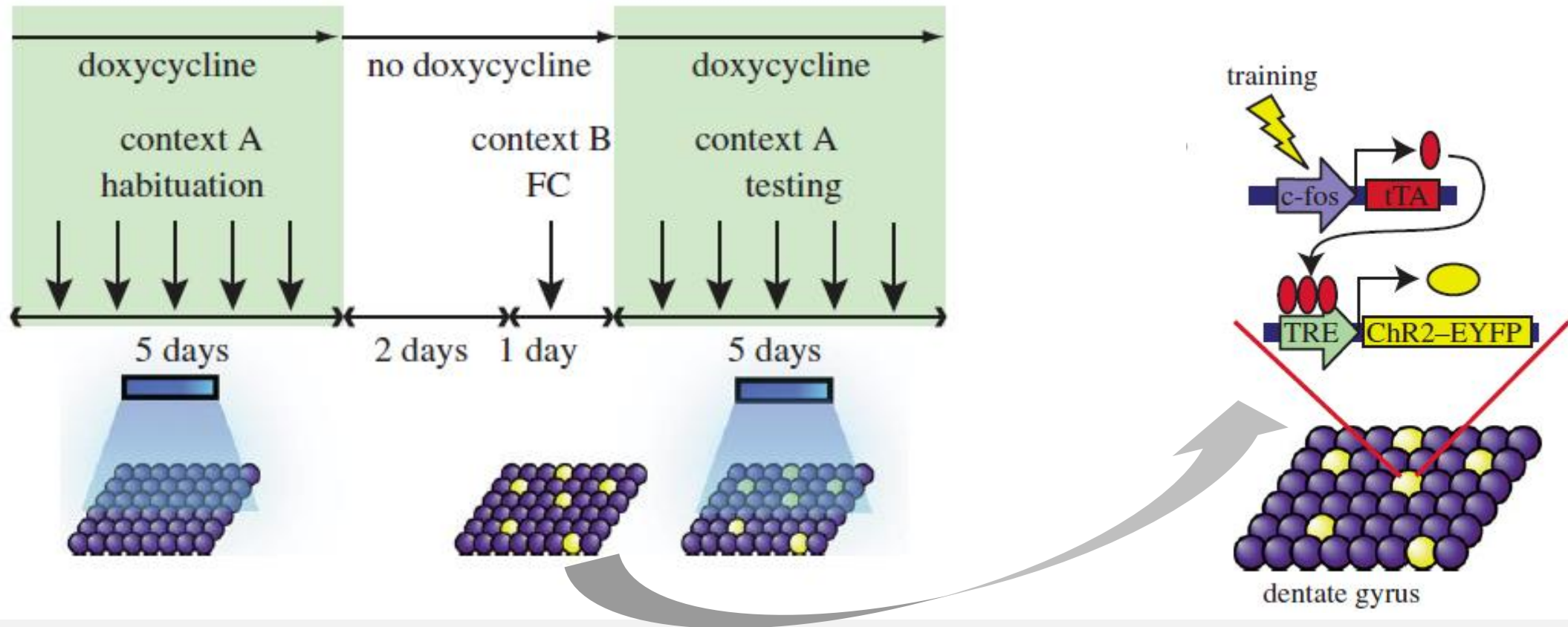
STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



Liu et al 2012

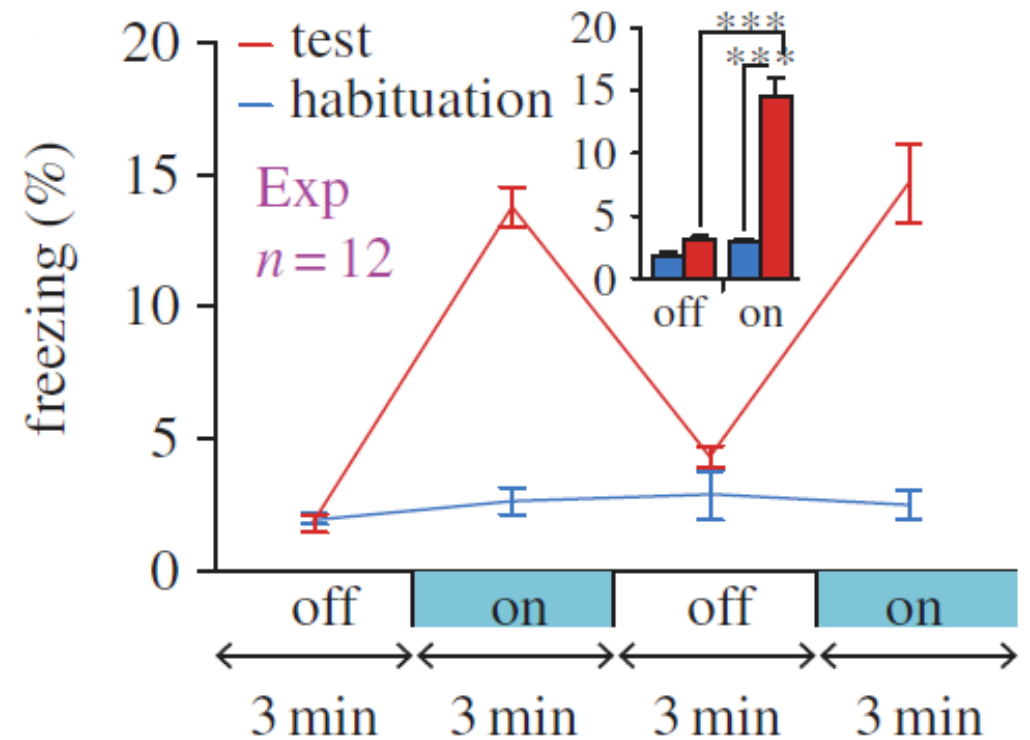
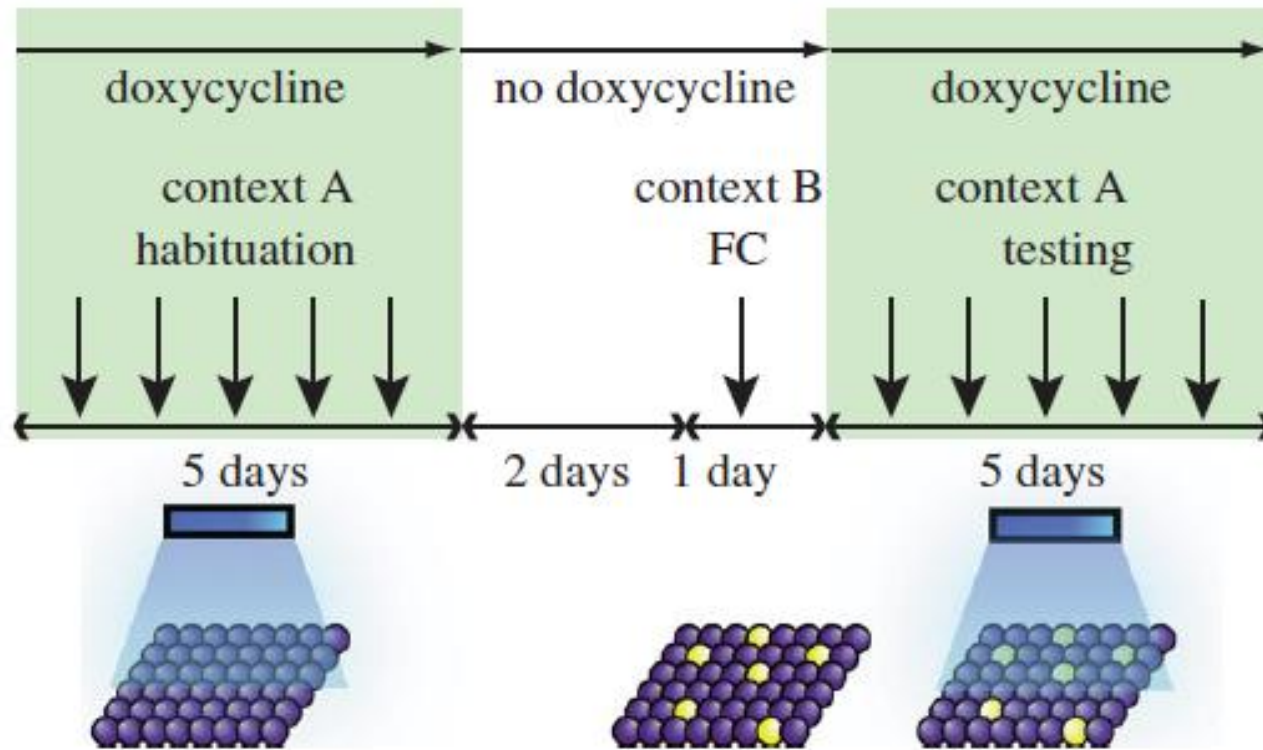
- Transgenní myš s genem pro tetracyklin-aktivátor (tTA) pod promotorem c-fos.
- Injekce adeno-asociovaného viru, který nese gen pro tetracyklin-response element (TRE), Channelrhodopsin 2 (ChR2) a žlutý fluorescenční protein (EYFP); vir transfekuje všechny neurony v gyrus dentatus
- Doxycyklin přítomen → inhibuje expresi tTA → inhibice exprese ChR2 + EYFP
- Doxycyklin není přítomen → exprese tTA v c-fos aktivovaných neuronech → vazba na TRE umožní expresi ChR2 + EYFP
- Strachové podmiňování vyvolá aktivitu cca 2-4% granulárních neuronů v gyrus dentatus → exprese c-fos → exprese ChR2 + EYFP
- Ve výsledku nesou všechny neurony aktivované během podmiňování Channelrhodopsin 2 (ChR2) a žlutý fluorescenční protein (EYFP)

STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



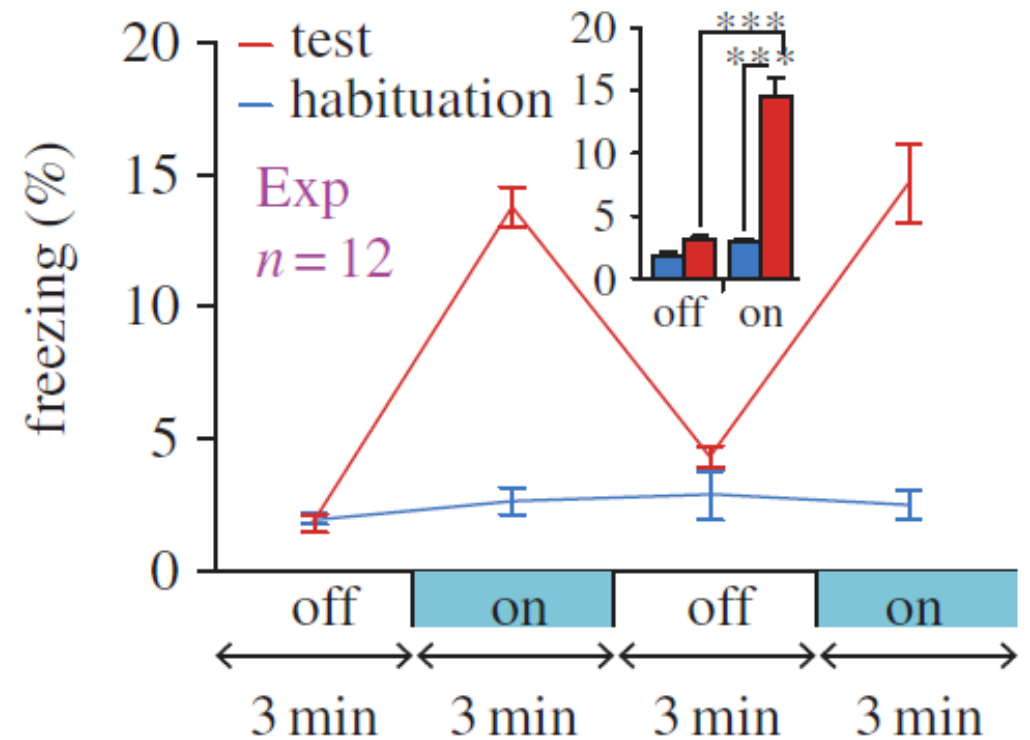
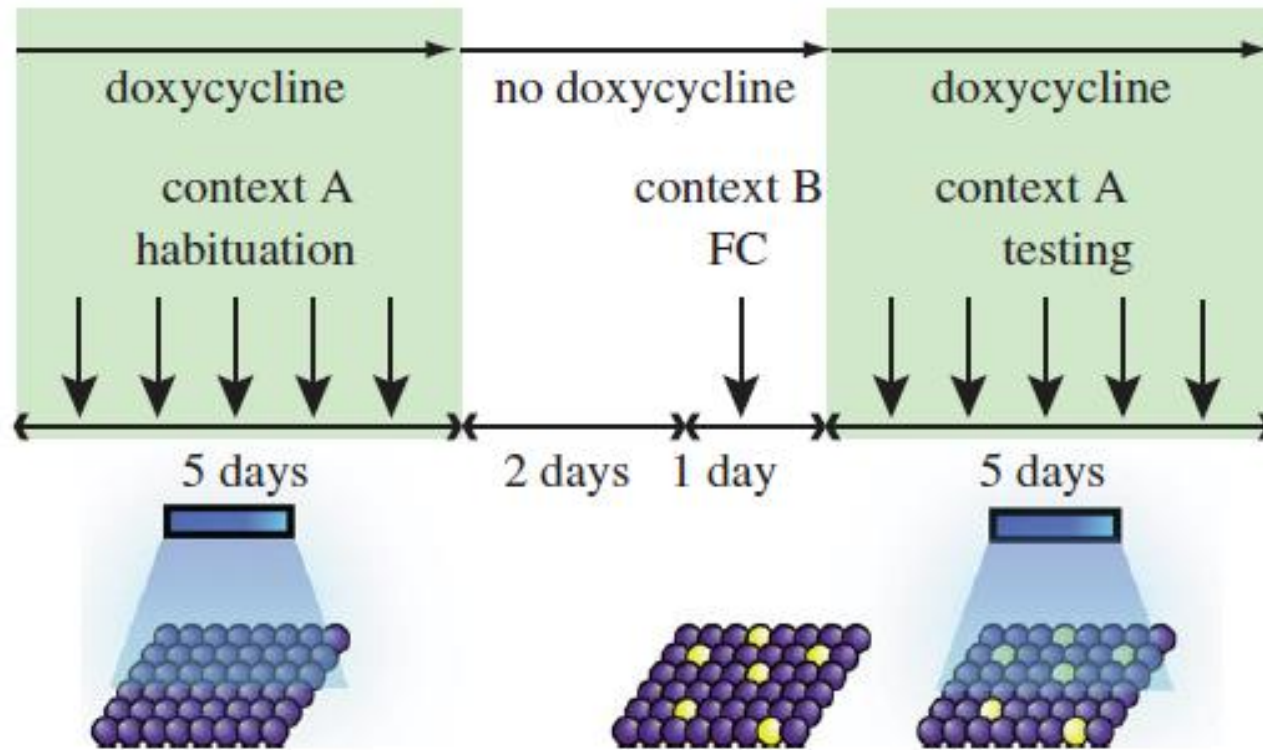
- Při habituaci nemá stimulace modrým světlem žádný efekt
- Zvíře si vytvoří strachovou vzpomínku v kontextu B, která se ale nepřenesle do kontextu A
- Stimulace modrým světlem ale otevře ChR2 kanál, dojde k aktivaci neuronu a tedy vybavení strachové vzpomínky i v kontextu A

STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



- Při habituaci nemá stimulace modrým světlem žádný efekt
- Zvíře si vytvoří strachovou vzpomínku v kontextu B, která se ale nepřenesla do kontextu A
- Stimulace modrým světlem ale otevře ChR2 kanál, dojde k aktivaci neuronu a tedy vybavení strachové vzpomínky i v kontextu A

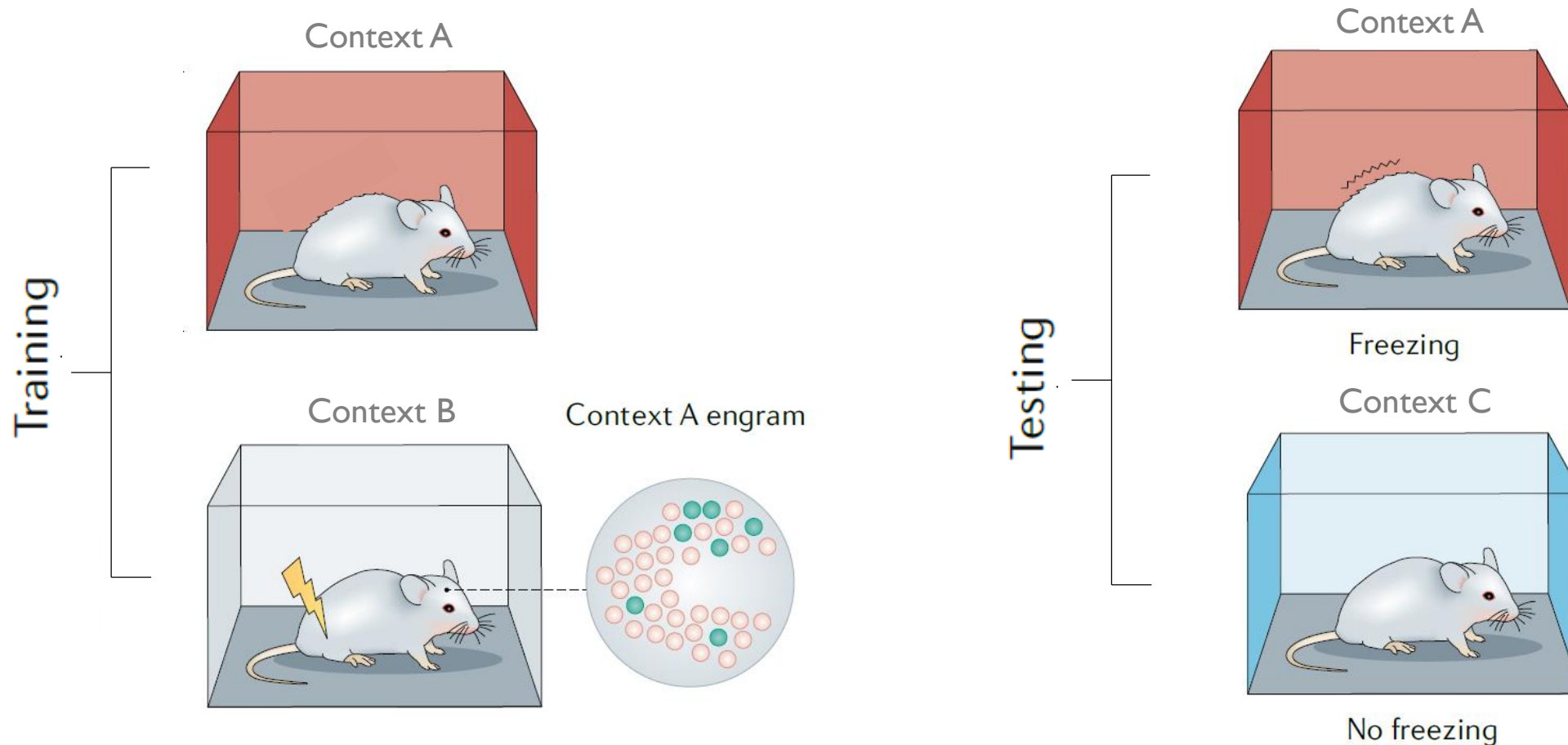
STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



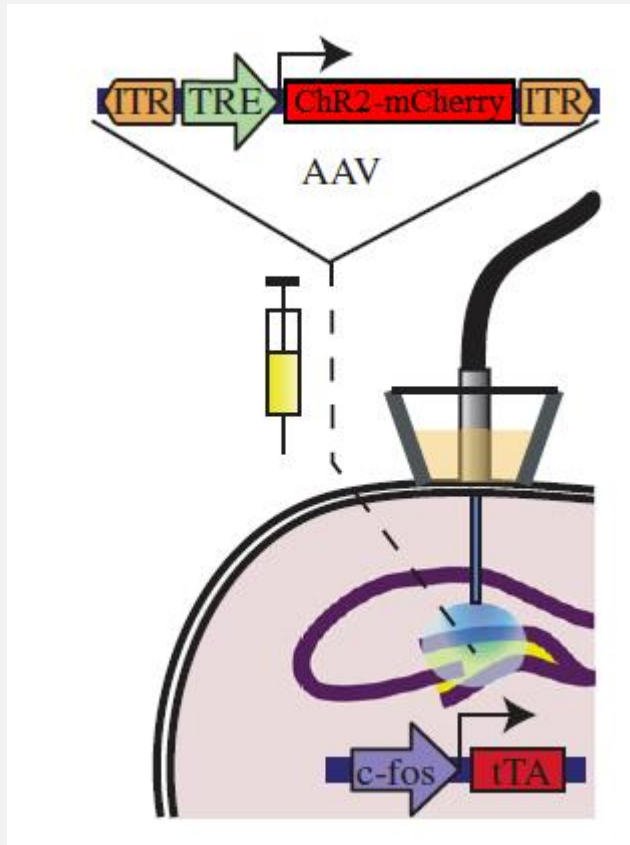
- Závěr: Dokážeme uměle reaktivovat vzpomínku, aniž bychom zvíře vystavili původnímu kontextu ...aneb „rozsvítilo se mi“ zde dostává v souvislosti s pamětí nový rozměr...

STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM

- reaktivace engramu neutrální vzpomínky v kontextu averzivní události může vést k implementaci „falešné paměti“



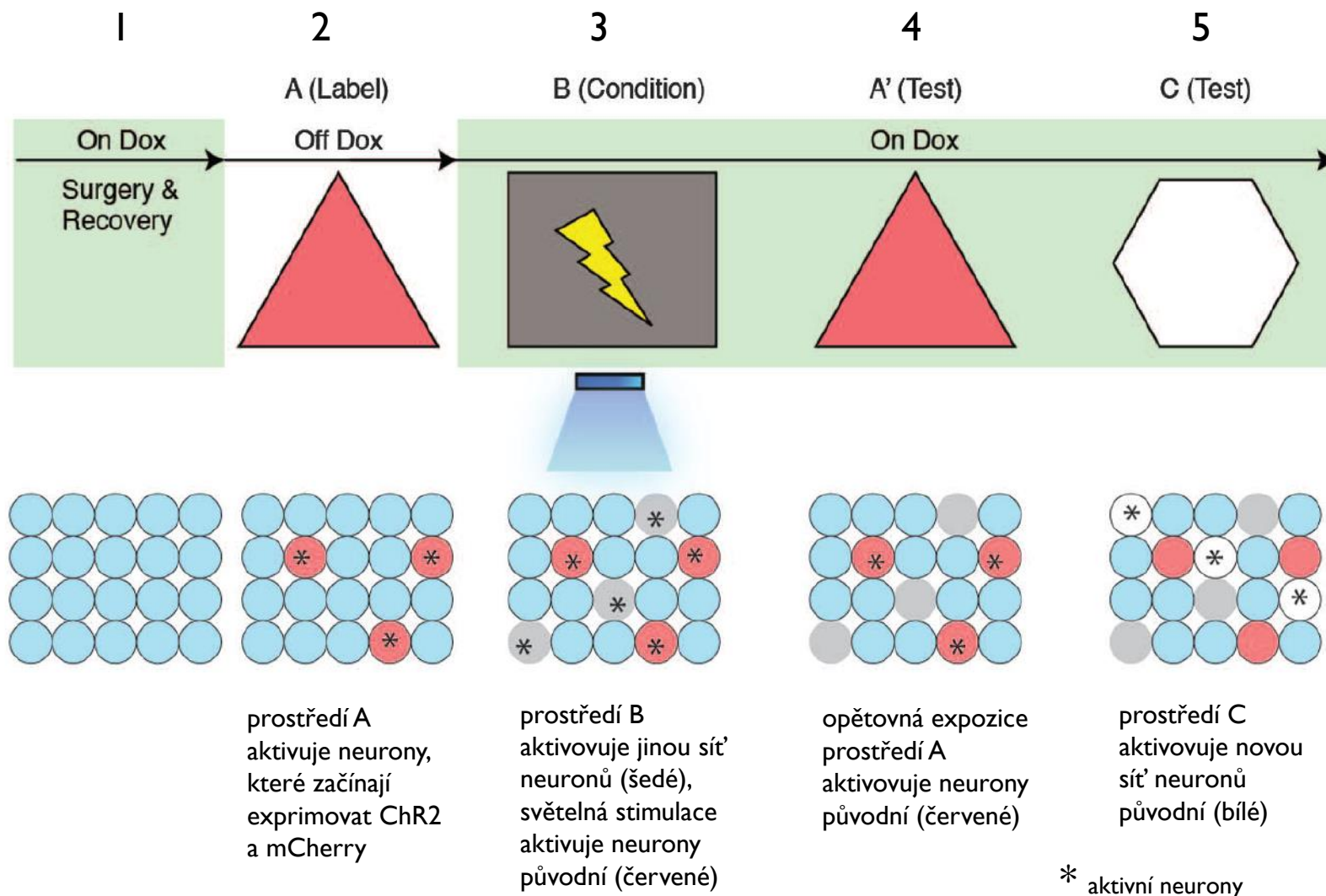
STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



Ramirez et al 2013

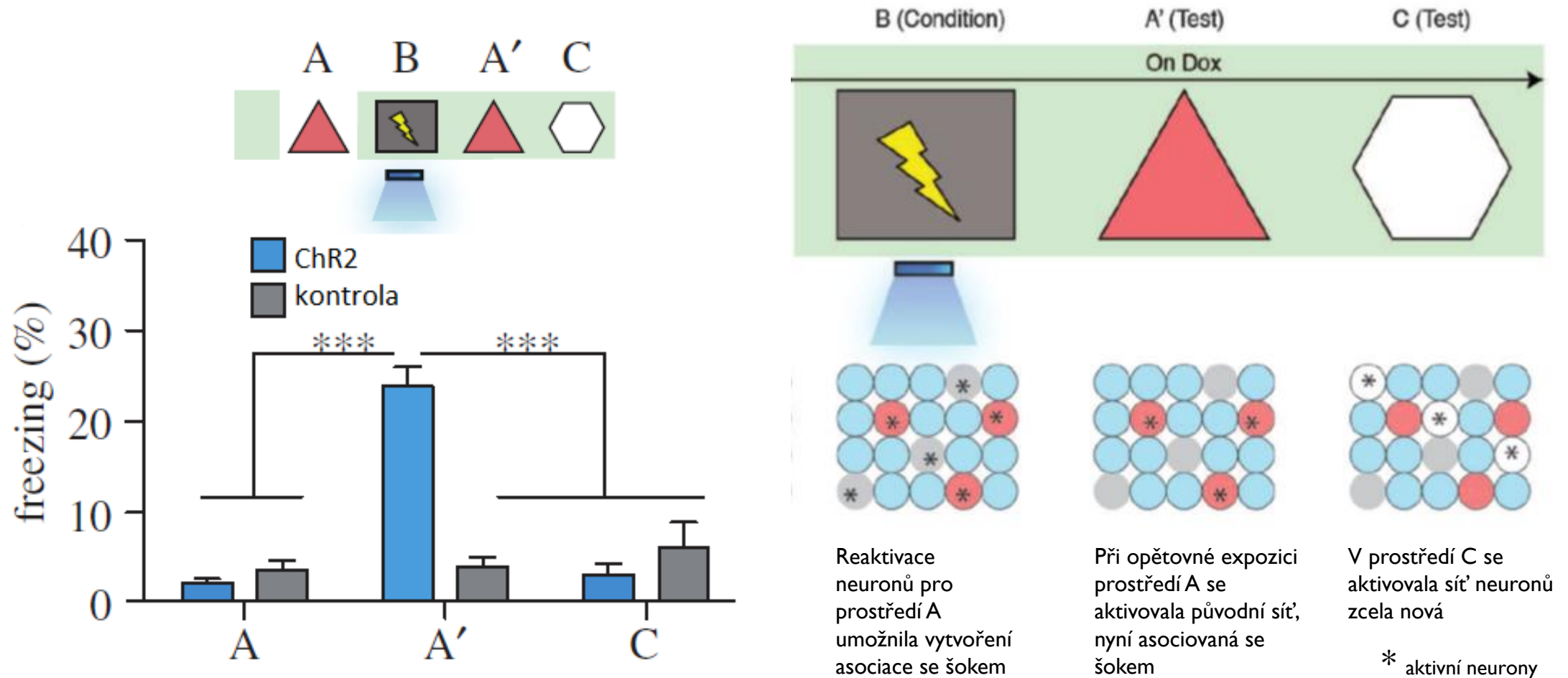
- Transgenní myš s genem pro tetracyklin-aktivátor (tTA) pod promotorem c-fos.
- Injekce adeno-asociovaného viru, který nese gen pro tetracyclin-response element, Channelrhodopsin 2 (ChR2) a červený fluorescenční protein (mCherry); vir transfekuje všechny neurony v gyrus dentatus

STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



1. Zvíře dostává doxycyklin – nedochází k expresi ChR2
2. Vysazen doxycyklin, zvíře exploruje prostředí A – exprese ChR2 v c-fos aktivovaných neuronech
3. Opět nasazen doxycyklin; zvíře exploruje prostředí B, kde dostává šok, za současné aktivace ChR2 modrým světlem
4. Zjišťuje se míra nehybnosti v prostředí A
5. Zjišťuje se míra nehybnosti v prostředí C, ve kterém zvíře předtím nikdy nebylo

STRACHOVÉ PODMIŇOVÁNÍ – MANIPULACE S ENGRAMEM



- Závěr: Podařilo se vytvořit umělou vzpomínku – zvíře si vybavilo šok v prostředí, v němž šok nikdy nedostalo.

DĚKUJI ZA POZORNOST

