

mgr Agnieszka Wardak

# Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Robert Filipkowski

Promotor pomocniczy: dr Krzysztof H. Olszyński



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2023

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi dr. hab. Robertowi Kubie Filipkowskiemu za lata wspólnej pracy nad tym projektem, wprowadzenie mnie w naukowy świat, cały poświęcony mi czas, cierpliwość i merytoryczne uwagi, bez których nie powstałaby niniejsza praca.

Dziękuję mojemu promotorowi pomocniczemu dr. Krzysztofowi H. Olszyńskiemu za lata współpracy, wsparcie podczas rozwiązywania wielu problemów naukowych oraz za cierpliwość i cenne wskazówki udzielone mi podczas pisania pracy.

Dziękuję mgr. inż. Rafałowi Polowemu za lata współpracy w naszej pracowni, pomoc i wsparcie w przygotowaniu moich doświadczeń oraz dzielenie się doświadczeniem i wiedzą związaną z przeprowadzaniem testów behawioralnych.

Dziękuję prof. dr. hab. Tomaszowi Lipniackiemu i dr. Markowi Kochańczykowi z Zakładu Biosystemów i Miękkiej Materii IPPT PAN za współpracę i pomoc w przygotowaniu moich doświadczeń, a w szczególności w przygotowaniu skryptów operujących klatką do warunkowania instrumentalnego.

Niniejsze badania były sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, grant OPUS nr 2015/19/B/NZ4/03393, przez IMDiK PAN z Funduszu Badań Własnych oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, projekt POWR. 03.02.00-00-I028/17-00.

## Spis treści

Streszczenie.....	5
Abstract .....	8
Wykaz skrótów.....	11
Innowacyjność rozprawy.....	12
1. Wstęp.....	13
1.1. Rodzaje warunkowania.....	13
1.1.1. Warunkowanie klasyczne .....	14
1.1.2. Warunkowanie instrumentalne .....	14
1.2. Wokalizacje ultradźwiękowe szczurów.....	16
1.2.1. Charakterystyka USV 50-kHz .....	17
1.2.2. Charakterystyka USV 22-kHz .....	18
1.3. Wykorzystanie wokalizacji ultradźwiękowych w warunkowaniu instrumentalnym ....	19
1.3.1. Wokalizacje ultradźwiękowe jako bodziec w warunkowaniu instrumentalnym....	19
1.3.2. Wokalizacje ultradźwiękowe jako reakcja instrumentalna.....	21
1.4. Podsumowanie.....	23
2. Cel pracy .....	24
3. Materiały i metody .....	25
3.1. Zwierzęta .....	25
3.2. Klatka do warunkowania .....	25
3.3. Schematy protokołów doświadczalnych .....	25
3.3.1. Warunkowanie instrumentalne wykorzystujące szczurze wokalizacje ultradźwiękowe jako pożądane reakcje .....	25
3.3.2. Warunkowanie instrumentalne wykorzystujące otwór na nos.....	33
3.3.3. Uczenie rozróżniania dźwięków z wykorzystaniem otworów na nos jako <i>operandum</i> .....	34
3.4. Analiza plików audio i wideo.....	38
3.5. Analiza statystyczna .....	40
4. Wyniki.....	41
4.1. Większość szczurów nie nabywa umiejętności wokalizowania w celu zdobywania nagrody mimo zastosowania modyfikacji protokołów doświadczalnych .....	41
4.2. Wśród szczurów nieuczących się i potencjalnie uczących się wyróżniono kilka podgrup .....	44
4.3. Szczury poddane warunkowaniu instrumentalnemu z wykorzystaniem ich własnych wokalizacji ultradźwiękowych nabywają umiejętność wsadzania nosa w otwór (ang. <i>nosepoke</i> ).....	47

4.4. Czas sesji treningowej skracał się stopniowo u szczurów potencjalnie uczących się...	50
4.5. Szczury nieuczące się i potencjalnie uczące się różnią się intensywnością wokalizowania .....	51
4.6. W kolejnych sesjach treningowych u szczurów potencjalnie uczących się rośnie odsetek nagrodzonych USV.....	54
4.7. Nagradzane USV były emitowane w seriach pojedynczych dźwięków.....	56
4.8. Szczury nieuczące się emitują krótkie USV 22-kHz.....	60
4.9. U szczurów potencjalnie uczących się zachodzą zmiany we właściwościach USV .....	62
4.10. Szczury spędzają najwięcej czasu w strefie klatki obejmującej karmnik .....	67
4.11. Szczury nie uczą się rozróżniania dźwięków o różnej częstotliwości.....	70
4.12. Wyniki analiz statystycznych .....	76
4.13. Suplement .....	88
5. Dyskusja .....	90
5.1. Podsumowanie wyników .....	90
5.2. Protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący szczurze wokalizacje ultradźwiękowe jako reakcję instrumentalną nie okazał się wystarczająco skuteczny .....	91
5.3. Zastosowanie modyfikacji protokołu doświadczalnego nie wpłynęło na zmianę jego skuteczności.....	95
5.4. Szczury uprzednio nagradzane za USV 50-kHz nabywają umiejętność wsadzania nosa w otwór .....	96
5.5. Szczury poddane warunkowaniu instrumentalnemu wykazują różnice w częstości wokalizacji.....	97
5.6. U szczurów potencjalnie uczących się można wyróżnić zachowania wskazujące na uczenie się.....	98
5.7. Szczury nieuczące się emitują więcej krótkich USV 22-kHz .....	100
5.8. Wokalizacje szczurów potencjalnie uczących się są coraz dłuższe .....	101
5.9. Obecnie istnieje tylko jeden protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący wokalizacje ultradźwiękowe szczurów jako obserwowane reakcje .....	101
5.10. Szczury nie uczą się odróżniać od siebie ultradźwięków o różnej częstotliwości ....	104
5.11. Podsumowanie dyskusji .....	106
6. Podsumowanie i wnioski.....	107
7. Spisy rycin i tabel.....	108
7.1. Spis rycin .....	108
7.2. Spis tabel.....	109
7.3. Spis tabel suplementu statystycznego.....	109
8. Piśmiennictwo .....	111

## Streszczenie

Szczury są zwierzętami społecznymi wykazującymi wiele zachowań regulujących funkcjonowanie w grupie. Ważnym elementem ich komunikacji międzypersonicznej są wokalizacje ultradźwiękowe (*ang. ultrasonic vocalizations, USV*), które sygnalizują stan emocjonalny osobnika. Powszechnie przyjętą jest 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 wyuczonych 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 jako nagrodę za: a. emisję USV 50-kHz; b. 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.

## Wykaz skrótów

<b>CTR</b>	szczury kontrolne
<b>WAR</b>	szczury warunkowane
<b>ITI</b>	przerwa pomiędzy próbami (ang. <i>inter-trial interval</i> )
<b>NU</b>	szczury <i>nieuczące się</i>
<b>NU-0</b>	szczury <i>nieuczące się</i> , które w żadnej sesji treningowej nie uzyskały maksymalnej liczby nagród
<b>NU-CEN</b>	szczury <i>nieuczące się</i> , które uzyskały maksymalną liczbę nagród w minimum dwóch kolejnych sesjach treningowych, lecz nie dwóch pierwszych i nie dwóch ostatnich
<b>NU-D1</b>	szczury <i>nieuczące się</i> , które uzyskały maksymalną liczbę nagród podczas pierwszej sesji treningowej, lecz nie uzyskały jej w żadnej z trzech ostatnich sesjach treningowych
<b>NU-SGL</b>	szczury <i>nieuczące się</i> , które uzyskały maksymalną liczbę nagród tylko podczas jednej sesji treningowej, lecz nie pierwszej
<b>NU-SUM</b>	szczury <i>nieuczące się</i> ; wszystkie szczury z grup NU
<b>PU</b>	szczury <i>potencjalnie uczące się</i>
<b>PU-MAX</b>	szczury <i>potencjalnie uczące się</i> , które uzyskały maksymalną liczbę nagród we wszystkich sesjach treningowych
<b>PU-PROG</b>	szczury <i>potencjalnie uczące się</i> , które uzyskały maksymalną liczbę nagród w czasie wszystkich trzech ostatnich sesji treningowych, lecz nie zdobyły jej w czasie wszystkich sesji treningowych
<b>PU-SUM</b>	szczury <i>potencjalnie uczące się</i> ; wszystkie szczury z grup PU

**P–M** oznaczenie grupy szczurów, którym prezentowano ultradźwięk o stałej częstotliwości, tzw. *plaski*, P i o częstotliwości modulowanej, M

**T–T** oznaczenie grupy szczurów, którym prezentowano dwa wygenerowane komputerowo niemodulowane ultradźwięki (tony, T) o różnej częstotliwości

**P–M + T–T** połączone grupy P–M i T–T

**USV** wokalizacje ultradźwiękowe (*ang. ultrasonic vocalizations*)

**USV 22-kHz** wokalizacje ultradźwiękowe w paśmie 22 kHz

**USV 50-kHz** wokalizacje ultradźwiękowe w paśmie 50 kHz

## **Innowacyjność rozprawy**

1. Podjęto próbę opracowania nowego protokołu warunkowania instrumentalnego szczurów wykorzystującego własne wokalizacje ultradźwiękowe jako reakcje instrumentalne.
2. Zaproponowano protokół warunkowania uproszczony względem jedyne obecnie proponowanego, który wymaga zastosowania zwierząt doświadczonych seksualnie, obecności dodatkowego szczura (samicy w rui) i wielotygodniowego treningu; a jednocześnie niezbędnymi ograniczeniami (szczur otrzymywał nagrodę dopiero po zjedzeniu poprzedniej i gdy jego głowa znajdowała się poza karmnikiem, faza treningowa trwała nie dłużej niż 14 dni).
3. Wykazanie uczenia się w ramach ww. nowego protokołu u części badanych szczurów; m.in. pokazanie skracania się czasu sesji u tych zwierząt.
4. Opisanie wybranych właściwości USV (długość, częstotliwość) emitowanych podczas całej procedury warunkowania instrumentalnego, dzielonej na trzy etapy: przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, sesji treningowych i sesji testowych.
5. Próba opracowania nowego protokołu warunkowania instrumentalnego szczurów wykorzystującego odpowiedź szczura w postaci wsadzania nosa w jeden z dwóch otworów jako reakcji w ramach rozróżniania dźwięków o różnej częstotliwości i modulacji.

## 1. Wstęp

Szczury (*Rattus norvegicus*) należą do zwierząt społecznych, które komunikują się między innymi za pomocą wokalizacji ultradźwiękowych (ang. *ultrasonic vocalizations*, USV). Dzięki postęmom metodologicznym badania nad USV szczurów ostatnich latach dynamicznie się rozwijają. Choć opisano już wiele aspektów behawioru wokalizacyjnego szczurów, takich jak kontekst, w jakim pojawiają się USV (Brudzynski i Burgdorf, 2021), czy obszary mózgu odpowiedzialne za regulację ich powstawania (Brudzynski, 2021), pytanie o dokładne funkcje USV, np. niesione przez nie znaczenie, czy uczenie się tego znaczenia przez szczura, pozostaje otwarte. W niniejszym projekcie badawczym podjęto próbę nauczania szczura wykorzystywania jego własnych wokalizacji jako pożądanых zachowań wzmacnianych nagrodą pokarmową w modelu warunkowania instrumentalnego.

Uczenie się definiowane jest jako proces poznawczy, w wyniku którego powstają nowe lub zmieniają się istniejące elementy zachowania. Podłożem tego procesu jest plastyczność układu nerwowego, czyli zdolność do reorganizacji połączeń nerwowych. Wyróżnia się uczenie percepcyjne i asocjacyjne. W uczeniu się percepcyjnym zwierzę zapoznaje się z cechami przedmiotów, takich jak barwa i kształt, tylko na podstawie informacji sensorycznej. Konsekwencją tego procesu jest pamięć rozpoznawcza, która pozwala na rozpoznanie uprzednio doświadczonych obiektów. Uczenie się asocjacyjne jest tworzeniem związków między dwoma bodźcami. By to nastąpiło, niezbędna jest zbieżność bodźców w czasie. Przykładem uczenia się asocjacyjnego jest warunkowanie instrumentalne (ang. *operant conditioning*, *instrumental conditioning*), w którym zwierzęta uczą się zależności między własnym zachowaniem a jego konsekwencjami. Efektem powstania tej zależności jest wytworzenie instrumentalnego odruchu warunkowego (Sadowski, 2012).

### 1.1. Rodzaje warunkowania

Odruch jest naturalną odpowiedzią organizmu na bodziec zewnętrzny lub wewnętrzny. Wyróżnia się dwa rodzaje odruchów: wrodzone oraz nabyte. Do odruchów wrodzonych należą te wykonywane automatycznie, niewyuczone, powstające niezależnie od warunków zewnętrznych. Dlatego odruchy te nazywa się odruchami bezwarunkowymi, a bodźce które je wywołują bodźcami bezwarunkowymi. Odruchy nabyte są wyuczone, gdyż powstają poprzez odpowiedź organizmu na bodźce środowiskowe w określonych warunkach; dlatego nazywane są odruchami warunkowymi. Odruchy warunkowe dzielone są na klasyczne oraz instrumentalne, a ich nabywanie nazywa się warunkowaniem (Sadowski, 2012).

### 1.1.1. Warunkowanie klasyczne

Warunkowanie klasyczne (ang. *classical conditioning*) jest przykładem uczenia się asocjacyjnego, w wyniku którego zachodzi tworzenie zależności między dwoma bodźcami (klasyczny odruch warunkowy). Jako pierwszy warunkowanie to opisał Iwan P. Pawłow, stąd wymiennie określane jest ono mianem warunkowania pawłowskiego. Podczas badań nad procesem trawienia u psa Pawłow zauważył, że wydzielanie śliny nie zachodzi tylko podczas spożywania pokarmu, ale także przed jego spożyciem, na jego widok, a nawet na widok człowieka podającego pokarm (Zimbardo, 2005). Wydzielanie śliny u psa w wyniku przeżuwania pokarmu jest przykładem odruchu wrodzonego. W tym przykładzie obecność pokarmu jest bodźcem bezwarunkowym (ang. *unconditioned stimulus*), a zachowanie wywołane przez ten bodziec reakcją bezwarunkową (ang. *unconditioned response*). Dalsze badania Pawłowa wykazały, że ślinienie się psa może zostać wywołane za pomocą bodźca, który nie ma żadnego związku z pokarmem. Działo się tak, kiedy psu wielokrotnie podano pokarm, jednocześnie prezentując bodziec akustyczny w postaci dźwięku dzwonka. Po jakimś czasie pies zaczynał się ślinić przy samym dźwięku dzwonka, zanim jeszcze otrzymał pokarm. W takiej sytuacji bodziec obojętny (dźwięk dzwonka) stał się bodźcem warunkowym (ang. *conditioned stimulus*), gdyż był wielokrotnie prezentowany wspólnie z bodźcem bezwarunkowym (pokarmem). Zachowanie wywołane przez bodziec warunkowy określane jest mianem reakcji warunkowej (ang. *conditioned response*). Podsumowując, aby powstał odruch warunkowy konieczne jest, by bodziec obojętny, który ma stać się bodźcem warunkowym, był zbieżny w czasie z bodźcem bezwarunkowym tak, aby zwierzę mogło nauczyć się, że między tymi bodźcami istnieje zależność. Z kolei zaprzestanie stosowania bodźca bezwarunkowego prowadzi do stopniowego wygaszania wytworzonego klasycznego odruchu warunkowego (Pavlov i Anrep, 1928).

### 1.1.2. Warunkowanie instrumentalne

Gdy Pawłow prowadził badania nad warunkowaniem klasycznym psów, Edward L. Thorndike prowadził badania nad kotami, które otrzymywały pokarm-nagrodę za wydostanie się ze skrzynek problemowych. Thorndike, obserwując relacje między zachowaniem a jego konsekwencjami, sformułował prawo efektu (ang. *law of effect*) mówiące, że jeśli dane zachowanie jest nagradzane, to utrwała się i prawdopodobnie będzie powtarzane (Thorndike, 1898). Jednym z pierwszych badaczy odruchów instrumentalnych był Jerzy Konorski, który wraz ze Stefanem Millerem w 1928 po raz pierwszy opublikował wyniki swoich obserwacji (Miller i Konorski, 1928; Miller i Konorski, 1969). Z badań Pawłowa i prawa efektu

Thorndike'a korzystał także B. F. Skinner, który prowadząc badania niezależnie od Konorskiego, został jednym z pionierów badań nad warunkowaniem instrumentalnym i twórcą procedur z nim związanych (Skinner, 1938).

Warunkowanie instrumentalne jest asocjacyjną formą uczenia się, która prowadzi do wytworzenia wyuczonej aktywnej reakcji. Zwierzęta, stosując na przykład metodę prób i błędów, uczą się zależności między własnym zachowaniem, np. naciśnięciem dźwigni, a jego konsekwencją. Zachowanie zwierzęcia prowadzi do wyzwolenia czynnika wzmacniającego (ang. *reinforcer*), który może być dla zwierzęcia przyjemny lub nieprzyjemny. Doświadczanie czynników wzmacniających powoduje wykształcenie w zwierzęciu wzmocnienia (ang. *reinforcement*) danego zachowania. Wzmocnienie pozytywne powstaje w wyniku zastosowania bodźca apetytywnego – nagrody (np. atrakcyjnego smakowo pokarmu), która zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia nagrodzonego zachowania w przyszłości. Wzmocnienie negatywne powstaje w wyniku zastosowania bodźca awersyjnego (np. impulsu elektrycznego drażniącego kończyny), który wymusza na zwierzęciu podjęcie działania celem usunięcia się spod działania bodźca bólowego (np. przejście do bezpiecznej części klatki) lub uniknięcia jego działania (naciśnięcia dźwigni wyłączającej prąd). Podobnie jak przy wzmocnieniu pozytywnym, wzmocnienie negatywne zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia takich zachowań w przyszłości, lecz efekt ten osiąga się za pomocą bodźca awersyjnego, a nie apetytywnego. Odrębną formą warunkowania instrumentalnego jest zastosowanie kary, a więc czynnika, który nie wzmacnia a osłabia prawdopodobieństwo wystąpienia danego zachowania w przyszłości (np. jeżeli szczur doświadcza w danym ramieniu labiryntu gwałtownego podmuchu powietrza lub impulsu elektrycznego, z czasem kieruje się do tego ramienia coraz rzadziej). Zastosowanie w warunkowaniu instrumentalnym czynników wzmacniających lub kary jest podstawowym elementem wytwarzania instrumentalnych odruchów warunkowych.

Gdy prawdopodobieństwo wystąpienia pożądanej reakcji jest znikoma, można zastosować środki, które sprowokują zwierzę do jej wykonania. W efekcie doprowadza się do kształtowania reakcji instrumentalnej (ang. *shaping*). Kształtowanie polega na stopniowym wzmacnianiu zachowania zwierzęcia, które doprowadzi do ostatecznej, docelowej reakcji niezbędnej w trakcie doświadczenia (Skinner, 1961; Papageorgi, 2018). Przykładem może być uczenie szczura naciskania dźwigni znajdującej się w klatce. Podczas kształtowania nagradzany będzie każdy, nawet najmniejszy ruch w stronę dźwigni. Gdy docelowe zachowanie zostanie osiągnięte, nagrody za niepełne zachowanie ustają. Metoda ta wykorzystywana jest

w pierwszych fazach warunkowania instrumentalnego, ponieważ ma na celu wytworzenie u zwierzęcia prostej asocjacji pomiędzy zachowaniem a wzmocnieniem (np. naciskania dźwigni z otrzymywaniem nagrody) (Lopuch i Popik, 2011; Davis *i wsp.*, 2016; Saito *i wsp.*, 2016; Johnson *i wsp.*, 2022).

Badania nad uczeniem się instrumentalnym przeważnie prowadzi się w klatce do warunkowania instrumentalnego (od nazwiska wynalazcy nazywanej także klatką Skinnera, Skinner, 1938). W klatce takiej znajduje się urządzenie (ang. *operandum*, Skinner, 1962), na przykład dźwignia (ang. *lever*) lub otwór na nos (ang. *nosepoke hole*), za pomocą którego zwierzę może wykonać reakcję instrumentalną. W wyniku tej reakcji następuje odpowiedź urządzenia, polegająca na pojawieniu się w klatce czynnika wzmacniającego o charakterze pozytywnym (np. granulki/pastylki pokarmu, krople wody) lub awersyjnym (np. impuls elektryczny drażniący łapy, nagły podmuch powietrza (ang. *air puff*, Dunnett i Brasted, 2001)). W zależności do potrzeb doświadczenia klatkę można odpowiednio modyfikować, tzn. zmieniać rodzaj lub liczbę urządzeń; dodatkowo oprogramowanie zapewnia automatyzację przebiegu doświadczenia. Choć warunkowanie instrumentalne z wykorzystaniem jako narzędzia wymienionych wyżej *operanda* jest stosowane powszechnie, można rozważać, na ile zachowania takie jak naciskanie dźwigni są naturalnymi zachowaniami występującymi u szczurów. Być może proces warunkowania instrumentalnego można uprościć zastępując klasyczne *operandum*, czyli instrument wykorzystywany do osiągnięcia nagrody lub uniknięcia kary, naturalną odpowiedzią szczura na niektóre bodźce – np. USV.

## 1.2. Wokalizacje ultradźwiękowe szczurów

Szczury porozumiewają się między sobą za pomocą wokalizacji ultradźwiękowych. Podstawowymi właściwościami akustycznymi USV są: długość, częstotliwość oraz modulacje częstotliwości w czasie. USV emitowane przez dorosłe szczury dzieli się na dwie kategorie: USV pasma 50 kHz oraz pasma 22 kHz, których nazwy wynikają z przeciętnej częstotliwości wokalizacji w tym paśmie. USV pasma 50 kHz (USV 50-kHz) i 22 kHz (USV 22-kHz) różnią się między sobą nie tylko właściwościami akustycznymi, lecz także pochodzeniem (obszarami mózgu i neuroprzekaznikami zaangażowanymi w ich powstawanie) oraz kontekstem, w jakim są emitowane (Knutson *i wsp.*, 2002). Zakres częstotliwości tych wokalizacji wykracza poza zakres słyszalności człowieka, można je jednak rejestrować za pomocą specjalistycznych urządzeń i analizować w formie wizualnej za pomocą spektrogramów (MacDonald T., 2018).



### 1.2.1. Charakterystyka USV 50-kHz

USV 50-kHz uznaje się powszechnie za USV towarzyszące sytuacjom apetytywnym (Brudzynski, 2015). Za ich emisję odpowiada mezo limbiczny szlak dopaminergiczny, którego pobudzenie powoduje wydzielanie dopaminy w jądrze półleżącym i strukturach sąsiednich (Burgdorf *i wsp.*, 2007; Brudzynski, 2009). Ultradźwięki tej kategorii towarzyszą sytuacjom nieagresywnym, takim jak: zabawa z innym osobnikiem (Knutson *i wsp.*, 1998; Kisko *i wsp.*, 2017), łaskotanie (ang. *tickling*) – metoda badawcza imitująca zabawę z innym osobnikiem (Panksepp i Burgdorf, 2000; Panksepp i Burgdorf, 2003; Hori *i wsp.*, 2013), spotkanie samca z samicą (Bialy *i wsp.*, 2000), eksplorowanie klatki ze świeżą ściółką (McGinnis i Vakulenko, 2003; Natusch i Schwarting, 2010) lub ściółką z zapachem innego szczura (Brudzynski i Pniak, 2002; Wöhr *i wsp.*, 2008), czy możliwość otrzymania nagrody pokarmowej (Burgdorf *i wsp.*, 2000). Postuluje się, że USV 50-kHz mogą być odpowiednikiem ludzkiego śmiechu (Panksepp i Burgdorf, 2003; Panksepp, 2007).

Częstość emisji (ang. *call rate*) USV 50-kHz rośnie w wyniku pobudzenia ośrodka nagrody, zarówno substancjami chemicznymi, jak i obecnością innych osobników, a nawet antycypacją takiej obecności. Częstość emisji USV 50-kHz rośnie po podaniu szczurom substancji psychoaktywnych: kokainy (Wintink i Brudzynski, 2001; Browning *i wsp.*, 2011; Maier *i wsp.*, 2012), amfetaminy (Knutson *i wsp.*, 2002; Thompson *i wsp.*, 2006; Brudzynski *i wsp.*, 2011) lub morfiny (Burgdorf *i wsp.*, 2001). Również otrzymanie słodkiej nagrody pokarmowej wywołuje wzrost częstości emisji USV 50-kHz u szczurów (Browning *i wsp.*, 2011). Obfitą emisję USV 50-kHz wywołuje także ekspozycja szczura na USV zarejestrowane u innego osobnika, a następnie odtworzone za pomocą głośnika; w sytuacji takiej szczur badany doświadcza wyłącznie wokalizacji innego osobnika, nie doświadczając jego obecności węchem i wzrokiem. W takiej sytuacji szczury mogą emitować znaczne ilości USV 50-kHz (Olszyński *i wsp.*, 2020; Olszyński *i wsp.*, 2021), lecz emisja ta może nie nastąpić, jeśli otoczenie szczura nie jest dla niego komfortowe (np. gdy przebywa w potencjalnie stresującym labiryncie, Wöhr i Schwarting, 2007). USV 50-kHz cechują się częstotliwością (ang. *peak frequency of average spectrum*, częstotliwość w maksimum uśrednionego widma) w zakresie 35-80 kHz oraz długością w zakresie 10-150 ms (Brudzynski, 2013). Ich cechą charakterystyczną jest wysoki stopień zróżnicowania: nie tylko ze względu na częstotliwość, ale także na modulację częstotliwości. Co ważne, zróżnicowanie to nie posiada jeszcze przypisanego znaczenia biologicznego. Powszechnie USV 50-kHz dzieli się na dwie główne podkategorie: dźwięki płaskie (ang. *flat calls*), tj. o stałej częstotliwości, oraz dźwięki modulowane (ang. *frequency-*

*modulated calls*) o różnym stopniu modulacji częstotliwości dźwięku. Podział na dwie główne podkategorie nie jest w stanie opisać złożoności odmian USV 50-kHz, jednakże nie istnieje jedna ogólnie przyjęta bardziej zaawansowana klasyfikacja podtypów USV 50-kHz. Stosowane klasyfikacje opierają się na podstawie: kryteriów wizualnych, w ramach których USV 50-kHz dzielone są na podstawie ich kształtu na spektrogramie (Wöhr *i wsp.*, 2008; Wright *i wsp.*, 2010); kryteriów akustycznych, tj. wymienionych wcześniej długości i częstotliwości (White *i wsp.*, 1990; Schwarting *i wsp.*, 2007; Barker *i wsp.*, 2010); nowatorskich technik klastrowania (Takahashi *i wsp.*, 2010; Karwicka *i wsp.*, 2021). Stosując techniki klastrowania Takahashi *i wsp.* wyróżnili grupę płaskich USV 50-kHz o częstotliwości 35-50 kHz, która ma współwystępować z przyjmowaniem pokarmu i pojawiać się w chwili otrzymywania pokarmu jako nagrody (Takahashi *i wsp.*, 2010).

### **1.2.2. Charakterystyka USV 22-kHz**

USV 22-kHz uznaje się za związane z sytuacjami awersyjnymi (Brudzynski, 2015). Za ich emisję odpowiada szlak cholinergiczny, którego pobudzenie powoduje wydzielanie acetylocholiny w międzymózgowiu i przodomózgowiu (Brudzynski i Bihari, 1990; Brudzynski, 2001; Brudzynski, 2009). Ultradźwięki tej kategorii występują podczas warunkowania strachu (Wöhr *i wsp.*, 2005) i ekspozycji na głośny bodziec akustyczny (Kaltwasser, 1990; Kaltwasser, 1991). Występują także w odpowiedzi na niespodziewany podmuch powietrza (Brudzynski i Holland, 2005), zapach drapieźnika (Blanchard *i wsp.*, 1991) oraz podczas agresywnej konfrontacji dwóch samców (Thomas *i wsp.*, 1983; Panksepp *i wsp.*, 2004). Postuluje się, że USV 22-kHz mogą być traktowane jako odpowiednik płaczu u człowieka (Brudzynski, 2019).

USV 22-kHz cechują się częstotliwością w zakresie od 18 do 32 kHz i znacznym zróżnicowaniem długości. Dzielone są na dwie kategorie: długie USV 22-kHz o długości powyżej 300 ms oraz krótkie USV 22-kHz o długości poniżej 300 ms (Brudzynski *i wsp.*, 1993). Istnieje powszechna zgoda co do uznawania długich USV 22-kHz jako sygnału informującego inne osobniki o potencjalnym zagrożeniu (Brudzynski, 2021). Krótkim USV 22-kHz nie przypisano jeszcze znaczenia. Wiadomo, że powstają one w sytuacji przyjmowania przez szczury kokainy (Barker *i wsp.*, 2010) oraz podczas kontaktu zwierzęcia z nieznanym mu eksperymentatorem (Brudzynski *i wsp.*, 1993). Sugeruje się, że krótkie USV 22-kHz mogą odzwierciedlać negatywny stan wewnętrzny szczura, niezwiązany z występowaniem bezpośredniego zagrożenia pochodzącego z otoczenia (Brudzynski, 2015; Robakiewicz *i wsp.*, 2019; Karwicka *i wsp.*, 2021).

### **1.3. Wykorzystanie wokalizacji ultradźwiękowych w warunkowaniu instrumentalnym**

Próby wykorzystania USV w warunkowaniu instrumentalnym są nieliczne. Obejmują dwa rodzaje doświadczeń: wykorzystanie uprzednio nagranych USV (odtworzanych podczas doświadczenia z głośnika) jako bodźca akustycznego oraz nagradzanie emisji USV 50-kHz. W pierwszym przypadku (podczas prezentacji USV z głośnika) wykorzystywano zarówno USV 50-kHz, jak i USV 22-kHz. USV te prezentowano w formie niezmienionego nagrania, jak i wersji zmodyfikowanej przez oprogramowanie.

#### **1.3.1. Wokalizacje ultradźwiękowe jako bodziec w warunkowaniu instrumentalnym**

Zarażenie emocjonalne (ang. *emotional contagion*) jest procesem przejmowania stanu emocjonalnego od innych; przenoszenie stanu emocjonalnego między szczurami odbywa się za pośrednictwem USV (Brudzynski, 2013). Zespół Saito i wsp. badał zjawisko wpływu prezentowanych USV na stan emocjonalny szczurów wykorzystując warunkowanie instrumentalne. W pierwszej fazie doświadczenia zwierzęta uczono odpowiedzi na prezentowane z głośnika dwa tony o częstotliwości 2 kHz i 9 kHz. Szczur uczył się odpowiadać na pierwszy z nich naciśnięciem przypisanej mu dźwigni, w wyniku czego otrzymywał nagrodę (wzmocnienie pozytywne), a na drugi – naciśnięciem innej dźwigni, w wyniku czego unikał szumu z głośnika (wzmocnienie negatywne). W drugiej fazie doświadczenia szczurowi prezentowano ton o częstotliwości pośredniej między dwoma tonami użytymi do warunkowania w fazie pierwszej (4, 6 lub 8 kHz). Dodatkowo, przed zaprezentowaniem tonu o częstotliwości pośredniej szczur przez 20 min eksponowany był na nagranie albo USV 50-kHz, albo USV 22-kHz. Okazało się, że szczury, które przed prezentacją tonu o częstotliwości pośredniej słyszały apetytywne USV 50-kHz, częściej naciskały dźwignię kojarzoną z nagrodą, natomiast te, które uprzednio słyszały awersyjne USV 22-kHz, częściej naciskały dźwignię kojarzoną z unikaniem kary. Doświadczenie to pokazało, że USV apetytywne lub awersyjne, pochodzące od innych szczurów, mogą wpływać na stan emocjonalny u szczurów eksponowanych na te USV (Saito i wsp., 2016).

W kolejnym doświadczeniu tego samego zespołu badano jaka właściwość USV decyduje o odbieraniu ich jako dźwięki kojarzone z sytuacjami apetytywnymi lub awersyjnymi. W tym celu zarejestrowano USV 50-kHz i USV 22-kHz emitowane przez szczury, a następnie poddano je obróbce cyfrowej, zmieniając ich podstawowe właściwości akustyczne (długość, częstotliwość, modulacje częstotliwości) w ten sposób, by USV 50-kHz upodobnić do USV 22-kHz i odwrotnie. W pierwszej fazie doświadczenia zwierzęta uczono odpowiedzi na

prezentowane z głośnika naturalne (nieedytowane) USV 50-kHz i USV 22-kHz w formie naciśnięcia jednej z dwóch dźwigni. Jeżeli zwierzę nacisnęło dźwignię prawidłową – otrzymywało nagrodę, jeżeli nieprawidłową – karane było szumem. W efekcie takiej nauki wybór dźwigni przez szczura po usłyszeniu przez niego dźwięku mógł być interpretowany przez eksperymentatora jako uznanie przez szczura tego dźwięku za apetytywny lub awersyjny. W drugiej fazie doświadczenia prezentowano szczurom USV ze zmodyfikowanymi właściwościami. Wyniki pokazały, że spośród trzech zmienionych właściwości to częstotliwość stanowi główne źródło informacji o charakterze prezentowanego ultradźwięku (Saito *i wsp.*, 2019).

Podobne badania nad rozróżnianiem dźwięków przeprowadzono u myszy. Wybrano pięć USV emitowanych przez myszy podczas kontaktu z innym osobnikami, a następnie zmodyfikowano je manipulując ich długością, częstotliwością i modulacją częstotliwości, tworząc osiem wersji każdej USV. W doświadczeniu uczono myszy odróżniać od siebie różne USV pod względem właściwości oraz USV zmodyfikowane od ich oryginalnych wersji, stosując otwory na nos. Autorzy odkryli, że zwierzęta są w stanie odróżniać te USV od siebie. Na podstawie wyników tych badań zasugerowano, że różniące się od siebie USV myszy mogą mieć odmienne dla tych zwierząt znaczenie behawioralne. Wyniki te otrzymano jednak po około dwunastu miesiącach doświadczenia, podczas których przez pięć lub sześć dni w tygodniu przeprowadzano dwie 30-minutowe sesje treningowe raz dziennie (Neilans *i wsp.*, 2014).

Ten sam zespół przeprowadził również badania na pięciu samicach myszy, które miały odróżnić niekompletne wersje USV lub sztucznie wygenerowane tonu od oryginalnych wersji tych samych USV. W każdej próbie mysz słyszała jedną (oryginalną) wokalizację prezentowaną wielokrotnie. Jej zadaniem było wskazanie, kiedy pojawił się nowy typ prezentowanego USV (niekompletna wersja USV lub komputerowo wygenerowany ton). Wyniki tego doświadczenia otrzymano po około 12 miesiącach i pokazały one, że myszy miały pewne trudności z odróżnieniem prezentowanych USV od siebie, zwłaszcza wtedy, gdy prezentowano początkowy fragment USV. Ta obserwacja sugeruje, że myszy postrzegają początkowe, a nie końcowe, fragmenty ultradźwięku, jako te podobne do oryginalnej wersji, co jest zgodne z podobnymi wynikami badań przeprowadzonymi u ludzi i ptaków (Holfoth *i wsp.*, 2014).

Pokazano także, że szczury są w stanie rozpoznać od jakiego szczura pochodzą prezentowane USV. W pierwszym doświadczeniu szczury mogły wybrać za pomocą dźwigni, czy preferują

prezentowane USV 50-kHz pochodzące od obcego szczura, czy USV pochodzące od szczura z tej samej klatki co szczur badany. Wyniki tego badania pokazały, że szczury preferowały USV pochodzące od obcego szczura. W drugim doświadczeniu szczury musiały nacisnąć dźwignię, by otrzymać dawkę kokainy. Naciśnięcie dźwigni pierwszy raz powodowało prezentację USV 50-kHz, USV 22-kHz lub szumu. Naciśnięcie dźwigni piąty raz skutkowało otrzymaniem dawki kokainy. Prezentowane USV lub szum służyły jako bodźce hamujące lub stymulujące przyjmowanie kokainy. Wyniki drugiego doświadczenia pokazały, że prezentacja USV pochodzących od obcego szczura zmniejszyła przyjmowanie narkotyków przez szczury (Vielle i wsp., 2021).

Badania prowadzone z wykorzystaniem wokalizacji ultradźwiękowych jako bodźca akustycznego pokazały, że zarówno szczury, jak i myszy są w stanie odróżniać od siebie prezentowane dźwięki na podstawie ich długości, częstotliwości i modulacji częstotliwości. W przypadku szczurów pokazały również, że zaprezentowane dźwięki mogą wpływać na stan emocjonalny tych zwierząt. Nie bez znaczenia okazało się także pochodzenie prezentowanych USV. Pokazano, że szczury preferują prezentowane USV pochodzące od obcego szczura, a nie szczura znajomego szczurowi badanemu.

### **1.3.2. Wokalizacje ultradźwiękowe jako reakcja instrumentalna**

Obecnie istnieje tylko jeden model warunkowania, w którym wykorzystuje się szczurze USV jako reakcje instrumentalne. Wykorzystuje on także popęd seksualny szczurów i przynosi efekty stopniowo w ciągu kilku tygodni trwania treningów.

W doświadczeniach grupy Ciucci i wsp. celem warunkowania było zwiększenie częstości wokalizowania, a także zmiany modulacji częstotliwości i poziomu natężenia dźwięków, samców szczurów poddanych działaniu neurotoksyny wywołującej objawy choroby Parkinsona. Neurotoksyna taka znacznie ogranicza liczbę emitowanych USV i wpływa na ich właściwości. Warunkowanie instrumentalne miało doprowadzić do odwrócenia niekorzystnych zmian: przywrócenia częstości wokalizowania i właściwości USV z czasu przed wywołaniem choroby. Trening przeprowadzano pięć dni w tygodniu przez cztery tygodnie. Podczas sesji treningowych samce szczurów Long-Evans były łączone z samicą w rui, która stanowiła dla samców bodziec „wywołujący” (ang. *elicitation cue*, Skinner, 1953), wywołujący emisję USV. Samiec był nagradzany za każde pięć wyemitowanych USV nagrodą w postaci porcji wody, której wcześniej był pozbawiony. Nagroda w postaci wody była połączona z kliknięciem i w trakcie trwania kolejnych treningów odchodzono od ograniczania szczurom wody i nagradzano

je podczas treningów wyłącznie samym kliknięciem. Zaprezentowany wynik wstępny w postaci spektrogramów ma wskazywać na stopniowe wracanie właściwości wokalizacji do poziomu sprzed podania neurotoksyny, jednak w pracy nie pokazano szczegółowych danych dotyczących treningu i właściwości wokalizacji ze wszystkich etapów doświadczenia (Ciucci *i wsp.*, 2010).

W wyniku kolejnych doświadczeń ten sam zespół przedstawił szczegółowy protokół nagradzania szczurów za ich własne USV. Podstawą warunkowania są sesje treningowe w klatce domowej. Samica stanowi apetytywny bodziec „wywołujący” emisję USV, za które to USV samce są nagradzane. Stwierdzono, że nagradzając szczura za emisję modulowanych USV 50-kHz przez sześć tygodni można zwiększyć częstość wokalizowania (Johnson *i wsp.*, 2011). Protokół ten jest wykorzystywany w doświadczeniach przeprowadzonych w badaniach wokalizacji u szczurów w modelach chorób wywołujących deficyty w mowie lub w modelach starzenia się, ponieważ w przypadku takich modeli obserwuje się zmiany zachodzące we właściwościach USV. Przy pomocy tego protokołu podejmuje się próby odwrócenia zachodzących zmian w emitowanych USV, takich jak modulacja częstotliwości, długość i poziom natężenia dźwięku (Johnson *i wsp.*, 2013; Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016; Lenell *i wsp.*, 2019; Shembel *i wsp.*, 2021).

Protokół doświadczalny w wyżej omówionych pracach opiera się na bezpośrednim kontakcie samca z samicą oraz na niezautomatyzowanym nagradzaniu USV wybranych przez eksperymentatora, śledzącego doświadczenie w czasie rzeczywistym. W kolejnej pracy zespołu A.M. Johnsona (Johnson *i wsp.*, 2022) zaproponowano częściową automatyzację tego protokołu, wykorzystującą klatkę do warunkowania instrumentalnego oraz system detekcji USV. W tym doświadczeniu wykorzystano także niebezpośredni kontakt badanych samców z samicą (przez siatkę) lub zapach samicy, który pochodził ze ściółki umieszczonej w wodzie (ściółkę pobierano od różnych samic, aby utrzymać efekt nowości). Zapach wprowadzano do klatki za pomocą specjalnego wodnego modułu rozprowadzającego zapach co 1 sekundę. Zapach samicy lub jej fizyczną obecność stosowano przez pierwsze tygodnie treningowe, wycofując w chwili, gdy u samców szczurów doszło do asocjacji pomiędzy bodźcami (wokalizowanie z otrzymywaniem nagrody). Nadal jednak samce wykorzystywane w doświadczeniu były doświadczane seksualnie przed rozpoczęciem sesji treningowych. Doświadczenie seksualne samców miało zapewnić właściwą odpowiedź w postaci wokalizacji USV 50-kHz, które podczas treningu wzmacniano nagrodą w postaci sacharozowej pastylki. W efekcie trwająca sześć tygodni procedura zautomatyzowana powoduje podobny wzrost

liczby USV u trenowanych szczurów do wzrostu jaki nastąpił w przypadku wcześniej stosowanej procedury manualnej (Lenell *i wsp.*, 2019; Johnson *i wsp.*, 2022).

#### **1.4. Podsumowanie**

Omówione powyżej prace, wykorzystujące USV szczurów jako obserwowane reakcje w warunkowaniu instrumentalnym, wskazują na uzasadnione wykorzystanie takiego warunkowania w badaniach nad szczurzymi modelami chorób ludzkich. Zmiany w wokalizowaniu mogą być traktowane jako odpowiednik deficytów komunikacji werbalnej ludzi.

W niniejszym projekcie postanowiono zastąpić wykorzystanie przez szczura urządzenia dostępnego w klatce do warunkowania jego własną wokalizacją w paśmie 50 kHz. W wyniku takiego warunkowania szczury powinny wzmacniać emisję USV 50-kHz w efekcie uzyskiwania nagrody pokarmowej. W ramach motywowania szczura do poszukiwania takiej nagrody konieczne jest ograniczenie dostępu do pokarmu przed sesją treningową.

Obecnie istniejący model warunkowania instrumentalnego, wykorzystującego szczurze USV wymaga wcześniejszego przygotowania samców szczurów, polegającego na łączeniu ich z samicą w rui, a następnie fizycznego kontaktu samca z samicą (bezpośredniego lub pośredniego) oraz procedury treningowej trwającej od czterech do ośmiu tygodni. Z powodu złożoności i czasochłonności istniejącego protokołu podjęto próbę utworzenia nowego, trwającego znacznie krócej.

## **2. Cel pracy**

Celem badań było zaprojektowanie protokołu warunkowania instrumentalnego, wykorzystującego szczurze wokalizacje ultradźwiękowe pasma 50-kHz jako obserwowane reakcje i opisanie długości oraz częstotliwości USV pojawiających się u szczurów w trakcie warunkowania. Dodatkowo, wobec niepowodzenia ww. badań, kolejnym celem badań było pokazanie, że wyodrębniona grupa zwierząt uległa skutecznemu warunkowaniu w ww. protokole.



### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Zwierzęta

W doświadczeniach wykorzystano samce szczurów stada Wistar (warunkowane, WAR n = 84, kontrolne, CTR n = 44, łącznie n = 128), pochodzące z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Doświadczenia przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (pozwolenie nr 109/2019). Zwierzęta trzymano w pokoju przeznaczonym do chowu z 12-godzinnym podziałem doby w temperaturze 22-25°C. Szczury w momencie przybycia do laboratorium osiągnęły wiek 7-8 tygodni i chowane były w parach ze stałym dostępem do wody i paszy.

#### 3.2. Klatka do warunkowania

Doświadczenia przeprowadzane były w klatce do warunkowania instrumentalnego (Med Associates Inc., Fairfax, VT, Stany Zjednoczone) wyposażonej w pojemnik na pastylki oraz podajnik pokarmu, która obsługiwana była za pomocą oprogramowania Med-PC® V (wersja 5.08, Med Associates Inc.). Dodatkowo w klatce umieszczono mikrofon rejestrujący USV oraz głośnik odtwarzających ultradźwięki (Avisoft Bioacoustics, Glienicke/Nordbahn, Niemcy) obsługiwane za pomocą programu Recorder USGH (wersja 1.0.0.1, Avisoft Bioacoustics). Obraz wideo rejestrowano kamerą FLIR® (Teledyne FLIR LCC, Wilsonville, OR, Stany Zjednoczone) obsługiwaną programem Spinnaker® SDK (wersja 1.15.0.63, Teledyne FLIR LCC) lub za pomocą kamery Basler (acA1300-60gc, Basler AG, Ahrensburg, Niemcy) obsługiwaną za pomocą programu EthoVision XT (wersja 10, Noldus, Wageningen, Holandia). Jako nagrody w warunkowaniu stosowano niearomatyzowane pastylki sacharozowe o masie 45 mg (TestDiet®, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone). W czasie doświadczeń, przed włożeniem każdego zwierzęcia, klatka była przemywana roztworem 10% EtOH, a następnie dokładnie wycierana.

#### 3.3. Schematy protokołów doświadczalnych

Każdy z protokołów doświadczalnych składał się z trzech faz: czynności przygotowawczych, treningu i testu.

##### 3.3.1. Warunkowanie instrumentalne wykorzystujące szczurze wokalizacje ultradźwiękowe jako pożądane reakcje

W fazie czynności przygotowawczych szczury były przyzwyczajone do nowego miejsca, następnie do eksperymentatora i do pastylek sacharozowych. Pastylki sacharozowe (10 sztuk) podawano szczurom do klatki domowej, by zapobiec ewentualnej neofobii pokarmowej w fazie

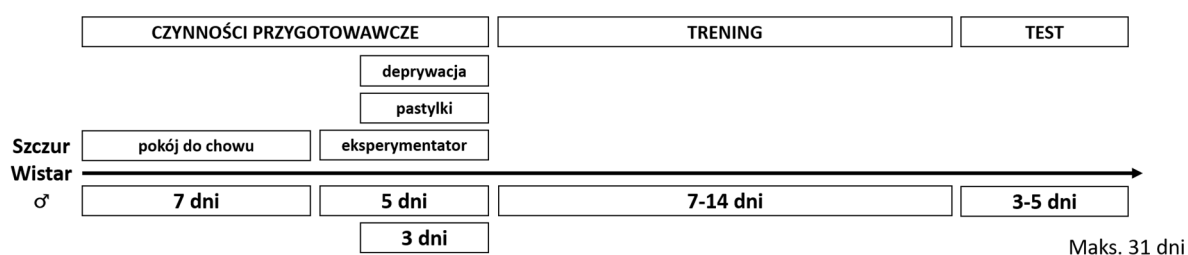
treningu. Zwierzęta przed warunkowaniem były poddane deprivacji pokarmowej; szczur otrzymywał taką ilość paszy na dobę, która pozwoliła mu na utrzymanie ok. 90-95% masy ciała osiąganą przy dostępie do paszy *ad libitum*. By umożliwić monitorowanie ilości spożywanej paszy, zwierzęta przed rozpoczęciem deprivacji pokarmowej rozdzielano do osobnych klatek.

W fazie treningowej zastosowano jeden z dwóch modeli warunkowania:

- I. wzmacniano emitowanie USV 50-kHz niezależnie od kontekstu; szczur otrzymywał nagrodę za emisję USV 50-kHz wyłącznie wtedy, kiedy jego nos znajdował się poza podajnikiem pokarmu (doświadczenia 1-6, WAR  $n = 76$ , CTR  $n = 36$ );
- II. wzmacniano emitowanie USV 50-kHz wyłącznie w odpowiedzi na USV 50-kHz emitowane z głośnika (doświadczenie 7, WAR  $n = 8$ , CTR  $n = 8$ );

Sesja treningowa odbywała się raz dziennie i kończyła się w momencie osiągnięcia maksymalnej liczby nagród przez szczura lub (jeśli warunek ten nie został spełniony) po maksymalnym czasie 15 min. Szczury kontrolne nie otrzymywały nagród w trakcie sesji treningowej.

W fazie testowej sprawdzano wyuczoną umiejętność. Sesja testowa odbywała się raz dziennie i trwała 5 min (dla szczurów, u których wzmacniano emitowanie USV 50-kHz oraz szczurów z grupy kontrolnej) lub 10 min (dla szczurów, u których wzmacniano emitowanie USV 50-kHz wyłącznie w odpowiedzi na USV 50-kHz emitowane z głośnika i szczurów należących do grupy kontrolnej). W czasie testu szczur nie otrzymywał nagród.



**Ryc. 1. Ogólny schemat doświadczenia.** Każdy z protokołów doświadczalnych składał się z trzech faz: czynności przygotowawczych, treningu i testu. Wymienione na schemacie czynności podczas wykonywania doświadczeń 1-6 nie podlegały modyfikacjom.

**Tabela 1. Zestawienie zmian wprowadzanych do protokołu doświadczalnego podczas przeprowadzania doświadczeń 1-6. Zmiany względem poprzedniego protokołu doświadczanego wytłuszczono. WAR – szczury warunkowane, CTR – szczury kontrolne.**

Protokół	Liczebność			Deprywacja pokarmowa [%]	Habitacja do klatki doświadczalnej	Faza doby	Maksymalna liczba nagród	Liczba sesji		Pomoce w kształtowaniu reakcji instrumentalnej
	w sumie	WAR	CTR					trening	test	
1	16	8	8	95	nie	jasna	10	10	3	brak
2	16	8	8	<b>90</b>	nie	jasna	10	<b>14</b>	3	brak
3	20	10	10	90	nie	jasna	10	14	3	<b>ściółka, playback USV</b>
4	20	10	10	90	nie	jasna	<b>30</b>	14	3	ściółka, playback USV
5	20	20	0	90	nie	<b>ciemna</b>	30	14	3	ściółka, playback USV
6	20	20	0	90	<b>tak</b>	ciemna	30	<b>7</b>	3	<b>brak</b>

### **3.3.1.1 Protokół 1**

Szczury (WAR n = 8, CTR n = 8) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 95%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Przeprowadzono 10 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 10 nagród. Szczury z grupy kontrolnej spędzały w klatce do warunkowania 15 min.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Faza testu składała się z pięciu sesji.

### **3.3.1.2 Protokół 2**

Szczury (WAR n = 8, CTR n = 8) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Przeprowadzono 14 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 10 nagród. Szczur kontrolny spędzał w klatce do warunkowania tyle czasu, ile szczur warunkowany z jego pary.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji.

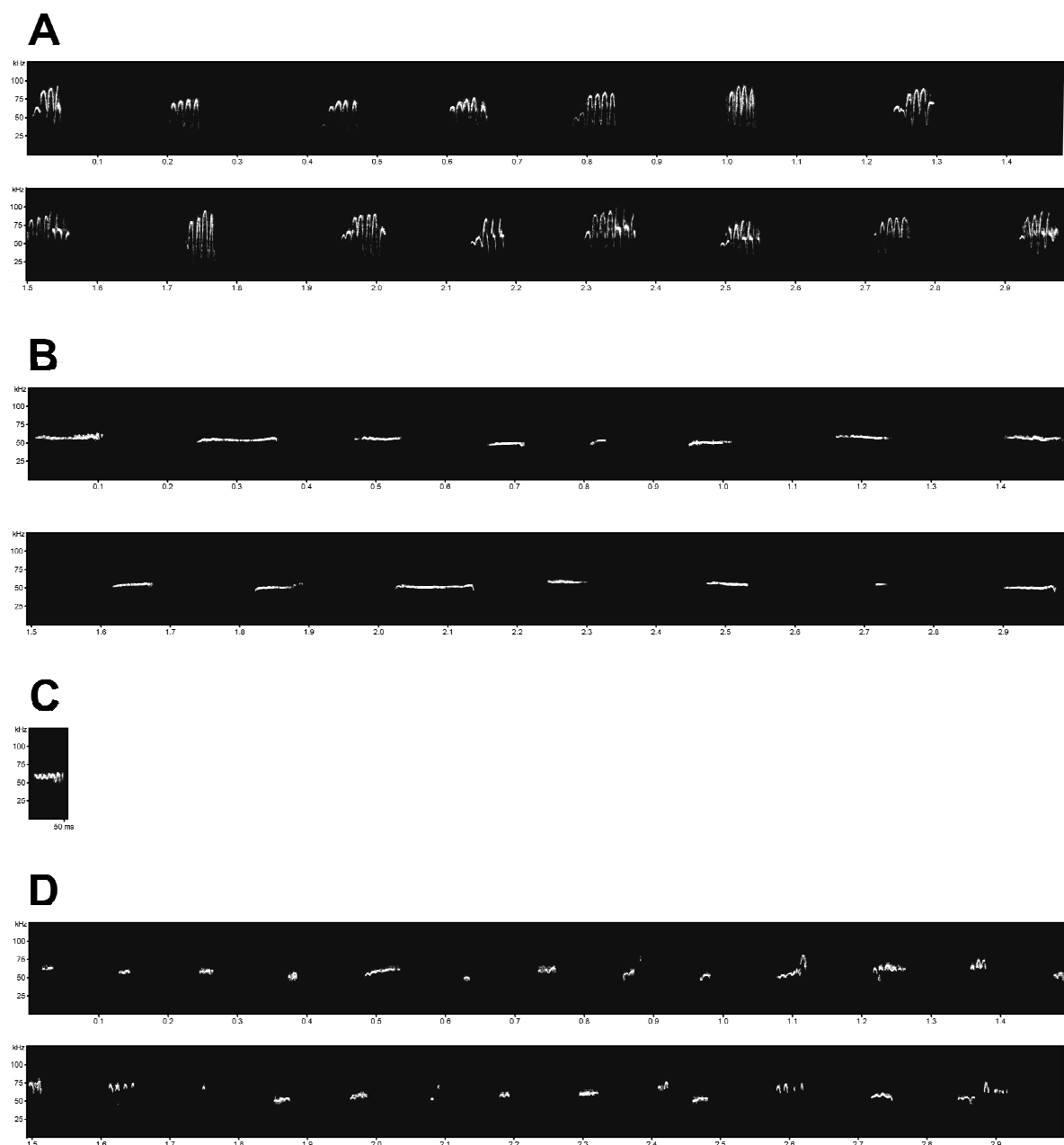
### **3.3.1.3 Protokół 3**

Szczury (WAR n = 10, CTR n = 10) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Przeprowadzono 14 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie

10 nagród. Szczur kontrolny spędzał w klatce do warunkowania tyle czasu, ile szczur warunkowany z jego pary. Podczas sesji treningowych zastosowano pomoce w kształtowaniu reakcji instrumentalnej: ściółkę za zapachem innego szczura oraz USV odtwarzane z głośnika. Ultradźwięki pochodziły z nagrań jednostronnej interakcji socjalnej szczurów, dźwięki zostały oczyszczone z szumów, wydzielone z nagrań, a następnie ułożone w sekwencję do odtwarzania. Nagrania te emitowano w sytuacji, gdy podczas sesji treningowej szczur nie wokalizował przez 90 s. Jeżeli szczur po odtworzeniu nagrania nie wokalizował przez kolejne 90 s, odtwarzano inny zestaw USV. Łącznie w doświadczeniu wykorzystano trzy nagrania USV, każdorazowo prezentowane w ustalonej kolejności:

- USV modulowane, sekwencja 15 dźwięków (długość 40,4-73,7 ms, średnia długość  $53,6 \pm 2,7$  ms; częstotliwość 57,1-78,1 kHz, średnia częstotliwość  $68,3 \pm 1,6$  kHz), czas trwania 3 s (Ryc. 2A);
  - USV niemodulowane, sekwencja 15 dźwięków (długość 15,8-116,7 ms, średnia długość  $68,3 \pm 7,3$  ms; częstotliwość 48,3-58,1 kHz, średnia częstotliwość  $53,6 \pm 0,8$  kHz), czas trwania 3 s (Ryc. 2B);
  - USV modulowany, 1 dźwięk (długość 41,4 ms, częstotliwość 59,4 kHz), czas trwania 0,05 s (Ryc. 3C, Tab. 4).
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji.



**Ryc. 2.** Spektrogramy nagrań USV emitowanych jako pomoc (protokoły 3-5) oraz jako bodziec warunkowany (protokół 7). **A.** Długość nagrania 3 s, 15 USV modulowanych, wykorzystane w protokołach 3-5. **B.** Długość nagrania 3 s, 15 USV niemodulowanych, wykorzystane w protokołach 3-5. **C.** Długość nagrania 0,05 s, 1 USV modulowany, wykorzystane w protokołach 3, 4, 7. **D.** Długość nagrania 3 s, 24 USV modulowane, wykorzystane w protokole 5.

### 3.3.1.4 Protokół 4

Szczury (WAR  $n = 10$ , CTR  $n = 10$ ) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%.

- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Przeprowadzono 14 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 30 nagród. Szczur kontrolny spędzał w klatce do warunkowania tyle czasu, ile szczur warunkowany z jego pary. Zastosowano pomoce w kształtowaniu reakcji instrumentalnej: ściółkę za zapachem innego szczura oraz USV emitowane z głośnika (te same co w doświadczeniu 3, Ryc. 2A-C).
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji.

### 3.3.1.5 Protokół 5

Szczury (WAR  $n = 20$ ) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprywacji pokarmowej na poziomie 90%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby. Przeprowadzono 14 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 30 nagród. Zastosowano pomoce w kształtowaniu reakcji instrumentalnej: ściółkę za zapachem innego szczura oraz USV emitowane z głośnika według zasad opisanych w protokole 3 (rozdz. 3.3.1.3). Nagranie pierwsze i drugie było tożsame z nagraniem pierwszym i drugim w protokole 3, wykorzystano jednak inne nagranie trzecie w kolejności:
  - USV modulowane, sekwencja 15 dźwięków, czas trwania 3 s (Ryc. 2A);
  - USV niemodulowane, sekwencja 15 dźwięków, czas trwania 3 s (Ryc. 2B);
  - USV modulowane, sekwencja 24 dźwięków (długość 5,1-72,3 ms, średnia długość  $29,2 \pm 3,6$  ms; częstotliwość 49,2-73,4 kHz, średnia częstotliwość  $58,9 \pm 1,3$  kHz), czas trwania 3 s (Ryc. 2D); dźwięki pozyskano z nagrania szczura eksplorującego klatkę z zapachem innego osobnika.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji.

### 3.3.1.6 Protokół 6

Szczury (WAR  $n = 20$ ) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

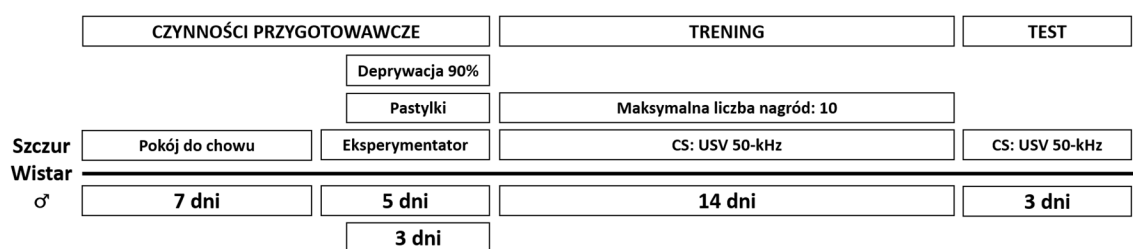
- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych oraz do klatki doświadczalnej. Szczury podzielono na dwie grupy: szczury warunkowane w klatce z poprzednich doświadczeń ( $n = 10$ ) oraz szczury warunkowane w klatce identycznej z klatką do chowu ( $n = 10$ ), odpowiednio przystosowaną do przeprowadzenia warunkowania (zainstalowany podajnik pokarmu, mikrofon oraz kamera). Przyzwyczajanie do miejsca przeprowadzania warunkowania (odpowiednio: klatki do warunkowania lub klatki tożsamej z klatką do chowu) trwało 3 min i przeprowadzane było raz dziennie przez cztery dni. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby. Przeprowadzono 7 sesji treningowych, podczas których szczur otrzymywał maksymalnie 30 nagród.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji.

### 3.3.1.7 Protokół 7

Szczury (WAR  $n = 8$ , CTR  $n = 8$ ) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem bodźca warunkowego (CS, ang. *conditioned stimulus*) w postaci emitowanego z głośnika pojedynczego USV 50-kHz (Ryc. 2C) z zastosowaniem poniższych warunków:

- Podczas fazy czynności przygotowawczych były przyzwyczajane do pokoju do chowu, eksperymentatora, pastylek sacharozowych, lecz nie do klatki doświadczalnej. Zwierzęta zostały poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%.
- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Przeprowadzono 14 sesji treningowych, podczas których szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 10 nagród. Z głośnika prezentowany był jeden modulowany ultradźwięk (zastosowany w protokołach 3 i 4, Ryc. 2C) w interwałach czasowych 20 – 10 – 30 s. Szczur otrzymywał nagrodę, kiedy odpowiedział na ultradźwięk emitowany z głośnika własnymi USV. Szczur kontrolny spędzał w klatce do warunkowania tyle czasu, ile szczur warunkowany z jego pary.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Faza testu składała się z trzech sesji. Przez pierwsze 5 min rejestrowane były tylko USV wyemitowane przez szczura w doświadczeniu; następnie 5 razy, co 1 min, prezentowany był CS z głośnika.





Ryc. 3. Schemat protokołu 7; doświadczenia przeprowadzono w jasnej fazie doby. CS – ultradźwiękowy bodziec warunkowy; szczegóły w tekście.

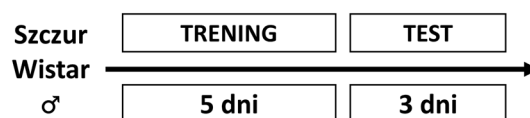
### 3.3.2. Warunkowanie instrumentalne wykorzystujące otwór na nos

Jako kontrolę dla warunkowania wzmacniającego emisję USV 50-kHz przez szczura wykorzystano powszechnie stosowaną metodę warunkowania wykorzystującego jako reakcję instrumentalną wsadzanie nosa w otwór (ang. *nosepoke*); WAR  $n = 36$ , CTR  $n = 8$ .

Faza czynności przygotowawczych została skrócona, jako że warunkowanie na wsadzanie nosa w otwór przeprowadzono na zwierzętach uprzednio wykorzystanych do warunkowania wzmacniającego emisję USV 50-kHz (protokoły 2, 5 i 6). Zwierzęta były poddane deprywacji pokarmowej na poziomie 90%. Faza czynności przygotowawczych nie podlegała późniejszym modyfikacjom.

Faza treningowa trwała pięć kolejnych dni, podczas których szczur poddawany był jednej sesji treningowej dziennie. Każda sesja kończyła się w momencie osiągnięcia maksymalnej liczby nagród przez szczura lub (jeśli warunek ten nie został spełniony) po maksymalnym czasie 15 min.

W fazie testowej sprawdzano wyuczoną umiejętność. Sesja testowa odbywała się raz dziennie przez trzy kolejne dni i trwała 5 min. W czasie testu szczur nie otrzymywał nagród.



Ryc. 4. Schemat protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego otwór na nos. Protokoły składały się z fazy treningowej i fazy testowej.

#### 3.3.2.1. Protokół 8

Szczury (WAR  $n = 8$ , CTR  $n = 8$ ) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby. Szczur warunkowany otrzymywał maksymalnie 10 nagród; szczur kontrolny nie otrzymywał nagród i spędzał w klatce do warunkowania tyle czasu, ile szczur warunkowany z jego pary.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie jasnej doby.

### 3.3.2.2. Protokół 9

Szczury (WAR n = 8) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Sesje treningowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby podczas których szczur otrzymywał maksymalnie 30 nagród.
- Sesje testowe zostały przeprowadzone w fazie ciemnej doby.

### 3.3.2.3. Protokół 10

Szczury (WAR n = 20) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem warunków protokołu 9. Dodatkowo umieszczony został mikrofon rejestrujący USV.

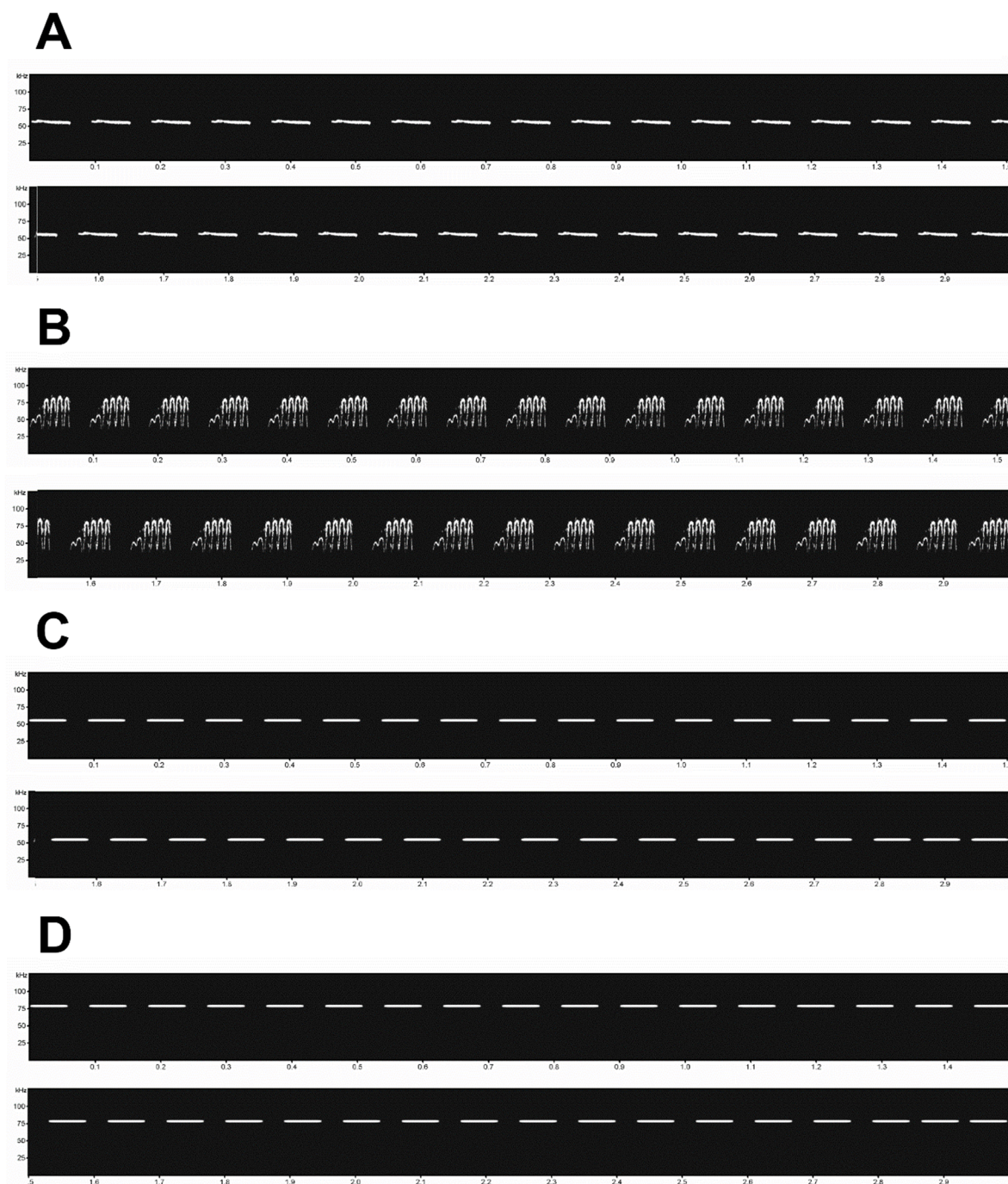
### 3.3.3. Uczenie rozróżniania dźwięków z wykorzystaniem otworów na nos jako *operandum*

W dodatkowych doświadczeniach sprawdzono, czy szczury są w stanie nauczyć się odróżnić od siebie wybrane sygnały akustyczne. W pierwszym wariantcie szczury uczyły się rozróżniać dwa ultradźwięki (nagrane podczas interakcji socjalnej innych szczurów, oczyszczone z szumów, wydzielone z nagrań, a następnie ułożone w sekwencję do odtwarzania) o różnej częstotliwości i modulacji (ultradźwięk o stałej częstotliwości, tzw. „płaski”, P i o częstotliwości modulowanej, M; oznaczenie grupy: P–M):

- USV niemodulowany (długość 59,3 ms; częstotliwość 55,1 kHz), odtworzony w sekwencji 33 powtórzeń o łącznej długości 3 s (Ryc. 5A);
- USV modulowany (długość 60,9 ms; częstotliwość 78,1 kHz), odtworzony w sekwencji 33 powtórzeń o łącznej długości 3 s (Ryc. 5B).

W drugim wariantcie szczury uczyły się rozróżniać dwa wygenerowane komputerowo niemodulowane ultradźwięki (tony, T) o różnej częstotliwości (oznaczenie grupy: T–T).

- Ton (długość 57,3 ms; częstotliwość 55,1 kHz) odtworzony w sekwencji 34 powtórzeń o łącznej długości 3 s (Ryc. 5C);
- Ton (długość 57,3 ms; częstotliwość 78,1 kHz) odtworzony w sekwencji 34 powtórzeń o łącznej długości 3 s (Ryc. 5D).



**Ryc. 5.** Spektrogramy ultradźwięków prezentowanych z głośnika w treningu rozróżniania dźwięków. **A.** Długość nagrania 3 s, 33 USV niemodulowane, prezentowane grupie P–M, **B.** Długość nagrania 3 s, 33 USV modulowane, prezentowane grupie P–M. **C.** Długość nagrania 3 s, 34 USV niemodulowane o częstotliwości 55 kHz, prezentowane grupie T–T, **D.** Długość nagrania 3 s, 33 USV niemodulowane o częstotliwości 78 kHz, prezentowane grupie T–T.

Doświadczenie z zastosowaniem układów dźwięków P–M i T–T przeprowadzono dwukrotnie, stosując dwa protokoły doświadczalne (protokół 11 i protokół 12, Tabela 2), opracowane na podstawie prac Saito *i wsp.* (Saito *i wsp.*, 2016; Saito *i wsp.*, 2019).

Faza czynności przygotowawczych została skrócona, jako że uczenie rozróżniania dźwięków przeprowadzono na zwierzętach uprzednio wykorzystanych do warunkowania wzmacniającego emisję USV 50-kHz (protokół 5 i 6). Zwierzęta były poddane deprivacji pokarmowej na poziomie 90%. Faza czynności przygotowawczych była identyczna w obu wariantach doświadczenia.

Faza kształtowania reakcji instrumentalnej trwała 2 dni. Szczury otrzymywały pastylkę sacharozową za każdą reakcję wsadzenia nosa w dostępne dwa otwory na nos. Sesja trwała 15 min lub do momentu, w którym szczur uzyskał 30 nagród. Zwierzę uczyło się asocjacji między wsadzeniem nosa w otwór a otrzymywaniem nagrody. Dodatkowo pierwszego dnia procedury kształtowania przed włożeniem szczura do klatki do otworów na nos włożono kilka sacharozowych pastylek, by zachęcić zwierzę do eksploracji tych urządzeń.

Faza treningowa trwała 14 kolejnych dni, podczas których szczur poddawany był jednej sesji treningowej dziennie. Szczura umieszczano w klatce przy wyłączonym świetle w klatce (ang. *housetlight*). Każda próba rozpoczynała się w momencie zapalenia się światła w klatce doświadczalnej i emisji USV z głośnika; trwała 5 s lub krócej, czyli do momentu, w którym szczur wsadził nos w jeden z dwóch otworów. Dźwięki były prezentowane z głośnika losowo. Szczur otrzymywał nagrodę tylko wtedy, gdy wsadził nos w otwór przypisany do prezentowanego dźwięku. Podczas trwania sesji doświadczalnej szczur uczył się także unikania kary, którą był szum trwający 5 s. Zachowanie szczura skutkowało następującymi konsekwencjami:

- Gdy nastąpiła reakcja poprawna następowało natychmiastowe wydanie nagrody. Światło klatki wyłączało się po 2 s, po czym następowała przerwa przed kolejną próbą (ang. *inter trial interval*, ITI). Podczas ITI dodatkowe wsadzania nosa w otwory nie powodowało pojawienia się nagrody.
- Wykonanie reakcji niepoprawnej skutkowało niepojawieniem się nagrody, natychmiastowym wyłączeniem światła i emisją z głośnika szumu trwającego 5 s (kara), po czym następował ITI.
- Brak reakcji wsadzenia nosa w żaden z otworów w ciągu 5 s od emisji sygnału z głośnika powodował, że szczur nie otrzymywał nagrody, światło gasło i rozpoczynał się ITI.

Każda sesja kończyła się w momencie osiągnięcia maksymalnej liczby nagród przez szczura lub (jeśli warunek ten nie został spełniony) po maksymalnym czasie sesji.

Doświadczenie nie zawierało fazy testowej.

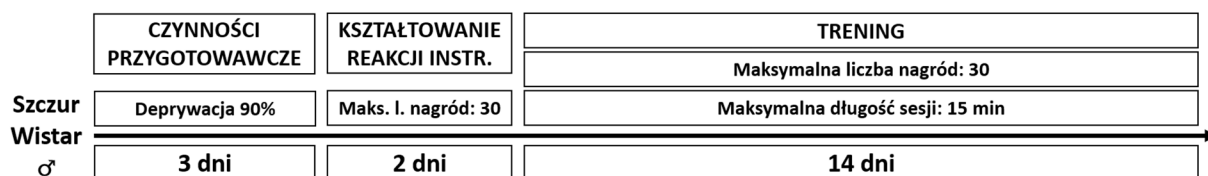
**Tabela 2. Porównanie protokołów doświadczalnych nr 11 i 12.** Do grupy P–M należą szczury, którym prezentowano USV 50-kHz niemodulowane („płaskie”) oraz modulowane. Do grupy T–T należą szczury, którym prezentowano tony o częstotliwości 55,1 kHz i 78,1 kHz.

	<b>Protokół 11</b>	<b>Protokół 12</b>
Liczebność całkowita	WAR, n = 20	WAR, n = 12
Grupa P–M: liczebność	P–M, n = 10	P–M, n = 6
<b>Grupa P–M: dźwięki</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>USV niemodulowane (częstotliwość 55,1 kHz)</b></li> <li>• <b>USV modulowane (częstotliwość 78,1 kHz)</b></li> </ul>	
Grupa T–T: liczebność	T–T, n = 10	T–T, n = 6
<b>Grupa T–T: dźwięki</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>tony (częstotliwość 55,1 kHz)</b></li> <li>• <b>tony (częstotliwość 78,1 kHz)</b></li> </ul>	
<b>Poziom deprywacji pokarmowej</b>	<b>90%</b>	
<b>Czas trwania kształtowania reakcji instrumentalnej</b>	<b>2 dni</b>	
<b>Czas trwania fazy treningowej</b>	<b>raz dziennie przez 14 dni</b>	
Faza doby	Jasna	Ciemna
Nagroda: liczba nagród	30 nagród/15 min	100 nagród/25 min
Kara: poziom natężenia szumu	50 dB	40 dB
ITI: długość w zależności od odpowiedzi	5 s po poprawnej, 15 s po niepoprawnej, 10 s po pominiętej próbie	10 s dla wszystkich prób
Próby korygujące	Brak	Obecne

### 3.3.3.1. Protokół 11

Szczury (WAR n = 20; P–M n = 10, T–T n = 10) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Sesja treningowa trwała 15 min lub do momentu, w którym szczur uzyskał 30 nagród.
- Gdy nastąpiła reakcja poprawna, przerwa przed kolejną próbą trwała 5 s.
- Reakcja niepoprawna powodowała natychmiastową emisję szumu o natężeniu dźwięku na poziomie 50 dB (natężenie w odległości 30 cm od źródła estymowane na podstawie instrukcji do oprogramowania SASLab Pro). Przerwa przed kolejną próbą trwała 15 s.
- Brak reakcji wsadzenia nosa w którykolwiek z otworów w ciągu 5 s od emisji sygnału z głośnika powodował emisję szumu (50 dB). Przerwa przed kolejną próbą trwała 10 s.

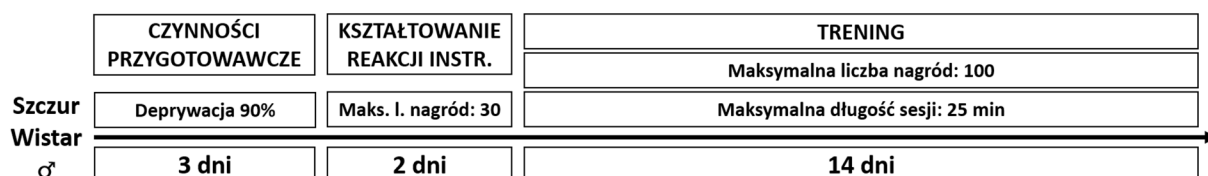


Ryc. 6. Schemat protokołu 11. Doświadczenie składało się z trzech faz: skróconej fazy czynności przygotowawczych, kształtowania reakcji instrumentalnej i treningu. Przeprowadzane było w jasnej fazie doby.

### 3.3.3.2. Protokół 12

Szczury (WAR n = 12; P–M n = 6, T–T n = 6) zostały poddane warunkowaniu z zastosowaniem poniższych warunków:

- Sesja treningowa trwała 25 min lub do momentu, w którym szczur uzyskał 100 nagród.
- Gdy nastąpiła reakcja poprawna, przerwa przed kolejną próbą trwała 10 s.
- Reakcja niepoprawna powodowała natychmiastową emisję szumu o natężeniu dźwięku na poziomie 40 dB. Następnie rozpoczynała się próba korygująca (ang. *correction trial*), polegająca na powtórzeniu próby w celu doprowadzenia do poprawnej odpowiedzi. Przerwa przed kolejną próbą trwała 10 s.
- Brak reakcji wsadzenia nosa w którykolwiek z otworów w ciągu 5 s od emisji sygnału z głośnika powodował rozpoczęcie przerwy przed kolejną próbą o długości 10 s.



Ryc. 7. Schemat protokołu 12. Doświadczenie składało się z trzech faz: skróconej fazy czynności przygotowawczych, kształtowania reakcji instrumentalnej i treningu. Przeprowadzane było w ciemnej fazie doby.

## 3.4. Analiza plików audio i wideo

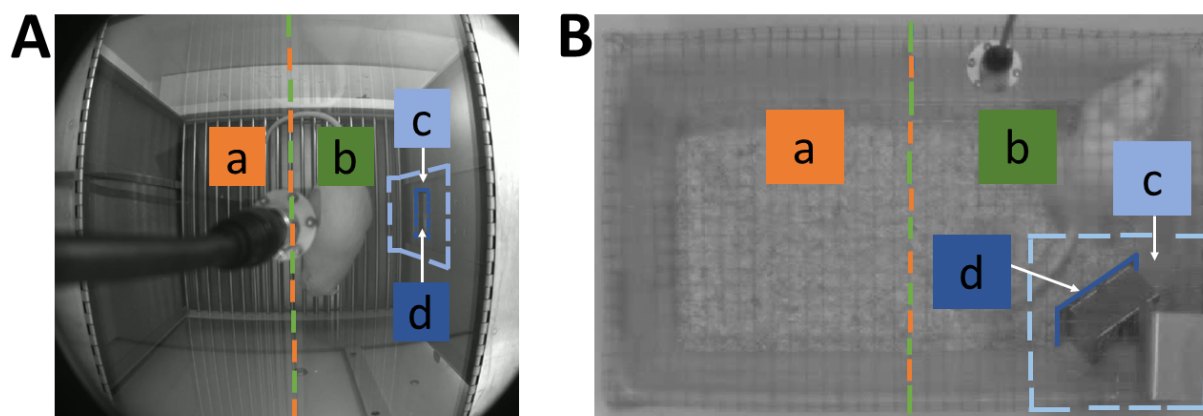
Pliki audio (.wav) analizowano za pomocą programu SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics, Glienicke/Nordbahn, Niemcy). Pliki były konwertowane na spektrogramy, przedstawiające dźwięk w formie wizualnej, z użyciem szybkiej transformacji Fouriera (rozdzielczość dziedziny częstotliwości 512 próbek, 100% rozmiaru ramki, funkcja okna FlatTop oraz zakładka 75% długości okna). Ultradźwięki zaznaczane były ręcznie. Spośród wartości wyliczanych przez oprogramowanie do dalszej analizy wykorzystano: długość, interwał (odstęp między kolejnymi ultradźwiękami, liczony od ich początków), częstotliwość w maksimum uśrednionego widma (ang. *peak frequency of average spectrum*). Wykryte USV

przyporządkowano do jednej z trzech kategorii: 50-kHz (częstotliwość >32 kHz), krótkie 22-kHz (częstotliwość 18-32 kHz, długość <0,3 s), długie 22-kHz (częstotliwość of 18-32 kHz, długość >0,3 s) (Brudzynski *i wsp.*, 1993; Portfors, 2007).

Pliki wideo analizowano za pomocą programu BehaView (wersja 0.0.23, autor: Paweł Boguszewski, IBD PAN, Warszawa, Polska), który pozwala na oznaczenie obserwowanych zachowań i ich analizę na podstawie liczby występujących zdarzeń oraz czasu trwania danego zachowania. Analizę materiałów wideo przeprowadzono wyznaczając ręcznie cztery strefy w klatce doświadczalnej (klatce Skinnera oraz tożsamej z klatką do chowu), po których poruszał się szczur (Ryc. 8):

- strefę bezkarmnikową (połowa klatki niezawierająca karmnika);
- strefę karmnikową (połowa klatki zawierająca karmnik);
- strefę okołokarmnikową (obszar otaczający karmnik). Strefę tę w klatce do warunkowania wyznaczono na podstawie krawędzi ścianek karmnika – pojedynczego modułu wielomodułowej ściany klatki – oraz pierwszych dwóch metalowych prętów podłogi (doświadczenia 4-5). Z kolei w klatce tożsamej z klatką do chowu granice wyznaczono na podstawie linii siatki nałożonej na klatkę (protokół 6);
- strefę karmnika (obszar, w którym pojawiała się nagroda wydawana z podajnika znajdującego się poza klatką).

Położenie szczura zaznaczano ręcznie na podstawie obecności jego nosa w danej strefie. Do wartości wyliczanych przez oprogramowanie i wykorzystanych do analizy należały: czas spędzony w danej strefie oraz liczba wejść do danej strefy. Dane obejmują pierwszych 5 min nagrania (lub krócej, jeśli nagranie trwało mniej niż 5 min). Ze względu na indywidualny czas sesji treningowej dla każdego szczura przebywanie w danej strefie wyrażono jako odsetek czasu spędzonego w strefie w stosunku do czasu trwania całej sesji, a liczbę wejść do danej strefy przeliczono na 1 min. Dane dotyczą szczurów w pierwszej (trening 1), środkowej (trening 7) i ostatniej sesji treningowej (trening 14).



**Ryc. 8. Cztery strefy klatki doświadczalnej: A. klatki Skinnera; B. klatki tożsamej z klatką do chowu, wyznaczone podczas analizy materiałów video.** a – strefa bezkarmnikowa; b – strefa karmnikowa; c – strefa okołokarmnikowa; d – strefa karmnika.

Doświadczenia z uczeniem rozróżniania dźwięków przeprowadzono z użyciem dedykowanych skryptów: napisanych w języku programowania MSN (MEDState Notation, Med Associates Inc.) oraz dodatkowego skryptu napisanego w języku programowania Python, kontrolującego program SASLab Pro na podstawie akcji podejmowanych przez oprogramowanie MED-PC (autor: Marek Kochończyk, IPPT PAN, Warszawa, Polska).

### 3.5. Analiza statystyczna

Wykresy oraz analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 8 (wersja 8.4.3, GraphPad Software, San Diego, CA, Stany Zjednoczone). Na wykresach przedstawiono średnią z błędem standardowym ( $\pm$  SEM) lub wartości indywidualne wraz ze średnią i błędem standardowym ( $\pm$  SEM). W analizie statystycznej wykorzystano testy nieparametryczne:

- Wilcoxon (ang. *Wilcoxon matched-pairs signed-rank test*) dla porównań dwóch wartości zależnych;
- Manna-Whitneya (ang. *Wilcoxon rank sum test*) dla porównań dwóch wartości niezależnych;
- Friedmana (ang. *Friedman ANOVA*) dla porównań wielu punktów zależnych;
- Kruskala-Wallisa (ang. *Kruskal-Wallis*) dla porównań wielu punktów niezależnych.

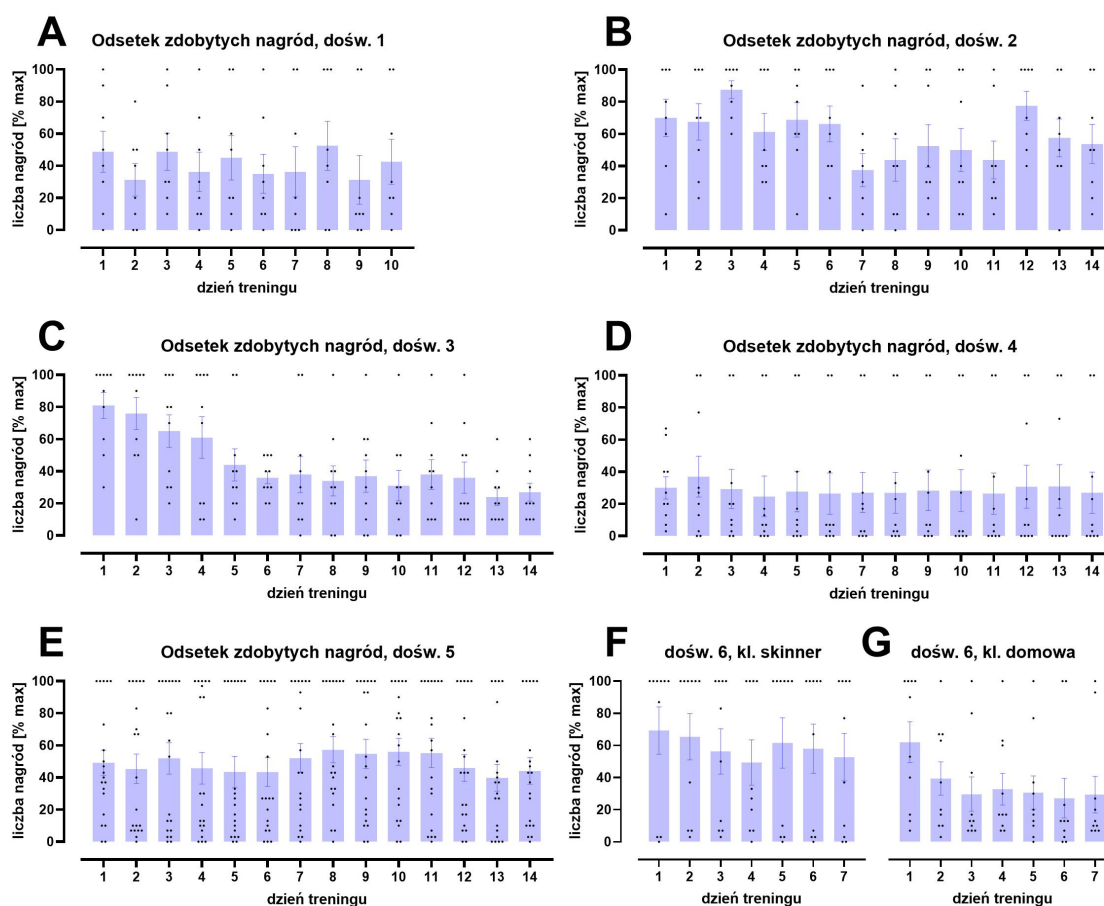
W każdym z przypadków wykonano test dwustronny. Za próg istotności uznano  $p < 0,05$ .



## 4. Wyniki

### 4.1. Większość szczurów nie nabywa umiejętności wokalizowania w celu zdobywania nagrody mimo zastosowania modyfikacji protokołów doświadczalnych

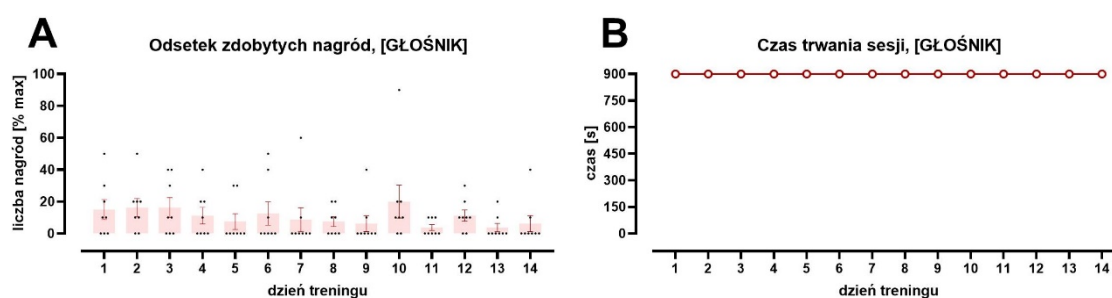
Szczury warunkowane instrumentalnie nie wykazują wyraźnych prawidłowości w zmianie zachowania i wykorzystaniu własnych wokalizacji ultradźwiękowych w celu zdobywania nagrody, niezależnie od wprowadzania modyfikacji protokołu doświadczalnego. Żaden z protokołów doświadczalnych 1–6 nie doprowadził do znacznego zwiększenia liczby szczurów o rosnącej liczbie zdobytych nagród (Ryc. 9, Tab. S1). Co więcej, uśrednienie wartości dla wszystkich szczurów wskazało na zmniejszenie się liczby nagród osiągniętych w kolejnych sesjach treningowych (Ryc. 11A, Tab. S2), natomiast nie wykazało zmian w czasie trwania sesji (Ryc. 11B, Tab. S2).



Ryc. 9. Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury z zastosowaniem różnych protokołów doświadczalnych. **A.** Podczas deprivacji pokarmowej 95% szczur poddawany był treningowi o długości 10 sesji, w każdej mógł osiągnąć maksymalnie 10 nagród. **B.** Warunki z wykresu A zmodyfikowano poprzez zwiększenie deprivacji

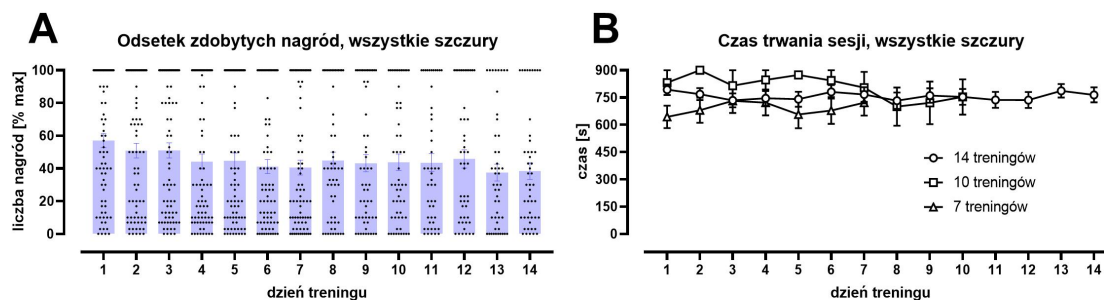
pokarmowej do 90% i wydłużenie treningu do 14 sesji. **C.** Warunki z wykresu B zmodyfikowano poprzez dodanie bodźców wzmacniających emisję USV w postaci: ściółki z klatki szczura znanego szczurowi doświadczalnemu oraz USV emitowanych z głośnika. **D.** Warunki z wykresu C zmodyfikowano poprzez zwiększenie maksymalnej liczby nagród do 30. **E.** Warunki z wykresu D zmodyfikowano poprzez zmianę fazy doby, w której były przeprowadzane sesje treningowe, z jasnej na ciemną. **F.** Warunki z wykresu E zmodyfikowano poprzez zastosowanie przyzwyczajania do klatki doświadczalnej (4 sesje poprzedzające trening) i skrócenia czasu treningu do 7 sesji. **G.** Warunki z wykresu F zmodyfikowano przez przeprowadzanie warunkowania w klatce identycznej z domową. Przy zastosowaniu któregośkolwiek z opisanych protokołów doświadczalnych nie obserwowano wyraźnego trendu wzrostowego w liczbie zdobywanych nagród (A, B, D, E, F) lub wręcz trend spadkowy (C, G). Liczebność: A n = 8, B n = 8, C n = 10, D n = 10, E n = 20, F n = 10, G n = 10. Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S1.

Podobnie, szczury nie nabywały umiejętności odpowiadania własnymi wokalizacjami na USV odtworzone z głośnika, by uzyskać nagrodę (protokół 7). W kolejnych sesjach wzmacniania odpowiedzi na USV 50-kHz emitowane z głośnika liczba zdobytych nagród nie zwiększała się ( $p = 0,0845$ , Friedman,  $p = 0,3750$ , Wilcoxon; Ryc. 10A, Tab. S1). Żaden ze szczurów w żadnej sesji treningowej nie osiągnął maksymalnej liczby nagród, przez co każda z sesji treningowych dla każdego szczura trwała maksymalną długość czasu (900 s, Ryc. 10B, Tab. S1).



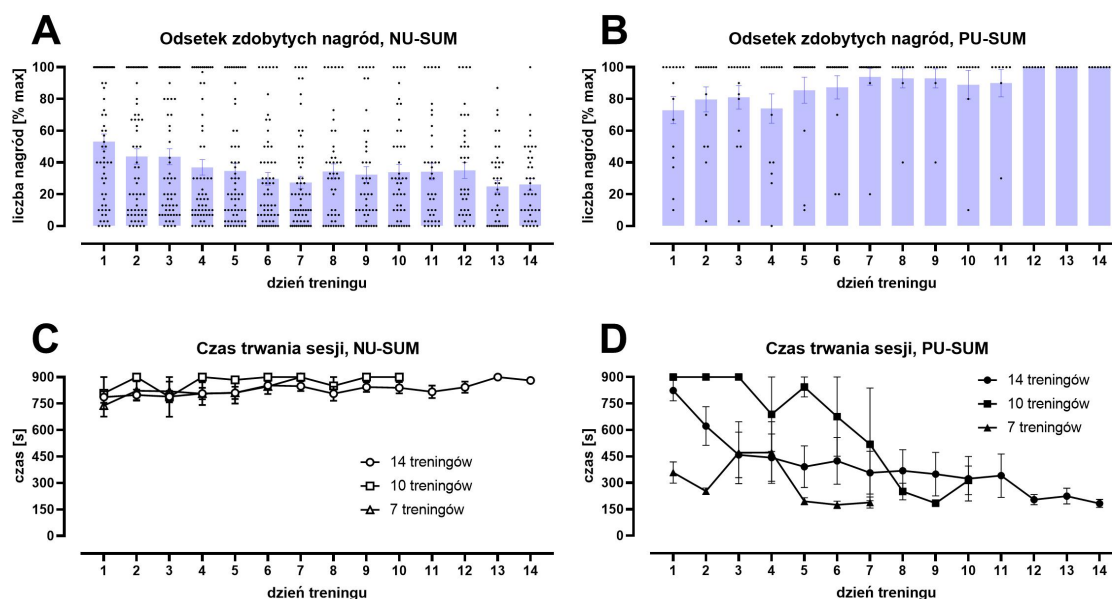
**Ryc. 10.** Charakterystyka grupy szczurów, u których wzmacniano odpowiedź na USV emitowane z głośnika: **A** – odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczura, **B** – czas trwania sesji treningowej. **A.** W trakcie pojedynczej sesji treningowej szczury mogły uzyskać maksymalnie 10 nagród. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. **B.** Maksymalna długość sesji wynosiła 900 s; im szybciej szczur otrzymał maksymalną liczbę nagród, tym krócej trwała sesja. Wykres przedstawia średnią  $\pm$  SEM. Liczebność n = 8. Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S1.

Ponieważ żadna z zastosowanych modyfikacji protokołu doświadczalnego nie wpłynęła na postęp w uczeniu się (Tab. S1), wyniki z doświadczeń 1-6 pogrupowano na podstawie liczby nagród uzyskanych w sesjach treningowych.



**Ryc. 11.** Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury (A) oraz czas trwania sesji (B) u wszystkich zwierząt zgrupowanych bez względu na zastosowany protokół doświadczalny. **A.** W trakcie pojedynczej sesji treningowej szczury mogły uzyskać maksymalnie 10 ( $n = 26$ ) lub 30 ( $n = 50$ ) nagród. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. **B.** Maksymalna długość sesji wynosiła 900 s; im szybciej szczur otrzymał maksymalną liczbę nagród, tym krócej trwała sesja. Wykres przedstawia średnią  $\pm$  SEM. Liczebność grup (dla obu wykresów): szczury z 14 sesjami treningu  $n = 48$ , szczury z 10 dniami treningu  $n = 8$ , szczury z 7 dniami treningu  $n = 20$ . Łącznie  $n = 76$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S2.

Większość szczurów (80%) nie wykazywała cech uczenia się wokalizowania w celu zdobywania nagrody (szczury określane dalej terminem „nieuczące się”, skrót NU). Grupę szczurów NU wydzielono na podstawie kryterium: szczury nie uzyskują maksymalnej liczby nagród w czasie trzech ostatnich sesji treningowych (Ryc. 12A). U szczurów z tej grupy czas kolejnych sesji treningowych nie ulegał skróceniu; co więcej, u szczurów z 14 sesjami treningowymi średnia długość sesji treningowej rośnie ( $p = 0,0007$ , Friedman;  $p = 0,0029$ , trening 1 vs 14, Wilcoxon; Ryc. 12C, Tab. S3b).



**Ryc. 12.** Charakterystyka grupy szczurów nieuczących się (NU) i potencjalnie uczących się (PU): **A** – odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczura, **B** – czas trwania sesji treningowej. **A, B.** W trakcie pojedynczej sesji treningowej szczury mogły uzyskać maksymalnie 10 (A n = 22, B n = 4) lub 30 (A n = 39, B n = 11) nagród. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. **C, D.** Maksymalna długość sesji wynosiła 900 s; im szybciej szczur otrzymał maksymalną liczbę nagród, tym krócej trwała sesja. Wykres przedstawia średnią  $\pm$  SEM. Liczebność grup: A, n = 61. B, n = 15. C, 14 treningów, n = 40, 10 treningów, n = 6, 7 treningów, n = 15. D, 14 treningów, n = 8, 10 treningów, n = 2, 7 treningów, n = 5. Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S3.

Mniej liczna grupa szczurów (20%) wykazuje zmiany w zachowaniu sugerujące zachodzący proces uczenia się i pojawiania się wokalizacji w celu uzyskania nagrody (szczury określane dalej terminem „potencjalnie uczące się”, skrót PU). Grupę szczurów PU wydzielono na podstawie kryterium: szczury uzyskują maksymalną liczbę nagród w czasie co najmniej wszystkich trzech ostatnich sesji treningowych (Ryc. 12B). U szczurów z tej grupy czas kolejnych sesji treningowych ulega skróceniu (7 treningów:  $p = 0,0154$ , Friedman,  $p = 0,0078$ , Wilcoxon; 14 treningów:  $p = 0,0002$ , Friedman,  $p = 0,0078$ , Wilcoxon); u szczurów z 10 dniami treningu widać wyraźny, choć nieistotny trend (Ryc. 12D, Tab. S3b).

#### 4.2. Wśród szczurów nieuczących się i potencjalnie uczących się wyróżniono kilka podgrup

W grupie szczurów NU wyodrębniono cztery podgrupy:

1. Szczury, które w żadnej sesji treningowej nie uzyskały maksymalnej liczby nagród (skrót NU-0; Ryc. 13A);

2. Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród podczas pierwszej sesji treningowej, lecz nie uzyskały jej w żadnej z trzech ostatnich sesjach treningowych (skrót NU-D1; Ryc. 13B);
3. Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród tylko podczas jednej sesji treningowej, lecz nie pierwszej (skrót NU-SGL; Ryc. 13C);
4. Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród w minimum dwóch kolejnych sesjach treningowych, lecz nie dwóch pierwszych i nie dwóch ostatnich (skrót NU-CEN; Ryc. 13D).

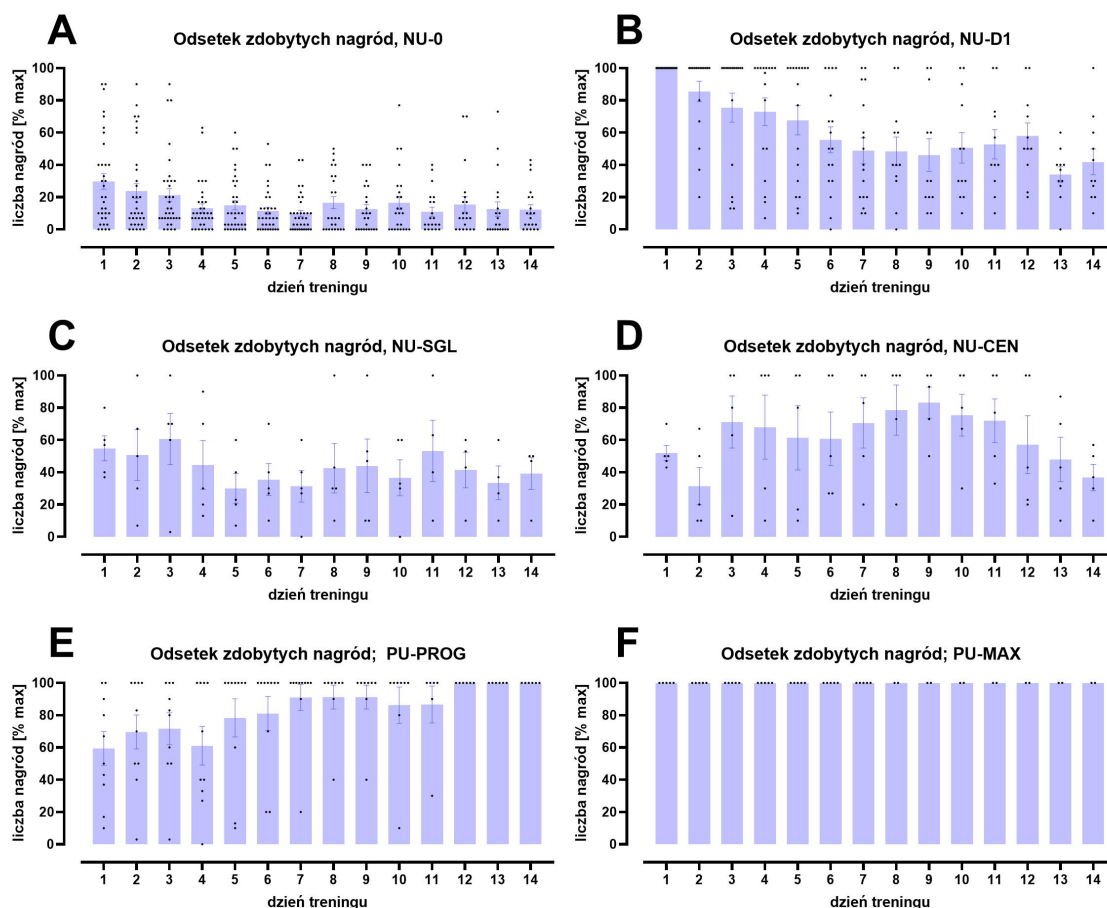
W grupie szczurów PU wyodrębniono dwie podgrupy:

1. Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród w czasie wszystkich trzech ostatnich sesji treningowych, lecz nie zdobyły jej w czasie wszystkich sesji treningowych (skrót PU-PROG; Ryc. 13E);
2. Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród we wszystkich sesjach treningowych (skrót PU-MAX; Ryc. 13F).

**Tabela 3. Wykaz grup zwierząt ustalonych na podstawie liczb osiągniętych nagród wraz z oznaczeniami skrótowymi oraz liczebnością.**

Skrót	Opis grupy	Liczebność grup			
		Całkowita	Według liczby treningów		
			7	10	14
<b>NU-SUM</b>	<b>Nieuczące się;</b> wszystkie szczury z grup NU	61	15	6	40
NU-D1	Nieuczące się; uzyskały maksymalną liczbę nagród podczas pierwszej sesji treningowej, lecz nie uzyskały jej w żadnej z trzech ostatnich sesjach treningowych	17	5	1	11
NU-SGL	Nieuczące się; uzyskały maksymalną liczbę nagród tylko podczas jednej sesji treningowej, lecz nie pierwszej	5	0	1	4
NU-CEN	Nieuczące się; uzyskały maksymalną liczbę nagród w minimum dwóch kolejnych sesjach treningowych, lecz nie dwóch pierwszych i nie dwóch ostatnich	5	0	0	5
NU-0	Nieuczące się; w żadnej sesji treningowej nie uzyskały maksymalnej liczby nagród	34	10	4	20
NU-SUM/0	Nieuczące się; szczury z grup NU bez grupy NU-0	27	5	2	20
<b>PU-SUM</b>	<b>Potencjalnie uczące się;</b> wszystkie szczury z grup PU	15	5	2	8
PU-MAX	Potencjalnie uczące się; uzyskały maksymalną liczbę nagród we wszystkich sesjach treningowych	5	3	0	2

PU-PROG	Potencjalnie uczące się; uzyskały maksymalną liczbę nagród w czasie wszystkich trzech ostatnich sesji treningowych, lecz nie zdobyły jej w czasie wszystkich sesji treningowych	10	2	2	6
---------	---	----	---	---	---



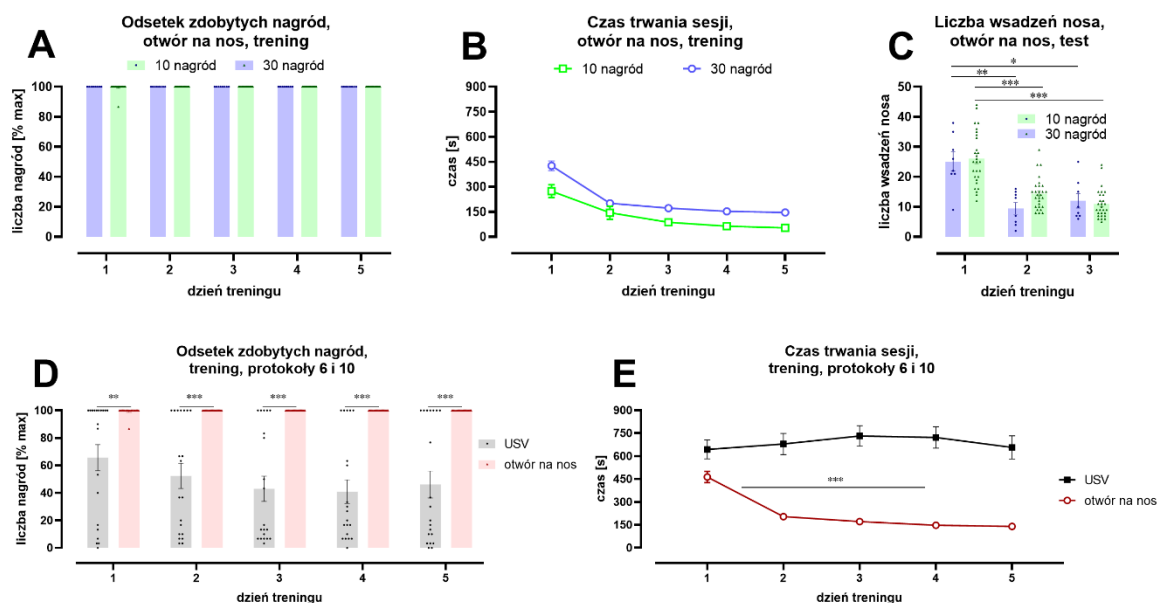
**Ryc. 13. Podział szczurów na grupy ze względu na zmiany w liczbie osiągniętych nagród w kolejnych sesjach treningowych.** **A.** Szczury, które w żadnej sesji treningowej nie uzyskały maksymalnej liczby nagród ( $n = 34$ ). **B.** Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród podczas pierwszej sesji treningowej, lecz nie uzyskały jej w żadnej z trzech ostatnich sesjach treningowych ( $n = 17$ ). **C.** Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród tylko podczas jednej sesji treningowej, lecz nie pierwszej ( $n = 5$ ). **D.** Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród w minimum dwóch kolejnych sesjach treningowych, lecz nie dwóch pierwszych i nie dwóch ostatnich ( $n = 5$ ). **E.** Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród w czasie wszystkich trzech ostatnich sesji treningowych, lecz nie zdobyły jej w czasie wszystkich sesji treningowych ( $n = 10$ ). **F.** Szczury, które uzyskały maksymalną liczbę nagród we wszystkich sesjach treningowych ( $n = 5$ ). Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Dane wyjściowe dla wykresów zestawiono w Tab. S20.

### **4.3. Szczury poddane warunkowaniu instrumentalnemu z wykorzystaniem ich własnych wokalizacji ultradźwiękowych nabywają umiejętność wsadzania nosa w otwór (ang. *nosepoke*)**

Większość szczurów nie nabywała umiejętności wokalizowania w celu uzyskania nagrody pokarmowej (Ryc. 9). Celem sprawdzenia, czy badane szczury jesteśmy w stanie uwarunkować instrumentalnie, osobniki uprzednio poddane wzmacnianiu wokalizacji (protokoły 2, 5, 6,  $n = 32$ ) lub wzmacnianiu wokalizacji w odpowiedzi na USV emitowane z głośnika (protokół 7,  $n = 4$ ) dodatkowo poddano warunkowaniu na wsadzanie nosa w otwór w ścianie klatki (protokoły 8-10).

Podczas warunkowania na wsadzanie nosa w otwór zdecydowana większość szczurów (27/28 w doświadczeniu z 30 nagrodami, 8/8 w doświadczeniu z 10 nagrodami) uzyskiwała 100% nagród już podczas pierwszego treningu. Zdolność ta utrzymywała się na wysokości 100% do ostatniej sesji treningowej (Ryc. 14A). Dodatkowo długość sesji treningowej zmniejszała się, zarówno u szczurów z maksymalną liczbą nagród 10 ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p < 0,0078$ , Wilcoxon), jak i 30 nagród ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p < 0,0001$ , Wilcoxon; Ryc. 14B, Tab. S4a). Szczury warunkowane na wsadzanie nosa w otwór podczas sesji testowych podejmowały liczne próby zdobycia nagrody poprzez wsadzanie nosa w otwór (Ryc. 14C). Wraz z kolejnymi sesjami testowymi liczba prób obniżała się, zarówno u szczurów z maksymalną liczbą nagród 10 ( $p = 0,0099$ , Friedman,  $p = 0,0391$ , Wilcoxon), jak i 30 nagród ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p < 0,0001$ , Wilcoxon; Ryc. 14C, Tab. S4b).

W porównaniu z wcześniejszym warunkowaniem wzmacniającym emisję USV odsetek uzyskanych nagród w sesjach warunkowania na wsadzanie nosa w otwór był znacznie wyższy niż odsetek uzyskanych nagród przez te same szczury we wcześniejszym doświadczeniu wzmacniającym emisję USV ( $p = 0,0010$  w pierwszej sesji treningowej,  $p < 0,0001$  dla kolejnych sesji treningowych, Mann-Whitney; Ryc. 14D, Tab. S4d). Dodatkowo, podczas warunkowania szczurów na wsadzanie nosa w otwór, czas sesji systematycznie się skracał. Nie obserwowano tego podczas warunkowania szczurów na emisję USV (Ryc. 14E, Tab. S4c). Długość pierwszej sesji treningowej w obu doświadczeniach był porównywany, następnie był wyraźnie niższy podczas sesji warunkujących na wsadzanie nosa w otwór ( $p < 0,0001$  dla dni 2-5, Mann-Whitney; Ryc. 14E, Tab. S4d).



**Ryc. 14. Charakterystyka grup szczurów, u których wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór.** **A.** Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczura. **B.** Czas trwania sesji treningowej. **C.** Liczba wsadzeń nosa podczas sesji testowych. **D.** Porównanie odsetka zdobytych nagród u tych samych zwierząt najpierw warunkowanych na emisję USV, potem warunkowanych na wsadzanie nosa w otwór. **E.** Porównanie czasu trwania sesji treningowych u tych samych zwierząt najpierw warunkowanych na emisję USV, potem warunkowanych na wsadzanie nosa w otwór. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM, punkty towarzyszące słupkom przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Wykresy liniowe przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann Whitney, Wilcoxon. Liczebność grup (A-C): 10 nagród  $n = 8$ , 30 nagród  $n = 28$ . Liczebność (DE): szczury warunkowane na emisję USV  $n = 20$ , szczury warunkowane na wsadzanie nosa  $n = 20$ . Analiza statystyczna została zamieszczona Tab. S4.

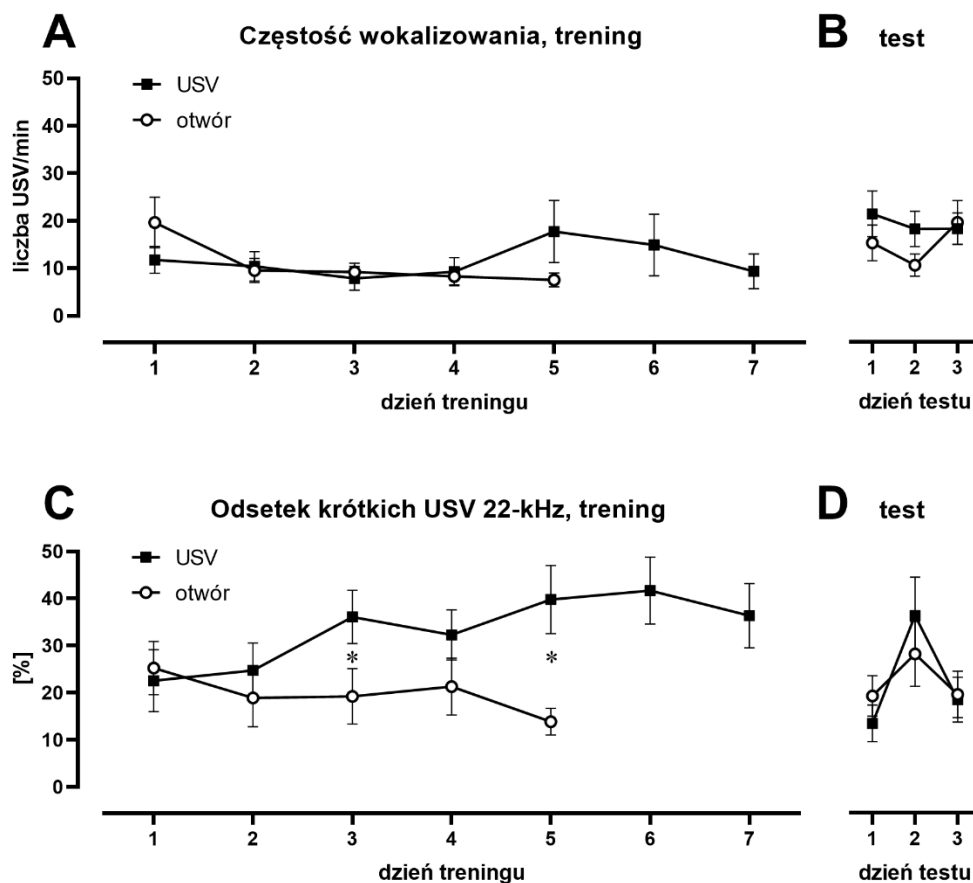
Dodatkowo, w doświadczeniu 10 podczas warunkowania na wsadzanie nosa w otwór zarejestrowano USV emitowane przez szczury podczas sesji treningowych i testowych. Pozwoliło to na porównanie charakterystyki wokalizacji tych szczurów, emitowanych najpierw podczas warunkowania na emisję USV, a następnie podczas warunkowania na wsadzanie nosa w otwór.

Częstość wokalizowania szczurów podczas treningów wzmacniających emisję USV i wzmacniających umiejętność wsadzania nosa w otwór był porównywalny (Ryc. 15A, Tab. S5b). Podobnie częstość wokalizowania była porównywalna w sesjach testowych tych doświadczeń (Ryc. 15B, Tab. S5b).

Udział krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV był przeważnie wyższy (w tym w dwóch punktach istotnie wyższy,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney, Tab. S5b) w sesjach treningowych wzmacniających emisję USV niż w sesjach wzmacniających umiejętność wsadzania nosa w otwór (Ryc. 15C). Podobnej zależności nie obserwowano w dniach testu (Mann-Whitney; Ryc.



15D, Tab. S5b). Co więcej, w kolejnych dniach treningu obserwowano trend wzrostowy udziału krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV podczas warunkowania na emisję USV ( $p = 0,0101$  dla przebiegu 1-7 oraz  $p = 0,0242$  dla przebiegu 1-5, Friedman;  $p = 0,0266$  dla porównania 1-7 oraz  $p = 0,0240$  dla porównania 1-5, Wilcoxon; Ryc. 15C, Tab. S5a); trend taki nie był obecny podczas sesji warunkowania na wsadzanie nosa w otwór ( $p = 0,1460$ , Friedman; Ryc. 15C, Tab. S5a).

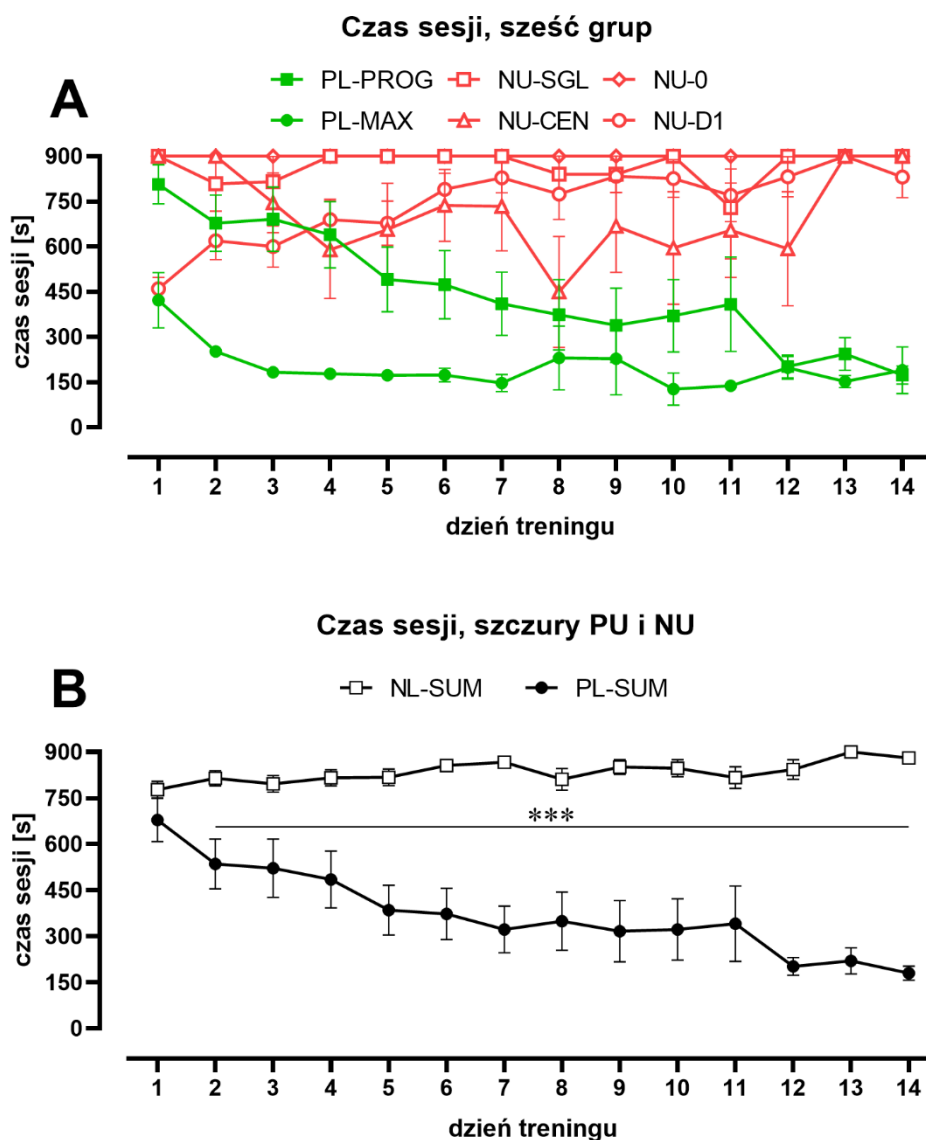


**Ryc. 15.** Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) i odsetek krótkich USV 22-kHz u szczurów, u których wzmacniano emisję USV, a następnie wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór. U szczurów najpierw przeprowadzono wzmacnianie emisji USV (7 sesji treningowych, czarne kwadraty, AC), a następnie wzmacnianie umiejętności wsadzania nosa w otwór (5 sesji treningowych, białe koła, AC). W obu doświadczeniach przeprowadzono 3 sesje testowe (BD). Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney. Liczebność  $n = 20$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S5.

#### **4.4. Czas sesji treningowej skracał się stopniowo u szczurów potencjalnie uczących się**

U szczurów PU czas trwania sesji treningowej skracał się, w przeciwieństwie do szczurów NU, gdzie czas sesji nie ulegał zmianie lub wydłużał się (Ryc. 16D, Tab. S6b). Wiązało się to z coraz szybszym osiągnięciem maksymalnej liczby nagród.

U szczurów PU-SUM czas trwania sesji treningowej skraca się stopniowo (wszystkie szczury, dni 1-7,  $n = 15$ ,  $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0002$ , Wilcoxon), w przeciwieństwie do szczurów NU-SUM u których czas sesji wydłużył się od  $778 \pm 27$  s (trening pierwszy) do  $867 \pm 19$  s (trening siódmy;  $n = 61$ ,  $p = 0,0043$ , Friedman,  $p = 0,0053$ , Wilcoxon). W rezultacie, czas sesji był istotnie krótszy u szczurów PU-SUM niż u szczurów NU-SUM od drugiej do czternastej sesji treningowej ( $p < 0,0001$ – $0,0014$ , Mann-Whitney, Ryc. 16B, Tab. S6d). Co więcej, czas sesji skracał się zarówno u wszystkich szczurów PU-MAX ( $422 \pm 92$  s, trening pierwszy;  $147 \pm 10$  s, trening siódmy;  $n = 5$ ,  $p = 0,0011$ , Friedman,  $p = 0,0625$ , Wilcoxon), jak i wszystkich szczurów PU-PROG ( $807 \pm 65$  s, trening pierwszy;  $410 \pm 105$  s, trening siódmy;  $n = 10$ ,  $p = 0,0003$ , Friedman,  $p = 0,0078$ , Wilcoxon; Ryc. 16A, Tab. S6c). U szczurów z grupy PU-PROG postęp w osiągnięciu coraz większej liczby nagród był procesem zindywidualizowanym; dzień treningu, od którego zwierzę zaczynało zdobywać maksymalną liczbę nagród, był indywidualny dla każdego szczura (Tab. S20). Dlatego u szczurów PU-PROG wybrano pierwsze trzy dni z maksymalną liczbą nagród i także stwierdzono coraz krótszy czas sesji treningowej ( $362 \pm 66$  s, trening pierwszy;  $198 \pm 19$  s, trening trzeci;  $n = 10$ ,  $p = 0,0665$ , Friedman;  $p = 0,0195$ , Wilcoxon).



**Ryc. 16.** Czas trwania sesji u szczurów podzielonych na sześć podgrup (A) oraz grupy PU-SUM i NU-SUM (B) bez względu na liczbę dni treningowych. A. Czas trwania sesji u wszystkich szczurów podzielonych na sześć grup. B. Czas trwania sesji treningowej szczurów PU-SUM i NU-SUM. Czas sesji był krótszy u szczurów PU-SUM w porównaniu do szczurów NU-SUM już od drugiej sesji treningowej. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney. Liczebność: A: NU-0,  $n = 20-34$ ; NU-D1,  $n = 11-17$ ; NU-SGL,  $n = 4-5$ ; NU-CEN,  $n = 5$ ; PU-PROG,  $n = 6-10$ ; PU-MAX,  $n = 2-5$ ; B: PU-SUM,  $n = 8-15$ ; NU-SUM,  $n = 40-61$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S6.

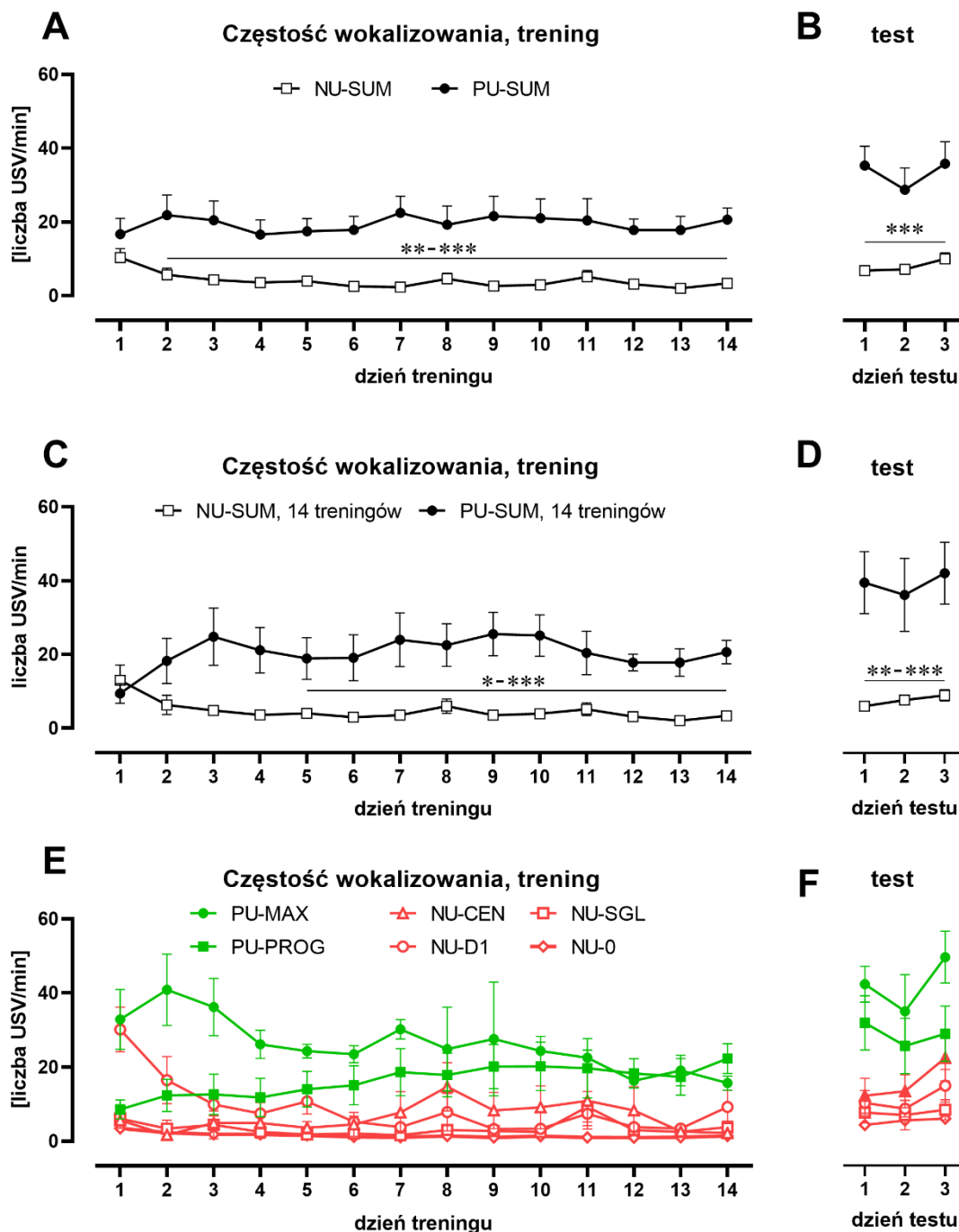
#### 4.5. Szczury nieuczące się i potencjalnie uczące się różnią się intensywnością wokalizowania

Częstość wokalizowania (średnia liczba USV emitowana w ciągu 1 min) jest istotnie wyższa u szczurów PU-SUM w porównaniu ze szczurami NU-SUM od drugiej do czternastej sesji treningowej ( $p < 0,05$  dla wszystkich dni, Mann-Whitney; Ryc. 17A, Tab. S7b). U szczurów PU-SUM częstość wokalizowania pozostaje stosunkowo stabilna przez pierwsze siedem sesji

treningowych, natomiast u szczurów NU-SUM obniża się (dla dni 1-7: NU-SUM  $p < 0,0001$  vs PU-SUM  $p = 0,1426$ , Friedman; NU-SUM  $p < 0,0001$  vs PU-SUM  $p = 0,1645$ , Wilcoxon; Ryc. 17A, Tab. S7a). Różnica między grupami PU-SUM i NU-SUM utrzymuje się także w sesjach testowych ( $p < 0,0001$  dla wszystkich dni, Mann-Whitney; Ryc. 17B, Tab. S7b).

Po rozbiciu grup PU-SUM i NU-SUM na podgrupy (Tabela 3) zmiana w częstości wokalizowania w ciągu kolejnych sesji treningowych obserwowana jest w grupach NU-D1 (dla dni 1-7:  $p = 0,0004$ , Friedman;  $p = 0,0039$ , Wilcoxon; Ryc. 17E, Tab. S7c) oraz NU-0 (dla dni 1-7:  $p < 0,0001$ , Friedman;  $p < 0,0001$ , Wilcoxon; Ryc. 17E, Tab. S7c); w obu grupach częstość wokalizowania obniża się.

Wzrost częstości wokalizowania pomiędzy ostatnią sesją treningową, a pierwszą sesją testową była wyższa w grupie PU-SUM ( $14,5 \pm 4,8$ ), w porównaniu z grupą NU-SUM ( $5,9 \pm 1,7$ , Ryc. 17AB), jednak nieistotna statystycznie ( $p = 0,0537$ , Mann-Whitney). Jednakże, różnica ta stała się istotna ( $p = 0,0326$ , Mann-Whitney) po usunięciu wartości odstającej z grupy NU-SUM, wyznaczonej za pomocą metody Tukey'a (ang. *Tukey's fences method*, van der Spoel i wsp., 2019). Wzrost częstości wokalizowania po zmianie w grupie NU-SUM wyniósł  $4,5 \pm 1,0$ .



**Ryc. 17.** Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM). **A, B.** Wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano 7, 10 lub 14 sesji treningowych (A) i 3 sesje testowe (B). **C, D.** Wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano 14 sesji treningowych (C) i 3 sesje testowe (D). **E, F.** Wartości z wykresów C i D rozbite na podgrupy PU i NU. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Mann-Whitney: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Liczebność grup: A, PU-SUM  $n = 8-15$ , NU-SUM  $n = 16-39$ ; B, PU-SUM  $n = 15$ , NU-SUM  $n = 61$ ; C, PU-SUM  $n = 8$ , NU-SUM  $n = 16-18$ ; D, PU-SUM  $n = 8$ , NU-SUM  $n = 41$ ; E, PU-MAX  $n = 2-5$ , PU-PROG  $n = 6-10$ , NU-CEN  $n = 3-5$ , NU-D1  $n = 3-9$ , NU-SGL  $n = 2-3$ , NU-0  $n = 8-22$ ; F, PU-MAX  $n = 5$ , PU-PROG  $n = 10$ , NU-CEN  $n = 5$ , NU-D1  $n = 17$ , NU-SGL  $n = 5$ , NU-0  $n = 34$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S7.

#### 4.6. W kolejnych sesjach treningowych u szczurów potencjalnie uczących się rośnie odsetek nagrodzonych USV

Analizę opisaną w tym podrozdziale wykonano na wynikach uzyskanych z protokołów doświadczalnych 4-6, gdzie zastosowano 30 nagród.

Po przydzieleniu USV emitowanych przez szczury do jednej z trzech kategorii przyjętych w piśmiennictwie (rozdz. 3.4), w grupie USV 50-kHz zauważono nieliczne USV nowej kategorii w paśmie 44 kHz (USV 44-kHz, Olszyński *i wsp.*, 2023). USV 50-kHz są dźwiękami krótkimi, które rzadko przekraczają granicę 100 ms (Portfors, 2007). Dodatkowo ich częstotliwość jest zwykle w różny sposób modulowana (Wright *i wsp.*, 2010). Jednak u części szczurów stwierdzono USV 44-kHz, które są wyjątkowo długie ( $> 150$  ms) i niemodulowane. Choć spełniają kryterium przynależności do USV 50-kHz (częstotliwość  $> 32$  kHz), ogólną charakterystyką bardziej przypominają USV 22-kHz (częstotliwość  $< 32$  kHz). USV 44-kHz zdarzały się rzadko i zostały wyłączone z analizy liczebności i właściwości USV 50-kHz. USV 44-kHz pojawiły się w pojedynczych sesjach:

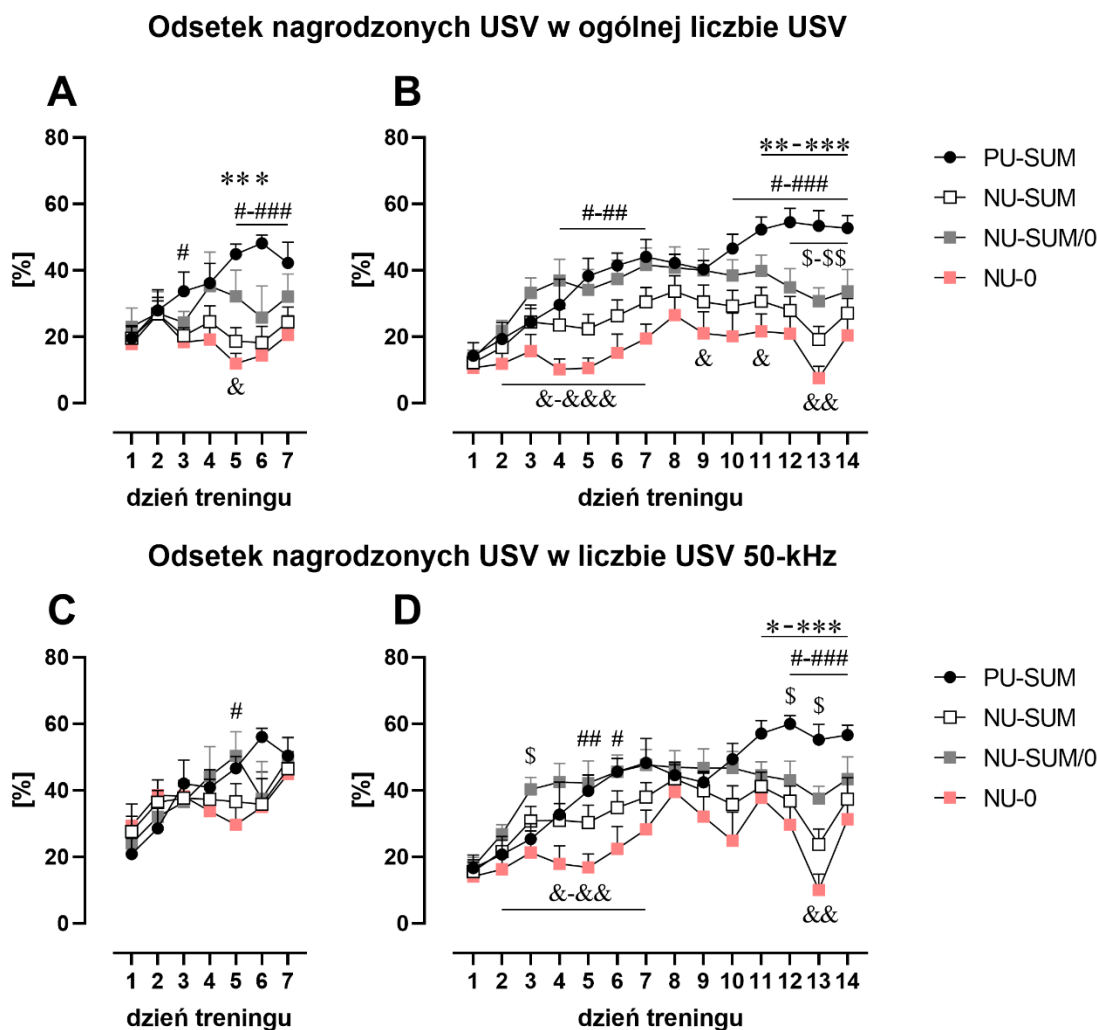
1. u jednego szczura grupy NU-SUM w jednym dniu habituacji do klatki (stanowiąc 75,00% USV o częstotliwości  $> 32$  kHz);
2. u dwóch szczurów grupy NU-SUM łącznie w dwóch sesjach treningowych (stanowiąc średnio 2,29% USV o częstotliwości  $> 32$  kHz);
3. u pięciu szczurów grupy PU-SUM łącznie w 21 sesjach treningowych (stanowiąc średnio 7,50% USV o częstotliwości  $> 32$  kHz);
4. u jednego szczura spośród wymienionych w punkcie 3 w jednym dniu testu (stanowiąc 0,54% USV o częstotliwości  $> 32$  kHz).

Łącznie w protokołach 4-6 stwierdzono 34 894 USV 50-kHz, z czego 102 (0,29%) stanowiły USV o nietypowej charakterystyce, które wyłączono z późniejszej analizy.

Odsetek nagrodzonych USV w stosunku do wszystkich emitowanych USV podczas sesji treningowych rośnie u szczurów PU-SUM. U szczurów z habituacją (cztery dni) i treningami przez siedem dni rośnie w grupie PU-SUM ( $p = 0,0255$ , Friedman,  $p = 0,0625$ , Wilcoxon; Ryc. 18A, Tab. S8a), lecz nie zmienia się w grupach NU (Ryc. 18A, Tab. S8a). U szczurów z 14 dniami treningów odsetek ten nie zmienia się w grupie NU-0 (Ryc. 18B, Tab. S8b), rośnie zaś w pozostałych grupach (PU-SUM, NU-SUM, NU-SUM/0,  $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0034$ - $0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 18B, Tab. S8b). Grupa PU-SUM charakteryzuje się istotnie wyższym odsetkiem nagrodzonych USV w stosunku do wszystkich USV przede wszystkim

w porównaniu z grupą NU-0 (tj. największa liczba sesji treningowych z  $p < 0,05$ , Mann-Whitney; Ryc. 18AB, Tab. S8cd). PU-SUM różni się od wszystkich pozostałych grup w ostatnie trzy treningi z czternastu (Ryc. 18B, Tab. S8d).

Odsetek nagrodzonych USV w stosunku do USV 50-kHz podczas sesji treningowych rośnie u szczurów PU-SUM. U szczurów z habituacją (cztery dni) i treningami przez siedem dni rośnie w grupie PU-SUM ( $p = 0,0059$ ; Friedman,  $p = 0,0625$ , Wilcoxon; Ryc. 18C, Tab. S8a), lecz nie zmienia się w grupach NU (Ryc. 18C, Tab. S8a). U szczurów z 14 dniami treningów odsetek ten nie zmienia się w grupie NU-0 (Ryc. 18B, Tab. S8b), rośnie zaś w pozostałych grupach (PU-SUM, NU-SUM, NU-SUM/0,  $p < 0,0001$ , Friedman;  $p < 0,05$ , Wilcoxon; Ryc. 18D, Tab. S8b). Największa różnica w odsetku nagrodzonych USV w stosunku do wszystkich USV 50-kHz (tj. największa liczba sesji treningowych z  $p < 0,05$ , Mann-Whitney; Ryc. 18AB, Tab. S8cd) widoczna jest między grupami NU-SUM/0 a NU-0. PU-SUM różni się od wszystkich pozostałych grup w treningach 12 i 13 na czternaście sesji treningowych (Ryc. 18D, Tab. S8d).



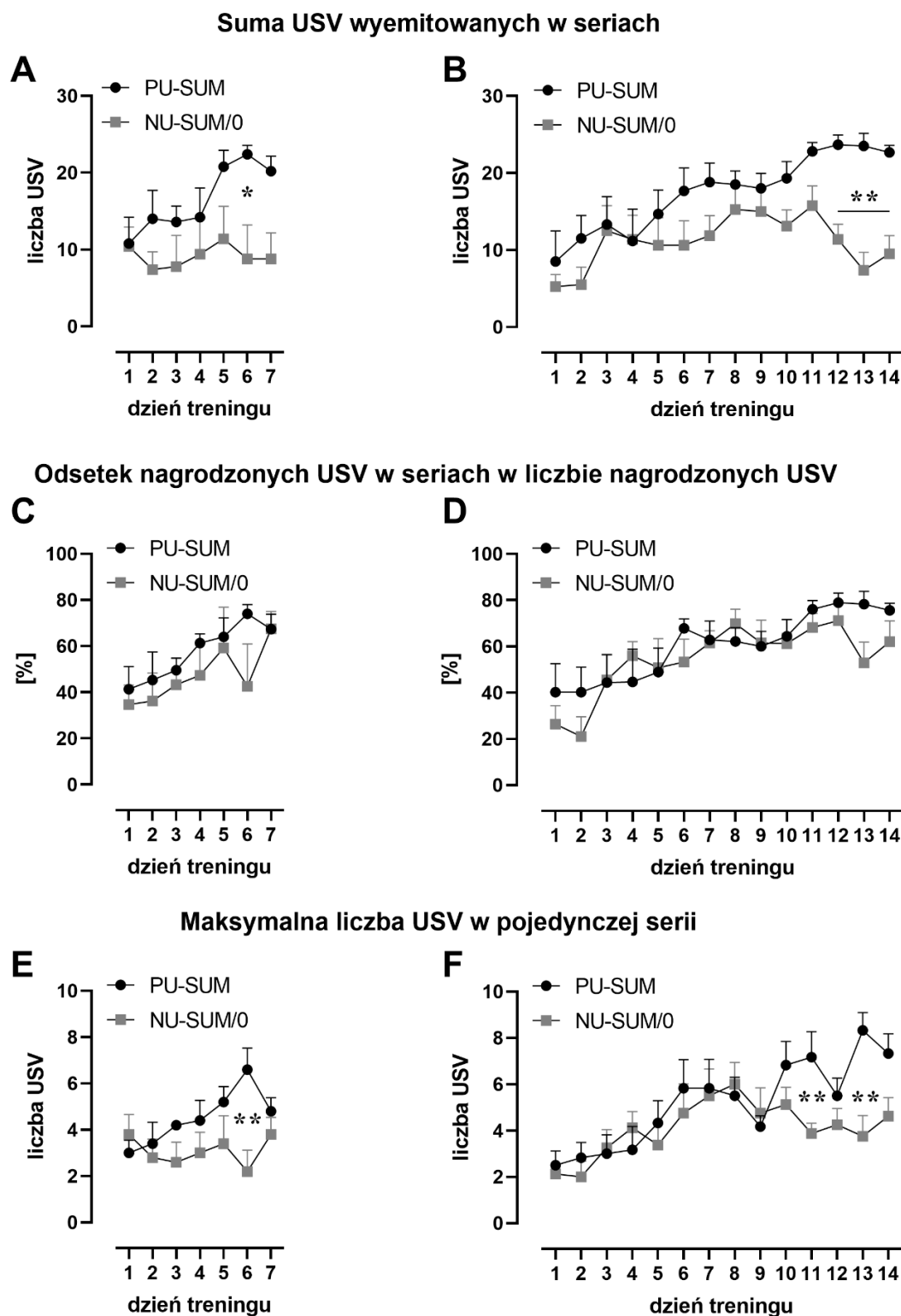
**Ryc. 18. Udział nagrodzonych USV w ogólnej liczbie USV (A, B) oraz w liczbie USV 50-kHz (C, D) podczas sesji treningowych.** Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej (A, C) lub 14 sesji treningowych (B, D). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \* PU-SUM vs NU-SUM, # PU-SUM vs NU-0, \$ PU-SUM vs NU-SUM/0, & NU-SUM/0 vs NU-0; jeden znak (\*, #, \$ lub &)  $p < 0,05$ , dwa znaki  $p < 0,01$ , trzy znaki  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney. Liczebność grup (szczury z 7 sesjami treningowymi): PU-SUM  $n = 5$ , NU-SUM  $n = 14-15$ , NU-SUM/0  $n = 5$ , NU-0  $n = 9-10$ . Liczebność grup (szczury z 14 sesjami treningowymi): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM  $n = 15-16$ , NU-SUM/0  $n = 8$ , NU-0  $n = 7-8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S8.

#### 4.7. Nagradzane USV były emitowane w seriach pojedynczych dźwięków

Okazało się, że wiele nagrodzonych USV jest emitowanych po sobie, jeden po drugim, tj. w seriach; za serię uznano co najmniej dwa kolejne ultradźwięki nagrodzone. Emisja nagradzanych USV w seriach miała miejsce zarazem u szczurów z grup PU-SUM, jak i grup NU-SUM/0 (szczury NU-0 nie zostały uwzględnione w analizie ze względu na bardzo niską emisję USV). Sumaryczna liczba USV wyemitowanych w seriach rosła w grupach PU-SUM, zarówno u szczurów z siedmioma sesjami treningowymi ( $p = 0,0430$ , Friedman,  $p = 0,0625$ ,

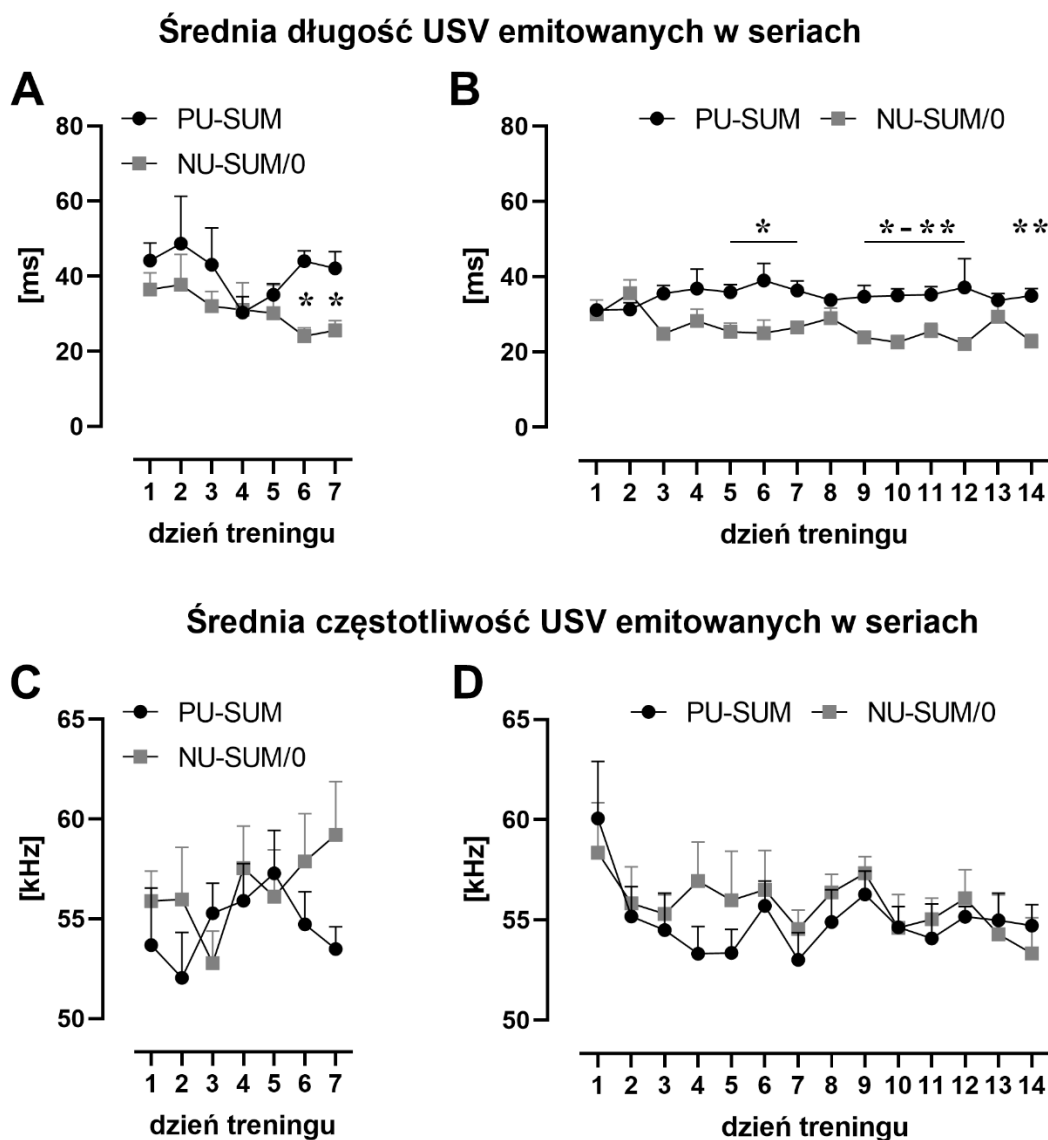


Wilcoxon; Ryc. 19A), jak i czternastoma sesjami treningowymi ( $p = 0,0010$ , Friedman,  $p = 0,0625$ , Wilcoxon; Ryc. 19B, Tab. S9a). Liczba USV emitowanych w seriach była przeważnie wyższa w grupie PU-SUM niż NU-SUM/0, w tym w pojedynczych sesjach treningowych istotnie wyższa (Mann-Whitney, Ryc. 19AB, Tab. S9b). Podobnie, maksymalna liczba USV wyemitowanych w pojedynczej serii była przeważnie wyższa w grupie PU-SUM niż NU-SUM/0, w tym w pojedynczych sesjach treningowych istotnie wyższa ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney; Ryc. 19EF, Tab. S9b).



**Ryc. 19. Liczebność nagrodzonych USV emitowanych w seriach.** A, B. Suma USV wyemitowanych w seriach. C, D. Odsetek nagrodzonych USV w seriach w całkowitej liczbie nagrodzonych USV. E, F. Maksymalna liczba USV w pojedynczej serii USV. Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano 7 (A, C, E) lub 14 (B, D, F) sesji treningowych. Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney. Liczebność grup (szczury z 7 sesjami treningowymi): PU-SUM  $n = 5$ , NU-SUM/0  $n = 5$ . Liczebność grup (szczury z 14 sesjami treningowymi): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM/0  $n = 8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S9.

Długość USV emitowanych w seriach nie wykazywała istotnego trendu zmian w ciągu kolejnych sesji treningowych ani w grupie PU-SUM, ani w grupie NU-SUM/0 (Ryc. 20AB, Tab. S10a), lecz podczas wielu sesji treningowych grupa PU-SUM emitowała USV dłuższe niż te emitowane przez grupę NU-SUM/0 ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney; Ryc. 20AB, Tab. S10b). Dodatkowo, spośród wszystkich serii USV wyemitowanych przez pojedynczego szczura wybrano tę najdłuższą; analiza takich serii wykazała, że szczury PU-SUM emitują w nich USV znacząco dłuższe niż szczury NU-SUM/0 ( $44,7 \pm 8,1$  vs  $26,4 \pm 2,6$  ms,  $p = 0,0066$ , Wilcoxon), emitując zarazem więcej USV w tej samej jednostce czasu ( $15,5 \pm 1,0$  vs  $9,3 \pm 1,6$  USV/min,  $p = 0,0128$ , Wilcoxon). Z kolei częstotliwość USV (częstotliwość w maksimum uśrednionego widma), liczona ponownie dla wszystkich serii, obniżała się wraz z kolejnymi treningami wyłącznie u szczurów PU-SUM z 14 sesjami treningowymi ( $p = 0,0441$ , Friedman;  $p = 0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 20D, Tab. S10a), jednak wyraźnych różnic między grupami nie stwierdzono w żadnej z sesji treningowych.



**Ryc. 20.** Zmiany właściwości USV emitowanych w seriach podczas kolejnych sesji treningowych u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM/0). **A, B.** Średnia długość USV w pojedynczej serii USV. **C, D.** Średnia częstotliwość USV wyemitowanych w seriach. Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano 7 (**A, C**) lub 14 (**B, D**) sesji treningowych. Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney. Liczebność grup (szczury z 14 sesjami treningowymi): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM/0  $n = 8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S10.

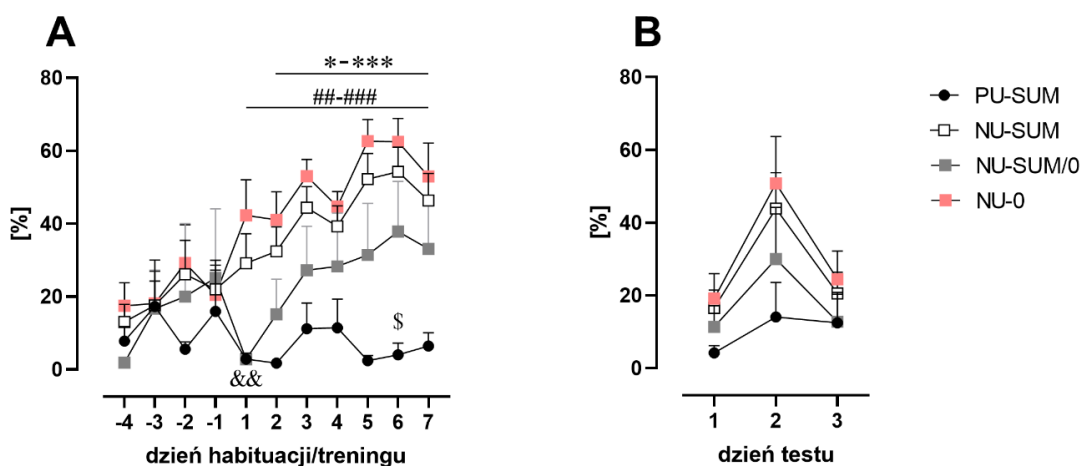
#### 4.8. Szczury nieuczące się emitują krótkie USV 22-kHz

Analizę krótkich USV 22-kHz wykonano dla doświadczeń, w których maksymalna liczba nagród wynosiła 30, tj. dla protokołów 4-5 (14 sesji treningowych) oraz protokołu 6 (7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 dniami habituacji).

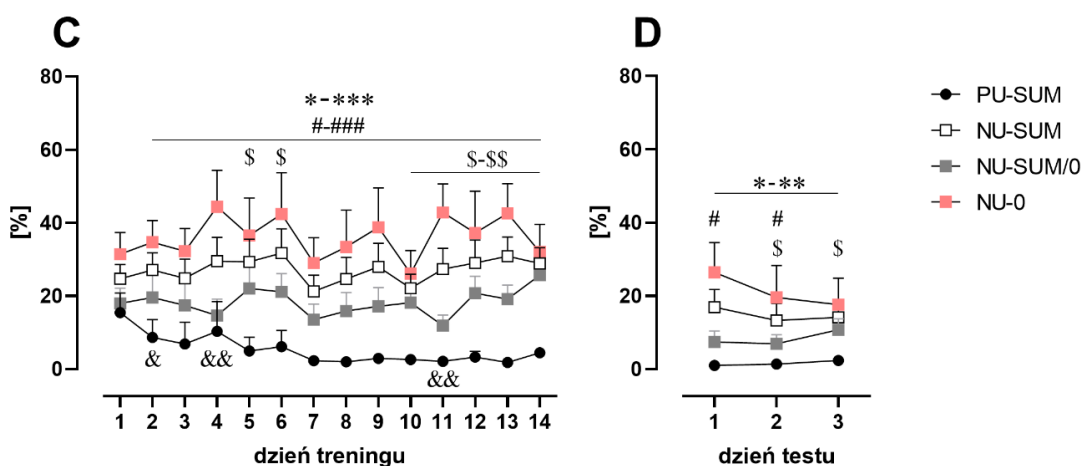
Odsetek emitowanych krótkich USV 22-kHz w stosunku do wszystkich emitowanych USV w treningach. U szczurów z habituacją (4 dni) i treningami przez siedem dni nie zmienia się

w grupie PU-SUM ( $p = 0,9092$ , Friedman;  $p > 0,9999$ , Wilcoxon; Ryc. 21A, Tab. S11a), lecz rośnie w grupach NU (NU-SUM:  $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0006$ , Wilcoxon; NU-SUM/0:  $p = 0,0218$ , Friedman,  $p = 0,1250$ , Wilcoxon; NU-0:  $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0098$ , Wilcoxon; Ryc. 21A, Tab. S11a). U szczurów z 14 dniami treningów odsetek ten wyraźnie obniża się w grupie PU-SUM ( $p = 0,0197$ , Friedman,  $p = 0,0625$ , Wilcoxon; Ryc. 21C, Tab. S11a), nie zmienia się zaś w grupach NU ( $p = 0,2390-0,5130$ , Friedman,  $p = 0,4609-0,7422$ , Wilcoxon, Ryc. 21C, Tab. S11a). Dodatkowo, już podczas drugiej sesji treningowej szczury NU (NU-SUM, NU-0) cechują się większym odsetkiem krótkich USV 22-kHz niż szczury PU-SUM (Mann-Whitney, Ryc. 21C, Tab. S11d). U szczurów, u których zastosowano wstępne przyzwyczajanie do klatki (Ryc. 21A), różnica w udziale krótkich 22-kHz-USV między grupą PU-SUM a NU-0 pojawia się już w pierwszej sesji treningowej, a między grupą PU-SUM a NU-SUM w drugiej sesji treningowej (Mann-Whitney; Tab. S11b). W większości sesji treningowych odsetek krótkich USV 22-kHz w grupie PU-SUM był niższy niż w pozostałych grupach, zwłaszcza pod koniec fazy treningowej (Mann-Whitney; Ryc. 21AC, Tab. S11bd). Podsumowując, procent krótkich USV-22-kHz u szczurów PU-SUM ( $6,15 \pm 2,14\%$ ) był niższy niż u szczurów NU-SUM/0 ( $15,67 \pm 2,99\%$ ,  $p = 0,0031$ ), NU-SUM ( $29,90 \pm 3,58\%$ ,  $p < 0,001$ ) i u szczurów NU-0 ( $40,19 \pm 4,42\%$ ,  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney) analizując pierwsze siedem sesji treningowych. Różnice te były także widoczne w sesjach testowych (Ryc. 21BD, Tab. S11ce).

### Odsetek krótkich 22-kHz USV u szczurów z 7 dniami treningu



### Odsetek krótkich 22-kHz USV u szczurów z 14 dniami treningu

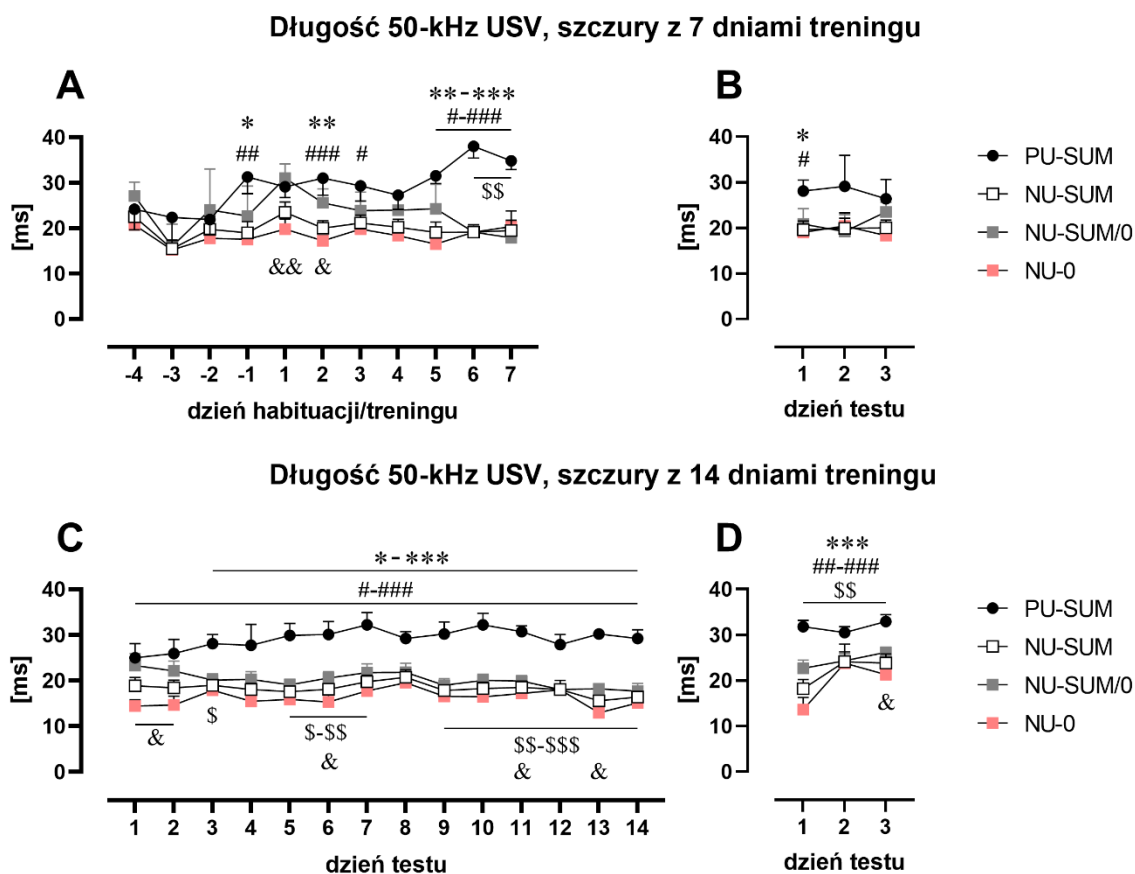


**Ryc. 21. Udział krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV.** Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: (A) 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, (C) 14 sesji treningowych. Niezależnie od liczby sesji treningowych po ostatnim treningu następowały trzy sesje testowe (BD). Wartości dla szczurów NU przedstawione są dwójako: wszystkie szczury NU zsumowane są w krzywej oznaczonej białymi kwadratami (NU-SUM), dodatkowo dane tworzące tę krzywą rozdzielone są na grupę szczurów NU, które kiedykolwiek otrzymały maksymalną liczbę nagród (NU-SUM/0, szare kwadraty) i szczury, które ani razu nie otrzymały maksymalnej liczby nagród (NU-0, truskawkowe kwadraty). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \* PU-SUM vs NU-SUM, # PU-SUM vs NU-0, \$ PU-SUM vs NU-SUM/0, & NU-SUM/0 vs NU-0; jeden znak (\*, #, \$ lub &)  $p < 0,05$ , dwa znaki  $p < 0,01$ , trzy znaki  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney. Liczebność grup (AB): PU-SUM  $n = 5$ , NU-SUM  $n = 14-15$ , NU-SUM/0  $n = 4-5$ , NU-0  $n = 10$ . Liczebność grup (CD): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM  $n = 16$ , NU-SUM/0  $n = 8$ , NU-0  $n = 8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S11.

#### 4.9. U szczurów potencjalnie uczących się zachodzą zmiany we właściwościach USV

Długość USV 50-kHz, emitowanych podczas doświadczenia, wykazywała trend wzrostowy u szczurów PU-SUM z siedmioma sesjami treningowymi ( $p = 0,0442$ , dla dni treningu,

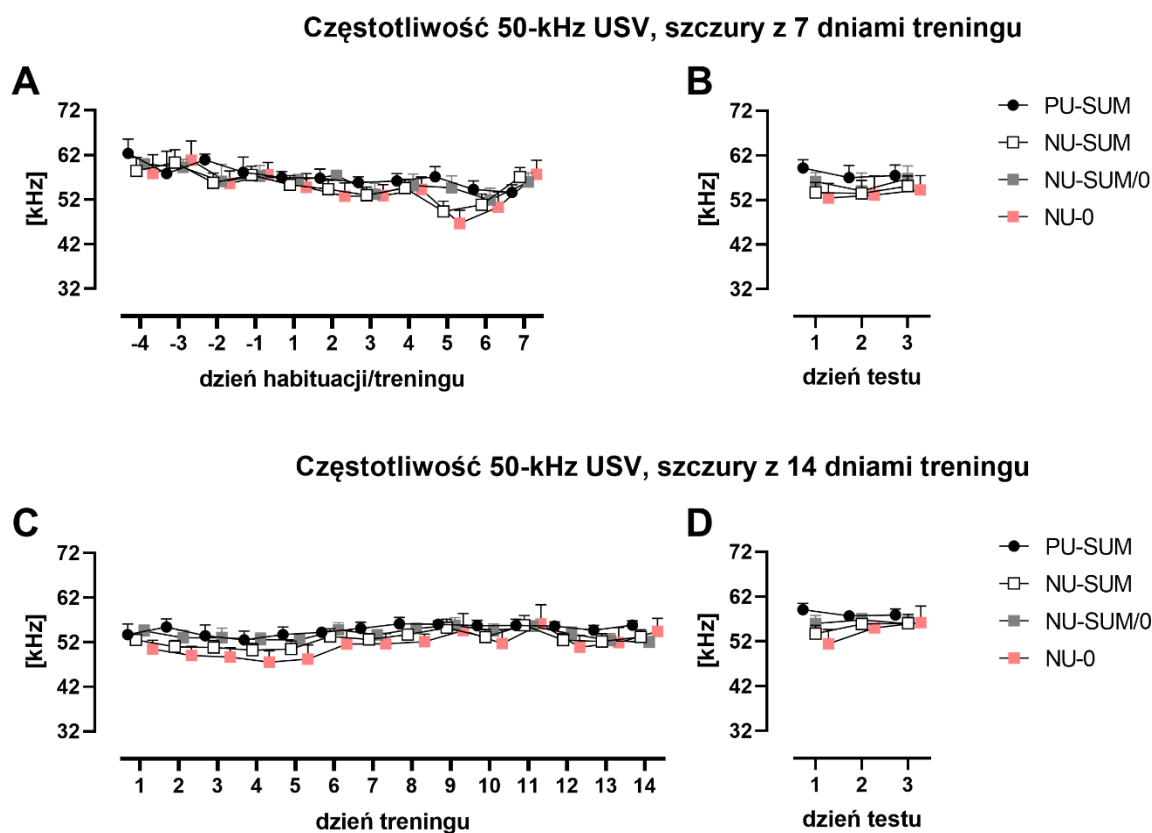
$p = 0,0050$  dla dni habituacji i treningu, Friedman; Ryc. 22A, Tab. S12a). Długość USV 50-kHz była wyższa podczas sesji treningowych u szczurów z grupy PU-SUM niż z NU-SUM, w tym istotnie wyższa w czterech treningach z siedmiu (Mann-Whitney; Ryc. 22A, Tab. S12c); podobna sytuacja miała miejsce w sesjach testowych, gdzie długość USV 50-kHz była zawsze wyższa w grupie PU-SUM niż NU-SUM, z czego jeden raz istotnie wyższa (Mann-Whitney; Ryc. 22B, Tab. S12c). W grupach z zastosowaniem czternastu sesji treningowych różnica między grupą PU-SUM oraz grupą NU-SUM pojawiała się w trzecim dniu treningu; od tego dnia długość USV 50-kHz grupy PU-SUM była istotnie wyższa, zarówno w sesjach treningowych, jak i w wszystkich sesjach testowych (Mann-Whitney; Ryc. 22CD, Tab. S12d). Podsumowując, długość USV 50-kHz była wyższa u wszystkich szczurów PU-SUM (7- i 14-treningowych analizowanych razem) podczas pierwszych siedmiu sesji treningowych ( $p = 0,0092$ , Friedman,  $p = 0,0205$ , Wilcoxon, Ryc. 22AC). Średnia długość USV 50-kHz u szczurów PU-SUM ( $29,9 \pm 1,5$  ms) była wyższa niż u szczurów NU-SUM/0 ( $22,0 \pm 1,2$  ms,  $p = 0,0011$ ), NU-SUM ( $19,6 \pm 0,8$  ms,  $p < 0,0001$ ) oraz szczurów NU-0 ( $17,9 \pm 0,7$  ms,  $p < 0,0001$ ; Mann-Whitney).



**Ryc. 22. Długość USV 50-kHz.** Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: (A) 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, (C) 14 sesji treningowych. Niezależnie od liczby sesji treningowych po ostatnim treningu następowały trzy sesje testowe (B, D). Wartości dla szczurów NU przedstawione są dwojako: wszystkie szczury NU zsumowane są w krzywej oznaczonej białymi kwadratami (NU-SUM), dodatkowo dane tworzące tę krzywą rozłożone są na grupę szczurów NU, które kiedykolwiek otrzymały maksymalną liczbę nagród (NU-SUM/0, szare kwadraty) i szczury, które ani razu nie otrzymały maksymalnej liczby nagród (NU-0, truskawkowe kwadraty). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \* PU-SUM vs NU-SUM, # PU-SUM vs NU-0, \$ PU-SUM vs NU-SUM/0, & NU-SUM/0 vs NU-0; jeden znak (\*, #, \$ lub &)  $p < 0,05$ , dwa znaki  $p < 0,01$ , trzy znaki  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney. Liczebność grup (AB): PU-SUM  $n = 5$ , NU-SUM  $n = 13-15$ , NU-SUM/0  $n = 4-5$ , NU-0  $n = 8-10$ . Liczebność grup (CD): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM  $n = 15-16$ , NU-SUM/0  $n = 8$ , NU-0  $n = 7-8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S12.



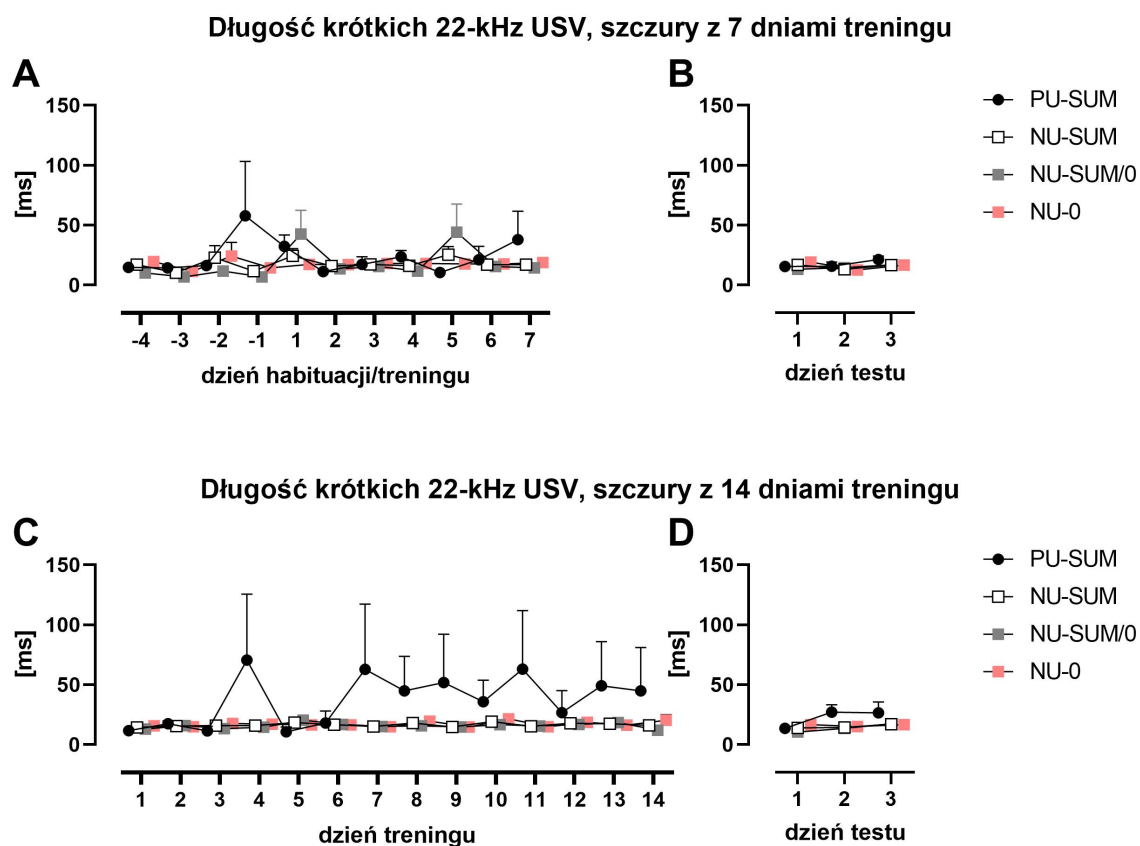
Częstotliwość USV 50-kHz pozostawała względnie stała, osiągając wartości porównywalne w porównywanych grupach (Ryc. 23, Tab. S13).



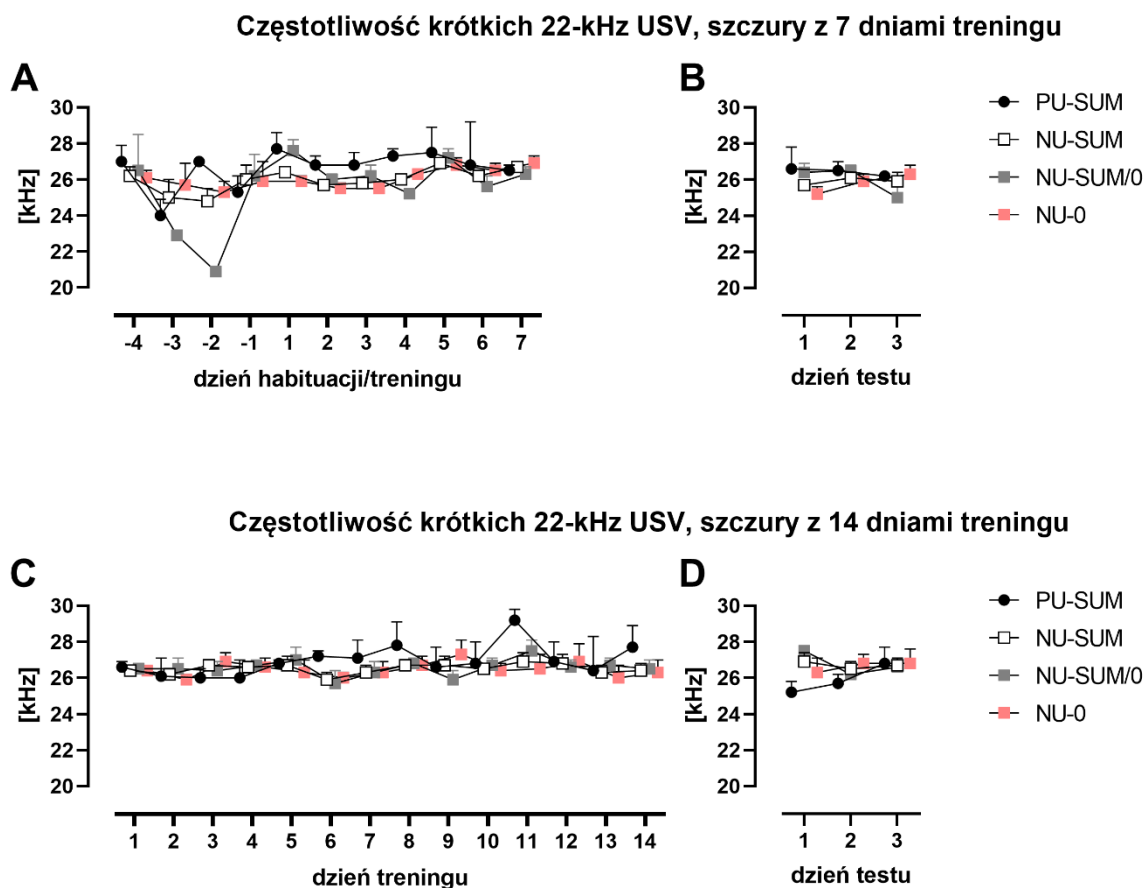
**Ryc. 23.** Średnia częstotliwość USV 50-kHz. Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: (A) 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, (C) 14 sesji treningowych. Niezależnie od liczby sesji treningowych po ostatnim treningu następowały trzy sesje testowe (B, D). Wartości dla szczurów NU przedstawione są dwojako: wszystkie szczury NU zsumowane są w krzywej oznaczonej białymi kwadratami (NU-SUM), dodatkowo dane tworzące tę krzywą rozłożone są na grupę szczurów NU, które kiedykolwiek otrzymały maksymalną liczbę nagród (NU-SUM/0, szare kwadraty) i szczury, które ani razu nie otrzymały maksymalnej liczby nagród (NU-0, truskawkowe kwadraty). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney. Liczebność grup (AB): PU-SUM  $n = 5$ , NU-SUM  $n = 13-15$ , NU-SUM/0  $n = 4-5$ , NU-0  $n = 8-10$ . Liczebność grup (CD): PU-SUM  $n = 6$ , NU-SUM  $n = 15-16$ , NU-SUM/0  $n = 8$ , NU-0  $n = 7-8$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S13.

Emisja krótkich USV 22-kHz zdarzała się rzadziej niż USV 50-kHz. Ich właściwości (długość, Ryc. 24 oraz częstotliwość, Ryc. 25) pozostawały stosunkowo stałe.

Szczury PU-SUM częściej emitowały długie USV 22-kHz niż szczury NU-SUM. W grupie PU-SUM takie ultradźwięki emitowało 6 z 11 zbadanych szczurów (54,5%) w 20 sesjach ze 119 (16,8%). W grupie NU-SUM takie ultradźwięki emitowały 3 z 31 zbadanych szczurów (9,7%) w 3 sesjach z 329 (0,9%).



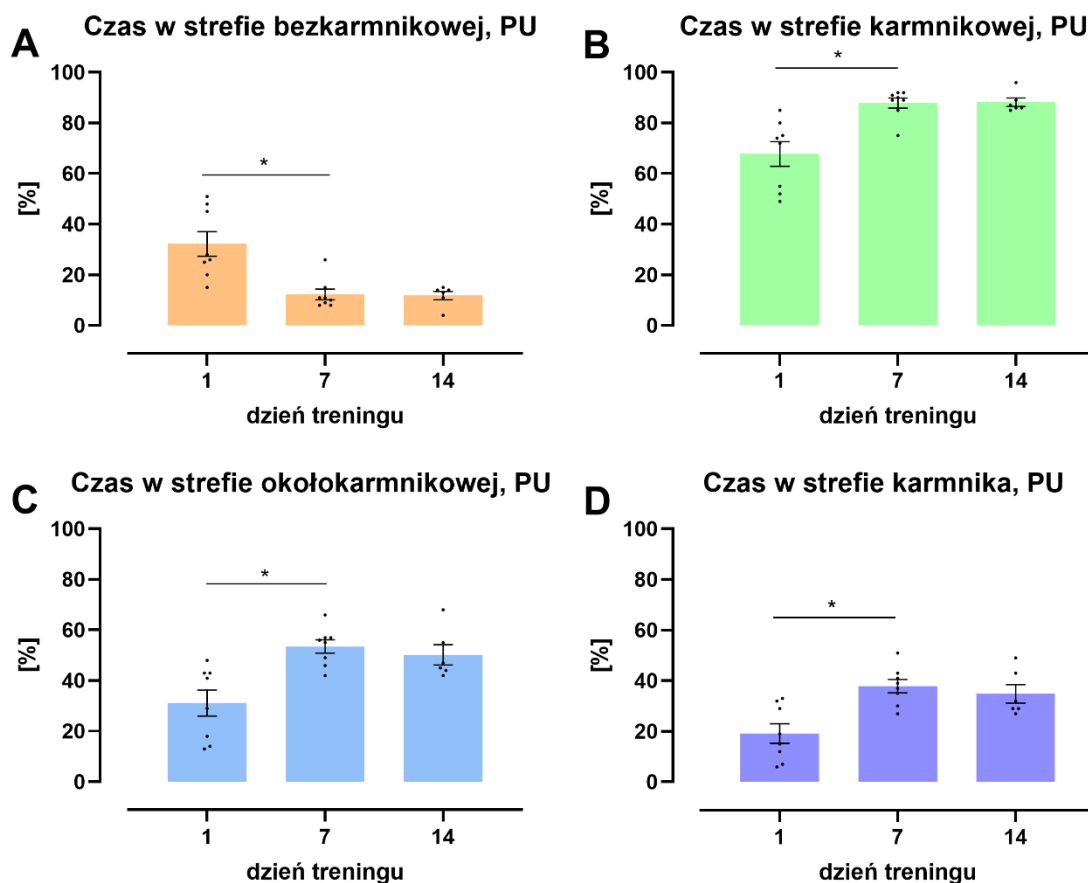
**Ryc. 24.** Średnia długość krótkich USV 22-kHz. Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: (A) 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, (C) 14 sesji treningowych. Niezależnie od liczby sesji treningowych po ostatnim treningu następowały trzy sesje testowe (BD). Wartości dla szczurów NU przedstawione są dwójako: wszystkie szczury NU zsumowane są w krzywej oznaczonej białymi kwadratami (NU-SUM), dodatkowo dane tworzące tę krzywą rozłożone są na grupę szczurów NU, które kiedykolwiek otrzymały maksymalną liczbę nagród (NU-SUM/0, szare kwadraty) i szczury, które ani razu nie otrzymały maksymalnej liczby nagród (NU-0, truskawkowe kwadraty). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney. Liczebność grup (AB): PU-SUM  $n = 2-5$ , NU-SUM  $n = 8-15$ , NU-SUM/0  $n = 1-5$ , NU-0  $n = 6-10$ . Liczebność grup (CD): PU-SUM  $n = 3-6$ , NU-SUM  $n = 14-16$ , NU-SUM/0  $n = 6-8$ , NU-0  $n = 7-8$ .



**Ryc. 25.** Średnia częstotliwość krótkich USV 22-kHz. Wykresy przedstawiają wartości dla szczurów z doświadczeń, w których zastosowano: (A) 7 sesji treningowych, poprzedzonych 4 sesjami przyzwyczajania do klatki doświadczalnej, (C) 14 sesji treningowych. Niezależnie od liczby sesji treningowych po ostatnim treningu następowały trzy sesje testowe (BD). Wartości dla szczurów NU przedstawione są dwojako: wszystkie szczury NU zsumowane są w krzywej oznaczonej białymi kwadratami (NU-SUM), dodatkowo dane tworzące tę krzywą rozłożone są na grupę szczurów NU, które kiedykolwiek otrzymały maksymalną liczbę nagród (NU-SUM/0, szare kwadraty) i szczury, które ani razu nie otrzymały maksymalnej liczby nagród (NU-0, truskawkowe kwadraty). Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney. Liczebność grup (AB): PU-SUM  $n = 2-5$ , NU-SUM  $n = 8-15$ , NU-SUM/0  $n = 1-5$ , NU-0  $n = 6-10$ . Liczebność grup (CD): PU-SUM  $n = 3-6$ , NU-SUM  $n = 14-16$ , NU-SUM/0  $n = 6-8$ , NU-0  $n = 7-8$ .

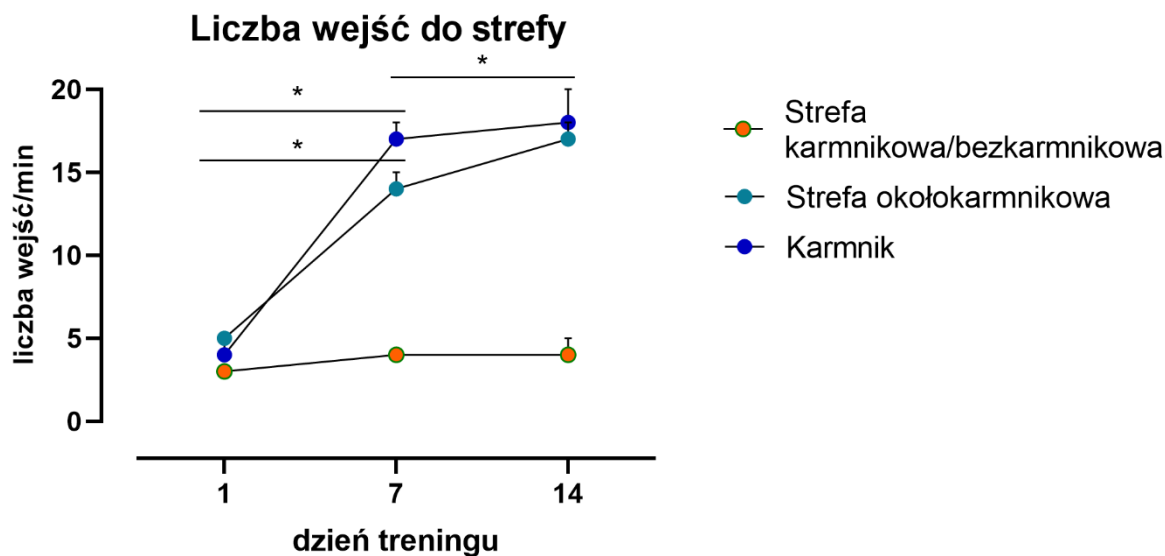
#### 4.10. Szczury spędzają najwięcej czasu w strefie klatki obejmującej karmnik

Porównanie zapisu wideo z pierwszej i siódmej sesji treningowej wykazało wzrost odsetka czasu spędzonego w strefie karmnikowej ( $p = 0,0234$ , Wilcoxon; Ryc. 26B), okołokarmnikowej ( $p = 0,0156$ , Wilcoxon; Ryc. 26C), jak i w strefie samego karmnika ( $p = 0,0156$ , Wilcoxon; Ryc. 26D, Tab. S14).



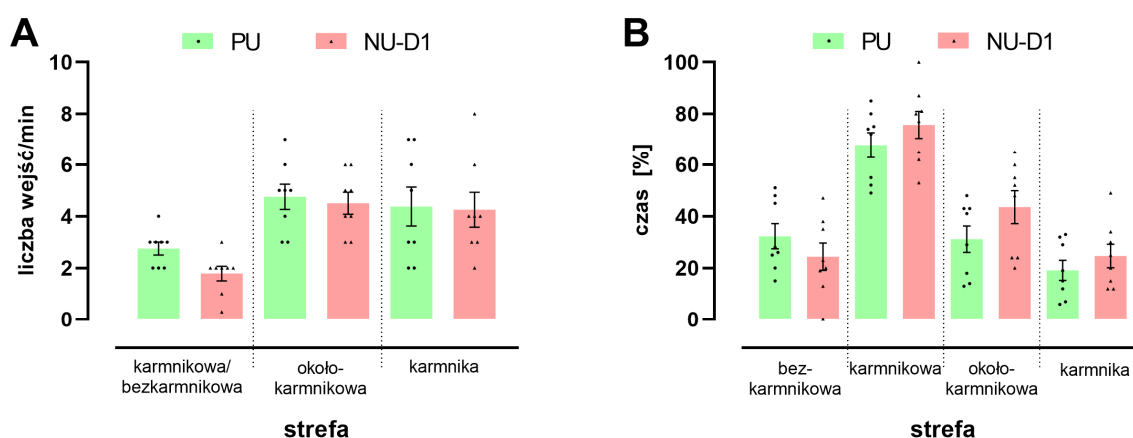
**Ryc. 26.** Odsetek czasu spędzonego w strefie bezkarmnikowej (A), karmnikowej (B), okołokarmnikowej (C) i strefie karmnika (D) dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. \*  $p < 0,05$ , Wilcoxon. Liczebność grup:  $n = 6-8$ . Wyniki analizy statystycznej przedstawione w Tab. S14.

Między pierwszą sesją treningową a siódmą sesją treningową zwiększyła się także liczba wejść do strefy okołokarmnikowej ( $p = 0,0156$ , Wilcoxon) oraz strefy karmnika ( $p = 0,0156$ , Wilcoxon). Porównanie siódmej sesji treningowej i czternastej sesji treningowej również wykazało wzrost liczby wejść do strefy okołokarmnikowej ( $p = 0,0313$ , Wilcoxon), lecz nie do strefy karmnika (Ryc. 27, Tab. S15).



Ryc. 27. Liczba wejść do poszczególnych stref klatki u szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Wilcoxon. Liczebność grup:  $n = 6-8$ . Wyniki analizy statystycznej przedstawione w Tab. S15.

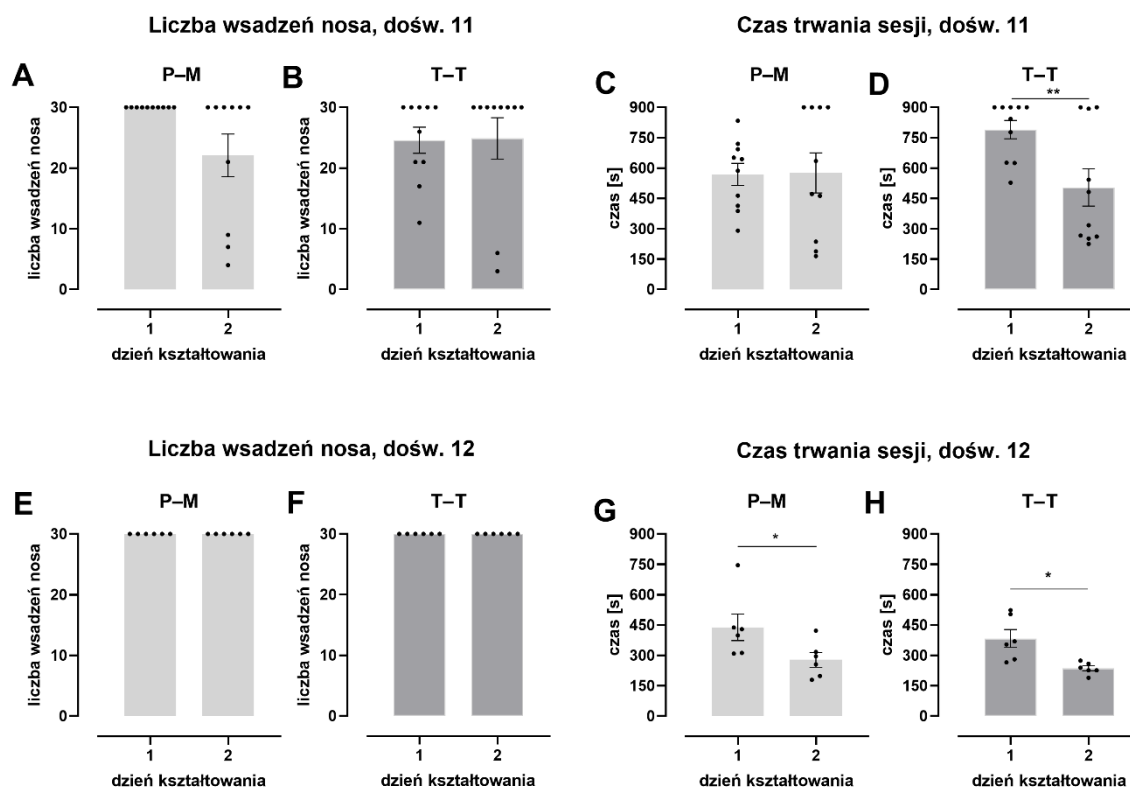
Porównano także czas spędzony w danej strefie między grupą szczurów PU a grupą NU-D1 podczas pierwszej sesji treningowej. Szczury z grupy NU-D1 ostatecznie nie spełniły przyjętego kryterium uczenia się, mimo wysokiej częstości wokalizowania w pierwszej sesji treningowej. Liczba wejść do poszczególnych stref oraz czas w nich spędzony był porównywalny dla obu tych grup (Mann-Whitney; Ryc. 28, Tab. S16).



Ryc. 28. Liczba wejść do danej strefy (A) i odsetek czasu spędzonego w danej strefie klatki (B) podczas pierwszej sesji treningowej u szczurów z grupy PU oraz szczurów grupy NU-D1. Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. Porównania statystyczne nie wykazały istotnych różnic. Liczebność grup:  $n = 8$ . Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w Tab. S16.

#### 4.11. Szczury nie uczą się rozróżniania dźwięków o różnej częstotliwości

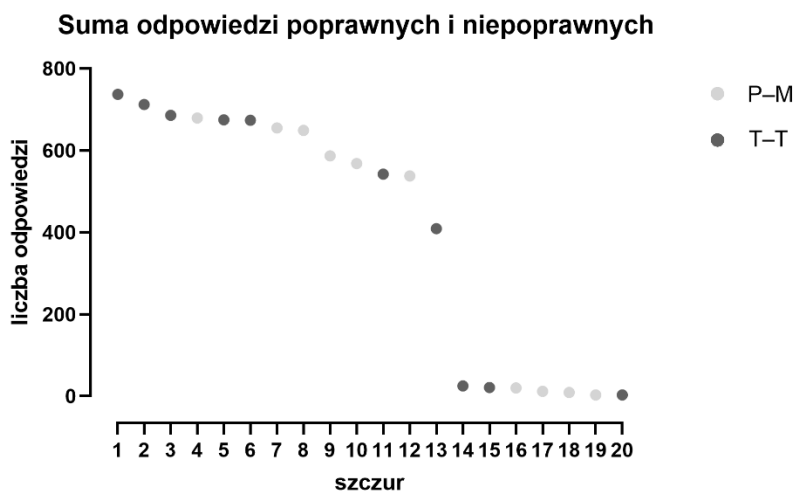
Liczba wsadzeń nosa nie różniła się między pierwszą a drugą sesją kształtowania, zarówno w doświadczeniu 11, jak i 12 (Wilcoxon; Ryc. 29ABEF, Tab. S17). Jednak czas sesji w drugim dniu kształtowania był krótszy niż w pierwszym w grupie T–T w doświadczeniu 11 ( $p = 0,0078$ , Wilcoxon; Ryc. 29D) oraz w obu grupach (P–M i T–T) w doświadczeniu 12 ( $p = 0,0313$  dla P–M,  $p = 0,0313$  dla T–T, Wilcoxon; Ryc. 29GH, Tab. S17).



Ryc. 29. Liczba wsadzeń nosa (ABEF) oraz czas trwania sesji (CDGH) podczas dwóch dni kształtowania reakcji instrumentalnej w protokole 11 (A-D) i protokole 12 (E-H). Sesje kształtowania reakcji instrumentalnej zostały przeprowadzone przed rozpoczęciem procedury treningowej. P-M (grupy szczurów, którym prezentowano ultradźwięk o stałej częstotliwości, tzw. płaski, P i o częstotliwości modulowanej, M); T-T (grupy szczurów, którym prezentowano dwa wygenerowane komputerowo niemodulowane ultradźwięki (tony, T) o różnej częstotliwości); P-M+T-T (połączone grupy P-M i T-T). Słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Punkty przedstawiają indywidualne wartości dla każdego szczura. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Wilcoxon. Liczebność grup: A-D  $n = 10$ ; E-H  $n = 6$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S17.

Podczas analiz statystycznych danych zebranych w doświadczeniu 11 zauważono, że zachowanie niektórych szczurów podczas sesji kształtowania reakcji instrumentalnej i sesji treningowych znacząco odbiega od zachowania pozostałych zwierząt. Pojedyncze szczury rzadko podejmowały próby wsadzenia nosa w jeden z dwóch otworów na nos przez całą fazę treningową (Ryc. 30). Dodatkowo zauważono, że w większości były to szczury, które nie uzyskały maksymalnej liczby nagród w drugim dniu kształtowania reakcji instrumentalnej

(Ryc. 29AB); co więcej, liczba wsadzeń nosa w drugim dniu kształtowania była niższa niż w pierwszym. Dlatego też wykonano dodatkową analizę statystyczną wyników z doświadczenia 11, z której wykluczono siedem szczurów (cztery szczury z grupy P–M, trzy szczury z grupy T–T; szczury 14-20 na Ryc. 30). Wyniki zebrane w doświadczeniu 11, z których usunięto szczury o wartościach odstających („O”), oznaczono jako „doświadczenie 11/O” (Ryc. 31, Ryc. 32).

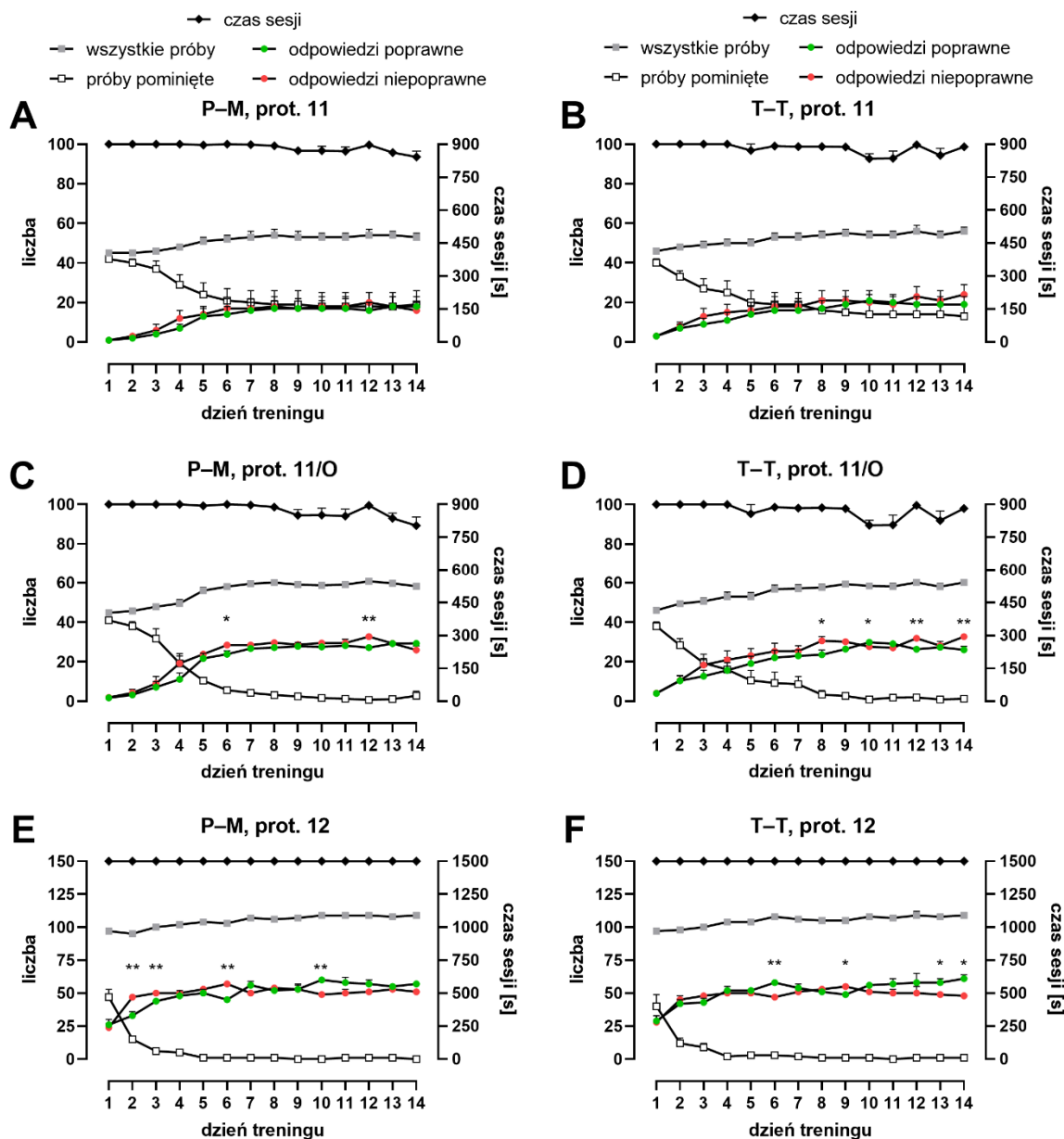


**Ryc. 30.** Suma odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych z 14 sesji treningowych szczurów po zastosowaniu protokołu 11. Wykres przedstawia szczury uporządkowane pod względem sumy wszystkich odpowiedzi. Ponieważ szczury o numerach 14-20 zachowywały się odmiennie od większości, wykonano dodatkową analizę statystyczną dla protokołu 11 (oznaczenie grupy: protokół 11/O).

W efekcie czternastu dni treningu rozróżniania dźwięków liczba wszystkich podjętych przez szczury prób zwiększyła się niezależnie od prezentowanych dźwięków (P–M lub T–T) i modyfikacji protokołu doświadczalnego (protokół 11 i 12;  $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0078–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31ABEF, Tab. S18). Podobnie, niezależnie od prezentowanych dźwięków i modyfikacji protokołu doświadczalnego, liczba odpowiedzi, zarówno poprawnych, jak i niepoprawnych, rosła ( $p < 0,0001–0,0044$ , Friedman;  $p = 0,0039–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31ABEF, Tab. S18), a liczba pominiętych prób zmniejszała się ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0078–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31ABEF, Tab. S18). W doświadczeniu 11 stwierdzono dodatkowo trend spadkowy czasu trwania sesji u obu grup (P–M i T–T;  $p = 0,0008–0,0050$ , Friedman; Ryc. 31AB, Tab. S18ab). W doświadczeniu 12 w obu grupach P–M i T–T w pojedynczych sesjach treningowych pojawiły się różnice między liczbą odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych ( $p = 0,0022–0,0043$ , Mann-Whitney; Ryc. 31EF, Tab. S18g). Po usunięciu siedmiu osobników o wartościach odstających z puli danych

doświadczenia 11 potwierdzono zmiany następujące w wyniku czternastodniowego treningu: zwiększenie liczby wszystkich podjętych prób w grupach P–M i T–T ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0156–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31CD, Tab. S18cd); zwiększenie liczby poprawnych i niepoprawnych odpowiedzi ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0156–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31CD, Tab. S18cd); zmniejszenie liczby prób pominiętych ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0156–0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 31CD, Tab. S18cd); trend spadkowy czasu trwania sesji ( $p = 0,0050–0,0008$ , Friedman; Ryc. 31CD, Tab. S18cd). Dodatkowo, w wyniku wykluczenia szczurów o wartościach odstających, odnotowano także różnice między liczbą odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych w pojedynczych sesjach treningowych ( $p = 0,0022–0,0498$  dla P–M,  $p = 0,0035–0,0338$  dla T–T, Mann-Whitney; Ryc. 31CD, Tab. S18g).





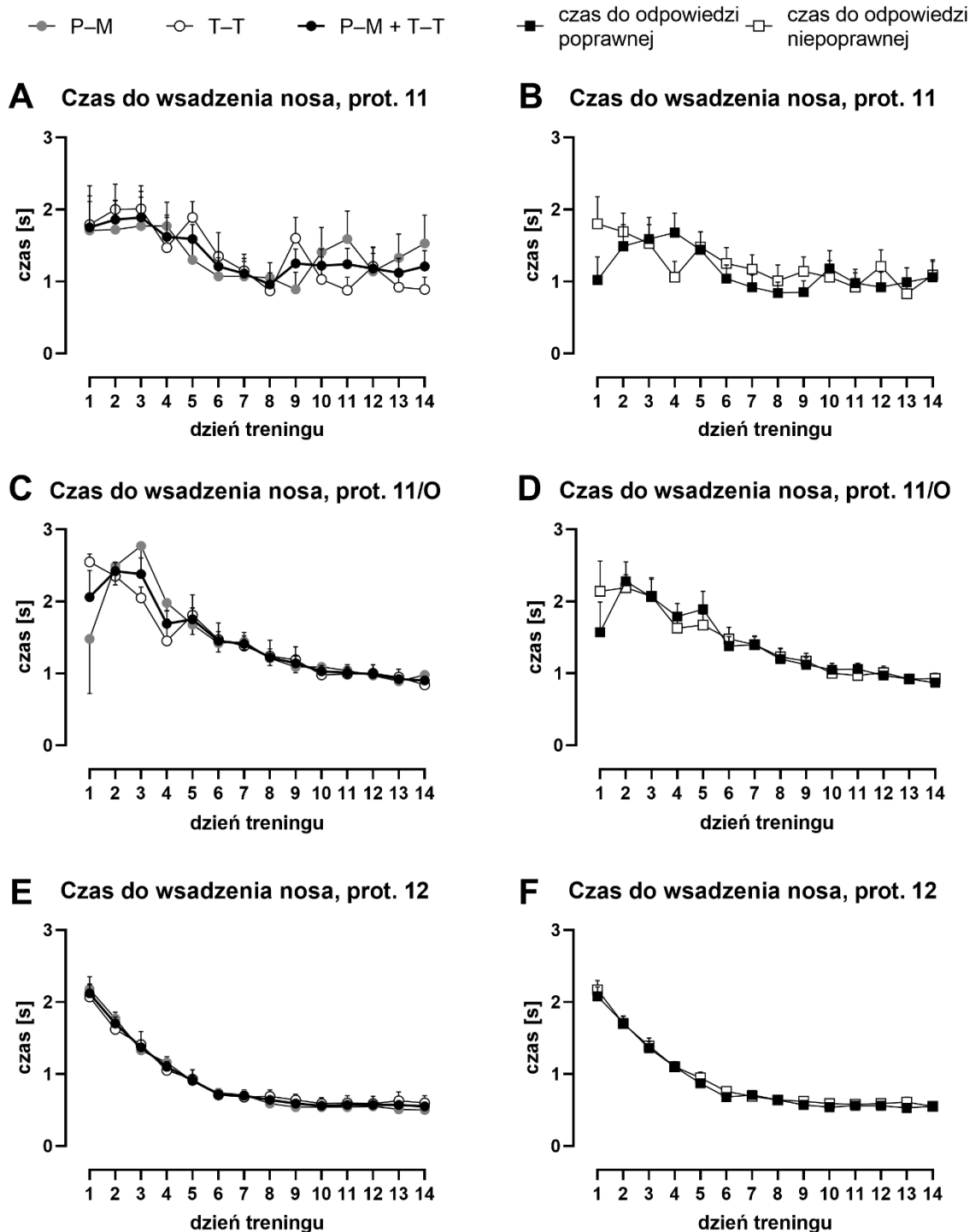
Ryc. 31. Liczba wszystkich prób, liczba odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych, liczba prób pominiętych oraz czas trwania sesji treningowych podczas 14 dni treningu rozróżniania dźwięków w protokole 11 (AB), protokole 11 bez uwzględnienia wartości odstających (11/O, CD) i protokole 12 (EF). P-M (grupy szczurów, którym prezentowano ultradźwięk o stałej częstotliwości, tzw. płaski, P i o częstotliwości modulowanej, M); T-T (grupy szczurów, którym prezentowano dwa wygenerowane komputerowo niemodulowane ultradźwięki (tony, T) o różnej częstotliwości); P-M+T-T (połączone grupy P-M i T-T). Kolorem zielonym zaznaczono odpowiedzi poprawne, kolorem czerwonym odpowiedzi niepoprawne. Wykresy przedstawiają wartości średnie  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney. Liczebność grup: A, B  $n = 10$ ; C  $n = 6$ ; D  $n = 7$ ; E, F  $n = 6$ . Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S18.

W efekcie czternastu dni treningu rozróżniania dźwięków średni czas upływający do wsadzenia nosa przez szczura w jeden z dwóch otworów dla szczurów z doświadczenia 11 wykazywał trend spadkowy: zarówno w grupie P-M ( $p = 0,0277$ , Friedman;  $p = 0,6523$ , Wilcoxon),

w grupie T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,1289$ , Wilcoxon), jak i dla sumy obu grup P-M + T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,0987$ , Wilcoxon). Średni czas do odpowiedzi poprawnej i niepoprawnej dla wszystkich szczurów także wykazywał trend spadkowy ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,9800$  dla odp. poprawnej,  $p = 0,0878$  dla odp. niepoprawnej, Wilcoxon; Ryc. 32AB, Tab. S19).

Po usunięciu wartości odstających z wyników doświadczenia 11 stwierdzono istotne skrócenie się średniego czasu do wsadzenia nosa w grupie T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0156$ , Wilcoxon) oraz dla sumy obu grup P-M + T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0046$ , Wilcoxon; Ryc. 32C, Tab. S19). Średni czas do wsadzenia nosa dla grupy P-M wykazywał trend spadkowy ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,5625$ , Wilcoxon; Ryc. 32CD, Tab. S19). Średni czas do odpowiedzi poprawnej wszystkich szczurów wykazywał trend spadkowy ( $p < 0,0001$ , Friedman;  $p = 0,1460$ , Wilcoxon), a do odpowiedzi niepoprawnej skracał się ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0166$ , Wilcoxon; Ryc. 32D, Tab. S19).

W doświadczeniu 12 stwierdzono coraz krótszy czas do wsadzenia nosa przez szczury zarówno w grupie P-M ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 32E), w grupie T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0313$ , Wilcoxon; Ryc. 32E), jak i dla sumy obu tych grup P-M + T-T ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,0005$ , Wilcoxon; Ryc. 32E). Średni czas do odpowiedzi poprawnej i niepoprawnej dla wszystkich szczurów skracał się ( $p < 0,0001$ , Friedman,  $p = 0,005$ , Wilcoxon; Ryc. 32F, Tab. S19).



**Ryc. 32.** Czas do wsadzenia nosa w jeden z dwóch otworów na nos w trakcie sesji treningowej rozróżniania dźwięków (protokół 11 (AB), protokół 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O, CD), protokół 12 (EF)). Wykresy przedstawiają średni czas jaki upłynął przed wsadzeniem nosa (ACE) dla szczurów z grupy P-M (USV o różnej częstotliwości i modulacji), grupy T-T (niemodulowane tony o różnej częstotliwości) i po zsumowaniu obu grup (P-M + T-T) oraz średni czas do poprawnej i niepoprawnej odpowiedzi (BDF). Wykresy przedstawiają średnią  $\pm$  SEM. Liczebność grup: A: P-M n = 10, T-T n = 10, P-M + T-T n = 20; B n = 20; C: P-M n = 6, T-T n = 7, P-M+T-T n = 13; D n = 13; E: P-M n = 6, T-T n = 6, P-M+T-T n = 12; F n = 12. Analiza statystyczna została zamieszczona w Tab. S19.

#### 4.12. Wyniki analiz statystycznych

Wielkie litery podane w nawiasach oznaczają części rycin, do których odnoszą się dane testy statystyczne. W niektórych przypadkach w tabeli podano dokładną nazwę ryciny. Wartości  $p < 0,05$  zostały wytłuszczone.

**Tab. S1.** Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury z zastosowaniem różnych protokołów doświadczalnych (Ryc. 9, Ryc. 10).

Numer protokołu doświadczalnego	Friedman	Wilcoxon (dzień pierwszy vs ostatni)
1 (Ryc. 9A)	0,4402	0,9453
2 (Ryc. 9B)	0,0515	0,3281
3 (Ryc. 9C)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0020</b>
4 (Ryc. 9D)	0,3811	0,6523
5 (Ryc. 9E)	<b>0,0470</b>	0,3092
6 (kl. Skinnera, Ryc. 9F)	0,3815	0,1875
6 (kl. domowa, Ryc. 9G)	<b>0,0143</b>	<b>0,0078</b>
7 (Ryc. 10)	0,0845	0,3750

**Tab. S2.** Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury oraz czas trwania sesji u wszystkich zwierząt zgrupowanych bez względu na zastosowany protokół doświadczalny (Ryc. 11).

Zakres sesji treningowych; badane szczury;	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
	% nagród (A)	czas sesji (B)	% nagród (A)	czas sesji (B)
1-7 (tylko 7 tren.)	<b>0,0089</b>	0,7292	<b>0,0015</b>	0,2324
1-7 (wszystkie)	<b>&lt;0,0001</b>	0,8711	<b>0,0007</b>	0,9485
1-10 (tylko 10 tren.)	0,4402	0,4746	0,9453	0,7500
1-10 (wszystkie)	<b>0,0027</b>	0,9636	0,0858	0,1982
1-14 (tylko 14 tren.)	<b>&lt;0,0001</b>	0,9648	<b>0,0022</b>	0,5412

**Tab. S3.** Charakterystyka grupy szczurów nieuczących się i potencjalnie uczących się (Ryc. 12). n.b. – nie badano, b.d. – brak danych.

a	Zakres sesji treningowych; badane szczury;	NU-SUM (AC)			
		Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
		% nagród (A)	czas sesji (C)	% nagród (A)	czas sesji (C)
	1-7 (tylko 7 tren.), n = 15	<b>&lt;0,0001</b>	0,2267	<b>0,0012</b>	0,0625
	1-7 (wszystkie), n = 61	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0043</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0053</b>
	1-10 (tylko 10 tren.), n = 6	0,0714	0,6114	0,5313	>0,9999
	1-10 (wszystkie), n = 46	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0275</b>	<b>0,0025</b>	0,2412
	1-14 (tylko 14 tren.), n = 40	<b>0,0030</b>	<b>0,0007</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0029</b>

b	Zakres sesji treningowych; badane szczury;	PU-SUM (BD)			
		Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
		% nagród (B)	czas sesji (D)	% nagród (B)	czas sesji (D)
	1-7 (tylko 7 tren.), n = 15	<b>0,0017</b>	<b>0,0154</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0078</b>
	1-7 (wszystkie), n = 61	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0002</b>
	1-10 (tylko 10 tren.), n = 6	n.b.	n.b.	b.d.	b.d.
	1-10 (wszystkie), n = 46	<b>0,0034</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0078</b>
	1-14, n = 40	<b>0,0620</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0078</b>

**Tab. S4.** Charakterystyka grup szczurów, u których wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór (Ryc. 14); b.d. – brak danych.

<b>a</b>			<b>b</b>				
Czas trwania sesji (B)	Friedman	Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	Liczba wsadzeń nosa, test (C)	Friedman	Wilcoxon sesja 1 vs sesja druga	Wilcoxon sesja 1 vs sesja 3	Wilcoxon sesja 2 vs sesja 3
10 nagród	< <b>0,0001</b>	<b>0,0078</b>	10 nagród	<b>0,0099</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0391</b>	0,4375
30 nagród	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	30 nagród	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>	<b>0,0007</b>

<b>c</b>	Badane zmienne	Badany zakres	Friedman		Wilcoxon	
			USV	otwór	USV	otwór
% nagród (D)	trening 1-5		<b>0,0411</b>	0,4060	<b>0,0098</b>	>0,9999
	trening 1-7		<b>0,0089</b>	b.d.	<b>0,0012</b>	b.d.
czas sesji (E)	trening 1-5		0,6661	< <b>0,0001</b>	0,9219	< <b>0,0001</b>
	trening 1-7		0,7361	b.d.	0,2324	b.d.

<b>d</b>	Dzień treningu	Mann-Whitney	
		% nagród (D)	Czas sesji (E)
	1	<b>0,0010</b>	0,0688
	2	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
	3	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
	4	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
	5	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>

**Tab. S5.** Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów, u których wzmacniano emisję USV, a następnie wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór (Ryc. 15); b.d. – brak danych.

<b>a</b>	Badane zmienne	Badany zakres	Friedman		Wilcoxon	
			USV	otwór	USV	otwór
częstość wokalizowania (AB)	trening 1-5		0,0980	0,0722	0,7814	<b>0,0371</b>
	trening 1-7		<b>0,0121</b>	b.d.	<b>0,0328</b>	b.d.
	test 1-3		<b>0,0015</b>	0,0810	<b>0,0167</b>	0,2814
% krótkich USV 22-kHz (CD)	trening 1-5		<b>0,0242</b>	0,1460	<b>0,0240</b>	<b>0,0384</b>
	trening 1-7		<b>0,0101</b>	b.d.	<b>0,0266</b>	b.d.
	test 1-3		0,2466	0,1857	0,3683	>0,9999

<b>b</b>	Dzień doświadczenia	Mann-Whitney	
		Częstość wokalizowania (AB)	% krótkich USV 22-kHz (CD)
	trening 1	0,2766	0,2394
	trening 2	0,5830	0,5327
	trening 3	0,1716	<b>0,0319</b>
	trening 4	0,4652	0,1374
	trening 5	0,6930	<b>0,0354</b>
	test 1	0,2084	0,1754
	test 2	0,1325	0,7128
	test 3	0,8045	0,9520

**Tab. S6.** Czas trwania sesji u szczurów podzielonych na sześć podgrup oraz grupy PU-SUM i NU-SUM bez względu na liczbę dni treningowych (Ryc. 12).

**a**

Badane grupy	Czas sesji (A)	
	Friedman	Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)
PU-MAX	<b>0,0011</b>	<b>0,0625</b>
PU-PROG	<b>0,0003</b>	<b>0,0078</b>
PU-PROG (pierwsze 3 sesje treningowe z maksymalną liczbą nagród)	<b>0,0665</b>	<b>0,0195</b>

**b**

Czas sesji (B)	
PU-SUM vs NU-SUM	
Dzień treningu	Mann Whitney
1	0,1330
2	<b>0,0007</b>
3	<b>0,0014</b>
4	<b>0,0002</b>
5	<b>&lt;0,0001</b>
6	<b>&lt;0,0001</b>
7	<b>&lt;0,0001</b>
8	<b>&lt;0,0001</b>
9	<b>&lt;0,0001</b>
10	<b>&lt;0,0001</b>
11	<b>0,0001</b>
12	<b>&lt;0,0001</b>
13	<b>&lt;0,0001</b>
14	<b>&lt;0,0001</b>

**Tab. S7.** Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM; Ryc. 17); c. porównanie sesji treningowych 1-7 odnosi się do wszystkich badanych szczurów bez względu na protokół doświadczalny. b.d. – brak danych.

**a**

Wykres	Porównanie	Friedman		Wilcoxon	
		PU-SUM	NU-SUM	PU-SUM	NU-SUM
A	Trening 1-7	0,1426	<b>&lt;0,0001</b>	0,2163	<b>&lt;0,0001</b>
A	Trening 1-5	0,3288	<b>&lt;0,0001</b>	0,8394	<b>&lt;0,0001</b>
B	Test 1-3	<b>0,0288</b>	<b>0,0135</b>	0,9341	<b>0,0012</b>
C	Trening 1-14	0,1532	<b>&lt;0,0001</b>	0,2188	<b>&lt;0,0001</b>
C	Trening 1-3	0,1416	<b>0,0034</b>	0,0625	<b>0,0182</b>
C	Trening 3-14	0,3912	<b>0,0059</b>	0,4375	0,0938
D	Test 1-3	0,4297	<b>0,0292</b>	0,6875	<b>0,0090</b>

**b**

Dzień treningu	Mann-Whitney	
	Wszystkie (A)	14 tren. (C)
1	0,0890	0,9284
2	<b>0,0017</b>	0,0726
3	<b>0,0030</b>	0,0618
4	<b>0,0062</b>	0,0520
5	<b>0,0006</b>	<b>0,0323</b>
6	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0239</b>
7	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0007</b>
8	<b>0,0002</b>	<b>0,0036</b>
9	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>
10	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0007</b>
11	<b>0,0084</b>	<b>0,0084</b>
12	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

13	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
14	<b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
Dzień testu	Wykres B	Wykres D
1	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>
2	< <b>0,0001</b>	<b>0,0007</b>
3	< <b>0,0001</b>	< <b>0,0001</b>

<b>c</b>	Wykres	Test	Porównanie	PU-MAX	PU-PROG	NU-CEN	NU-D1	NU-SGL	NU-0
	E	Friedman	Trening 1-7	0,4627	0,2806	0,6491	<b>0,0004</b>	0,2995	< <b>0,0001</b>
	E	Wilcoxon	Trening 1-7	0,6250	<b>0,0098</b>	>0,9999	<b>0,0039</b>	0,5000	< <b>0,0001</b>
	E	Friedman	Trening 1-14	0,5654	0,3847	0,4777	<b>0,0224</b>	0,5409	<b>0,0001</b>
	E	Wilcoxon	Trening 1-14	b.d.	0,0625	0,2500	0,2500	b.d.	<b>0,0078</b>
	F	Friedman	Test 1-3	0,1821	<b>0,0212</b>	0,3673	0,1333	0,6914	0,2602
	F	Wilcoxon	Test 1-3	0,3125	0,3750	0,1875	<b>0,0240</b>	>0,9999	0,0604

<b>d</b>		Mann-Whitney							
	Dzień treningu (E)	PU-MAX vs PU-PROG	PU-MAX vs NU-CEN	PU-MAX vs NU-D1	PU-MAX vs NU-SGL	PU-MAX vs NU-0	PU-PROG vs NU-CEN	PU-PROG vs NU-D1	PU-PROG vs NU-SGL
	1	<b>0,0077</b>	<b>0,0357</b>	0,7972	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	>0,9999	<b>0,0030</b>	0,6678
	2	<b>0,0127</b>	<b>0,0159</b>	<b>0,0420</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,0759	0,6198	0,3007
	3	0,0400	<b>0,0079</b>	<b>0,0120</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,9530	0,7802	0,2867
	4	0,1275	<b>0,0079</b>	<b>0,0070</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,9530	0,8418	0,4685
	5	0,1292	<b>0,0159</b>	<b>0,0420</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,3197	0,9682	0,3706
	6	0,2544	<b>0,0357</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,2168	0,3154	0,1608
	7	0,1292	<b>0,0357</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0357</b>	< <b>0,0001</b>	0,2867	<b>0,0350</b>	<b>0,0140</b>
	8	0,5333	0,8000	0,2667	0,2000	<b>0,0220</b>	0,9212	0,1535	<b>0,0485</b>
	9	0,4222	0,4000	0,1333	0,2000	<b>0,0110</b>	0,2788	<b>0,0283</b>	<b>0,0485</b>
	10	0,8889	0,4000	0,1333	0,2000	<b>0,0220</b>	0,2788	0,1535	<b>0,0485</b>
	11	0,4286	0,8000	0,2000	0,3333	<b>0,0444</b>	0,9048	0,5476	0,6429
	12	>0,9999	0,8000	0,2000	0,3333	<b>0,0444</b>	0,1667	<b>0,0238</b>	0,0714
	13	0,8571	0,2000	0,2000	0,3333	<b>0,0444</b>	<b>0,0476</b>	<b>0,0476</b>	0,1429
	14	0,4286	0,2000	0,8000	0,3333	<b>0,0444</b>	<b>0,0238</b>	0,0952	0,0714
	Dzień testu (F)								
	1	0,3553	<b>0,0079</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0079</b>	< <b>0,0001</b>	0,0586	<b>0,0069</b>	<b>0,0373</b>
	2	0,2544	<b>0,0317</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0159</b>	< <b>0,0001</b>	0,5135	<b>0,0209</b>	0,0753
	3	0,2544	<b>0,0317</b>	<b>0,0021</b>	<b>0,0079</b>	< <b>0,0001</b>	0,9530	0,1743	0,1645

<b>e</b>		Mann-Whitney						
	Dzień treningu (E)	PU-PROG vs NU-0	NU-CEN vs NU-D1	NU-CEN vs NU-SGL	NU-CEN vs NU-0	NU-D1 vs NU-SGL	NU-D1 vs NU-0	NU-SGL vs NU-0
	1	<b>0,0750</b>	<b>0,0091</b>	0,7000	0,1483	<b>0,0091</b>	< <b>0,0001</b>	0,4413
	2	<b>0,0270</b>	<b>0,0196</b>	0,8571	>0,9999	0,1045	<b>0,0047</b>	0,6500
	3	<b>0,0241</b>	0,4376	0,5714	<b>0,0325</b>	0,1455	<b>0,0014</b>	0,9191
	4	0,0896	>0,9999	0,3929	<b>0,0289</b>	0,3636	<b>0,0151</b>	0,7057
	5	<b>0,0064</b>	0,1986	0,7143	0,2185	0,1455	<b>0,0027</b>	0,6226
	6	<b>0,0007</b>	0,7591	0,4000	0,1257	0,3727	<b>0,0055</b>	0,4887
	7	< <b>0,0001</b>	0,8636	0,4000	<b>0,0300</b>	0,4818	<b>0,0024</b>	0,1548
	8	< <b>0,0001</b>	0,4000	0,4000	<b>0,0176</b>	0,8571	0,0582	0,1011
	9	< <b>0,0001</b>	0,7143	0,7000	<b>0,0066</b>	0,8571	0,0604	0,1297
	10	<b>0,0001</b>	>0,9999	0,4000	<b>0,0484</b>	0,6286	0,1104	0,1736
	11	<b>0,0027</b>	>0,9999	0,8000	<b>0,0242</b>	0,9000	<b>0,0242</b>	<b>0,0444</b>
	12	<b>0,0007</b>	0,7000	0,9000	<b>0,0424</b>	0,8000	<b>0,0121</b>	<b>0,0444</b>
	13	<b>0,0013</b>	0,4000	>0,9999	<b>0,0485</b>	0,8000	<b>0,0485</b>	0,2667
	14	<b>0,0007</b>	0,1000	0,4000	0,2788	0,8000	<b>0,0121</b>	0,1778
	Dzień testu (F)							
	1	< <b>0,0001</b>	0,5554	0,4206	0,0611	>0,9999	<b>0,0131</b>	0,2612
	2	<b>0,0017</b>	0,4103	0,4206	<b>0,0394</b>	0,4109	0,2151	0,7058
	3	<b>0,0002</b>	0,1364	0,0952	<b>0,0037</b>	0,6074	<b>0,0041</b>	0,1362

Tab. S8. Udział nagrodzonych USV w ogólnej liczbie USV oraz w liczbie USV 50-kHz podczas sesji treningowych (Ryc. 18).

**a**

Badana grupa	Szczury z 7 sesjami treningowymi (AC)			
	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
	nagrodzone/ wszystkie	nagrodzone/ USV kHz-50	nagrodzone/ wszystkie	nagrodzone/ USV kHz-50
PU-SUM	<b>0,0255</b>	<b>0,0059</b>	0,0625	0,0625
NU-SUM	0,4868	0,2727	0,4143	<b>0,0295</b>
NU-SUM/0	0,8989	0,0583	0,3125	0,0625
NU-0	0,2782	0,3004	0,9453	0,3594

**b**

Badana grupa	Szczury z 14 sesjami treningowymi (BD)			
	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
	nagrodzone/ wszystkie	nagrodzone/ USV kHz-50	nagrodzone/ wszystkie	nagrodzone/ USV kHz-50
PU-SUM	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>
NU-SUM	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0034</b>	<b>0,0034</b>
NU-SUM/0	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0078</b>
NU-0	0,0748	<b>0,0032</b>	0,1484	0,2500

**c**

Dzień treningu	Szczury z 7 sesjami treningowymi, Mann-Whitney							
	nagrodzone/wszystkie (A)				nagrodzone / USV 50-kHz (C)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
1	>0,9999	0,6905	0,8591	0,5941	0,5531	0,6905	0,5941	0,5941
2	0,9185	0,8413	0,7679	0,9794	0,3139	0,8413	0,2155	0,3210
3	0,0526	0,3095	<b>0,0400</b>	0,3097	0,5958	0,8413	0,5741	0,8844
4	0,2294	>0,9999	0,0932	0,2051	0,6598	0,8413	0,4396	0,3863
5	<b>0,0036</b>	0,2222	<b>0,0007</b>	<b>0,0123</b>	0,2570	0,5476	<b>0,0370</b>	0,0706
6	<b>0,0106</b>	0,0952	<b>0,0123</b>	0,3696	0,0842	0,3333	0,0719	0,6111
7	0,0845	0,5476	<b>0,0440</b>	0,2431	0,8775	0,8413	0,9710	0,5395

**d**

Dzień treningu	Szczury z 14 sesjami treningowymi, Mann-Whitney							
	nagrodzone/wszystkie (B)				nagrodzone / USV 50-kHz (D)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
1	0,9016	0,7546	0,5468	0,1866	>0,9999	0,6620	0,6337	0,3147
2	0,6407	0,6620	0,1812	<b>0,0207</b>	0,7900	0,2684	0,5728	<b>0,0135</b>
3	0,9563	0,2824	0,2171	<b>0,0224</b>	0,3982	<b>0,0293</b>	0,5468	<b>0,0482</b>
4	0,3977	0,5728	<b>0,0290</b>	<b>0,0003</b>	0,9237	0,2284	0,2471	<b>0,0140</b>
5	0,0570	0,7546	<b>0,0013</b>	<b>0,0103</b>	0,2051	0,8518	<b>0,0047</b>	<b>0,0059</b>
6	0,0794	0,7296	<b>0,0043</b>	<b>0,0160</b>	0,3318	0,8518	<b>0,0338</b>	<b>0,0137</b>
7	0,1144	0,8518	<b>0,0073</b>	<b>0,0068</b>	0,4494	0,8518	0,1079	<b>0,0207</b>
8	0,2611	0,8518	0,0813	0,1049	0,7781	0,9217	0,5338	0,3203
9	0,2868	0,9497	0,0779	<b>0,0482</b>	0,9560	0,7546	0,6282	0,1994
10	0,0795	0,4136	<b>0,0283</b>	0,0688	0,3199	0,9497	0,1029	0,0878
11	<b>0,0060</b>	0,0813	<b>0,0023</b>	<b>0,0202</b>	<b>0,0274</b>	0,0463	0,0793	0,5543
12	<b>0,0017</b>	<b>0,0293</b>	<b>0,0013</b>	0,1540	<b>0,0033</b>	<b>0,0426</b>	<b>0,0023</b>	0,1893
13	<b>0,0002</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0127</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0020</b>
14	<b>0,0034</b>	<b>0,0426</b>	<b>0,0027</b>	0,1949	<b>0,0313</b>	0,1006	<b>0,0260</b>	0,1689



**Tab. S9.** Liczebność nagrodzonych USV emitowanych w seriach: suma USV wyemitowanych w seriach (liczba USV), odsetek nagrodzonych USV w seriach w całkowitej liczbie nagrodzonych USV (% USV), maksymalna liczba USV w pojedynczej serii USV (max USV); a. suma, odsetek i maksymalna liczba USV u szczurów PU-SUM i NU-SUM/0 szczurów 7- i 14-treningowych; b. porównanie sumy, odsetka i maksymalnej liczby USV pomiędzy grupą PU-SUM a NU-SUM/0 szczurów 7- i 14-treningowych (Ryc. 19).

a	Nagrodzone USV w seriach	Badana grupa	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
			7 treningów	14 treningów	7 treningów	14 treningów
Liczba USV (A, B)	PU-SUM		<b>0,0430</b>	<b>0,0010</b>	0,0625	0,0625
	NU-SUM/0		0,9303	<b>0,0153</b>	0,6875	0,1250
% USV (C, D)	PU-SUM		0,0764	<b>0,0027</b>	0,0625	0,0625
	NU-SUM/0		0,5079	<b>0,0179</b>	0,0625	<b>0,0234</b>
Max USV (E, F)	PU-SUM		0,0551	<b>&lt;0,0001</b>	0,0625	<b>0,0313</b>
	NU-SUM/0		0,6358	<b>0,0366</b>	>0,9999	<b>0,0469</b>

b	Dzień treningu	Mann-Whitney					
		Liczba USV		% USV		Max USV	
		7 treningów (A)	14 treningów (B)	7 treningów (C)	14 treningów (D)	7 treningów (E)	14 treningów (F)
1	0,7143	0,7702	0,7143	0,3620	0,5635	0,5641	
2	0,1190	0,2118	0,7302	0,2641	0,4603	0,3643	
3	0,5794	0,7792	0,9603	>0,9999	0,3175	0,7196	
4	0,3889	0,8801	0,4127	0,4141	0,3571	0,4119	
5	0,2063	0,8735	>0,9999	0,6773	0,3175	0,4872	
6	<b>0,0476</b>	0,1322	0,2857	0,4735	<b>0,0079</b>	0,3646	
7	0,0873	0,0992	0,5000	0,7782	0,3810	0,7509	
8		0,5724		0,2631		0,8265	
9		0,6427		0,4709		0,8248	
10		0,0749		0,6384		0,1848	
11		0,0629		0,5088		<b>0,0077</b>	
12		<b>0,0010</b>		0,5495		0,2374	
13		<b>0,0017</b>		0,0546		<b>0,0090</b>	
14		<b>0,0057</b>		0,4342		0,0559	

**Tab. S10.** Zmiany właściwości USV emitowanych w seriach podczas kolejnych sesji treningowych u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM/0; Ryc. 20).

a	Właściwości USV w seriach	Badana grupa	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
			7 treningów	14 treningów	7 treningów	14 treningów
długość USV (A, B)	PU-SUM		0,3509	0,4845	0,8125	0,3125
	NU-SUM/0		0,0816	<b>0,0386</b>	0,0625	0,0781
częstotliwość USV (C, D)	PU-SUM		0,3027	<b>0,0441</b>	>0,9999	<b>0,0313</b>
	NU-SUM/0		0,1779	0,3978	0,1875	0,1172

b	Dzień treningu	Mann-Whitney			
		Długość USV		częstotliwość USV	
		7 treningów (A)	14 treningów (B)	7 treningów (C)	14 treningów (D)
1	>0,9999	0,6065	0,2977	0,5541	
2	0,8081	0,2398	0,2141	0,4376	
3	0,9399	0,3277	0,9399	0,6649	
4	0,9048	0,2673	0,6032	0,1709	
5	0,9048	<b>0,0173</b>	0,9048	0,4004	
6	<b>0,0357</b>	<b>0,0460</b>	0,3929	0,8357	
7	<b>0,0159</b>	<b>0,0216</b>	0,1508	0,5495	
8		0,2824		0,3623	
9		<b>0,0338</b>		0,3467	
10		<b>0,0027</b>		0,5941	
11		<b>0,0130</b>		0,6853	
12		<b>0,0010</b>		0,1325	
13		0,0813		>0,9999	
14		<b>0,0013</b>		0,5921	

Tab. S11. Udział krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV (Ryc. 21).

**a**

Badana grupa	Friedman			Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)		
	4 habituacje, treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)	4 habituacje, 7 treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)
PU-SUM	0,9092	0,9190	<b>0,0197</b>	>0,9999	0,8125	0,0625
NU-SUM	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0015</b>	0,2674	<b>0,0006</b>	<b>0,0302</b>	0,4637
NU-SUM/0	<b>0,0218</b>	<b>0,0311</b>	0,5130	0,1250	0,2324	0,7422
NU-0	<b>&lt;0,0001</b>	0,0627	0,2390	<b>0,0098</b>	0,0625	0,4609

**b**

Dzień doświadczenia	Mann-Whitney (A)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
habituacja 1	0,8658	0,3095	0,7429	0,2041
habituacja 2	0,9286	0,8413	>0,9999	0,7599
habituacja 3	0,6532	0,2857	0,2041	0,1672
habituacja 4	0,6848	0,8333	0,6950	0,9817
trening 1	0,0544	0,8968	<b>0,0027</b>	<b>0,0027</b>
trening 2	<b>0,0325</b>	0,4603	<b>0,0083</b>	0,0786
trening 3	<b>0,0035</b>	0,1508	<b>0,0013</b>	0,1225
trening 4	<b>0,0109</b>	0,2698	<b>0,0030</b>	0,1365
trening 5	<b>0,0026</b>	0,1587	<b>0,0007</b>	0,0949
trening 6	<b>0,0005</b>	<b>0,0317</b>	<b>0,0007</b>	0,1645
trening 7	<b>0,0051</b>	0,0556	<b>0,0077</b>	0,1961

**c**

Badana grupa (B)	Friedman	Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)
PU-SUM	0,3673	0,3125
NU-SUM	0,6271	0,7197
NU-SUM/0	0,9537	0,8125
NU-0	0,3675	0,7695

**d**

Dzień treningu	Mann-Whitney (A)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
1	0,1978	0,7546	0,0593	0,0830
2	<b>0,0100</b>	0,0813	<b>0,0070</b>	<b>0,0353</b>
3	<b>0,0319</b>	0,2151	<b>0,0127</b>	0,0799
4	<b>0,0414</b>	0,2394	<b>0,0176</b>	<b>0,0075</b>
5	<b>0,0024</b>	<b>0,0193</b>	<b>0,0047</b>	0,1949
6	<b>0,0103</b>	<b>0,0283</b>	<b>0,0290</b>	0,1304
7	<b>0,0045</b>	0,1066	<b>0,0007</b>	0,1540
8	<b>0,0022</b>	0,0533	<b>0,0007</b>	0,1372
9	<b>0,0030</b>	0,0703	<b>0,0007</b>	0,0779
10	<b>0,0017</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,0013</b>	0,6454
11	<b>0,0018</b>	<b>0,0310</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0070</b>
12	<b>0,0005</b>	<b>0,0113</b>	<b>0,0007</b>	0,3663
13	<b>0,0002</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,0013</b>	0,0650
14	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0007</b>	0,6671

**e**

Dzień testu	Mann-Whitney (B)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-0	PU-SUM vs NU-SUM/0	NU-SUM/0 vs NU-0
1	0,5500	0,5674	0,6905	0,8561
2	0,1147	0,0949	0,4206	0,4216
3	0,4550	0,2065	0,7460	0,2544

**f**

Badana grupa (D)	Friedman	Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)
PU-SUM	0,2014	0,1250
NU-SUM	0,4323	0,6685
NU-SUM/0	0,6543	0,3125
NU-0	0,1853	0,1953

**g**

Dzień testu	Mann-Whitney (D)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-0	PU-SUM vs NU-SUM/0	NU-SUM/0 vs NU-0
1	<b>0,0257</b>	<b>0,0127</b>	0,1615	0,0822
2	<b>0,0075</b>	<b>0,0130</b>	<b>0,0303</b>	0,2233
3	<b>0,0485</b>	0,1795	<b>0,0426</b>	0,9329

Tab. S12. Długość USV 50-kHz (Ryc. 22).

**a**

Badana grupa	Friedman			Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)		
	4 habituacje, 7 treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)	4 habituacje, 7 treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)
PU-SUM	<b>0,0050</b>	<b>0,0442</b>	0,5608	0,1250	0,1250	0,4375
NU-SUM	0,0759	0,1073	0,3158	<b>0,0215</b>	0,0554	0,2979
NU-SUM/0	0,0683	<b>0,0479</b>	0,5557	0,0625	0,0625	0,1484
NU-0	0,6452	0,7226	0,5808	0,2324	0,4922	0,9453

**b**

Badana grupa	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
	7 treningów, test (B)	14 treningów, test (D)	7 treningów, test (B)	14 treningów, test (D)
PU-SUM	0,9537	0,4419	>0,9999	0,4375
NU-SUM	0,8187	<b>0,0104</b>	0,7729	<b>0,0036</b>
NU-SUM/0	0,3637	0,0789	0,5000	<b>0,0391</b>
NU-0	0,9737	0,1197	0,8457	0,0781

**c**

Dzień doświadczenia	Mann-Whitney (AB)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
habituacja 1	0,6240	0,8413	0,3863	0,0753
habituacja 2	0,2234	0,6905	0,1645	0,7000
habituacja 3	0,4545	0,6905	0,1742	0,3710
habituacja 4	<b>0,0146</b>	0,2222	<b>0,0080</b>	0,3097
trening 1	0,3398	0,5000	0,0753	<b>0,0077</b>
trening 2	<b>0,0048</b>	0,2222	<b>0,0010</b>	<b>0,0223</b>
trening 3	0,0633	0,4206	<b>0,0400</b>	0,5331
trening 4	0,1916	0,9683	0,0703	0,2065
trening 5	<b>0,0051</b>	0,2222	<b>0,0013</b>	0,3863
trening 6	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0079</b>	<b>0,0007</b>	0,6167
trening 7	<b>0,0023</b>	<b>0,0079</b>	<b>0,0113</b>	0,9291
test 1	<b>0,0193</b>	0,1508	<b>0,0193</b>	0,8591
test 2	0,1613	0,3095	0,1941	0,8362
test 3	0,0951	0,4206	0,0706	0,1965

**d**

Dzień doświadczenia	Mann-Whitney (CD)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
trening 1	0,0980	0,6620	<b>0,0127</b>	<b>0,0379</b>
trening 2	0,0677	0,3450	<b>0,0266</b>	<b>0,0134</b>
trening 3	<b>0,0016</b>	<b>0,0117</b>	<b>0,0043</b>	0,4418
trening 4	<b>0,0256</b>	0,0813	<b>0,0386</b>	0,0608
trening 5	<b>0,0008</b>	<b>0,0087</b>	<b>0,0027</b>	0,1605
trening 6	<b>0,0018</b>	<b>0,0216</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,0379</b>
trening 7	<b>0,0008</b>	<b>0,0093</b>	<b>0,0027</b>	0,1605
trening 8	<b>0,0133</b>	0,0593	<b>0,0200</b>	0,1605
trening 9	<b>0,0008</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0027</b>	0,5054
trening 10	<b>0,0005</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0080</b>	0,1049
trening 11	<b>0,0005</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,0281</b>
trening 12	<b>0,0032</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,0200</b>	0,5941
trening 13	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0115</b>
trening 14	<b>0,0002</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,0013</b>	0,3671
test 1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0005</b>	0,3154
test 2	<b>0,0006</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0027</b>	0,1654
test 3	<b>0,0002</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0023</b>

Tab. S13. Średnia częstotliwość USV 50-kHz (Ryc. 23).

**a**

Badana grupa	Friedman			Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)		
	4 habituacje, 7 treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)	4 habituacje, 7 treningów (A)	7 treningów (A)	14 treningów (C)
PU-SUM	0,0678	0,1835	0,4383	0,1250	0,3125	0,4375
NU-SUM	<b>0,0006</b>	<b>0,0157</b>	<b>0,0465</b>	0,1876	0,8040	0,9799
NU-SUM/0	<b>0,0279</b>	0,0531	0,1475	0,1250	0,6250	0,1484
NU-0	<b>0,0475</b>	0,1688	0,3511	0,5566	0,5566	0,2500

**b**

Badana grupa	Friedman		Wilcoxon (pierwszy vs ostatni)	
	7 treningów, test (B)	14 treningów, test (D)	7 treningów, test (B)	14 treningów, test (D)
PU-SUM	0,0934	<b>0,0289</b>	0,0625	0,0938
NU-SUM	0,4204	0,8290	0,1861	0,9799
NU-SUM/0	0,9537	>0,9999	0,3750	0,7422
NU-0	0,6013	0,7943	0,3750	0,7422

**c**

Dzień doświadczenia	Mann-Whitney (AB)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
habituacja 1	0,3056	0,1508	0,5941	0,3097
habituacja 2	0,3949	0,4206	0,5135	0,3710
habituacja 3	0,1186	0,3095	0,1292	>0,9999
habituacja 4	0,1186	0,5476	0,5135	0,8591
trening 1	0,4445	0,5476	0,5135	0,9530
trening 2	0,4445	>0,9999	0,3097	0,3710
trening 3	0,6116	0,4206	0,8591	0,9530
trening 4	0,8001	>0,9999	0,7679	0,8591
trening 5	0,0806	0,4206	0,0553	0,1645
trening 6	0,5531	0,6905	0,5941	0,9530
trening 7	0,2300	0,5476	0,2065	0,4396
test 1	0,2661	0,4206	0,3097	0,9530
test 2	0,7826	0,6905	0,9314	0,9777
test 3	0,8001	0,8413	0,8591	0,7679

**d**

Dzień doświadczenia	Mann-Whitney (CD)			
	PU-SUM vs NU-SUM	PU-SUM vs NU-SUM/0	PU-SUM vs NU-0	NU-SUM/0 vs NU-0
trening 1	0,6407	0,8518	0,4923	0,4278
trening 2	0,0701	0,2284	0,1471	0,5622
trening 3	0,3291	0,7546	0,3132	0,4923
trening 4	0,4494	>0,9999	0,2635	0,2198
trening 5	0,2611	0,7546	0,3676	0,7925
trening 6	0,8577	0,8518	0,9578	0,9578
trening 7	0,2938	0,3450	0,5622	0,9578
trening 8	0,2611	0,6620	0,2635	0,9578
trening 9	0,8456	0,6377	0,3002	0,3132
trening 10	0,5900	0,7546	0,8749	0,6354
trening 11	0,6407	0,6620	0,7925	0,8749
trening 12	0,1775	0,4908	0,3676	0,9578
trening 13	0,4494	0,2824	>0,9999	0,3676
trening 14	0,1545	<b>0,0426</b>	0,6354	0,1471
test 1	0,1365	0,0813	0,3676	>0,9999
test 2	0,3042	0,1079	0,7712	>0,9999
test 3	0,2796	0,1079	0,7128	>0,9999

**Tab. S14.** Odsetek czasu spędzonego w strefie bezkarmnikowej, karmnikowej, okołokarmnikowej i strefie karmnika dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej (Ryc. 26).

Strefa	Wilcoxon	
	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
Strefa bezkarmnikowa (A)	<b>0,0234</b>	0,8125
Strefa karmnikowa (B)	<b>0,0234</b>	0,8125
Strefa okołokarmnikowa (C)	<b>0,0156</b>	0,5625
Strefa karmnika (D)	<b>0,0156</b>	0,6250

**Tab. S15.** Liczba wejść do poszczególnych stref klatki dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej (Ryc. 27).

Strefa	Wilcoxon	
	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
Strefa karmnikowa/bezkarmnikowa	0,2422	0,2188
Strefa okołokarmnikowa	<b>0,0156</b>	<b>0,0313</b>
Strefa karmnika	<b>0,0156</b>	0,6875

**Tab. S16.** Liczba wejść do danej strefy i odsetek czasu spędzonego w danej strefie klatki podczas pierwszej sesji treningowej u szczurów z grupy PU oraz szczurów grupy NU-D1 (Ryc. 28); b.d. – brak danych

Strefa	Liczba wejść (A) Mann-Whitney	Czas (B) Mann-Whitney
Strefa karmnikowa	b.d.	0,2455
Strefa bezkarmnikowa	b.d.	0,2455
Strefa karmnikowa/bezkarmnikowa	0,0503	b.d.
Strefa okołokarmnikowa	0,8183	0,0866
Strefa karmnika	>0,9999	0,3967

**Tab. S17.** Liczba wsadzeń nosa oraz czas trwania sesji podczas dwóch dni kształtowania reakcji instrumentalnej w protokole 11 i protokole 12 (Ryc. 29); b.d. – brak danych.

Badane zmienne	Wilcoxon			
	Doświadczenie 11		Doświadczenie 12	
	P-M (AC)	T-T (BD)	P-M (EG)	T-T (FH)
Liczba wsadzeń nosa	0,1250	>0,9999	b.d.	b.d.
Czas sesji	0,7695	<b>0,0078</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>

**Tab. S18.** Liczba wszystkich prób, liczba odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych, liczba prób pominiętych oraz czas trwania sesji treningowych podczas 14 dni treningu rozróżniania dźwięków w protokole 11, protokole 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O) i protokole 12 (Ryc. 31); b.d. – brak danych.

a	P–M, prot. 11 (A)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<b>0,0006</b>	0,6089	<b>0,0078</b>	<b>0,0313</b>	0,5938
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<b>0,0003</b>	0,3360	<b>0,0078</b>	<b>0,0313</b>	0,0781
	Odpowiedzi niepoprawne	<0,0001	<b>0,0007</b>	0,1092	<b>0,0078</b>	<b>0,0234</b>	0,3828
	Próby pominięte	<0,0001	<b>0,0008</b>	0,0542	<b>0,0078</b>	<b>0,0234</b>	0,1094
	Czas sesji	<b>0,0050</b>	0,5438	0,4468	0,1250	>0,9999	0,1250

b	T–T, prot. 11 (B)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<b>0,0001</b>	0,3824	<b>0,0078</b>	<b>0,0078</b>	0,2617
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<0,0001	0,1077	<b>0,0078</b>	<b>0,0078</b>	0,4961
	Odpowiedzi niepoprawne	<0,0001	<b>0,0002</b>	<b>0,0450</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0156</b>
	Próby pominięte	<0,0001	<0,0001	0,3537	<b>0,0039</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0156</b>
	Czas sesji	<b>0,0008</b>	0,6058	<b>0,0139</b>	0,5000	>0,9999	>0,9999

c	P–M, prot. 11/O (C)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<0,0001	0,5521	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,3125
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<0,0001	0,8116	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,1875
	Odpowiedzi niepoprawne	<0,0001	<0,0001	0,1152	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,1875
	Próby pominięte	<0,0001	<0,0001	0,3134	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,4063
	Czas sesji	<b>0,0050</b>	0,5438	0,4468	0,1250	>0,9999	0,1250

d	T–T, prot. 11/O (D)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<b>0,0001</b>	0,7150	<b>0,0156</b>	<b>0,0156</b>	0,3438
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<b>0,0001</b>	<b>0,0229</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0156</b>	0,6250
	Odpowiedzi niepoprawne	<0,0001	<b>0,0003</b>	0,0790	<b>0,0156</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0313</b>
	Próby pominięte	<0,0001	<0,0001	0,3139	<b>0,0156</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0313</b>
	Czas sesji	<b>0,0008</b>	0,6058	<b>0,0139</b>	0,5000	>0,9999	>0,9999

e	P–M, prot. 12 (E)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<b>0,0002</b>	0,5473	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,3125
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<b>0,0004</b>	0,5570	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,8438
	Odpowiedzi niepoprawne	<b>0,0023</b>	<b>0,0011</b>	0,5832	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,8750
	Próby pominięte	<0,0001	<0,0001	0,9651	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,2500
	Czas sesji	b.d	b.d	b.d	b.d	b.d	b.d

f	T–T, prot. 12 (F)	Friedman			Wilcoxon		
		Trening sesje 1-14	Trening sesje 1-7	Trening sesje 8-14	Trening 1 vs 14	Trening 1 vs 7	Trening 7 vs 14
	Liczba wszystkich prób	<0,0001	<0,0001	0,1112	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,2500
	Odpowiedzi poprawne	<0,0001	<b>0,0007</b>	0,1681	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,1563
	Odpowiedzi niepoprawne	<b>0,0044</b>	<b>0,0127</b>	0,1061	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,3438
	Próby pominięte	<0,0001	<b>0,0002</b>	0,9387	<b>0,0313</b>	<b>0,0313</b>	0,2500
	Czas sesji	b.d	b.d	b.d	b.d	b.d	b.d

Dzień treningu	Mann-Whitney					
	odpowiedzi poprawne vs odpowiedzi niepoprawne					
	P-M, prot. 11 (A)	T-T, prot. 11 (B)	P-M, prot. 11/O (C)	T-T, prot. 11/O (D)	P-M, prot. 12 (E)	T-T, prot. 12 (F)
1	0,5570	0,6840	>0,9999	0,7704	0,5606	>0,9999
2	0,9270	0,7794	0,9654	0,7762	<b>0,0043</b>	0,5130
3	0,6658	0,4454	0,6753	0,1352	<b>0,0043</b>	0,2576
4	0,6934	0,6320	0,1450	0,2984	0,8528	0,3701
5	0,7327	0,5138	0,6970	0,3333	0,5584	0,6732
6	0,2945	0,4456	<b>0,0498</b>	0,1917	<b>0,0022</b>	<b>0,0065</b>
7	0,5577	0,7272	0,3723	0,5659	0,4113	0,5108
8	0,6136	0,2178	0,1775	<b>0,0338</b>	0,4545	0,3918
9	0,9883	0,2137	0,8485	0,1224	>0,9999	<b>0,0281</b>
10	0,3409	0,2470	0,1710	<b>0,0227</b>	<b>0,0043</b>	0,1212
11	>0,9999	0,8356	0,5736	0,4703	0,1688	0,2835
12	0,0949	0,0906	<b>0,0022</b>	<b>0,0035</b>	0,1623	0,6147
13	0,5863	0,5611	0,6991	0,7768	0,2294	<b>0,0325</b>
14	0,6136	0,0915	0,2186	<b>0,0064</b>	0,0693	<b>0,0108</b>

**Tab. S19.** Czas do wsadzenia nosa w jeden z dwóch otworów na nos w trakcie sesji treningowej rozróżniania dźwięków w doświadczeniu 11, doświadczeniu 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O) i doświadczeniu 12 (Ryc. 32).

Czas do wsadzenia nosa	Doświadczenie 11 (AB)		Doświadczenie 11/O (CD)		Doświadczenie 12 (EF)	
	Friedman	Wilcoxon	Friedman	Wilcoxon	Friedman	Wilcoxon
	Trening 1-14	Trening 1 vs 14	Trening 1-14	Trening 1 vs 14	Trening 1-14	Trening 1 vs 14
Średni czas dla grupy P-M	<b>0,0277</b>	0,6523	<b>&lt;0,0001</b>	0,5625	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0313</b>
Średni czas dla grupy T-T	<b>&lt;0,0001</b>	0,1289	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0156</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0313</b>
Średni czas dla P-M + T-T	<b>&lt;0,0001</b>	0,0987	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0046</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>
Średni czas do odpowiedzi poprawnej	<b>&lt;0,0001</b>	0,9800	<b>&lt;0,0001</b>	0,1460	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>
Średni czas do odpowiedzi niepoprawnej	<b>&lt;0,0001</b>	0,0878	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0166</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>

## 4.13. Suplement

Tab. S20. Odsetek zdobytych nagród przez szczury przyporządkowane do poszczególnych grup w poszczególnych sesjach treningowych (dane wyjściowe dla Ryc. 13). Dni, w których dany szczur uzyskał 100% nagród zaznaczono kolorem niebieskim.

Grupa	NU-0													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	73,3	70,0	80,0	30,0	30,0	53,3	43,3	46,7	10,0	26,7	40,0	43,3	40,0	43,3
2	63,3	76,7	33,3	16,7	40,0	40,0	20,0	23,3	40,0	50,0	36,7	23,3	23,3	36,7
3	10,0	6,7	53,3	13,3	26,7	6,7	23,3	43,3	26,7	76,7	16,7	16,7	6,7	10,0
4	13,3	0,0	0,0	13,3	6,7	6,7	26,7	33,3	26,7	26,7	16,7	70,0	73,3	23,3
5	30,0	40,0	13,3	23,3	33,3	26,7	43,3	33,3	16,7	13,3	30,0	16,7	10,0	13,3
6	33,3	6,7	16,7	3,3	3,3	6,7	3,3	23,3	40,0	23,3	6,7	10,0	3,3	10,0
7	20,0	26,7	20,0	6,7	10,0	6,7	0,0	3,3	3,3	3,3	0,0	6,7	0,0	3,3
8	26,7	20,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	20,0	30,0	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	0,0	6,7	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0
10	40,0	13,3	10,0	0,0	0,0	6,7	3,3	6,7	6,7	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0
11	40,0	10,0	0,0	6,7	0,0	0,0	10,0	6,7	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0
12	6,7	3,3	20,0	6,7	16,7	0,0	16,7	0,0	0,0	3,3	6,7	6,7	0,0	6,7
13	10,0	20,0	6,7	10,0	3,3	0,0	6,7	6,7	13,3	10,0	3,3	6,7	0,0	10,0
14	0,0	6,7	6,7	0,0	3,3	13,3	0,0	40,0	10,0	13,3	0,0	6,7	0,0	3,3
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	3,3
16	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	10,0	3,3	26,7	6,7	10,0	13,3	10,0	6,7	0,0	0,0	3,3	3,3	3,3	3,3
18	60,0	90,0	30,0	10,0	50,0	30,0	10,0	0,0	40,0	50,0	20,0	20,0	20,0	40,0
19	90,0	60,0	30,0	10,0	10,0	20,0	10,0	0,0	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0	20,0
20	40,0	70,0	90,0	30,0	60,0	40,0	0,0	40,0	30,0	40,0	20,0	70,0	50,0	20,0
21	30,0	10,0	30,0	30,0	50,0	20,0	0,0	30,0	20,0	20,0				
22	70,0	0,0	30,0	10,0	10,0	10,0	0,0	50,0	10,0	10,0				
23	10,0	20,0	10,0	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0				
24	0,0	0,0	20,0	0,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	20,0				
25	90,0	63,3	80,0	63,3	36,7	13,3	26,7							
26	86,7	36,7	13,3	20,0	3,3	3,3	3,3							
27	53,3	66,7	43,3	60,0	20,0	23,3	20,0							
28	40,0	10,0	6,7	16,7	30,0	13,3	10,0							
29	16,7	3,3	10,0	10,0	0,0	3,3	6,7							
30	13,3	16,7	6,7	6,7	3,3	0,0	6,7							
31	6,7	10,0	6,7	16,7	16,7	13,3	6,7							
32	3,3	6,7	6,7	6,7	3,3	6,7	10,0							
33	3,3	6,7	6,7	6,7	10,0	3,3	0,0							
34	0,0	3,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0							

Grupa	NU-D1													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100,0	100,0	80,0	96,7	100,0	100,0	93,3	33,3	20,0	76,7	100,0	23,3	36,7	100,0
2	100,0	100,0	100,0	90,0	100,0	66,7	100,0	100,0	100,0	90,0	73,3	76,7	50,0	43,3
3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	56,7	66,7	93,3	50,0	56,7	56,7	26,7	26,7
4	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	40,0	10,0	10,0	30,0	10,0	10,0	100,0	0,0	10,0
5	100,0	100,0	100,0	50,0	90,0	100,0	60,0	60,0	20,0	100,0	40,0	40,0	40,0	70,0
6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	60,0	30,0	0,0	10,0	30,0	20,0	50,0	40,0	30,0
7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	30,0	40,0	40,0	20,0	30,0	40,0	50,0	30,0	30,0
8	100,0	100,0	100,0	100,0	40,0	20,0	20,0	30,0	30,0	20,0	70,0	50,0	30,0	20,0
9	100,0	100,0	100,0	80,0	30,0	30,0	50,0	40,0	60,0	50,0	40,0	20,0	40,0	60,0
10	100,0	50,0	40,0	100,0	20,0	50,0	20,0	60,0	60,0	20,0	30,0	70,0	20,0	20,0
11	100,0	100,0	20,0	20,0	20,0	50,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	60,0	50,0
12	100,0	80,0	100,0	50,0	100,0	40,0	20,0	40,0	10,0	30,0				
13	100,0	36,7	16,7	16,7	76,7	100,0	93,3							
14	100,0	20,0	13,3	6,7	10,0	0,0	10,0							
15	100,0	66,7	13,3	30,0	13,3	6,7	13,3							



16	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,7	36,7							
17	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	76,7							

Grupa	NU-SGL													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	56,7	66,7	100,0	90,0	23,3	26,7	26,7	43,3	53,3	33,3	63,3	43,3	36,7	46,7
2	36,7	6,7	3,3	13,3	6,7	10,0	30,0	30,0	46,7	60,0	100,0	53,3	26,7	50,0
3	80,0	100,0	70,0	70,0	40,0	40,0	0,0	30,0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0
4	60,0	30,0	70,0	30,0	60,0	70,0	40,0	10,0	100,0	30,0	40,0	60,0	60,0	50,0
5	40,0	50,0	60,0	20,0	20,0	30,0	60,0	100,0	10,0	60,0				

Grupa	NU-CEN													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	46,7	66,7	63,3	30,0	16,7	26,7	83,3	100,0	93,3	100,0	100,0	100,0	86,7	56,7
2	43,3	10,0	13,3	10,0	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,7	76,7	23,3	43,3	36,7
3	50,0	10,0	100,0	100,0	100,0	26,7	20,0	73,3	73,3	80,0	33,3	43,3	30,0	30,0
4	50,0	50,0	80,0	100,0	100,0	50,0	100,0	20,0	50,0	30,0	50,0	20,0	10,0	10,0
5	70,0	20,0	100,0	100,0	80,0	100,0	50,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	70,0	50,0

Grupa	PU-PROG													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	43,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	66,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3	36,7	83,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	16,7	3,3	3,3	0,0	13,3	20,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	10,0	50,0	60,0	40,0	10,0	20,0	20,0	40,0	40,0	10,0	30,0	100,0	100,0	100,0
6	80,0	70,0	80,0	40,0	100,0	100,0	90,0	90,0	90,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0
7	90,0	40,0	50,0	70,0	60,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0				
8	50,0	50,0	90,0	100,0	100,0	70,0	100,0	100,0	100,0	100,0				
9	100,0	100,0	50,0	33,3	100,0	100,0	100,0							
10	100,0	100,0	83,3	26,7	100,0	100,0	100,0							

Grupa	PU-MAX													
	Dzień treningu													
szczur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							
4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							
5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							

Skrypty do doświadczeń rozróżniania dźwięków z wykorzystaniem otworów na nos jako *operandum* opublikowano w bazie figshare.com.

- kształtowanie reakcji instrumentalnej, DOI: 10.6084/m9.figshare.23586735
- trening, DOI: 10.6084/m9.figshare.23586729

Materiały wideo prezentujące szczury w warunkowaniu instrumentalnym opublikowano w bazie figshare.com.

- trening USV, DOI: 10.6084/m9.figshare.23586738
- trening wsadzania nosa w otwór, DOI: 10.6084/m9.figshare.23586726

## 5. Dyskusja

### 5.1. Podsumowanie wyników

Uzyskane w ramach przeprowadzonych doświadczeń wyniki pokazały, że szczury jako cała grupa nie uczyły się wokalizowania, by uzyskać nagrodę pokarmową. Jako że żadna z modyfikacji protokołu doświadczalnego nie wpłynęła w sposób widoczny na postępy w uczeniu się zwierząt, wyniki z doświadczeń 1-6 dodatkowo pogrupowano na podstawie arbitralnie przyjętego kryterium uczenia się: uzyskanie maksymalnej liczby nagród w czasie każdej z trzech ostatnich sesji treningowych.

Szczury poddane warunkowaniu instrumentalnemu w większości (80%,  $n = 61$ , „nieuczące się”, NU) nie zwiększały liczby nagradzanych pokarmowo reakcji instrumentalnych (emisji USV 50-kHz) w czasie kolejnych sesji treningowych. Z kolei u mniejszej części szczurów (20%,  $n = 15$ , „potencjalnie uczące się”, PU) obserwowano pewne zmiany w zachowaniu, sugerujące zachodzący proces asocjacji i wzmocnienia nagradzanego zachowania:

- czas sesji treningowej skracał się u szczurów PU w przeciwieństwie do szczurów NU, u których czas sesji nie ulegał zmianie lub wydłużał się;
- częstość wokalizowania była wyższa u szczurów PU niż u szczurów NU, zarówno w sesjach treningowych, jak i testowych;
- w kolejnych sesjach treningowych odsetek nagrodzonych USV u szczurów PU rósł w stosunku do wszystkich emitowanych USV, jak i do emitowanych USV 50-kHz;
- nagradzane USV były emitowane w seriach, zarówno u szczurów PU, jak i u szczurów NU, jednak wraz z postępem treningu szczury PU emitowały więcej USV w obrębie pojedynczej serii niż szczury NU.

Co więcej, zachodziły zmiany we właściwościach USV, które mogłyby świadczyć o preferencji emisji USV 50-kHz przez szczury PU:

- USV 50-kHz wraz z kolejnymi sesjami treningowymi były dłuższe u szczurów PU niż NU; szczury PU miały dłuższe USV 50-kHz niż szczury NU również w sesjach testowych;
- USV 50-kHz emitowane w seriach przez szczury PU były nie tylko dłuższe niż u szczurów NU, ale były także emitowane z większą częstością;
- odsetek krótkich USV 22-kHz, emitowanych przez szczury PU, obniżał się.

Dodatkowo u szczurów NU pokazano istotne zmiany w zachowaniu:

- częstość wokalizowania obniżała się wraz z kolejnymi sesjami treningowymi;
- odsetek krótkich USV 22-kHz, emitowanych przez szczury NU, utrzymywał się lub wzrastał.

Opisane zmiany w zachowaniu szczurów PU mogły świadczyć o zachodzącym procesie uczenia się, a zarazem mogły być konsekwencją zastosowanego kryterium podziału zwierząt na grupy. Istnieje jednak grupa zmian, która świadczyła o wystąpieniu uczenia się i jednocześnie nie wynikała z przyjętego kryterium:

- czas sesji skracał się u szczurów PU-MAX;
- czasu sesji treningowej skracał się u szczurów PU-PROG przez pierwsze trzy sesje treningowe z maksymalną liczbą nagród;
- wzrost częstości wokalizowania między pierwszą sesją testową a ostatnią treningową, obecny w grupach PU i NU, był wyższy w grupie PU.

W ramach doświadczeń kontrolnych wykazano także, że możliwe jest uwarunkowanie tych samych szczurów na wsadzanie nosa w otwór. Po zastosowaniu zaproponowanych protokołów uczenia rozróżniania dźwięków nie stwierdzono procesu uczenia się, natomiast wykazano, że szczury, by uzyskać nagrodę pokarmową, wsadzały nos w otwór coraz szybciej.

## **5.2. Protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący szczurze wokalizacje ultradźwiękowe jako reakcję instrumentalną nie okazał się wystarczająco skuteczny**

Protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący szczurze USV 50-kHz jako pożądane reakcje, opracowany w ramach niniejszej rozprawy, cechuje skuteczność na poziomie 20%. Jego skuteczność jest więc niska. Można w tej sytuacji rozważyć kilka przyczyn tego niepowodzenia.

Naturalny poziom wokalizowania szczura jest cechą silnie indywidualną. Samce szczurów stada Wistar zwykle różnią się częstością wokalizowania, nawet w warunkach wyjściowych (Brudzynski i Pniak, 2002; Schwarting *i wsp.*, 2007; Wöhr i Schwarting, 2007). W przeprowadzonych doświadczeniach część szczurów cechowała niska częstość wokalizowania (Ryc. 17E, Tab. S20). Jednym z założeń opracowywanego w niniejszej pracy protokołu warunkowania mogłoby być wstępne wykluczenie szczurów o niskiej częstości wokalizowania, jednak prowadziłyby to prawdopodobnie do odrzucania znacznej części

zwierząt. Co więcej, na podstawie wartości wyjściowej częstości wokalizowania szczurów nie można przewidzieć postępów w warunkowaniu instrumentalnym w kolejnych dniach. Szczury z wysoką częstością wokalizowania pierwszego dnia treningu ostatecznie rozdzieliły się na dwie grupy, jedną nieuczącą się (NU-D1) i jedną potencjalnie uczącą się (PU-MAX). Z kolei 10 szczurów o początkowo niskiej częstotliwości wokalizowania utworzyło jedną z grup szczurów PU (PU-PROG; Ryc. 17E).

Doświadczenie przeprowadzane ręcznie, w sposób nieautomatyczny jest narażone na błąd ludzki. Nagradzane zachowanie szczura, tj. USV, są zjawiskiem bardzo krótkotrwałym, trwającym od 10 ms do 150 ms (Brudzynski, 2013). W warunkowaniu instrumentalnym kluczowe jest, by czas między nagradzaniem zachowaniem a otrzymaniem nagrody był odpowiednio krótki (Skinner, 1961; Carlson i Wielkiewicz, 1972; Schindler *i wsp.*, 1993). Być może nawet najszybsza możliwa reakcja ze strony eksperymentatora, prowadząca do wydania nagrody, była zbyt wolna, by doszło do uczenia się asocjacyjnego u szczura. Reakcja ta mogłaby zostać skrócona poprzez większą automatyzację obsługi klatki do warunkowania. Jednakże próby warunkowania szczurów na własne USV podjęte przez inne zespoły wykazały, że trening przeprowadzany ze zautomatyzowanym wydawaniem nagrody przynosi podobne rezultaty co trening przeprowadzany ręcznie (Johnson *i wsp.*, 2022).

W doświadczeniu zastosowano deprivację pokarmową. Ograniczenie dostępu szczurów do paszy, na poziomie takim samym, jak w prezentowanych doświadczeniach, jest stosowane w warunkowaniu instrumentalnym powszechnie, gdyż jest czynnikiem motywującym do zdobywania nagrody pokarmowej (Schindler *i wsp.*, 1993; Saito *i wsp.*, 2016; Friedel *i wsp.*, 2017). Grupa szczurów, którą pozbawiono pokarmu na 48 h przed doświadczeniem, wokalizowała na podobnym poziomie co grupa szczurów posiadająca dostęp do paszy tylko przez jedną godzinę w ciągu doby (Pertsov *i wsp.*, 2012). Z kolei w pracy stosującej wzmacnianie emisji USV 50-kHz głównym pokarmem szczurów były nagrody pokarmowe podczas sesji treningowych przeprowadzanych raz dziennie przez 6 tygodni (Johnson *i wsp.*, 2022); u szczurów tych liczba wokalizacji rosła wraz z kolejnymi tygodniami treningu. Wiadomo także, że szczury wokalizują w paśmie 50 kHz, zarówno w klatce znanej, jak i nowej, niezależnie od tego, czy były uprzednio poddane deprivacji pokarmowej czy też posiadały swobodny dostęp do paszy. Jednakże częstość wokalizowania była większa u zwierząt z dostępem do paszy *ad libitum*, dlatego zasugerowano, że deprivacja pokarmowa może mieć tłumiący wpływ na wokalizację w paśmie 50 kHz (Schwartzing *i wsp.*, 2007). Istnieją zatem

przesłanki pozwalające sądzić, że deprywacja pokarmowa może mieć działanie hamujące na częstość emisji USV 50-kHz, lecz nie można stwierdzić tego jednoznacznie.

Stosowanie deprywacji pokarmowej wymaga chowu pojedynczego. Wraz z rozpoczęciem deprywacji pokarmowej zwierzęta, uprzednio chowane w klatkach w parach, rozdzielane były do klatek indywidualnych. Było to konieczne dla właściwego monitorowania ilości spożytej paszy. Taka zmiana może wpłynąć na emisję USV 50-kHz, które są formą komunikacji szczura (w tym przypadku osamotnionego) z innymi przedstawicielami jego gatunku. Jednak istnieją liczne doniesienia wskazujące na to, że izolacja dorosłego szczura powoduje wzrost częstości emisji USV 50-kHz. Szczury chowane pojedynczo w klatkach przez 32 dni wokalizowały znacznie intensywniej przed oraz po zaprezentowaniu USV z głośnika niż te trzymane w parach (Olszyński *i wsp.*, 2020). Szczury chowane pojedynczo wokalizowały więcej niż szczury trzymane razem, zarówno podczas zabawy (Knutson *i wsp.*, 1998), jak i podczas łaskotania przez eksperymentatora, co jest odpowiednikiem zabawy z innym osobnikiem (Panksepp i Burgdorf, 2000; Burgdorf i Panksepp, 2001). W pracach wykorzystujących warunkowanie szczurów na emisję USV 50-kHz zwierzęta w czasie trwania całej procedury chowano pojedynczo (Johnson *i wsp.*, 2013; Shembel *i wsp.*, 2021) powołując się na pracę, w której szczury chowane pojedynczo przez 29 dni wokalizowały znacznie intensywniej od tych chowanych w grupach (Panksepp i Burgdorf, 2000). Wydaje się więc, że trzymanie szczurów pojedynczo w klatkach nie powinno wpływać hamująco na wokalizowanie w przeprowadzonych doświadczeniach. Co więcej, taki chów zwierząt może wpłynąć motywująco na emisję USV 50-kHz. Jednakże należy także uwzględnić fakt, że izolacja może wpływać na zachowanie szczurów. Samce szczurów chowane pojedynczo przez 14 miesięcy miały zwiększone potrzeby kontaktu z innym osobnikiem w porównaniu ze szczurami trzymanymi w grupach (Templer *i wsp.*, 2018). Wydaje się więc, że izolacja szczurów może mieć wpływ na charakter emitowanych ultradźwięków – mogą w nich przeważać te o znaczeniu społecznym, a więc wyrażające w większym stopniu potrzebę kontaktu z drugim osobnikiem, tzn. bardziej „społeczne” niż behawioralnie „obojętne” – taka zmiana właściwości USV mogłaby mieć negatywny wpływ na proces uczenia się w ramach proponowanego w niniejszej pracy protokołu.

Do potencjalnych przyczyn niepowodzenia w opracowaniu protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów może należeć również biologiczna rola tychże wokalizacji w wyrażaniu wewnętrznego stanu emocjonalnego szczura. Już w latach siedemdziesiątych XX w. sformułowano hipotezę, że wokalizacje ultradźwiękowe gryzoni

odzwierciedlają stan ich pobudzenia i wywołują podobny stan u pobliskich zwierząt (Bell, 1974). W kolejnych latach opisywano znaczenie USV szczurów w kontaktach międzyosobniczych. Opisano USV 22-kHz emitowane podczas agresywnych spotkań dwóch samców (Thomas *i wsp.*, 1983), a w efekcie zaproponowano drugą hipotezę mówiącą, że USV 50-kHz i USV 22-kHz mają znaczenie w komunikacji społecznej (Barfield i Thomas, 1986). Potwierdzeniem znaczenia komunikacyjnego szczurzych USV jest reakcja szczurów na prezentowane z głośnika USV: zwiększenie aktywności motorycznej i podchodzenie w kierunku prezentowanych USV 50-kHz oraz zmniejszenie aktywności motorycznej szczura po prezentacji USV 22-kHz (Brudzynski i Chiu, 1995; Wöhr i Schwarting, 2007; Olszyński *i wsp.*, 2020). Obie te hipotezy nie są wzajemnie wykluczające się – wskazują jednak na związek emisji USV z emocjami i sytuacjami międzyosobniczymi, a nie ze zdobywaniem nagrody. Można zatem przypuszczać, że naturalna, biologiczna rola USV, którą jest wyrażanie przez te zwierzęta wewnętrznego stanu emocjonalnego, mogła mieć niekorzystny wpływ na skuteczność omawianego w ramach niniejszej pracy protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV 50-kHz. Jednocześnie, stosowane w warunkowaniu instrumentalnym powszechnie naciskanie dźwigni i wsadzanie nosa są reakcjami motorycznymi, eksploracyjnymi, powiązаныmi ze zdobywaniem pokarmu – co może tłumaczyć większą skuteczność ich zastosowania.

Do prawdopodobnych przyczyn niskiej skuteczności prezentowanego w niniejszej pracy protokołu warunkowania instrumentalnego należą: częstość wokalizowania u szczurów, która jest cechą silnie indywidualną; przeprowadzanie doświadczeń w sposób nieautomatyczny, co naraża doświadczenie na błąd ludzki większy niż w przypadku zautomatyzowania; stosowanie deprivacji pokarmowej, która może mieć działanie hamujące na częstość emisji USV 50-kHz; izolacja szczurów chowanych pojedynczo mogła mieć wpływ na charakter emitowanych przez nie USV (wyrażające potrzebę kontaktu z drugim osobnikiem). Opracowanie protokołu warunkowania instrumentalnego z wykorzystaniem USV 50-kHz szczurów wiąże się z wyzwaniem stawianym tym zwierzętom, które mają za zadanie rozróżnienie dwóch powodów emisji USV 50-kHz – w celu otrzymania nagrody i w ramach wyrażania apetytywnego stanu emocjonalnego. Czynność taka jak wsadzenie nosa w otwór czy naciskanie dźwigni jest niepowiązana ze stanem emocjonalnym szczura tak silnie jak USV i dlatego w przypadku jej użycia nie występuje komplikacja związana ze znaczeniem biologicznym/behawioralnym USV.

### 5.3. Zastosowanie modyfikacji protokołu doświadczalnego nie wpłynęło na zmianę jego skuteczności

Modyfikacje wprowadzone do protokołu doświadczalnego miały na celu zwiększenie jego efektywności. W pierwszym kroku zdecydowano się na zwiększenie liczby sesji treningowych i maksymalnej liczby nagród podczas jednej sesji (Tabela 1). Ponieważ doświadczenie polegało na nagradzaniu szczurów za ich własną wokalizację w paśmie 50 kHz, kolejne modyfikacje miały na celu zwiększenie częstości emisji USV 50-kHz, które następnie można byłoby wzmacniać przez podawanie nagrody pokarmowej. Czynniki zachęcającymi zwierzęta do wokalizacji były: przeprowadzanie treningu w fazie ciemnej, przyzwyczajanie do klatki do warunkowania, obecność ściółki z zapachem drugiego szczura z klatki (od którego w ramach deprivacji pokarmowej szczur badany był izolowany) oraz odtwarzane z głośnika USV 50-kHz (Tabela 1). Mimo zastosowanych zmian protokołu u większości szczurów nie stwierdzono zwiększonej częstości wokalizowania w paśmie 50 kHz, przez co możliwość otrzymania nagrody zachodziła rzadko.

Wykorzystywane w doświadczeniach nagrania zawierające USV 50-kHz, zgodnie z wiedzą literaturową, miały zwiększyć częstość wokalizacji u szczurów, a tym samym zwiększyć szanse na uczenie się instrumentalne szczurów i wytworzenie asocjacji między wokalizacją a nagrodą w postaci pokarmu. Szczury odpowiadają własną wokalizacją na prezentowane z głośnika USV 50-kHz (Wöhr i Schwarting, 2007; Olszyński *i wsp.*, 2020). Prezentowane USV wykorzystane w doświadczeniu nie przyniosły jednak oczekiwanych rezultatów w postaci zwiększonej liczby szczurów emitujących USV 50-kHz, aby uzyskać nagrodę. Zespół dr. M. Wöhra pokazał, że podczas pierwszej prezentacji USV 50-kHz z głośnika ilość uwolnionej dopaminy w jądrze półleżącym przypomina sytuację otrzymania nagrody pokarmowej, jednak odpowiedź w jądrze półleżącym szybko wygasa wraz z kolejnymi odtworzeniami tego samego nagrania (Willuhn *i wsp.*, 2014). Można więc przypuszczać, że prezentacja tych samych nagrań USV 50-kHz nie sprawdza się w doświadczeniach długoterminowych, gdyż szczury wraz z kolejnymi powtórzeniami przestają na nie reagować.

Jako jeden z elementów mający na celu zwiększyć częstość emisji USV 50-kHz wykorzystano ściółkę pochodzącą z klatki szczura chowanego wcześniej ze szczurem poddawanym warunkowaniu. Wcześniej wykazano, że szczury wokalizują w paśmie 50 kHz w odpowiedzi na obecny w klatce zapach innych szczurów (Brudzynski i Pniak, 2002). Jednak wniosek ten sformułowano na podstawie doświadczenia trwającego cztery dni, dlatego można przypuszczać, że prezentowanie szczurom zapachu tego samego szczura przez dwa tygodnie

może, podobnie jak prezentacja tych samych nagrań z głośnika, nie sprawdzać się jako bodziec zwiększający liczbę wokalizacji w doświadczeniach długoterminowych.

Doświadczenia zaczęto przeprowadzać w ciemnej fazie doby, ponieważ jest to zgodne z naturalną aktywnością dobową szczurów (Schweinfurth, 2020). Można znaleźć przykłady doświadczeń z wykorzystaniem USV przeprowadzanych w ciemnej fazie doby (Wöhr *i wsp.*, 2008; Wright *i wsp.*, 2010; Rostron *i wsp.*, 2017; Riede *i wsp.*, 2020), wśród nich są też prace z modelem warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2022). Jednak mimo wprowadzenia tej zmiany do protokołu doświadczalnego i przeprowadzania procedur w fazie ciemnej doby nie stwierdzono zwiększenia się liczby szczurów wokalizujących, by zdobyć nagrodę pokarmową.

#### **5.4. Szczury uprzednio nagradzane za USV 50-kHz nabywają umiejętność wsadzania nosa w otwór**

Brak wzmocnienia wokalizowania w paśmie 50 kHz, mimo nagradzania tego zachowania, mogłoby być wynikiem niewłaściwych warunków panujących w Pracowni Behavioralno-Metabolicznej IMDiK PAN. Dlatego w celu przekonania się, czy zwierzęta wykorzystane w warunkowaniu instrumentalnym można uwarunkować z użyciem wykorzystywanego w ww. Pracowni sprzętu, zwierzęta uprzednio poddane wzmocnianiu wokalizacji lub wzmocnianiu wokalizacji w odpowiedzi na USV emitowane z głośnika dodatkowo poddano procedurze wzmocniania reakcji ruchowej polegającej na wsadzeniu nosa w otwór w ścianie klatki. Podczas tej procedury wytwarzania reakcji instrumentalnej zdecydowana większość szczurów ( $n = 35$  na  $36$ ) uzyskiwała maksymalną liczbę nagród już podczas pierwszego treningu. Umiejętność ta utrzymywała się na niezmiennej maksymalnej wysokości do ostatniej sesji treningowej (Ryc. 14A).

Wytworzenie u zwierząt asocjacji między wsadzeniem nosa w otwór a otrzymaniem nagrody jest często wykorzystywane na wstępnym etapie doświadczenia, przed rozpoczęciem następnych zaawansowanych procedur uczenia się (Lopuch i Popik, 2011; Maier *i wsp.*, 2012; Bassareo *i wsp.*, 2015). Pokazano, że umiejętność wsadzania nosa w otwór przychodzi szczurom łatwiej niż naciskanie dźwigni (Schindler *i wsp.*, 1993). U szczurów warunkowanych w fazie treningowej na wkładanie nosa w jeden z dwóch otworów pokazano, że szczury osiągnęły obrane kryterium uczenia się już pierwszego dnia treningu, odsetek pominiętych prób zmniejszał się, a czas do wsadzenia nosa w otwór w kolejnych sesjach treningowych ulegał szybkiemu skracaniu się (Yawata *i wsp.*, 2018).



Otwór przygotowany na wykrycie wsadzenia nosa jest obok dźwigni najczęściej stosowanym *operandum*. USV powstają w wyniku konkretnego stanu afektywnego szczura, również podczas uczenia się wsadzania nosa w otwór (Ryc. 15). W przeprowadzonym doświadczeniu pokazano częstość wokalizacji na tym samym poziomie jak w warunkowaniu na emisję własnych wokalizacji. Wynik ten wskazuje na to, że nabywanie nowej reakcji instrumentalnej polegającej na wsadzaniu nosa w otwór, aby uzyskać nagrodę, nie miało wpływu na stan emocjonalny szczurów. W związku z tym można zaproponować przeprowadzenie doświadczenia na grupie szczurów naiwnych, u których wzmacniana będzie reakcja wsadzania nosa w otwór za pomocą nagrody wraz z nagrywaniem ultradźwięków w trakcie doświadczenia. Pozwoliłoby to na pełen obraz sytuacji emisji USV, w której szczury są warunkowane instrumentalnie po raz pierwszy.

### **5.5. Szczury poddane warunkowaniu instrumentalnemu wykazują różnice w częstości wokalizacji**

Szczury PU i NU różniły się intensywnością wokalizowania we wszystkich sesjach treningowych (Ryc. 17A, Tab. S5b) i we wszystkich sesjach testowych (Ryc. 17B, Tab. S5b); częstość wokalizowana była wyższa w grupie PU-SUM niż NU-SUM. Dodatkowo częstość wokalizowania u szczurów PU-SUM pozostała stała w kolejnych dniach treningu, a u szczurów NU-SUM obniżała się (Ryc. 17A, Tab. S5a).

Szczurze USV 50-kHz odgrywają istotną rolę w komunikacji socjalnej. Emitowane są podczas kontaktów z innymi osobnikami, np. podczas zabawy. USV te wskazują także na apetytywny stan emocjonalny szczurów powiązany z uwalnianiem się dopaminy (Brudzinski, 2009). Zachowania szczurów w trakcie fazy treningowej objawiające się uzyskiwaniem maksymalnej liczby nagród przez wszystkie sesje, na początku lub w czasie pojedynczych treningów, można tłumaczyć apetytywnym stanem emocjonalnym jakiego doświadczają szczury. Stan ten powiązany jest ściśle z emisją USV 50-kHz. Pokazano, że szczury wokalizują w paśmie 50 kHz w oczekiwaniu na nagrodę – tuż przed jej podaniem (Burgdorf *i wsp.*, 2000; Buck *i wsp.*, 2014). Nagradzanie w klatce do warunkowania szczurów poddanych deprivacji pokarmowej mogło wywołać u nich apetytywny stan emocjonalny, w wyniku którego nasiliła się emisja USV 50-kHz. Dzięki temu mogło dojść do potencjalnego uczenia się asocjacyjnego, łączącego USV z nagrodą, a zarazem mogło być przeszkodą w uczeniu się, gdyż USV mogły powstawać w wyniku pozytywnego skojarzenia klatki z nagrodą, a nie wokalizowaniem za nagrodę.

## **5.6. U szczurów potencjalnie uczących się można wyróżnić zachowania wskazujące na uczenie się**

Szczury PU charakteryzowały się pewnymi zachowaniami sugerującymi wystąpienie u nich procesu uczenia się asocjacyjnego. Co istotne, niektóre z tych zachowań nie były wynikiem z przyjętego arbitralnie kryterium podziału zwierząt na grupy.

W grupie szczurów PU pokazano skracanie się czasu sesji treningowych w kolejnych dniach, co pozostaje w kontraście do szczurów NU, gdzie czas sesji nie ulegał zmianie lub się wydłużał (Ryc. 12D, Tab. S3b). W modelu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów jako wzmacniane reakcje wskazano, że czas sesji treningowej, w jakim szczury spełniały obrane przez eksperymentatora kryterium wokalizowania, wynosił od 5 do 10 min (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2022). Jednak w żadnej z prac, w których wykorzystany jest ten model, nie przedstawiono długości sesji dla poszczególnych szczurów (dynamiki skracania się sesji treningowych w ciągu trwającej kilka tygodni fazy treningowej).

Udział nagrodzonych USV we wszystkich emitowanych USV oraz w USV 50-kHz podczas sesji treningowych był wyższy u szczurów PU niż u szczurów NU (Ryc. 18), co może świadczyć o wzmocnieniu wokalizowania w tym paśmie częstotliwości w wyniku warunkowania. Podobną obserwację pokazano w pracy Johnson *i wsp.*, 2011, w której podczas fazy treningowej nagradzono szczury za emisję modulowanych USV. Na skutek treningu obserwowano wzrost częstości wokalizacji oraz liczby emitowanych modulowanych USV – nie pokazano jednak, by wzrost ten był statystycznie znamieny.

Stwierdzono, że w treningu siódmym (połowa fazy treningowej), czas spędzony przez szczury PU w połowie klatki z karmnikiem, jak i w bezpośrednim sąsiedztwie karmnika, był dłuższy niż w treningu pierwszym. Czas spędzony w danej strefie w dniu siódmym utrzymał się na podobnym poziomie do ostatniej sesji treningowej (Ryc. 26, Tab. S14). Dodatkowo, w treningu siódmym liczba wejść do stref okołokarmnikowej i karmnika była u tych szczurów wyższa względem pierwszego dnia treningu (Ryc. 27, Tab. S15). Częstsze przebywanie w strefach klatki z karmnikiem, a także zwiększona liczba przejść do stref, w których znajduje się karmnik z jednoczesnym minimalnym przechodzeniem między strefami karmnikową i bezkarmnikową mogą oznaczać powiązanie przez szczura klatki doświadczalnej z otrzymywaniem pokarmu oraz z wykonywaniem wyuczonej reakcji instrumentalnej, wskutek której otrzymywał on nagrodę pokarmową. W pracy, w której szczurom podawano morfinę pokazano, że spędzają one więcej czasu w miejscu otrzymywania narkotyku niż szczury otrzymujące sól

fizjologiczną, co świadczy o nagradzającym wpływie tego narkotyku i w związku z tym preferowanie konkretnego miejsca przez szczury (Rossi i Reid, 1976). Szczury także uczą się znajdować i zapamiętują miejsce, w którym otrzymują nagrodę. W pracy Michon *i wsp.*, 2020 szczury uczyły się, w których ramionach labiryntu T znajdowała się nagroda o większej wartości (9 pastylek), a w których o mniejszej wartości (1 pastylka). Nawiązując do wyników z przedstawionych tutaj doświadczeń i przykładów z literatury można stwierdzić, że spędzanie przez szczury czasu w konkretnej stronie klatki doświadczalnej świadczy o zachodzącej u nich asocjacji danego miejsca z otrzymywaniem nagrody.

W grupie szczurów PU występują USV nagradzane w seriach. Doświadczenie nagradzania szczurów za USV nie miało na celu zwiększenia liczby emitowanych przez nie USV w kolejnych sesjach treningowych, tak jak to miało miejsce w pracach zespołu A. M. Johnsona (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2022), tylko na wytworzeniu asocjacji pomiędzy wokalizacją, a otrzymaniem nagrody. Postępy w uczeniu się widoczne byłyby za pomocą uzyskiwania przez szczury maksymalnej liczby nagród w treningach (*plateau* procesu uczenia się) i skracającego się czasu trwania sesji treningowej bez wokalizacji dodatkowych, tj. emitowanych np. po wypadnięciu nagrody do karmnika i pojawiających się podczas przemieszczania się szczura do karmnika. USV emitowane w seriach są przykładem idealnej reakcji instrumentalnej, w której szczur emituje jedną USV i odbiera nagrodę, następnie emituje kolejne pojedyncze USV itd. Przypomina to reakcje wsadzania nosa w otwór, gdzie także szczur wsadza nos jednorazowo, odbiera nagrodę i następnie po raz kolejny wsadza nos. Z tego powodu przyjrano się właściwościom USV emitowanych w seriach. Sumaryczna liczba USV wyemitowanych w seriach rosła w grupach szczurów PU, zarówno podczas treningu trwającego siedem dni (Ryc. 19A), jak i czternaście dni (Ryc. 19B). Maksymalna liczba USV wyemitowanych w pojedynczej serii była przeważnie wyższa w grupie szczurów PU niż u szczurów NU (Ryc. 19EF, Tab. S9b). Wyniki te mogą sugerować zachodzący proces uczenia się u szczurów i wokalizowanie, by zdobyć nagrodę, jednak USV w seriach stwierdzono zarówno w grupie szczurów PU, jak i NU.

Szczury PU wykazały pewne zachowania wskazujące na asocjację między emisją USV 50-kHz a otrzymywaniem nagrody, jest to: skracający się czas sesji treningowych; zwiększony odsetek nagrodzonych USV i USV emitowane w seriach, a także spędzanie czasu głównie w tej części klatki doświadczalnej, w której znajduje się karmnik. Wyniki uzyskane u szczurów grupy PU, mogą stanowić punkt wyjścia do opracowania bardziej skutecznego protokołu w przyszłych badaniach.

### 5.7. Szczury nieuczące się emitują więcej krótkich USV 22-kHz

Szczury, które nie uczą się wokalizować, by zdobyć nagrodę, emitują więcej krótkich USV 22-kHz (tj. o długości poniżej 300 ms) od szczurów PU się począwszy od drugiego dnia treningu, co obserwuje się zarówno u szczurów poddanych treningowi siedmiodniowemu, jak i czternastodniowemu (Ryc. 21AB, Tab. S9). Odsetek emitowanych krótkich USV 22-kHz w stosunku do wszystkich emitowanych USV w każdej z trzech sesji testowych jest większy u szczurów NU niż u szczurów PU (Ryc. 21C, Tab. S9).

Znaczenie krótkich USV 22-kHz nie zostało jeszcze dobrze poznane. Pokazano, że u szczurów, które naciskając dźwignię otrzymywały kokainę w jednej z dwóch dostępnych dawek, większość USV 22-kHz należała do krótkich. Występowały one głównie u szczurów z niższą dawką kokainy, ponieważ zwierzęta nie mogły przy niej osiągnąć stanu nasycenia. Na podstawie wyników tego doświadczenia zaproponowano, że USV te mogą powstawać w wyniku negatywnego stanu emocjonalnego u szczura (Barker *i wsp.*, 2010). Krótkie USV 22-kHz pojawiają się także u szczurów dotykanych przez obcego dla nich eksperymentatora (Brudzynski *i wsp.*, 1993) oraz u szczurów, którym przed doświadczeniem bodźca awersyjnego w postaci impulsu elektrycznego prezentowano sygnał ostrzegawczy w postaci dźwięku (Karwicka *i wsp.*, 2021). Krótkie USV 22-kHz mogą być związane z wewnętrznym negatywnym stanem emocjonalnym szczura niezwiązanym z zagrożeniem z zewnątrz (Brudzynski, 2015). Sugeruje się także, że emisja tych wokalizacji związana jest z wyższym poziomem stresu niż w przypadku otrzymywania niespodziewanych bodźców w postaci impulsów elektrycznych (Karwicka *i wsp.*, 2021) oraz może być związana z eksploracją otoczenia (Robakiewicz *i wsp.*, 2019). Pokazano również, że gdy szczury przestały otrzymywać nagrodę pokarmową lub nagrodę w postaci elektrycznej stymulacji mózgu, to zmniejszyła się u nich emisja USV 50-kHz, a zwiększyła w paśmie 20-kHz (bez rozróżnienia na krótkie i długie USV 22-kHz). Obserwację tę powiązano z negatywnym stanem emocjonalnym szczurów oraz stwierdzono, że nagły brak nagrody może być odebrany przez zwierzęta jako kara (Burgdorf *i wsp.*, 2000). Na podstawie zacytowanych prac można wnioskować, że krótkie USV 22-kHz u szczurów NU mogły wiązać się z negatywnym wewnętrznym stanem emocjonalnym tych zwierząt. Przyczyną może być także zwiększony poziom stresu wynikający z nieotrzymywania nagrody, a w związku z tym przebywanie w klatce doświadczalnej przez maksymalny czas trwania sesji treningowej (15 min).

### **5.8. Wokalizacje szczurów potencjalnie uczących się są coraz dłuższe**

U szczurów PU (zarówno w grupach o siedmiu, jak i czternastu sesjach treningowych) pokazano, że emitowane USV 50-kHz są dłuższe niż u szczurów NU (Ryc. 22AC, Tab. S12ac). W sesjach testowych zmiana w długości utrzymała się na istotnym poziomie pierwszego dnia testu u szczurów trenowanych przez 7 dni, a u szczurów trenowanych przez 14 dni – we wszystkie dni testowe (Ryc. 22BD, Tab. S12cd).

Zmiany długości USV 50-kHz nie są zjawiskiem powszechnie opisywanym. W pracy Olszyński *i wsp.*, 2021 grupie szczurów poddanych warunkowaniu strachu i grupie szczurów kontrolnych zaprezentowano z głośnika USV 50- i 22-kHz. W odpowiedzi szczury uprzednio poddane warunkowaniu strachu emitowały USV 50-kHz o wyższej częstotliwości i większej długości niż szczury nie poddane warunkowaniu strachu. W pracy Shembel *i wsp.*, 2021 szczury warunkowano instrumentalnie (przez cztery lub osiem tygodni) nagradzając je za ich własne USV 50-kHz. Trening stopniowo zwiększał liczbę wokalizacji emitowanych przez szczury. Dodatkowo, w wyniku treningu długość USV emitowanych przez szczury trenowane zwiększała się, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, u której USV w ramach kolejnych sesji treningowych były coraz krótsze. Badacze ci pokazali także, że w obu grupach szczurów poddanych warunkowaniu zmianom w długości USV towarzyszył spadek ich częstotliwości.

Postuluje się, że zmiany w długości i częstotliwości USV szczurów poddanych warunkowaniu strachu są oznaką nadmiernej czujności (ang. *hypervigilance*) u tych zwierząt spowodowaną doznaniem wcześniej szokiem elektrycznym (Olszyński *i wsp.*, 2021). Z kolei zwiększenie długości USV w połączeniu ze zmniejszeniem częstotliwości u szczurów nagradzanych za emisję USV 50-kHz tłumaczono zmianami fizycznymi i funkcyjnymi zachodzącymi w krtani podczas tak długo trwającego treningu (Shembel *i wsp.*, 2021).

Skąpe dotychczasowe doniesienia na temat zmian w długości USV 50-kHz powodują trudności w interpretacji zmian, które pokazano w niniejszej pracy. Ponieważ większa długość USV w sesjach treningowych i testowych została opisana u szczurów PU w porównaniu do szczurów NU, można przypuszczać, że zmiana ta jest powiązana z treningiem i uzyskiwaniem nagród przez szczury PU.

### **5.9. Obecnie istnieje tylko jeden protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący wokalizacje ultradźwiękowe szczurów jako obserwowane reakcje**

Opisany przez innych badaczy (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2013; Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016; Lenell *i wsp.*, 2019; Shembel *i wsp.*, 2021; Johnson *i wsp.*, 2022) protokół

warunkowania instrumentalnego wykorzystujący USV 50-kHz jako obserwowane reakcje zakłada wykonywanie czynności doświadczalnych ręcznie (Johnson *i wsp.*, 2011) lub w formie automatyzacji częściowej (Johnson *i wsp.*, 2022). Protokół ten wykorzystuje popęd seksualny samców i stosuje parowanie samców z samicą w rui.

Opis półautomatycznego nagradzania szczurów za emisję USV (Johnson *i wsp.*, 2022) wskazuje, że liczba USV ulegała stopniowemu zwiększeniu przez pierwsze cztery tygodnie warunkowania, co porównane jest do wyników warunkowania przeprowadzonego manualnie zaprezentowanymi w pracy Lenell *i wsp.*, 2019). Stwierdzono, że zastosowanie półautomatycznego protokołu warunkowania powoduje pojawienie się większej liczby USV w porównaniu do grupy kontrolnej – w podobny sposób, jak w przypadku protokołu przeprowadzanego ręcznie, jednak w powyższych pracach nie podano analizy statystycznej potwierdzającej te wnioski. Podobnie nie przedstawiono właściwości emitowanych ultradźwięków (długości, częstotliwości), udziału procentowego USV 50-kHz i USV 22-kHz, ani dokładnego czasu trwania poszczególnych sesji treningowych. Mimo opracowania częściowej automatyzacji protokołu warunkowania, nie stwierdzono jego lepszej skuteczności w porównaniu do warunkowania przeprowadzanego ręcznie. Można zatem przypuszczać, że automatyzacja protokołu przeprowadzanego w niniejszej rozprawie manualnie nie dałaby gwarancji na zwiększenie liczby szczurów wokalizujących, by zdobyć nagrodę.

Pewne elementy postępowania w protokole zaproponowanym przez Johnson *i wsp.*, 2022 pokrywają się z postępowaniem zastosowanym w doświadczeniach przeprowadzanych w niniejszej rozprawie, tj.: zastosowanie deprywacji pokarmowej, zastosowanie pastylek sacharozowych o masie 45 mg jako nagrody, przeprowadzanie wszystkich czynności w ciemnej fazie doby oraz zbliżony maksymalny czas trwania sesji treningowej (10 minut). Najważniejszą różnicą w protokołach jest zastosowany sposób zwiększania liczby USV u trenowanych szczurów. Zgodnie z protokołem zaprezentowanym przez Johnson *i wsp.*, 2022 wykorzystanie, jako motywacji do zdobycia nagrody, popędu seksualnego u doświadczonych seksualnie samców gwarantuje emisję USV pod wpływem obecnego podczas warunkowania zapachu samicy. W opisanych w niniejszej rozprawie doświadczeniach zastosowano emisję apetytywnych wokalizacji z głośnika oraz bodziec zapachowy w postaci ściółki z zapachem innego szczura, które miały na celu uprościć sposób zwiększania wokalizowania u szczurów bez konieczności wcześniejszego łączenia ich z samicą. Dodatkowo, wykorzystanie pomocy w kształtowaniu reakcji instrumentalnej miało na celu skrócenie fazy treningowej w porównaniu do protokołów trwających aż 6 tygodni – niezależnie od tego czy był to protokół

przeprowadzany ręcznie czy automatycznie (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2022). Pomimo pewnych wspólnych elementów postępowania w protokole warunkowania, zaproponowanym przez Johnson *i wsp.*, 2022 i użytych w opisanych tu doświadczeniach, USV emitowane z głośnika oraz ściółka okazały się znacznie mniej skuteczne w wywoływaniu USV u szczurów niż prezentowanie zapachu samicy szczurom doświadczonym seksualnie.

Zastosowanie protokołu warunkowania instrumentalnego szczurów przeprowadzanego ręcznie (Johnson *i wsp.*, 2011) lub częściowo automatycznie (Johnson *i wsp.*, 2022) pozwoliło na opisanie postępu w uczeniu się szczurów, które wokalizują, by uzyskać nagrodę, jednak ma również kilka wad. Wspomniany wcześniej brak analizy statystycznej, który potwierdziłby zachodzące zmiany USV u szczurów w kolejnych tygodniach doświadczenia, nie pozwala na sformułowanie stwierdzenia, że trening USV miał wpływ na zwiększenie emisji USV (Johnson *i wsp.*, 2011; Lenell *i wsp.*, 2019; Johnson *i wsp.*, 2022). Zastosowanie różnego podejścia do deprivacji (stosowanie deprivacji pokarmowej (Johnson *i wsp.*, 2022), wodnej (Johnson *i wsp.*, 2011; Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016; Lenell *i wsp.*, 2019), albo niestosowanie żadnej (Johnson *i wsp.*, 2013; Shembel *i wsp.*, 2021)) nasuwa pytanie które z zastosowanych podejść jest skuteczniejsze w treningu USV oraz czy motywacja do zdobycia nagrody pokarmowej, u zwierząt bez deprivacji jest wystarczająca. W kilku pracach zespołu prof. A.M. Johnsona wspomina się wykorzystanie „klikania” długopisem, które jest używane wraz z nagrodą pokarmową (Johnson *i wsp.*, 2011; Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016; Lenell *i wsp.*, 2019). W jednej z tych prac wytłumaczono, że „kliknięcie” stosowano, by stopniowo przejść od nagradzania szczurów za pomocą wody do nagradzania przy użyciu „kliknięcia” (Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016). Stosowanie długopisu nie pojawia się także w innych pracach stosujących ten protokół (Johnson *i wsp.*, 2013; Shembel *i wsp.*, 2021; Johnson *i wsp.*, 2022). W związku z tym, nie wiadomo czy konieczne jest stosowanie tego narzędzia podczas treningu i jak ono wpływa na jego efektywność. Czas sesji treningowej i liczby nagród także nie zostały podane szczegółowo. Choć nagroda pokarmowa/wodna stosowana była w sześciu pracach (Johnson *i wsp.*, 2011; Johnson *i wsp.*, 2013; Kelm-Nelson *i wsp.*, 2016; Lenell *i wsp.*, 2019; Shembel *i wsp.*, 2021; Johnson *i wsp.*, 2022), to jedynie dwie z nich podają maksymalną liczbę nagród jaką mogą otrzymać zwierzęta (Johnson *i wsp.*, 2011; Lenell *i wsp.*, 2019). Brak dokładnego opisu czasu sesji treningowych i liczby otrzymywanych nagród nie pozwala na formułowanie wniosków na temat indywidualnych różnic w wokalizacji u szczurów i śledzenie ich postępów w nauce w ciągu kilku tygodni treningu.

Protokół doświadczalny opracowany przez zespół Johnsona wymaga więc uzupełnienia kilku braków: statystycznego potwierdzenia skuteczności protokołu; określenia skuteczności różnych podejść do deprivacji; określenia roli „kliknięcia” długopisem w połączeniu z wydawaniem nagrody; uzupełnienia szczegółowych danych o czasie sesji treningowych i liczbie nagród. Wszystkie wymienione braki pozostawiają wątpliwości co do pełnej skuteczności przedstawionego protokołu warunkowania instrumentalnego, zarówno przeprowadzanego ręcznie jak i półautomatycznie.

### **5.10. Szczury nie uczą się odróżniać od siebie ultradźwięków o różnej częstotliwości**

W ramach opisanych tutaj doświadczeń szczury nie uczyły się rozróżniania od siebie dwóch prezentowanych ultradźwięków w ciągu dwóch tygodni treningu, o czym świadczy zbliżona liczba uzyskanych odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych (Ryc. 31, Tab. S18). Jednak wraz z trwaniem fazy treningowej latencja do wsadzenia nosa była coraz krótsza, przez co liczba prób podejmowanych przez zwierzęta była coraz liczniejsza w kolejnych sesjach treningowych (Ryc. 32, Tab. S19).

W pracach opisujących proces uczenia się rozróżniania dźwięków przez szczury procedura uczenia się trwa stosunkowo długo. W przypadku, gdy szczury miały za zadanie odróżnić od siebie dwa dźwięki słyszalne lub USV 50-kHz i 22-kHz, proces uczenia się trwał około 30 dni, szczury podejmowały 120-150 prób dziennie, a sesja treningowa trwała 60 min (Saito *i wsp.*, 2016; Saito *i wsp.*, 2019). W doświadczeniu, w którym myszy miały za zadanie odróżniać od siebie USV zmodyfikowane za pomocą oprogramowania, proces uczenia trwał aż 12 miesięcy. Myszy podejmowały 50-100 prób dziennie, sesja treningowa odbywała się dwa razy dziennie i trwała 30 min (Neilans *i wsp.*, 2014). Z kolei w pracy, w której szczury uczyły się rozpoznawania, które z prezentowanych nagrań zawiera więcej słyszalnych tonów, sygnalizując to za pomocą otworów na nos, około 75% szczurów spełniło kryterium uczenia się (odsetek odpowiedzi poprawnych powyżej 70%) dopiero po czterech-sześciu miesiącach treningu obejmującego 100-300 prób dziennie przy czasie sesji treningowej trwającej 90 min (Brunton *i wsp.*, 2013; Hady *i wsp.*, 2022). Na podstawie powyższych przykładów z piśmiennictwa można stwierdzić, że uczenie się rozróżniania dźwięków jest procesem, który trwa minimum miesiąc, wymagającym podejmowania od 50 do nawet 300 prób podczas każdej sesji treningowej trwającej od 60 do 90 min. Można wysnuć wniosek, że samo zwiększenie czasu trwania sesji treningowej (z 15 min do 25 min) i liczby prób (z 30 do 100) było niewystarczające, gdyż czas trwania fazy treningowej (czternaście dni) był zbyt krótki, by pojawić się mogły ewentualne postępy w uczeniu się.



W dodatku, by utrzymać atrakcyjność nagrody wydawanej podczas treningu, doświadczenie wymaga długotrwałej deprivacji zwierząt (pokarmowej lub związanej z ograniczeniami w picciu), co pociąga za sobą konieczność stałego monitorowania ich stanu zdrowia. Jeśli masa ciała myszy lub szczurów podlegającej deprivacji spada poniżej 80% wagi, jaką miałyby w dostępie do paszy *ad libitum*, zwierzęta powinny być dokarmiane, gdyż taki spadek wagi prowadzi do zmian behawioralnych i stresu fizjologicznego (Heiderstadt *i wsp.*, 2000; Bailey *i wsp.*, 2021; Johnson *i wsp.*, 2022). Podczas doświadczenia trwającego przez kilka miesięcy nie można wykluczyć pojawienia się problemów zdrowotnych zwierząt w wyniku tak długo trwającej deprivacji. Może to powodować pojawienie się zmian w ich zachowaniu jeszcze w trakcie doświadczenia i ostatecznie prowadzić do zmniejszenia liczby zwierząt w grupie doświadczalnej. Planując doświadczenia warunkowania instrumentalnego należy wziąć pod uwagę konieczność zastosowania deprivacji i jej rodzaj (pokarmowa lub wodna), jednocześnie mając na względzie dobrostan zwierząt.

Przeszkodą w przeprowadzaniu doświadczeń z rozróżnianiem sygnałów akustycznych może być również obieranie przez szczury różnych strategii działania, by zdobyć nagrodę (Will, 1974). O obraniu przez szczury strategii działania, polegającej na jak najszybszym otrzymaniu nagrody w przeprowadzonych przez mnie doświadczeniach, świadczyć może coraz krótsza latencja do wsadzania nosa w kolejnych próbach i zwiększająca szansę otrzymania nagrody. Jednocześnie liczba odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych pozostawała do siebie zbliżona, mimo zastosowania prób korygujących oraz kary w postaci szumu. Można zatem wnioskować, że podczas tworzenia protokołu rozróżniania dźwięków należy wziąć pod uwagę możliwe zachowania zwierząt i stworzyć protokół w oparciu o różne metody niepozwalające zwierzętom na stosowanie własnych strategii działania.

Na podstawie doświadczeń z niniejszej rozprawy i przykładów z literatury można wnioskować, że rozróżnianie prezentowanych dźwięków nie należy do tych umiejętności, których szczury szybko się uczą. Planując podobne doświadczenia w przyszłości należałoby brać pod uwagę głównie fakt, że faza treningowa może trwać miesiącami, przez co wymaga znacznego zaangażowania osoby/osób przeprowadzających doświadczenie. Konieczny jest także dobór odpowiedniej deprivacji pokarmowej, by mimo tak długo trwającej procedury utrzymać atrakcyjność nagrody, jednocześnie dbając o dobrostan zwierząt.

### 5.11. Podsumowanie dyskusji

Protokół warunkowania instrumentalnego wykorzystujący USV szczurów jako pożądane reakcje, testowany w niniejszej rozprawie, cechuje się niską skutecznością. Mimo przeprowadzenia wielu modyfikacji w protokole doświadczalnym, większość szczurów nie nauczyła się wokalizować, aby zdobyć nagrodę. Potencjalnymi przyczynami niepowodzenia mogły być: indywidualny dla każdego szczura naturalny poziom wokalizowania, prawdopodobny negatywny wpływ chowu pojedynczego i deprywacji pokarmowej na częstość wokalizowania oraz niesprawdzające się w długoterminowych doświadczeniach zachęcanie szczura do wokalizowania przez prezentowanie USV z głośnika i ściółki z zapachem znajomego szczura. Planując podobne doświadczenia w przyszłości należy pamiętać o indywidualnym dla szczurów poziomie wokalizowania; być może warto byłoby dokonać preselekcji zwierząt pod kątem częstości wokalizowania, odrzucając te o naturalnie niskim poziomie emisji USV. Można by także rozważyć przeprowadzenie doświadczenia bez deprywacji pokarmowej, co pozwoliłoby na trzymanie zwierząt w grupach i wyeliminowałoby ewentualny negatywny wpływ chowu pojedynczego na wokalizowanie. Być może bodźce wywołujące zwiększenie intensywności wokalizacji u szczurów powinny być jak najbardziej różnorodne; zarówno odtwarzane USV, jak i ściółka może w każdej sesji treningowej pochodzić od innych szczurów, dzięki czemu „atrakcyjność” stosowanych bodźców mogłaby zostać utrzymana. Warto byłoby także zwiększyć stopień automatyzacji nagradzania szczurów za emitowane wokalizacje, co mogłoby zmniejszyć błąd ludzki wiążący się z ręcznym sterowaniem wydawaniem nagrody i bardziej zobjektywizować przebieg doświadczenia. Opracowanie skutecznego protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów mogłoby pozwolić na jego adaptacje do różnych układów doświadczalnych oraz wykorzystanie w badaniu zwierzęcych modeli chorób neurologicznych, w których dochodzi do upośledzenia funkcji wokalnych, takich jak schizofrenia, choroba Parkinsona, autyzm i in.

## 6. Podsumowanie i wnioski

Wprowadzenie protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego USV szczurów jako reakcje instrumentalne mogłoby stać się przydatnym narzędziem do badania wokalizacji ultradźwiękowych szczura i posłużyć w badaniach wykorzystujących zwierzęce modele różnych chorób neurologicznych, takich jak autyzm, schizofrenia czy choroba Parkinsona.

Zastosowanie protokołu warunkowania instrumentalnego szczurów, wykorzystującego wokalizacje ultradźwiękowe jako pożądane reakcje, nie przyniosło oczekiwanych wyników. Mimo użycia szeregu modyfikacji tego protokołu jego ogólna skuteczność wyniosła jedynie 20%. Jednak u wspomnianych 20% szczurów obserwowano pewne zmiany w zachowaniu, sugerujące uczenie się i wzmocnienie nagradzanego zachowania, jak również zmiany we właściwościach emitowanych USV. Doświadczenia kontrolne pokazały, że szczury, uprzednio nagradzane za emisję apetytywnych USV, szybko warunkują się na wsadzanie nosa w otwór. Wyniki uzyskane w grupie szczurów wykazujących zachowania świadczące o zachodzącym procesie uczenia się, mogą stanowić punkt wyjścia do opracowania bardziej skutecznego protokołu w przyszłości.

Usprawnienie protokołu warunkowania instrumentalnego mogłoby nastąpić w wyniku automatyzacji nagradzania szczurów, ponieważ procedura manualna jest pracochłonna i narażona na błąd ludzki w wyższym stopniu niż procedura zautomatyzowana. Wokalizacje nagradzane podczas doświadczeń to zjawiska krótkotrwałe, mierzone w milisekundach, przez co, przy stosowaniu manualnego wydawania nagrody, łatwiej o zmienność w wynikach pochodzącą z przypadku i błędu.

Można przypuszczać, że przeszkodą w warunkowaniu instrumentalnym wykorzystującym własne USV szczura mogła być m.in. biologiczna rola wokalizacji ultradźwiękowych – wyrażanie stanu emocjonalnego tych zwierząt w ramach kontaktów międzyosobniczych.

## 7. Spisy rycin i tabel

### 7.1. Spis rycin

Ryc. 1. Ogólny schemat doświadczenia.....	26
Ryc. 2. Spektrogramy nagrań USV emitowanych jako pomoc (protokoły 3-5) oraz jako bodziec warunkowany (protokół 7).....	30
Ryc. 3. Schemat protokołu 7.....	33
Ryc. 4. Schemat protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego otwór na nos.....	33
Ryc. 5. Spektrogramy ultradźwięków prezentowanych z głośnika w treningu rozróżniania dźwięków. ....	35
Ryc. 6. Schemat protokołu 11.....	38
Ryc. 7. Schemat protokołu 12.....	38
Ryc. 8. Cztery strefy klatki doświadczalnej: A. klatki Skinnera; B. klatki tożsamej z klatką do chowu, wyznaczone podczas analizy materiałów video.....	40
Ryc. 9. Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury z zastosowaniem różnych protokołów doświadczalnych.....	41
Ryc. 10. Charakterystyka grupy szczurów, u których wzmacniano odpowiedź na USV emitowane z głośnika.....	42
Ryc. 11. Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury (A) oraz czas trwania sesji (B) u wszystkich zwierząt zgrupowanych bez względu na zastosowany protokół doświadczalny.....	43
Ryc. 12. Charakterystyka grupy szczurów nieuczących się (NU) i potencjalnie uczących się (PU)....	44
Ryc. 13. Podział szczurów na grupy ze względu na zmiany w liczbie osiągniętych nagród w kolejnych sesjach treningowych. ....	46
Ryc. 14. Charakterystyka grup szczurów, u których wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór. ....	48
Ryc. 15. Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) i odsetek krótkich USV 22-kHz u szczurów, u których wzmacniano emisję USV, a następnie wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór....	49
Ryc. 16. Czas trwania sesji u szczurów podzielonych na sześć podgrup (A) oraz grupy PU-SUM i NU-SUM (B) bez względu na liczbę dni treningowych.....	51
Ryc. 17. Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM).....	53
Ryc. 18. Udział nagrodzonych USV w ogólnej liczbie USV (A, B) oraz w liczbie USV 50-kHz (C, D) podczas sesji treningowych.....	56
Ryc. 19. Liczebność nagrodzonych USV emitowanych w seriach.....	58
Ryc. 20. Zmiany właściwości USV emitowanych w seriach podczas kolejnych sesji treningowych u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM/0).....	60
Ryc. 21. Udział krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV.....	62
Ryc. 22. Długość USV 50-kHz.....	64
Ryc. 23. Średnia częstotliwość USV 50-kHz.....	65
Ryc. 24. Średnia długość krótkich USV 22-kHz.....	66
Ryc. 25. Średnia częstotliwość krótkich USV 22-kHz.....	67
Ryc. 26. Odsetek czasu spędzonego w strefie bezkarmnikowej (A), karmnikowej (B), okołokarmnikowej (C) i strefie karmnika (D) dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej.....	68
Ryc. 27. Liczba wejść do poszczególnych stref klatki u szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej.....	69
Ryc. 28. Liczba wejść do danej strefy (A) i odsetek czasu spędzonego w danej strefie klatki (B) podczas pierwszej sesji treningowej u szczurów z grupy PU oraz szczurów grupy NU-D1.....	69
Ryc. 29. Liczba wsadzeń nosa (ABEF) oraz czas trwania sesji (CDGH) podczas dwóch dni kształtowania reakcji instrumentalnej w protokole 11 (A-D) i protokole 12 (E-H).....	70

Ryc. 30. Suma odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych z 14 sesji treningowych szczurów po zastosowaniu protokołu 11.....	71
Ryc. 31. Liczba wszystkich prób, liczba odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych, liczba prób pominiętych oraz czas trwania sesji treningowych podczas 14 dni treningu rozróżniania dźwięków w protokole 11 (AB), protokole 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O, CD) i protokole 12 (EF).....	73
Ryc. 32. Czas do wsadzenia nosa w jeden z dwóch otworów na nos w trakcie sesji treningowej rozróżniania dźwięków (protokół 11 (AB), protokół 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O, CD), protokół 12 (EF)).....	75

## 7.2. Spis tabel

Tabela 1. Zestawienie zmian wprowadzanych do protokołu doświadczalnego podczas przeprowadzania doświadczeń 1-6.....	27
Tabela 2. Porównanie protokołów doświadczalnych nr 11 i 12.....	37
Tabela 3. Wykaz grup zwierząt ustalonych na podstawie liczb osiągniętych nagród wraz z oznaczeniami skrótowymi oraz liczebnością.....	45

## 7.3. Spis tabel suplementu statystycznego

Tab. S1. Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury z zastosowaniem różnych protokołów doświadczalnych (Ryc. 9, Ryc. 10).....	76
Tab. S2. Odsetek maksymalnej liczby nagród uzyskanych przez szczury oraz czas trwania sesji u wszystkich zwierząt zgrupowanych bez względu na zastosowany protokół doświadczalny (Ryc. 11).76	76
Tab. S3. Charakterystyka grupy szczurów nieuczących się i potencjalnie uczących się (Ryc. 12). ....	76
Tab. S4. Charakterystyka grup szczurów, u których wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór (Ryc. 14. ).....	77
Tab. S5. Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów, u których wzmacniano emisję USV, a następnie wzmacniano umiejętność wsadzania nosa w otwór (Ryc. 15) .....	77
Tab. S6. Czas trwania sesji u szczurów podzielonych na sześć podgrup oraz grupy PU-SUM i NU-SUM bez względu na liczbę dni treningowych (Ryc. 12). .....	78
Tab. S7. Częstość emisji USV (liczba USV na 1 min) u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM; Ryc. 17).....	78
Tab. S8. Udział nagrodzonych USV w ogólnej liczbie USV oraz w liczbie USV 50-kHz podczas sesji treningowych (Ryc. 18).....	80
Tab. S9. Liczebność nagrodzonych USV emitowanych w seriach (Ryc. 19).....	81
Tab. S10. Zmiany właściwości USV emitowanych w seriach podczas kolejnych sesji treningowych u szczurów potencjalnie uczących się (PU-SUM) i nieuczących się (NU-SUM/0; Ryc. 20). .....	81
Tab. S11. Udział krótkich USV 22-kHz w ogólnej liczbie USV (Ryc. 21). .....	82
Tab. S12. Długość USV 50-kHz (Ryc. 22). .....	83
Tab. S13. Średnia częstotliwość USV 50-kHz (Ryc. 23).....	84
Tab. S14. Odsetek czasu spędzonego w strefie bezkarmnikowej, karmnikowej, okołokarmnikowej i strefie karmnika dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej (Ryc. 26). .....	85
Tab. S15. Liczba wejść do poszczególnych stref klatki dla szczurów PU podczas pierwszej, siódmej i czternastej sesji treningowej (Ryc. 27).....	85
Tab. S16. Liczba wejść do danej strefy i odsetek czasu spędzonego w danej strefie klatki podczas pierwszej sesji treningowej u szczurów z grupy PU oraz szczurów grupy NU-D1 (Ryc. 28) .....	85
Tab. S17. Liczba wsadzeń nosa oraz czas trwania sesji podczas dwóch dni kształtowania reakcji instrumentalnej w protokole 11 i protokole 12 (Ryc. 29).....	85

Tab. S18. Liczba wszystkich prób, liczba odpowiedzi poprawnych i niepoprawnych, liczba prób pominiętych oraz czas trwania sesji treningowych podczas 14 dni treningu rozróżniania dźwięków w protokole 11, protokole 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O) i protokole 12 (Ryc. 31).	86
Tab. S19. Czas do wsadzenia nosa w jeden z dwóch otworów na nos w trakcie sesji treningowej rozróżniania dźwięków w doświadczeniu 11, doświadczeniu 11 bez uwzględniania wartości odstających (11/O) i doświadczeniu 12 (Ryc. 32).	87
Tab. S20. Odsetek zdobytych nagród przez szczury przyporządkowane do poszczególnych grup w poszczególnych sesjach treningowych (dane wyjściowe dla Ryc. 13)	88

## 8. Piśmiennictwo

Bailey, L. S., Bagley, J. R., Dodd, R., Olson, A., Bolduc, M., Philip, V. M., Reinholdt, L. G., Sukoff Rizzo, S. J., Tarantino, L., Gagnon, L., Chesler, E. J. i Jentsch, J. D. (2021) Heritable variation in locomotion, reward sensitivity and impulsive behaviors in a genetically diverse inbred mouse panel. *Genes Brain Behav* 20(8): e12773. DOI: 10.1111/gbb.12773

Barfield, R. J. i Thomas, D. A. (1986) The Role of Ultrasonic Vocalizations in the Regulation of Reproduction in Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 474(1 Reproduction): 33-43. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb27996.x

Barker, D. J., Root, D. H., Ma, S., Jha, S., Megehee, L., Pawlak, A. P. i West, M. O. (2010) Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 211(4): 435-442. DOI: 10.1007/s00213-010-1913-9

Bassareo, V., Cucca, F., Frau, R. i Di Chiara, G. (2015) Differential activation of accumbens shell and core dopamine by sucrose reinforcement with nose poking and with lever pressing. *Behav Brain Res* 294: 215-223. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.006

Bell, R. W. (1974) Ultrasounds in small rodents: Arousal-produced and arousal-producing. *Developmental Psychobiology* 7(1): 39-42. DOI: 10.1002/dev.420070107

Bialy, M., Rydz, M. i Kaczmarek, L. (2000) Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav Neurosci* 114(5): 983-990. DOI: 10.1037//0735-7044.114.5.983

Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R. i Weiss, S. M. (1991) Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50(5): 967-972. DOI: 10.1016/0031-9384(91)90423-1

Browning, J. R., Browning, D. A., Maxwell, A. O., Dong, Y., Jansen, H. T., Panksepp, J. i Sorg, B. A. (2011) Positive affective vocalizations during cocaine and sucrose self-administration: a model for spontaneous drug desire in rats. *Neuropharmacology* 61(1-2): 268-275. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.04.012

Brudzynski, S. M. (2001) Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8): 611-617. DOI: 10.1016/s0149-7634(01)00058-6

Brudzynski, S. M. (2009) Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. *ILAR J* 50(1): 43-50. DOI: 10.1093/ilar.50.1.43

Brudzynski, S. M. (2013) Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* 23(3): 310-317. DOI: 10.1016/j.conb.2013.01.014

Brudzynski, S. M. (2015) Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr Neuropharmacol* 13(2): 180-192. DOI: 10.2174/1570159x13999150210141444

- Brudzynski, S. M. (2019) Emission of 22 kHz vocalizations in rats as an evolutionary equivalent of human crying: Relationship to depression. *Behav Brain Res* 363: 1-12. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.01.033
- Brudzynski, S. M. (2021) Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sci* 11(5). DOI: 10.3390/brainsci11050605
- Brudzynski, S. M. i Bihari, F. (1990) Ultrasonic vocalization in rats produced by cholinergic stimulation of the brain. *Neurosci Lett* 109(1-2): 222-226. DOI: 10.1016/0304-3940(90)90567-s
- Brudzynski, S. M., Bihari, F., Ociepa, D. i Fu, X. W. (1993) Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. *Physiol Behav* 54(2): 215-221. DOI: 10.1016/0031-9384(93)90102-1
- Brudzynski, S. M. i Burgdorf, J. S. (2021) Recent Studies of Rat Ultrasonic Vocalizations-Editorial. *Brain Sci* 11(11). DOI: 10.3390/brainsci11111390
- Brudzynski, S. M. i Chiu, E. M. C. (1995) Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & Behavior* 57(6): 1039-1044. DOI: 10.1016/0031-9384(95)00003-2
- Brudzynski, S. M. i Holland, G. (2005) Acoustic characteristics of air puff-induced 22-kHz alarm calls in direct recordings. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8): 1169-1180. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.007
- Brudzynski, S. M. i Pniak, A. (2002) Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J Comp Psychol* 116(1): 73-82. DOI: 10.1037/0735-7036.116.1.73
- Brudzynski, S. M., Silkstone, M., Komadoski, M., Scullion, K., Duffus, S., Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R. i Panksepp, J. (2011) Effects of intraaccumbens amphetamine on production of 50 kHz vocalizations in three lines of selectively bred Long-Evans rats. *Behav Brain Res* 217(1): 32-40. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.10.006
- Brunton, B. W., Botvinick, M. M. i Brody, C. D. (2013) Rats and humans can optimally accumulate evidence for decision-making. *Science* 340(6128): 95-98. DOI: 10.1126/science.1233912
- Buck, C. L., Malavar, J. C., George, O., Koob, G. F. i Vendruscolo, L. F. (2014) Anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations are associated with escalated alcohol intake in dependent rats. *Behav Brain Res* 271: 171-176. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.06.003
- Burgdorf, J., Knutson, B. i Panksepp, J. (2000) Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behav Neurosci* 114(2): 320-327.
- Burgdorf, J., Knutson, B., Panksepp, J. i Shippenberg, T. S. (2001) Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 155(1): 35-42. DOI: 10.1007/s002130100685
- Burgdorf, J. i Panksepp, J. (2001) Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* 72(1-2): 167-173. DOI: 10.1016/s0031-9384(00)00411-x



- Burgdorf, J., Wood, P. L., Kroes, R. A., Moskal, J. R. i Panksepp, J. (2007) Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* 182(2): 274-283. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.03.010
- Carlson, J. G. i Wielkiewicz, R. M. (1972) Delay of reinforcement in instrumental discrimination learning of rats. *J Comp Physiol Psychol* 81(2): 365-370. DOI: 10.1037/h0033531
- Ciucci, M. R., Vinney, L., Wahoske, E. J. i Connor, N. P. (2010) A translational approach to vocalization deficits and neural recovery after behavioral treatment in Parkinson disease. *J Commun Disord* 43(4): 319-326. DOI: 10.1016/j.jcomdis.2010.04.004
- Davis, C. M., Roma, P. G. i Hienz, R. D. (2016) The Rodent Psychomotor Vigilance Test (rPVT): A Method for Assessing Neurobehavioral Performance in Rats and Mice. *J Vis Exp*(118). DOI: 10.3791/54629
- Dunnett, S. B. i Brasted, P. J. (2001) An operant analysis of fronto-striatal function in the rat. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. J. J. E. Buccafusco, CRC Press LLC: 201-230.
- Friedel, J. E., DeHart, W. B. i Odum, A. L. (2017) The effects of 100 dB 1-kHz and 22-kHz tones as punishers on lever pressing in rats. *J Exp Anal Behav* 107(3): 354-368. DOI: 10.1002/jeab.254
- Hady, A. E., Takahashi, D., Sun, R., Boyd-Meredith, T., Zhang, Y., Charles, A. S. i Brody, C. D. (2022) Chronic brain functional ultrasound imaging in freely moving rodents performing cognitive tasks. *bioRxiv*: 2022.2001.2029.478327. DOI: 10.1101/2022.01.29.478327
- Heiderstadt, K. M., McLaughlin, R. M., Wright, D. C., Walker, S. E. i Gomez-Sanchez, C. E. (2000) The effect of chronic food and water restriction on open-field behaviour and serum corticosterone levels in rats. *Lab Anim* 34(1): 20-28. DOI: 10.1258/002367700780578028
- Holfoth, D. P., Neilans, E. G. i Dent, M. L. (2014) Discrimination of partial from whole ultrasonic vocalizations using a go/no-go task in mice. *J Acoust Soc Am* 136(6): 3401. DOI: 10.1121/1.4900564
- Hori, M., Shimoju, R., Tokunaga, R., Ohkubo, M., Miyabe, S., Ohnishi, J., Murakami, K. i Kurosawa, M. (2013) Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. *Neuroreport* 24(5): 241-245. DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835edbf
- Johnson, A. M., Ciucci, M. R. i Connor, N. P. (2013) Vocal training mitigates age-related changes within the vocal mechanism in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(12): 1458-1468. DOI: 10.1093/gerona/glt044
- Johnson, A. M., Doll, E. J., Grant, L. M., Ringel, L., Shier, J. N. i Ciucci, M. R. (2011) Targeted training of ultrasonic vocalizations in aged and Parkinsonian rats. *J Vis Exp*(54). DOI: 10.3791/2835
- Johnson, A. M., Lenell, C., Severa, E., Rudisch, D. M., Morrison, R. A. i Shembel, A. C. (2022) Semi-Automated Training of Rat Ultrasonic Vocalizations. *Front Behav Neurosci* 16: 826550. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.826550

Kaltwasser, M. T. (1990) Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiol Behav* 48(1): 13-17. DOI: 10.1016/0031-9384(90)90253-z

Kaltwasser, M. T. (1991) Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety? *Behav Brain Res* 43(2): 133-137. DOI: 10.1016/s0166-4328(05)80063-4

Karwicka, W., Wiatrowska, M., Kondrakiewicz, K., Knapska, E., Kurska, M. B. i Hamed, A. (2021) Relaying Aversive Ultrasonic Alarm Calls Depends on Previous Experience. Empathy, Social Buffering, or Panic? *Brain Sci* 11(6). DOI: 10.3390/brainsci11060759

Kelm-Nelson, C. A., Brauer, A. F. i Ciucci, M. R. (2016) Vocal training, levodopa, and environment effects on ultrasonic vocalizations in a rat neurotoxin model of Parkinson disease. *Behav Brain Res* 307: 54-64. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.03.006

Kisko, T. M., Wohr, M., Pellis, V. C. i Pellis, S. M. (2017) From Play to Aggression: High-Frequency 50-kHz Ultrasonic Vocalizations as Play and Appeasement Signals in Rats. *Curr Top Behav Neurosci* 30: 91-108. DOI: 10.1007/7854\_2015\_432

Knutson, B., Burgdorf, J. i Panksepp, J. (1998) Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 112(1): 65-73. DOI: 10.1037/0735-7036.112.1.65

Knutson, B., Burgdorf, J. i Panksepp, J. (2002) Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull* 128(6): 961-977. DOI: 10.1037/0033-2909.128.6.961

Lenell, C., Newkirk, B. i Johnson, A. M. (2019) Laryngeal Neuromuscular Response to Short- and Long-Term Vocalization Training in Young Male Rats. *J Speech Lang Hear Res* 62(2): 247-256. DOI: 10.1044/2018\_JSLHR-S-18-0316

Lopuch, S. i Popik, P. (2011) Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *J Comp Psychol* 125(2): 250-253. DOI: 10.1037/a0021532

MacDonald T., B. S. M. (2018) Ultrasonic Vocalizations, Their Recording, and Bioacoustic Analysis. Amsterdam, Academic Press,

Maier, E. Y., Abdalla, M., Ahrens, A. M., Schallert, T. i Duvauchelle, C. L. (2012) The missing variable: ultrasonic vocalizations reveal hidden sensitization and tolerance-like effects during long-term cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 219(4): 1141-1152. DOI: 10.1007/s00213-011-2445-7

McGinnis, M. Y. i Vakulenko, M. (2003) Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiol Behav* 80(1): 81-88. DOI: 10.1016/s0031-9384(03)00227-0

Michon, F., Sun, J. J., Kim, C. Y. i Kloosterman, F. (2020) A Dual Reward-Place Association Task to Study the Preferential Retention of Relevant Memories in Rats. *Front Behav Neurosci* 14: 69. DOI: 10.3389/fnbeh.2020.00069

Miller, S. i Konorski, J. (1928) Sur une forme particulière des réflexes conditionnels. *Compt Rend Séanc Soc Biol* 99: 1155-1157.

- Miller, S. i Konorski, J. (1969) On a particular form of conditioned reflex. *J Exp Anal Behav* 12(1): 187-189. DOI: 10.1901/jeab.1969.12-187
- Natusch, C. i Schwarting, R. K. (2010) Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol Biochem Behav* 96(3): 251-259. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.05.013
- Neilans, E. G., Holfoth, D. P., Radziwon, K. E., Portfors, C. V. i Dent, M. L. (2014) Discrimination of ultrasonic vocalizations by CBA/CAJ mice (*Mus musculus*) is related to spectrotemporal dissimilarity of vocalizations. *PLoS One* 9(1): e85405. DOI: 10.1371/journal.pone.0085405
- Olszyński, K. H., Polowy, R., Maż, M., Boguszewski, P. M. i Filipkowski, R. K. (2020) Playback of Alarm and Appetitive Calls Differentially Impacts Vocal, Heart-Rate, and Motor Response in Rats. *iScience* 23(10): 101577. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101577
- Olszyński, K. H., Polowy, R., Wardak, A. D., Grymanowska, A. W. i Filipkowski, R. K. (2021) Increased Vocalization of Rats in Response to Ultrasonic Playback as a Sign of Hypervigilance Following Fear Conditioning. *Brain Sci* 11(8). DOI: 10.3390/brainsci11080970
- Olszyński, K. H., Polowy, R., Wardak, A. D., Łaska, I. A., Grymanowska, A. W., Puławski, W., Gawryś, O., Koliński, M. i Filipkowski, R. K. (2023) Rats emit aversive 44-kHz ultrasonic vocalizations during prolonged Pavlovian fear conditioning. *bioRxiv*: 2023.2004.2006.535936. DOI: 10.1101/2023.04.06.535936
- Panksepp, J. (2007) Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: modeling primal human laughter in laboratory rats. *Behav Brain Res* 182(2): 231-244. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.02.015
- Panksepp, J. i Burgdorf, J. (2000) 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* 115(1): 25-38. DOI: 10.1016/S0166-4328(00)00238-2
- Panksepp, J. i Burgdorf, J. (2003) "Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 79(3): 533-547. DOI: 10.1016/S0031-9384(03)00159-8
- Panksepp, J., Burgdorf, J., Beinfeld, M. C., Kroes, R. A. i Moskal, J. R. (2004) Regional brain cholecystokinin changes as a function of friendly and aggressive social interactions in rats. *Brain Res* 1025(1-2): 75-84. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.07.076
- Papageorgi, I. (2018) Shaping. *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*. T. K. Shackelford i V. A. Weekes-Shackelford. Cham, Springer International Publishing: 1-3.
- Pavlov, I. P. i Anrep, G. V. (1928) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*, Oxford University Press: Humphrey Milford, 1-67.
- Pertsov, S. S., Koplik, E. V., Karkishchenko, N. N. i Sudakov, K. V. (2012) Ultrasonic vocalization of rats in various motivational and emotional states. *Bull Exp Biol Med* 153(6): 804-807. DOI: 10.1007/s10517-012-1831-4
- Portfors, C. V. (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46(1): 28-34.

- Riede, T., Schaefer, C. i Stein, A. (2020) Role of deep breaths in ultrasonic vocal production of Sprague-Dawley rats. *J Neurophysiol* 123(3): 966-979. DOI: 10.1152/jn.00590.2019
- Robakiewicz, I., Polak, M., Rawska, M., Alberski, D., Polowy, R., Wytrychiewicz, K., Syperek, M., Matysiak, J. i Filipkowski, R. K. (2019) Stimulus-seeking in rats is accompanied by increased cFos expression in hippocampal CA1 as well as short 22 kHz and flat 50 kHz calls. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 79(3): 309-317.
- Rossi, N. A. i Reid, L. D. (1976) Affective States Associated with Morphine Injections. *Physiological Psychology* 4(3): 269-274.
- Rostron, C. L., Gaeta, V., Brace, L. R. i Dommett, E. J. (2017) Instrumental conditioning for food reinforcement in the spontaneously hypertensive rat model of attention deficit hyperactivity disorder. *BMC Res Notes* 10(1): 525. DOI: 10.1186/s13104-017-2857-5
- Sadowski, B. (2012) *Uczenie się i warunkowanie. Biologiczne mechanizmy zachowania się ludzi i zwierząt.* Warszawa, Wydawnictwo naukowe PWN: 466-491.
- Saito, Y., Tachibana, R. O. i Okanoya, K. (2019) Acoustical cues for perception of emotional vocalizations in rats. *Sci Rep* 9(1): 10539. DOI: 10.1038/s41598-019-46907-0
- Saito, Y., Yuki, S., Seki, Y., Kagawa, H. i Okanoya, K. (2016) Cognitive bias in rats evoked by ultrasonic vocalizations suggests emotional contagion. *Behav Processes* 132: 5-11. DOI: 10.1016/j.beproc.2016.08.005
- Schindler, C. W., Thorndike, E. B. i Goldberg, S. R. (1993) Acquisition of a Nose-Poke Response in Rats as an Operant. *Bulletin of the Psychonomic Society* 31(4): 291-294.
- Schwarting, R. K., Jegan, N. i Wöhr, M. (2007) Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 182(2): 208-222. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.01.029
- Schweinfurth, M. K. (2020) The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Elife* 9. DOI: 10.7554/eLife.54020
- Shembel, A. C., Lenell, C., Chen, S. i Johnson, A. M. (2021) Effects of Vocal Training on Thyroarytenoid Muscle Neuromuscular Junctions and Myofibers in Young and Older Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76(2): 244-252. DOI: 10.1093/gerona/glaa173
- Skinner, B. F. (1938) *The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis*, Appleton-Century, 3-115.
- Skinner, B. F. (1953) *Shaping and maintaining operant behavior. Science and human behavior.* New York, Macmillan: 91-106.
- Skinner, B. F. (1961) *The Experimental Analysis of Behavior. Cumulative record (enlarged ed.):* 142-152.
- Skinner, B. F. (1961) *How to Teach Animals. Cumulative record (enlarged ed.).* 412-419.
- Skinner, B. F. (1962) Operandum. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 5(2): 224-224. DOI: 10.1901/jeab.1962.5-224

- Takahashi, N., Kashino, M. i Hironaka, N. (2010) Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. *PLoS One* 5(11): e14115. DOI: 10.1371/journal.pone.0014115
- Templer, V. L., Wise, T. B., Dayaw, K. I. T. i Dayaw, J. N. T. (2018) Nonsocially housed rats (*Ratus norvegicus*) seek social interactions and social novelty more than socially housed counterparts. *J Comp Psychol* 132(3): 240-252. DOI: 10.1037/com0000112
- Thomas, D. A., Takahashi, L. K. i Barfield, R. J. (1983) Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 97(3): 201-206.
- Thompson, B., Leonard, K. C. i Brudzynski, S. M. (2006) Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behav Brain Res* 168(1): 64-73. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.10.012
- Thorndike, E. L. (1898) The mental fact in association. *Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals*. New York The Macmillan company: 65-77.
- van der Spoel, E., Choi, J., Roelfsema, F., Cessie, S. I., van Heemst, D. i Dekkers, O. M. (2019) Comparing Methods for Measurement Error Detection in Serial 24-h Hormonal Data. *Journal of Biological Rhythms* 34(4): 347-363. DOI: 10.1177/0748730419850917
- Vielle, C., Montanari, C., Pelloux, Y. i Baunez, C. (2021) Evidence for a vocal signature in the rat and its reinforcing effects: a key role for the subthalamic nucleus. *Proc Biol Sci* 288(1965): 20212260. DOI: 10.1098/rspb.2021.2260
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U. i Barfield, R. J. (1990) Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 104(3): 255-262. DOI: 10.1037/0735-7036.104.3.255
- Will, B. (1974) Development of Strategies Utilized by Albino-Rats in Operant-Conditioning. *Animal Behaviour* 22(May): 370-375. DOI: Doi 10.1016/S0003-3472(74)80033-3
- Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M. J., Hart, A. S., Hollon, N. G., Phillips, P. E., Schwarting, R. K. i Wöhr, M. (2014) Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *J Neurosci* 34(32): 10616-10623. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1060-14.2014
- Wintink, A. J. i Brudzynski, S. M. (2001) The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70(2-3): 317-323. DOI: 10.1016/s0091-3057(01)00615-3
- Wöhr, M., Borta, A. i Schwarting, R. K. (2005) Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 84(3): 228-240. DOI: 10.1016/j.nlm.2005.07.004
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. i Spruijt, B. (2008) Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav* 93(4-5): 766-776. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.11.031

Wöhr, M. i Schwarting, R. K. (2007) Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One* 2(12): e1365. DOI: 10.1371/journal.pone.0001365

Wright, J. M., Gourdon, J. C. i Clarke, P. B. (2010) Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl)* 211(1): 1-13. DOI: 10.1007/s00213-010-1859-y

Yawata, Y., Makino, K. i Ikegaya, Y. (2018) Answering hastily retards learning. *PLoS One* 13(4): e0195404. DOI: 10.1371/journal.pone.0195404

Zimbardo, P. G. (2005) *Uczenie się i analiza zachowania*. Psychologia i życie. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN: 224-266.