

Когнитивные тесты зебраданио (*Danio rerio*):

Т- и У-образные лабиринты

2021 г. Д.С. Галстян^{1,2}, Т.О. Колесникова³,

Ю.М. Косицын¹, К.Н. Забегалов³, М.А. Губайдуллина³, Г.О. Маслов^{3,5}

К.А. Демин^{1,3,4}, А.В. Калуев^{1,3,4,5,6,7,8 *}

¹*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

²*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

³*Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия*

⁴*Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия*

⁵*Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия*

⁶*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

⁷*Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия*

⁸*Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

* avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию xx.xx.2021 г.

После доработки xx.xx.2021 г.

Принята к публикации xx.xx.2021 г.

Аннотация.

Т- и У-образные лабиринты традиционно используются для оценки пространственного обучения и памяти зебраданио. В установке Т-образного лабиринта рыбу обучают заплывать в нужный рукав и не заплывать в «неправильный» с использованием как положительных (например, пищевое подкрепление), так и негативных (например, электрический ток) стимулов для формирования более стойких рефлексов. В основе У-образного лабиринта лежит принцип спонтанного выбора. Поведение спонтанного выбора описывает тенденцию животных менять направление своего поворота в серии последовательных поворотов. Каждый выбор статистически зависит от предыдущего, что свидетельствует о его мнестическом происхождении. В отличие от других типов мнестических задач, тестирование в У-образном лабиринте не требует предварительного

обучения или подкрепления (как в Т-образном лабиринте). Оба теста являются эффективными методами оценки аффективного фенотипа зебрданио.

Abstract.

T- and Y-shaped mazes are traditionally used to assess spatial learning and memory of zebrafish. In the installation of the T-shaped maze, the fish are taught to swim into the desired sleeve and not swim into the "wrong" one using both positive (for example, food reinforcement) and negative (for example, electric current) stimuli to form more persistent reflexes. The Y-shaped maze is based on the principle of spontaneous choice. Spontaneous choice behavior (SPB) describes the tendency of animals to change their direction of rotation in a series of successive turns. Each choice statistically depends on the previous one, which indicates its mnemonic origin. Unlike other types of memory tasks, testing in the Y-shaped maze does not require prior training or reinforcement (as in the T-shaped maze). Both aquatic mazes are becoming useful tools for assessing zebrafish cognitive phenotypes.

Ключевые слова: зебрданио, лабиринт, память, обучение, спонтанный выбор.

Keywords: zebrafish, maze, memory, learning, spontaneous choice.

Т-образный лабиринт

Т-образный лабиринт (T-maze) широко используют для оценки пространственного обучения и памяти грызунов (1) и рыб (2) (Рис. 1, Табл. 1). Он также применяется для оценки влияния фармакологических препаратов на поведение животных (3). Методика исследования включает в себя два этапа: обучение и тестирование. Перед проведением обучения зебрданио подвергаются предварительной экспозиции в лабиринте в течение нескольких дней (3-5) для снижения эффекта новизны. На этапе обучения для формирования более стойких рефлексов используется как положительное (например, пищевое) подкрепление, так и негативное (например, электрический ток) (4). Одним из недостатков данного теста является длительность его обучения, которое может занимать 8-10 дней.

Существует несколько модификаций данного теста, как методологических, так и технических. Классическая установка представляет собой Т-образный лабиринт, имеющий один длинный стартовый рукав (например, 300 мм × 80 мм × 60 мм) и два коротких рукава (например, 80 мм × 65 мм × 60 мм), располагающихся перпендикулярно. Один из коротких рукавов маркируется как «целевой рукав», второй соответственно относится к категории «неправильный рукав». В целевом рукаве находится

положительный стимул в виде еды или сородичей, при заходе в неправильный рукав зебраданио получает разряд током (1–2 В, 0.3–0.5 мА). На концах коротких рукавов могут располагаться расширения, представляющие собой прямоугольную камеру. Стартовый длинный рукав делится на 2 зоны, разделенные непрозрачной перегородкой: стартовую и новый рукав. Перед началом тестирования животное помещается в стартовую зону на 30 с, затем убирают перегородка, позволяя животному свободно исследовать оба рукава Т-образного лабиринта.

Ежедневно животные подвергаются трем обучающим сессиям, в течение которых при нахождении рыбы в неправильном рукаве она получает удар электрическим током (не более 3 ударов током за сессию). Модификации в методике могут выражаться в наличии положительного и отрицательного стимулов постоянно в одних и тех же рукавах, либо каждую обучающую сессию целевой и неправильный рукава маркируются случайно. Также, сочетания положительного и отрицательного стимула могут варьироваться в зависимости от целей эксперимента и использоваться совместно, либо по отдельности. В случае использования либо только положительного, либо только отрицательного стимула время обучения увеличивается в 2-3 раза.

При манипуляции с животными во время обучения и тестирования необходимо соблюдать аккуратность и осторожность. При помещении животного в установку запрещается касаться сачком воды в установке. Перед тестированием необходимо максимально быстро поймать рыбу в сачок, не гоняя ее по домашнему аквариуму или по аквариуму для экспозиции, поскольку это приведет к увеличению тревожности зебраданио и исказит результаты обучения и тестирования. Запрещается допускать падение рыбы с высоты в воду. По окончании эксперимента, животных необходимо аккуратно поймать сачком и переместить в домашний аквариум или в аквариум для дальнейших манипуляций. Необходимо избегать резких звуков и движений во время габитуации и обучения, поскольку это может привести к искажению результатов. В случае падения рыбы на пол, ее необходимо аккуратно переместить в домашний аквариум и протестировать позже. Негативный стимул необходимо подавать только после явного пересечения границы неправильного рукава.

Общая схема тестирования

Этап 1- габитуация к условиям лабиринта. На данном этапе животным в течение 3-5 дней позволяют свободно исследовать установку в группе. С каждым последующим днем габитуации количество животных в группе уменьшается в 2 раза. В конце первого этапа зебраданио индивидуально экспонируется в установке. Время экспозиции варьируется от нескольких часов (2-4 ч) в первые дни до 15-5 мин в последующие сессии.

Успешным окончанием этапа габитуации является свободное перемещение зебрэданио по всему лабиринту и сведение к минимуму поведения фризинга.

Этап 2 - обучение. На этапе обучения животные индивидуально экспонируются в тестовой установке, с заданными целевыми рукавами. Целевой рукав может маркироваться цветом (например, красной, зеленой или желтой карточкой), рисунком (полосы, круги). В качестве положительного подкрепления в целевом рукаве может находиться пища, либо группа сородичей. Негативным стимулом в неправильном (нецелевом рукаве) может быть удар током, либо экспозиция хищника. Во время обучающей сессии в течение 5 мин исследователь наблюдает за поведением зебрэданио и подает либо положительный, либо отрицательный стимул при заходе в правильный (целевой)/неправильный рукав. Зебрэданио может подвергаться не более чем трем обучающим сессиям в течение дня. После окончания обучения животные помещаются в домашний аквариум. Успешным считается обучение, при котором рыба ни разу не заплывает в неправильный рукав в течение 5-минутной тренировочной сессии.

Этап 3 – тестирование. На последнем этапе оценивается количество и продолжительность заходов в правильный и неправильный рукава, а также латентный период первого захода в неправильный рукав, число и продолжительность актов фризинга. Поведение зебрэданио фиксируется на видеокамеру в течение 5 мин. Съемка экспериментальной установки ведется сверху. Во время тестирования необходимо соблюдать тишину в экспериментальной комнате, находиться в помещении во время съемки не рекомендуется. Температура и химические показатели воды в установке должна быть аналогичными параметрам в домашнем аквариуме (25-26 °C). Освещение в комнате тестирования должно быть около 60-80 лк. После тестирования, животные переносятся в другой аквариум для дальнейших манипуляций, либо в домашний аквариум. Рекомендуемый размер выборки - не менее 15 особей в каждой когорте.

Габитуация				Обучение	Тестирование		
2 часа	15 минут	5 минут	5 минут				
Группа N=16	Группа N=8	Группа N=4					
		Группа N=4					
	Группа N=8	Группа N=4					
		Группа N=4					
Группа N=16	Группа N=8	Группа N=4	N=1				
		Группа N=4					
	Группа N=8	Группа N=4					
		Группа N=4					
Группа N=16	Группа N=8	Группа N=4					
		Группа N=4					
	Группа N=8	Группа N=4					
		Группа N=4					

Рисунок 1. Общая схема эксперимента в Т-образном эксперименте

Таблица 1. Основные параметры, регистрируемые у зебрании в тесте Т-образного лабиринта

Table 1. Common behavioral endpoints assessed in zebrafish T-maze

Параметр	Детали
Замирание (фризинг)	Отсутствие заметного движения рыбы, кроме глаз и жаберных крышек, более чем на 2 с. При автоматизированной подсчете фризингом считается движение со скоростью менее 0.1 см/с. Увеличение данного параметра свидетельствует о повышении уровня тревожности, седации.
Общая локомоторная активность	Общая пройденная дистанция (см или м). Увеличение данного параметра свидетельствует об увеличении исследовательской активности зебрании.
Число заходов в правильный рукав	Число, продолжительность нахождения в правильном рукаве, а также латентный период первого захода в правильный рукав. Увеличение числа и продолжительности выходов рассматривается как положительный эффект от обучения. Укорочение латентного периода первого захода в правильный рукав также свидетельствует о формировании устойчивого рефлекса.
Число заходов в неправильный рукав	Число, продолжительность нахождения в неправильном рукаве. Увеличение длительности нахождения свидетельствует о негативном влиянии на память и отсутствии сформированного рефлекса

У-образный лабиринт

У-образный лабиринт (Y-maze) – еще один широко применяемый метод оценки пространственной памяти и обучения как у грызунов, так и зебрании. Ранее было разработано множество тестов для оценки способности зебрании к адаптивному обучению, таких как тест «активное избегание», Т-образный и крестообразный лабиринты, и др. К основным недостаткам данных методов можно отнести временные затраты на обучение животных в этих тестах, а также подстраивание протоколов для каждого отдельного функционального анализа адаптивного поведения под определенные задачи, что является трудоемким процессом. В связи с этим возникла необходимость разработки быстрого и точного теста для оценки адаптивного поведения, каким является У-образный лабиринт.

В основе данного теста лежит принцип спонтанного выбора (spontaneous alternation). Поведение спонтанного выбора (ПСВ) описывает тенденцию животных менять направление своего поворота в серии последовательных поворотов (5). Каждый выбор статистически зависит от предыдущего, что свидетельствует о его мнестическом происхождении. В отличие от других типов мнестических задач, тестирование в У-образном лабиринте не требует предварительного обучения или подкрепления, поскольку оценивается свободный выбор животного.

Происхождение ПСВ остается в значительной степени неизвестным. Было предложено множество теорий, пытающихся объяснить это чередование. Среди них отмечается любопытство или добыча пищи как фактор потребности в исследовании пространства, чтобы найти пищу или убежище (6). В случае отсутствия подкрепления само по себе реактивное торможение ведет к отращению к ранее сделанному выбору (7). Наконец, был предложен декремент действия, предполагающий, что насыщение стимулов и реактивное торможение благотворно влияют на память, поскольку задерживают закрепление привычки к обучению (8).

Классическая тестовая установка состоит из трех одинаковых рукавов, расположенных под углом 120 градусов относительно друг друга (высота 10 см, длина 15 см, ширина 7 см; 5 см длина, 2 см ширина), полностью заполненных водой (9). Размеры установки также могут меняться. Температура и химический состав воды в лабиринте должны быть аналогичными аквариуму домашнего содержания. Процедура тестирования включает в себя три этапа:

Этап 1. Габитуация. Для снижения эффекта новизны каждую рыбу помещают в лабиринт, закрытый прозрачной крышкой для предотвращения выпрыгивания из установки, на 10 мин.

Этап 2. Тестирование. На данном этапе отмечается стартовый рукав, в котором находится рыба на начало эксперимента. Важно: для каждого животного стартовый рукав выбирается произвольно. Далее подсчитывается количество и последовательность поворотов в течение не менее 1 часа или до 100 входов в рукав. Если рыба выполнила 100 полных входов в рукава до окончания назначенного времени, тест заканчивают раньше. По окончании тестирования рыбу аккуратно вылавливают сачком и помещают в другой аквариум для дальнейших манипуляций либо в домашний аквариум.

Этап 3. Анализ данных. Анализ данных и построение тетраграмм производится по принципу анализа левых (Л) и правых (П) поворотов при выходе из рукава. Тетраграммы (ПППП или ЛЛЛЛ) представляют собой чистые повторения поворотов в одну сторону, а тетраграммы (ПЛПЛ и ЛПЛП) - чистые чередования. Стратегия

полностью случайного поиска состояла бы в том, чтобы выбрать каждую потенциальную тетраграмму одинаково. Однако последовательности ответов могут включать в себя повторения чередований. Для проверки нулевой гипотезы о равной вероятности попадания в любую из целевых рук используется биномиальный тест и обобщенные линейные модели для чередующихся и повторяющихся частотных данных.

Благодарности: Работа поддержана Госзаданием (проект 73026081) Санкт-Петербургскому Государственному Университету.

Литература

1. Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology*. 1990;101(1):27-33.
2. Williams FE, White D, Messer Jr WS. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behavioural Processes*. 2002;58(3):125-32.
3. Lamb EA, Echevarria DJ, Jouandot DJ. The utility of the T-maze in assessing learning, memory, and models of neurological disorders in the zebrafish. *Behaviour*. 2012;149(10-12):1081.
4. Ngoc Hieu BT, Ngoc Anh NT, Audira G, Juniardi S, Liman RAD, Villaflores OB, et al. Development of a modified three-day t-maze protocol for evaluating learning and memory capacity of adult zebrafish. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(4):1464.
5. Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2002;26(1):91-104.
6. Estes W, Schoeffler M. Analysis of variables influencing alternation after forced trials. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1955;48(5):357.
7. Solomon RL. The influence of work on behavior. *Psychological Bulletin*. 1948;45(1):1.
8. Walker EL. Action decrement and its relation to learning. *Psychological Review*. 1958;65(3):129.
9. Aoki R, Tsuboi T, Okamoto H. Y-maze avoidance: An automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neuroscience research*. 2015;91:69-72.