

Mgr Agnieszka Wardak

Pracownia Behawioralno-Metaboliczna

IMDiK PAN

Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej

Streszczenie

Szczury są zwierzętami społecznymi wykazującymi wiele zachowań regulujących funkcjonowanie w grupie. Ważnym elementem ich komunikacji międzysobniczej są wokalizacje ultradźwiękowe (*ang. ultrasonic vocalizations, USV*), które sygnalizują stan emocjonalny osobnika. Powszechnie przyjętą się podział USV na dwie główne kategorie w zależności od ich średniego pasma częstotliwości. USV pasma 22 kHz (USV 22-kHz), o częstotliwości od 18 do 32 kHz, które charakteryzują się brakiem modulacji częstotliwości, najczęściej związane są z sytuacjami awersyjnymi („nieprzyjemnymi”). Druga kategoria – USV pasma 50 kHz (USV 50-kHz) o częstotliwości od 35 do 80 kHz charakteryzują się różnym stopniem modulacji częstotliwości. USV 50-kHz powiązane są z sytuacjami apetytywnymi („przyjemnymi”) i pojawiają się w takich sytuacjach jak kontakt społeczny czy uzyskiwanie nagrody.

W związku z powszechnym występowaniem wokalizowania u szczurów a jednocześnie szerokim zastosowaniem tych zwierząt w modelach chorób człowieka, ważnym wydaje się pytanie, czy można wytworzyć u szczura asocjację jego własnej wokalizacji z określonym bodźcem wzmacniającym w ramach warunkowania instrumentalnego. Warunkowanie instrumentalne jest szczególną formą uczenia się, prowadzącą do wytworzenia wyuczonej reakcji poprzez powiązanie określonego zachowania z jego konsekwencją. Podczas warunkowania instrumentalnego stosowane są bodźce wzmacniające, które polegają na otrzymaniu nagrody lub uniknięciu kary. Przeważnie ww. reakcja polega na interakcji zwierzęcia z odpowiednim urządzeniem np. dźwignią czy otworem na nos. W ramach niniejszej pracy przyjęto założenie, że szczur mógłby zastosować emisję własnych USV jako reakcję instrumentalną. Chociaż badanie warunkowania instrumentalnego, jak i szczurzych USV trwają od dekad, to połączenie obu tych elementów pojawia się bardzo rzadko. **Celem niniejszych badań było zaprojektowanie szczurzego protokołu warunkowania wykorzystującego emisję USV 50-kHz jako reakcji instrumentalnych.**

Szczury stada Wistar po deprivacji pokarmowej otrzymywały wzmocnienie pokarmowe w dwóch sytuacjach doświadczalnych: a. za emisję USV 50-kHz; b. za odpowiedź własnymi USV 50-kHz na USV 50-kHz emitowane z głośnika. W procesie nabywania umiejętności wykorzystywania własnych USV jako reakcji instrumentalnej zwierzęta wykazywały duże rozbieżności.

Analiza wszystkich zbadanych szczurów wykazała, że jako cała grupa nie uczyły się one wokalizowania, które pozwoliłoby im na otrzymanie nagrody pokarmowej. Jednocześnie doświadczenia kontrolne pokazały, że badane szczury uczyły się reakcji instrumentalnej polegającej na wsadzaniu nosa w otwór (ang. *nosepoke*) już w czasie pierwszej sesji treningowej. W ramach analizy uzyskanych wyników zwierzęta podzielono dodatkowo na dwie główne grupy. Mniejszą grupę szczurów ($n = 15$), które były nagradzane za emisję USV 50-kHz, uznano za potencjalnie uczące się na podstawie arbitralnie przyjętego kryterium (uzyskanie maksymalnej liczby nagród w czasie każdej z trzech ostatnich sesji treningowych). Z kolei większość badanych zwierząt ($n = 61$) uznano za nieuczące się.

U szczurów potencjalnie uczących się stwierdzono zmiany w zachowaniu, sugerujące zachodzący proces asocjacji i wzmocnienia zachowania w postaci emisji USV 50-kHz: a. coraz krótszy czas sesji treningowych, b. wyższą częstość wokalizowania (liczba USV emitowana w ciągu 1 min), c. rosnący odsetek nagradzanych USV 50-kHz w stosunku do wszystkich USV, jak i do USV 50-kHz, d. zwiększoną liczbę USV 50-kHz emitowanych seriach (za serię uznano co najmniej dwie kolejne nagrodzone USV).

Część z tych zmian mogła być konsekwencją zastosowanego, wyżej wymienionego kryterium, jednakże opisano szereg zmian u szczurów potencjalnie uczących się, które z jednej strony świadczyły o wystąpieniu uczenia się, a jednocześnie nie wynikały bezpośrednio z przyjętego kryterium – na przykład: a. skracanie się czasu sesji treningowej przez pierwsze trzy sesje treningowe z maksymalną liczbą nagród, b. wzrost częstości wokalizowania w czasie pierwszej sesji testowej w porównaniu z ostatnią sesją treningową. Obserwacje te stanowiły więc dodatkowe potwierdzenie wystąpienia procesu uczenia się w tej grupie zwierząt. Opisano również postępujące zwiększenie długości USV 50-kHz szczurów potencjalnie uczących się, a analiza materiałów wideo pokazała, że szczury te w kolejnych dniach doświadczenia spędzały więcej czasu w połowie klatki z karmnikiem, jak i w bezpośrednim sąsiedztwie karmnika. Z kolei u szczurów nieuczących się pokazano obniżającą

się częstość wokalizowania oraz wzrost udziału (w procentach) występowania awersyjnych krótkich USV 22-kHz.

Zastosowany protokół warunkowania instrumentalnego szczurów, wykorzystujący USV 50-kHz jako pożądaną reakcję, nie przyniósł oczekiwanych wyników. Mimo zastosowania wielu zmian protokołu w doświadczeniu polegającym na nagradzaniu szczurów za ich własne USV 50-kHz, u większości szczurów nie obserwowano zwiększonej liczby tych USV. Dodatkowe doświadczenia z wykorzystaniem otworu na wsadzanie nosa w celu uczenia szczurów rozróżniania dźwięków pokazały, że szczury uczyły się reagować coraz szybszym wsadzaniem nosa w kolejnych sesjach treningowych, lecz ostatecznie nie nauczyły się odróżniać od siebie dwóch prezentowanych dźwięków. Szczury nie uczyły się także odpowiadać własnymi USV na USV prezentowane z głośnika.

Potencjalne przyczyny niepowodzenia w opracowaniu protokołu uczenia się instrumentalnego zostały omówione w Dyskusji, wraz z krytyką rozwiązań proponowanych przez innych badaczy. Wskazanie w niniejszej pracy grupy szczurów, u której opisano zachowania świadczące o wystąpieniu uczenia się daje nadzieję na możliwość opracowania analogicznego i bardziej skutecznego protokołu w przyszłości. Wprowadzenie protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów jako reakcje instrumentalne mogłoby stać się przydatnym narzędziem do badania USV szczura i posłużyć w badaniach wykorzystujących zwierzęce modele chorób neurologicznych człowieka.

Abstract

Rats being social animals express many behaviors that regulate their functioning in a group environment. A very important aspects of intraspecific rat communication are ultrasonic vocalizations (USV) which appear to express rats' emotional state. The widely accepted consensus is that USV can be divided into two main groups depending on the average frequency bandwidth which they occupy. First are the 22-kHz calls which fall between the 18 to 32 kHz bandwidth, and are of constant frequency. They are often associated with aversive situations; therefore, they express an internal negative state of the animal. The second group of USV are 50-kHz calls which are usually in between 35 and 80 kHz in frequency and are much more diverse in their spectral form. 50-kHz calls are associated with the rat's positive emotional state and appear in the context of social interaction or acquisition of a reward.

Relating to the frequent use of USV in many different aspects of a rat's behavior, an interesting question emerges: whether it is possible to teach a rat to associate its own USV with food reward in operant conditioning. Considering the appearance of 50-kHz calls in a reward context, these USV seem adequate for the task. Operant (or instrumental) conditioning is a particular form of learning which leads to development of a learnt operant behavior. The animal learns to associate specific behavior with a consequence of this behavior. To lead to the acquisition of the operant behavior, reinforcement is used which can take form of receiving a reward or avoiding punishment. For instrumental conditioning, an interaction with a device located in an operant conditioning box is often employed. The device usually takes form as a physical object such as a lever or nose-poke hole, it was therefore assumed that rats could possibly use their own vocalization to achieve a reward. Even though operant conditioning is a method used for decades now and rat USV are also known for a considerable amount of time, research into combining these two has been limited. **The aim of the study was to develop a protocol of operant conditioning using emission of rat 50-kHz USV as operant response.** Experiments were performed with Wistar rats which were mildly food deprived and were rewarded either for 50-kHz USV emission or for 50-kHz USV response to 50-kHz USV playback. The animals showed high variability in using their own USV as an operant response.

The results showed that all rats analyzed as a one group did not learn in operant conditioning to vocalize in order to receive a reward. Also, control experiments done in

parallel demonstrated that rats previously reinforced for USV emission readily acquired nose-pokes as operant responses during the first training session. As a result of further analysis, two groups of animals emerged depending on the efficacy of operant USV-learning. A minority of rats ($n = 15$) that were rewarded for 50-kHz USV emission were considered as potentially-learning based on an arbitrary criterion (maximum number of rewards obtained during each of the last three training sessions). Majority of rats ($n = 61$) were considered as non-learning.

The potentially-learning rats have shown some changes in behavior which suggested the emergence of an associative process and reinforcement of emission of 50-kHz calls: a. decrease in duration of a training sessions, b. higher call rate (calls/min), c. incrementing percentage of rewarded USV in the total number of USV and in all 50-kHz USV, d. increased number of calls emitted in bouts (at least two consecutive rewarded-USV were considered as a bout).

These changes in behavior could have been the consequence of using the above-mentioned criterion. However, a number of changes in potentially-learning rats were described, which indicated the occurrence of learning and, at the same time, did not result directly from the adopted criterion – for example: a. decrease in training-session duration during the three first days with maximum number of rewards, b. higher call rate during the first test session vs. the last day of training. Thus, these observations constituted additional confirmation of the learning process in this group of animals. Additionally, the duration of 50-kHz calls steadily increased in potentially-learning rats. The analysis of video materials showed that rats spent more time in the middle of the cage with a feeder and in the direct vicinity of the feeder during training days of the experiment. Whereas, the call rate of non-learning rats was decreasing during sessions and they produced increasingly more (in %) aversive short 22-kHz calls.

The protocol of operant conditioning of rats, which used 50-kHz USV as a desired operant response, did not yield the expected results. The protocol was modified several times to increase the emission of 50-kHz calls. However, despite the applied changes, the subjects did not produce more 50-kHz USV. Also, additional, experiments with distinguishing two USV did not bring the expected results either. Rats learned to poke their noses faster in successive training sessions, but they ultimately did not learn to distinguish between the two presented stimuli. Rats also did not learn to respond with their own 50-kHz USV to appetitive USV playback.

Potential reasons of why USV may not easily become an operant response are extensively discussed in the Discussion, along with criticisms of solutions proposed by other researchers. Showing herein the presence of a group of rats showing learning-related behaviors gives hope for the possibility of developing analogous and more effective experimental protocols in the future. The introduction of operant conditioning protocol with rat USV as operant response could become a very useful tool to study rat USV and animal models of human neurological diseases.