

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Tomáš Petr

**Pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti laboratorních potkanů
s odlišnou raně ontogenetickou zkušeností se sociální hrou**

Locomotor, emotional and cognitive skills of laboratory Norway rats
with different early ontogenetic experience with social play

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Marek Špinka, CSc.

Konzultantky práce:

RNDr. et PhDr. Tereza Nekovářová, Ph.D.

RNDr. Eva Landová, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl moc poděkovat svému školiteli docentu Marku Špinkovi za neobyčejně laskavý osobní přístup a také za to, že mi umožnil podílet se na tomto zajímavém výzkumu a připravil mi ideální studijní podmínky, díky nimž jsem se mohl výzkumu věnovat skutečně naplno. Také jsem mu moc vděčný za pomoc s vyhodnocením a interpretací dat. Dále bych chtěl poděkovat oběma svým konzultantkám: doktorce Tereze Nekovářové za milý osobní přístup i za její značnou časovou investici v sestavování pilotních pokusů. Doktorce Evě Landové děkuji za možnost konzultovat některé výstupy z behaviorálních testů.

Jsem velice vděčný oběma svým rodičům, že mi umožnili studovat obor, o který jsem měl vždy velký zájem, přestože k němu nevedla přímá cesta. Děkuji své přítelkyni Kláře za to, že mi byla během několika dosavadních let studia velkou oporou.

Na závěr bych chtěl vyjádřit svůj dík všem zúčastněným laboratorním potkanům. Jednak za to, že pomohli rozšířit vědecké poznání o sociální hře a také za to, že mi umožnili bezprostředně poznat o jak inteligentní a citlivá zvířata se jedná.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 4. 2022

.....

Bc. Tomáš Petr

Abstrakt

V současném výzkumu hravého chování u zvířat dosud nebylo spolehlivě empiricky testováno, zdali experimentální omezení hry v kritické fázi ontogeneze bude mít negativní vliv na pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti v pozdější fázi vývoje jedince. V této diplomové práci se snažíme oddělit vliv kinematického a sociálního omezení herní zkušenosti tím, že mezi sebou porovnáváme tři skupiny laboratorních potkanů Long-Evans s různými manipulacemi (treatmenty). Ty spočívaly v tom, že laboratorní potkani byli vystaveni odlišné herní zkušenosti mezi 24. a 66. postnatálním dnem. Všem potkanům samcům byla v tomto raném období ontogeneze umožněna sociální hra na jednu hodinu denně. Dle příslušného treatmentu bylo laboratorním potkanům buďto modifikováno herní prostředí, anebo byla hra redukována sociálně méně hravým partnerem. V treatmentu s plnou hrou byla fokálnímu laboratornímu potkanovi plemene Long-Evans umožněna sociální hra v plném pohybovém rozsahu celé herní arény a hra byla umožněna pokaždé s tím samým partnerem totožného plemene Long-Evans. Toto párové uspořádání pro hru bylo shodné i v treatmentu s pohybově omezenou hrou, ovšem prostor pro hru byl omezen radikálním snížením stropu herní arény do té míry, aby u této skupiny byly znemožněny jakékoliv třírozměrné (3D), tedy vertikální prvky hry. V sociálně omezeném treatmentu pro hru byla fokálnímu laboratornímu potkanovi plemene Long-Evans umožněna hra v plném pohybovém rozsahu celé herní arény, ovšem hra byla omezena tím, že fokální laboratorní potkan Long-Evans byl vystaven partnerovi méně hravého plemene Fischer 344. Takto ovlivněné treatmenty laboratorních potkanů byly poté mezi 43. a 66. postnatálním dnem testovány prostřednictvím baterie behaviorálních testů. Cílem práce bylo zjistit, zda a jak kinematické a sociální omezení hry v kritickém období mezi odstavem a dospíváním ovlivní emoční, kognitivní a lokomoční dovednosti laboratorních potkanů Long-Evans. Testovány byly tři hypotézy: H1 – omezení hry zvýší anxieta laboratorních potkanů a sníží jejich exploraci v testech *Open field* a *Elevated plus maze*; H2 – omezení hry zhorší paměť a schopnost učení u laboratorních potkanů v testu *Novel object recognition* a testu kognitivní flexibility v Y-bludišti; H3 – omezení hry zhorší lokomoční schopnosti laboratorních potkanů v motorických úlohách náročných na udržení rovnováhy: *Beam walking test*, *Rope maintenance test* a *Inclined plane test*. Výsledky behaviorálních testů nakonec nepotvrdily platnost ani jedné z uvedených hypotéz. Nepodařilo se prokázat, že by námi provedené sociální a pohybové omezení sociální hry v pro hru kritické fázi ontogeneze laboratorních potkanů *Rattus norvegicus* mělo významný negativní vliv na jejich pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti v pozdější fázi ontogeneze. Tyto výsledky tak zpochybňují některé ve vědecké literatuře široce sdílené domněnky o funkci sociální hry u potkanů.

Klíčová slova: hravé chování, sociální hra, Open field test, Elevated plus maze test, Novel object recognition test, Y-maze test, Beam walking test, Rope maintenance test, Inclined plane test

Abstract

In the contemporary research of playful behavior in animals, it has not yet been reliably tested whether the experimental limitations of play in the critical phase of ontogenesis will have a negative effect on motor, emotional and cognitive skills in the later stages of an individual's development. In this thesis, we try to separate the influence of kinematic and social limitations of play experience by comparing three treatments of Long-Evans laboratory rats, in which rats were exposed to different play experience in the period between the 24th and 66th postnatal day. In this early period of ontogenesis, all male rats were allowed to play for one hour a day. According to the treatment, it was either modified the rats' play environment or the play was reduced by a socially less playful partner. In full-play treatment, the Long-Evans focal laboratory rat was allowed to play in the full extent of movement in the entire environment of a play arena. The play was enabled throughout the whole experiment with a partner of same Long-Evans strain. The same strain paired arrangement for the play was present in the second treatment with kinematically-reduced play, however the space for the play behavior was limited by a radical lowering of a ceiling of the play arena to such an extent that any three-dimensional (3D) elements of the play were disabled in this group. In the third treatment, the Long-Evans focal rat was allowed to play in the full range of the entire play arena, but the play was reduced by exposing the Long-Evans focal rat to a less playful Fischer 344 partner. These three diversely impacted treatments of Long-Evans laboratory rats were then tested between a 43rd and 66th postnatal day using a battery of behavioral tests. The aim of the study was to determine whether and how the kinematic and social limitations of the social play in its critical period between weaning and adolescence affect the emotional, cognitive and locomotor skills of laboratory Norway rats. Three hypotheses were tested: H1 – limitation of social play will increase the anxiety of rats and reduce their exploration in the Open field and Elevated plus maze tests; H2 – limitation of social play will impair memory and learning ability in rats in the Novel object recognition test and the cognitive flexibility test in the Y-maze maze; H3 – limitation of social play will worsen the locomotor abilities of laboratory rats in tasks demanding maintaining the balance in three locomotor tests: Beam walking test, Rope maintenance test and Inclined plane test. In conclusion, the results of behavioral tests have not confirmed the validity of any of these hypotheses. We were not successful to prove that the social and kinematic limitations of social play performed in the play-critical phase of ontogenesis of rats *Rattus norvegicus* would have a significant negative effect on their kinematic, emotional and cognitive skills in the later ontogeny. These results thus question some of the widely shared scientific assumptions about the function of social play in rats.

Key words: play behavior, social play, Open field test, Elevated plus maze test, Novel object recognition test, Y-maze test, Beam walking test, Rope maintenance test, Inclined plane test

OBSAH

Úvod	7
1 Východiska pro studium hravého chování	8
1.1. Hra v biologii	9
1.1.1. Sociální hra u potkanů	10
1.2. Jaké druhy zvířat jsou hravé?	13
1.2.1. Adaptivní význam hry	14
1.3. Funkce hry.....	15
1.3.1. Hypotéza nadbytku zdrojů.....	15
1.3.2. Hypotéza přebytku energie	16
1.3.3. Hypotéza nácviku pohybových dovedností	16
1.3.4. Hypotéza vlastního ohodnocení.....	17
1.3.5. Hypotéza tréninku na neočekávané	17
1.4. Manipulace se hrou během ontogeneze	20
1.4.1. Herní deprivace	20
2 Cíle a design pokusu.....	22
3 Metodika	25
3.1. Open field test	26
3.2. Elevated plus maze test	28
3.3. Novel object recognition test.....	30
3.4. Y-maze – test kognitivní flexibility	33
3.5. Beam walking test	37
3.6. Rope maintenance test	39
3.7. Inclined plane test.....	41

4 Vyhodnocení a výsledky.....	44
4.1. Open field test	44
4.1.1. Vyhodnocení explorace	46
4.1.2. Vyhodnocení anxiety.....	47
4.2. Elevated plus maze test	48
4.2.1. Vyhodnocení explorace	50
4.2.2. Vyhodnocení anxiety.....	51
4.3. Novel object recognition test.....	53
4.3.1. Vyhodnocení explorace	55
4.3.2. Vyhodnocení kognice	56
4.4. Y-maze – test kognitivní flexibility	57
4.4.1. Vyhodnocení kognice	58
4.5. Beam walking test	60
4.5.1. Vyhodnocení motoriky	62
4.6. Rope maintenance test	67
4.6.1. Vyhodnocení motoriky	69
4.7. Inclined plane test.....	74
4.7.1. Vyhodnocení motoriky	75
Diskuse	77
Závěr	83
Seznam použité literatury.....	84
Přílohy.....	91

Úvod

Současný výzkum hravého chování u zvířat je postaven na poměrně silném teoretickém základu, který tvrdí, že provádění hry v rané fázi ontogeneze bude zvířeti přinášet určité krátkodobé nebo dlouhodobé výhody, jež zvíře upotřebí v dynamicky proměnlivém fyzickém i sociálním prostředí (Fagen, 1981; Špinka et al., 2001, Burghardt, 2005). Navzdory poměrně robustnímu teoretickému a popisnému ukotvení tohoto jevu, dosud nebylo publikováno příliš mnoho experimentálních studií, v nichž by na jakémkoliv zvířecím druhu byly testovány predikce o dlouhodobých vývojových benefitech hry – především z pohybové, emocionální a kognitivní domény – tím, že by byla v rané fázi ontogeneze omezena, nikoliv znemožněna, herní zkušenost.

V této diplomové práci se proto snažíme současné poznání o funkcích hry doplnit tím, že prostřednictvím originálního designu experimentu testujeme dříve publikované predikce o funkci hry. Tyto predikce jsou součástí několika ucelených teorií o funkci hry, např. teorii o motorickém tréninku (Byers & Walker, 1995), teorii hry jako tréninku na neočekávané (Špinka, Newberry & Bekoff, 2001) a teorii o třístupňové evoluci hry (Burghardt, 2005). Předpokládáme, že provádění hry v kritické fázi ontogeneze zlepšuje pozdější pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti u těch druhů zvířat, u nichž je komplexní sociální hra přítomna. Jako modelový živočich pro testování těchto predikcí byl zvolen laboratorní potkan *Rattus norvegicus* plemene Long-Evans.

V designu našeho experimentu byla sociální hra samcům laboratorních potkanů Long-Evans umožněna na jednu hodinu denně v samostatných herních arénách. Dle omezení herní zkušenosti byli laboratorní potkani Long-Evans rozděleni do třech treatmentů. V treatmentu s plnou herní zkušeností byl fokální laboratorní potkan plemene Long-Evans vystaven partnerovi téhož plemene. Prostor pro hru byl vymezen v rozsahu celé herní arény. V treatmentu s kinematicky omezenou herní zkušeností byl fokální laboratorní potkan plemene Long-Evans také vystaven partnerovi téhož plemene, ovšem herní aréna byla redukována sníženým stropem. Byly tak umožněny pouze 2D prvky hry, tzn. rotace při hře byla umožněna pouze po horizontální ose těla. Ve třetím treatmentu sociálně redukované hry byl fokální laboratorní potkan plemene Long-Evans vystaven partnerovi méně hravého plemene Fischer 344. Prostor pro hru byl znovu v rozsahu celé herní arény. Předpokládali jsme, že během hodinové interakce těchto dvou odlišných laboratorních plemen bude docházet k sociální hře s menší četností a herní projevy budou tímto méně hravým partnerem celkově redukovány (Siviy, 2018).

Cílem práce bylo následně zjistit, zda a jak sociální a kinematické omezení hry v kritickém období mezi odstavem a dospíváním ovlivní emoční, kognitivní a lokomoční dovednosti laboratorních potkanů Long-Evans. Testovány byly tři hypotézy: H1 – omezení hry zvýší anxiету laboratorních potkanů a sníží jejich exploraci v testech *Open field* a *Elevated plus maze*; H2 – omezení hry zhorší paměť a schopnost učení u laboratorních potkanů v testu *Novel object recognition* a testu kognitivní flexibility v Y-bludišti; H3 – omezení hry zhorší lokomoční schopnosti laboratorních potkanů v úlohách náročných na udržení rovnováhy motorických testů *Beam walking*, *Rope maintenance* a *Inclined plane*.

Kapitola 1

Východiska pro studium hravého chování

Pokud bychom se zeptali náhodného dospělého člověka, zdali někdy v životě byl svědkem – ať už bezprostředně či z virtuálních médií – hry jednoho nebo dvou zvířat, dalo by se jen obtížně předpokládat, že takový člověk odpoví záporně. A pokud by se skutečně stalo, že by nikdy v životě žádné hry u zvířat svědkem nebyl, předpokládali bychom nejspíš, že takový člověk musel být přinejmenším během své socializace součástí nepřeborného množství dětských – tedy výhradně lidských her. Skrze všudypřítomnost a nepřebornou variabilitu forem her v savčí říši, jíž jsme jako lidé integrální součástí, by tedy pravděpodobně takový člověk termínu hra v biologickém významu slova intuitivně porozuměl. Ovšem, jak zdařile by tento projev chování dokázal popsat, natož odborně definovat?

Jelikož si s vědeckým pojetím fenoménu biologické hry lámou etologové a behaviorální vědci hlavu již přes více než sto let, podařilo se za tu dobu syntetizovat odlišně úspěšné myšlenkové koncepty a teorie, které nám mohou pomoci heterogenní projevy hry v živočišné říši zodpovědět pomocí Tinbergenových čtyř příčin pro vysvětlení určitého chování. Prostřednictvím proximální příčiny hry se ptáme, jaké neurální a hormonální mechanismy stojí za motivací věnovat se provádění hry. Ontogenetická příčina zkoumá, v jakém období životního vývoje příslušného živočišného druhu provádění hry vrcholí a je pro budoucí vývoj nejdůležitější. Fylogenetická příčina nám může osvětlit, proč hra vznikla a udržela se ve fylogenezi mnoha živočišných druhů a v konečném důsledku odpovědět na otázku, proč se mohlo vyplatit zvířecímu druhu jednou se v evoluci hravým stát a již se hravým udržet. A nakonec, prostřednictvím ultimálních hledisek hry se ptáme, k jakému účelu zvířeti v jeho vlastní ontogenezi hra a její projevy slouží a z jakého důvodu do ní zvíře investuje nemalé množství energie, přestože by ho mohlo věnovat kterémukoliv z “vážnějších” a z hlediska pozorovatele účelnějších druhů chování – jako je např. lov, grooming, sexuální a agonistické chování a jiné. V této kapitole budou výše zmíněné příčiny hravého chování rozebrány se zaměřením na modelový živočišný druh pro savčí hru, laboratorního potkana *Rattus norvegicus*.

1.1. Hra v biologii

Při rozsáhlém výskytu hravého chování napříč škálou velice často i nepříbuzných taxonů (Pellis, Burghardt, Palagi, & Mangel, 2015), bylo třeba nalézt takovou definici hry, jež by obsáhla společný jmenovatel behaviorálních projevů, které hru spoluvytvářejí a dělají ji nezaměnitelnou oproti ostatním komplexním projevům chování pozorovatelných v živočišné říši.

O takovou koncepci se na přelomu nového tisíciletí pokusil americký etolog Gordon Burghardt (2005). Aby zvířecí chování mohlo být klasifikováno jako hra, mělo by splňovat následujících pět kritérií: (1) jeho chování se jeví jako zcela bezúčelné v kontextu, v němž je pozorováno; (2) herní aktivita je spontánní, emotivně příjemná, odměňující, nejčastěji dobrovolná; (3) liší se od seriózního typu chování, buďto přímo svou nespecifickou formou projevu nebo ontogenetickým načasováním (např. do juvenilní periody vývoje organismu); (4) hra je neustále opakovaná, nikoliv ale ve stereotypním slova smyslu; (5) pokud je zvíře vystaveno závažnému stresu, hra není v takové situaci inicializována.

Hravé chování je obecně děleno do třech primárních kategorií: (1) samostatná pohybově-rotací hra; (2) hra s objektem; a (3) sociální hra (Fagen, 1981). Při samostatně prováděné pohybově-rotací hře zvíře provádí různé pohyby, které často napodobují, ovšem jakoby přehánějí normální úmyslné pohyby, anebo jde o pohyby vyskytující se pouze při hře. Příkladem mohou být vytočené energické pohyby u kopytníků (s vykopnutím zadních nohou do strany) či kotouly a přemety u opic (Müller-Schwarze, 1984; Sommer & Mendoza-Granados, 1995, Petru et al., 2009). Byers (1984) předpokládá, že tento typ hry by mohl být vývojově nejpůvodnější.

Samostatná nebo skupinová hra s objektem (Tanner & Byrne, 2010) obnáší manipulaci zvířete s neživým objektem. Předpokládá se, že tato herní kategorie je obzvláště významná pro ty zvířecí druhy, jež si prostřednictvím hry mohou nacvičovat své lovecké dovednosti (Biben, 1979), tedy především šelmy. Také může být velice pravděpodobné, že hra s objektem může být vývojovým prekursorem pro komplexní a kognitivně flexibilní používání nástrojů v živočišné říši (Graham & Burghardt, 2010).

Za nejvíce prostudovanou kategorií hravého chování je považována sociální hra. Na rozdíl od předchozích dvou kategorií, sociální hra vždy nutně začleňuje dva nebo více účastníků, kteří jsou zpravidla, ale nikoliv vždy, totožného biologického druhu (Graham & Burghardt, 2010). Mezi nejtypičtější behaviorální projevy sociální hry patří hra na honěnou a zápasení s rychlými změnami dominantních rolí účastníků (Panksepp, Siviy, & Normansell, 1984).

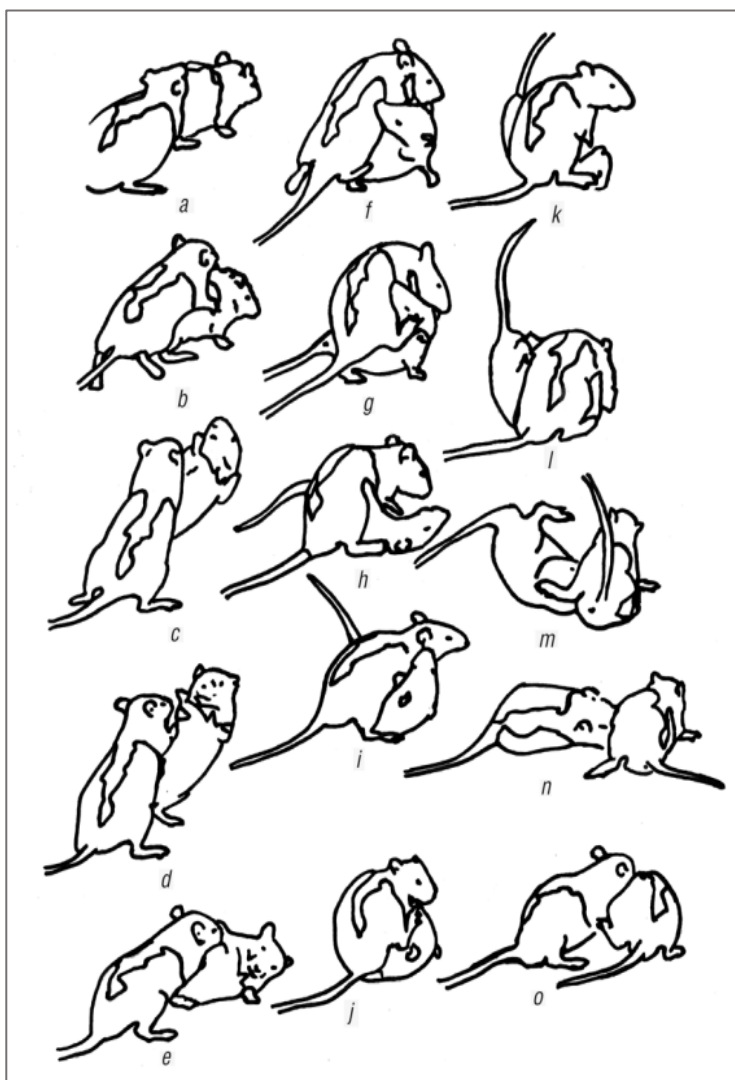
Povaha sociální hry vyžaduje jakousi sladěnost obou účastníků v herních tazích kvůli velice rychlému sledu různých okolností, které do hry vstupují a jsou při hře generovány dynamicky. Aby hra běžela v rámci pravidel, všichni její účastníci musejí umět vnímat a vyhodnocovat herní vizuální i vokální signály (Winkler & Bryant, 2021). Tyto signály jsou druhově specifické a dávají jasně najevo, že hra stále běží. Díky tomu je rámec vymezující hru udržovaný v patřičných mezích, a je zabráněno možnému nežádoucímu *vážnému* chování, jako je např. přechod z hry v agonistický střet.

1.1.1. Sociální hra u potkanů

Projevem sociální hry u potkanů *Rattus norvegicus* je zvláštní typ zápasení (anglicky rough-and-tumble). Má se za to, že tento herní projev je nejvíce prostudovaným typem sociální hry vůbec (Pellis & Pellis, 2009). Rough-and-tumble u potkanů je dynamická forma sociální hry založená na specifické sekvenci pohybových manévřů obou partnerů. V prvním kroku se iniciátor hry snaží získat přístup k zátylku svého herního partnera a přitisknout se v tomto místě svým rostrem. Obvyklou následnou sekvenci herních prvků ilustruje Obr.1 níže.

Obr. 1: Průběh sociální hry u potkana obecného *Rattus norvegicus*

Obrázek 1 (překlad a přepis z článku Pellis, Pellis, & Bell, 2010, str. 283). Dva juvenilní potkaní samci, 35 dnů staří, jsou účastníky sociální hry, při které soupeří o to, který z nich získá přístup k zátylku svého herního partnera. Potkan nalevo iniciuje hru tím, že se ke svému partnerovi přiblíží zezadu (a) s cílem přichytit se k jeho zátylku (b). Bezprostředně před tím, než ke kontaktu v tom místě dojde, se obránce otočí po longitudinální ose svého těla (c), aby byl vystaven iniciátorovi hry čelně (d). Iniciátor hry pokračuje pohybem kupředu a tlačí obránce k ulehnutí nejdříve na stranu (e) a poté na záda, kde se znovu snaží dosáhnout protivníkova týlu (f a h). V poloze na zádech se obránce snaží iniciátorovi oplatit a také



útočit na partnerův zátylek (i), ale je blokován iniciátorovou zadní nohou (j a k). Po dalším pokusu o získání přístupu k partnerovu týlu je iniciující horní potkan setřesen (l a m), což umožňuje původnímu obránci postavit se na vlastní nohy (n) a provedení protiútok (o).

První projevy hravého chování se u potkanů začínají objevovat v období před odstavením, okolo třetího týdne po narození (Pellis & Pellis, 1997) a jejich četnost a intenzita vrcholí zhruba uprostřed juvenilního období, tzn. třicet až čtyřicet dní po narození (Thor & Holloway, 1984). Hra ovšem pokračuje až do dospělosti (Pellis & Pellis, 1987, 1990). Je pozorováno, že parametr, který se s věkem mění nepřímou úměrou, je frekvence herních iniciací. Zato proporce defenzivních odpovědí nikoliv (Pellis et al., 2010), ta je ustálena v celé ontogenezi přibližně na hodnotě 80 procent (Pellis & Pellis, 1990, 1991a, 1997; Thor & Holloway, 1983 as cited in Pellis et al., 2010). To jinými slovy znamená, že v průměru z pěti pokusů o iniciaci hry se čtyři úspěšně rozvinou do herní interakce, a to nezávisle na věku potkana. Hra je u potkanů považovaná za obohacující chování pro oba zúčastněné, nezávisle na tom, jestli se jedinec v průběhu hry nachází v dominantní nebo submisivní roli (Burgdorf et al., 2006; Špinka et al., 2001).

Z hlediska pohlavního dimorfismu hry u potkanů jsou považováni za hravější samci (Pellis, 2002) v tom smyslu, že častěji iniciují hru. Co se rovněž liší mezi pohlavími, je způsob používání defenzivních taktik. U samců se během přechodu z puberty do rané dospělosti začínají objevovat drsnější formy hry, kdy se bránící se potkani méně často uchylují k plné rotaci na úkor rotace jen částečné (Pellis, 2002). Ta může přerůst i do obrany ve stoje. Tím si zajišťují lepší manévrovatelnost, což zároveň snižuje odevzdání se iniciátorovi a vytváří lepší pozici pro protiútok. U samic naopak převládá plná rotace během celé jejich ontogeneze.

Jedno z možných vysvětlení přítomného pohlavního dimorfismu v potkaní hře může být naplnění predikce (Špinka, 2001), že častější iniciace hry a její rozmanitější prvky se mohou vyskytovat u toho pohlaví, jež je během svého života častěji vystavováno nepředvídatelným událostem. Ať ty už mají původ ve vnějším proměnlivém prostředí, nebo jsou způsobeny vnitrodruhovými faktory – jako může být např. pohlavně odlišné budování sociální hierarchie nebo soupeření o pohlavní rozmnožování, při kterém mohou být na samce kladeny vyšší nároky kvůli agonistickým střetům s jinými samci z důvodu kompetice o reprodukční úspěch. Byla vyslovena i hypotéza, že sociální hra může podporovat rozvoj samčího sexuálního chování, protože kontakt na týl samice je součástí samčího prekopulačního chování. Dosavadní výzkum ale tuto hypotézu nepodporuje (Pellis et al., 1997).

Předpokládá se, že sociální hra rough-and-tumble je pro potkany spojená s pozitivní motivací a příjemným prožitkem, což bylo prokázáno například podmíněnou preferencí potkanů pro ta místa, kde si dříve měli možnost hrát (Conditioned Place Preference) (Calcagnetti & Schechter, 1992) a doloženou rolí dopaminergních a opioidních nervových drah v regulaci hry (Vanderschuren, Achterberg & Trezza, 2016). Byl také pozorován, tzv. rebound effect, tedy že motivace k provádění hry u potkanů narůstá s tím, jak dlouho byli izolováni od možnosti sociální hry spontánně provádět (Siviy, 2016).

Experimenty, jejichž cílem bylo zjistit, jaká mozková centra jsou do hry zapojena, ukázaly, že potkani chirurgicky zbavení mozkové kůry (Pellis & Pellis, 1992; Panksepp et al., 1994) byli motivováni k provádění hry i nadále. Dekortikace se v herním projevu odrazila „pouze“ v redukci přetáčení na záda, tzv. *pinning*. Tím hra dekortikovaných juvenilních laboratorních

potkanů daleko více připomínala projev rough-and-tumble u dospělých zvířat. Pozdější výzkumy (Bell et al., 2009; Schneider & Koch, 2005) odhalily, že důležitou modulační oblastí mozkové kůry pro hru u potkanů bude mít prefrontální kortex.

Přestože není dosud přesně znám “herní neurální okruh” (Siviy & Panksepp, 2011), výzkumy vlivu podkorových oblastí naznačují, že největší roli v regulaci a motivaci hry sehrávají specifické oblasti bazálních ganglií a limbického systému (Vanderschuren, Achterberg & Trezza, 2016). Významnou roli v modulaci projevů hravého chování má oblast bazálních ganglií zvaná striatum, zejména její ventrální část nazývaná *Nucleus accumbens* (Siviy, 2016). Důležitá role tohoto útvaru pro sociální hru spočívá především v mechanismech odměny a motivace k opakovatelnosti hravého chování. Podstatnou roli v této struktuře hraje především neurotransmitter dopamin – hra je spojena se zvýšením uvolňováním dopaminu (Robinson et al., 2011), a předpokládá se, že pro to, aby ke hře mohlo dojít, musí dopaminergní systém fungovat optimálně (Trezza et al., 2010).

Mezi jednu z podstatných struktur limbického systému, podílející se na hře patří amygdala. Zdá se, že amygdala má vliv na pohlavně odlišné projevy sociální hry (Vanderschuren, Achterberg & Trezza, 2016). Za velmi důležitou mozkovou strukturu pro hravé chování je považován také thalamus, zejména jeho parafascikulární oblast (PFA). Bylo zjištěno, že poškození parafascikulární oblasti thalamu (PFA) má robustní, dlouhotrvající negativní následky v projevu hry (Siviy, 2016).

Z výše uvedeného vyplývá, že na iniciaci a správný průběh sociální hry se podílejí specifické oblasti mozku. V případě mozkové kůry se jedná o prefrontální kortex; z podkorové části jde o oblast bazálních ganglií zvané striatum; a limbického systému, v němž byl zjištěn vliv amygdaly. Významnou roli hraje také v mezimozku umístěná parafascikulární oblast thalamu. Narušení všech těchto struktur výrazně ovlivňuje projevy sociální hry u potkanů.

1.2. Jaké druhy zvířat jsou hravé?

Dokladem pro úvodní argument, že hra je u vývojově vyšších skupin živočichů velmi rozšířený projev chování, kterým stojí za to se zabývat, budiž výčet skupin obratlovců i bezobratlých živočichů, u nichž byla kritéria pro klasifikaci hry (Burghardt, 2005) naplněna. V naprosté většině dokumentovaných případů hry v živočišné taxonomii se dá odvodit, že hravé chování má doménu u homoiotermních obratlovců s vysokým stupněm encefalizace a s relativně dlouhým postnatálním vývojem při stabilní rodičovské péči (Graham & Burghardt, 2010). Hlavním důvodem pro to může být skutečnost, že homoiotermní živočichové těží z vysoce efektivního aerobního metabolismu, jenž jim umožňuje inicializovat a udržet v chodu poměrně energicky náročnou hru s relativně velkým pohybovým rozsahem. To je něco, co u poikilotermních živočichů tradičně není očekáváno.

Většina druhů savců je považovaná za hravé ve svém juvenilním stádiu vývoje (Fagen, 1981), přičemž mezi nejhravější savčí řady jsou tradičně řazeni primáti, hlodavci, masožravci, kopytníci, chobotnatci, kytovci (Graham & Burghardt, 2010) a dvojitozubci (Watson, 2010). Z ptáčích řádů byla hra dokumentována u pěvců – krkavcovitých a pěnicovitých (Diamond & Bond, 2003); dlouhokřídlých (Gamble & Cristol, 2002), papoušků (Diamond & Bond, 2003) a zoborožců (Kemp, 2001). Relativně redukovaný výskyt hry v případě ptáčích řádů oproti těm savcům může být vysvětlený kognitivními nároky pro realizaci hry. Předpokládá se, že výskyt hry napříč taxony pozitivně koreluje s encefalizačním indexem, spíše než s tělesnou hmotností nebo rychlostí metabolismu (Jerison, 1973; Eisenberg, 1981 as cited in Špinka et al., 2001).

Klasickou představu, že hra je výsadou výhradně savců a ptáků s vysokým encefalizačním indexem (e.g. Eisenberg, 1981), nabourávají různé, i když zatím často strohé či anekdotické doklady hry u plazů, obojživelníků, ryb, paryb, a co více, i některých zástupců bezobratlých živočichů. Pro demonstraci přítomnosti hry u plazů lze uvést dokumentovaný případ hry s míčem u želvy druhu *Trionyx triunguis* (Burghardt, 1998). Dále hra byla klasifikována u varanů (*Varanus spp.*), kteří byli rovněž zachyceni při interakci s různými objekty, zde se navíc podařilo natočit přetahovanou o provaz s ošetřovateli (Burghardt, 2015). Hra s objekty byla pozorována rovněž u krokodýlů (Burghardt, 2015). Údajně Burghardtových (2005) pět kritérií pro sociální hru naplňují i pralesní žáby z čeledi Dendrobatidae, pozorované při vzájemném hravém zápasení (Burghardt, 2015). Z čistě vodního prostředí kritéria hry Burghardt (2005) naplnili zástupci ryb z čeledi vrubozubcovití a rypounovití (Burghardt, 2015), z paryb poté žraloci a rejnoci (Burghardt, 2005 as cited in Graham & Burghardt, 2010).

Doklady možného výskytu hry u bezobratlých jsou jistě fantastickým objevem v oblasti studia hravého chování posledních dekád. Ze skupin bezobratlých, kteří naplňují herní kritéria dle Burghardta (2005) padá pozornost na hlavonožce – především přirozeně velice zvědavé chobotnice (Zylinski, 2015). V jejich případě jde o dokumentovanou hru s objektem. Co se týče členovců, hra byla pozorovaná u vos (Dapporto et al., 2006) a pavouků (Pruitt, Burghardt & Riechert, 2012). Nespojité taxonomické výskyt hry u mnohých obratlovců a vybraných zástupců měkkýšů a členovců poukazuje na již těžko zpochybnitelný fakt, že hra musela vzniknout v evoluci několikrát nezávisle na sobě (Pellis et al., 2015).

1.2.1. Adaptivní význam hry

V bodě, kdy jsme nashromáždili doklady o přítomnosti hry u tak široké plejády vývojově odlišných taxonů živočichů se nelze ubránit otázce – proč ke vzniku hravého chování v evoluci opakovaně došlo? Pokrok v poznání, na kterém úspěšné zodpovězení této otázky závisí, je podmíněn zjištěním, zdali praktikování hry zvířeti přináší nějaké okamžité nebo dlouhodobé benefity v jeho životní strategii? V případě, že ano, o jaké se konkrétně jedná?

Lze objektivně předpokládat, že hravé chování je pro zvíře jednak relativně energicky nákladnou záležitostí (Burghardt, 1988), během hry se také snižuje ostražitost, a tak je zvíře náchylnější k predaci (Harcourt, 1991, Špinka et al., 2001). Nadto dle prvního kritéria pro klasifikaci hravého chování (Burghardt, 2005) se hra jeví jako bezúčelná. Poté proto, aby bylo chování adaptivní, musí být naplněn předpoklad, že hravé druhy zvířat z provádění hry nějaký skrytý prospěch získávají (Pellis et al., 2010; Špinka et al., 2001). Vyjádřeno z pohledu evoluční biologie – ti jedinci v populaci stejného živočišného druhu, kteří si hrají, by měli prostřednictvím přirozeného výběru získat reprodukční výhodu nad těmi jedinci, kteří hravými nejsou (Alcock, 2005), případně prováděním sociální hry zvýší svou inkluzivní fitness (Graham & Burghardt, 2010). Pokud k tomu dojde, hra se skrze fyziologické a psychologické změny nakumulované u pozdějších generací daného živočišného druhu nakonec ustálí jako chování s adaptivní hodnotou (Pellis et al., 2010).

Při hledání adaptivní hodnoty hry stojí v cestě dle Pellis et al. (2010) tři obtíže: Za prvé, hravé chování bude nejspíše multifunkcionálního charakteru. To znamená, že ze samotného provádění hry bude plynout pravděpodobně více než jedna adaptivní výhoda. K tomu navíc různé druhy živočichů mohou získávat ze hry odlišné benefity, což dělá mezidruhové srovnání velice komplikovaným.

Za druhé, není úplně snadné odlišit benefity okamžité od těch dlouhodobých, obzvlášť když se do uvažování přidá ještě konkrétní průběh ontogeneze příslušného druhu. Vysvětleno konkrétněji – praktikování hry v dospělosti bude přinášet zvířeti zejména okamžité benefity, zatímco praktikování hry v juvenilním období může mít jak okamžité, tak z neméně významné části i benefity dlouhodobé. Pro zvíře v raném stádiu vývoje bude hra nejspíš sloužit jako příprava na dovednosti, které uzpůsobí později v dospělosti (Špinka et al., 2001; Pellis et al., 2010).

A nakonec za třetí, k hravému chování dochází až tehdy, když jsou všechny důležité potřeby zvířete uspokojeny – ať už jsou to potřeby vázány na okolní prostředí, nebo vycházejí z vnitřních motivací. Hravé chování je tak lepší chápat buď jako určitý typ volnočasové aktivity, která napomáhá vývoji jedince, nebo tento vývoj v různé míře usnadňuje (Martin & Caro, 1985), anebo také jako „příležitostného chování“ (Fraser & Duncan, 1998 as cited in Špinka et al., 2001), čili chování, které sice přináší malý konečný benefit, ale zároveň je prováděno v situacích, kdy náklady na jeho provádění spadnou ještě na nižší úroveň, než je onen benefit samotný.

1.3. Funkce hry

Pokud lze předpokládat, že hravé chování má adaptivní hodnotu, tedy že v evoluci přináší hravému druhu okamžité nebo dlouhodobé benefity, je potřeba jít dále do konkrétních rovin a zodpovědět otázku – O jaké výhody se jedná? V takovém případě se ptáme na funkci hravého chování v různých fázích ontogeneze příslušného druhu živočicha. Zodpovědět funkci hry ovšem není triviální záležitost a uvažování se dostává do formy různých více či méně propracovaných hypotéz.

Nejčastěji uváděné benefity, které zvíře ze hry získává, jsou jednak zlepšené motorické dovednosti, a poté výhody v sociálním a kognitivním vývoji. Popřípadě okamžitý benefit z odměňujícího požitku ze hry (e.g. Emery & Clayton, 2015). Z dosavadních mnoha desítek let výzkumu hravého chování lze za pět nejvýraznějších koncepcí o adaptivní funkci hravého chování (nebo její absenci) v ontogenezi považovat:

- 1) Hypotéza nadbytku zdrojů (Burghardt, 1988)
- 2) Hypotéza přebytku energie (Barber, 1991)
- 3) Hypotéza nácviku pohybových dovedností (Byers, 1998)
- 4) Hypotéza vlastního ohodnocení (Thompson, 1998)
- 5) Hypotéza tréninku na neočekávané (Špinka et al., 2001)

V následujících odstavcích budou tyto hypotézy o funkci hry rozebrány podrobněji. Ze všech pěti konceptů, pouze jeden – Burghardtova (1998) hypotéza nadbytku zdrojů – hru nepovažuje za adaptivní.

1.3.1. Hypotéza nadbytku zdrojů

Model teorie nadbytku zdrojů (Burghardt, 1988) (anglicky *surplus resource theory*) se snaží o vysvětlení poznatku, proč se hra vyskytuje v nejvyšší míře a komplexitě projevů u endotermních živočichů. Model předpokládá, že hra je u těchto skupin živočichů vedlejším efektem jiných specifických fyziologických znaků a příslušných životních strategií (Burghardt, 1988, 1999).

Východiska teorie spočívají v tom, že mladí savci si, na rozdíl od plazů, mohou dovolit hrát, protože disponují aerobním metabolismem. Ten jim umožňuje delší a ráznější herní aktivitu. K tomu navíc savčí rodičovská péče přináší do systému jednak nutriční přísun ve formě savčího mléka, ale také poskytuje důležitou ochranu hravým potomkům před predátory.

Hra poté poskytuje jakýsi prostředek pro to, aby mohlo být juvenilní savčí chování úspěšně přemodelováno do chování dospělého jedince – za předpokladu, že je daný jedinec dobře zajištěn po stránce materiálních zdrojů a nehrozí mu žádné nebezpečí. Tato hypotéza vylučuje adaptivní výhodu hry. Primární proces výskytu hry ve fylogenezi vysvětluje jako pouhý vedlejší efekt dřívějších savčích adaptací (Špinka et al., 2001).

1.3.2. Hypotéza přebytku energie

Barberova (1991) hypotéza přebytku energie (angl. *surplus energy hypothesis*) vychází z podobných východisek jako Burghardtův (1988) model nadbytku zdrojů. Jak Barber (1991) tak i Burghardt (1998) nahlíží na herní projevy jako na vedlejší důsledek vnitřních fyziologických procesů. V případě mláďat savčích druhů, oba přístupy (Barber, 1991; Burghardt, 1998) akcentují předpoklad, že za normálních podmínek jsou mláďata hravá, protože u hravých druhů rodiče o mláďata pečují po relativně dlouhou dobu a poskytují jim přísun nutričně bohatého savčího mléka. Ovšem poté se oba přístupy rozdělují. Teorie nadbytku zdrojů (Burghardt, 1998) tvrdí, že mláďata si hrají tak často, a s takovou intenzitou, jak bohaté zdroje během vývoje mláďě získá. Barberova (1991) hypotéza naopak předpokládá, že mláďata některých savčích druhů si hrají, protože za normálních okolností přísun jejich energie není limitován a přebytečné energie se hrou potřebují zbavit.

Barberova (1991) hypotéza přebytku energie spatřuje ve hře okamžité benefity a považuje ji za adaptivní, zatímco Burghardtův (1998) model nikoliv. Funkce hry je v případě hypotézy o přebytku energie (Barber, 1991) založena na předpokladu, že rázná, dynamická a na emocionální systém vázaná hra aktivuje u mláďat sympatický nervový systém. Skrze aktivaci tohoto systému dochází k akutnímu i chronickému navýšení rychlosti metabolismu a termogenezi hnědé tukové tkáně, což může mít za následek ochranu hravého jedince vůči prochlazení a také před rozvinutím obezity. Následkem toho může být zvíře lépe ochráněno proti patogenům (Špinka et al., 2001).

1.3.3. Hypotéza nácviku pohybových dovedností

Přezkum Byersovy (1998) hypotézy pro hravé chování jako nácviku pohybových dovedností (angl. *motor-training hypothesis*) lze nalézt v myšlení německého psychologa Karla Grosse (1898), který považoval za hlavní benefit hry v rané ontogenezi, že hra zvířeti pomáhá zdokonalovat kritické vzorce chování (Špinka et al., 2001). Byers (1984) nad to uvažoval, že všechny ostatní kategorie hry se vyvinuly z lokomoční hry, jejíž nejpůvodnější účel byl antipredačního charakteru. „Během další evoluce byla hra modifikována, specializována a diverzifikována pro různé taxony podle selekčních tlaků, které působily na příslušné populace“ (Byers, 1984 as cited in Špinka et al., 2001, p. 149). Tato koncepce je tedy z dalších, které uvažují adaptivní výhody hravého chování.

Následně Byers s Walkerem (1995) přišli na to, že načasování hravé periody v juvenilním období koresponduje s vrcholnou fází cerebellární synaptogeneze u potkanů, myší a koček. Zároveň se u těchto tří druhů vrchol hry odehrává přibližně ve věku, kdy se vlákna kosterní svaloviny diferencují na pomalý a rychlý typ. To dalo vzniknout Byersově (1998) hypotéze o senzitivní periodě, v níž se předpokládá, že hra přináší velmi specifické a trvalé (neuro)fyziologické účinky, které mohou vést ke zlepšení dovedností, optimálnímu poměru rychlosti / síly a větší hospodárnosti u druhově-typických pohybových vzorců (Byers, 1998 as cited in Špinka et al., 2001). Autoři Pellis et al. (2010) našli podporu této hypotézy v empirických výzkumech, ovšem také upozorňují na to, že časový soulad neurálních změn v cerebellu s vrcholem výskytu hry v senzitivním období je pouze korelační, nedokazuje tedy kauzální spojitost.

1.3.4. Hypotéza vlastního ohodnocení

Thompsonova (1998) hypotéza vlastního ohodnocení (angl. *self-assessment hypothesis*) nahlíží na hru jako na prostředek pro to, aby zvíře získalo zpětnou vazbu o stavu svých fyzických dovedností a kondice. Podle této hypotézy mláďata zvířat testují sama sebe prostřednictvím opakované a náročné herní aktivity. Zvířata skrze osobní zpětnou vazbu poté uzpůsobují náročnost hry. Teorie self-assessmentu uvažuje možné sebe-ohodnocení u všech tří kategorií hry – samostatné lokomoční hry, hry s objektem i sociální hry. Benefity ze hry jsou okamžité a z největší části se vztahují ke kognitivní doméně zvířete (Špinka et al., 2001).

1.3.5. Hypotéza tréninku na neočekávané

V porovnání s ostatními hypotézami hledajícími odpověď na to, zdali může mít hravé chování u zvířat adaptivní hodnotu, je koncept hry jako tréninku na neočekávané (Špinka et al., 2001) (angl. *training for the unexpected hypothesis*, dále *TFUN*) nejnovější a nejpropracovanější. Teorie nahlíží na hru jako na multifunkcionální aktivitu a předkládá dohromady 24 predikcí, které hru rozdělují dle jejích uvažovaných benefitů do celé variace oblastí, z nichž lze na hru nahlížet – oblast pohybová, oblast strukturální, oblast motivační, oblast emocionální, oblast kognitivní, oblast sociální, oblast ontogenetická a oblast fylogenetická (Špinka et al., 2001).

Hlavní tezí této teorie je předpoklad, že si zvířata hrají z toho důvodu, že hrou rozvíjí pohybové, emocionální, kognitivní a sociální dovednosti, a to tím, že je provádění komplexní hry připravuje na neočekávané události v jejich proměnlivém fyzickém i sociálním prostředí. V teorii *TFUN* (Špinka et al., 2001) je navíc uváděn koncept sebe-znevýhodnění (angl. *self-handicapping*) (Petrů, Špinka, Charvátová & Lhota, 2009). Ten je založen na předpokladu, že zvířata se při provádění hry sama sebe různě znevýhodňují, čímž během vlastního hravého chování alternují celou variací nových situací, do kterých se prostřednictvím hry dostávají a musejí se s nimi také v dané herní situaci vypořádat. Tím tak vlastně trénují na neočekávané situace, které mohou kdykoliv nastat.

V následujících odstavcích bude teorie hry jako tréninku neočekávaného (Špinka et al., 2001) rozdělena na několik dílčích aspektů, u nichž *TFUN* očekává, že budou hrou rozvíjeny a jejichž funkce hravému zvířeti přináší určité na benefity vázané na konkrétní aspekty.

1.3.5.1. Aspekty pohybové a strukturální

Výchozí funkce hry, dle *TFUN* (Špinka et al., 2001) spočívá v nacvičování behaviorálních sekvencí, při nichž ztrácí zvíře plnou kontrolu nad svými pohyby a stabilní polohou a kontrolu okamžitě potřebuje nabýt znovu zpět. Hra tak alternuje různé situace, kdy zvíře kontrolu nad situací má a následně je kinematickými nebo gravitačními důsledky hry balančně rozhozeno, ztratí stabilitu a ihned se jí snaží získat zpět. Benefit hry je pak takový, že se zvíře učí jak se lokomočně vypořádat s náhlou ztrátou kontroly (Špinka et al., 2001), prostřednictvím čehož se zlepšují jeho celkové motorické dovednosti.

V případě specifické sociální hry u potkanů zvané rough-and-tumble, Pellis et al. (2010) považují použití této hypotézy za validní a demonstrují její aplikaci na situaci při hře, při které juvenilní potkani v obraně provádějí plnou rotaci a nechají se herním partnerem otočit na záda a zafixovat v poloze zvané *pinning*. Zde ztrácí plnou kontrolu nad svými pohyby a během pozdější fáze hry se jí následně snaží získat znovu zpět. Pellis et al. (2010) nadto dodávají, že z hlediska pozorování sebe-znevýhodnění u tohoto chování dochází i v případě potkaního jedince, který hru inicioval. U zvířete pozicičně nahoře se dá totiž velice často sledovat, že si na spodního partnera vleze všemi čtyřmi končetinami, což jeho polohu viditelně velice znestabilní a musí se se ztrátou kontroly v dané situaci rovněž vypořádat. Hypotéza sebe-znevýhodnění tak platí pro oba partnery při hře.

1.3.5.2. Aspekt emocionální

Praktikováním lokomočních destabilizačních prvků během hry se vedle zlepšování motorických dovedností zlepšuje také schopnost zvířete vyrovnávat se s emočně náročnými situacemi plynoucími z nepředvídatelného (Špinka et al., 2001). K takovým situacím dochází zejména při nenadále vzniklých vážných situacích, které nemá zvíře pod kontrolou a které tedy mohou pro něho být dočasně dezorientující nebo se při nich může cítit bezmocné. Může to být například tehdy, když zvíře náhle čelí pro něj děsivému nebo nebezpečnému stimulu nebo když je nuceno reagovat na náhlou přítomnost cizího jedince anebo v případě, že je vystaveno náhlé proměně zavedené dominance uvnitř vlastní skupiny (Špinka et al., 2001, Pellis a et al., 2010). Hypotéza sebe-znevýhodnění předpokládá, že hra zvířeti umožňuje takovéto náhlé emočně náročné situace zvládat tím, že hrou během rané fáze ontogeneze rozvíjí emocionální flexibilitu a zvířeti dlouhodobě snižuje riziko, že bude v takových situacích zachváčeno negativními pocity.

V případě laboratorních potkanů bylo v řadě různých experimentů (McEwen & Sapolsky, 1995; Metz et al., 2001, 2005; Roozendaal, 2002; Smith & Metz 2005 as cited in Pellis et al., 2010) zjištěno, že pocíťovaný stres u těchto zvířat zhoršuje kognitivní a motorické dovednosti. Ovšem zdá se, že pokud měli potkani v juvenilním období přístup ke hře, pak jsou v dospělosti schopni daleko lépe redukovat přespřílišnou emocionální odezvu na neočekávaný stimul (Pellis et al., 2010). A taková redukce odezvy je pro jejich výkonnost žádoucí.

1.3.5.3. Aspekt kognitivní

Rychlá alternace mezi kontrolovanými a nekontrolovanými pohyby během hry vyžaduje rozvinutý kognitivní aparát s dostatečnou kapacitou k vyhodnocení série sekvenčních pohybů, jež v běžných neherních situacích nenásledují jeden druhý (Špinka et al., 2001). Předpoklad kognitivní náročnosti se týká všech tří kategorií hry, tedy i té nejméně sofistikované – samostatné pohybově-rotací hry. Jedna z predikcí *TFUN* (Špinka et al., 2001, p.160) hovoří, že „hra má za následek měřitelné změny a posílení těch mozkových struktur, které přijímají a integrují složité somatické vjemy, řídí složité motorické vzorce a modulují emoční reakce“. Nepředvídatelná povaha herních sekvencí podle této hypotézy spočívá na pohybovou improvizaci a emocionální flexibilitu.

1.3.5.4. Aspekt sociální

Během sociální hry se zvířata sama různě sebe-znevýhodňují tím, že používají nepřeborné množství variací pozic a pohybů, které omezují jejich kompetence a naopak zvýhodňují herního partnera (Špinka et al., 2001). Dalším sebe-znevýhodňujícím znakem sociální hry je ten, že zvířata si ke své hře často vybírají silnějšího nebo zkušenějšího herního partnera. *TFUN* toto chování vysvětluje jako trénink na neočekávané a vidí hru jako prostředek pro zlepšování sociálních dovedností a vztahů uvnitř skupiny (Špinka et al., 2001; Lewis, 2000).

Graham a Burghardt (2010) pozorují, že druhy zvířat žijících ve velkých sociálních skupinách bývají hravější. Tím, že zvířata během hry mění sociální role, hra může být také důležitým prostředkem pro rozvoj sociální flexibility a internalizaci sociálních pravidel (Siviy, & Panksepp, 2011; Himmler, Himmler, Pellis, & Pellis, 2016). Z dlouhodobého pozorování sociálního chování potkanů vyplývá, že pokud tato zvířata v juvenilním období nemají přístup ke hře, bývají jako dospělí výrazně méně sociálně kompetentní (Pellis & Pellis, 2007). Mohou se u nich objevit sklony k hyperdefenzivnímu jednání a jsou mnohem náchylnější eskalovat běžná setkání v agresivní potyčky (Einon & Potegal, 1991). Také jsou méně často schopná projevit submisivní chování vzhledem k dominantním zvířatům a mohou být proto neojediněle terčem útoků, čímž u nich dochází k projevům nadměrnému stresu (von Frijtag et al., 2002). Je proto zřejmé, že praktikování hravého chování může potkanům sloužit jako prostředek k získání důležitých sociálních kompetencí pro život ve složitých sociálních koloniích.

1.4. Manipulace se hrou během ontogeneze

Hravé chování se u potkanů začíná vyskytovat týden před odstavem (Bolles & Woods, 1964; Pellis & Pellis, 1997), jeho vrchol se odehrává mezi třicátým až čtyřicátým dnem po narození (Thor & Holloway, 1984) a chování pokračuje dále do dospělosti. Hra je běžně pozorována u všech mláďat v populaci (Špinka et al., 2001). Juvenilní období je charakterizováno rychlým alometrickým růstem ve hmotnosti těla a rychlé změny tělních proporcí mohou mít za následek menší preciznost pohybů, což může vést k častějším hůře odhadnutým pohybům a „průšvihům“. Dle teorie hry jako tréninku na neočekávané (Špinka et al., 2001) přináší provádění hry právě v juvenilním období největší prospěch. Teorie *TFUN* dále předpokládá, že různé herní módy mají vrchol v odlišných fázích ontogeneze. Například vrchol lokomoční hry předchází vrcholu sociální hry.

1.4.1. Herní deprivace

Důležitá otázka pro studium hravého chování, která se v tomto bodě naskytá, je ta, co se stane se zvířaty, která byla – ať už z přirozených důsledků nebo uměle prostřednictvím manipulace – zbavena možnosti částečně nebo zcela provádět hru? Oblast experimentálního výzkumu hravého chování, která se na tuto otázku snažila najít odpověď, prošla poměrně rozsáhlým vědeckým bádáním, a proto dnes existuje celá řada studií, v nichž se autoři ontogenetickou deprivací hry u potkanů zabývali. Manipulace hry, jež vylučuje přímo chirurgický nebo chemický zásah do organismu testovaného zvířete, lze v laboratorních podmínkách dosáhnout v zásadě třemi způsoby. První způsob je úplná nebo částečná sociální izolace pokusného zvířete, druhý způsob je jeho ustájení s nehravým nebo méně hravým partnerem a třetí způsob spočívá v modifikaci herního prostředí tak, že je zamezeno určitým důležitým pohybovým prvkům sociální hry.

Znemožnění sociální hry potkanům během juvenilního období může mít dlouhodobé negativní kognitivní, behaviorální a socio-emocionální důsledky pro jejich pozdější vývoj (Pellis et al., 2010; Špinka et al., 2001). Studie zabývající se herní deprivací způsobenou sociální izolací během herní periody například dokládají, že izolovaní potkani byly agresivnější, jak k jiným potkanům (Byrd & Briner, 1999; Day, Seay, Hale, & Hendricks, 1982), tak i ke zvířatům jiných druhů (Johnson, DeSisto, & Koenig, 1972). Další studie například dávají do souvislosti sociální izolaci v juvenilním období se zhoršením prostorového učení (Frisone, Frye, & Zimmerberg, 2002), behaviorální hyperaktivitou v neznámých otevřených prostorech (Gentsch et al. 1988) nebo různými deficity během sexuálních projevů (van den Berg, Hol, Van Ree, Spruijt, Everts, & Koolhass, 1999).

Studii, které využívají metodu sociální izolace je celá řada. Holloway a Suter (2004) ovšem namítají, že je těžké odlišit vliv prostorové sociální izolace od vlivu samotné herní deprivace na různé ontogeneticky pozdější projevy testovaných zvířat. Oba faktory totiž v těchto experimentech působí zároveň – pokud je zvíře izolované, je zamezeno nejen ve hře, ale zároveň je připraveno o možnost sociálního vískání, společného odpočinku, synchronizace aktivity

a zjištěné ontogenetické změny mohou být způsobeny kterýmkoliv z těchto faktorů. Sociální izolace tedy zcela vyloučí hru a tím zabrání ontogenetickému působení všech výše uvedených aspektů herního chování (pohybovému, emocionálnímu, kognitivnímu, sociálnímu), ale současně navozuje zvířeti i jiné typy deprivace.

Přístup, který by mohl tyto vlivy odlišit, spočívá v tom, že je testované zvíře v ontogenetickém období hry ustájeno s nehravým či méně hravým partnerem. Jako příklady experimentálních provedení lze uvést ustájení potkaních mláďat s dospělými samicemi, jež za normálních okolností juvenilům neodpovídají na hru (Pellis, Pellis, & Williams, 2017), dále přítomnost farmakologicky ovlivněného partnera (Einon, Morgan, & Kibbler, 1978) popřípadě ustájení hravého juvenila s plemenem laboratorního potkana Fischer 344, které je považované za méně hravé (Schneider et al., 2016).

Jedno z možných vysvětlení nižší míry hravosti laboratorního plemene Fischer 344 může být dáno tím, že když je jedinec z tohoto plemene spárován s herními partnery jiných hravějších plemen (např. Lewis nebo Sprague-Dawley), je pro něho jednak obtížnější reagovat na herní výzvy, protože mu může činit potíže přecítit herní signály a také hůře přizpůsobuje své prvky chování probíhající hře (Siviy, 2018). Další vysvětlení poukazuje na to, že sociální hra u mláďat laboratorního plemene Fischer 344 se více podobá hře dospělých laboratorních potkanů, což může u plemene Fischer 344 indikovat jejich urychlené dospívání (Siviy, Crawford, Akopian & Walsh, 2011).

Studie, v jejichž uspořádání figuruje nehravý nebo méně hravý partner nám ukazují, že mláďata hravějších potkaních plemen odchovaná s takovými partnery vykazují později celou řadu různých kognitivních, sociálních a emočních deficitů, včetně problémů s krátkodobou pamětí (e.g. Einon, Morgan, & Kibbler, 1978; Pellis, Field, & Whishaw, 1999; Potegal & Einon, 1989; Schneider, Bindila, et al., 2016; Schneider, Pätz, Spanagel, & Schneider, 2016 as cited in Stark & Pellis, 2020).

Další možností, jak cíleně deprivovat v ontogenezi od hravého chování, je uzpůsobit fyzické prostředí tak, aby klíčové prvky, typické pro hru daného druhu, nemohla mláďata realizovat. Tento způsob deprivace použili Donaldson et al. (2002) při výzkumu hry selat. Selatům byla herní plocha rozčleněna rovnoběžnými překážkami, takže nemohla uskutečňovat otočky a vzájemné kroužení při hravých soubojích, což jsou typické prvky jejich hry. Takto kinematicky deprivovaná selata se lišila od kontrolních selat v následném sociálním chování po odstavu, kdy již byla všechna selata chována ve stejném prostředí. U potkanů ani jiného druhu savce nebyla dosud tato metoda pro výzkum benefitů hravého chování použita.

Kapitola 2

Cíle a design pokusu

V předchozí kapitole, jež byla věnována teoretickým předpokladům o důležitosti sociální hry u potkanů během kritické fáze jejich ontogeneze, bylo nastíněno, že adaptivní funkce hry mohou přinášet řadu okamžitých i dlouhodobých benefitů pro správný rozvoj pohybových, emocionálních, kognitivních a sociálních dovedností. Různé studie využívající experimentálních manipulací hry během kritického hravého období v juvenilním stádiu vývoje nám ukazují, že herní deprivace může vést k různým pozdějším sociálním, emocionálním, kognitivním, i jiným vývojovým nedostatkům.

Cílem práce je proto prostřednictvím behaviorálních testů zjistit, zda a jak sociální a kinematické omezení hry v kritickém období mezi odstavem a dospíváním ovlivní emoční, kognitivní a lokomoční dovednosti laboratorních potkanů Long-Evans. Náš výzkumný cíl je postaven na třech hypotézách:

- ❖ H1 – omezení hry zvýší anxiету laboratorních potkanů a sníží jejich exploraci
- ❖ H2 – omezení hry zhorší paměť a schopnost učení u laboratorních potkanů
- ❖ H3 – omezení hry zhorší lokomoční schopnosti laboratorních potkanů v úlohách náročných na udržení rovnováhy

Design pokusu byl rozdělen do dvou fází. První fáze svým načasováním spadá mezi 24. a 66. postnatální den věku laboratorních potkanů Long-Evans a jejím cílem bylo ovlivnění ontogenetické zkušenosti se hrou. Takto ovlivnění laboratorní potkani byli ve druhé fázi od 43. postnatálního dne testováni prostřednictvím sestavené baterie testů pro vyhodnocení jejich emocionálních, kognitivních a lokomočních dovedností.

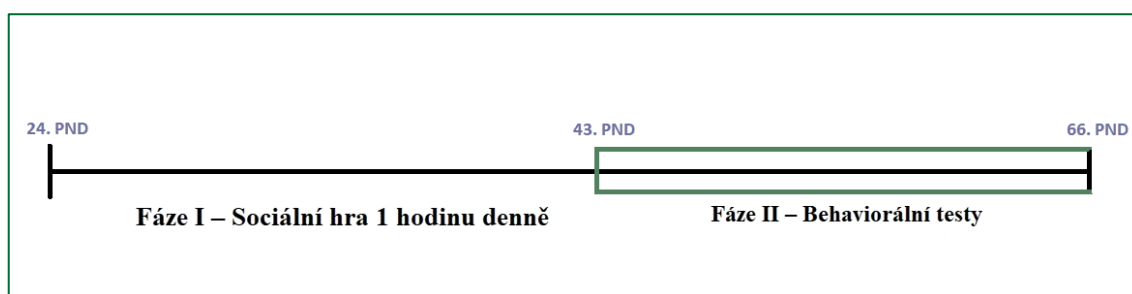
V našem designu pokusu byla sociální hra laboratorním potkanům od 24. do 66. postnatálního dne umožněna na jednu hodinu denně v samostatné chovné nádobě, tzv. T-boxu (vždy mezi 10.00–11.00 hod. dopoledne). Podle předchozích zjištění (e.g. Pellis & Pellis, 2007) by časová příležitost jedné hodiny sociální hry během dne měla plně nahradit neomezenou příležitost ke hře. Účastníky sociální hry byla pokaždé stejně stará zvířata, jež spolu byla od začátku až do konce fáze ovlivnění zkušenosti se hrou párově ustájena v prostorově rozdělené chovné nádobě (tzv. Duna boxu).

Klíčový prvek první fáze našeho pokusu tkví v omezení herní zkušenosti. Dle příslušné herní modifikace byli laboratorní potkani Long-Evans rozděleni do tří skupin s různými manipulacemi:

- I. Treatment „Full play“ (*FP*) – od začátku dva párově ustájení samci Long-Evans měli pro sociální hru k dispozici celý 3D prostor herního T-boxu. Tato skupina nebyla oproti dvěma následujícím nijak manipulována.
- II. Treatment „Socially reduced“ (*SR*) – již od prvního dne ustájení (24. p.n.d.) byl sledovaný samec plemene Long-Evans ustájen se se stejně starým samcem méně hravého plemene Fischer 344. Ti byli až do konce výzkumu umístěni spolu. Oba herní partneři měli pro sociální hru k dispozici celý 3D prostor herního T-boxu.
- III. Treatment “Kinematically Reduced” (*KR*) – od začátku dva párově ustájení samci Long-Evans měli k dispozici pouze 2D prostor ke hře. Toho bylo docíleno tím, že jim byl snížen strop herního T-boxu. Výška herního stropu byla v časovém průběhu experimentu modifikována s ohledem na věk a tělesnou hmotnost zvířat tak, aby během celého období pro získávání herních zkušeností byly této skupině znemožněny jakékoliv 3D prvky sociální hry.

Všem laboratorním potkanům v takto sestavených treatmentech byla párová sociální hra umožněna na 1 hodinu denně v samostatných herních T-boxech. Kvůli vyloučení škodlivého vlivu sociální izolace v době mimo hru, byli herní partneři od 24. postnatálního dne až do konce experimentu ustájeni párově v Duna boxech, ovšem v polovině prostoru byla po celé šířce boxu vsazena pletivová zábrana. Díky tomu byl umožněn olfaktorický, vizuální, akustický a částečně i taktilní kontakt párových zvířat, ovšem sociální hra byla během ustájení zcela znemožněna. Partneři k sobě byli vybráni tak, aby do dělené Duna klece nebyli umístěni dva sourozenci ze stejného vrhu.

Od 43. postnatálního dne byly, vedle prováděného ovlivnění herní zkušenosti, navíc pro všechny laboratorní potkany Long-Evans realizovány i behaviorální testy. To znamená, že fáze I – ovlivnění herních zkušeností a fáze II – behaviorální testy spolu probíhaly paralelně až do konce pokusu, kterým byl stanoven 66. postnatální den věku laboratorních potkanů Long-Evans. Behaviorální testy se konaly pravidelně po hře, tzn. nejdříve od 12.00 a svým časovým rozsahem nepřesáhli 19. hod večerní. Časové schéma pokusu je zobrazeno na obrázku 2 (PND: postnatální den).



Obr. 2: Schéma designu pokusu pro ontogenezi samců Long-Evans

S ohledem na výše zmíněné omezení hry předpokládáme, že se mezi sebou laboratorní potkani s plnou (*FP*), kinematicky redukovanou (*KR*) a sociálně redukovanou (*SR*) hrou budou lišit ve výkonnosti v sestavené baterii behaviorálních testů. Ta zahrnuje dva testy zaměřené na emocionalitu a exploraci – *Open field test*, *Elevated plus maze test*; dva testy zaměřené na kognitivní dovednosti – *Novel object recognition test*, *Y-maze test* kognitivní flexibility; a tři testy zaměřené na motorické dovednosti – *Beam walking test*, *Rope maintenance test*, *Inclined plane test*.

Design obou fází experimentu byl navržen tak, aby mohl být pokus zopakovaný ve dvou samostatných bžích – letním a zimním – s časovým odstupem 119 dní. Každého běhu se zúčastnilo 18 laboratorních potkanů Long-Evans, kteří byli rovnoměrně rozděleni mezi tři vymezené treatmenty (*FP*, *KR*, *SR*) a 6 potkanů Fischer 344, kteří byli do pokusu začleněni jako méně hraví partneři ve skupině *SR*.

Kapitola 3

Metodika

V předchozí kapitole byl představen design výzkumu, jenž spočíval především v rozdělení laboratorních potkanů Long-Evans do tří treatmentů zohledňujících rozdílnou zkušenost se sociální a motorickou hrou během ontogeneze. Takto rozdělené skupiny byly mezi 43. až 66. postnatálním dnem všech pokusných zvířat testované prostřednictvím baterie testů. Ta byla sestavená ze dvou testů zaměřených na emocionalitu a exploraci – *Open field test* (OF), *Elevated plus maze test* (EPM); dvou testů zaměřených na kognitivní dovednosti – *Novel object recognition test* (NOR), *Y-maze test* kognitivní flexibility; a tří testů zaměřených na motorické dovednosti – *Beam walking test* (BWT), *Rope maintenance test* (RMT), *Inclined plane test* (IPT). Harmonogram behaviorálních testů po jednotlivých týdnech testování zobrazuje tabulka 1 (zkratka T1: týden 1).

Tab. 1: Schéma harmonogramu behaviorálních testů

	Den 1	Den 2	Den 3	Den 4	Den 5	Den 6	Den 7
T1	EPM 1	OF 1 (NOR hab.)	NOR	NOR	BWT	RMT	
T2	EPM 2	OF 2	Y-maze fáze I	Y-maze fáze II ("shaping")		Y-maze fáze II ("non shaping")	
T3	OF 3	EPM 3	Y-maze fáze II	Y maze fáze III			
T4	IPT – den 1	IPT – den 2	IPT – den 3				

3.1. Open field test

Tento behaviorální test se používá jako nástroj k měření emocionality (anxiety) a explorační u hlodavců. Protože se předpokládá, že strach z nového prostředí u potkanů inhibuje pohyb (Halliday, 1968), vyšší míru anxiety lze zaznamenat tehdy, když je zvíře v prostředí otevřené arény méně aktivní, v krajním případě až ztuhlé (tzv. *freezing*); vyhýbá se prostřední části arény (Simon, Dupuis & Costentin, 1994); a ve zvýšené míře vylučuje (projevy urinace a defekace). Za parametry explorační lze považovat celkovou nachozenou vzdálenost v celé aréně; celkovou nachozenou vzdálenost v prostřední části arény; a celkový počet vstupů do středu arény. Vyhodnocení ušlé vzdálenosti jako parametru explorační může mít ovšem své limity, jak naznačuje například studie autorů Genaro & Schmidek (2000) – samotné vystavení osvětlené Open field arény může být pro zvířata velice averzivní stimul a pohyb v Open fieldu je z určitého hlediska možné považovat více za útekovou reakci nežli za volnou explorační.

3.1.1. Aparatura

Čtvercová *open field* aréna (100 x 100 x 42 cm) je umístěná na zemi uprostřed místnosti tak, aby se střed arény nacházel pod hlavní stropní žárovkou v místnosti. Soft-boxy osvětlující střed arény stojí diagonálně od protějších rohů arény ve vzdálenosti 60 cm. Aktivitu testovaného zvířete nahrává jedna kamera umístěná nad open-field arénou ve výšce 240 cm nad zemí.

Zvíře je umístěno do středu arény a jeho aktivita je nahrávána na 10 minut.



Obr.3: Aparatura Open field arény

3.1.2. Měřené parametry

- Explorace:
 - celková nachozená vzdálenost v celé aréně
 - celková nachozená vzdálenost ve středu arény
 - celkový počet vstupů do středu arény
- Anxieta:
 - čas strávený ve středu arény
 - čas po který je zvíře inaktivní (tzn. nehýbe se)
 - defekace, urinance

3.1.3. Predikce

Dle hypotézy o funkci hry jako tréninku na neočekávané (Špinka et al., 2001), účast na sociální hře v ontogenezi zvířeti napomáhá k rozvoji sociálních, kognitivních, emocionálních a pohybových dovedností, které zvíře upotřebí pro život v sociálně dynamickém a fyzicky proměnlivém prostředí. Z hlediska studia emocionality, hra prováděná v ontogenezi u jedince může plnit také funkci sloužící k vyrovnání se s nepředvídatelnými a emocionálně zatěžkavými situacemi (Špinka et al., 2001). Na základě námi stanovené hypotézy H1, předpokládáme že se projevy anxiety a explorační budou v Open field aréně napříč třemi treatmenty pokusných zvířat lišit.

Lze očekávat, že laboratorní potkani vystavení plné hře (*FP*) v ontogenezi budou v *Open field* testu vykazovat nižší míru anxiety, zato vyšší míru explorační oproti dvěma hrou omezeným treatmentům (*KR*, *SR*). Specificky u skupiny laboratorních potkanů Long-Evans se sociálně redukovanou hrou (*SR*) se dá očekávat, že ke hře během kritické juvenilní fáze ontogeneze bude kvůli méně hravému partnerovi Fischer 344 docházet s menší četností. Omezený přístup ke hře může negativně ovlivnit emocionální odpověď na neznámou a pro potkany potenciálně rizikovou situaci spojenou s otevřeným prostorem (Špinka et al., 2001; Treit et al., 1993). Podporu předpokladu, že herní deprivace v ontogenezi je spojená se zvýšenou anxietou a vyšší emocionální senzitivitou v dospělosti lze nalézt například ve studiích Leussis & Andersen (2008); Lukkes et al. (2009); Baarendse et al. (2014), Lesscher et al., (2015) (as cited in Vanderschuren et al., 2016).

Na tomto místě je ovšem třeba také zmínit, že například empirická studie etologů Schneider et al. (2016), v níž autoři pracovali se potkaními samicemi plemene Wistar-Fischer 344 a kontrolní skupinou Wistar-Wistar, žádné významné rozdíly v míře anxiety a explorační mezi těmito skupinami v Open field testu neodhalila. Oproti našemu designu experimentu ale tato studie pracovala s juvenilními samicemi, nikoliv se samci. A k tomu navíc využívala rozdílný způsob ustájení vzhledem k našemu designu pokusu – v provedeném experimentu byla zvířata ustájena po čtyřech jedincích v případě skupiny Wistar-Fischer 344 a po pěti jedincích v případě skupiny Wistar-Wistar. Rovněž přístup zvířat ke hře během ustájení nebyl narozdíl od našeho pokusu nijak regulován (Schneider et al., 2016). Naš experiment proto stále může přinést odlišné výsledky.

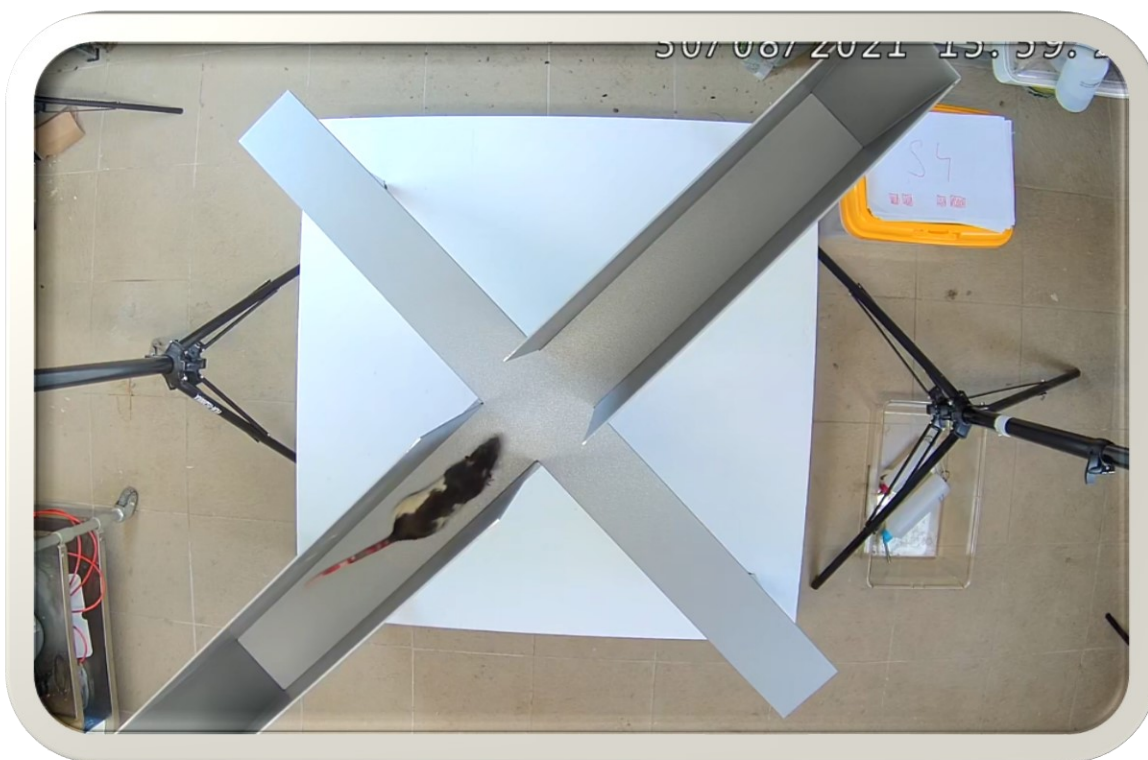
3.2. Elevated plus maze test

Jedná se o alternativu k *Open field* testu pro měření anxiety a explorce u hlodavců. Bludiště má tvar “+”, je tvořeno dvěma otevřenými osvětlenými rameny (50 x 10 cm), dvěma uzavřenými odstíněnými rameny (50 x 10 x 40 cm) a prostřední otevřenou platformou (10 x 10 cm). Preference zdržovat se v uzavřených ramenech je pro hlodavce možné považovat za adaptivní chování, zatímco otevřený prostor za anxiogenní (úzkost vyvolávající) faktor (Ennaceur, Michalikova & Chazot, 2006). Jelikož je celá aparatura EPM umístěna relativně vysoko (103 cm) nad zemí, mohlo by se zdát, že výška, ve které se potkani pohybují, je pro ně další z anxiogenních faktorů. Existují ovšem studie (e.g. Treit et al., 1993; Rodgers & Dalvi, 1997), jež tvrdí, že parametr výšky umístění bludiště nad zemí nemá na celkovou aktivitu v Elevated plus maze u potkanů prakticky žádný významný vliv. Očekáváme proto, že hlavní anxiogenním zdrojem budou u testovaných zvířat představovat dvě otevřená ramena. Otevřený prostor totiž brání potkanům projevit tigmotaxi (Treit et al., 1993) – vrozenou antipredační tendenci zdržovat se blízko zdi na úkor otevřeného prostoru.

3.2.1. Aparatura

Bludiště *Elevated plus maze* je usazené na víku zakrývající *Open field* arénu. Soft-boxy osvětlující otevřená ramena a středovou část aparatury stojí v ose naproti otevřeným ramenům bludiště ve vzdálenosti 60 cm. Aktivita testovaného zvířete je nahrávána prostřednictvím kamery umístěné nad aparaturou Elevated plus maze ve výšce 240 cm nad zemí.

Zvíře je umístěno do středové otevřené platformy a jeho aktivita je nahrávána na 10 minut.



Obr.4: Aparatura arény *Elevated plus maze*

3.2.2. Měřené parametry:

- Explorace:
 - celková nachozená vzdálenost v aréně
 - procento vstupů do otevřených ramen ze vstupů do všech ramen
- Anxieta:
 - latence prvního vstupu do otevřeného ramene
 - procento času stráveného v otevřených ramenech z celkového času
 - čas po který je zvíře inaktivní (tzn. nehýbe se)
 - defekace, urinance

3.2.3. Predikce

Jak již bylo uvedeno, *Elevated plus maze* je alternativou k *Open field testu*, tudíž měří i podobné vlastnosti – anxieta a exploraci. Ve výsledcích pokusu lze proto očekávat obdobné rozdíly v chování mezi treatmenty potkanů. Na základě hypotézy H1 tudíž předpokládáme, že potkani vystavení plné hře v ontogenezi (FP) budou v testu vykazovat nižší míru anxiety, zato vyšší míru explorace. V případě EPM budou trávit méně času v uzavřených ramenech a budou vykazovat vyšší celkovou nachozenou vzdáleností uvnitř aparatury (všech čtyř ramen bludiště).

Vyšší míru anxiety – tedy delší čas strávený v uzavřených ramenech na úkor otevřených ramen – a nižší míru explorace lze totožně s hypotézou *Open field testu* očekávat u potkanů plemene Long-Evans, jež byli v ontogenezi vystaveni buďto herní aréně se sníženým stropem (KR) anebo měli za partnery méně hravé plemeno Fischer 344 (SR). Ve druhém případě se jedná o treatment, u kterého k sociální hře během ontogeneze bude pravděpodobně docházet s menší četností. I v tomto případě předpokládáme, že redukovaný přístup ke hře během ontogeneze negativně ovlivní emocionální odpověď na neznámou (Špinka et al., 2001) a z hlediska tigmotaxe (Treit et al., 1993) potenciálně rizikovou situaci spojenou s otevřeným prostorem.

Navzdory ucelené hypotéze o (Špinka et al., 2001), ovšem zatím konkrétně v prostředí bludiště *Elevated plus maze* tomuto předpokladu nenasvědčuje žádná empirická studie. Obdobně jako v případě měření anxiety v *Open field testu*, ve studii Schneider et al. (2016), potkaní samice plemene Wistar mající za partnerky jiné samice z plemene Fischer 344, dosáhly v EPM podobných výsledků jako kontrolní skupina Wistar-Wistar. Jediné, v čem se oba treatmenty mezi sebou lišily, byla četnost vstupu do uzavřených ramen ve prospěch vyšší četnosti u skupiny se sociálně redukovanou hrou – tato skupina byla více explorativní.

3.3. Novel object recognition test

V *Novel object recognition* testu (NOR) je možné sledovat jednak ochotu zvířete k exploraci v bludišti a poté měřit jeho výkonnost v kognitivní úloze zaměřené na diskriminaci dvou objektů a následné uchování těchto stimulů v paměti. Jistým adaptivním předpokladem k NOR testu u potkanů může být jejich vrozená tendence ve známém prostředí prozkoumávat ze dvou různých objektů dosud nepoznaný objekt na úkor objektu, kterému bylo zvíře dříve vystaveno (Ennaceur & Delacour, 1988). Tato vrozená tendence byla testována rovněž u některých druhů primátů, psů, prasat a koní (Akkerman et al., 2012).

3.3.1. Aparatura

NOR test proběhne ve čtvercové *Open field* aréně (100 x 100 x 42 cm). Ta je umístěná na zemi uprostřed místnosti tak, aby se střed arény nacházel pod hlavní stropní žárovkou v místnosti. Do *Open field* arény se v pozdějších fázích pokusu umisťují objekty. V tomto testu nejsou využity soft-boxy, jelikož jejich použití za objekty vytváří nežádoucí stíny. Aktivitu testovaného zvířete nahrává jedna kamera umístěná nad *Open field* arénou ve výšce 240 cm nad zemí.

3.3.2. Design pokusu

Aby NOR test mohl poskytnout validní výsledky, měl by zahrnovat celkem tři fáze. Každé fázi přísluší jeden testovací den. V první fázi je zvíře seznámeno s prostředím, ve kterém následný test proběhne. Tomuto procesu se přezdívá environmentální familiarizace (Besheer & Bevins, 2000). Bylo zjištěno, že potkani mají větší tendenci zkoumat nový podnět ve známém prostředí, nežli v prostředí zcela novém (Sheldon 1969, as cited in Besheer & Bevins, 2000). Ve druhé fázi je zvíře vystaveno dvěma shodným výchozím objektům. A nakonec, ve třetí testovací fázi pokusu je jeden z výchozích objektů vyměněn za nový. V případě, že potkan během této fáze věnuje více interakcí a času novému objektu, NOR test předpokládá, že si výchozí objekt zvíře uchovalo v paměti. Preference k novému objektu tedy může indikovat dobře fungující paměť (e.g. Akkerman et al., 2012).

NOR test má v našem provedení následující design:

- Fáze I – habituace v OF bez objektů, 10 min, provedení 1 den před fází IIa
- Fáze IIa – dva shodné objekty, 10 min, provedení 1 den před fází III
- Fáze IIb – dva shodné objekty, 5 min, provedení ve stejný den jako fáze III
- Fáze III – dva rozdílné objekty, 10 min

Schéma fáze I – habituace v prostředí OF bez objektů

Jedná se o standardní expozici v *Open field* aréně. Cílem habituace je poskytnout zvířeti představu o 3D prostoru arény, jenž bude ve fázi II a III obohacen o objekty. Habituace pro každé zvíře trvá 10 min.

Schéma fáze IIa – vystavení dvěma shodným objektům v prostředí OF

Proběhne následující den po fázi I. Polovina zvířat z treatmentu je vystavena dvěma výchozím objektům A, druhá polovina dvěma výchozím objektům B. Oba objekty, A i B, které ve studii používáme, jsou vyrobeny ze skla a mají kovový uzávěr potažený bílou izolepou. Liší se však mezi sebou tvarem, velikostí, a výplní. V této fázi jsou dva objekty (AA, nebo BB) umístěny v rozích proti sobě, střed objektu je ve vzdálenosti 26 cm od rohových hran OF. Pozice objektů je totožná pro všechna zvířata a treatmenty. Každé zvíře je umístěno do spodní části open field arény, zády k objektům. Expozice trvá 10 min.

Objekt A	Objekt B
materiál: sklo, tvar: válec rozměry: $\varnothing$ 6,5 cm víčko: $\varnothing$ 6,5 cm výška: 8,5 cm výplň: barevné kuličky na prádlo	materiál: sklo, tvar: šestihran rozměry: nejdelší $\varnothing$: 8 cm víčko: $\varnothing$ 7 cm výška: 10,5 cm výplň: voda obarvená tuší
	

Schéma fáze IIb – vystavení dvěma shodným objektům v prostředí OF

Zvolené objekty i jejich umístění v Open field aréně jsou totožné s fází IIa. Co se ovšem liší je načasování a délka expozice. Fáze IIb proběhne ve stejný den jako fáze III, konkrétněji jednu hodinu před touto poslední fází. Expozice objektům pro každé zvíře trvá 5 min.

Schéma fáze III – vystavení dvěma různým objektům v prostředí OF

V této fázi je jeden z výchozích objektů vyměněn za nový – pozice nového objektu je určena tak, že polovině zvířat z treatmentu bude vyměněn objekt z jednoho rohu a druhé polovině zvířat objekt z druhého rohu *Open field* arény. Tím chceme vyloučit vliv laterality při preferenci. Expozice objektům pro každé zvíře trvá 10 min.

Princip umístění objektů v jednotlivých fázích *Novel object recognition* testu ilustrují následující fotografie. Obrázek 5 zachycuje vystavení dvěma shodným objektům ve fázi IIa a IIb. Obrázek 6 zachycuje následnou vyměněnu výchozího objektu původně napravo za dosud nefamiliární objekt ve fázi III.



Obr. 5: Dva shodné objekty (fáze IIa, IIb)



Obr. 6: Dva rozdílné objekty (fáze III)

3.3.3. Měřené parametry

- Explorace:
 - celková nachozená vzdálenost v aréně
 - čas po který je zvíře inaktivní (nehýbe se)
 - ih1 = index habituace explorativního chování (fáze IIa vs IIb)
 - ih2 = index habituace explorativního chování (fáze IIa vs III)
 - ih3 = index habituace explorativního chování (fáze IIb vs III)
- Paměť:
 - D1, DI = indexy diskriminace mezi novým a familiárním obj.
 - RI = index rekognice
 - VI = index návštěv (nový vs. familiární objekt)

3.3.4. Predikce

U potkanů, kteří budou v naší studii vystaveni různé zkušenosti se sociální hrou během rané ontogeneze, lze s ohledem na naši hypotézu H2 v NOR testu očekávat odlišné výsledky. Shodně s předpoklady exploračních testů OF a EPM, u laboratorních potkanů Long-Evans, kteří byli dříve v ontogenezi vystaveni neredukované (*FP*) sociální hře, lze očekávat vyšší míru explorace a lepší paměť. Předpokládáme proto, že laboratorní potkani z treatmentů *FP* stráví více času u výchozích objektů ve fázi IIa a IIb, a následně ve fázi III budou trávit více času u nového objektu, a to v porovnání se dvěma hrou omezenými skupinami, v nichž byla v ontogenezi hra omezována nižším stropem (*KR*) nebo redukována nehravým partnerem (*SR*). Rovněž očekáváme, že celková interakce s objekty s objekty (index návštěv) bude ve fázích II i III u skupin s plnou hrou (*FP*) vyšší než u treatmentů s pohybově (*KR*) a sociálně (*SR*) redukovanou hrou.

3.4. Y-maze – test kognitivní flexibility

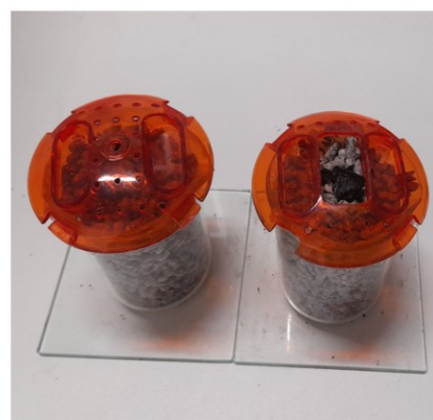
Jedná se o kognitivní test v Y-bludišti, který je založený na principu reverzního učení (Mackintosh, Mcgonigle & Holgate, 1968). Na základě reverzního učení lze u zvířat měřit dovednost kognitivní flexibility (Izquierdo, Brigman, Radke, Rudebeck & Holmes, 2017; Dhawan, Tait & Brown, 2019). Tu lze chápat jako schopnost rychle měnit své chování v závislosti na proměnlivých podmínkách prostředí. Nutným předpokladem pro možnost testování kognitivní flexibility v Y-bludišti je prvotní úloha prostorového učení, při níž se zvíře učí postupně diskriminovat mezi dvěma chodbami bludiště, kdy pouze jedna chodba vede stabilně k pozitivnímu stimulu (nádobka s přístupnou odměnou), zatímco druhá chodba vede vždy k neutrálnímu stimulu (nádobka s nepřístupnou odměnou). Naučené zvíře volí tu chodbu, o níž má dlouhodobý záznam v paměti, že vede k získání odměny. Princip kognitivní flexibility spočívá v tom, že po dosažení určitého diskriminačního kritéria v prostorovém učení, tedy akumulaci patřičného množství správných odpovědí, se význam podnětů obrátí – z pozitivního se stane neutrální a vice versa.

3.4.1. Aparatura

Y-bludiště se skládá ze tří ramen (49 x 11 x 30 cm), z nichž vždy právě jedno je pro zvíře výchozím bodem, z něhož v testu startuje. Toto rameno se po ustálení během všech fází testu nemění. Laboratorní potkan si v testu vždy sám zvolí, do kterého ze dvou potenciálních ramen vkročí. Na obou koncích těchto ramen bludiště jsou umístěny barvou i tvarem identické válcovité nádobky (ø 6 cm), vyrobené ze skla s umělohmotnými uzávěry (ø 8 cm). Tyto uzávěry jsou proraženy úzkými póry (0,3 cm). V obou nádobkách je umístěná odměna. Nádobky se mezi sebou liší pouze tím, že v jednom z uzávěrů je navíc ručně proražený otvor (3,5 x 2 cm), čímž se odměna uvnitř nádobky stává pro potkana dostupnou, a proto lze v testu tuto nádobku považovat za pozitivní stimul. Na druhém z uzávěrů jsou proraženy jen velice úzké póry (0,3 cm), díky nimž má zvíře možnost odměnu v nádobce zkoumat olfaktorickými smysly, avšak fyzický přístup k ní je zvířeti odepřen – tato nádobka v testu slouží jako neutrální kontrolní stimul.



Obr. 7: Aparatura Y-maze s umístěnými nádobkami (fáze II)



Obr. 8: Nádobky používané ve Y-maze

Design pokusu

Y-maze test kognitivní flexibility je rozdělen do tří fází:

- I. Fáze – habituace v Y-maze (1 den ve druhém týdnu), 10 min
- II. Fáze – učení na jedno rameno (4 dny ve druhém týdnu + 1 den ve třetím týdnu)
- III. Fáze – přeučení na druhé rameno (4 dny ve třetím týdnu)

Tři dny před zahájením I. fáze testu Y-maze je každému zvířeti jednou denně podávána jedna porce odměny, prostřednictvím níž se testovaní laboratorní potkani budou učit volit správné rameno ve fázi II. a fáze III. Jako odměna byly zvoleny borůvkové cereálie Versele-Laga Crock Complete Berry. Jednou porcí odměny se rozumí zhruba $\frac{1}{4}$ cereálie (při vyšším počtu expozic se vyhneme tomu, že zvíře překrmíme, čímž by mohlo ztrácet motivaci k učení).

Schéma Fáze I – habituace v Y-maze

Na začátku I. fáze je soubor 18 testovaných zvířat rozdělen na polovinu, tj. 9 zvířat, která budou ve fázích II a III podmiňována na levou stranu (“L”) a zbylých 9 zvířat, která budou podmiňována na pravou stranu (“P”). V rozdělení by měly být zohledněny treatmenty (*FP*, *KR*, *SR*). To znamená, že z každého treatmentu budou pseudonáhodně tři zvířata postupně učena na dostupnou odměnu v levém rameni bludiště a zbylá tři zvířata budou postupně učena na dostupnou odměnu v pravém rameni bludiště. Tedy např. soubor “L” bude obsahovat tři potkany z treatmentu *FP*, tři potkany z treatmentu *KR* a tři potkany ze *SR*.

Každé zvíře je v habituacní fázi na 10 min vystaveno prostředí Y-bludiště, aby získalo představu o prostoru, v němž v následujících dnech učení proběhne.

Schéma Fáze II – učení na jedno rameno

Výchozí bod pro umístění zvířete v bludišti je na konci předem určeného ramena chodby. Při umístění je zvíře vždy natočeno zády k otevřené chodbě. Cílem II. fáze je změřit rychlost učení spočívající v tom, jestli si pokusné zvíře zapamatovalo, v jakém ze dvou ramen Y-bludiště může očekávat odměnu. Pokud se zvíře rozejde z výchozího bodu a zahne do ramene s přístupnou odměnou, jedná se o správnou odpověď (“S”). V případě, že se rozhodne jít nejprve do ramene s nepřístupnou odměnou (tj. ocitne se v chodbě všemi čtyřmi končetinami), jedná se o neúspěch (“F”), a to i přesto, že v “S” rameni nakonec skončí. Zvíře je z bludiště odebráno v okamžiku, kdy si vybere odměnu z “S” ramene a zkonzumuje ji, případně po vypršení časového limitu 3 min.

Učení na jedno rameno probíhá tak, že každé zvíře je vloženo do bludiště čtyřikrát samo po sobě. Mezi jednotlivými expozicemi je vnitřek bludiště čištěn 70% ethanolem, aby došlo k eliminaci pachových stop. Čtyři vložení po sobě pro každé zvíře uzavírají jednu sérii. Každý testovací den učení v tomto experimentu obnáší pouze jednu sérii, s výjimkou 4. dne (neděle, týden 2), kdy proběhnou dvě série v jeden den. Ve fázi II učení na jedno rameno bude každé testované zvíře vystaveno Y-maze bludišti dohromady 24krát.

Jelikož lze očekávat (bylo empiricky testováno v pilotním pokusu), že při dvou možných ramenech dosahuje průměrný laboratorní potkan po 16 expozicích úspěšnosti (“S”) pouze kolem 50 %, bude pro první dva dny testování fáze II pro každé zvíře aplikována metoda zvaná shaping. Jedná se o trénink zaměřený na žádoucí chování, které má na počátku malou pravděpodobnost výskytu. Z hlediska učení ve Y-maze je do “S” ramene zvíře v jednotlivých krocích naváděno prostřednictvím postupného umisťování odměny blíže vůči schématickému umístění nádoby, podrobněji viz níže.

Stupňování přidávání odměny (borůvková cereálie) má během prvních dvou dnů učení fáze II následující posloupnost:

1. První vložení do bludiště: Odměna na začátku “S” ramene
2. Druhé vložení do bludiště: Odměna uprostřed “S” ramene
3. Třetí vložení do bludiště: Na konec ramene “S” přidat nádobku a do ní přístupnou odměnu.
4. Čtvrté vložení do bludiště: Na konec ramene “S” přidat nádobku a do ní přístupnou odměnu, a navíc přidat nádobku s nepřístupnou odměnou do ramene “F”.



Obr. 9: Y-maze shaping první vložení



Obr. 10: Y-maze shaping druhé vložení



Obr. 11: Y-maze shaping třetí vložení



Obr. 12: Y-maze shaping čtvrté vložení

Od třetího testovacího dne Y-maze testu se od *shapingu* upouští a celá zbylá fáze II učení a následná fáze III přeučení jsou zjednodušeny pouze na 4. krok: („Na konec ramene “S” přidat nádobku a do ní přístupnou odměnu, a navíc přidat nádobku s nepřístupnou odměnou do ramene “F”).

Schéma Fáze III – přeučení na druhé rameno

Ve třetí fázi zkoumáme kognitivní flexibilitu, tzn. zdali je zvíře schopné se přeučit již zapamatované umístění odměny. Nádobky v “S” a “F” ramenech jsou již od prvního kroku a po celou dobu této fáze prohozeny. Ovšem platí totožný způsob vyhodnocování, že pokud se zvíře rozejde z výchozího bodu a zahne do ramene s přístupnou odměnou, jedná se o správnou odpověď (“S”). V případě, že se rozhodne jít nejprve do ramene bez přístupné odměny, jedná se o neúspěch (“F”). Expozice končí v momentě, kdy si potkan vybere odměnu z “S” ramene, případně po časovém limitu 3 minuty, pokud není odměna zkonsumována. Proces přeučení obnáší 4 série, tedy celkem 16 expozičních pro každé zvíře.

3.4.2. Měřené parametry

Jedna série sestává ze čtyřech po sobě jdoucích vložených testovaných zvířete do Y-bludiště. Úspěšná odpověď spočívající ve správném zahnutí testovaného zvířete do ramene s přístupnou odměnou („S“) je kvantifikována číslovkou 1. Nesprávné zahnutí („F“) je kvantifikováno číslovkou 0. Každé testované zvíře může získat v jedné sérii skóre 0–4. Proces učení bude pro každé zvíře vyjádřen jako průměr celkového skóre za celou fázi II (6 sérií = 24 expozičních), proces přeučení bude spočítán jako průměr celkového skóre za celou fázi III (4 série = 16 expozičních).

3.4.3. Predikce

Prostřednictvím toho, jak rychle je zvíře schopno se naučit vyhledávat odměnu v rameni s pozitivním stimulem a následném úspěchu v úloze reverzního učení, lze získat přehled o schopnosti kognitivní flexibility (Havekes, Timmer, & Van der Zee, 2007). Navzdory ucelené hypotéze o pozitivním vlivu sociální hry na kognitivní dovednosti jedince (Špinka et. al, 2001), v případě Y-bludiště dosud nejsou k dispozici empirické studie, které by dávaly přímo do souvislosti vliv sociální hry v ontogenezi na schopnost kognitivní flexibility v tomto bludišti u jakéhokoliv živočišného druhu. Jedna existující, na hru nezaměřená behaviorální studie provedená na myších (Van der Borght, Havekes, Bos, Eggen & Van der Zee, 2007) naznačuje rostoucí výkonnost v učení na jedno rameno a reverzním učení u skupiny myší, které byla umožněna spontánní pohybová aktivita během ustájení – na 14 dní během ustájení jim bylo zpřístupněno běhací kolo. Nejednalo se však o sociální hru, nýbrž individuální pohybovou aktivitu.

V návaznosti na hypotézu H2 očekáváme, že skupina potkanů, která v naší studii bude vystavena plné hře (*FP*), zvládne proces učení na jedno rameno a následující test reverzního učení nejrychleji, s nejvyšším skóre. U skupiny vystavené sociální hře v aréně se sníženým stropem (*KR*) očekáváme v učení a kognitivní flexibilitě o něco horší výsledky. Totéž je očekáváno u skupiny potkanů Long-Evans, která byla v herní aréně vystavována nehravému partnerovi z plemene Fischer 344 (*SR*). Lze totiž předpokládat, že s redukcí hry ze strany méně hravého partnera a formou ustájení bez *enrichmentu* (např. bez běhacího kola), bude zvíře v sociální hře během rané ontogeneze zaostávat za jedinci ze skupin *FP* a kognitivní dovednosti nebudou u této skupiny hrou tolik rozvinuty.

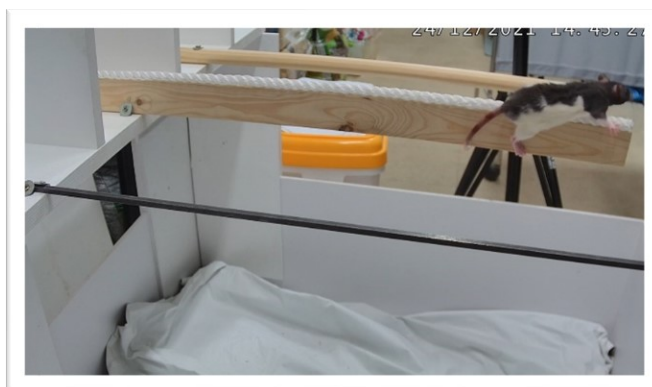
3.5. Beam walking test

Beam walking test může sloužit jako nástroj k měření balančních dovedností a jemné motoriky u hlodavců (von Euler et al., 1996; Carter et al., 1999; da Silva et al., 2018). Pohybová koordinace a rovnováha je zaznamenávána na kladině, jejíž jeden konec je upevněn ke stabilní přihrádce (úkrytu) a druhý konec směřuje volně do prostoru. Test vychází z předpokladu, že pokud je kladina umístěna dostatečně vysoko nad zemí, je poté hlodavec, umístěný na svrchní plochu kladiny, vnitřně motivován k tomu vyvinout spontánní pohyb do přihrádky, jež v prostředí představuje stabilní bod, na kterém není nutné balancovat.

Konečná podoba aparatury beam walking testu není v experimentálních studiích standardizována a liší se v závislosti na povaze zaměření výzkumu. Jsou studie, ve kterých je použit pouze jeden tvar a rozměr kladiny (Mikulecká & Mareš, 2002; Feng et al., 2014), v jiných studiích se pracuje s baterií několika tvarově homogenních (von Euler et al., 1996) či tvarově heterogenních (Carter et al., 1999; da Silva et al., 2018) kladin, jež se mezi sebou navzájem liší svou šířkou. Šířka a tvar kladiny totiž udávají koordinační náročnost pro úspěch v testu.

3.5.1. Aparatura

V naší studii přicházíme s vlastní originální aparaturou Beam walking testu sestávající z police se třemi přihrádkami (rozměr jedné přihrádky: 20 x 20 x 20 cm). Ke každé z přihrádek je přimontován jeden ze tří heterogenních typů kladiny. První kladina je zkombinována z dřevěného trámku¹ (1 cm x 4,5 cm x 58,5 cm), po jehož svrchním povrchu je nataženo a upevněno syntetické polypropylenové lano (průměr 1,1 cm). Druhou kladinu představuje ocelová tyčka ve tvaru čtyřbokého hranolu (0,6 cm x 0,6 cm x 58 cm). Třetí kladina má válcovitý tvar a je vyrobena z nelakovaného dřeva (průměr 2,4 cm, délka 57,5 cm).



Obr. 13: Aparatura BWT (pohled seshora) Obr. 14: Aparatura BWT (pohled z boku)

Aparatura Beam walking testu byla speciálně vyrobena tak, aby pro její upevnění nad zemí mohla být využita *Open field* aréna. Protože chceme mít BWT aparaturu ve větší výšce než dovolí standardní výška *Open field* arény (43 cm), byly k aparatuře navíc vyrobeny čtyři

¹ Délka je uváděna jako vzdálenost od volného konce kladiny k vnitřní hraně přihrádky, tzn. skutečná délka kladiny je u všech typů o 20 cm delší (tj. o celou délku přihrádky).

speciální nástavce² (30 cm x 20 cm x 1 cm), které budou umístěny na dvě rohové části open-field arény přiléhající k jedné společné hraně (boku). Obě z dvojic nástavců by na sebe měly v rozích open-field arény kolmo navazovat. Účelem nástavců je vyvýšit celou aparaturu o 30 cm nad OF arénu, tj. 73 cm nad zem. K tomu je po celé spodní ploše OF arény rozprostřena molitanová žíněnka (s tloušťkou 6 cm) pokrytá omyvatelným ubrusem z netkané textilie. Žíněnka slouží k zachycení pádů z kladin, ke kterým v tomto testu může, ale nemusí docházet.

3.5.2. Design pokusu

Každé zvíře je standardizovaně vkládáno na nejzválenější konec kladiny, zády od přihrádky. Testovaný laboratorní potkan má v tomto testu pouze jednu možnost, jak uspět – a to tak, že se dostane z otevřeného konce kladiny do stabilní ohrazené přihrádky aparatury. V takovém případě se expozice považuje za úspěch „S“. Pokud během pohybu po kladině zvíře spadne nebo seskočí, v testu neuspěje („F“). Pokud zvíře nespadne, avšak přihrádky nedosáhne do 120 vteřin od vložení na kladinu, považuje se takový pokus za limit („L“). Časy, za jak rychle se dokáže zvíře dostat do stabilní přihrádky, případně za jak rychle z kladiny spadne, budou vyhodnoceny dodatečně z pořízených záznamů.

V momentě, kdy je testované zvíře vystaveno všem třem typům kladiny, je pro něho uzavřena jedna série expozic. Pokud byla všechna zvířata v dané sérii otestována a od začátku právě dokončené série uběhlo více než 60 minut, v experimentu lze pokračovat začátkem další série. Během testovacího dne proběhnou celkem tři série, tzn. každé zvíře bude jednomu typu kladiny vystaveno celkem třikrát (devět expozic kladinám celkově).

3.5.3. Měřené parametry

- Úspěch v testu
 - Čas, za který se zvíře dostane z otevřeného konce kladiny do stabilní přihrádky
 - Procentuální šance na úspěch v testu v rámci příslušného treatmentu
- Neúspěch v testu
 - Pád: Čas, za který zvíře spadne z kladiny dolů
 - Limit: Časový limit 120 vteřin

3.5.4. Predikce

V souladu s hypotézou o funkci hry, jakožto nácviku pohybových dovedností (Byers, 1998; Špínka et. al, 2001) a z ní plynoucí hypotézy H3, předpokládáme, že laboratorní potkani Long-Evans, kterým bude během ontogeneze umožněna plná hra (*FP*), dosáhnou v Beam walking testu nejlepších výsledků. U skupiny potkanů, u nichž hra nebude moci být rozvinuta v plném prostorovém rozsahu (*KR*), předpokládáme, že omezení hry v ontogenezi zhorší lokomoční schopnosti potkanů v této úloze náročné na udržení rovnováhy. Totéž se dá očekávat u skupiny, v níž bude hra redukována nehravým partnerem (*SR*).

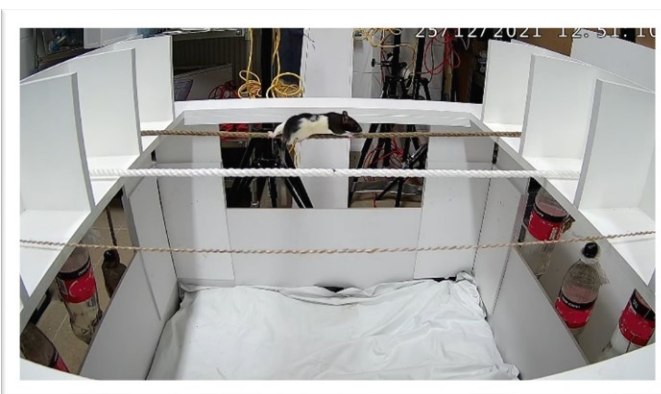
² Je uváděn rozměr, o který se aparatura vyvýší nad hranu open-field arény. Skutečný rozměr nástavce, tj včetně jeho základů, které zasahují pod úroveň maximální výšky open-filedu je 55 x 20 x 2 cm.

3.6. Rope maintenance test

Jedná se o náš vlastní test, který je hybridem tří již zavedených testů – *Rope traverse* testu (Kim, Schallert, Liu, et al., 2001), prostřednictvím něhož lze u hlodavců měřit balanční a senzomotorické schopnosti, *Grip strength* testu (Feng et al., 2014) měřícího sílu úchytu a výše popsaného *Beam walking* testu. Podstatný rozdíl našeho testu oproti metodice *Rope traverse* testu spočívá v tom, že před první expozicí v *Rope maintenance* testu není zvíře vystaveno žádnému pre-tréninku. Ten je u *Rope traverse* testu zaváděn z toho důvodu, aby zvíře bylo během samotného experimentu natrénováno přebíhat provaz z vlastní iniciativy. V *Rope maintenance* testu ovšem není pre-trénink podstatný, jelikož je zde zvíře na provaz vkládáno manuálně, a to vždy doprostřed délky provazu (přibližně 36 cm ve vzdálenosti od obou polic). Bezprostředně po každém vložení je zvíře nuceno se s vratkou pozicí nestabilního provazu vyrovnat prostřednictvím vlastních senzomotorických schopností. Tento způsob manipulace z hlediska vkládání zvířete do aparatury daleko více připomíná výše zmíněný *Grip test*.

3.6.1. Aparatura

Aparatura *Rope maintenance* testu se skládá ze dvou polic s šesti (2x3) přihrádkami. Mezi dvojicemi protilehlých přihrádek je natažen vždy jeden ze tří typů provazů vedený otvory protilehlých přihrádek. Vně z obou protilehlých přihrádek je každý provaz zatížen dvěma PET lahvemi naplněnými vodou (1,75l). Zatížením je docíleno toho, že provaz uvnitř aparatury vydrží natažen. Naše aparatura *Rope maintenance* testu využívá tři typy provazů: konopný provaz – $\varnothing$ 9 mm; polypropylenový provaz – $\varnothing$ 11 mm; a jutový provázek – $\varnothing$ 3 mm. Délka provazů mezi protilehlými policemi (tj. délka propasti) je 72 cm.



Obr. 15: Aparatura RMT (pohled seshora)

Obr. 16: Aparatura RMT (pohled z boku)

Konstrukce aparatury *Rope maintenance* testu byla navržena tak, aby mohla být prostřednictvím 8 nástavců nasazena na *Open field* arénu, za účelem její vyvýšení. Totožné nástavce využívá i *Beam walking* test. Technická specifika využití nástavců jsou proto uvedena v odstavci 3.5.1 této diplomové práce. Po celé spodní ploše OF arény je totožně s BWT rozprostřena molitanová žíněnka (s tloušťkou 6 cm) pokrytá omyvatelným ubrusem z netkané textilie. Žíněnka slouží k zachycení pádů z provazů, ke kterým v tomto testu rovněž může, ale nemusí docházet.

3.6.2. Design pokusu

Každé testované zvíře je vkládáno doprostřed provazu čelem k vnitřní hraně aparatury. Za úspěch ("S") v Rope maintenance testu je považován výsledek, kdy se laboratorní potkan na provaze dokáže udržet a zároveň přeručuje / přeběhne na libovolnou stranu provazu, kde dosáhne stabilní přihrádky. Pokud se potkan kdekoliv na trajektorii provazu pustí, v testu neuspěje ("F"). V případě, že zvíře nedosáhne stabilní přihrádky, ovšem zvládne se na provaze udržet alespoň 120 vteřin, je pokus je považován za limit („L“). Časy, za jak rychle se dokáže testované zvíře dostat do stabilní přihrádky, případně za jak rychle z provazu spadne, budou vyhodnoceny dodatečně z pořízených záznamů.

V momentě, kdy je testované zvíře vystaveno všem třem typům provazů, je pro něho uzavřena jedna série expozič. Pokud byla všechna zvířata v dané sérii otestována a od začátku právě dokončené série uběhlo více než 60 minut, v experimentu lze pokračovat začátkem další série. Během testovacího dne proběhnou celkem tři série, tzn. každé zvíře bude jednomu typu provazu vystaveno celkem třikrát (devět expozič provazů celkově).

3.6.3. Měření parametry

- Úspěch v testu
 - Čas, za který se zvíře dostane z prostřední části provazu do stabilní přihrádky
 - Procentuální šance na úspěch v testu v rámci příslušného treatmentu
- Neúspěch v testu
 - Pád: Čas, za který zvíře spadne z provazu dolů
 - Limit: Časový limit 120 vteřin

3.6.4. Predikce

Jelikož Rope maintenance test měří podobné parametry jako *Beam walking* test, lze na něj aplikovat i shodné předpoklady o funkci hry jako nácviku pohybových dovedností (Byers, 1998; Špinka et. al, 2001) a z ní plynoucí hypotézy H3. Rope maintenance test se řadí mezi úlohy náročné na udržení rovnováhy, a proto lze očekávat, že laboratorní potkani, kterým bude během ontogeneze umožněna plná hra (*FP*), dosáhnou v tomto testu nejlepších výsledků. Po vložení na provazy se dostanou rychleji do stabilní přihrádky a je u nich očekávána procentuálně vyšší šance na úspěch. Skupina potkanů, u nichž hra nebude moci být rozvinuta v plném 3D prostorovém rozsahu (*KR*), bude v souladu s hypotézou dosahovat v těchto parametrech horších výsledků. Totéž se dá očekávat u skupiny laboratorních potkanů Long-Evans (*SR*), kde je sice umožněna plná prostorová hra, ovšem je očekáváno, že hra bude redukována méně hravým partnerem laboratorního plemene Fischer 344.

3.7. Inclined plane test

Lokomoční úlohu stability v nakloněné rovině je možné považovat za užitečný a robustní test senzomotorických funkcí u hlodavců (Murphy, Rick, Milgram & Ivy, 1995). Test je v klasickém pojetí koncipován tak, že je testované zvíře manuálně vloženo na gumovou podlahu, přičemž je testováno, zdali se zvíře dokáže na daném náklonu udržet za využití všech čtyř končetin a vlastní senzomotoriky. Přístup spočívající v manuálním vkládání testovaných laboratorních potkanů do prostřední části nakloněné roviny jsme ovšem při pilotních pokusech vyhodnotili jako komplikovaný, zejména proto, že zvířata nebylo snadné vkládat standardizovaně. Způsob manipulace při vkládání pokusných zvířat do nakloněné roviny jsme proto modifikovali.

V našem netradičním přístupu je testovaný laboratorní potkan umístěn do spodní části nakloněné roviny a má za úkol vyšplhat po hladké nalakované dřevěné desce chodby, na jejímž konci ho čeká odměna. Ta je umístěna na dřevěném žlábků platformy 4x4 cm, uprostřed koncové části chodby. Odměna se v tomto testu používá z toho důvodu, aby zvíře v pozdějších obtížnějších fázích testu bylo motivováno ke šplhání směrem nahoru. S rostoucím počtem expozičních v nakloněné rovině roste úhel, který svírá rovina s vodorovnou deskou a tím se pro zvíře zvyšuje obtížnost se k platformě s odměnou na konci chodby dostat. S každým rostoucím sklonem roviny se tak teoreticky zvyšují lokomoční a balanční nároky pro to, aby zvíře z roviny nesklouzlo.

3.7.1. Aparatura

Aparatura nakloněné roviny sestává z hladké překližkové chodby (49 x 17,5 x 18 cm) natřené bílým lakem a uzavřené skleněným stropem. Chodba je připevněna kovovými panty k vodorovné desce. Díky uchycení chodby skrze panty lze libovolně měnit úhel náklonu chodby vůči vodorovné desce. Celá deska je posazena na dřevěné nástavce – ty jsou nasazeny na rohové hrany *Open field* arény, čímž je aparatura pro *Inclined plane test*



Obr. 17: Aparatura IPT (úhel náklonu 25°)

zvednuta do ve výšky 76,5 cm nad zemí. Technická specifika využití nástavců jsou uvedena v odstavci 3.5.1 této diplomové práce. Po celé spodní ploše OF arény je rozprostřena molitanová žíněnka (s tloušťkou 6 cm) pokrytá omyvatelným ubrusem z netkané textilie. Žíněnka slouží k zachycení pádů z nakloněné roviny, ke kterým v tomto testu rovněž může, ale nemusí docházet. Smyslem úlohy Inclined plane testu je najít pro každé z testovaných zvířat nejvyšší možný úhel náklonu, při kterém je testované zvíře ještě schopno udržet stabilní balanc, jenž mu umožní pohybovat se za odměnou po plošině nahoru, aniž by z chodby vlivem gravitace sklouzlo dolů.

3.7.2. Design pokusu

Přestože se naše vlastní metodika *Inclined plane* testu v mnohém shoduje s klasickými metodologickými přístupy (Rivlin & Tator, 1977; Murphy, Rick, Milgram & Ivy, 1995; von Euler, Akesson, Samuelsson, Seiger & Sundstrom, 1996), zejména tedy se základní logikou postupného zvyšování úhlů nakloněné roviny (postupně rostoucí obtížností testu), naše úloha se v několika důležitých metodických bodech liší.

První z odlišných přístupů spočívá v tom, že úloha je obohacená o faktor učení. K učení jsme se přiklonili z důvodu praktických nesnází při vkládání potkanů do zadní části uzavřené chodby, jež se objevily během pilotního testování. Shodně jako v případě kognitivní flexibility v Y-maze testu, jenž úloze nakloněné roviny předchází, jsme zvolili učení prostřednictvím pozitivní motivace – odměny. Potkany již od první expozice v nakloněné rovině učíme, že na dřevěné platformě (4 x 4 cm) připevněné ke konci chodby se nachází odměna v podobě ¼ borůvkové cereálie (Versele-Laga Crock Complete Berry). Zvíře je vkládáno vždy na začátek chodby a očekává se, že se skrze vlastní sled pohybů dostane k platformě na konci chodby, z níž si odměnu vyzvedne a zkonzumuje ji kdekoliv v bludišti.

Za druhé, od předešlých studií (e.g. Rivlin & Tator, 1977; Murphy, Rick, Milgram & Ivy, 1995; von Euler et al., 1996), v nichž je zvíře umisťováno do určitého bodu v nakloněné rovině, v němž balancuje, aby nespadlo, se náš přístup odlišuje v tom, že zvíře učíme šplhat po nakloněné rovině směrem nahoru. Celý proces je tak pro zvíře o něco náročnější, jelikož musí pohybovat končetinami, čímž nutně přichází o stabilní kontakt všech čtyř končetin s povrchem nakloněné chodby.

A za třetí, povrch chodby (lakovaná překližka) je navíc hladký bez povrchových nerovností, jež by mohly sloužit k možnosti zachycení – chybí např. gumové drážky používané v protokolu Rivlinem & Tatorem (1977) – a tudíž více klouže. Tím se stává úloha také o něco obtížnější. Z toho důvodu lze očekávat, že potkani z nakloněné roviny mohou sklouznout již při nižších úhlech náklonu (20–30°). I přesto (s podporou výsledků pilotního testování) očekáváme, že variabilita úspěšnosti mezi jednotlivými testovanými zvířaty vyjde dostatečně vysoká.

Kritérium úspěchu (“S”) v testu může být dosaženo s ohledem na čtyři možné scénáře:

1. Normální scénář: potkan dosáhne platformy a sní odměnu (kdekoliv v bludišti).
2. Scénář bez snědení odměny: potkan v chodbě vydrží 3 minuty, aniž by z ní sklouzl dolů.
3. Scénář, kdy odměna sklouzne dolů: potkan dosáhne platformy a drkne do odměny a ta sklouzne dolů. Zvíře následně vydrží v chodbě alespoň 30 vteřin.
4. Scénář, kdy potkan sklouzne i s odměnou: potkan dosáhne platformy a sklouzne i s odměnou v tlamě.

Pokud během testu není naplněn ani jeden z těchto scénářů, je daná expozice v nakloněné rovině hodnocena jako neúspěch „F“. V případě, že zvíře v dané expozici neuspěje, má jeden další pokus na opravu v následující expozici. Pokud zvíře neuspěje dvakrát za sebou, z testu je vyřazeno. Příklad postupového klíče: kombinace „FF“ => zvíře je vyřazeno, kombinace „FSF“ => zvíře v testu nadále pokračuje.

Posloupnost zvyšování úhlů, jež svírá rovina s vodorovnou deskou, má v testu následující podobu:

pořadí expozice														
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
úhel	0°	0°	5°	5°	5°	10°	10°	15°	15°	20°	25°	28°	31°	34°

3.7.3. Měřené parametry

- Úhel prvního pádu
- Nejvyšší dosažený úhel
- Celkový počet úspěchů

3.7.4. Predikce

Hypotéza o funkci hry, jakožto nácviku pohybových dovedností (Byers, 1998) dává do souvislosti expozici sociální hře v ontogenezi zvířete s vlivem na utváření svalového aparátu a pozitivní vývoj cerebella. Pohybový aspekt teorie hry jako tréninku na neočekávané tvrdí (Špinka et. al, 2001), že hrou se zvíře učí, jak se lokomočně vypořádat s náhlou ztrátou kontroly. Na obou těchto předpokladech je postavena hypotéza H3, prostřednictvím níž se očekává, že skupina laboratorních potkanů, která si bude moci během pro hru kritické fáze ontogeneze dopřát plnou hru (*FP*), dosáhne v Inclined plane testu nejlepších výsledků. Skupina laboratorních potkanů, kde hra nebude moci být rozvinuta v plném prostorovém rozsahu (*KR*), bude v souladu s předpoklady hypotézy dosahovat v testu horších výsledků. Totéž se dá očekávat u skupiny (*SR*), v níž bude sice umožněn plný pohybový rozsah, ovšem hra bude redukována nehravým partnerem Fischer 344.

Kapitola 4

Vyhodnocení a výsledky

Behaviorálních testů se zúčastnilo dohromady 36 laboratorních potkanů Long-Evans. Tento vzorek byl rozdělen po 18 testovaných zvířatech do dvou běhů: letního běhu A (23.8. – 15.9.2021) a zimního běhu B (20.12.2021 – 12.1.2022). Veškerá použitá metodika byla odzkoušená v pilotním pokusu na vzorku 12 laboratorních potkanů v zimním období mezi roky 2020 / 2021.

Všechny behaviorální testy se odehrály v Demonstrační a pokusné stáji Fakulty agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, objekt A, místnost číslo 15. V této místnosti byli potkani rovněž ustájeni a také zde probíhala herní zkušenost. Teplota v místnosti byla během letního běhu v rozmezí 23,5 – 25,2 °C, během zimního běhu v rozmezí 22,1– 24,0 °C. Světelný režim v místnosti byl nastaven na: 7.00 – 21.00 rozsvíceno, 21.01 – 6:59 zhasnuto. Přístup k pitné vodě byl během trvání pokusu ad libitum, přístup ke krmení byl před zahájením fáze behaviorálních testů ad libitum, během fáze behaviorálních testů byla zvířata krmena až po skončení testování v daném dni.

Projekt byl součástí grantu GA ČR 20-26831: Ontogeneze hravého chování u laboratorních potkanů. Projekt pokusu byl schválen Ministerstvem zemědělství 63479/2016-MZE-17214.

4.1. Open field test

Open field test byl proveden během testovací fáze pokusu celkem třikrát (týden 1, týden 2 a týden 3) s časovým odstupem 7, resp. 6 dní. Každý testovaný laboratorní potkan byl umístěn doprostřed arény a jeho spontánní aktivita byla nahrávána na 10 min. Po každé expozici byla vnitřní plocha arény čištěna 70% ethanolem kvůli eliminaci pachových stop. Projevy urince a defekace byly zaznamenávány do zápisového listu.

Desetiminutového časového limitu pro exploraci v tomto testu nedosáhla všechna testovaná zvířata. V 1. a 2. týdnu testování letního běhu (A) vyskočil laboratorní potkan K6 z treatmentu *KR* z Open field arény před časovým limitem 10 min. Ve 2. týdnu zimního běhu (B) z arény vyskočili ven nejprve dva laboratorní potkani K1 a K4 ze skupiny *KR*, a následně ve 3. týdnu vyskočili před limitem z arény titíž jedinci K1 a K4, a navíc i laboratorní potkan P4 z treatmentu *FP*. Po vyskočení z arény bylo každé zvíře vždy vráceno zpět do své domovské Duna klece a test byl pro něho ukončen. Měřené parametry byly z důvodu vyskakování z arény přepočítány pro všechna testovaná zvířata na relativní hodnoty (výsledná hodnota parametru naměřená do vyskočení z arény vztažena k naměřenému času do vyskočení z arény).

Pořízené záznamy byly nejprve sestříhány v softwaru Wondershare Uniconverter 13. Délka každého videa byla stanovena stříhem na 10 minut, případně na specifický čas do vyskočení z arény. Takto upravená videa byla následně zanalyzována v softwaru pro automatické trackování behaviorálních dat Lolitrack v.5.

Open field aréna (100x100cm) byla v softwaru Lolitrack virtuálně rozdělena na čtvercovou středovou zónu (70x70cm) a její přilehlé okraje. Za bod na těle určující navštívení středové zóny bylo zvoleno gravitační těžiště zvířete. S takto nastavenými parametry byly následně v softwaru Lolitrack analyzovány tyto sledované proměnné:

OF_arena_dist_rel = celková relativní nachozená vzdálenost v aréně

OF_middlezone_dist_rel = celková relativní nachozená vzdálenost ve středové zóně arény

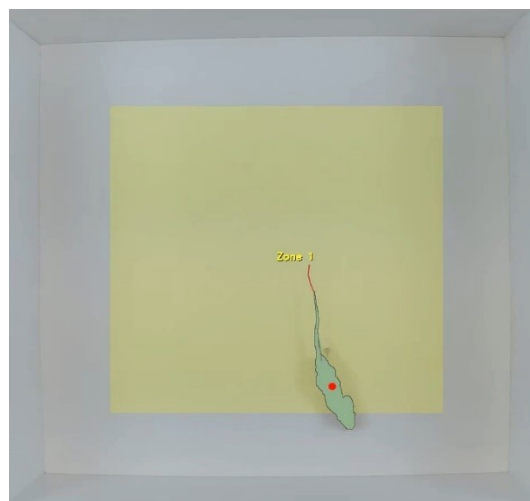
OF_middlezone_visits_rel = celkový relativní počet vstupů středové zóny arény

OF_middlezone_time = procento času stráveného ve středové zóně arény

OF_arena_inakt = procento inaktivity v aréně

OF_uri = urinance

OF_defec = defekace



Obr. 18: Vymezení středové zóny v OF aréně

Výstupní hodnoty proměnných ze softwaru Lolitrack byly poté statisticky vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na výše uvedené závisle proměnné aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, běh, týden testování a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Jako efekt interakce byl zkoumán parametr váhy s během (A, B). Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí a byla u všech závisle proměnných dodržena a náhodné efekty i efekt interakce vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.1.1. Vyhodnocení explorační

Rozdíl v celkové relativní nachozené vzdálenosti uvnitř arény vyšel statisticky nevýznamný pro treatment ($F = 1.55$, $p = 0.2177$), zato signifikantní pro běh ($F = 7.67$, $p = 0.0068$) a váhu ($F = 11.75$, $p = 0.0009$). Interakce váhy s během vyšla rovněž jako statisticky významná ($F = 14.26$, $p = 0.0003$). Laboratorní potkani z treatmentu *FP* a *SR* nachodili v aréně podobnou vzdálenost ($t = 0.09$, $p = 0.9285$). Skupina *KR* nachodila v aréně více než *FP* ($t = 1.49$, $p = 0.1407$) a *SR* ($t = 1.58$, $p = 0.1164$), ovšem rozdíl není statisticky signifikantní. V prvním týdnu testování byla celková nechozená vzdálenost vyšší než ve druhém ($t = 5.41$, $p < 0.0001$) a třetím ($t = 3.81$, $p = 0.0002$) týdnů testování.

Rozdíly v celkové relativní nachozené vzdálenosti ve středové zóně arény vyšly opět nesignifikantní pro treatment ($F = 1.73$, $p = 0.1822$). Testování laboratorní potkani ze skupin *KR* nachodili ve středové části arény mnohem více oproti potkanům z treatmentu *FP* ($t = 1.67$, $p = 0.0984$) a *SR* ($t = 1.58$, $p = 0.1175$), oba rozdíly ale postrádají statistickou významnost. Skupiny *FP* a *SR* se v nachozené vzdálenosti ve středové zóně arény příliš nelišily ($t = -0.10$, $p = 0.9168$). Statisticky významný rozdíl v nachozené vzdálenosti ve středové zóně arény byl mezi běhy ($F = 5.21$, $p = 0.0247$) a významný rozdíl byl i z hlediska váhy ($F = 5.49$, $p = 0.0212$). Těžší laboratorní potkani více nachodili v prostřední části arény. Signifikantní vyšel i efekt interakce váhy s během ($F = 7.97$, $p = 0.0058$). První týden testování se v nachozené vzdálenosti ve středové části arény výrazně lišil od druhého ($t = 6.55$, $p < 0.0001$) i třetího ($t = 4.00$, $p = 0.0001$) týdne. V porovnání s oběma týdny byla nachozená vzdálenost v prvním týdnu vyšší.

Rozdíl v celkovém relativním počtu vstupů do středové zóny arény vyšel pro treatment nesignifikantní ($F = 1.38$, $p = 0.2556$). Pro běh ($F = 3.46$, $p = 0.0658$) i váhu ($F = 4.05$, $p = 0.0470$) vyšel tento parametr na hraně statistické významnosti. Efekt interakce váhy s během byl poměrně silný ($F = 5.18$, $p = 0.0251$). Nejvíce vstupů do středové zóny arény bylo pozorováno u treatmentu *KR* oproti *FP* ($F = 1.45$, $p = 0.1490$) i *SR* ($F = 1.45$, $p = 0.1501$). Skupiny *FP* a *SR* byly v tomto parametru téměř totožné ($t = -0.02$, $p = 0.9878$). V prvním týdnu testování byl celkový relativní počet vstupů do středové zóny vyšší než ve druhém ($t = 4.39$, $p < 0.0001$) a třetím ($t = 2.49$, $p = 0.0145$) týdnů.

Shrnutí: Pro naměřené parametry explorační v Open field testu nebyly pro žádný z parametrů potvrzeny statisticky významné rozdíly mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR*. Rozdíl mezi běhy se ukázal být významný pro parametr celkové relativní nachozené vzdálenosti v celé aréně i vyhodnocení nachozené vzdálenosti v jejím středu. Váha vykazuje se všemi exploračními parametry významný korelační vztah. Čím potkani více vážili, tím více nachodili v celé aréně i její prostřední části a celkově více navštěvovali prostřední zónu arény. Pro všechny měřené parametry explorační se také ukázalo, že daný parametr dosahoval nejvyšší hodnoty v prvním týdnu testování v porovnání s následným druhým i třetím vystavením v Open field aréně. Hypotéza H1, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Open field testu výrazně vyšší míru explorační oproti treatmentům *KR* a *SR*, nebyla naplněna.

4.1.2. Vyhodnocení anxiety

Hodnota procenta času stráveného ve středu arény se významně nelišila mezi treatmenty ($F = 0.14$, $p = 0.8736$), běhy ($F = 0.45$, $p = 0.5030$) ani váhou testovaných zvířat ($F = 0.49$, $p = 0.4846$). Z hlediska času stráveného uprostřed arény byly treatmenty *KR* a *FP* velice podobné ($t = 0.09$, $p = 0.9304$) ve prospěch treatmentu *KR*. Skupina *FP* strávila ve středu Open field arény o něco více času oproti skupině *SR* ($t = 0.40$, $p = 0.6878$). Významný rozdíl byl mezi jednotlivými týdny OF testu ($F = 9.28$, $p = 0.0002$). V prvním a třetím týdnu strávili testovaní laboratorní potkani výrazněji více času ve středu arény oproti druhému týdnu (T1: $t = 3.93$, $p = 0.0002$; T3: $t = 2.45$, $p = 0.0160$). Rozdíl mezi prvním a třetím týdnem významný nebyl ($t = 0.95$, $p = 0.3458$).

Rozdíl v procentu času inaktivity v aréně vyšel celkově statisticky nevýznamně pro treatment ($F = 2.22$, $p = 0.1144$) a běh ($F = 1.83$, $p = 0.1798$), ovšem pro váhu významně ($F = 8.84$, $p = 0.0037$). Efekt interakce váhy s během se ukázal být také silný ($F = 5.85$, $p = 0.0175$). Laboratorní potkani z treatmentu *KR* byly v OF aréně celkově více aktivní oproti potkanům ze skupiny *SR* ($t = -2.02$, $p = 0.0457$) a *FP* ($t = -1.56$, $p = 0.1223$). První zmíněný rozdíl vyšel dokonce pod hladinou statistické významnosti $p = 0.0500$. Skupiny *FP* a *SR* se mezi sebou také lišily ($t = -0.46$, $p = 0.6433$), ovšem nikterak výrazně. V prvním týdnu testování byla pro všechna testovaná zvířata celková aktivita v aréně výrazně vyšší než ve druhém ($t = -7.84$, $p < 0.0001$) a třetím ($t = -5.68$, $p < 0.0001$) týdnu.

Projevy urinace a defekace v Open field aréně se mezi treatmenty významně nelišily (urinace: $F = 1.01$, $p = 0.3680$; defekace: $F = 0.51$, $p = 0.5998$). Laboratorní potkani z treatmentu *KR* v aréně častěji urinovali oproti skupině *FP* ($t = 1.33$, $p = 0.1868$) i *SR* ($t = 0.28$, $p = 0.7790$). Oba rozdíly ovšem postrádají statistickou signifikanci. Urinace byla častější i u skupiny *SR* v porovnání s treatmentem *FP* ($t = 1.06$, $p = 0.2931$), zde ovšem také nevýznamně. Projevy defekace byly u treatmentu *KR* oproti *FP* častější ($t = 0.89$, $p = 0.3763$). Skupiny *KR* a *SR* byly v tomto projevu zcela totožné ($t = -0.00$, $p = 1.0000$). V letním běhu A byla zaznamenána výrazně vyšší míra defekace ($t = 2.89$, $p = 0.0047$). Oba projevy se ale významně odlišovaly mezi jednotlivými týdny testování. První týden testování se významně liší od druhého (urinace: $t = 2.39$, $p = 0.0190$; defekace: $t = 2.28$, $p = 0.0246$) a třetího (urinace: $t = 2.39$, $p = 0.0190$; defekace: $t = 3.68$, $p = 0.004$) týdne. Rozdíl mezi druhým a třetím týdnem nebyl v případě urinace vůbec žádný ($t = 0.00$, $p = 1.0000$), v projevech defekace poměrně velký rozdíl byl ($t = 1.83$, $p = 0.0705$).

Shrnutí: Ani pro naměřené parametry anxiety v Open field testu nebyly pro žádný z parametrů potvrzeny statisticky významné rozdíly mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR*. Parametr váhy naznačuje, že čím bylo zvíře těžší, tím bylo v aréně výrazněji méně aktivní. Výrazný rozdíl v parametrech anxiety mezi běhy A a B byl pozorován pouze v defekaci v běhu A, kde byl tento projev výrazně vyšší bez ohledu na treatment. Hodnoty všech měřených parametrů se výrazně lišily mezi týdny testování. Nejvyšší projevy urinace a defekace byly zaznamenány pro první vystavení OF aréně, ovšem oba projevy se nijak významně nelišily mezi sledovanými treatmenty. Hypotéza H1, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Open field testu výrazně nižší míru anxiety oproti treatmentům *KR* a *SR*, nebyla naplněna.

4.2. Elevated plus maze test

Elevated plus test byl proveden v každém ze dvou běhů celkem třikrát (týden 1, týden 2 a týden 3) s časovým odstupem 7, resp. 6 dní. Každý testovaný laboratorní potkan byl umístěn na prostřední platformu EPM aparatury a jeho spontánní aktivita byla nahrávána na 10 min. Po každé expozici byla vnitřní plocha aparatury čištěna 70% ethanolem kvůli eliminaci pachových stop. Projevy urinace a defekace byly zaznamenávány do zápisového listu.

Desetiminutového časového limitu pro nahrávání spontánní aktivity v tomto testu nedosáhla některá testovaná zvířata z důvodu pádů z otevřených ramen aparatury. Po pádu bylo každé zvíře vždy vráceno zpět do bludiště EPM a bylo dále ponecháno volné exploraci do uplynutí výchozího 10minutového měření. Naměřené hodnoty parametrů byly z důvodu pádu z aparatury přepočítány pro všechna testovaná zvířata na relativní hodnoty (výsledná hodnota parametru naměřená do prvního pádu vztažena k času do prvního pádu). Pády byly častější v letním běhu A. Čas do prvního pádu mezi běhy a treatmenty znázorňuje tabulka 2.

Tab. 2: Časy do prvních pádů z aparatury *Elevated plus maze*

kód zvířete	běh A			běh B		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
K1	10:00	10:00	10:00	10:00	04:21	10:00
K2	04:50	10:00	10:00	10:00	10:00	01:01
K3	03:35	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
K4	08:41	02:49	09:07	10:00	08:56	07:20
K5	01:52	10:00	02:40	10:00	10:00	10:00
K6	02:02	09:38	10:00	10:00	10:00	10:00
P1	10:00	01:38	09:47	10:00	10:00	01:47
P2	06:49	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
P3	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00	02:28
P4	10:00	07:08	10:00	10:00	10:00	09:48
P5	07:49	02:55	02:33	10:00	07:06	10:00
P6	07:50	09:25	09:39	10:00	10:00	10:00
S1	04:12	02:26	10:00	10:00	10:00	10:00
S2	10:00	10:00	00:32	10:00	10:00	10:00
S3	10:00	07:34	10:00	10:00	10:00	10:00
S4	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
S5	10:00	09:57	06:01	10:00	10:00	10:00
S6	07:47	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00

Kvůli pádům z aparatury byly pořízené záznamy sestříhány v softwaru Wondershare Uniconverter 13 ve dvou sadách nahrávek. V první sadě byla délka každého videa stanovena stříhem buďto na 10 minut nebo na specifický čas do prvního pádu z otevřeného ramene aparatury (sada relativních hodnot). Ve druhé sadě byla délka každého videa standardizovaná na 6 minut

(sada standardizovaných hodnot). Tím jsme sice v této sadě přišli o některé kratší nahrávky, ale délka videa byla pro validnější porovnání shodná pro všechny nahrávky. Takto upravené dvě sady videí byly následně zanalyzovány v softwaru pro automatické trackování behaviorálních dat Lolitrack v.5.

Elevated plus maze aréna byla v softwaru Lolitrack virtuálně rozdělena na pět zón. Dvě zóny byly tvořeny uzavřenými rameny (50 x 10 x 40 cm), dvě zóny byly tvořeny otevřenými rameny (50 x 10 cm) a jednu zónu tvořila prostřední otevřená platforma (10 x 10 cm). Za bod na těle určující navštívení zóny bylo zvoleno gravitační těžiště zvířete.



Obr. 19: Vymezení zón aparatury EPM

S takto nastavenými parametry byly následně v softwaru Lolitrack analyzovány tyto sledované proměnné:

`EPM_arena_dist_rel` = celková relativní nachozená vzdálenost v aparatuře

`EPM_OAV` = procento vstupů do otevřených ramen ze vstupů do všech ramen

`EPM_OA_latency` = latence prvního vstupu do otevřeného ramene

`EPM_OAT` = procento času stráveného v otevřených ramenech z celkového času

`EPM_arena_inakt` = procento inaktivity v aparatuře

`EPM_uri` = urinace

`EPM_defec` = defekace

`EPM_fall` = pád z otevřeného ramene aparatury

Výstupní hodnoty proměnných ze softwaru Lolitrack byly následně pro obě sady nahrávek statisticky vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na výše uvedené závisle proměnné aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, běh, týden testování a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Jako efekt interakce byl zkoumán parametr váhy s během (A, B). Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byla u všech závisle proměnných dodržena a náhodné efekty a efekt interakce vyšly statisticky nesignifikantní.

Protože se sada vyhodnocení relativních hodnot výrazně nelišila od vyhodnocení sady standardizovaných hodnot, dali jsme při interpretaci výsledků z Elevated plus maze testu přednost sadě relativních hodnot, abychom nemuseli vyřazovat některé nahrávky.

4.1.3. Vyhodnocení exploração

Rozdíl v celkové relativní nachozené vzdálenosti v aparatuře Elevated plus maze vyšel pro treatment velice slabě ($F = 0.10$, $p = 0.9027$). Nachozená vzdálenost mezi treatmenty *KR* a *SR* byla téměř identická ($t = 0.02$, $p = 0.9820$). Laboratorní potkani z treatmentu *FP* nachodili jen o něco méně oproti treatmentu *KR* ($t = -0.40$, $p = 0.6920$) a *SR* ($t = -0.38$, $p = 0.7012$). Rozdíl v nachozené vzdálenosti byl ale významný mezi běhy ($F = 17.54$, $p = 0.001$). Váha byla pro nachozenou vzdálenost v EPM aparatuře poměrně silný faktor ($F = 2.61$, $p = 0.1094$), ovšem statisticky nevýznamný. Interakce běhu s váhou vyšla pro tento paramet statisticky signifikantní ($F = 13.95$, $p = 0.0003$). Testování laboratorní potkani obecně nachodili v aparatuře EPM nejvíce ve třetím týdnu testování. Třetí týden se výrazně lišil od prvního ($t = 2.83$, $p = 0.0057$) a druhého týdne ($t = 3.61$, $p = 0.0005$).

Procento vstupů do otevřených ramen ze vstupů do všech ramen nebylo statisticky významně rozdílné pro treatment ($F = 1.30$, $p = 0.2811$) ani opakování mezi týdny ($F = 2.61$, $p = 0.1117$). Větší procento vstupů do otevřených ramen bylo pozorováno u treatmentu *FP* oproti *SR* ($t = 1.49$, $p = 0.1418$) i *KR* ($t = 0.19$, $p = 0.8497$), rozdíl ale ani v jednom případě statisticky významný nebyl. Váha se ale ukázala být významným faktorem ($F = 4.53$, $p = 0.0373$). Těžší potkani navštěvovali otevřená ramena více než ti lehčí. Rozdíl mezi běhy se pro tento parametr ukázal být bezvýznamný ($F = 0.00$, $p = 0.9727$).

Shrnutí: Pro oba naměřené parametry exploração v Elevated plus maze testu nebyly potvrzeny statisticky významné rozdíly mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR*. Z hlediska celkové nachozené vzdálenosti v aparatuře EPM se ukázalo, že testování laboratorní potkani byli více aktivní v letním běhu než v zimním. Ze tří testovaných týdnů byla z hlediska nachozené vzdálenosti v aparatuře u třetího týdne naměřena statisticky významně vyšší hodnota. Také se ukázalo, že váha měla významný vliv na procento návštěv v obou otevřených ramenech aparatury EPM. Hypotéza H1, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Elevated plus výrazně vyšší míru exploração oproti treatmentům *KR* a *SR*, nebyla naplněna.

4.1.4. Vyhodnocení anxiety

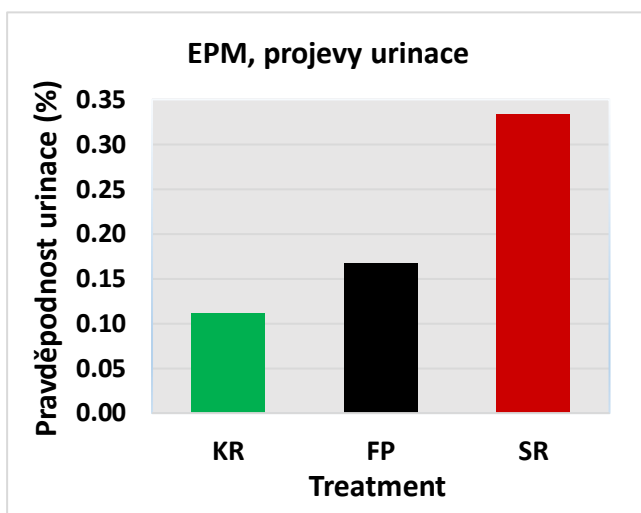
Rozdíl v latenci prvního vstupu do otevřeného ramene vyšel téměř nulový mezi treatmenty ($F = 0.03$, $p = 0.9688$), byl slabý mezi běhy ($F = 3.68$, $p = 0.7055$) a statisticky nevýznamný pro parametr váhy ($F = 1.13$, $p = 0.2900$). Latence prvního vstupu do otevřeného ramene byla u treatmentů *KR* a *FP* velice podobná ($t = 0.08$, $p = 0.9376$). Rozdíl mezi skupinami *FP* a *SR* v tomto parametru rovněž nebyl významný ($t = 0.17$, $p = 0.8630$). Významný rozdíl v latenci vstupu do otevřeného ramene byl potvrzen mezi všemi třemi týdny testování ($F = 15.96$, $p < 0.0001$). Nejvíce signifikantní rozdíl v latenci byl mezi 2. a 3. testovacím týdnem ($t = 5.25$, $p < 0.0001$), kdy ve 3. týdnu byla latence prvního vstupu do otevřeného ramene výrazně nižší.

Z hlediska času stráveném v otevřených ramenech nebyl naměřen statisticky významný rozdíl mezi treatmenty ($F = 0.46$, $p = 0.6331$) ani běhy ($F = 1.95$, $p = 0.1657$). Laboratorní potkani ze skupin *FP* a *SR* strávily v otevřených ramenech podobné procento času ($t = -0.12$, $p = 0.9011$). Treatment *KR* strávil v otevřených ramenech méně času oproti skupině *FP* ($t = -0.76$, $p = 0.4463$), ale rozdíl nebyl statisticky významný. Efekt váhy testovaných zvířat byl blízko statistické významnosti ($F = 2.92$, $p = 0.0906$). Celkový rozdíl v čase stráveném v otevřených ramenech byl významný pouze mezi druhým a třetím týdnem testování ($F = 3.33$, $p = 0.0399$) ve prospěch třetího týdne.

Inaktivita v aparatuře EPM nebyla významně odlišná mezi treatmenty ($F = 0.50$, $p = 0.6064$) a ani z hlediska váhy testovaných zvířat ($F = 1.90$, $p = 0.1714$). Procento inaktivity bylo podobné mezi treatmenty *FP* a *SR* ($t = -0.19$, $p = 0.8501$) a rozdílné mezi skupinami *FP* a *KR* ($t = 0.76$, $p = 0.4474$), ovšem statisticky nevýznamně. Efekt interakce běhu s váhou ($F = 9.84$, $p = 0.0023$) vyšel z hlediska inaktivity jako statisticky významný. První a třetí týden testování vykazovaly výrazně vyšší procento aktivity oproti druhému týdnu ($t = -2.70$, $p = 0.0082$; $t = -3.17$, $p = 0.0021$).

Projevy urinace se významně lišily mezi treatmenty ($F = 3.25$, $p = 0.0430$) i mezi jednotlivými týdny testování ($F = 6.92$, $p = 0.0015$). Urinace byla výrazně nižší u treatmentu *KR* oproti *SR* ($t = -2.38$, $p = 0.0192$), avšak statisticky nevýznamně nižší vůči *FP* ($t = -0.73$, $p = 0.4663$). Rozdíl mezi skupinami *FP* a *SR* se ukázal být na hraně statistické významnosti ($t = -1.78$, $p = 0.0782$). Celkově výraznější projevy urinace byly pozorovány v prvním týdnu testování oproti druhému ($t = 3.12$, $p = 0.0024$)

a třetímu ($t = 2.90$, $p = 0.0046$) týdnu. Projevy defekace nemohly být kvůli nízkému počtu pozorování tohoto projevu v EPM testu vyhodnoceny.



Obr. 20: Projevy urinace mezi treatmenty v EPM

Shnutí: Ze všech naměřených parametrů anxiety v Elevated plus maze testu byl jako statisticky významný rozdíl mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR* potvrzen pouze projev urinace. Dále jako statisticky významný se u všech naměřených parametrů ukázal být rozdíl mezi jednotlivými týdny (opakováními) testování. Efekt váhy se u žádného z parametrů anxiety neprokázal jako statisticky významný. Hypotéza H1, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Elevated plus maze testu výrazně nižší míru anxiety oproti treatmentům *KR* a *SR*, nebyla naplněna.

Celkové přehledové vyhodnocení explorační anxiety:

V tabulce 3 jsou zobrazeny celkové rozdíly všech sledovaných parametrů *Open field* testu. Rozdíly, které vyšly pod hladinou statistické významnosti $p < 0.050$ jsou v tabulce označeny zeleně. Kompletní přehledová tabulka je dostupná v přílohové sekci.

Tab. 3: Rozdíly v měřených parametrech *Open field* testu (editovaný výsek z kompletní tabulky)

Open field test	rozdíl mezi treatmenty:	rozdíl mezi běhy:	rozdíl mezi týdny:
OF_arena_dist_rel	nevýznamný	významný	významný
OF_middlezone_dist_rel	nevýznamný	na hraně význ.	významný
OF_middlezone_visits_rel	nevýznamný	nevýznamný	významný
OF_middlezone_time	nevýznamný	nevýznamný	významný
OF_arena_inakt_	nevýznamný	nevýznamný	významný
OF_uri	nevýznamný	nevýznamný	významný
OF_defe	nevýznamný	významný	významný

Tabulka 4 zobrazuje celkové rozdíly ve vyhodnocení všech měřených parametrů testu *Elevated plus maze*. Rozdíly, které vyšly pod hladinou statistické významnosti $p < 0.050$ jsou v tabulce označeny zeleně. Kompletní přehledová tabulka je dostupná v přílohové sekci.

Tab. 4: Rozdíly v měřených parametrech *Elevated plus maze* testu (editovaný výsek z kompletní tabulky)

Elevated plus maze test	rozdíl mezi treatmenty:	rozdíl mezi běhy:	rozdíl mezi týdny:
EPM_arena_dist_rel	nevýznamný	nevýznamný	významný
EPM_OAV	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamný
EPM_OA_latency	nevýznamný	na hraně význ.	významný
EPM_OAT	nevýznamný	nevýznamný	významný
EPM_inakt	nevýznamný	nevýznamný	významný
EPM_uri	významný (SR>KR)	nevýznamný	významný
EPM_defe	N/A (malý vzorek)	N/A (malý vzorek)	N/A (malý vzorek)
EPM_fall (běh A)	nevýznamný	N/A (malý vzorek)	nevýznamný

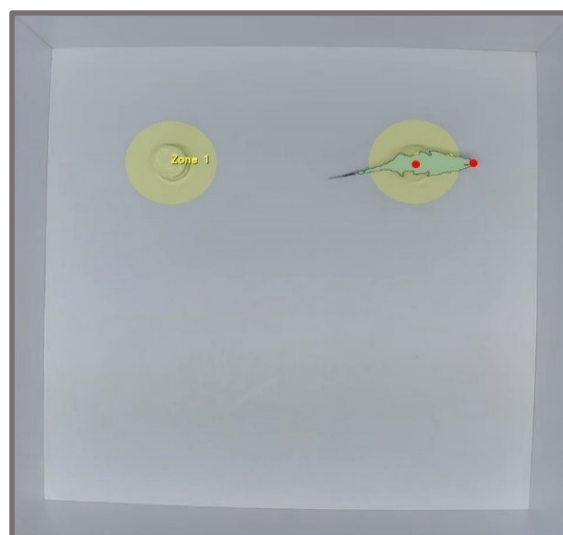
4.3. Novel object recognition test

NOR byl rozdělen do tří testovacích fází. Všechny fáze byly provedeny ve třech po sobě jdoucích dnech. První fáze byla vyhodnocena jako klasický *Open field* test. V následujících fázích, v nichž byly do arény přidány objekty, byl každý testovaný laboratorní potkan umístěn vždy do spodní části OF arény zády k objektům a jeho spontánní aktivita byla nahrávána na 10 minut ve fázi IIa a III a na 5 minut ve fázi IIb. Mezi jednotlivými expozicemi v tomto testu nebyl, s výjimkou fáze I, čištěn vnitřek arény 70% ethanolem z důvodu nasycení arény olfaktorickými stimuly, ale pouze vodou. Vnitřek arény včetně objektů v něm byl však čištěn 70% ethanolem mezi jednotlivými fázemi (tzn. dny testování).

Z důvodu nežádoucího vyskakování testovaných laboratorních potkanů z OF arény při NOR testu nedosáhla 10minutového, resp. 5minutového časového limitu pro exploraci objektů všechna testovaná zvířata. Po vyskočení z arény bylo toto zvíře vždy vráceno zpět do své domovské Duna klece a test byl pro něho ukončen. Ve fázi IIa a IIb testování NOR letního běhu (A) vyskočil z Open field arény před časovým limitem laboratorní potkan K6 z treatmentu KR. Jelikož tento jedinec neměl zájem o výchozí objekty ve fázi II, byl vyloučen z testování záměny objektů ve fázi III. Ve fázi IIb zimního běhu (B) z arény vyskočil ven jedinec K4 z treatmentu KR a proto ve fázi III také nebyl testován. Ve fázi III tohoto běhu vyskočili z arény ještě další dva laboratorní potkani K1 a K2 z treatmentu KR. Jelikož se ale jednalo o vyskočení z arény až ve finální fázi testu, záznamy byly ponechány k vyhodnocení. K tomu navíc nahrávka aktivity u testovaného laboratorního potkana S6 byla ve fázi IIa zkrácena o posledních 31 vteřin záběru z důvodu poškozeného videosouboru. Měřené parametry explorace byly z obou výše jmenovaných důvodů zkrácení záběrů přepočítány pro všechna testovaná zvířata na relativní hodnoty (výsledná hodnota parametru naměřená ve zkráceném záběru vztažena k přesnému času zkráceného záběru).

Pořízené záznamy byly nejprve sestříhány v softwaru Wondershare Uniconverter 13. Délka každého videa byla stanovena stříhem dle příslušné testovací fáze buďto na 10 nebo 5 minut, popřípadě na specifický čas zkráceného záběru. Takto upravená videa byla následně zanalyzována v softwaru pro automatické trackování behaviorálních dat Lolitrack v.5.

V okolí objektů umístěných v Open field aréně byly v softwaru Lolitrack vymezeny dvě virtuální zóny jejíž perimetr byl obou případech do vzdálenosti 5 cm od hrany objektu. Za bod na těle určující navštívení zóny objektu byla zvolena hlava zvířete. Při vyhodnocení takto nastavených parametrů ovšem vznikala nežádoucí situace, v níž si testovaný laboratorní potkan na objekt vylezl, posadil se zde a hlavou se natahoval mimo



Obr. 21: Potřž s vyhodnocením opakovaných vstupů v NOR testu

vymezenou zónu objektu (*Obr.21*). Když poté vrátil hlavu zpět do zóny, byl tento pohyb v softwaru Lolitrack vyhodnocený jako další vstup do zóny objektu. Z tohoto důvodu bylo v softwaru nastaveno také stopování pánevní oblasti těla zvířete, aby na všechny vyhodnocené parametry testu mohla být aplikovaná post hoc korekce. Ta byla provedena v programu Excel pro všechny výstupní soubory ze softwaru Lolitrack a spočívala v kontrole, zdali je testované zvíře pánevní oblastí těla v zóně objektu. Pokud ano, vrátil-li se do oblasti hlavou, nebyla taková interakce vyhodnocena jako další vstup do zóny objektu. Rovněž čas strávený v zóně byl v takovém případě navýšen o čas, který testované zvíře strávilo sezením na objektu, zatímco jeho hlavová část se nacházela mimo zónu.

Pro každé testované zvíře byly v NOR testu sledovány tyto parametry:

NOR_arena_dist_rel = celková relativní nachozená vzdálenost v aréně pro fáze IIa–III

NOR_arena_inakt = procento inaktivity v aréně pro fáze IIa–III

e1 = čas strávený v zóně obou objektů ve fázi IIa (5 min)

e2 = čas strávený v zóně obou objektů ve fázi IIb (5 min)

e3 = čas strávený v zóně obou objektů ve fázi III (5 min)

TZo = čas strávený v zóně výchozího objektu ve fázi III (10 min)

TZn = čas strávený v zóně nového objektu ve fázi III (10 min)

VISo = počet návštěv výchozího objektu ve fázi III (10 min)

VISn = počet návštěv nového objektu ve fázi III (10 min)

Výstupní hodnoty parametrů ze softwaru Lolitrack vyjádřeny v absolutních číslech byly po provedené korekci přepočítány v programu Excel na indexy explorace a kognice pro NOR test:

NOR_ih1 = index habituace explorativního chování (fáze IIa vs IIb) $NOR_{ih1} = e1 - e2$

NOR_ih2 = index habituace explorativního chování (fáze IIa vs III) $NOR_{ih2} = e1 - e3$

NOR_ih3 = index habituace explorativního chování (fáze IIb vs III) $NOR_{ih3} = e2 - e3$

NOR_D1 = index diskriminace mezi novým a familiárním objektem $NOR_{D1} = TZn - TZo$

NOR_DI = index diskriminace mezi novým a familiárním objektem $NOR_{DI} = \frac{D1}{e3}$

NOR_RI = index rekognice $NOR_{RI} = \frac{TZn}{e3}$

NOR_VI = index návštěv (nový vs. familiární objekt) $NOR_{VI} = \frac{VISn}{VISn + VISo}$

Parametry explorační a všechny spočítané indexy kognice byly následně statisticky vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na tyto závislé proměnné aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, fáze NOR testu, běh a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Jako efekt interakce byl zkoumán parametr váhy s během (A, B). Pro všechny závislé proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byla u všech závislé proměnných dodržena a náhodné efekty i efekt interakce vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.3.1. Vyhodnocení explorační

Rozdíl v celkové relativní nachozené vzdálenosti v aréně vyšel statisticky nevýznamný mezi treatmenty ($F = 1.02$, $p = 0.3662$), běhy ($F = 0.10$, $p = 0.7533$) i váhou ($F = 2.68$, $p = 0.1054$). Nejvíce nachodili v aréně laboratorní potkani z treatmentu *KR* oproti *SR* ($t = 1.42$, $p = 0.1588$) i *FP* ($t = 0.76$, $p = 0.4470$). V obou případech postrádá rozdíl statistickou významnost. Treatment *FP* nachodil v aréně větší celkovou relativní vzdálenost oproti skupině *SR* ($t = 0.62$, $p = 0.5345$), rozdíl je ovšem také nevýznamný. V nachozené vzdálenosti se od sebe výrazně lišily jednotlivé po sobě jdoucí fáze. Ve fázi IIa byla celková relativní nachozená vzdálenost významně vyšší oproti fázi IIb ($t = 2.59$, $p = 0.0113$) i fázi III ($t = 5.22$, $p < 0.0001$). Fáze IIb a III se od sebe také významně lišily ve prospěch fáze IIb ($t = 2.63$, $p = 0.0103$).

Procento času inaktivity v aréně nebylo významně odlišné pro treatment ($F = 1.90$, $p = 0.1565$), běh ($F = 0.13$, $p = 0.7150$), ani váhu ($F = 1.38$, $p = 0.2442$). Nejméně aktivní byl treatment *SR* oproti *KR* ($t = 1.83$, $p = 0.0703$) a *FP* ($t = 1.30$, $p = 0.1968$). První ze zmíněných rozdílů se blížil hranici statistické významnosti. Treatment *FP* byl oproti *KR* ($t = 0.59$, $p = 0.5572$) také o něco méně aktivní, ovšem nevýznamně. Fáze IIa vykazovala výrazně vyšší procento aktivity vůči fázi IIb ($t = 2.81$, $p = 0.0062$) a fázi III ($t = 4.09$, $p = 0.0001$).

Všechny tři typy ukazatelů habituace explorativního chování se ukázaly být v rozdílech pro treatment jako statisticky nevýznamné (ih1: $F = 0.59$, $p = 0.5670$; ih2: $F = 1.69$, $p = 0.2154$; ih3: $F = 0.95$, $p = 0.4078$). To znamená, že nebyly potvrzeny významné rozdíly v tom, o kolik méně nebo více času strávili testovaní laboratorní potkani z treatmentů *KR*, *FP* a *SR* u obou objektů v porovnání s příslušnými fázemi testování. Statisticky nesignifikantní rozdíl byl naměřen i mezi běhy (ih1: $F = 0.13$, $p = 0.7227$; ih2: $F = 0.63$, $p = 0.4407$; ih3: $F = 0.68$, $p = 0.4211$) a v kovariátu s váhou (ih1: $F = 0.01$, $p = 0.9102$; ih2: $F = 0.03$, $p = 0.8552$; ih3: $F = 0.02$, $p = 0.8994$). Váha testovaných zvířat se ukázala být obzvláště slabým faktorem pro vysvětlení habituace explorativního chování.

Shrnutí: Parametry explorační v prostředí Open field arény NOR testu neukázaly statisticky významné rozdíly mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR*, váhou a ani letním (A) a zimním (B) během. V nachozené vzdálenosti a inaktivitě v aréně se od sebe výrazně lišily jednotlivé po sobě jdoucí fáze. Hypotéza H1, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Novel object recognition testu vyšší míru explorační oproti treatmentům *KR* a *SR*, nebyla naplněna.

4.3.2. Vyhodnocení kognice

Oba indexy diskriminace mezi novým a familiárním objektem vyšly statisticky nevýznamně z hlediska rozdílu mezi treatmenty (D1: $F = 1.68$, $p = 0.2169$; DI: $F = 0.17$, $p = 0.8454$), běhy (D1: $F = 0.67$, $p = 0.4238$; DI: $F = 1.30$, $p = 0.2709$) i faktorem váhy (D1: $F = 0.08$, $p = 0.7820$; DI: $F = 0.03$, $p = 0.8669$). Rozdíl v indexu D1 mezi treatmenty *KR* a *FP* byl blízko hraně statistické významnosti ($t = 1.79$, $p = 0.0920$) ve prospěch skupiny *KR*. To znamená, že tato skupina strávila ve fázi III v zóně u nového objektu více času než u familiárního objektu. Rozdíl v indexu diskriminace D1 mezi treatmenty *FP* a *SR* ($t = -1.25$, $p = 0.2292$) byl také znát, byl ovšem méně výrazný. Oproti tom druhý index diskriminace DI vyšel mezi treatmenty se slabým rozdílem. Rozdíl mezi skupinami *FP* a *SR* ($t = -0.22$, $p = 0.8267$) byl nevýrazný ve prospěch treatmentu *SR*. V indexu diskriminace DI mezi skupinami *FP* a *KR* také příliš velký rozdíl nebyl ($t = 0.39$, $p = 0.6981$).

Ani rozdíl v indexu rekognice se neprokázal být statisticky významný mezi treatmenty ($F = 1.93$, $p = 0.1780$), běhy ($F = 2.74$, $p = 0.1171$) a už vůbec ne v kovarianci s váhou ($F = 0.0$, 0.9876). Laboratorní potkani z obou treatmentů *KR* i *SR* projevily lepší schopnost rekognice vůči skupině *FP* ($t = 1.74$, $p = 0.1018$; $t = 1.69$, $p = 0.1106$). To znamená, že u nového objektu ve fázi III strávili větší poměr času vzhledem k celkovému strávenému času u obou zkoumaných objektů v této fázi. Ani v jednom porovnání ale rozdíl nebyl statisticky významný. Treatmenty *KR* a *SR* se od sebe v tomto indexu vzájemně výrazně nelišily ($t = 0.30$, $p = 0.7670$).

Index návštěv mezi familiárním a novým objektem vyšel ve svém rozdílu jako statisticky nevýznamný pro treatment ($F = 1.70$, $p = 0.2144$), běh ($F = 2.46$, $t = 0.1361$) i váhu ($F = 0.53$, $p = 0.4759$). Laboratorní potkani z obou skupin *KR* i *SR* věnovali více návštěv novému objektu vůči familiárnímu objektu v porovnání se skupinou *FP* ($t = 1.70$; $p = 0.1080$; $t = 1.46$, 0.1643). Skupiny *KR* a *SR* se od sebe v tomto indexu vzájemně příliš nelišily ($t = 0.47$, $p = 0.6481$).

Shrnutí: Parametry kognice v prostředí Open field arény NOR testu neprokázaly statisticky významné rozdíly mezi treatmenty *FP*, *KR* a *SR*, váhou a ani letním (A) a zimním (B) během. Paměťové dovednosti by se mohly zdát lepší u treatmentu *KR* oproti skupině *FP*, ovšem v žádném z měřených indexů nebyly rozdíly mezi skupinami prokázány na hladině $p < 0.0500$ pro statistickou významnost. Hypotéza H2, která předpokládala, že treatment *FP* projeví v Novel object recognition testu lepší paměťové schopnosti, nebyla verifikována.

4.4. Y-maze – test kognitivní flexibility

Test kognitivní flexibility v prostředí Y-bludiště byl rozdělen do tří testovacích fází. Pořadí a načasování jednotlivých fází v testu již byly znázorněny na schématu Tab. 1 v úvodu do kapitoly 3. Během každého testovacího dne fáze II a III byl testovaný laboratorní potkan umístěn do výchozího bodu bludiště zády k otevřené chodbě, a to čtyřikrát sám po sobě. Po každém vložení byl vnitřek bludiště čištěn 70% ethanolem kvůli eliminaci pachových stop. Snědená porce odměny byla vždy doplněna do nádoby s otvorem v „S“ rameni. Úspěchy v testu byly zaznamenávány do záznamového archu. Kritérium pro úspěch pro postup do fáze III přeučení byl stanoven na dosažení 75% úspěšnosti alespoň v jedné z posledních dvou sérií II. fáze testu. Tomuto kritériu nevyhověla v letním běhu (A) dvě testovaná zvířata S3 a P4, a proto nebyla ve fázi III na kognitivní flexibilitu testována. V zimním běhu (B) kritériu vyhověla všechna testovaná zvířata.

Záznamy o úspěšnosti z každé série testování uvedené v záznamovém archu byly převedeny na skóre 0–4. Tím vzniklo 6 parametrů pro výpočet schopnosti učení a 4 parametry pro výpočet schopnosti kognitivní flexibility.

YM_1_learning = skóre pro 1. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze (metoda shaping)

YM_2_learning = skóre pro 2. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze (metoda shaping)

YM_3_learning = skóre pro 3. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze

YM_4_learning = skóre pro 4. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze

YM_5_learning = skóre pro 5. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze

YM_6_learning = skóre pro 6. sérii testování učení na jedno rameno Y-maze

YM_7_reversal = skóre pro 1. sérii testování přeučení na druhé rameno Y-maze

YM_8_reversal = skóre pro 2. sérii testování přeučení na druhé rameno Y-maze

YM_9_reversal = skóre pro 3. sérii testování přeučení na druhé rameno Y-maze

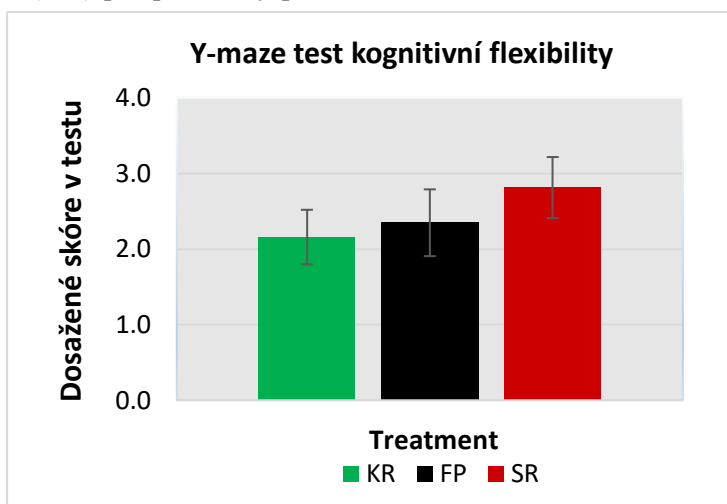
YM_10_reversal = skóre pro 4. sérii testování přeučení na druhé rameno Y-maze

Jelikož metoda shaping byla provedena kvůli značnému usnadnění v navádění testovaného zvířete do „S“ ramene pro získání odměny, nebyly parametry YM_1_learning a YM_2_learning zahrnuty do výpočtů. Zbývá sada čtyř parametrů pro učení na jedno rameno Y-maze a sada čtyř parametrů pro přeučení na druhé rameno Y-maze byly statisticky vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na tyto dvě sady závisle proměnných aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, běh, série Y-maze testu a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Jako efekt interakce byl zkoumán parametr váhy s během (A, B). Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byla u všech závisle proměnných dodržena a náhodné efekty i efekt interakce vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.3.3. Vyhodnocení kognice

Rozdíl v dosaženém skóre (0–4) pro parametry učení na jedno rameno ve Y-maze testu nebyl statisticky významný mezi treatmenty ($F = 0.59$, $p = 0.5558$), běhy ($F = 1.29$, $p = 0.2578$), jednotlivý sériemi ($F = 0.23$, $p = 0.8737$), ani pro kovarianci s váhou ($F = 0.53$, $p = 0.4683$). Celkově se lépe učili laboratorní potkani z treatmentu *FP* oproti skupině *KR* ($t = 1.08$, $p = 0.2825$) a *SR* ($t = 0.42$, $p = 0.6722$). Rozdíl ale nebyl ani v jednom případě statisticky významný. Treatment *SR* byl oproti skupině *KR* v učení také o něco lepší ($t = 0.69$, $p = 0.4896$). I v tomto případě ovšem rozdíl postrádal statistickou signifikanci. Vzájemné porovnání všech čtyř sérií učení na jedno rameno ve Y-maze dle dosaženého skóre nebylo v žádném z případů nad hodnotou $|t| > 0.80$ a pod hladinou statistické významnosti $p = 0.4000$, proto zde jednotlivá porovnání nebudou dále rozváděna.

Vyhodnocení kognitivní flexibility dopadlo vzhledem k výsledkům učení v zásadě odlišně. Rozdíl v dosaženém skóre (0–4) pro parametry přeučení na druhé rameno ve Y-maze testu byl pro treatment lehce pod hranou statistické významnosti ($F = 3.24$, $t = 0.0429$). Výrazně lepší schopnosti kognitivní flexibility projevili laboratorní potkani z treatmentu *SR* oproti skupině *KR* ($t = 2.39$, $p = 0.0183$) i *FP* ($t = 1.72$, $p = 0.0874$). V prvním případě byl rozdíl statisticky významný, ve druhém případě se rozdíl blížil statistické signifikanci na hladině $p = 0.0500$. Treatmenty *FP* a *KR* se od sebe také lišily



Obr. 22: Dosažené skóre ve fázi III testu Y-maze (přeučení)

($t = 0.63$, $p = 0.5294$) ve prospěch lepší schopnosti kognitivní flexibility skupiny *FP*. Tento rozdíl ovšem zas tak významný nebyl. Velice významné rozdíly byly nalezeny mezi sériemi přeučení ($F = 37.85$, $p < 0.0001$). Vzájemné porovnání všech sérií bylo nad hodnotou $|t| > 4.00$ a pod hladinou $p = 0.0001$ s výjimkou rozdílu mezi 2. a 3. sérií, který byl na hraně statistické významnosti ($t = -1.88$, $p = 0.0624$). Kovariance s váhou ($F = 8.04$, $p = 0.0054$) se ukázala být také statisticky významným faktorem. Více vážící laboratorní potkani projevily výrazně lepší schopnost kognitivní flexibility.

Shrnutí: Kognitivní dovednosti testovaných laboratorních potkanů se výrazně nelišily ve fázi II učení na jedno rameno Y-maze testu, kde sice treatment *FP* projevily lepší schopnost učení oproti skupině *KR* i *SR*, ovšem rozdíl postrádal statistickou signifikanci. Ve fázi III přeučení na druhé rameno Y-maze testu byl ovšem významně lepší treatment *SR* oproti treatmentu *KR* a nevýznamně lepší oproti treatmentu *FP*. Hypotéza H2, která předpokládala, že laboratorní potkani Long-Evans z treatmentu *FP* zvládnou proces učení na jedno rameno a následující test reverzního učení výrazně rychleji a s výrazně vyšším skóre, nebyla verifikována.

Celkové přehledové vyhodnocení kognice

Tabulka 5 zobrazuje celkové rozdíly ve vyhodnocení všech měřených parametrů testu *Novel object recognition*. Rozdíly, které vyšly pod hladinou statistické významnosti $p < 0.050$ jsou v tabulce označeny zeleně. Kompletní přehledová tabulka je dostupná v přílohové sekci.

Tab. 5: Rozdíly v měřených parametrech NOR testu (editovaný výsek z kompletní tabulky)

Novel object recognition test	rozdíl mezi treatmenty:	rozdíl mezi běhy:	rozdíl mezi fázemi
NOR_arena_dist_rel	nevýznamný	nevýznamný	významný
NOR_arena_inakt_	nevýznamný	nevýznamný	významný
NOR_ih1_5min	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_ih2_5min	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_ih3_5min	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_D1	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_DI	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_RI	nevýznamný	nevýznamný	-
NOR_VI	nevýznamný	nevýznamný	-

Tabulka 6 shrnuje celkové rozdíly u obou sledovaných parametrů *Y-maze* testu. Rozdíly, které vyšly pod hladinou statistické významnosti $p < 0.050$ jsou v tabulce označeny zeleně. Kompletní přehledová tabulka je dostupná v přílohové sekci.

Tab. 6: Rozdíly v měřených parametrech Y-maze testu (editovaný výsek z kompletní tabulky)

Y-maze test kognitivní flex.	rozdíl mezi treatmenty:	rozdíl mezi běhy:	rozdíl mezi sériemi:
YM_learning	nevýznamný	nevýznamný	celkově nevýznamný
YM_reversal	Významný (SR>KR)	nevýznamný	celkově významný

4.5. Beam walking test

Beam walking test byl realizován během jednoho dne testování. Každý testovaný laboratorní potkan byl vložen na jeden ze tří typů kladiny (A, B, C) zády k přihrádce aparatury. Jeho pohyblivá aktivita byla nahrávána na kameru. Poté, co byla jednomu typu kladiny vystavena všechna testovaná zvířata, pokračovalo se ve vystavení dalšímu typu kladiny. Vystavení všem třem typům kladiny uzavíralo pro testované zvíře jednu sérii testu. Každý laboratorní potkan byl během testovacího dne vystaven třem po sobě jdoucím sériím *Beam walking* testu.

Po každé jednotlivé expozici testovaného zvířete kladině byly do záznamového archu zaznamenány tři možné stavy vyhodnocení – úspěch, pád a limit. Aritmetické rozdíly mezi přesným časem vložení testovaného zvířete na kladinu a přesným časem úspěšného dosažení stabilní přihrádky nebo přesným časem pádu z kladiny, byly vyhodnoceny dodatečně z pořízených kamerových záznamů. Jako bod na těle, jenž určoval, zdali zvíře dosáhlo oblasti stabilní přihrádky, byla zvolena pánevní oblast testovaného zvířete. Čas limitu byl stanoven na 120 vteřin. Distribuce jednotlivých pádů v *Beam walking* testu se u tohoto testu značně lišily mezi letním během (A) a zimním během (B). Znázornění úspěchů (zeleně), pádů (červeně) a limitů (modře) udává tabulka 7. Každý blok tabulky představuje jednu sérii testu. Písmeno A, B, C udává typ kladiny. Číslo v zeleném / červeném / modrém poli značí čas dosažení přihrádky / pádu z kladiny.

Tab. 7: Distribuce úspěchů, pádů a dosažených limitů mezi dvěma běhy a třemi sériemi testu BWT

	1. série							2. série							3. série					
	Běh A			Běh B				Běh A			Běh B				Běh A			Běh B		
	A	B	C	A	B	C		A	B	C	A	B	C		A	B	C	A	B	C
K 1	56	33	31	120	120	32	K 1	5	60	27	16	107	24	K 1	61	35	4	8	37	34
K 2	4	86	33	105	50	59	K 2	46	120	14	11	36	120	K 2	81	3	6	120	21	70
K 3	101	120	35	120	120	67	K 3	34	120	6	55	15	21	K 3	27	17	6	3	6	3
K 4	39	120	19	79	3	32	K 4	28	120	8	17	31	22	K 4	9	120	11	5	14	12
K 5	81	38	4	111	33	57	K 5	39	28	2	14	38	21	K 5	9	19	85	15	19	14
K 6	116	120	52	116	68	58	K 6	33	41	25	46	24	41	K 6	26	33	24	48	74	37
P 1	30	6	9	120	120	28	P 1	35	5	17	120	120	108	P 1	11	120	9	119	105	64
P 2	93	120	12	120	120	120	P 2	11	120	14	120	7	120	P 2	9	120	10	74	35	37
P 3	23	18	18	120	120	43	P 3	12	86	10	8	10	6	P 3	26	22	42	4	31	7
P 4	80	120	10	89	55	26	P 4	33	120	37	37	13	30	P 4	78	120	49	25	22	35
P 5	43	120	10	120	120	108	P 5	11	31	1	69	44	21	P 5	7	42	6	34	31	22
P 6	18	120	13	85	58	25	P 6	13	120	16	30	113	42	P 6	10	32	6	9	35	27
S 1	29	33	7	120	120	2	S 1	26	58	15	120	120	115	S 1	25	19	17	120	120	120
S 2	82	82	1	120	120	101	S 2	47	75	3	90	120	44	S 2	42	25	16	62	55	73
S 3	92	115	21	112	96	37	S 3	18	120	108	103	43	32	S 3	24	120	8	6	43	5
S 4	57	47	39	120	60	4	S 4	11	39	11	26	24	39	S 4	11	25	14	28	15	56
S 5	69	120	17	120	120	27	S 5	17	37	12	50	120	14	S 5	12	14	37	108	29	9
S 6	57	36	17	120	120	111	S 6	50	118	9	54	46	62	S 6	72	76	5	38	38	62

Z důvodu toho, že pro vyhodnocení každé expozice jednomu ze tří typů kladiny náležely tři stavy (úspěch, pád, limit) a test obnášel tři série, bylo pro vyhodnocení *Beam walking* testu vytvořeno dohromady 27 parametrů. Do těchto parametrů byly dosazeny aritmetické rozdíly mezi přesným časem vložení zvířete na testovanou kladinu a buďto přesným časem úspěšného dosažení stabilní přihrádky (parametry pro úspěch) anebo přesným časem pádu z kladiny (parametry pro pád). Parametry pro limit sloužili pouze jako kategoriální proměnná.

Tabulka 8: Parametry pro vyhodnocení *Beam walking* testu

Parametry pro úspěch	Parametry pro pád	Parametry pro limit
BWT_1_A_success	BWT_1_A_fall	BWT_1_A_limit
BWT_1_B_success	BWT_1_B_fall	BWT_1_B_limit
BWT_1_C_success	BWT_1_C_fall	BWT_1_C_limit
BWT_2_A_success	BWT_2_A_fall	BWT_2_A_limit
BWT_2_B_success	BWT_2_B_fall	BWT_2_B_limit
BWT_2_C_success	BWT_2_C_fall	BWT_2_C_limit
BWT_3_A_success	BWT_3_A_fall	BWT_3_A_limit
BWT_3_B_success	BWT_3_B_fall	BWT_3_B_limit
BWT_3_C_success	BWT_3_C_fall	BWT_3_C_limit

Z těchto parametrů byly v *Beam walking* testu statisticky vyhodnoceny tři modely:

- 1) Za jak rychle se testovaný laboratorní potkan dokáže dostat do přihrádky po vložení na vzdálený konec kladiny (čas v sekundách)
- 2) Za jak rychle testovaný laboratorní potkan z kladiny spadne na molitanovou žíněnku (čas v sekundách)
- 3) Jaká je procentuální pravděpodobnost úspěchu testu, když za neúspěch jsou považovány stavy pádu a limitu (vyjádřeno v %)

Kvůli zásadně odlišné distribuci parametrů pro úspěch, pád a limit mezi letním (A) a zimním během (B) byly tyto parametry analyzovány pro každý z běhů a příslušný typ kladiny zvlášť. Parametry byly vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na parametry proměnných reprezentující jeden ze tří modelů aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, série BWT testu a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byly u všech závisle proměnných dodrženy a náhodné efekty vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.3.4. Vyhodnocení motoriky

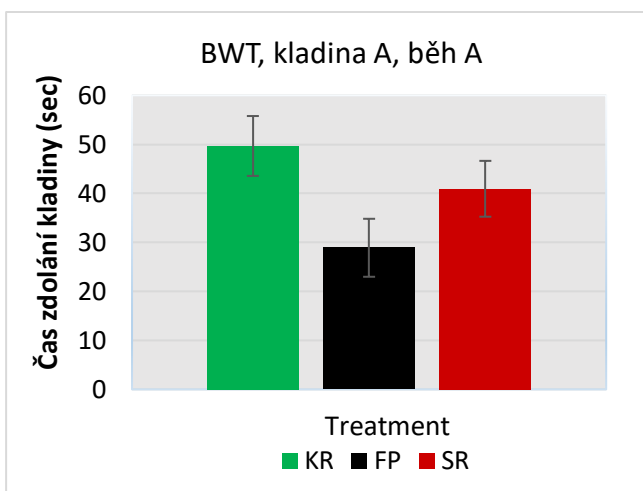
Kladina typu A

Kladinu typu A představoval dřevěný trámek (1 cm x 4,5 cm x 58,5 cm), po jehož svrchním povrchu bylo nataženo a upevněno syntetické polypropylenové lano (průměr 1,1 cm).



Obr. 23: Beam walking test – kladina typu A

Rozdíl v čase, za který se testovaní laboratorní potkani zvládly dostat po vložení na kladinu A do stabilní přihrádky byl pro běh A na hraně statistické významnosti pro treatment ($F = 3.15$, $p = 0.0551$). Významně rychleji stabilní přihrádky dokázali dosáhnout laboratorní potkani ze skupiny *FP* oproti treatmentu *KR* ($t = -2.49$, $p = 0.0176$) a nevýznamně rychleji oproti treatmentu *SR* ($t = -1.53$, $p = 0.1346$). Skupiny *KR* a *SR* se od sebe také lišily ($t = 1.08$, $p = 0.2854$), ale statisticky nevýznamně. Běh B byl nicméně v těchto výsledcích nekonzistentní. Rozdíl mezi treatmenty se ve druhém běhu ukázal být statisticky nesignifikantní ($F = 1.85$, $p = 0.1813$). Nižšího času pro dosažený úspěchu v testu zde dosáhla skupina *KR* oproti *SR* ($t = -1.88$, $p = 0.0742$) a *FP* ($t = -1.41$, $p = 0.1741$). U prvního jmenovaného případu byl rozdíl blízko hranice statistické významnosti. Ani u jednoho běhu se váha neukázala být statisticky významnou kovariancí (běh A: $F = 1.54$, $p = 0.2234$; běh B: $F = 1.25$, $p = 0.2770$), ovšem zanedbatelný faktor to také nebyl. V obou bězích byl čas dosažení úspěchu na kladině typu A výrazně vyšší pro první sérii v porovnání se druhou (běh A: $t = 4.88$, $p < 0.0001$; běh B: $F = 5.93$, $p < 0.0001$) a třetí (běh A: $t = 4.36$, $p = 0.0001$; běh B: $t = 7.02$, $p < 0.0001$) sérií testu.



Obr. 23: Čas dosažení stabilní přihrádky v Beam walking testu na kladině typu A v běhu A

Rozdíl v úspěšnosti dokončit test bez pádu a limitu nebylo možné pro běh A kvůli nízkému pozorování počtu pádu a limitů vyhodnotit. Pro běh B byl v tomto parametru rozdíl mezi treatmenty statisticky nesignifikantní ($F = 1.64$, $p = 0.2050$). S větší úspěšností test dokončovali laboratorní potkani ze skupiny *KR* oproti *SR* ($t = 1.80$, $p = 0.0791$) a *FP* ($t = 1.46$, $p = 0.1524$). Treatmenty *FP* a *SR* se také lišily, ale rozdíl nebyl veliký ($t = 0.36$, $p = 0.7203$). Šance na úspěšné dokončení testu se při vystavení kladině typu A v běhu B lišila mezi jednotlivými sériemi testu. Pro testované laboratorní potkany byla výrazně vyšší šance dosáhnout úspěchu ve druhé ($t = 2.82$, $p = 0.0073$) a třetí ($t = 3.08$, $p = 0.0036$) sérii oproti první sérii vystavení kladině typu A. Váha se neukázala mít na úspěšné dokončení testu na kladině typu A v běhu B příliš velký vliv ($F = 0.36$, $p = 0.5530$).

Kladina typu B

Kladinu typu B v našem testu představuje ocelová tyčka ve tvaru čtyřbokého hranolu (0,6 cm x 0,6 cm x 58 cm).



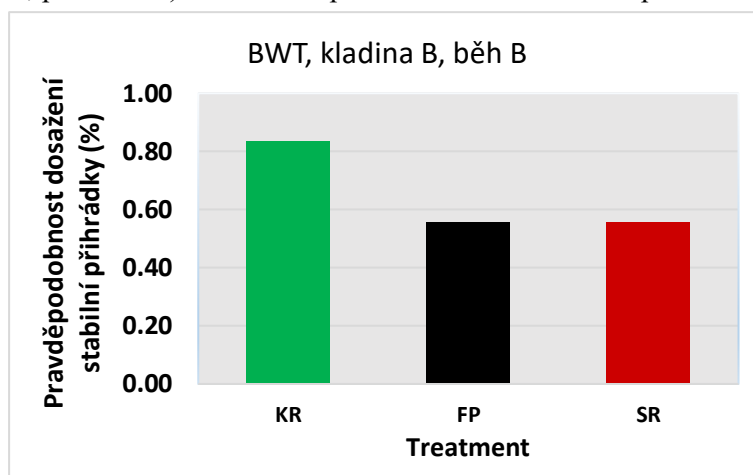
Obr. 24: Beam walking test – kladina typu B

Rozdíl v čase, za který se testovaní laboratorní potkani zvládli dostat po vložení na kladinu B do stabilní přihrádky byl pro běh A byl velice slabý pro treatment ($F = 0.16$, $p = 0.8501$). Nižšího času pro dosažení úspěchu v testu zde dosáhla skupina *KR* oproti *FP* ($t = -0.55$, $p = 0.5911$) i *SR* ($t = -0.37$, $p = 0.7169$). Nejednalo se ovšem o příliš velké rozdíly. Skupiny *FP* a *SR* se od sebe v čase dokončení testu na kladině typu B téměř nelišily ($t = 0.13$, $p = 0.9019$). Rozdíl mezi sériemi testu se v běhu A pro tento typ kladiny ukázal být lehce pod hranou statistické významnosti ($F = 4.05$, $t = 0.0480$). Jediný signifikantní rozdíl v čase úspěšného dokončení testu byl mezi 2. a 3. sérií ($F = 2.83$, $p = 0.0163$). V běhu B pro kladinu typu B byly celkové rozdíly mezi treatmenty patrné, ovšem nad hranicí statistické významnosti ($F = 2.39$, $p = 0.1203$). Nižšího času pro dosažení úspěchu v testu i v tomto běhu dosáhla skupina *KR* oproti *FP* ($t = -2.06$, $p = 0.0539$) i *SR* ($t = -1.69$, $p = 0.1086$). V prvním případě bylo porovnání na hraně statistické významnosti. Skupiny *FP* a *SR* se od sebe v tomto parametru sice lišily ($t = 0.40$, $p = 0.6936$), ale ne příliš. Rozdíl mezi jednotlivými sériemi v čase dosažení úspěchu v testu byl významný

mezi 1. a 3. sérií ($t = 3.15$, $p = 0.0056$) a blízko hraně významnosti mezi 2. a 3. sérií ($t = 1.87$, $p = 0.0782$). Váha se v žádném z běhů neukázala být příliš silným faktorem (běh A: $F = 0.85$, $p = 0.3759$; běh B: $F = 0.09$, $p = 0.7647$).

Rozdíly mezi časy pádů od vložení testovaných laboratorních potkanů na kladinu typu B byly v běhu A mezi treatmenty celkově statisticky nevýznamné ($F = 2.69$, $p = 0.1817$). Déle se na kladině typu B byli schopni udržet laboratorní potkani z treatmentu *SR* oproti *FP* ($t = 2.18$, $p = 0.0949$). Rozdíl je značný, ale postrádá statistickou signifikanci. Skupina *KR* se také na kladině udržela déle než *FP* ($t = 1.09$, $p = 0.3380$). Treatmenty *KR* a *SR* se v tomto parametru téměř vůbec nelišily ($t = -0.03$, $p = 0.9768$). Rozdíly mezi sériemi se v čase pádů pro kladinu typu B v běhu A neukázaly být příliš významné ($F = 1.10$, $p = 0.4165$) a faktor váhy také ne ($F = 0.33$, $p = 0.5963$). Rozdíly parametru času pádů v běhu B nebylo možno pro nízký počet pozorování vyhodnotit.

Rozdíl v úspěšnosti dokončit test bez pádu nebo limitu na kladině typu B nebyl pro běh A mezi treatmenty příliš velký ($F = 0.27$, $p = 0.7641$). Relativně vyšší úspěšnost bylo možné pozorovat u treatmentu *SR* oproti *FP* ($t = 0.74$, $p = 0.4659$) a *KR* ($t = 0.36$, $p = 0.7226$). Skupiny *KR* a *FP* se od sebe také příliš nelišily ($t = 0.39$, $p = 0.6982$). Mezi jednotlivými sériemi kladiny typu B v běhu A byly rozdíly nevýznamné ($t = 0.90$, $p = 0.4148$). Váha na úspěšné dokončení Beam walking testu pro kladinu typu B v běhu A mohla mít určitý vliv, ale ten postrádá statistickou signifikanci ($F = 2.37$, $p = 0.1308$). Rozdíl v úspěšnosti dokončit test bez pádu nebo limitu byl pro Běh B na hraně statistické významnosti pro treatment ($t = 3.22$, $p = 0.0497$). Výrazně vyšší šanci na úspěšné dokončení testu (tzn. nižší počet pádů a limitů) měli potkani z treatmentu *KR* oproti *FP* ($F = 2.41$, $p = 0.0201$) i *SR* ($F = 2.36$, $p = 0.0231$). Oba tyto rozdíly byly statisticky významné na hladině $p = 0.500$. Rozdíly mezi skupinami *FP* a *SR*



Obr. 25: Procentuální šance úspěšnosti v testu Beam walking na kladině typu B v běhu B

($t = -0.22$, $p = 0.8296$) se lišily jen velice mírně ve prospěch skupiny *SR*. Rozdíly v úspěšném dokončení testu byly významné mezi jednotlivými sériemi kladiny B v běhu B ($F = 5.03$, $p = 0.0109$). Dosažení úspěchu se výrazně lišilo mezi 1. a 3. sérií ($t = -3.16$, $p = 0.0029$) a 2. a 3. sérií ($t = -2.30$, $p = 0.0265$) ve prospěch pozdějších sérií BWT testu. Váha se ukázala být poměrně silným faktorem pro úspěch testu, ovšem postrádala statistickou signifikanci ($F = 3.16$, $p = 0.0827$).

Kladina typu C

Kladina typu C měla válcovitý tvar a byla vyrobena z nelakovaného dřeva (průměr 2,4 cm, délka 57,5 cm).



Obr. 26: Beam walking test – kladina typu C

Rozdíl časů, za které se testovaní laboratorní potkani byly schopni dostat do stabilní přihrádky po vystavení kladiny typu C nemohl být kvůli téměř nulovým celkovým úspěchům v běhu A tohoto testu (viz Tabulka 1 výše) nakonec vyhodnocen. Pro běh A proto dávalo smysl pro tento typ kladiny místo toho vyhodnotit časy do pádů. Rozdíly v tomto parametru vychází slabě mezi treatmenty ($F = 0.35$, $p = 0.7043$) a téměř nulově mezi jednotlivými sériemi testu ($t = 0.01$, $p = 0.9886$). Ukázalo se, že váha také neměla na delší setrvání na kladině C v běhu A vůbec žádný vliv ($t = 0.00$, $p = 0.9876$). Déle na kladině typu C v běhu A zvládli vydržet laboratorní potkani ze skupiny *KR* oproti treatmentu *FP* ($t = 0.81$, $p = 0.4225$) a *SR* ($t = 0.24$, $p = 0.8109$). Skupina *SR* byla oproti *FP* také o málo lepší ($t = -0.63$, $p = 0.5320$).

Běh B dopadl oproti běhu A překvapivě odlišně. Kladina typu C se pro laboratorní potkany neukázal být tak velkou výzvou jako tomu bylo pozorováno v běhu A. Mohl zde být proto vyhodnocen čas v přebíhání. Mezi treatmenty byl v dosažených časech pro úspěch patrný určitý rozdíl ($t = 2.13$, $p = 0.1430$), který ovšem postrádal statistickou významnost. Rychlejší byli v tomto testu laboratorní potkani ze skupiny *KR* oproti *SR* ($t = -1.96$, $p = 0.0624$) a *FP* ($t = -0.60$, $p = 0.5535$). Skupiny *FP* a *SR* se od sebe také poměrně lišily ($t = -1.37$, $p = 0.1835$), ovšem nesignifikantně. Rozdíl v rychlosti přebíhání přes kladinu typu C mezi jednotlivými sériemi výrazný byl ($F = 15.37$, $p < 0.0001$). Významně se lišila první série od druhé (4.60 , $p = 0.0001$) a třetí ($t = 5.13$, $p < 0.0001$). Druhá série se od třetí zas tolik nelišila ($t = 0.42$, $p = 0.6750$). Váha se pro rychlost zdolání kladiny typu C v běhu B ukázala jako poměrně slabý faktor ($t = 0.10$, $p = 0.7500$).

Pravděpodobnost dosažení úspěchu na kladině C nebylo možné pro běh A kvůli téměř nulovému počtu neúspěchů spočítat. Rozdíly pro běh B v tomto parametru vyšly statisticky nesignifikantně mezi treatmenty ($F = 1.00$, $p = 0.3752$) a sériemi ($F = 1.18$, $p = 0.3175$). Vyšší šanci na úspěch v testu byl pozorován u skupiny *KR* oproti *SR* ($t = 1.35$, $p = 0.1839$) a *FP* ($t = 1.20$, $p = 0.2361$). Treatmenty *FP* a *SR* se od sebe v šanci na úspěch v testu na kladině typu C v běhu B téměř nelišily ($t = 0.12$, $p = 0.9023$). Váha se ukázala být poměrně důležitým faktorem pro úspěch ($t = 3.68$, $p = 0.0618$), ovšem její efekt je nad hranicí statistické významnosti.

Shrnutí

Stavy úspěchů, pádu a dosažených limitů pro tři různé typy kladiny a dva běhy měly v Beam walking testu velmi odlišné rozložení, proto musely být vyhodnoceny zvlášť. V rychlosti v přebíhání přes kladinu typu A v běhu A byla statisticky významně lepší skupina *FP* oproti *KR* a statisticky nevýznamně lepší oproti *SR*. Nicméně v běhu B se ukázal být na tomto typu kladiny naopak lepší treatment *KR* oproti dvěma zbylým. *KR* skupina navíc v tomto běhu úspěšněji dokončovala test s nižší šancí na pád nebo limit.

I kladina typu B dopadla v obou bězích lépe pro treatment *KR* oproti *FP* i *SR*. V běhu A byl náskok skupiny *KR* nižší než v běhu B. Při vyhodnocení pádů v běhu A se na kladině typu B byli schopni udržet déle laboratorní potkani ze skupiny *SR* oproti *FP* a *KR*. U sociálně redukované skupiny (*SR*) v běhu A bylo na kladině typu B možné také pozorovat vyšší úspěšnost v testu bez pádů nebo dosažení limitů. Naopak v běhu B se ukázal statisticky významný rozdíl v tomto parametru pro treatment *KR* vůči skupinám *FP* i *SR*.

Rozdíly v časech udržení se na kladině typu C v běhu A dopadly pro treatment *KR* nejlépe, pro treatment *FP* nejhůře. Rozdíly ovšem nebyly statisticky významné. Na kladině typu C v běhu B se ukázaly být rychlejší laboratorní potkani *KR* oproti *SR* a *FP*. Skupina *KR* měla i vyšší šanci na úspěšné dosažení testu.

Váha u žádného z typů kladiny nevyšla pod hladinou statistické významnosti $p = 0.05$. Nejedná se tedy o významný faktor predikce v rychlosti přebíhání; v čase, po kterém je zvíře schopno udržet se na kladině; ani v pravděpodobnosti úspěšně dokončit test. Ukázalo se však, že mezi sériemi se rozdíly v těchto třech parametrech významně liší. K největšímu zlepšení nejčastěji docházelo mezi 1. a 3. a mezi 2. a 3. sérií.

Prostřednictvím stanovené hypotézy H3 jsme předpokládali, že laboratorní potkani Long-Evans, kterým bude během ontogeneze umožněna plná hra (*FP*), dosáhnou v *Beam walking* testu nejlepších výsledků. To se statisticky významně potvrdilo pouze u kladiny typu A v běhu A. Ve všech ostatních případech se překvapivě předvedla lepší motorické dovednosti kinematicky redukovaná skupina *KR* oproti *SR* a *FP*, popřípadě sociálně redukovaná skupina *SR* oproti *FP* a *KR*. Rozdíly nicméně nebyly – kromě šance na úspěšné dokončení testu na kladině typu B v běhu B – statisticky signifikantní. Hypotézu H3 se v *Beam walking* testu nepodařilo verifikovat.

4.6. Rope maintenance test

Rope maintenance test byl realizován během jednoho dne testování. Každý testovaný laboratorní potkan byl vložen na jeden ze tří typů provazu (A, B, C) zády k vnitřní hraně aparatury. Jeho pohyblivá aktivita byla nahrávána na kameru. Poté, co byla jednomu typu provazu vystavena všechna testovaná zvířata, pokračovalo se ve vystavení dalšímu typu provazu. Vystavení všem třem typům provazu uzavíralo pro testované zvíře jednu sérii testu. Každý laboratorní potkan byl během testovacího dne vystaven třem po sobě jdoucím sériím *Rope maintenance* testu.

Po každé jednotlivé expozici testovaného zvířete provazu byly do záznamového archu zaznamenány tři možné stavy vyhodnocení – úspěch, pád a limit. Aritmetické rozdíly mezi přesným časem vložení testovaného zvířete na provaz a přesným časem úspěšného dosažení stabilní přihrádky nebo přesným časem pádu z provazu, byly vyhodnoceny dodatečně z pořízených kamerových záznamů. Jako bod na těle, jenž určoval, zdali zvíře dosáhlo oblasti stabilní přihrádky, byla zvolena pánevní oblast testovaného zvířete. Čas limitu byl stanoven na 120 vteřin. Distribuce jednotlivých pádů a dosažených limitů v *Rope maintenance* testu se mezi letním během (A) a zimním během (B) u tohoto testu značně lišily. Znázornění úspěchů (zeleně), pádů (červeně) a limitů (modře) znázorňuje tabulka 9. Každý blok představuje jednu sérii testu. Písmeno A, B, C udává typ provazu. Číslo v zeleném / červeném poli značí uplynulý čas dosažení přihrádky / pádu z provazu od vložení na provaz.

Tab. 9: Distribuce úspěchů, pádů a dosažených limitů mezi dvěma běhy a třemi sériemi testu RMT

	1. série							2. série							3. série					
	Běh A			Běh B				Běh A			Běh B				Běh A			Běh B		
	A	B	C	A	B	C		A	B	C	A	B	C		A	B	C	A	B	C
K 1	120	120	73	20	4	32	K 1	31	39	11	4	2	11	K 1	10	34	8	3	2	12
K 2	120	99	17	34	18	33	K 2	39	24	8	3	2	7	K 2	52	91	17	7	3	13
K 3	120	120	9	17	5	25	K 3	67	19	101	2	1	15	K 3	14	6	13	3	2	12
K 4	120	120	49	34	18	100	K 4	120	117	19	19	17	9	K 4	52	15	12	9	6	12
K 5	49	15	15	33	17	48	K 5	7	8	11	8	12	22	K 5	10	10	7	7	7	23
K 6	14	11	17	55	50	30	K 6	12	36	21	42	23	12	K 6	13	11	7	6	11	11
P 1	50	33	57	111	35	81	P 1	12	26	7	26	21	52	P 1	11	8	19	27	18	22
P 2	120	120	40	42	45	21	P 2	120	110	120	37	13	21	P 2	25	120	120	43	24	27
P 3	8	6	34	34	14	16	P 3	5	9	5	7	4	21	P 3	14	6	8	12	17	32
P 4	120	103	120	8	15	9	P 4	115	78	120	41	27	19	P 4	16	53	40	8	33	20
P 5	120	120	28	84	25	120	P 5	120	10	11	36	93	120	P 5	120	24	29	25	16	54
P 6	59	89	29	66	61	86	P 6	39	35	18	44	29	19	P 6	23	30	68	30	33	27
S 1	120	11	17	77	56	22	S 1	11	55	27	37	20	18	S 1	29	31	8	48	63	32
S 2	57	41	23	47	16	15	S 2	14	22	7	9	9	8	S 2	6	5	15	7	4	6
S 3	117	55	18	13	3	25	S 3	14	46	7	4	2	12	S 3	21	38	17	6	3	8
S 4	13	13	39	36	21	21	S 4	16	41	62	19	10	20	S 4	45	44	30	13	19	18
S 5	12	5	9	120	64	16	S 5	3	5	4	30	37	15	S 5	6	4	8	47	32	5
S 6	85	77	92	41	36	100	S 6	63	62	25	31	29	19	S 6	11	59	16	25	33	14

Z důvodu toho, že pro vyhodnocení každé expozice jednomu ze tří typů provazu náležely tři stavy (úspěch, pád, limit) a test obnášel tři série, bylo pro vyhodnocení *Rope maintenance* testu vytvořeno dohromady 27 parametrů. Do těchto parametrů byly dosazeny aritmetické rozdíly mezi přesným časem vložení zvířete na testovaný provaz a buďto přesným časem úspěšného dosažení stabilní přihrádky (parametry pro úspěch) anebo přesným časem pádu z provazu (parametry pro pád). Parametry pro limit sloužili pouze jako kategoriální proměnná.

Tab. 10: Parametry pro vyhodnocení *Rope maintenance* testu

Parametry pro úspěch	Parametry pro pád	Parametry pro limit
RMT_1_A_success	RMT_1_A_fall	RMT_1_A_limit
RMT_1_B_success	RMT_1_B_fall	RMT_1_B_limit
RMT_1_C_success	RMT_1_C_fall	RMT_1_C_limit
RMT_2_A_success	RMT_2_A_fall	RMT_2_A_limit
RMT_2_B_success	RMT_2_B_fall	RMT_2_B_limit
RMT_2_C_success	RMT_2_C_fall	RMT_2_C_limit
RMT_3_A_success	RMT_3_A_fall	RMT_3_A_limit
RMT_3_B_success	RMT_3_B_fall	RMT_3_B_limit
RMT_3_C_success	RMT_3_C_fall	RMT_3_C_limit

Z těchto parametrů byly v *Rope maintenance* testu statisticky vyhodnoceny tři modely:

- 1) Za jak rychle se testovaný laboratorní potkan dokáže dostat do jedné ze dvou přihrádek po vložení na prostřední část provazu (čas v sekundách)
- 2) Jaká je procentuální pravděpodobnost úspěchu testu, když za neúspěch jsou považovány stavy pádu a limitu (vyjádřeno v %)

Kvůli zásadně odlišné distribuci parametrů pro úspěch, pád a limit mezi letním (A) a zimním během (B) byly tyto parametry analyzovány pro každý z běhů a příslušný typ provazu zvlášť. Parametry byly vyhodnoceny v programu SAS Studio. V něm byla na proměnné reprezentující jeden ze dvou modelů aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, série RMT testu a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byly u všech závisle proměnných dodrženy a náhodné efekty vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.3.5. Vyhodnocení motoriky

Provaz typu A

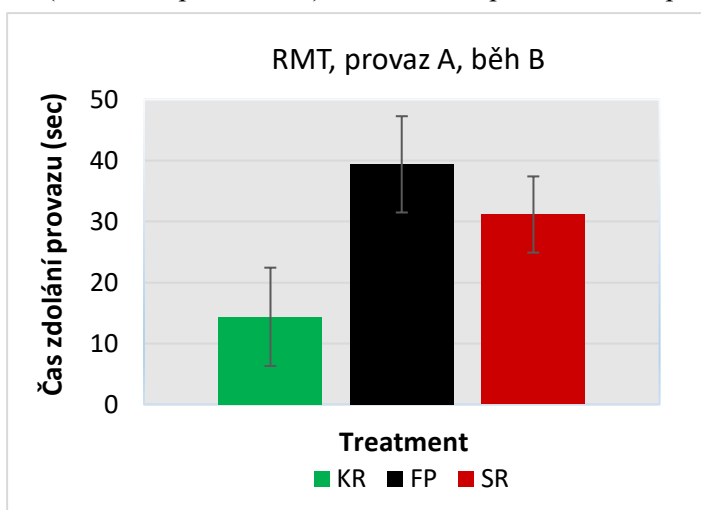
Prvním typem provazu, s nímž se každé testované zvíře v Rope maintenance testu setkalo byl konopný provaz (průměr 9 mm).



Obr. 27: *Rope maintenance test – provaz typu A*

Rozdíl v rychlosti zdolání provazu typu A v běhu A nebyl statisticky významný pro treatment ($F = 1.58$, $p = 0.2459$) ani po sobě jdoucí sérii testu ($F = 0.34$, $t = 0.7168$). Rychleji provaz typu A v běhu A zdolali laboratorní potkani z treatmentu *FP* oproti *KR* ($t = -1.42$, $p = 0.1805$) a *SR* ($t = -0.13$, $p = 0.9022$). Ve druhém případě byl ovšem rozdíl mizivý. Skupiny *SR* a *KR* se od sebe také lišily ($t = 1.56$, $p = 0.1439$). Všechny zmíněné rozdíly postrádaly statistickou významnost.

V běhu B byl rozdíl v rychlosti dosažení úspěchu v testu na provaze typu A blízko hranice statistické významnosti pro treatment ($F = 2.62$, $p = 0.0868$). Laboratorní potkani ze skupiny *KR* zde byly výrazně rychlejší oproti skupině *FP* ($t = -2.25$, $p = 0.0312$) i *SR* ($t = -1.69$, $p = 0.0995$). V prvním případě byl rozdíl statisticky významný, ve druhé byl blízko statistické významnosti na hladině $p = 0.05$. Skupiny *FP* a *SR* se od sebe lišily ($t = 0.86$, $p = 0.3961$) ve prospěch nižšího času pro dosažení stabilní přihrádky u treatmentu *SR*. V běhu B byl pro tento typ provazu statisticky významný rozdíl mezi sériemi testu ($F = 18.84$, $p < 0.0001$). Čas v dosažení úspěchu byl v první sérii výrazně vyšší než ve druhé ($t = 4.87$, $p < 0.0001$) a ve třetí ($t = 5.72$, $p < 0.0001$) sérii. Váha se neukázala být významným faktorem pro rychlost zdolání horizontálního provazu typu A ani v jednom z běhů (běh A: $F = 1.68$, $p = 0.2196$; běh B: $F = 1.66$, $p = 0.2059$).



Obr. 28: *Čas dosažení stabilní přihrádky v Rope maintenance testu na provazu typu A v běhu B*

Rozdíl v procentuální šanci dosažení úspěchu v běhu A u provazu A nebyl statisticky významný pro treatment ($F = 1.46$, $p = 0.2445$), jednotlivé série ($F = 2.25$, $p = 0.1179$), ani váhu ($F = 0.93$, $p = 0.3391$). Vyšší šance na dokončení provazu typu A v běhu A bez pádu a limitu byla u skupiny *SR* oproti *FP* ($t = 1.62$, $p = 0.1122$). Treatmenty *SR* a *KR* ($t = 0.23$, $p = 0.8171$) se od sebe lišily jen mírně. Treatment *KR* měl vyšší šanci dokončit test než *FP* ($t = 1.33$, $p = 0.1897$). Počítat pravděpodobnost úspěchu pro tento typ provazu v běhu B nemělo smysl, jelikož byl pozorovaný pouze jeden případ dosažení limitu a nebyl pozorovaný žádný pád.

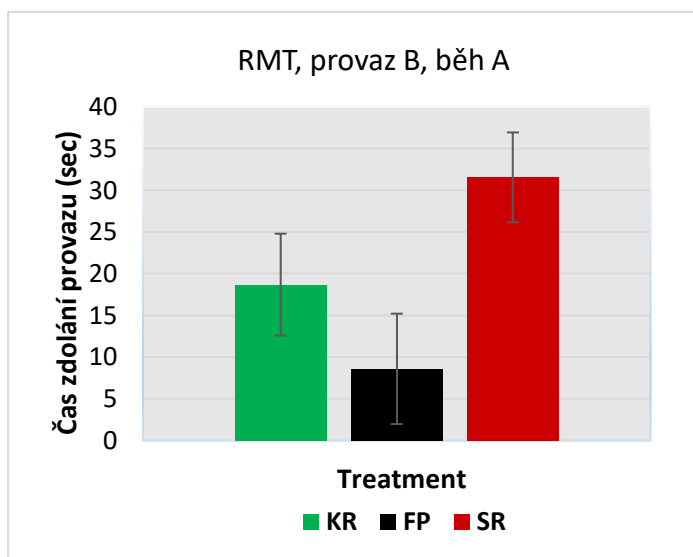
Provaz typu B

Druhý typ provazu aparatury Rope maintenance testu byl vyrobený z polypropylenu. Průměr provazu činil 11 mm.



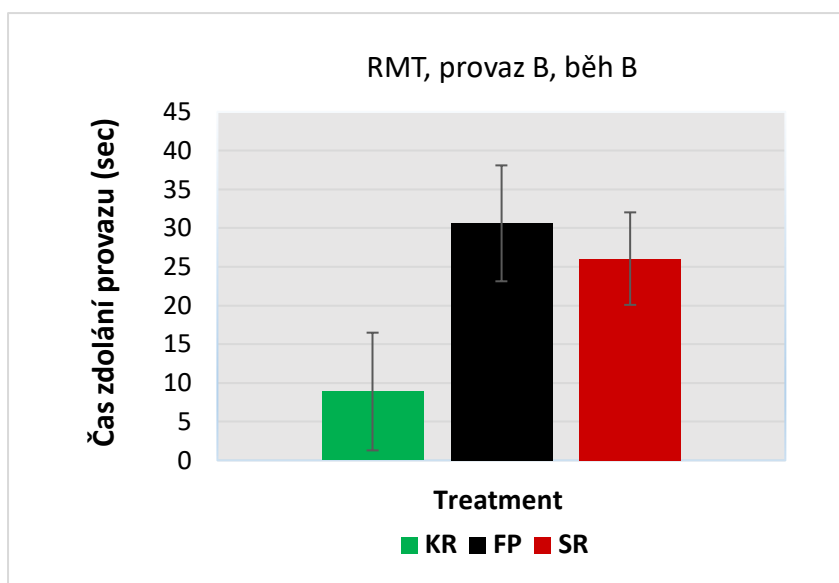
Obr. 29: Rope maintenance test – provaz typu B

Rozdíl v čase dosažení stabilní přihrádky po vložení na prostřední část provazu typu B byla v případě běhu A na hraně statistické významnosti pro treatment ($F = 3.56$, $p = 0.0525$). Skupina *FP* byla výrazně rychlejší oproti *SR* ($t = -2.63$, $p = 0.0180$) i méně výrazně rychlejší vůči *KR* (-1.14 , $p = 0.2710$). Treatmenty *KR* a *SR* se také poměrně hodně lišily ($t = -1.57$, $p = 0.1355$) ve prospěch nižšího času u treatmentu *KR*. Z hlediska opakování testu mezi sériemi se ukázal být statisticky významný pouze rozdíl mezi 1. a 2. sérií ($t = -2.30$, $p = 0.0353$). Jako významný faktor rychlosti zdolání provazu typu B v běhu A se ukázala být váha ($F = 4.80$, $t = 0.0437$). Těžší laboratorní potkani zdolali test mnohem pomaleji.



Obr. 30: Čas dosažení stabilní přihrádky v Rope maintenance testu na provazu typu B v běhu A

Běh B pro tento typ provazu dopadl opět nekonzistentně. Nejrychlejší treatment ve zdolání provazu byl *KR*, který byl významně rychlejší vůči *FP* ($t = -2.10$, $p = 0.0432$) i téměř významně rychlejší vůči *SR* ($t = -1.87$, $p = 0.0697$). Skupiny *SR* a *FP* se od sebe lišily méně, a to ve prospěch treatmentu *SR* ($t = -0.51$, $p = 0.6112$). V opakováních testu mezi sériemi byl v běhu B významný rozdíl mezi 1. a 3. ($t = 2.11$, $p = 0.0415$) a téměř významný rozdíl mezi 1. a 2. ($t = 1.82$, $p = 0.0778$) sérii provazu B. Váha ($F = 1.43$, $p = 0.2395$) byla pro běh B mnohem méně významný faktor než pro běh A.

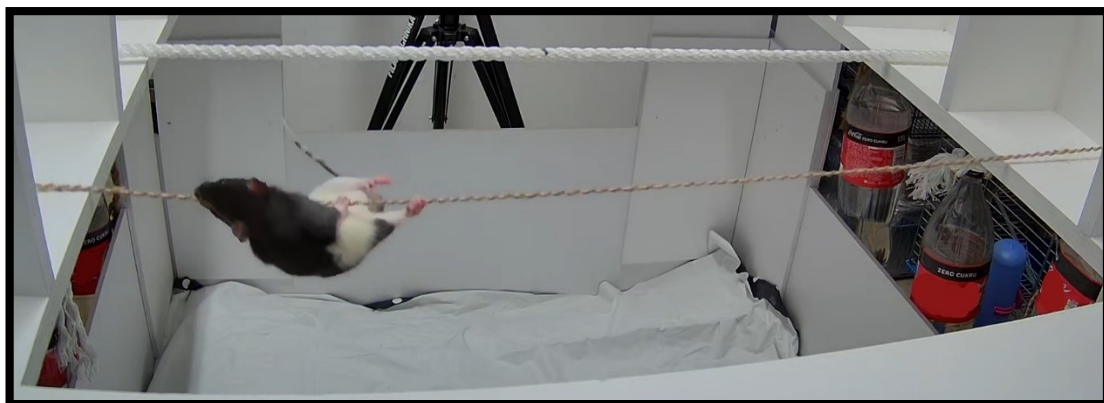


Obr. 31: Čas dosažení stabilní přihrádky v Rope maintenance testu na provazu typu B v běhu B

Pravděpodobnost úspěšně dokončit test na provazu B bez pádu nebo limitu nebyl v běhu A statisticky významný pro treatment ($F = 1.55$, $p = 0.2239$), opakování mezi sériemi ($F = 2.49$, $p = 0.0946$), ani váhu ($F = 1.76$, $p = 0.1910$). Vyšší šanci na úspěch bylo možné v běhu A spatřit u treatmentu *SR* vůči *FP* ($t = 1.76$, $p = 0.0857$) i *KR* ($t = 0.83$, $p = 0.4108$). Treatmenty *KR* a *FP* se v úspěšnosti také lišily ($t = 0.89$, $p = 0.3771$). U skupiny *KR* byla úspěšnost o něco vyšší, ale nevýznamně. Rozdíl v opakováních byl významný pouze mezi 1. a 3. sérií ($t = -2.12$, $p = 0.0397$). Mezi 1. a 2. sérií byl rozdíl blízko hranice statistické signifikance ($t = -1.74$, $p = 0.0888$). Počítat pravděpodobnost úspěchu pro tento typ provazu v běhu B nemělo smysl, jelikož všechny treatmenty dosáhly v tomto běhu 100% úspěšnosti.

Provaz typu C

Třetí typ provazu v našem testu představoval juntový provázek o průměru 3 mm.



Obr. 32: Rope maintenance test – provaz typu C

Rozdíly v čase zdolání provazu typu C v běhu A nebyly mezi treatmenty příliš velké ($F = 0.30$, $p = 0.7432$). O něco rychleji byli schopni zdolat tento provaz laboratorní potkani z treatmentu *SR* oproti *KR* ($t = -0.73$, $p = 0.4755$) a *FP* ($t = -0.60$, $p = 0.5552$). Mezi skupinami *KR* a *FP* byl zcela zanedbatelný rozdíl ($t = 0.00$, $p = 0.9969$). Ukázalo se, že váha příliš velký vliv na čas dosažení stabilní přihrádky pro tento typ provazu v běhu A nemá ($F = 0.91$, $p = 0.3499$). Opakování mezi sériemi běhu A ($F = 1.86$, $p = 0.1789$) v zásadě také tolik ne. Rychlost v přelézání provazu typu C v běhu B měla oproti běhu A větší rozdíly mezi treatmenty ($F = 1.28$, $p = 0.2906$). Rychleji provaz zvládli zdolat laboratorní potkani ze skupiny *SR* oproti *FP* ($t = -1.60$, $p = 0.1190$) i *KR* ($t = -0.50$, $p = 0.6169$). Rozdíl mezi skupinami *KR* a *FP* byl také patrný ($t = -0.95$, $p = 0.3468$) ve prospěch treatmentu *KR*. Váha se v tomto běhu ukázala být slabým faktorem ($F = 0.19$, $p = 0.6641$). Mezi jednotlivými sériemi vystavení provazu typu C byl pro rychlosti dosažení úspěchu významný rozdíl ($F = 7.67$, $t = 0.0018$). Dosažení stabilní přihrádky trvalo v první sérii výrazně více času než ve druhé ($t = 3.46$, $p = 0.0015$) a ve třetí ($t = 3.33$, $p = 0.0021$).

Rozdíl v pravděpodobnosti úspěšně dokončit test na provazu typu C bez pádu nebo limitu nebyl v běhu A statisticky významný pro treatment ($F = 1.18$, $p = 0.3183$) ani váhu ($F = 1.29$, $p = 0.2627$). Vyšší šanci na úspěšné dokončení testu bylo možné v běhu A pozorovat u treatmentu *KR* oproti *FP* ($t = 1.53$, $p = 0.1330$) a *SR* ($t = 1.02$, $p = 0.3139$). Treatmenty *FP* a *SR* se v úspěšnosti také odlišovaly ($t = -0.99$, $p = 0.3280$) – u skupiny *SR* byla úspěšnost o něco vyšší. Rozdíl úspěšnosti dokončení testu mezi sériemi provazu typu C pro běh A byl nulový ($t = 0.00$, $p = 1.0000$). To znamená, že distribuce pádů / limitů byla v běhu A konzistentní pro všechny tři série opakování provazu typu C. Počítat pravděpodobnost úspěchu pro tento typ provazu v běhu B nedávalo smysl, jelikož byl pozorovaný pouze jeden případ dosažení limitu.

Shrnutí

Stavy úspěchů, pádu a dosažených limitů pro tři různé typy provazů a dva běhy měly v Rope maintenance testu velmi odlišné rozložení, proto musely být vyhodnoceny zvlášť.

Na provazu typu A byla v běhu A z hlediska času pro dosažení stabilní přihrádky nevýznamně lepší skupina *FP* oproti *KR* a *SR*. Ovšem šance na dosažení úspěchu bez pádu nebo limitu v testu na provazu typu A byla v běhu A vyšší pro treatment *SR*. Skupiny *FP* a *KR* se od sebe v obou parametrech v tomto běhu příliš nelišily. V běhu B byla z hlediska času pro dosažení stabilní přihrádky naopak lepší skupina *KR* vůči *FP* významně, a vůči *SR* nevýznamně. Zde se treatment *FP* umístil až na posledním místě.

Na provazu typu B byl v běhu A z hlediska času pro dosažení stabilní přihrádky lepší treatment *FP* oproti *SR* významně a oproti *KR* nevýznamně. Vyšší šanci na úspěch v testu měli laboratorní potkani z treatmentu *SR*, treatment *FP* se v tomto parametru umístil až na posledním místě. Běh B ovšem dopadl zcela jinak. Nejrychlejší treatment zde byl *KR*, který byl významně rychlejší vůči *FP* i téměř významně rychlejší vůči *SR*. Skupiny *SR* a *FP* se od sebe lišily méně, a to ve prospěch treatmentu *SR*.

V běhu A na provaze typu C byla z hlediska času pro dosažení stabilní přihrádky nevýznamně lepší skupina *SR* proti *KR*. Treatments *KR* a *FP* byli v tomto parametru téměř totožné. Nejvyšší šanci úspěšně dokončit test pro provaz typu C v běhu A měli laboratorní potkani z treatmentu *KR*, za nimi byla skupina *SR*, až potom *FP*. V běhu B byla z hlediska času pro dosažení stabilní přihrádky o mnoho lepší skupina *SR* v porovnání se skupinou *FP* a o málo lepší vůči skupině *KR*. Treatment *FP* se v tomto parametru opět umístil až na posledním místě. Žádný z rozdílů mezi treatments ovšem nebyl pro tento typ provazu statisticky významný.

Podobně jako ve výsledcích Beam walking testu, i v Rope maintenance testu vycházel trend postupného snižování času, za který se testování laboratorní potkani zvládli dostat do stabilní přihrádky s rostoucím opakováním testu. Nejčastěji byl rozdíl znát mezi 1. a 3. a 2. a 3. sérií RMT testu. Váha se neukázala být statisticky signifikantním faktorem pro rychlost zdolání všech tří typů provazů, s výjimkou provazu typu B v běhu A, kde faktor signifikantní byl – lehčí zvířata zvládala test rychleji. Šance na úspěch v testu na váze také příliš nezávisela.

Prostřednictvím stanovené hypotézy H3 jsme předpokládali, že laboratorní potkani Long-Evans, kterým bude během ontogeneze umožněna plná hra (*FP*), dosáhnou v Rope maintenance testu nejlepších výsledků. To se statisticky významně potvrdilo pouze u provazu typu B v běhu A. Na provazu typu A byl v běhu A opět nejlepší treatment *FP*, i když nevýznamně, na provaze typu C ovšem ne. Zde byla nevýznamně lepší skupina *SR*. V běhu B se ukázal jistý trend, kdy se treatment *FP* obou sledovaných parametrů – rychlost zdolání provazu a pravděpodobnost úspěchu – umisťoval až na posledním místě. V běhu B na provazech typu A i B dokonce treatment s kinematicky redukovanou hrou (*KR*) projevil významně lepší motorické dovednosti než treatment s plnou hrou (*FP*). Stanovenou hypotézu H3 se proto v Rope maintenance testu nepodařilo verifikovat.

4.7. Inclined plane test

Test v nakloněné rovině byl zrealizován během tří testovacích dní. Testování laboratorní potkani Long-Evans v něm byli učeni šplhat za odměnou při postupné rostoucí obtížnosti, tj. postupném zvyšování úhlu, jenž svírala deska nakloněné roviny vzhledem k vodorovné desce, na níž byla posazena. V prvním dnu testování test začínal na sklonu 0° , postupně se úhel zvyšoval nejdříve o 5° a ve vyšších obtížnostech posledního dne testování nakonec jen o 3° . Test mohl skončit buďto úspěchem nebo pádem. Čtyři kritéria pro úspěch a postupový klíč pro postup na vyšší obtížnost testu již byly zmíněny v kapitole věnované metodice tohoto testu.

První pád byl během testování zaznamenán až na náklonu 15° . V tabulce č. 11 jsou proto znázorněny jen výseky z kompletních tabulek Inclined plane testu pro běh A i B. V tabulce jsou zeleně a písmenem S značeny úspěchy v testu. Horní index nad písmenem „S“ udává kritérium úspěchu. Červeně jsou značeny pády z nakloněné roviny.

Tab. 11: Úspěchy a neúspěchy v Inclined plane testu do obtížnosti 34° (výseky za oba běhy)

běh A							
	15°	15°	20°	25°	28°	31°	34°
K 1	S	S	F	S ³	F	F	-
K 2	S	S	S	S	F	F	-
K 3	F	S	F	S ⁴	F	F	-
K 4	S	S	S	F	F	-	-
K 5	S	S	S	S	S ⁴	S	F
K 6	S	S	S	S	S	S	S ⁴
P 1	S	S	S	F	S	F	F
P 2	S	S	S	S	S	F	F
P 3	S	S	S	S	S	F	F
P 4	S	S	S	S	F	S ⁴	F
P 5	S	S	S	S	F	F	-
P 6	S	S	S	S	S	S	F
S 1	S	S	S	S	S	S ³	S
S 2	S	S	S	S ⁴	S ⁴	F	F
S 3	S	S	S	S ³	S	F	F
S 4	S	S	S	S	S	F	F
S 5	S	S	S	S	S ³	S	F
S 6	S	S	S	S ³	S	S	F

Běh B							
	15°	15°	20°	25°	28°	31°	34°
K 1	S	S	S	F	F	-	-
K 2	S	S	F	F	-	-	-
K 3	S	S	S	S ³	F	F	-
K 4	S	S	F	S ⁴	F	F	-
K 5	S	S	S	F	S ³	S	S ⁴
K 6	S	S	S ³	S	S	F	F
P 1	S	S	F	F	-	-	-
P 2	S	S	S	S	F	F	-
P 3	S	S	S ⁴	F	F	-	-
P 4	S	S	F	F	-	-	-
P 5	S	S	F	F	-	-	-
P 6	S	S	S	S ³	S ⁴	F	F
S 1	S	S	S	F	F	-	-
S 2	S	S	F	F	-	-	-
S 3	S	S	S	S ⁴	F	F	-
S 4	S	S	S	S ⁴	F	F	-
S 5	S	S	S ⁴	F	F	-	-
S 6	S	S ³	F	S ⁴	F	S ⁴	F

Z kompletních tabulek Inclined plane testu byly vyhodnoceny tyto tři parametry:

`IPT_first_fall_angle` = úhel prvního pádu

`IPT_highest_successful_angle` = nejvyšší dosažený úhel pro úspěch

`IPT_number_of_successes` = celkový počet úspěchů v testu

Výše uvedené parametry byly spočítány v programu SAS Studio. V něm byla na tyto závisle proměnné aplikována statistika obecného smíšeného lineárního modelu (GLMM). Za fixní efekty byly v modelu zvoleny treatment, běh a váha. Za náhodné efekty byly zvoleny vrh a párová klec. Jako efekt interakce byl zkoumán parametr váhy s během (A, B). Pro všechny závisle proměnné byla zkoumaná normalita a homoskedasticita reziduí. Pokud není uvedeno jinak, normalita a homoskedasticita reziduí byla u všech závisle proměnných dodržena a náhodné efekty i efekt interakce vyšly jako statisticky nevýznamné.

4.3.6. Vyhodnocení motoriky

Rozdíl v úhlu do prvního pádu v nakloněné rovině nebyl statisticky významný pro treatment ($F = 0.40$, $p = 0.6750$) ani váhu testovaných zvířat ($F = 0.73$, $p = 0.4058$). Vyšší úhel do prvního pádu byl zaznamenán u skupiny *SR* oproti *FP* ($t = 0.87$, $p = 0.3975$) i *KR* ($t = 0.54$, $p = 0.5963$). Rozdíly nebyly statisticky významné. Skupiny *KR* a *FP* ($t = 0.25$, $p = 0.8026$) se od sebe v tomto parametru příliš nelišily. Běh se ukázal být pro celkové rozdíly v úhlu prvního pádu poměrně silným faktorem ($F = 3.95$, $p = 0.0644$). Interakce běhu s váhou vyšla blízko hranice statistické významnosti ($F = 3.80$, $p = 0.0689$).

V případě nejvyššího dosaženého úhlu v Inclined plane testu vyšly rozdíly mezi treatmenty jako nevýznamné ($F = 1.26$, $p = 0.3073$). Celkově vyšších úhlů v nakloněné rovině dosáhl treatment *KR* oproti *FP* ($t = 1.46$, $p = 0.1607$) a *SR* ($t = 0.34$, $p = 0.7413$). Treatment *FP* v tomto parametru zaostával za skupinou *SR* ($t = -1.30$, $p = 0.2104$). Rozdíl mezi běhy byl na hraně statistické významnosti ($t = 4.75$, $p = 0.0428$). Samotná váha testovaných zvířat se neukázala být pro nejvyšší dosažený úhel příliš významným faktorem ($F = 0.12$, $t = 0.7352$), interakce běhu s váhou ovšem vyšla silně ($F = 6.52$, $p = 0.0199$).

Rozdíl v celkovém počtu úspěchů v testu nakloněné roviny byl mezi treatmenty znovu statisticky nevýznamný ($F = 0.75$, $p = 0.4883$). Více dosažených úspěchů bylo zaznamenáno u treatmentu *SR* oproti *FP* ($t = 0.95$, $p = 0.3523$). Treatmenty *SR* a *KR* ($t = -0.07$, $p = 0.9478$) se v tomto parametru téměř nelišily. Váha nebyla pro celkový počet úspěchů příliš silný faktor ($F = 0.30$, $p = 0.5893$). Rozdíl mezi běhy byl velice významný ($F = 9.49$, $p = 0.0065$), taktéž i interakce běhu s váhou ($F = 9.83$, $p = 0.0057$).

Shrnutí

Prostřednictvím stanovené hypotézy H3 jsme předpokládali, že laboratorní potkani Long-Evans, kterým bude během ontogeneze umožněna plná hra (*FP*), dosáhnou v Inclined plane testu nejlepších výsledků. Ve dvou sledovaných parametrech – úhel do prvního pádu z nakloněné roviny a celkový počet úspěchů – byl však lepší treatment se sociálně redukovanou hrou (*SR*) oproti zbylým dvěma skupinám. V parametru nejvyššího dosaženého úhlu v nakloněné rovině se ukázal nejlepší treatment *KR*. Naopak treatment *FP* ve všech třech měřených parametrech v Inclined plane testu dosahoval nejhorších výsledků. Všechny naměřené rozdíly mezi treatmenty postrádaly statistickou významnost. Stanovenou hypotézu H3 se v Inclined plane testu nepodařilo verifikovat.

Přehledové tabulky vyhodnocení motoriky:

Níže zobrazené tabulky 12 – 14 slouží pro shrnutí celkových rozdílů u všech měřených parametrů motorických testů. Rozdíly pod hladinou statistické významnosti $p < 0.050$ jsou označeny zeleně. Kompletní tabulky jsou dostupné v přílohové sekci.

Tab. 12: Rozdíl v měřených parametrech BWT (editovaný výsek z kompletní tabulky)

BWT - běh A	rozdíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:
BWT_A_success_time	významný (FP>KR)	nevýznamný	významné
BWT_B_success_time	nevýznamný	nevýznamný	významné
BWT_B_fall_time	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
BWT_B_success_%	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
BWT_C_fall_time	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
BWT - běh B	rozdíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:
BWT_A_success_time	nevýznamný	nevýznamný	významné
BWT_A_success_%	nevýznamný	nevýznamný	významné
BWT_B_success_time	nevýznamný	nevýznamný	významné
BWT_B_success_%	významný (KR > FP) & (KR > SR)	nevýznamný	významné
BWT_C_success_time	nevýznamný	nevýznamný	významné
BWT_C_success_%	nevýznamný	na hraně význ.	nevýznamné

Tab. 13: Rozdíl v měřených parametrech RMT (editovaný výsek z kompletní tabulky)

RMT – běh A	rozdíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:
RMT_A_success_time	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
RMT_A_success_%	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
RMT_B_success_time	významný (FP > SR)	na hraně význ.	významné
RMT_B_success_%	nevýznamný	nevýznamný	významné
RMT_C_success_time	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
RMT_C_success_%	nevýznamný	nevýznamný	nevýznamné
RMT – běh B	rozdíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:
RMT_A_success_time	významný (KR > FP)	nevýznamný	významné
RMT_B_success_time	významný (KR > FP)	nevýznamný	významné
RMT_C_success_time	nevýznamný	nevýznamný	významné

Tab. 14: Rozdíl v měřených parametrech IPT (editovaný výsek z kompletní tabulky)

Inclined plane test	rozdíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:
IPT_first_fall_angle	nevýznamný	nevýznamný
IPT_highest_successful_angle	nevýznamný	nevýznamný
IPT_number_of_successes	nevýznamný	nevýznamný

Diskuse

Diskuse výsledků jednotlivých testů

Prostřednictvím manipulace se sociální hrou během kritické fáze ontogeneze testovaných laboratorních potkanů Long-Evans jsme si dali za cíl zjistit zdali treatment, v němž byla umožněna sociální hra v plném rozsahu (*FP*) bude vykazovat výrazně lepší pohybové, kognitivní a emocionální dovednosti oproti treatmentům, v němž byla herní aréna modifikována sníženým stropem (*KR*) nebo byl prostor pro hru umožněn sice v plném rozsahu, avšak laboratorní potkani Long-Evans v něm měli pro hru k dispozici partnera méně hravého plemene Fischer 344 (*SR*). Ukázalo se, že naměřené parametry realizovaných behaviorální testů tomuto předpokladu odpovídaly jen ojediněle.

Testy explorace a emocionality – *Open field test* a *Elevated plus maze test* – ukázaly, že laboratorní potkani z treatmentu *KR* projeví vyšší míru explorace ve všech třech měřených parametrech explorace v *Open field* aréně i v jednom parametru explorace v prostředí *Elevated plus maze*, kde laboratorní potkani z treatmentu *KR* celkově více nachodili, zatímco u treatmentu *FP* bylo procentu vstupů do otevřených ramen ze vstupů do všech ramen o něco málo vyšší. Také se ukázalo, že v prostřední části *Open field* arény významně více nachodili těžší laboratorní potkani bez ohledu na příslušnost k treatmentu. Zkoumané parametry anxiety se ukázaly být v *Open field* aréně nižší u treatmentu *KR* z hlediska vyššího času stráveném v prostřední části arény a nižšího procenta času inaktivity, ovšem treatment *FP* v *Open field* aréně vykazoval nejnižší projevy urinace a defekace. V prostředí *Elevated plus maze* byla pozorována nejnižší latence vstupu do otevřeného ramene a nejvyšší čas strávený v otevřených ramenech u treatmentu *SR*. Testování laboratorní potkani z treatmentu *KR* byli v bludišti EPM nejvíce aktivní a byly u nich zaznamenány nejnižší projevy urinace – statisticky významně nižší oproti skupině *SR*. Všechny ostatní popsání rozdílů v parametrech explorace a anxiety však u obou dvou testů postrádaly mezi treatmenty statistickou signifikanci pod hladinou $p = 0.05$.

Kognitivní test určený pro měření explorace a paměti – *Novel object recognition test* – ukázal, že z hlediska explorace v aréně více nachodil laboratorní potkani z treatmentu *KR* a byli v ní také celkově aktivnější. Indexy habituace explorativního chování, jež udávají rozdíl času stráveného u obou objektů mezi dvěma příslušnými fázemi NOR testu, se mezi treatmenty nevýznamně lišily. Index *ih1* vyšel jako vyšší pro treatment *KR*, index *ih2* vyšel jako vyšší pro treatment *SR* a index *ih3* vyšel jako vyšší pro treatment *FP*. V paměťových schopnostech v NOR testu se ukázali jako nejlepší laboratorní potkani *KR* v prvním ze dvou indexů diskriminace mezi novým a familiárním objektem ($D1: KR > SR > FP$, ovšem $DI: SR > FP > KR$). Dále byl u laboratorních potkanů z treatmentu *KR* také vyhodnocen vyšší index rekognice a vyšší index návštěv. Všechny zmíněné rozdíly v parametrech explorace a kognice mezi treatmenty v NOR testu postrádaly statistickou signifikanci pod hladinou $p = 0.05$.

V testu *Y-maze* kognitivní flexibility dopadl z hlediska učení nejlépe treatment *FP*, rozdíl v učení ovšem nebyl mezi žádnou skupinou statisticky signifikantní. V následném přeučení byl o něco lepší treatment *SR* oproti dvěma zbylým. Z hlediska porovnání schopnosti kognitivní flexibility byl dokonce treatment *SR* statisticky významně lepší než treatment *KR* ($t = 2.39$, $p = 0.0183$).

Vyhodnocení dvou motorických testů – *Beam walking* testu (BWT) a *Rope maintenance* testu (RMT) – v nichž byli testovaní laboratorní potkaní vystaveni třem typů kladin nebo provazů vždy ve třech sériích opakování, bylo ztíženo tím, že kvůli odlišné distribuci pádů a dosažených limitů musely být oba testy vyhodnoceny zvlášť pro letní běh (A) a pro zimní běh (B).

BWT, běh A: Zatímco v rychlosti zdolání kladiny typu A se ukázal být signifikantně lepší treatment *FP* oproti *KR* a nesignifikantně lepší oproti *SR*, na kladině typu B naopak byl nevýznamně lepší treatment *KR* oproti *FP* i *SR*. Pozorovaný čas do pádu je u kladiny typu B nejvyšší pro skupinu *SR* a u kladiny typu C nejvyšší pro treatment *KR*. Procentuální úspěšnost pro dokončení testu vycházela pro kladinu typu B nejvyšší pro treatment *SR*. **RMT, běh A:** Na provazu typu A v *Rope maintenance* testu se ukázal být nevýznamně lepší treatment *FP* oproti *KR* a *SR*. Ještě větší rozdíl ve zdolání provazu mezi treatmenty byl naměřen u provazu typu B, kde skupina *FP* byla oproti *SR* rychlejší statisticky významně, oproti *KR* nevýznamně. Oproti tomu na provaze typu C byla nejrychlejší skupina *SR*. Z hlediska parametru pro úspěšné dokončení testu byla skupina *SR* lepší na provazu A i B, zatímco na provazu typu C byla úspěšnější skupina *KR*. **BWT, běh B:** V rychlosti zdolání všech tří typů kladin A, B i C dosahoval nejkratších časů treatment *KR*. Rovněž šance dokončit úspěšně test u něho byla nejvyšší na všech třech kladinách. Šance dokončit úspěšně test na kladině typu B byla u tohoto treatmentu dokonce statisticky významně vyšší oproti skupinám *FP* a *SR*. **RMT, běh B:** V *Rope maintenance* testu byl na obou provazech typu A i B významně rychlejší treatment *KR* oproti *FP* a nevýznamně rychlejší oproti *SR*. Na provaze typu C byl nejrychlejší treatment *SR* oproti dvěma zbylým.

Ve dvou sledovaných parametrech *Inclined plane testu* – úhlu do prvního pádu z nakloněné roviny a celkového počet úspěchů – byl lepší treatment se sociálně redukovanou hrou (*SR*) oproti zbylým dvěma skupinám a v parametru nejvyššího dosaženého úhlu v nakloněné rovině se ukázal nejlepší treatment *KR*. Naopak treatment *FP* ve všech třech měřených parametrech *Inclined plane* testu dosahoval nejhorších výsledků. Ani jeden z rozdílů se ovšem neukázal být statisticky signifikantní.

Z výsledků všech měřených parametrů u sedmi provedených behaviorálních testů tedy rozhodně nevyplývá, že by treatment laboratorních potkanů, kterému byla v kritické fázi ontogeneze umožněna sociální hra na jednu hodinu denně v plném rozsahu (*FP*), byl významně lepší v pohybových, kognitivních a emocionálních dovednostech. Naopak u mnoha parametrů, především v běhu B námi navržených dvou motorických testů využívajících kladin a provazů, se ukázal statisticky významně i nevýznamně jako lepší treatment *KR* oproti treatmentu *FP*. Nadto v mnoha dalších parametrech těchto testů se ukázal být nevýznamně lepší treatment *SR* oproti *FP*. Příčina proč tomu tak je, jde proti soudobým hypotézám o funkci hry, a proto může být velice obtížné ji vysvětlit.

Z prezentovaných výsledků je patrné, že metodika všech behaviorálních testů použitých v této diplomové práci se pro zkoumání rozdílů odlišné ontogenetické zkušenosti se hrou osvědčila, jelikož určitá variabilita naměřených hodnot parametrů mezi treatmenty vycházela poměrně stabilně, přestože byla v naprosté většině případů statisticky nesignifikantní, tzn. nad hladinou $p < 0.05$. Důvod, proč nevycházely rozdíly mezi treatmenty signifikantní v testech explorační, emocionální a kognitivní v již zavedených a v praxi hojně používaných testech (Open field, Elevated plus maze, Novel object recognition test, Y-maze test kognitivní flexibility) může být vysvětlen jednoduše tím, že námi provedená modifikace sociální hry u laboratorních potkanů nemá na jejich explorační, emocionální a kognitivní dovednosti nakonec tak velký vliv, jak jsme původně předpokládali. Nesignifikantní rozdíly, které vycházely u některých kognitivních a emocionálních parametrů ve prospěch treatmentů *KR* a *SR* mohly být tudíž náhodné. V opačném případě by to svědčilo o tom, že pohybová nebo sociální redukce hry v malé míře pozitivně ovlivňuje pozdější explorační, emocionální a kognitivní dovednosti, což se zdá být velice neintuitivní, ale zcela se to zavrhnout nedá.

U treatmentu sociálně redukované hry laboratorních potkanů Long-Evans (*SR*) bylo predikováno, že si s nimi jejich partneři plemene Fischer 344 budou hrát s menší četností a celkový projev hry bude díky nim redukován (Siviy et al., 2011; Schneider et al., 2016; Siviy, 2018). Projev hry ovšem nemusel být u těchto herních partnerů nakonec redukován tak výrazně, jak jsme původně předpokládali. Vyhodnocení herních projevů u tohoto treatmentu z kamerových nahrávek hravých klecí bude zpracována až později.

Vysvětlit statisticky signifikantní rozdíly ve prospěch lepších kinematických dovedností u treatmentu *KR* oproti *FP* a *SR* v námi navržených testech (*Beam walking test*, *Rope maintenance test*) bude daleko obtížnější. Faktor váhy se pro predikci úspěšnosti v těchto testech nezdál příliš významný. V *Beam walking* testu váha testovaného zvířete u žádného z typů kladiny, ani v žádném z běhů nevyšla pod hladinou statistické významnosti $p = 0.05$. Nejedná se tedy o významný faktor predikce v rychlosti přebíhání; času, po kterém je zvíře schopno udržet se na kladině; ani v pravděpodobnosti úspěšně dokončit test. Váha se neukázala být statisticky signifikantním faktorem ani pro rychlost zdolání všech tří typů provazů v *Rope maintenance testu*, s výjimkou provazu typu B v běhu A, kde faktor signifikantní byl – lehčí zvířata zvládala test rychleji. Šance na úspěch v tomto testu na váze také příliš nezávisela. A do třetice váha se neukázala být významným faktorem ani pro jediný ze třech sledovaných parametrů *Inclined plane testu*.

Druhým faktorem, který mohl mít vliv na rychlost zdolání motorických testů a úspěšnost splnit test bez pádů nebo před dosažením limitu 120 vteřin, je faktor motivace. Všechny tři námi navržené motorické testy vycházely z předpokladu, že testované zvířete se a) po vložení na konec kladiny v *Beam walking* testu bude chtít po kladině co nejrychleji dostat z otevřeného prostoru do stabilní přihrádky b) po vložení na prostřední část provazu v *Rope maintenance* testu se bude chtít co nejrychleji dostat do jedné ze stabilních přihrádek aparatury c) po vystavení *Inclined plane* testu projeví zvíře ochotu šplhat po relativně kluzké nakloněné plošině nahoru za odměnou. Faktor motivace je ovšem velice obtížné jakkoliv kvantifikovat, a proto zůstává tato příčina

nezodpovězená. Nemůžeme ovšem vyloučit, že laboratorní potkani z treatmentu *KR* a *SR* byli ve všech třech úlohách více motivováni test dokončovat dle námi stanovených kritérií pro úspěch.

Vedle faktoru motivace navíc mohl určitou roli hrát i jistý kognitivní aspekt spočívající v pochopení motorické úlohy. V mnoha případech *Beam walking* testu a *Rope maintenance* testu bylo zaznamenáno, že testovaní laboratorní potkani dosáhli stabilní přihrádky buďto až ve třetí sérii opakování testu nebo ji nedosáhli vůbec, namísto toho u nich byl opakovaně zaznamenán limit 120 vteřin. Odlišit ale faktor motivace a kognitivní aspekt vzhledu, tzn. že si testované zvíře uvědomí, že pro něho může být fyzicky méně náročné co nejrychleji přešplhat po provaze do stabilní přihrádky než se na něm po dobu 120 vteřin udržet, ovšem není triviální. Toto pozorované chování proto lze jen obtížně interpretovat, a to obtížněji jej přisuzovat vlivu odlišné ontogenetické zkušenosti se hrou.

Celková diskuse

Jak již bylo uvedeno v části 1.3. této diplomové práce, evolučně založená teorie hravého chování předpokládá, že hra přináší jedincům, kteří ji uskutečňují, výhody oproti jiným jedincům, kteří ji uskutečňují méně nebo v menším rozsahu. Zmíněná část práce také popisuje některé teorie o tom, které konkrétní benefity by mohly ze hry plynout. Jak už konstatovala řada badatelů, kvůli obtížnosti testování těchto benefitů je bohužel dosud malý počet studií, které rigorózním způsobem empiricky testovaly četné hypotézy vyplývající z uvedených teorií. Teoretické články o funkci hry tak svým počtem, ale i ohlasem (například z hlediska počtu citací) převažují nad články založenými na empirickém výzkumu. Existují tři hlavní důvody, proč je takový experimentální výzkum hry obtížný.

Zaprvé není jednoduché hru pokusně manipulovat, aniž bychom zároveň ovlivnili další aspekty ontogenetické zkušenosti. Jak je popsáno v oddílu 1.4 této diplomové práce, k omezení ontogenetické zkušenosti se hrou byla u laboratorních potkanů manipulativně prováděna sociální izolace v tom období, kdy si potkani nejvíce hrají. Tím jsou ale zvířata zbavena nejen hry, ale i dalších aspektů sociální zkušenosti a nalezené rozdíly pak nelze s jistotou připsat hře jako kauzálnímu činiteli. Zadruhé se mohou efekty rozdílné zkušenosti se hrou ukázat v řadě různých stránek pozdějšího chování a není zřejmé, které behaviorální testy mají být pro ověření hypotéz použity. Zatřetí je známo, že hra a její důsledky jsou individuálně velmi variabilní a hledané efekty se tedy při malých pokusných vzorcích nemusí podařit prokázat.

V našem experimentu jsme se pokusili všechny tyto tři problémy obejít inovativním designem pokusu, větším počtem cíleně zaměřených testů a relativně početným vzorkem (vzhledem k náročnosti testování). Zaprvé, ontogenetickou zkušenost jsme dali všem zvířatům stejnou a cíleně ji odlišili jen během každodenní příležitosti ke hře v T-boxech, a to na plnou hru, hru kinematicky omezenou a hru sociálně omezenou. Pokud bychom později našli rozdíly v dovednostech potkanů, byly by průkazně způsobené odlišnou manipulací hry. Mohli jsme dokonce předpokládat, že kinematické omezení hry se projeví více v pozdějších testech motorických dovedností, zatímco sociální omezení hry například více v testech anxiety. Zadruhé

jsme potkany cíleně testovali ve třech doménách (emocionalita, kognice, motorika) a to v každé doméně v řadě parametrů. Zatřetí jsme testovali poměrně početný vzorek (s ohledem na náročnost každodenní manipulace a následného testování) 36 potkanů. Přes tuto snahu naše data nepotvrdila ani jednu ze třech testovaných hypotéz, nenašli jsme tedy u potkanů odchovaných s výrazně odlišnou zkušeností se hrou rozdíly v emocionálních, kognitivních ani motorických dovednostech. Ačkoli žádná podobná studie nebyla dosud provedena, můžeme výsledky porovnat s předchozími studiemi, kde byli potkani vystaveni různému prostředí ovlivňujícímu hru a poté testováni v behaviorálních testech. Některé z těchto studií ukázaly rozdílné chování potkanů u různých treatmentů. Avšak pokusy využívající sociální izolace laboratorních potkanů (e.g. Byrd & Briner, 1999; Frisone et al., 2002), nelze brát z výše uvedených důvodů jako důkazy účinků samotné hry.

V jiných pokusech, nichž byla použita citlivější manipulace omezení hry tím, že byli jako herní partneři použiti buď méně hraví potkani laboratorního plemene Fischer 344 (Schneider et al., 2016; Stark & Pellis, 2020) nebo potkani s farmakologicky sníženou herní aktivitou (Einon et al., 1978), případně dospělá zvířata (Burleson et al., 2016; Pellis, Pellis, & Williams, 2017). V těchto studiích byly nalezeny snížené sociální dovednosti jako jsou například deficity v sociální interakci, sociální paměti, zpracování sociálně přenášených informací a sníženou citlivostí na bolest, přehnané agresivní projevy při hře, anebo zvýšený sociální stres (Burleson et al., 2016; Schneider et al., 2016; Stark & Pellis, 2020).

Ve spojení s našimi výsledky by to mohlo znamenat, že hra u potkanů specificky posiluje rozvoj sociálních dovedností, avšak ovlivňuje méně, nebo možná vůbec ne, dovednosti emocionální, kognitivní či motorické. Tento závěr by bylo žádoucí podpořit či vyvrátit dalšími studiemi. Pokud by tento závěr platil, byl by spíše v rozporu s teorií tréninku nečekaného, která očekává efekty hry ve víc směrech, a ukazoval by více na trénink doménově specifických dovedností. Tento závěr by také byl v souladu se skutečností, že hra u potkanů má především sociální podobu v podobě rough-and-tumble zápasení. Je však nutné podotknout, že i u potkanů se ve hře vyskytují honičky a poskoky. Tato lokomoční podoba hry byla však u potkanů zatím málo studována. Je možné, že lokomoční podoba hry by se projevila silněji, kdyby si pokusní potkani mohli hrát v mnohem větších prostorách, než jsou malé chovné nádoby, které byly použity ve většině studií včetně té současné. Nelze vyloučit, že pak by se rozdíly v pozdějších motorických dovednostech prokázaly.

I přesto, že žádná ze tří hypotéz nebyla v naší studii potvrzena, pokládáme za důležité, že tento závěr je založen na několika nezávislých pilotních i ověřených testech. Zatímco testy emotionality (OF a EPM) byly použity v poměrně standardní podobě, testy NOR a *Y-maze* a tři testy motorických dovedností byly specificky upraveny pro naše účely. Tyto testy spolehlivě zachytily interindividuální behaviorální variabilitu mezi jedinci a mohou být použity v dalších experimentech.

Interindividuální variabilita chování potkanů v testech byla v našem pokusu značná. Z důvodů, které se nepodařilo plně objasnit, se ve svém chování značně lišila zvířata v obou bězích. Ačkoli pokusní potkani pocházeli z téže chovatelské instituce a byli chováni stejnými způsobem, zvířata v běhu B měla nižší tělesnou hmotnost. Tělesná hmotnost také měla prokazatelný vliv na některé parametry testů, zejména těch, které souvisely s pohybem zvířat, ať už v OF testu nebo v motorických testech. Navíc se v některých případech ukázala významnou interakce mezi během a hmotností. Tyto výsledky je velmi těžké interpretovat, proto se do interpretace těchto výsledků nepouštíme, neboť by byly jen spekulacemi. Nicméně velká variabilita mezi jednotlivými zvířaty a její spojitost s tělesnou hmotností ukazují, jak jsou testované proměnné citlivé na další vlivy. To může být jednou z příčin negativních výsledků i v tomto experimentu.

V širší rovině je zajímavé zmínit, že některé z nejdůkladněji provedených empirických studií zkoumajících funkci hry také přinesly negativní výsledky týkající se všech testovaných hypotéz. Nejznámějším příkladem je série studií zkoumající možné benefity hry u surikat (*Suricata suricatta*), provedená Lyndou Sharpe (2005a, 2005b, 2005c) ve volné přírodě. Rozsáhlé datové soubory získané mnoholetým pozorováním ukázaly významné interindividuální rozdíly v míře hry, nepodařilo se však prokázat žádný z testovaných vztahů k jejich sociálním vazbám, dominantnímu postavení, úspěšnosti v agresivním chování či jiným parametrům úspěchu.

Závěr

Dvě soudobé vědecké teorie o funkci hry – hypotéza nácviku pohybových dovedností (Byers, 1998) a hypotéza tréninku na neočekávané (Špinka et al., 2001) – předpokládají, že hra má v evoluční biologii adaptivní hodnotu spočívající v tom, že hrající si mládě, nejčastěji savčího nebo ptačího druhu, prováděnou hrou nacvičuje určité dovednosti, které v dospělosti uzpůsobí v dynamicky proměnlivém fyzickém i sociálním prostředí. Cílem této diplomové práce bylo otestovat jak námi provedené omezení herní zkušenosti v kritickém období ontogeneze laboratorních potkanů plemene Long-Evans ovlivní jejich pozdější pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti.

Náš výzkumný byl postaven na třech hypotézách: a) omezení hry zvýší anxiету potkanů a sníží jejich exploraci; b) omezení hry zhorší paměť a schopnost učení u potkanů; c) omezení hry zhorší lokomoční schopnosti potkanů v úlohách náročných na udržení rovnováhy. Pro verifikaci těchto hypotéz bylo provedeno dohromady sedm behaviorálních testů. Hypotéza, že omezení hry zvýší anxiету laboratorních potkanů a sníží jejich exploraci v testech *Open field* a *Elevated plus maze* nebyla ani u jednoho z těchto testů potvrzena. Hypotéza, že omezení hry zhorší paměť a schopnost učení u laboratorních potkanů rovněž nebyla potvrzena v testu *Novel object recognition* ani v testu kognitivní flexibility v bludišti *Y-maze*. A nakonec hypotéza, že omezení hry zhorší lokomoční schopnosti potkanů v úlohách náročných na udržení rovnováhy nebyla spolehlivě potvrzena ani v jednom z provedených motorických testů.

Cíle práce byly naplněny. Z výsledků provedených behaviorálních testů nevyplyvá, že by námi provedené sociální a pohybové omezení sociální hry v pro hru kritické fázi ontogeneze laboratorních potkanů *Rattus norvegicus* mělo významný negativní vliv na jejich pohybové, emocionální a kognitivní dovednosti. Ve spojení s již publikovanými studiemi, které ukázaly určité benefity v sociální oblasti, můžou tyto výsledky naznačovat, že hra u potkanů má ontogenetické účinky v sociální, ale nikoli v emocionální, kognitivní nebo motorické oblasti.

Seznam použité literatury

- Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N. P., Bollen, E., Gijsselaers, H. J., Lieben, C. K., Steinbusch, H. W., & Prickaerts, J. (2012). Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioural brain research*, 232(2), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.022>
- Alcock, J. (2005). *Animal behavior: An evolutionary approach*. 8th ed.
- Barber, N. (1991). Play and energy regulation in mammals. *Quarterly Review of Biology*, 66. pp. 129-147,
- Besheer, J. & Bevins, Rick. A. (2000). The role of environmental familiarization in novel-object preference, *Behavioural Processes*. 50(1), pp. 19-29, [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(00\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(00)00090-5)
- Bell, H.C., McCaffrey, D.R., Forgie, M.L., Kolb B. & Pellis, S.M. (2009). The role of the medial prefrontal cortex in the play fighting of rats. *Behavioral Neuroscience*, 123. 1158–1168. [PubMed: 20001100]
- Biben, M. (1979). Predation and predatory play behaviour of domestic cats. *Animal Behaviour*, 27. 81-94.
- Bolles, R. C., & Woods, P. J. (1964). The ontogeny of behavior in the albino rat. *Animal Behaviour*, 12. 427–441.
- Burgdorf J., Panksepp J., Beinfeld M. C., Kroes R. A., & Moskal J. R. (2006). Regional brain cholecystokinin changes as a function of rough-and-tumble play behavior in adolescent rats. *Peptides* 27(1), 172– 177.
- Burghardt, G. M. (1988). Precocity, play, and the ectotherm endotherm transition – profound reorganization or superficial adaptation? In E. M. Blass (ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*. New York: Plenum Publishing. pp. 107-148
- Burghardt, G. M. (1998). The evolutionary origins of play revisited: lessons from turtles. In M. Bekoff and J. A. Byers (Eds), *Animal Play: Evolutionary, Comparative, and Ecological Perspectives*, Cambridge (UK): Cambridge University Press. pp. 1–26.
- Burghardt, G. M. (1999). Conceptions of play and the evolution of animal minds. *Evolution and Cognition*, 5. pp. 115-123.
- Burghardt, G. M. (2005). *The Genesis of Animal Play: Testing the Limits*. Cambridge (MA): MIT Press.
- Burghardt, G. M. (2015). Play in fishes, frogs and reptiles. *Current Biology*, 25(1), R9–R10. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.027>
- Byers, A. (1984). Play in ungulates. In P. K. Smith (ed.), *Play in Animals and Humans*, pp.43-65. Oxford: Basil Blackwell.
- Byers, A. (1998). Biological effects of locomotor play: getting into shape, or something more specific? In M. Bekoff and A. Byers (Eds.), *Animal Play: Evolutionary, Comparative and Ecological Perspectives*, pp. 205—220. Cambridge: Cambridge University Press.

- Byers, J. A., & Walker, C. B. (1995). Refining the motor training hypothesis for the evolution of play. *American Naturalist* 146, pp.25–40.
- Byrd, K. R., & Briner, W. E. (1999). Fighting, nonagonistic social behavior, and exploration in isolation-reared rats. *Aggressive Behavior*, 25, 211–223.
- Calcagnetti, D. J., & Schechter, M. D. (1992). Place conditioning reveals the rewarding aspect of social interaction in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 51(4), pp. 667-672.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., et al. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.* 19, 3248–3257. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-03248.1999
- da Silva, F. B. R., Cunha, P. A., Ribera, P. C., Barros, M. A., Cartagenes, S. C., Fernandes, L. M. P., Teixeira, F. B., Fontes-Junior, E. A., Prediger, R. D., Lima, R. R. & Maia, C. S. F. (2018). Heavy chronic ethanol exposure from adolescence to adulthood induces cerebellar neuronal loss and motor function damage in female rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 11.
- Dapporto, L., Turillazzi, S., Palagi, E. (2006). Dominance interactions in young adult paper wasp (*Polistes dominulus*) foundresses: a playlike behavior? *Journal of Comparative Psychology*, 120(4). 394 – 400.
- Day, H. D., Seay, B. M., Hale, P., & Hendricks, D. (1982). Early social deprivation and the ontogeny of unrestricted social behavior in the laboratory rat. *Developmental Psychobiology*, 15, 47–59.
- Dhawan, S. S., Tait, D. S., & Brown, V. J. (2019). More rapid reversal learning following overtraining in the rat is evidence that behavioural and cognitive flexibility are dissociable. *Behavioural brain research*, 363, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.055>
- Diamond, J., & Bond, A. B. (2003). A Comparative Analysis of Social Play in Birds. *Papers in Behavior and Biological Sciences*, (35).
- Donaldson, T. M., Newberry, R. C., Špinka, M. & Cloutier, S. (2002). Effects of early play experience on play behaviour of piglets after weaning. *Applied Animal Behaviour Science*, 79, 221-231.
- Einon, D. F., & Michael J. Morgan. (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Developmental Psychobiology* 10. pp. 123–32.
- Einon, D. F., Michael J. Morgan, & Christopher C. Kibbler. (1978). Brief periods of socialization and later behavior in the rat. *Developmental Psychobiology*, 11. pp. 213–25.
- Einon, D., & Potegal, M. (1991). Enhanced defense in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Aggressive Behavior*, 17, pp. 27–40.
- Eisenberg, J. F. (1981). *The mammalian Radiations: An analysis of Trends in Evolution, Adaptation, and Behaviour*. Chicago: University of Chicago Press
- Emery, N. J., & Clayton, N. S. (2015). Do birds have the capacity for fun? *Current Biology*, 25(1). 16-20, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.020>.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59. doi:10.1016/0166-4328(88)90157-x

- Ennaceur, A., Michalikova, S., Chazot P.L. (2006). Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behavioural Brain Research* 171(1), 26-49,
- Fagen, R. (1981). *Animal Play Behavior*. Oxford: Oxford University Press.
- Feng Q., Ma Y., Mu S., Wu J., Chen S., OuYang L., et al. (2014) Specific Reactions of Different Striatal Neuron Types in Morphology Induced by Quinolinic Acid in Rats. *PLoS ONE* 9(3): e91512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091512>
- Frisone, D. F., Frye, C. A., & Zimmerberg, B. (2002). Social isolation stress during the third week of life has age-dependent effects on spatial learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 128, 153–160.
- Gamble J. R., & Cristol D. A. (2002). Drop-catch behaviour is play in herring gulls, *Larus argentatus*. *Animal Behaviour* 63(2), 339 –345.
- Genaro, G., & Schmidek, W.R. (2000), Exploratory Activity of Rats in Three Different Environments. *Ethology*, 106. pp. 849-859. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00605.x>
- Gentsch, G., Lichtsteiner, M., Frischknecht, H. R., Feer, H., Siegfried, B. (1988). Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiology & Behavior* 48. pp. 13-16.
- Graham, K. L., & Burghardt, G. M. (2010). Current perspectives on the biological study of play: signs of progress. *The Quarterly Review of Biology*, 85(4), 393–418.
- Groos, K. (1898). *The Play of Animals*. New York: D. Appleton.
- Halliday, M.S., 1968: Exploratory behaviour. In: *Analysis of behavioural change*. L. Weikrantz Edt., Harper and Row, New York.
- Harcourt, R. (1991). Survivorship Costs of Play in the South-American Fur-Seal. *Animal Behavior* 42, 509-511.
- Havekes, R., Timmer, M., & Van der Zee, E. A. (2007). Regional differences in hippocampal PKA immunoreactivity after training and reversal training in a spatial Y-maze task. *Hippocampus*, 17(5), 338–348. <https://doi.org/10.1002/hipo.20272>
- Himmler, S. M., Himmler, B. T., Pellis, V. C., & Pellis, S. M. (2016). Play, variation in play and the development of socially competent rats. *Behaviour*, 153(9–11), 1103–1137. doi:10.1163/1568539X-00003307
- Holloway, K. S., & Suter, R. B. (2004). Play Deprivation without Social Isolation: Housing Controls. *Developmental Psychobiology*, 44(1), 58–67. <https://doi.org/10.1002/dev.10151>
- Izquierdo, A., Brigman, J.L., Radke, A.K., Rudebeck, P.H. & Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: An updated perspective, *Neuroscience* 345 pp. 12-26, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.021>
- Johnson, R. N., DeSisto, M. J., Jr., & Koenig, A. B. (1972). Social and developmental experience and interspecific aggression in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 79, 237–242
- Kemp, A. C. (2001). Family Bucerotidae (Hornbills). In J. del Hoyo, A. Elliott & J. Sargatal,

- (eds.). *Handbook of birds of the world, Vol. 6, Mousebirds to Hornbills* Lynx Edicions, Barcelona, pp. 436-523.
- Kim, D., Schallert, T., Liu, Y., Browarak, T., Nayeri, N., Tessler, A., Fischer, Murray M. (2001). Transplantation of genetically modified fibroblasts expressing BDNF in adult rats with a subtotal hemisection improves specific motor and sensory functions. *Neurorehabil Neural Repair*. 2001;15(2):141-50. doi: 10.1177/154596830101500207. PMID: 11811255.
- Mackintosh, N. J., Mcgonigle, B., & Holgate, V. (1968). Factors underlying improvement in serial reversal learning. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, 22(2), 85–95. <https://doi.org/10.1037/h0082753>
- Mikulecká, A., & Mareš, P. (2002). NMDA receptor antagonists impair motor performance in immature rats. *Psychopharmacology* 162, pp. 364–372 . <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1122-2>
- Murphy, M. P., Rick, J. T., Milgram, N. W. & Ivy, G. O. (1995). A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64, 181-186.
- Müller-Schwarze, D. (1984). Analysis of play behavior: what do we measure and when? In P. K. Smith. (ed.), *Play in Animals and Humans*, Oxford (UK): Basil Blackwell. pp. 147–158
- Lewis K. P. 2000. A comparative study of primate play behaviour: implications for the study of cognition. *Folia Primatologica* 71(6), 417– 421.
- Panksepp, J., Siviy, S., & Normansell, L. (1984). The psychobiology of play: Theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 8(4), 465–492
- Panksepp, J., Normansell, L., Cox, J.F., & Siviy, S.M. (1994). Effects of neonatal decortication on the social play of juvenile rats. *Physiol Behav*. 56, 429–443.
- Pellis, S. M. (2002). Sex differences in play fighting revisited: Traditional and nontraditional mechanisms of sexual differentiation in rats. *Archives of Sexual Behavior*, 31(1), 17–26. <https://doi.org/10.1023/A:1014070916047>
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (1987). Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Aggressive Behavior*, 13, 227–42.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (1990). Differential rates of attack, defense, and counterattack during the developmental decrease in play fighting by male and female rats. *Developmental Psychobiology* 23, 215–31.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (1997). The prejuvenile onset of play fighting in rats (*Rattus norvegicus*). *Developmental Psychobiology*, 31. pp. 193–205.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (2007). Rough-and-tumble play and the development of the social brain. *Current Directions in Psychological Science* 16:95–98.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (2009). *The Playful Brain: Ventures to the Limits of Neuroscience*. Oxford (UK): Oneworld Press
- Pellis, S.M. Pellis V.C. & Whishaw, I.Q. (1992). The role of the cortex in play fighting by rats: Developmental and evolutionary implications. *Brain Behav Evol*. 1992; 39:270–284. [PubMed: 1498649]

- Pellis, S. M., Pellis, V. C., & Bell, H. C. (2010). The function of play in the development of the social brain. *American Journal of Play*, 2(3), 278–296. Retrieved from <https://mail.google.com/mail/u/1/>
- Pellis, S., Pellis, V., & Williams, L. (2017). Adult-juvenile play fighting in rats: Insight into the experiences that facilitate the development of socio-cognitive skills. *International Journal of Comparative Psychology*, 30.
- Pellis, S. M., Field, E. F., Smith, L. K., & Pellis, V. C. (1997). Multiple differences in the play fighting of male and female rats. Implications for the causes and functions of play. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 21(1), 105–120.
- Pellis, S. M., Burghardt, G. M., Palagi, E., & Mangel, M. (2015). Modeling play: distinguishing between origins and current functions. *Adaptive Behavior*, 23(6), 331–339. <https://doi.org/10.1177/1059712315596053>
- Petrů, M., Špinka, M., Charvátová, V. & Lhota, S. (2009). Revisiting play elements and self-handicapping in play: A comparative ethogram of five old world monkey species. *Journal of Comparative Psychology*, 123, pp. 250-263.
- Pruitt, J., Burghardt, G., & Riechert, S. (2011). Non-Conceptive Sexual Behavior in Spiders: A Form of Play Associated with Body Condition, Personality Type, and Male Intrasexual Selection. *Ethology*, 118. 33-40. [10.1111/j.1439-0310.2011.01980.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2011.01980.x).
- Rivlin, A. S. & Tator, C. H. (1977). Objective clinical-assessment of motor function after experimental spinal-cord injury in rat. *Journal of Neurosurgery*, 47, pp. 577-581.
- Robinson, D.L., Zitzman, D.L., Smith, K.J., & Spear, L.P., (2011). Fast dopamine release events in the nucleus accumbens of early adolescent rats. *Neuroscience* 176, 296–307.
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6), pp. 801–810. doi: 10.1016/S0149-7634(96)00058-9.
- Sharpe, L. L. (2005a). Frequency of social play does not affect dispersal partnerships in wild meerkats. *Animal Behaviour* 70(3), 559 –569.
- Sharpe, L. L. (2005b). Play does not enhance social cohesion in a cooperative mammal. *Animal Behaviour* 70(3), 551–558.
- Sharpe, L. L. (2005c). Play fighting does not affect subsequent fighting success in wild meerkats. *Animal Behaviour* 69, 1023–1029.
- Schneider, M. & Koch, M., (2005). Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 30, 944–957.
- Schneider, P., Bindila, L., Schmahl Ch., Bohus M., Meyer-Lindenberg A., Lutz B., Spanagel R., & Schneider M. (2016). Adverse Social Experiences in Adolescent Rats Result in Enduring Effects on Social Competence, Pain Sensitivity and Endocannabinoid Signaling. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice: Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6)

- Siviy S. M. (2016). A Brain Motivated to Play: Insights into the Neurobiology of Playfulness. *Behaviour*, 153(6-7), 819–844. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003349>
- Siviy, S. M. (2018). Effects of neonatal handling on play and anxiety in F344 and Lewis rats. *Developmental Psychobiology*, 60(4), 458–467. <https://doi.org/10.1002/dev.21622>
- Siviy, S. M., & Panksepp, J. (2011). In search of the neurobiological substrates for social playfulness in mammalian brains. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1821–1830. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.006>
- Siviy, S. M., Crawford, C. A., Akopian, G., & Walsh, J. P. (2011). Dysfunctional play and dopamine physiology in the Fischer 344 rat. *Behavioural brain research*, 220(2), 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.009>
- Sommer, V., & Mendoza-Gianados, D. (1995). Play as indicator of habitat quality: a field study of langur monkeys (*Presbytis entellus*) . *Ethology*, 99, pp. 177-192.
- Špinka, M., Newberry, R. C., & Bekoff, M. (2001). Mammalian play: training for the unexpected. *The Quarterly Review of Biology*, 76(2), 141–168. Retrieved from doi: 10.1086/393866. PMID: 11409050.%0A
- Stark, R., & Pellis, S. M. (2020). Male Long Evans rats reared with a Fischer-344 peer during the juvenile period show deficits in social competency: a role for play. *International Journal of Play*, 9(1), 76–91. <https://doi.org/10.1080/21594937.2020.1720142>
- Tanner, J.E., & Byrne, R.W. (2010). Triadic and collaborative play by gorillas in social games with objects. *Animal Cognition*, 13, 591–607.
- Thompson K. V. (1998). Self assessment in juvenile play. M. Bekkoff & Byers J.A (eds.) In *Animal Play: Evolutionary, Comparative and Ecological Perspectives*. Cambridge.
- Thor, D. H., & Holloway, W.R. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22, 587–90.
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.*, 44(2) pp. 463-9. doi: 10.1016/0091-3057(93)90492-c
- Trezza, V., Baarendse, P.J.J., & Vanderschuren, L.J.M.J. (2010). The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 463–469.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Achterberg, E.J. M., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* (70), pp. 86-105, ISSN 0149-7634, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.201>
- van den Berg, C. L., Hol, T., Van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., & Koolhaas, J. M. (1999). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental Psychobiology*, 34, 129–138
- von Euler, M., Akesson, E., Samuelsson, E. B., Seiger, A. & Sundstrom, E. (1996). Motor performance score: A new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, 137, pp. 242-254.
- von Frijtag, J. C., Schot, M., van den Bos, R. & Spruijt, B. M. (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress

- situation in rats. *Developmental Psychobiology*, 41. pp.58–69.
- Watson, D. (2010). The Play Associations of Red-necked Wallabies (*Macropus rufogriseus banksianus*) and Relation to Other Social Contexts. *Ethology*. 94. 1 - 20. 10.1111/j.1439-0310.1993.tb00543.x.
- Winkler, S. L., & Bryant, G. A. (2021). Play vocalisations and human laughter: a comparative review. *Bioacoustics*, 30(5), 499–526. <https://doi.org/10.1080/09524622.2021.1905065>
- Zylinski, S. (2015). Fun and play in invertebrates. *Current Biology*, 25(1), R10–R12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.068>

Přílohy

Tab. 15: Údaje o testovaných zvířatech (Vysvětlivky: Run – běh; Litter – vrh; Box – párová klec; weight_W7, weight_W8, weight_W9, weight_W10 – naměřené váhy v 7., 8., 9. a 10. postnatálním týdnu).

Animal	Run	Litter	Treatment	Box	weight_W7	weight_W8	weight_W9	weight_W10
K1	A	Vrh1	K	K12	184	213	249	251
K2	A	Vrh2	K	K12	169	199	234	263
K3	A	Vrh3	K	K34	162	190	211	239
K4	A	Vrh4	K	K34	169	194	225	254
K5	A	Vrh5	K	K56	158	196	232	262
K6	A	Vrh6	K	K56	213	234	270	300
P1	A	Vrh1	P	P12	191	224	273	309
P2	A	Vrh2	P	P12	188	212	253	287
P3	A	Vrh3	P	P34	179	212	256	287
P4	A	Vrh4	P	P34	183	205	246	280
P5	A	Vrh5	P	P56	179	203	241	278
P6	A	Vrh6	P	P56	207	240	280	302
S1	A	Vrh1	S	S1F1	189	203	248	285
S2	A	Vrh2	S	S2F2	198	227	269	297
S3	A	Vrh3	S	S3F3	191	221	271	284
S4	A	Vrh4	S	S4F4	179	189	225	256
S5	A	Vrh5	S	S5F5	158	184	221	257
S6	A	Vrh6	S	S6F6	227	247	306	327
K1	B	Vrh1	K	K12	109	125	143	148
K2	B	Vrh2	K	K12	109	116	129	138
K3	B	Vrh3	K	K34	95	104	120	130
K4	B	Vrh4	K	K34	105	125	149	163
K5	B	Vrh5	K	K56	83	95	105	119
K6	B	Vrh6	K	K56	89	101	115	131
P1	B	Vrh1	P	P12	91	102	122	138
P2	B	Vrh2	P	P12	90	99	106	131
P3	B	Vrh3	P	P34	88	99	121	135
P4	B	Vrh4	P	P34	95	99	111	123
P5	B	Vrh5	P	P56	108	111	119	133
P6	B	Vrh6	P	P56	73	84	100	108
S1	B	Vrh1	S	S1F1	88	103	115	131
S2	B	Vrh2	S	S2F2	85	96	109	125
S3	B	Vrh3	S	S3F3	88	98	111	128
S4	B	Vrh4	S	S4F4	90	97	104	116
S5	B	Vrh5	S	S5F5	110	130	158	179
S6	B	Vrh6	S	S6F6	77	87	105	116

Tab. 16: Souhrn celkového vyhodnocení parametrů testů Open field, Elevated plus maze, Novel object recognition a Y-maze.

Open field test	rozdíly mezi treatmenty:	rozdíly mezi běhy:	rozdíly mezi týdny:	kovariát s váhou:	interakce váha * běh	rezidua:	homoskedasticita
OF_arena_dist_rel	nevýznamný (KR > FP > SR)	významný (B > A)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	významný	významná	normálně rozdělená	ANO
OF_middlezone_dist_rel	nevýznamný (KR > SR > FP)	na hraně význam. (B > A)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	významný	významná	normálně rozdělená	ANO
OF_middlezone_visits_rel	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný (B > A)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	na hraně význam.	významná	normálně rozdělená	ANO
OF_middlezone_time	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný (B > A)	významný (1 > 2) & (3 > 2)	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
OF_arena_inakt_	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (A > B)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	významný	významná	normálně rozdělená	ANO
OF_ari	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (B > A)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	-	-	-	-
OF_defe	nevýznamný (SR > KR > FP)	významný (A > B)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	-	-	-	-

Elevated plus maze test	rozdíly mezi treatmenty:	rozdíly mezi běhy:	rozdíly mezi týdny:	kovariát s váhou:	interakce váha * běh	rezidua:	homoskedasticita
EPM_arena_dist_rel	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (B > A)	významný (3 > 1) & (3 > 2)	nevýznamný	významná	normálně rozdělená	ANO
EPM_OAV	nevýznamný (FP > KR > SR)	nevýznamný (B > A)	nevýznamný (1 > 2)	významný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
EPM_OA_latency	nevýznamný (KR > FP > SR)	na hraně význam. (A > B)	významný (2 > 1) & (2 > 3)	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
EPM_OAT	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (B > A)	významný (3 > 2)	nevýznamný	na hraně význam.	normálně rozdělená	ANO
EPM_inakt	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (A > B)	významný (2 > 1) & (2 > 3)	nevýznamný	významná	normálně rozdělená	ANO
EPM_ari	významný (SR>KR) & (SR > FP)	nevýznamný (B > A)	významný (1 > 2) & (1 > 3)	-	-	-	-
EPM_defe	N/A (malý vzorek)	N/A (malý vzorek)	N/A (malý vzorek)	-	-	-	-
EPM_fall (běh A)	nevýznamný (FP > KR > SR)	N/A (malý vzorek)	nevýznamný (2 > 3)	-	-	-	-

Novel object recognition test	rozdíly mezi treatmenty:	rozdíly mezi běhy:	rozdíly mezi fázemi	kovariát s váhou:	interakce váha * běh	rezidua:	homoskedasticita
NOR_arena_dist_rel	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný (B > A)	významný (1 > 2 a 3); (2 > 3)	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_arena_inakt_	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (A > B)	významný (1 > 2 a 3)	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_ih1_5min	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_ih2_5min	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_ih3_5min	nevýznamný (FP > SR > KR)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_D1	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_DI	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_RI	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
NOR_VI	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (A > B)	-	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO

Y-maze test	rozdíly mezi treatmenty:	rozdíly mezi běhy:	rozdíly mezi sériemi	kovariát s váhou:	interakce váha * běh	rezidua:	homoskedasticita
YM_learning	nevýznamný (FP > SR > KR)	nevýznamný (A > B)	celkové nevýznamný	nevýznamný	nevýznamná	normálně rozdělená	ANO
YM_reversal	významný (SR>KR) & (SR > FP)	nevýznamný	celkové významný	významný	na hraně význam.	normálně rozdělená	ANO

Tab. 17: Souhrn celkového vyhodnocení parametrů motorických testů (lepší výkon v testu znamená: nižší čas v úspěšném dokončení testu BWT nebo RMT; vyšší čas do pádu z kladiny (BWT) nebo provazu (RMT); a vyšší šanci na úspěch v BWT nebo RMT testu bez pádu a bez dosažení limitu).

BWT - běh A	rozíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:	rezidua:	homoskedasticita
BWT_A_success_time	významný (FP>KR) & (FP> SR)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (2 > 1)	normálně rozdělená	ANO
BWT_B_success_time	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 2)	normálně rozdělená	ANO
BWT_B_fail_time	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný	nevýznamné	nenormálně rozdělená	NE
BWT_B_success_%	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný	nevýznamné	-	-
BWT_C_fail_time	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný	nevýznamné	nenormálně rozdělená	NE
BWT - běh B	rozíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:	rezidua:	homoskedasticita
BWT_A_success_time	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (3 > 2)	normálně rozdělená	ANO
BWT_A_success_%	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (2 > 1)	nenormálně rozdělená	NE
BWT_B_success_time	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1)	normálně rozdělená	ANO
BWT_B_success_%	významný (KR > FP) & (KR > SR) & (SR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1)	normálně rozdělená	ANO
BWT_C_success_time	nevýznamný (KR > FP > SR)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (2 > 1)	normálně rozdělená	ANO
BWT_C_success_%	nevýznamný (KR > FP > SR)	na hraně významnosti	nevýznamné		
RMT - běh A	rozíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:	rezidua:	homoskedasticita
RMT_A_success_time	nevýznamný (FP > SR > KR)	nevýznamný	nevýznamné	normálně rozdělená	ANO
RMT_A_success_%	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný	nevýznamné	-	-
RMT_B_success_time	významný (FP > SR) & (FP > KR)	na hraně význam.	významné (1 > 2)	normálně rozdělená	ANO
RMT_B_success_%	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1)	-	-
RMT_C_success_time	nevýznamný (SR > FP > KR)	nevýznamný	nevýznamné	normálně rozdělená	ANO
RMT_C_success_%	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný	nevýznamné	-	-
RMT - běh B	rozíl mezi treatmenty:	kovariát s váhou:	opakování:	rezidua:	homoskedasticita
RMT_A_success_time	významný (KR > FP) & (SR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (3 > 2)	normálně rozdělená	ANO
RMT_B_success_time	významný (KR > FP) & (SR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1)	normálně rozdělená	ANO
RMT_C_success_time	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný	významné (3 > 1) & (3 > 2)	normálně rozdělená	ANO
Inclined plane test	rozíl mezi treatmenty:	rozíl mezi běhy:	kovariát s váhou:	rezidua:	homoskedasticita
IPT_first_fail_angle	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný (B > A)	nevýznamný	normálně rozdělená	ANO
IPT_highest_successfu	nevýznamný (KR > SR > FP)	nevýznamný (A > B)	nevýznamný	normálně rozdělená	ANO
IPT_number_of_succe	nevýznamný (SR > KR > FP)	nevýznamný (A > B)	nevýznamný	normálně rozdělená	ANO