
МЕТОДИКА

УДК 575:591.513.5

КОГНИТИВНЫЙ ТЕСТ НА «НЕИСЧЕЗАЕМОСТЬ». МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВАРИАНТ ДЛЯ КРЫС

© 2024 г. А. Г. Королев^{1, 2, *}, П. Д. Огурцов¹, А. Н. Иноземцев¹, И. И. Полетаева¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²РУДН им. П. Лумумбы, Медицинский институт, Москва, Россия

*e-mail: korolevpost@gmail.com

Поступила в редакцию 07.07.2024 г.

После доработки 09.09.2024 г.

Принята к публикации 09.09.2024 г.

Дается описание разработанной экспериментальной установки, позволяющей оценивать решения крысами теста на постоянство объекта (object permanence, по Ж. Пиаже), что является проявлением способности животных к оперированию одним из простейших эмпирических законов «неисчезаемости» (по Крушинскому), т.е. способности к решению элементарной логической задачи. Помещенное в ярко освещенную часть камеры животное может убежать через лаз в комфортное темное отделение, но после первых попыток лаз закрывают разными способами, и для выполнения теста животному необходимо преодолеть препятствие, оперируя правилом «неисчезаемости». Выполнение теста не требует предварительного научения, и он аналогичен тесту на «неисчезаемость», используемому в экспериментах с мышами. Проведено тестирование крыс пяти разных генетических групп — крыс аутбредных линий Вистар и Лонг-Эванс, крыс инбредной линии Крушинского-Молодкиной (КМ) (с предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии), производной от КМ линии «0» (без аудиогенной эпилепсии) и крысы инбредной линии SHR со спонтанной артериальной гипертензией. Проведенные предварительные эксперименты (выполнявшиеся с каждым животным в пределах одного опытного дня) выявили межлинейные различия в решении теста с превосходством показателей крыс линии SHR. Использование данного теста возможно в нейрофизиологических и фармакологических исследованиях поведения крыс.

Ключевые слова: когнитивные способности животных, тест на «неисчезаемость», экспериментальная установка, линии крыс

DOI: 10.31857/S0044467724060099

Изучение когнитивных способностей животных является актуальной задачей современной нейробиологии и представляет интерес для фундаментальных и прикладных исследований. Следует, однако, отметить, что под термином «когнитивные способности» очень часто понимаются обучение сложным навыкам и память (см. Pickens, Holland, 2004; Иноземцев, Королев, 2023). В то же время в настоящем сообщении оценивается успешность/неуспешность решения элементарной логической задачи, или оперирование простейшими эмпирическими законами (по Л.В. Крушинскому, 2014). Предметом настоящей статьи является описание экспериментальной установки для тестирования у лабораторных крыс способности понимать правило «неисчезаемости» («object permanence» по Ж. Пиаже, Zussa et al., 2007), которое является одним из простейших эмпирических законов: «Предмет, который только что воспринимался, но в данный момент не виден, продолжает существовать и его можно отыскать». Экспериментальную установку для тестирования этой

способности впервые использовали в экспериментах на мышах (Galsworthy et al., 2005), и она получила название «puzzle-box». Предложенный этими авторами тест базируется на оборонительной мотивации. Животное, помещенное в освещенную часть камеры, стремится избежать яркого света и спрятаться в более комфортном, темном отделении экспериментальной установки через лаз, который (в экспериментах на мышах) углублен в пол светлой части камеры. Аналогичного опыта (т.е. тренировки навыка попадания в темный отсек) у животного нет. Очевидно, что выполнение такой реакции при открытом лазе аналогично тесту «светло-темная камера», однако в последующих предъявлениях теста лаз маскируют. В экспериментах на мышах такую маскировку осуществляют, присыпая лаз стружкой вровень с полом или закрывая его легкой пробкой (которую мышь может вынуть зубами или отодвинуть) (Galsworthy et al., 2002, 2005; Ben Abdallah et al., 2011; Perepelkina, Poletaeva, 2022). В экспериментах на крысах такой тест ранее не применялся.

МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. Тестировали крыс-самцов пяти генетических групп в возрасте 5 мес. Работа выполнена на крысах следующих линий: аутбредная линия Вистар ($n = 12$), аутбредная линия Лонг-Эванс ($n = 11$), инбредная линия Крушинского – Молодкиной (КМ, $n = 12$) (с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией, АЭ), линия, выведенная на основе гибридов F2 (КМ x Вистар) и селектированная на отсутствие АЭ (линия «0», $n = 12$), и инбредная линия SHR со спонтанной гипертензией ($n = 8$). Крыс содержали по 4 особи в клетке (46 x 30 x 16 см) со свободным доступом к корму и воде и 12-часовым циклом свет – темнота (7.00-19.00). Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU.

Описание экспериментальной установки. Тест получил название «тест на поиск скрытого входа в укрытие» (ПСВУ). Конфигурация установки запатентована в качестве полезной модели (Королев и др., 2023).

Установка (рис. 1) выполнена из непрозрачного пластика и состоит из стартового открытого ярко-освещенного (400 лк) отсека (63 x 45 x 28 см) и меньшего по размеру (33 x 23 x 30 см) темного (1–2 лк) отсека. В освещенном отсеке у стенки, отделяющей его от темного отсека, в полу имеется «лаз» квадратной формы (9 x 9 x 15 см), ведущий в темный отсек. Через него крыса может перейти в комфортный темный отсек. Лаз может оставаться открытым, а может быть замаскирован рядом способов. Его присыпают стружкой вровень с полом, закрывают губкой, воронкой либо легкой «пластиной» с небольшими выступами, препятствующими ее быстрому извлечению из лаза животным.

Процедура теста. За сутки до начала эксперимента крыс помещали на 5 мин в светлую, ярко освещенную часть камеры для привыкания к новой установке. В день эксперимента крысу помещали в светлую часть камеры около стенки, дальней от лаза, и давали дважды перейти в темный отсек через открытый лаз. Животное пребывало в темноте 30 сек, затем его пересаживали в чистую клетку. Последующее предъявление теста (помещение в светлый отсек) проводили через 60 сек. Таким образом, интервал между попытками составлял примерно 90 сек. В следующих 4 предъявлениях теста лаз закрывали в следующей последовательности: засыпали стружкой, вставляли в лаз губку, воронку или накрывали лаз «пластиной». На решение предъявлений теста со стружкой и с губкой крысе отводили 180 сек, на решение предъявлений с воронкой и с «пластиной» – 240 сек. В случае, если животное не решало задачу, его время записывали как 180 или 240 сек соответственно. После каждого предъявления установку

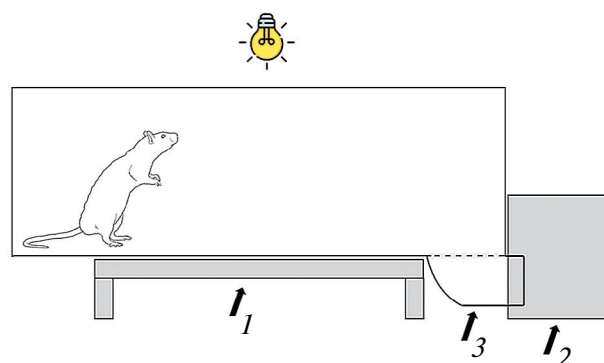


Рис. 1. Экспериментальная установка для проведения теста на «поиск скрытого входа в укрытие» (ПСВУ). 1 – стартовая камера, светлый отсек (63 x 45 x 28 см), 2 – темный отсек (33 x 23 x 20 см), 3 – лаз для перехода в темный отсек (9 x 9 x 15 см).

Fig. 1. Experimental box for the test “the search of hidden passage into the shelter” (SHPS). 1 – the brightly lit part of the box for start (63 x 45 x 28 cm), 2 – the dark part of the box (33 x 23 x 20 cm), 3 – the underpass for entering the dark part of the box (9 x 9 x 15 cm).

протирали спиртом. В ходе опыта отмечали латентный период (ЛП) перехода в темный отсек.

Статистическая обработка. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software Inc., США). Значимость различия долей крыс, решивших задачу в тесте, рассчитывали по ϕ -критерию Фишера для оценки различий альтернативных долей (Лакин, 1990). Парные сравнения по данному критерию проводили для теста с крысами Вистар (отмечено * на графиках), а также для сравнения крыс КМ и «0» (отмечено V и ###). При анализе ЛП перехода в темноту межгрупповые различия выявляли однофакторным ANOVA с *post hoc* тестом по Тьюки. Отдельно сравнивали между собой все группы «парно» с «группирующей переменной» «линия крыс», а зависимой – время решения задачи. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты решения теста показали наличие межлинейных различий как в доле животных (рис. 2), решивших его разные предъявления, так и в ЛП решений (рис. 3). Наиболее успешными в решении всех предложенных задач оказались крысы линии SHR, у которых была максимальная доля (100%) решений первых трех задач. У крыс этой линии была и самая большая доля особей (75%), которые решили наиболее сложный этап теста – с «пластиной». Крысы остальных групп решали тест на его разных этапах примерно на одном уровне, хотя у крыс КМ доля успешных решений

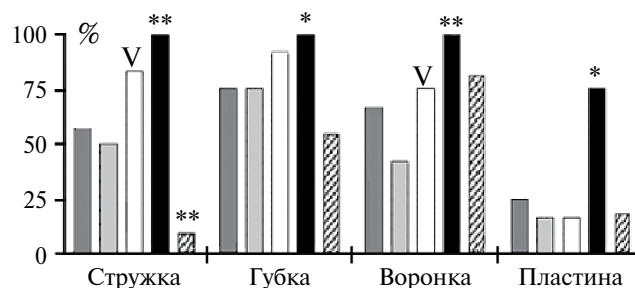


Рис. 2. Доли крыс пяти генетических групп (ось ординат, %), решивших последовательные предъявления теста ПСВУ. Темно-серые столбики – Вистар, светло-серые – линия «0», белые – КМ, черные – SHR, штриховка – Лонг-Эванс. *** – значимо отличается от показателей крыс Вистар, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно, ### – значимо отличается от показателей крыс «0», $p < 0.001$, V – значимо отличается от показателей крыс «0», $p < 0.05$ (критерий ϕ Фишера для оценки разности альтернативных долей).

Fig. 2. The proportions of rats from five strains (ordinate, %), which solved the subsequent trials of SHPS test. Dark grey columns – Wistar, light grey – strain “0”, white – KM, black – SHR, striped – Long-Evans. *** – significantly different from Wistar rats scores, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, ### – significantly different from scores of “0” strain, $p < 0.001$, v – significantly different from scores of “0” (Fisher ϕ criterion for differences of alternative proportions).

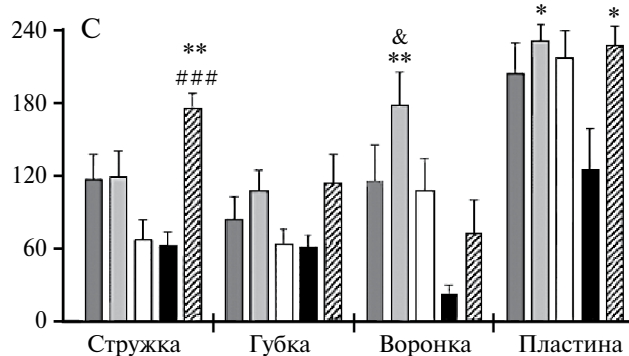


Рис. 3. Время (ЛП) (ось ординат с, средн. \pm ош.ср) перехода в темный отсек крыс 5 генетических групп при последовательных предъявлениях теста ПСВУ. Обозначения – как на рис. 2. ### – значимо отличается от показателя КМ, $p < 0.001$, *, ** – значимо от показателя крыс SHR, $p < 0.05$, $p < 0.01$ соответственно, & – показатель значимо отличается от такового у Лонг-Эванс, $p < 0.01$ (однофакторный ANOVA с post hoc тестом по Тьюки).

Fig. 3. Time (latencies) (ordinate, s, mean \pm st.err) of rat transition into the dark part of the box for subsequent trials of SHPS test for five rat strains. Designations, as in fig. 2. ### – significantly different from KM strain scores, $p < 0.001$, *, ** – significantly different from SHR scores, $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively, & – significantly different from Long-Evans scores, $p < 0.01$ (1 fact/ ANOVA, post hoc Tukey test).

в целом была несколько выше, чем у Вистар и «0». У крыс Лонг-Эванс доля решения этапа теста, когда лаз был засыпан стружкой, оказалась парадоксально низкой (9%), т.е. такой же, как при предъявлении теста с лазом, закрытым «пластиной». Для выяснения причины такой особенности крыс этой линии требуются дополнительные эксперименты.

Быстрота (ЛП) решения последовательных предъявлений теста представлена на рис. 3. Тест с лазом, замаскированным стружкой, все крысы решали в целом одинаково быстро, кроме крыс Лонг-Эванс (их ЛП приближался к 180 с). ЛП предъявления с лазом, закрытым губкой, был примерно одинаковым во всех 5 группах. Предъявление с воронкой быстрее всех решали крысы SHR, а медленнее всех – крысы линии «0». Крысы КМ, Вистар и Лонг-Эванс решали эту фазу теста примерно одинаково быстро. Среднее время решения последнего предъявления (лаз закрыт пластиной) значимо различалось только при сравнении крыс Вистар и Лонг-Эванс с SHR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, предъявление теста ПСВУ крысам разных генетических групп позволило выявить межгрупповые различия как в долях животных, которые решили разные предъявления теста, так и в скорости (ЛП) таких решений. Более высокие показатели решения теста крысами линии SHR (со спонтанной гипертензией) частично согласуются с их более высокой моторной возбудимостью (Hendley, Wessel, 1985; Rosenwasser et al., 1993; Fasmer, Johansen, 2016; Tchekalarova et al., 2023) и импульсивностью (Hand et al., 2009). В то же время в ряде работ с использованием крыс линии SHR (это общепризнанная модель заболевания ADHD человека) отмечались их отличия от нормотензивных крыс Вистар-Киото и аутбредной линии Вистар по показателям условно-рефлекторного инструментального обучения, причем различия в разных работах имели разный «знак» (Hand et al., 2009, 2010; Silic et al., 2023).

Данные, полученные при первом тестировании новой установки для крыс, позволяющей оценивать способность этих животных оперировать эмпирическим законом – правилом «неисчезаемости», имеют, разумеется, предварительный характер. В то же время эти данные свидетельствуют о принципиальной важности проведения подобного рода тестирования при оценке, например, эффектов фармакологических агентов – в частности, препаратов ноотропного ряда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показатели теста ПСВУ для крыс обнаружили ряд различий в его выполнении при сравнении

поведения крыс разных генетических групп. Это свидетельствует о том, что использование данной экспериментальной методики, описание которой дано в статье, может дать новую информацию о способности к решению элементарной логической задачи, которая основана на улавливании животным правила «неисчезаемости».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Г.К. — конструирование установки, разработка схемы эксперимента, проведение тестов, обработка данных написание статьи. П.Д.О. — проведение тестов, обработка данных. А.Н.И. — разработка схемы эксперимента, редактирование текста. И.И.П. — идея работы, написание статьи.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500080-8.

СОБЛЮДЕНИЕ БИОЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа соответствует требованиям Директивы Европарламента о защите животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU, 22 September 2010). Заявка «Условия содержания животных» подтверждена Комиссией по биоэтике МГУ 30.10.2018.

ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

korolevpost@gmail.com

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крушинский Л.В. Биологические основы рассудочной деятельности: Эволюционный и физиолого-генетический аспекты поведения.
- Королев А.Г., Иноземцев А.Н., Полетаева И.И. Устройство для исследования поведения лабораторных крыс: пат. 2023132329/14(071447) РФ, 08.12.2023.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М. Высшая школа, 1990.
- Иноземцев А.Н., Королев А.Г. Инструментальное оборонительное поведение: подходы и методы исследования. Учебное пособие. М.: Москва, 2023. 200с.
- Ben Abdallah N.M.-B., Fuss J., Trusel M., Michael J., Galsworthy M.J., Bobsin K., Colacicco G., Robert M.J., Deacon R.M.J., Riva M.A., Christoph Kellendonk C., Sprengel R., Lipp H.-P., Gass P. The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia. *Expim. Neurol.* 2011, v. 227: 42–52.
- Fasmer O.B., Johansen E.B. Patterns of motor activity in spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. *Behav Brain Funct.* 2016. 12(1): 32. doi: 10.1186/s12993-016-0117-9.
- Galsworthy M.J., Paya-Cano J.L., Monleon S., Plomin R. Evidence for general cognitive ability (g) in heterogeneous stock mice and an analysis of potential confounds. *Genes Brain Behav.* 2002. 1 (1): 88–95.
- Galsworthy M.J., Paya-Cano J.L., Liu L., Monleon S., Gregoryan G., Fernandes C., Schalkwyk L.C., Plomin R. Assessing reliability, heritability and general cognitive ability in a battery of cognitive tasks for laboratory mice. *Behav. Genet.* 2005, 35(5): 675–692. doi: 10.1007/s10519-005-3423-9.
- Pickens C.L., Holland P.C. Conditioning and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004. 28: 651–661.
- Hand D.J., Fox A.T., Reilly M.P. Differential effects of d-amphetamine on impulsive choice in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Behav Pharm.* 2009. 20(5–6): 549–553. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283305ee1
- Hand D.J., Fox A.T., Reilly M.P. Response acquisition with signaled delayed reinforcement in a rodent model of ADHD. *Behav Brain Res.* 2010. 213(2): 155–160. doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.043.
- Hendley E.D., Wessel D.J., Atwater D.G., Gellis J., Whitehorn D., Low W.C. Age, sex and strain differences in activity and habituation in SHR and WKY rats. *Physiol Behav.* 1985. 34(3): 379–383. doi: 10.1016/0031-9384(85)90199-4
- Perepelkina O.V., Poletaeva I.I. Selection of Mice for Object Permanence Cognitive Task Solution. *Neurol Int.* 2022. 14(3): 696–706. doi: 10.3390/neurolint14030058.PMID: 36135993
- Rosenwasser A.M., Plante L. Circadian activity rhythms in SHR and WKY rats: strain differences and effects of clonidine. *Physiol Behav.* 1993. 53(1): 23–29. doi: 10.1016/0031-9384(93)90006-2.
- Silic B., Aggarwal M., Liyanagata K., Tripp G., Wickens JR. Conditioned approach behavior of SHR and SD rats during Pavlovian conditioning. *Behav. Brain Res.* 2023. 443:114348. doi: 10.1016/j.bbr.2023.114348
- Zucca P., Milos N., Vallortigara G. Piagetian object permanence and its development in Eurasian jays (*Garrulus glandarius*). *Anim. Cogn.* 2007. 10: 243–258.

“OBJECT PERMANENCE” TEST FOR RATS. FIRST EXPERIMENTS

A. G. Korolev^{a, b, #}, P. D. Ogourtsov^a, A. N. Inozemtsev^a, I. I. Poletaeva^a

^a*Biology Department, Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*P. Lumumba RUPF, Medical Institute, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: korolevpost@gmail.com*

The description of the developed experimental set, permitting to evaluate rats solution of the “object permanence” test (be J. Piaget), which reflects animal capacity to operate one of the most simple empirical rules (by Krushinsky), i.e. capacity to solve elementary logic task. An animal, being placed in the brightly lit part of the box, is eager to run into the dark one via underpass, although after the first attempts the underpass was hidden by several means, and now an animal can solve the task overcoming the obstacle in case it operates the object permanence rule. The test solution does not require the previous learning, and it is similar to the test used in mice experiments. The test was applied in experiments with rats of five genetic groups – outbred Wistar and Long-Evans rats, rats of inbred audiogenic-prone Krushinsky – Molodkina (KM) strain, the strain derived from KM rats, selected for audiogenic non-proneness and inbred SHR strain with spontaneous arterial hypertension. The preliminary experiments (performed with an animal during one experimental day) revealed interstrain differences with the test solution prevalence in SHR strain. This test could be used in pharmacological and neurophysiological experiments with rats.

Keywords: animal cognitive ability, object permanence test, experimental setup, rat strains