

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra etologie a zájmových chovů



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv různé ontogenetické zkušenosti na ultrazvukovou
komunikaci u mladých laboratorních potkanů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Ilčíková

Obor studia: Management zdraví a welfare zvířat

Vedoucí práce: doc. RNDr. Marek Špínka, CSc.

© 2022/2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv různé ontogenetické zkušenosti na ultrazvukovou komunikaci u mladých laboratorních potkanů " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Marku Špinkovi, CSc. za cenné rady, vřelý a ochotný přístup, odborná doporučení a pomoc při analýze dat. Taktéž velmi děkuji Bc. Marii Radchenko za pomoc při experimentu a její ochotný a milý přístup a Dr. Quanyao Liu Ph.D., který mi poskytl cenné rady a zejména pomoc při analytickém zpracování dat. Ráda bych také poděkovala své rodině, blízkému okruhu přátel a partnerovi za jejich podporu.

Vliv různé ontogenetické zkušenosti na ultrazvukovou komunikaci u mladých laboratorních potkanů

Souhrn

Potkani obecní (*Rattus norvegicus*) jsou vysoce sociální zvířata, která pro normální sociální vývoj potřebují udržovat kontakt s dalšími jedinci svého druhu. Pokud je potkanům během ontogeneze bráněno v sociální interakci, mohou se u nich v dospělosti objevit sociální poruchy. Produkce ultrazvuků (USV) zvyšuje soudržnost skupiny a specifická volání vyjadřují afektivní stavy potkanů. Afektivní prožitky jsou psychofyziologické stavy zahrnující pocity, emoce a nálady jedince. Jsou prožívány buď příjemně nebo naopak nepříjemně. Tato práce byla především zaměřena na akutní emoce, které jsou vyjadřovány prostřednictvím ultrazvukové komunikace. Potkani obvykle vydávají dva typy volání – pozitivní 50kHz, které jsou produkovány hlavně při hravých interakcích, a negativní 22kHz, které jsou vydávány během stresových situacích. Existuje metoda, která spolehlivě dokáže vyvolat produkci 50kHz USV a je známa pod pojmem lechtání potkanů (tickling). Jedná se o hravou manipulaci, která napodobuje sociální hru potkanů „rough-and-tumble“.

Cílem této studie bylo porovnat vokalizaci potkanů, kterým byla od odstavu umožněna odlišná kvalita sociální hry, a ověřit, zda kineticky nebo sociálně omezená hra ovlivňuje produkci USV během lechtání s člověkem. Následně byla zkoumána také korelace negativních 22kHz a pozitivních 50kHz USV, stejně jako konzistentně individuální četnost pozitivních 50kHz USV a negativních 22kHz USV vydávaných během lechtání. Všem experimentálním potkanům byly umožněny párové hry ve věku 22 dnů do 70-76 dnů. Hravé interakce byly poskytovány každý všední den (hodinu denně). Pro zkoumání vlivu sociálních a kinetických aspektů hry bylo v každém ze 3 běhů náhodně rozděleno 18 potkanů do 3 skupin po 6 jedincích – kontrolní, sociálně omezené a kineticky omezené. Potkani z kontrolní skupiny si hráli ve dvojici s potkanem z kmene Long-Evans v normální kleci bez omezení. Potkani ze skupiny s kineticky omezenou hrou si také hráli ve dvojici s Long-Evans potkanem, ale jejich hrací aréna měla výškově omezený strop z pletiva, který se každý týden zmenšoval. Potkani ze skupiny se sociálním omezením si hráli v normální kleci bez omezení, ale byli spárováni s potkany z kmene Fischer-344, kteří vykazují znaky snížené sociální interakce. Jakmile potkani dosáhli věku 35 dní, byli následující dva týdny lechtáni jednou denně každý všední den. Lechtání probíhalo mezi 8.00 a 9.30 hod, tedy předtím, než byli později v 10.00 hod odebráni do herní párové arény.

Bylo zjištěno, že různá kvalita hry neměla vliv na produkci ultrazvuků při lechtání. Také produkce pozitivních 50kHz ultrazvuků výrazně převažovala nad negativními 22kHz ultrazvuky, což bylo pravděpodobně způsobeno lechtáním. Korelace 50kHz a 22kHz ultrazvuků nebyla nepotvrzena a byla odhalena konzistentní a individuální četnost pozitivních 50kHz a negativních 22kHz ultrazvuků. Z hlediska welfare by toto zjištění mohlo v budoucnu přispět ke zlepšení technik lechtání, které by mohly být více přizpůsobeny individuálním potřebám potkanů.

Klíčová slova: hravé chování, mezidruhová hra, lechtání, vokalizace, afektivní prožitky

Influence of different ontogenetic experience on ultrasound communication in juvenile laboratory rats

Summary

Rats (*Rattus norvegicus*) are highly social animals that need to maintain contact with conspecifics for normal social development. If social interaction is prevented during their ontogeny, social disorders may occur in adulthood. The emission of ultrasounds (USVs) increases group cohesion and specific calls express the affective states of the rats. Affective states are psychophysiological states involving an individual's feelings, emotions and moods. They are experienced pleasantly or unpleasantly. This work focused primarily on acute emotions that are expressed through ultrasound communication. Rats typically emit two types of calls – positive 50kHz which are produced mainly during playful interactions and negative 22kHz emitted during stressful situations. There is a method that can reliably induce the production of 50kHz ultrasounds and is known as rat tickling. It is a playful manipulation that mimics the "rough-and-tumble" social game of rats.

The aim of this study was to compare the vocalizations of rats that were allowed different quality of social play since weaning, and to verify that kinetically or socially reduced play affects the production of ultrasounds during tickling with humans. Subsequently, the correlation of 22kHz negative and 50kHz positive USVs was also investigated. The consistent individual frequency of positive 50kHz USVs and negative 22kHz USVs emitted during tickling was also studied. All experimental rats were allowed to play paired games from the age of 22 days to 70-76 days. To investigate the effect of the social and kinetic aspects of the play, in each of the 3 runs, 18 rats were randomly divided into 3 groups of 6 individuals each – control, socially restricted, and kinetically restricted. Rats from the control group played in pairs with a Long-Evans rat in a normal cage without restraint. Rats from the kinetic restricted group also played in pairs with the Long-Evans rat, but their play arena had a height-restricted mesh ceiling that got smaller each week. Rats from the socially restricted group played in a normal cage without restriction, but were paired with Fischer-344 rats that exhibit characteristics for reduced social interaction. Once the rats reached 35 days of age, they were tickled once a day every weekday for the next two weeks. Tickling took place between 8.00 and 9.30 a.m., before they were later taken to the game pair arena at 10.00 a.m.

It was found that the different quality of play did not affect the production of ultrasounds during tickling. Also, the production of positive 50kHz ultrasounds significantly outweighed the negative 22kHz ultrasounds, which was probably due to tickling. The frequency of positive

50kHz and negative 22kHz ultrasounds was found to be consistent and individual. From a welfare point of view, this finding could contribute to improving tickling techniques in the future, which could be more adapted to the individual needs of rats.

Keywords: playful behaviour, interspecies play, tickling, vocalisation, affective states

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	3
3	Literární rešerše	4
3.1	Afektivní prožitky	4
3.2	Komunikace	6
3.3	Vznik a zdroje hlasového projevu	6
3.4	Akustická komunikace	7
3.5	Vokalizace jako ukazatel afektivních prožitků	8
3.6	Ultrazvuková komunikace	10
3.6.1	Indikátory ultrazvukové vokalizace	10
3.7	Vokalizace hlodavců	11
3.8	Vokalizace u potkana	12
3.8.1	Typy vokalizací	12
3.8.2	Vokalizace v negativním kontextu	14
3.8.3	Vokalizace v pozitivních kontextu	14
3.9	Měření afektivních prožitků u potkanů	15
3.10	Ontogeneze sociálního chování u potkanů	16
3.11	Hravé chování	18
3.12	Sociální hra	18
3.13	„Rough-and-tumble“ hra u potkanů	19
3.14	Lechtání (heterospecifická hra)	20
3.14.1	Srovnání produkce 50kHz USV při lechtání s člověkem a RT hry	22
4	Metodika	24
4.1	Experimentální zvířata a jejich umístění	24
4.2	Manipulace s herními aspekty	25
4.3	Zkoumání vlivu lechtání na produkci 50kHz USV	26
4.3.1	Vyhodnocení četností vokalizace	30
4.4	Statistická analýza	30
5	Výsledky	32
6	Diskuze	36
7	Závěr	39
8	Literatura	40

1 Úvod

Lingvistika, tedy nauka o jazyku, je přirozeně antropocentrická. Komunikace zvířat by však neměla být studována antropocentrickým způsobem, protože nevíme mnoho o vnitřních stavech zvířat. Můžeme ale zkoumat jejich komunikaci, a tím se přiblížit k vnitřním stavům (Brudzynski 2005). Je to oblast, která se inspirovala jinými obory, a tak přispěla v hledání stále lepších metod, jak co nejlépe „odposlouchávat“ zvířata. Komunikace mezi zvířaty je o přenosu signálu a náš cíl je pochopit, jak a proč komunikace probíhá (Kaplan 2014).

V současnosti dochází ke zvyšování zájmu veřejnosti o dobré životní podmínky zvířat. Definice dobrých životních podmínek zvířat neboli welfare se měnilo v čase, protože se také měnilo naše chápání zvířat. Většina nejnovějších definic podporuje význam afektivních prožitků, tj. emocí a nálad zvířat. V minulosti tomu tak ale nebylo. Zájem o dobré životní podmínky zvířat se zaměřoval hlavně na minimalizaci negativních zkušeností. Avšak důležitou součástí welfare zvířat jsou pozitivní prožitky. V průběhu života by četnost příjemných zážitků měla převažovat nad těmi nepříjemnými (Laurijs et al. 2021). Obecně platí, že hodnocení welfare zahrnuje tři základní principy: fungování (zvířata by měla být v dobrém zdravotním stavu s normálním růstem a vývojem), přirozený život (prostředí by mělo napodobovat habitat, který umožňuje zvířatům fungovat v jejich nejpřirozenější podobě) a pocity (bez bolesti, strachu a trápení). Celkové zlepšení dobrých životních podmínek zvířat prostřednictvím obohacováním prostředí je přínosné pro platnost a reprodukovatelnost studií na laboratorních zvířatech (LaFollette et al. 2019).

Objev ultrazvukové komunikace poskytuje příležitost získat plnější porozumění chování zvířat (Arch & Narins 2008). A proč studovat akustickou komunikaci právě u hlodavců? Důvodů pro studium akustické komunikace je hned několik. Zaprvé, akustická komunikace má velký význam pro organizaci zvířecích společenství (Schleich et al. 2007). Nehledě na to, že zájem o hlasovou komunikaci u potkanů stále roste kvůli využití na zvířecích modelech u neuropsychiatrických onemocnění a poruch (Brudzynski & Burgdorf 2021). Na rozdíl od mnoha jiných druhů hlodavců jsou potkani (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) vysoce sociální zvířata a hlasová komunikace je běžným rysem jejich sociálních interakcí. Přestože vědci od počátku 60. let věděli, že potkani mohou produkovat ultrazvuk (USV), studium jejich ultrazvukové komunikace bylo nejméně 10 let ztíženo technickými problémy při záznamu a analýze ultrazvukových signálů (Brudzynski 2009).

Vědci naopak již dlouho zkoumají hry zvířat, aby porozuměli jejich formám a spouštěcím mechanismům (Ahloy-Dallaire et al. 2018). Hra je označována za potenciálního ukazatele welfare. Je to z důvodu, že je doprovázena příjemným afektivním prožitkem a její proces je odměňující. Dalším důvodem je, že obvykle mizí, když jsou zvířata vystavena kondičním překážkám (Held & Špinka 2011), jako je například sociální izolace, která vede k řadě fyziologických, emocionálních, kognitivních a sociálních deficitů (Baarendse et al. 2013; Cuesta et al. 2020). V poslední době se hra stala klíčovým tématem při studiu pozitivních stavů u zvířat, což je aktuální změna, protože převážná většina výzkumu v oblasti welfare zvířat byla spíše zaměřena na negativní stavy (Hammond et al. 2019). Spolehlivé navození pozitivního afektu u zvířat je nezbytné, pokud chceme úspěšně zlepšit životní podmínky zvířat. U laboratorních potkanů (*R. norvegicus*) je široce propagovaná metoda heterospecifické hry tzv. lechtání (tickling) (Hinchcliffe et al. 2020).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem literární rešerše bylo osvětlení afektivních stavů u zvířat, se kterými je úzce spojena komunikace. Také byl vysvětlen význam ultrazvukové komunikace u potkanů a jejich typy ultrazvuků (USV) v rámci kontextu situace. Byla rovněž zmíněna ontogeneze sociálního chování potkanů, se kterou se pojí hravé chování. Současně se hrou byla představena hravá manipulace s potkany (lechtání) vyvolávající pozitivní ultrazvukovou vokalizaci u potkanů. Později byla metoda lechtání více rozvedena v další části práce v rámci metodiky.

Druhá část práce měla za cíl porovnat vokalizace potkanů, kterým byla od odstavu umožněna různá kvalita sociální hry, a tím ověřit hypotézy, že kineticky nebo sociálně omezená hra sníží četnost pozitivní 50kHz USV a zároveň zvýší četnost negativní 22kHz USV produkovaných potkany během lechtání s člověkem. Předpoklady četností pro 50kHz USV jsou vyobrazeny na Obrázku 1, z nichž byla odvozena tendence k negativní vokalizaci. Práce také ověřovala korelaci pozitivních 50kHz a 22kHz USV a zkoumala individuální četnost pozitivních 50kHz USV a negativních 22kHz USV vydávaných během lechtání.

Bylo testováno celkově 6 hypotéz:

H1: Kineticky nebo sociálně omezená hra sníží četnost pozitivních 50kHz USV produkovaných potkany během lechtání.

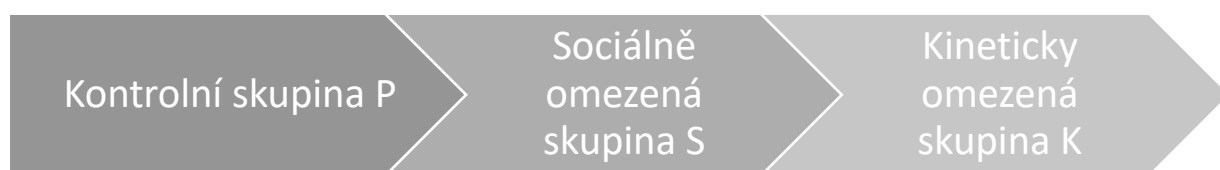
H2: Kineticky nebo sociálně omezená hra zvýší četnost negativních 22kHz USV produkovaných potkany během lechtání.

H3: Potkani, kteří zažili kineticky omezenou hru, budou produkovat méně pozitivních 50kHz USV než potkani, kteří zažili sociálně omezenou hru.

H4: Potkani, kteří zažili kineticky omezenou hru, budou produkovat více negativních 22kHz USV než potkani, kteří zažili sociálně omezenou hru.

H5: Pozitivní 50kHz USV a negativní 22kHz mezi sebou nekorelují při produkování vokalizací potkany během lechtání.

H6: Při opakovaném lechtání budou mít potkani konzistentní individuální četnost pozitivních 50kHz USV a negativních 22kHz USV.



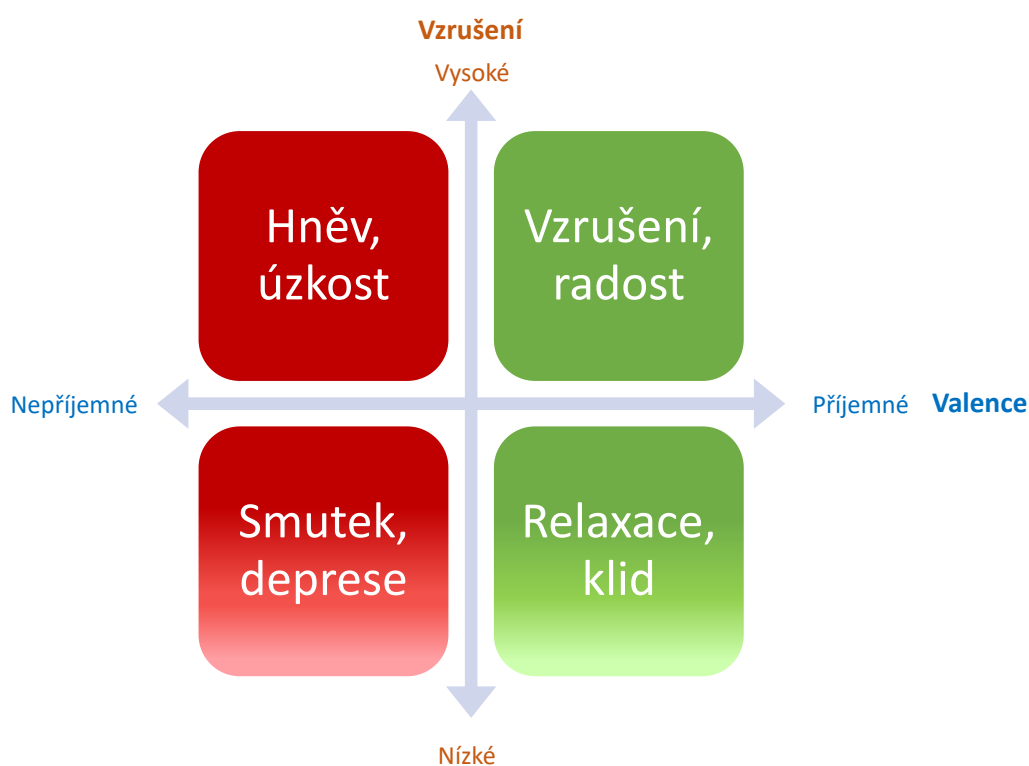
Obrázek 1 Znárodnění předpokladů četností produkce pozitivních 50kHz USV během lechtání od nejvyšší po nejnižší četnost. Na základě grafického zobrazení byly vytvořeny hypotézy H1, H3.

3 Literární rešerše

3.1 Afektivní prožitky

Charles Darwin ve své knize Výraz emocí u člověka a u zvířat, vydané v roce 1872, poskytl první moderní biologické vysvětlení projevu afektivních stavů u zvířat a jejich evoluce a homologie mezi druhy. Ačkoliv Darwinovy myšlenky byly založeny na omezených pozorovacích důkazech, nová data jeho hypotézy podporují. Darwin byl přesvědčen, že projevy emocí a základní mozkové procesy byly podrobeny evolučnímu procesu. Tedy, že emocionální stavy lidí a zvířat jsou homologní procesy, do značné míry vrozené, které podléhají evolučním změnám (Bruzynski 2017).

Panksepp (2005) do afektivních prožitků zahrnuje pocity, emoce a nálady jedince, které řídí myšlení a jednání. Jsou spojeny s tělesnými událostmi (homeostatické pudy jako hlad a žízeň) nebo se sensorickými podněty (chuť, dotek, bolest). Emoce a nálady se odlišují ve valenci (příjemnost/nepříjemnost) a vzrušení (vysoká vzrušivost/nízká vzrušivost) (Scherer 2005). Jsou tedy pojímány ve dvoudimenzionálním uspořádání podél os valence a vzrušení (obrázek 2) (Russell 1980).



Obrázek 2 Základní druhy afektů znázorněné ve dvoudimenzionálním modelu. Ve kvadrantech jsou vyznačeny konkrétní emoce. Upraveno dle Kremer et al. (2020).

Emoce jsou považovány za relativně krátkodobé, intenzivní prožitky, které jsou vyvolány určitým objektem nebo událostí (Paul & Mendl 2018). Nálady jsou oproti tomu považovány za déle trvající než emoce a nejsou vyvolávány specifickými objekty nebo událostmi. Nálady jsou často označovány jako volně plovoucí a představují tak spíše průběžný průměr emocí (Mendl et al. 2010). Tato práce bude zaměřena zejména na akutní emoce, protože není známo, zda nálady lze vyjádřit prostřednictvím akutní vokalizace (Laurijs et al. 2021)

Emoční stavy lze rozdělit do dvou základních tříd označených jako pozitivní a negativní stavy náležející všem živočichům. Negativní stav je vyvoláván vnějšími nebo vnitřními podněty, které představují nebezpečí pro organismus. Způsobují fyzické poškození a narušení sociobiologické rovnováhy. Na druhou stranu pozitivní stav je vyvolán situacemi, které minimalizují ohrožení, posilují bezpečnost, zachovávají fyzickou a sociální integritu, zlepšují stabilitu a udržují fyziologickou rovnováhu (Brudzynski 2013). Pozitivní a negativní stavy jsou také přítomny i u člověka a nejlépe jsou popsány jako pojmy smutek, hněv, překvapení, strach, odpor a radost. Nejčastěji vznikají, když se nám něco nelíbí, něco, co ovlivňuje náš pocit pohody. Emoce jsou totiž funkční adaptace, které se vyvinuly k tomu, aby nás co nejrychleji připravily na důležité životní události z hlediska reprodukce a přežití. A mechanismy, které vyvolávají emoce, nám pomáhají správně vyhodnocovat a rozpoznávat tyto události (Ekman 2003; Kremer et al. 2020).

Vyjádření afektivních stavů u zvířat lze také rozdělit pomocí mezidruhové a vnitrodruhové komunikace. Mezidruhová komunikace zahrnuje sdělování signálů směřujících k predátorovi, většinou agonistické interakce, jako je klam, vyhrožování, varování, zastrasování. Zatímco vnitrodruhovou komunikaci, která je častější, lze dále rozdělit na formu dyadické komunikace, při níž spolu komunikují pouze dva jedinci téhož druhu, nebo na skupinovou komunikaci, při níž jeden nebo více organismů vyjadřuje svůj emocionální stav mnoha jedincům. Bylo zjištěno, že nejčastější signály používané v komunikaci zvířat se týkají negativního vlivu (strach, ohrožení, úzkost) (Brudzynski 2017).

Afektivní prožitky u zvířat byly prokázány u široké škály druhů napříč taxonomickým měřítkem (hmyz, ptáci, savci), utvářejí totiž důležité sociální interakce mezi jednotlivci. Jasně ukazatele pozitivních afektivních prožitků jsou však vzácné, protože je obtížné je identifikovat (Friel et al. 2019).

3.2 Komunikace

Komunikace mezi zvířaty je složité téma, protože existuje celá řada způsobů, jak spolu zvířata komunikují (Brudzynski 2005). Wilson (2000) definoval komunikaci jako projev jedince (chování, zbarvení) vnímaný jiným jedincem, u kterého vyvolává odpověď/reakci. Tato odpověď přináší prospěch buď jedné nebo oběma komunikujícím stranám. V nezákladnější podobě lze komunikaci charakterizovat jako chování sloužící k předání informací (Palagi et al. 2016).

Zvířata čerpají informace z prostředí přímou komunikací pomocí taktiky pokus-omyl (osobní informace) nebo sledováním interakcí ostatních živočichů s prostředím a jejich výsledků, čímž získávají tzv. sociální informace (Danchin et al. 2004; Mazorra-Alonso et al. 2021). Sociální informace mohou být založeny na signálech/znacích, které se vyvinuly pro předávání informací příjemcům (Mazorra-Alonso et al. 2021). Další možností je, že sociální informace mohou být založeny také na signálech, které jedinci poskytují nevědomě během biologických činnostech (neúmyslné sociální informace) (Danchin et al. 2004; Mazorra-Alonso et al. 2021). Signály obvykle informují příjemce o fenotypovém stavu a schopnosti odesílatele, což je údajně výhodné jak pro odesílatele, tak pro příjemce. Neúmyslná sociální informace může náhodně kolemjdoucí informovat například o poloze zdroje, ale také o jeho kvalitě, která se obvykle odráží ve výkonu nebo fenotypové kvalitě vysílače (tj. veřejná informace). Důležité je, že signály, stejně jako neúmyslné informace, mají spolehlivě předávat informace o fenotypovém stavu odesílatele. V závislosti na typu citlivého kanálu používaného k přenosu signálu nebo k odposlechu neúmyslných signálů byly klasifikovány zrakové, sluchové nebo chemické podněty (Mazorra-Alonso et al. 2021). Používání chemických látek je nejstarší, nejrozšířenější a nejspolehlivější způsob, který živé organismy používají k vyhodnocování prostředí a ke vzájemné komunikaci (Wyatt 2010).

3.3 Vznik a zdroje hlasového projevu

Teorie zdroje a filtru popisuje vznik hlasového projevu ve dvou fázích. V první fázi vzniká hrtanový tón kmitáním hlasivek, přičemž zdrojem vokalizace je vydechovaný vzduch. Ve druhé fázi vzniká v dutinách hlasivek rezonátor, pomocí kterého je vytvořen konečný zvuk hlasového projevu (Briefer 2020). Zdrojem zvuku mohou být buď zvukové orgány, nebo vibrace přenášené na povrch těla zvířete, které fungují jako zesilovač zvuku. V živočišné říši existuje široké spektrum typů zvukových orgánů – bilaterální u bezobratlých a obvykle nepárové u obratlovců (výjimkou jsou ptáci, kteří mají párový syrinx) (Busnel 1977). Zvukový

orgán, hrtan, u savců přeměňuje proudění vzduchu na zvukové vlny. Tyto zvukové vlny jsou následně filtrovány hlasovým ústrojím, ústní a nosní dutinou, nozdrami, rty, jazykem, zuby a čelistí zvířete. Během této filtrace, které závisí na rezonančním a artikulačním systému, vzniká rozložení energie v podobě vokalizace (Laurijs et al. 2021).

3.4 Akustická komunikace

Akustická komunikace neboli vokalizace zahrnuje dynamické reakce spojené s přijímáním a odesíláním kódovaných signálů (Brudzynski 2005). Zvířata používají akustickou komunikaci ke zprostředkování základních interakcí, jako je sexuální kompetice, ochrana teritoria, rozpoznání partnera či potomka a obrana před predátory (Taylor & Reby 2010). Mimo jiné je to jedna z nejrozšířenějších, nejsložitějších a nejbohatších forem emocionálního vyjádření. Zvuk má mnoho výhod oproti jakékoli jiné formě komunikace, zejména v té afektivní, která se nejčastěji odehrává v situacích biologického nebezpečí. Zvuk se může šířit na poměrně velkou vzdálenost a jeho příjem není závislý na denním světle. Rychlost přenosu akustických signálů je prakticky okamžitá a signály lze okamžitě ukončit (Brudzynski 2017).

Produkce vokalizace je jedním z nejlepších prostředků komunikace u většiny suchozemských obratlovců. Není tedy překvapivé, že je jedním z nejstarších znaků obratlovců pro vnitrodruhovou komunikaci. Fylogenetická historie vokalizace naznačuje, že vokální forma je vysoce adaptivní a je biologicky důležitá pro chování zvířat po stovky milionů let (u tetrapodů asi 400 milionů let). Za nejstarší vokální formu komunikace je považována komunikace samic s mláďaty a primární, a tedy nejdůležitější funkce vokalizace souvisí s ochranou života jedince (Brudzynski 2021).

Neverbální komunikace u lidí (pláč, smích, sténání, křik) je evolučním protějškem vokalizace u ostatních savců. Vokalizace představuje evolučně starší systém komunikace, než je lidská řeč, a to s jinou nervovou regulací a jiným významem (Brudzynski 2021). Nervový systém se savců u vyvinul tak, aby podporoval sociální interakce a vazby v bezpečném prostředí. Zahrnuje tři části hierarchického systému – relaxaci/socializaci, reakci „bojů nebo úteč“ a zamrznutí (freezing) (Briefer 2020). Amygdala, která je součástí mozku, se u ptáků a savců podílí na pozitivních a negativních emocích a prostřednictvím vokalizace se podílí na vyjadřování emocí (Laurijs et al. 2021).

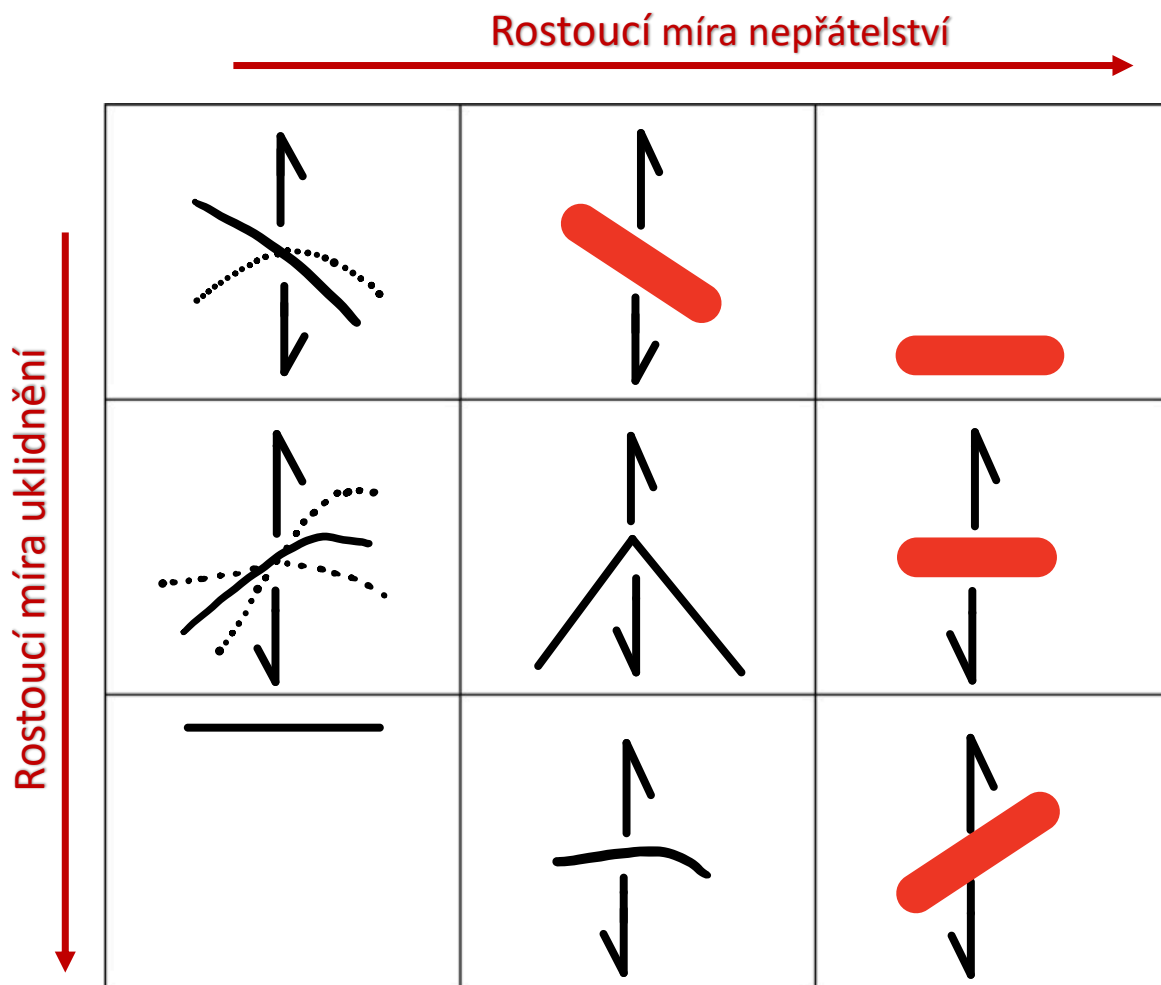
3.5 Vokalizace jako ukazatel afektivních prožitků

Výzkum pozitivních aspektů welfare není zdaleka tak rozvinutý jako výzkum negativních zkušeností (Laurijs et al. 2021). Velmi slibným indikátorem pozitivních afektivních prožitků je považována vokalizace, neboť její produkce je silně ovlivněna emocionálním stavem jedince (Briefer 2020).

Vyjádření afektivního stavu je prostřednictvím vokalizace snadnější z několika důvodů. Za prvé, zvuk může poměrně dobře v závislosti na jeho frekvence cestovat přes překážky. Za druhé, akustické signály se mohou přenášet na relativně dlouhé vzdálenosti, což znamená, že ostatní jedinci nemusí být nutně blízko, aby vnímali informace v hlasových projevech ostatních. Dále také akustická struktura vokalizací se může poměrně rychle měnit v souvislosti se situací, což není například možné u chemické komunikace (Laurijs et al. 2021).

Afekty působí na úrovni mozku, hrtanu, hlasivek a plic a projevují se plynulým rozsahem vokalizace. Na rozdíl od různých druhů měření, která často vyžadují manipulaci se zvířaty, lze vokalizaci zaznamenávat neinvazivně z dálky. Dají se také měřit téměř okamžitě pomocí akustického monitorování v reálném čase (Briefer 2020).

Mortonova motivačně strukturální pravidla uvádějí, že akustické vlastnosti vokalizace jsou předvídatelné z kontextu, ve kterém jsou produkovány. To znamená, že vokalizace produkováne v „nepřátelských“ podmínkách budou mít nižší frekvenci a delší doby trvání než vokalizace v „přátelském“ prostředí (Friel et al. 2019). Drsné zvuky o nízké frekvenci signalizují, že odesílatel pravděpodobně zaútočí, pokud se k němu příjemce přiblíží nebo zůstane ve stejné vzdálenosti. Naopak tonální, vysokofrekvenční zvuky naznačují, že odesílatel je submisivní, bojácný a nebude se chovat nepřátelsky, pokud dojde k bližšímu kontaktu. Drsná a tonální kvalita zvuku se vzájemně ovlivňují s frekvencí zvuku (výškou tónu). Na Obrázku 3 jsou schematicky znázorněny zvukové struktury s různými zvuky v nepřátelském nebo uklidňujícím kontextu (Morton 1977).



Obrázek 3 Zvukové struktury znázorněné v různých stupních a kombinacích motivačního stavu, jako je strach, uklidnění, nepřátelství. V každém bloku je frekvence udávána výškou obrázku nad základní čarou. Drsné zvuky jsou zvýrazněny širokou červenou čarou a tonální zvuky tenkou černou čarou. Přerušované čáry znázorňují případnou změnu zvukové struktury. Šipky označují možnost změny frekvence v rámci každého bloku. Upraveno dle (Morton 1977).

Agresivní a dominantní zvířata se pokouší vizuálně i akusticky vyvolat dojem větší velikosti těla. U submisivních jedinců dochází k opačnému projevu. Větší jedinci jsou proto při agonistických střetech ve výhodě oproti menším jedincům. Z toho zvířata těží, jelikož se vyhýbají nebezpečným střetům, které je mohou stát život (Taylor & Reby 2010). V pozitivních situacích má vokalizace důležitou funkci – usnadňuje skupinové soužití zvířat, což umožňuje efektivnější komunikaci a spolupráci mezi jedinci (Laurijs et al. 2021).

3.6 Ultrazvuková komunikace

Lidské ucho dokáže vnímat ultrazvuky (USV) mezi hranicí 20 Hz až 20 kHz. Hranice, jejíž frekvence je vyšší než hranice lidského slyšitelného rozsahu, je definována jako ultrazvuk (USV) (Arch & Narins 2008). Vnímání ultrazvuků je mezi suchozemskými obratlovci velmi rozšířené a je považován za rodový rys savců (Masterton et al. 1969). Po hlodavcích jsou nejpočetnějším řádem letouni, kteří využívají ultrazvukovou komunikaci. Kvůli noční aktivitě mají omezený zrak, který kompenzují sonarem s ultrazvukovými impulzy (Arch & Narins 2008).

V účinné akustické komunikaci se musí dostat vysílaný signál k příjemci zřetelně, aby následovalo odpovídající rozhodnutí. Za takový čistý signál můžeme považovat ten, který má minimální požadavek na komunikaci, s čímž se také pojí faktory (prostředí, sociální podmínky) spojené s přenosovými vlastnostmi ultrazvuků (Arch & Narins 2008).

V případě hlodavců může být zranitelnost vůči predátorům zahrnuta do vývoje repertoáru ultrazvukových signálů. Percepční schopnosti predátorů mohou ovlivnit konstrukci signálů jak v ultimátním (prostřednictvím vrozeného chování) tak v proximátním (prostřednictvím individuálního učení v průběhu ontogeneze) časovém období (Snowdon & de la Torre 2002). Je však velmi nepravděpodobné, že by se ultrazvuková komunikace u hlodavců vyvinula kvůli neslyšitelnosti pro širokou škálu potenciálních predátorů (Arch & Narins 2008).

3.6.1 Indikátory ultrazvukové vokalizace

Zvíře, které je vybaveno adekvátními orgány pro produkci ultrazvuku, je ovlivňováno fyziologickými a psychologickými faktory specifickými pro daný druh a jeho životní podmínky. Tyto faktory mohou být biotické (predátoři), abiotické (vlhkost, světlo) a endogenní (hormonální stav, věk, psychická motivace) (Busnel 1977). Jakmile dojde k produkci ultrazvuku, následuje kód, ve kterém vstupují do vokalizace různé faktory: rytmus, frekvence opakování, kolísání amplitudy, intenzita, frekvence (Busnel 1977; Briefer 2020). Také cirkadiánní a sezónní rytmy mohou ovlivnit produkci vokalizace. Povahu signálů určuje dokonce i věk zvířete – nařhmyzí larvy a nymfy obecně nemají zvukový aparát, který má později imago a signály mladých savců a ptáků nemají stejné fyzické struktury jako signály dospělých (Busnel 1977).

Vokalizační indikátory jsou potenciálně spolehlivé a vznikají mimovolně, jako důsledek změn napětí a působení svalů používaných pro tvorbu hlasu, způsobených aktivací

autonomního nervového systému. Nevýhodou hlasových indikátorů emocí však je, že vokalizace nevznikají v každém emocionálním stavu (např. při málo vzrušivých situacích či depresích). Amplituda vokalizací a jejich rychlost naznačuje emocionální vzrušení, což znamená, že s vyšší amplitudou souvisí rychlejší vokalizace indikující vyšší emoční vzrušení. Doba trvání vokalizací se vyznačuje emoční valencí – pozitivní vokalizace jsou kratší oproti vokalizacím negativním (Briefer 2020).

Neurální mechanismy pro regulaci základních rysů vokalizace, jako je délka a frekvence zvuku, se nacházejí v hlubokém zadním mozku sousedící s míchou (Brudzynski 2021). Akustické signály se mohou značně lišit ve zvukové frekvenci, délce signálu a hlasitosti (Brudzynski 2017). Frekvence vokalizačních signálů je dána fyzikálními vlastnostmi hlasivek. Na rozdíl od hlasových záhybů, hlasivky nemohou růst nezávisle na zbytku hlasového ústrojí, neboť jejich vývoj je anatomicky omezen kosterními strukturami. Délka hlasového aparátu se odráží ve formantech (zvýrazněné rezonanční frekvence) u mnoha zvířecích hlasových projevů. To znamená, že na rozdíl od základní frekvence, formanty poskytují přesnější informace o volajícím. Variabilita formantů v závislosti na tělesné velikosti volajícího tak může příjemcům poskytnout informace o potenciálních konkurentech. Zároveň jim také může usnadnit rozhodování, zda agonistickou interakci s druhým partnerem vystupňovat, či nikoli. Používání formantů jako indikátorů tělesné velikosti může být u savců rozšířené a může mít potenciální důsledky pro mezidruhové interakce, jako je odposlech v kontextu predátor/kořist. Formanty jsou snáze rozlišitelné v drsných, širokopásmových voláních (jako je chrčení, sténání nebo vrčení) než v tonálních voláních s vysokou frekvencí (Taylor & Reby 2010).

3.7 Vokalizace hlodavců

Různé druhy hlodavců mají vyvinutý poměrně sofistikovaný akustický komunikační systém, který se skládá z různých typů zvukových signálů. Většina těchto zvukových signálů není pro člověka slyšitelná, protože jsou produkovány v ultrazvukovém pásmu (Wöhr et al. 2015). Hlodavci používají stabilizovaný hrtan jako píšťalku bez vibrací k produkci ultrazvuků (Brudzynski 2017). Obecně platí, že ultrazvuky vydávané dospělými hlodavci souvisí s pohyby při výdechu produkované jako komunikační signály. Využívají je ke zprostředkování široké škály sociálních interakcí (námluvy, teritorialita, poplašné volání, agresivita, páření, mateřské chování) (Arch & Narins 2008).

3.8 Vokalizace u potkana

Potkani obecní (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), včetně jejich laboratorní formy, jsou vysoce sociální savci, kteří vykazují silnou motivaci udržovat kontakt s jedinci svého druhu (Cloutier et al. 2013). Vydávání ultrazvuků zvyšuje soudržnost skupiny. Nedávné studie naznačují, že valenčně specifické volání poskytují vyjádření jejich afektivních stavů (Brudzynski & Burgdorf 2021), což umožňuje rozvoj a posílení kooperativního chování mezi potkany (Brudzynski 2013). Ultrazvuky jsou tedy důležité jako hrací signály, které se používají k vyjednávání interakcí a zabránění chybné interpretace. Podobně jako je tomu u některých intenzivněji studovaných vizuálních signálů používaných psovitými šelmami a primáty (např. hrací úklony nebo obličejové výrazy s otevřenou tlamou) (Burke et al. 2017).

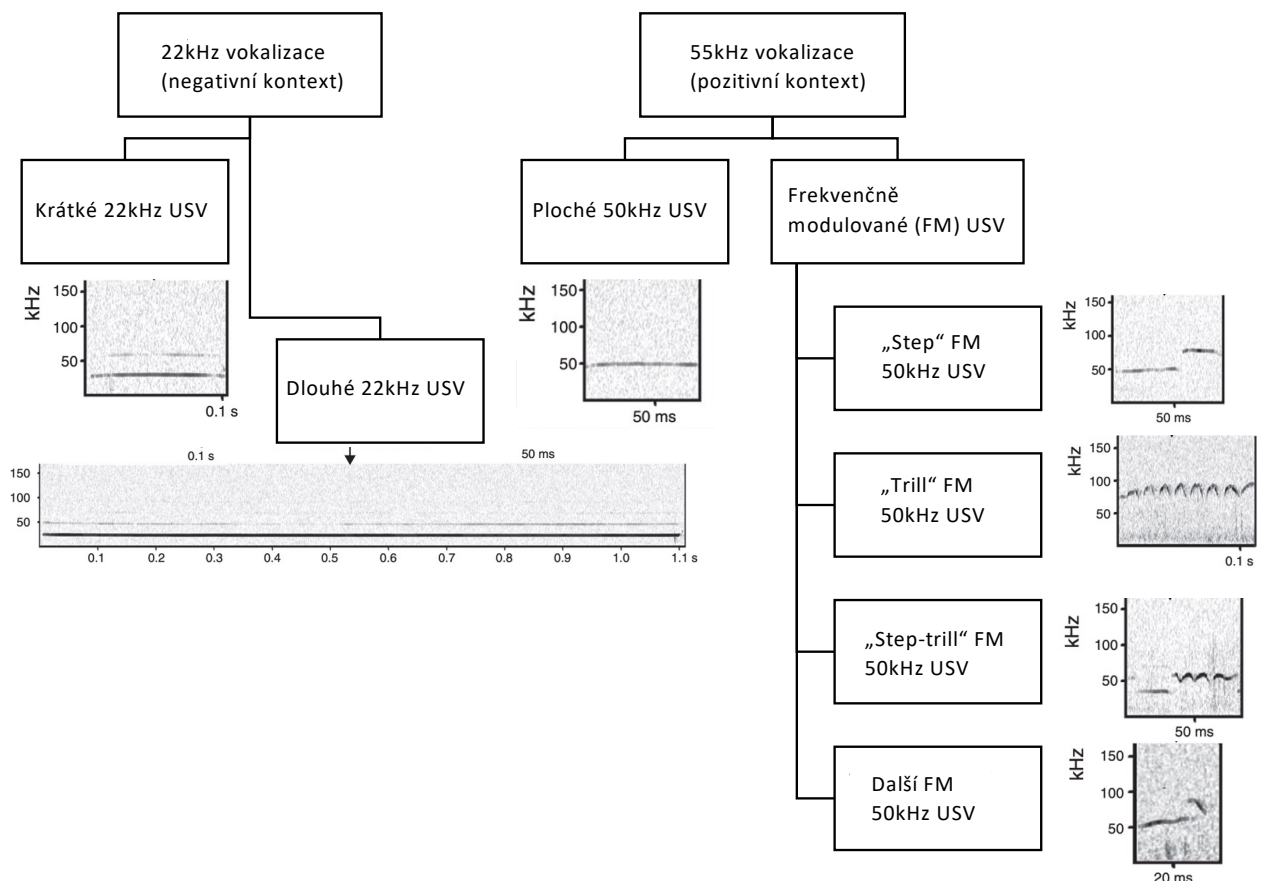
Většina vokalizací u potkana jsou polysémické, tedy poskytují současně několik znaků (významů) (Brudzynski 2005) a slouží jako komunikační nástroj – etologický vysílač označovaný etotransmitter (Brudzynski 2013). V souladu s definicí komunikace je produkce ultrazvukových volání potkanů aktivním a dynamickým procesem (Brudzynski 2005). Stejně jako ostatní savci, potkani produkují zvuk hrtanem. Na rozdíl od většiny savčích druhů mohou používat hrtan ve dvou režimech (Brudzynski 2009). Většina savčích vokalizací, včetně lidského hlasu, vzniká, když proudící vzduch způsobí vibrace napjatých hlasivek vedoucí ke zvukovým tlakovým vlnám s bohatým harmonickým obsahem. Potkani tímto způsobem vydávají slyšitelné zvuky v reakci na agresi, blížící se dravce nebo bolestivé podněty (Laplagne & Elías Costa 2016). Tyto signály mohou ale směřovat i na nepříjemné či hrubé zacházení od lidí (Brudzynski 2009). Jejich ultrazvuková produkce, druhá funkce hrtanu, se však odehrává mimo rozsah našeho sluchu. Pro člověka neslyšitelné ultrazvukové vokalizace vznikají, když vzduch proudí malým otvorem, který je tvořen hlasivkovými záhyby. Prostřednictvím aerodynamického pískacího mechanismu potkan vydává téměř čisté tóny (Laplagne & Elías Costa 2016). Zmíněné hlasivkové záhyby umožňují potkanům tvořit ultrazvukové pískání, které podporuje komunikaci na krátkou vzdálenost uvnitř kolonie, zejména v podzemních norách (Brudzynski 2013).

3.8.1 Typy vokalizací

Pro potkany jsou ultrazvukové vokalizace velmi přirozené. Ultrazvuky vydávají od narození, přestože jejich sluch je málo vyvinutý a vyvíjí se později (sluchové funkce se u mláďat objevují 12-14 dní po narození). Mláďata vydávají ultrazvukové „izolační volání“, když jsou oddělena od sourozenců nebo když vypadnou z hnízda. Izolační volání se ve své

akustické struktury mění jen málo, dokud mláďata nedosáhnou věku přibližně 21 dnů, kdy dojde ke zvratu a dospívající potkani brzy začnou vydávat volání podobné 22kHz a 50kHz typům ultrazvuků dospělých jedinců (Brudzynski 2009).

Jsou známy obecně dva typy ultrazvukové vokalizace (Obrázek 4) – 22kHz volání, která se projevují jak u novorozených mláďat, tak i dospělých jedinců, a 50kHz volání, kterými vokalizují dospívající a dospělí potkani. Volání o 22 kHz jsou obvykle spojena s averzními situacemi, naopak volání o 50 kHz s těmi příjemnými. Každý z těchto typů volání zahrnuje řadu podobných vokalizací, avšak typy 22 kHz a 50 kHz se v podstatě nepřekrývají. Tímto způsobem je příjemce jednoznačně informován o stavu signalizátora i v případě, že příjemce nevidí danou situaci (Burgdorf & Panksepp 2001; Brudzynski 2013). Volání o 22 kHz se vyvinulo jako alarmové chování proti predátorům, kdežto 50kHz vokalizace jsou přidružené hovory podporující přístup, hru a spolupráci (Burgdorf & Panksepp 2001; Brudzynski 2013).



Obrázek 4 Klasifikace ultrazvukových vokalizací dospělých potkanů. Příkladové spektrogramy ukazují akustickou strukturu vokalizace v čase. Upraveno dle Brudzynski (2013).

U potkanů bylo prokázáno, že vokalizační projev spojený s pozitivními emocemi je vyvolán prostřednictvím odlišné dráhy v mozku než u negativních emocí. Potkani tedy dokážou vyjádřit rozdíl mezi pozitivním nebo negativním prožitkem vokalizací (Laurijs et al. 2021).

3.8.2 Vokalizace v negativním kontextu

Negativní 22kHz vokalizace mají velmi nízkou frekvenci v rámci ultrazvuků (20-30 kHz), dlouhé trvání (obvykle mezi 500-3000 ms na jedno volání) a jsou monotónní, to znamená, že jejich frekvence zůstává po dobu trvání volání většinou neměnná. 22kHz vokalizace jsou iniciovány vzestupným mezolimbickým cholinergním systémem. Negativní vokalizace se také dají rozdělit na dlouhé (300 až více než 3000 ms) a krátké formy volání (150-300 ms) (Brudzynski 2013).

Vokalizace o frekvenci 22 kHz hraje roli poplašného volání varujícího celou kolonii před přítomností predátorů nebo jiného nebezpečí. Jsou určeny jedincům ze skupiny a také vyžadují jejich přítomnost (tzv. efekt publika). Z toho vyplývá, že ultrazvukové poplašné vokalizace nejsou zaměřeny přímo na predátory. Volání o frekvenci 22 kHz také hrají významnou roli v dyadických interakcích mezi potkany a podílejí se na přerušení sociálních aktivit (Brudzynski 2013).

Některé studie naznačují, že ultrazvukový projev o 22 kHz je klíčovou součástí pozorovacího učení strachu u potkanů, z čehož vyplývá fakt, že komunikační význam 22kHz USV je naučený. Potkani potřebují během averzní situace slyšet vlastní 22kHz USV, aby si prostřednictvím podmiňování vytvořili asociaci mezi 22kHz USV a averzním prožitkem. Proces podmiňování je tedy dostatečně rychlý, spolehlivý a specifický pro podněty, aby u potkanů plnil adaptivní obrannou funkci (Wöhr et al. 2015).

3.8.3 Vokalizace v pozitivních kontextu

Na druhou stranu, 50kHz vokalizace mají vysokou frekvenci (obvykle 35-80 kHz), velmi krátké trvání (10-150 ms) a jejich frekvence může být značně modulovaná (Brudzynski 2013). Významnost 50kHz ultrazvuků potkani uplatňují při sociálním kontaktním volání během interakcí mezi jedinci stejného pohlaví. Například mladí potkani vydávají vysokou míru 50kHz ultrazvuků během hry „rough-and-tumble“. Bylo také zjištěno, že potkani tráví více času s jedinci produkující 50kHz ultrazvuky než s těmi, kteří vydávají ultrazvuky v nižších 22kHz frekvencích (Wöhr et al. 2015). U dospívajících potkanů se 50kHz vokalizace nejvíce

projevuje při heterospecifické hře s člověkem (lechtání) (Burgdorf & Panksepp 2001) nebo při očekávání sociálních her (Hammond et al. 2019).

Jsou vyvolány vzestupným mezolimbickým dopaminergním systémem. Vokalizace o frekvenci 50 kHz byly dále rozděleny do dvou hlavních podkategorií – 50kHz volání s plochou frekvencí a 50kHz volání s modulovanou frekvencí. Ačkoli obě podkategorie volání se uskutečňují v apetitivních stavech, bylo prokázáno, že volání s frekvenční modulací je spojeno s odměnou a pozitivními afektivními stavy, zatímco ploché volání plní sociální funkci. Může rovněž sloužit jako kontaktní volání a s největší pravděpodobností hraje roli při potravním chování. Nicméně anticipační 50kHz vokalizace byly zaznamenány pouze u dospělých potkanů, nikoliv u mláďat (Brudzynski 2013).

3.9 Měření afektivních prožitků u potkanů

Měření afektivních prožitků u laboratorních potkanů může být obtížné, protože většina dostupných metod měří lépe vzrušení než emoční valenci. Například fyzikální měření afektivního stavu (tj. srdeční frekvence a glukokortikoidy) se mohou zvýšit jak v situacích, které mají vyvolat negativní účinek (např. při šoku), tak i pozitivní (např. při páření nebo hře) (Mason & Mendi 1993).

Tradiční behaviorální měření určené k hodnocení strachu a úzkosti (např. testy v elevated plus maze nebo open field test) mohou také měřit stupeň vzrušení (Mendl et al. 2010). Ačkoli se výrazy obličejů potkanů spolehlivě mění při negativních stavech, změny způsobené pozitivními vlivy stavy jsou jemnější a méně průkazné. Jednou z metod pro hodnocení pozitivního stavu u laboratorních potkanů je měření jejich ultrazvukové vokalizace. Počet těchto volání nám tedy umožňuje měřit afektivní stav potkana v různých situacích nebo po vystavení experimentálnímu testování. Existuje ověřená metoda lechtání potkanů (heterospecifická hra), která dokáže vyvolat pozitivní 50kHz ultrazvukové vokalizace (LaFollette et al. 2019).

Předchozí experimenty s lechtáním potkanů probíhaly v širokém spektru prostředí. Prostedí má značný vliv na pozitivní produkci ultrazvuků (LaFollette et al. 2017). Lechtání potkanů se provádělo na různých místech (doma nebo v testovací kleci, s podestýlkou nebo bez ní), také v různou denní dobu a při různém osvětlení (červené osvětlení, tlumené osvětlení a normální osvětlení) (LaFollette et al. 2017, 2019). Přinejmenším jedna z těchto podmínek (přítomnost podestýlky) zvyšuje 50kHz vokalizaci při lechtání, což je pravděpodobně indikátor pozitivnějšího stavu potkana (Natusch & Schwarting 2010).

3.10 Ontogeneze sociálního chování u potkanů

Mláďata většiny společenských druhů prochází vývojovými stádii, během nichž je pro správný sociální vývoj nezbytná sociální stimulace. Potkani nejenže obvykle rodí 6-12 mláďat, ale žijí také v koloniích s více dospělými samicemi, které mají tendenci synchronizovat estrální cykly, a tedy i porody (Schweinfurth 2020). V tomto prostředí mají mladí potkani po úplném odstavení od matky k dispozici sourozence a další stejně staré vrstevníky z jiných vrhů, se kterými si mohou hrát (Pellis et al. 2023). Z toho důvodu jsou potkani neobvyčejně náchylní k vlivům prostředí v období, kdy si vytvářejí primární sociální vazby (Hol et al. 1999). Nedostatek herního chování je základem sociálních poruch v dospělosti (Hol et al. 1999; Douglas et al. 2004; Stark & Pellis 2020).

Izolační chov zvířat po odstavu je považován za jeden z modelů sociálního stresu. Zvířata chovaná v izolaci vykazují řadu behaviorálních a fyziologických změn ve srovnání se zvířaty chovanými ve skupinách (Arakawa 2005), protože je to zkušenost, která je pro ně nepřirozená (Arakawa 2003). Mladí potkani tráví od odstavu stále více času mimo hnízda a mezi první „nemateřské“ sociální interakce se řadí sociální hra (Hol et al. 1999; Douglas et al. 2004). Jako nejranější sociální aktivita neřízena matkou je „boj“ ve hře, který je považován za jednu z nejzásadnějších rolí pro sociální vývoj (Douglas et al. 2004). Je známo, že potkan obecný (*R. norvegicus*) je vhodným laboratorním druhem, který umožňuje oddělit kinematický a sociální aspekt zvířecí hry a do hravé interakce se začíná zapojovat přibližně ve věku 15 dnů. Jeho herní aktivita dosahuje vrcholu přibližně ve 35 dnech a poté postupně klesá, než v pohlavní dospělosti vymizí (Thor & Holloway 1984).

Sociální izolace potkanů má různé účinky na pozdější sociální chování v závislosti na věku jedince. Krátkodobá izolace u mláďat (do 3 dnů) a dospělých potkanů (do 7 dnů) způsobuje zvýšení hravých interakcí (zejména kvantitu hry) neboli rebound efekt. Naopak dlouhodobá izolace (14-75 dní) u mladých potkanů snižuje pozdější sociální chování v dospělosti. Dlouhodobá izolace má výrazný vliv, který snižuje frekvenci a délku trvání sociálního chování. Je také snížena sociální explorace nebo očichávání anogenitálních oblastí, a naopak zvýšena latence prvního výskytu prvků sociálního chování (Van Den Berg et al. 1999).

Současné výsledky ukazují, že neschopnost se přiměřeně zapojit do hravé interakce mezi vrstevníky během dospívání vede k trvalému poškození citlivosti na bolest. Sociální schopnosti jsou také trvale narušeny v tom smyslu, že jsou sníženy sociální interakce, sociální paměť a zpracování sociálně předávaných informací (Schneider et al. 2016). Mimo jiné nedostatek

sociálních interakcí rovněž způsobuje agresivitu mezi jedinci (Brown 1991; Stark & Pellis 2020). Deficity v sociálním chování potkanů jsou částečně způsobeny nevhodnými reakcemi na čichové signály od ostatních jedinců. K reakcím dochází proto, že potkani neměli příležitost si vyvinout odpovídající reakce na pachy ostatních jedinců. Je to z toho důvodu, že potkani se během sociálních interakcí učí čichové signály svých partnerů a vytvářejí si tak pachovou "sociální paměť", kterou mohou v budoucnu využít. Sociální paměť zajišťuje neagresivní chování ze strany dominantního samce vůči podřízeným jedincům. Zároveň se také samci díky tomu učí, jak vyhledávat pachy samic, které jsou v říji (Brown 1991). Naopak nebyly pozorovány žádné trvalé účinky na rozpoznávání objektů a pohybovou aktivitu (Schneider et al. 2016).

Ve studii Siviy et al. (2003) byla charakterizována různá úroveň hravosti inbredních kmenů potkanů. Bylo zjištěno, že potkani z kmene Fischer-344 (F-344) vykazují menší hravost a vyšší úroveň stresu ve srovnáním s potkany z jiných kmenů (např. kmen Lewis). Bylo také zjištěno, že potkani chovaní s vrstevníky nevykazovali známky stresu oproti těm, kteří byli párováni s dospělými jedinci (Stark & Pellis 2020). Důvodem bylo, že juvenilní jedinec, který je v interakci s dospělým, používá více hravých útoků, čímž si kompenzuje sníženou hravost dospělého (Pellis et al. 2023). Mladí potkani z kmene Long-Evans (LE) hrající si s dospělým zažívají jen malý zlomek výměny rolí, kterou zažívají mladiství jedinci hrající si s vrstevníky. Navíc při interakci s vrstevníky je mezi partnery přibližně 50:50 rozdělení v počtu výměn rolí, které iniciují (Himmler et al. 2016). Z toho vyplývá, že klíčovou zkušenost během hravého boje nezajišťuje zkušenost s výměnou rolí nebo dokonce možnost ji iniciovat, ale že partneři musí tyto zkušenosti relativně rovnoměrně vyrovnávat. Ve většině měřítek hravého boje, včetně výměny rolí, totiž páry LE a F-344 vykazují 2 až 4krát větší asymetrii než páry LE a LE (Pellis et al. 2023). Z toho vychází, že trénink hry není jen nácvik specifických vzorců chování, ale obecně vede k produkci sociálně zdatnějších zvířat (Pellis et al. 2010, 2023). S tím by souviselo také tvrzení, že emoční regulace je důležitou součástí tréninku, který poskytuje hravou zkušenost při dospívání (Špinka et al. 2001). To naznačuje, že na rozvoj ochuzené emoční regulace má vliv stres, který mládřata vykazují v úplné/částečné izolaci s dospělým jedincem, nikoli absence hry (Pellis et al. 2023).

3.11 Hravé chování

Hra je mezi mláďaty savců velmi rozšířená (Burghardt 2006). Hravá mláďata mají lepší fyzickou kondici a schopnost přežití (Cameron et al. 2008). Mnohem lépe se také vypořádávají s novými situacemi (Donaldson et al. 2002) a dochází ke správnému vývinu jejich reprodukčních schopností (Nunes 2014).

Podle Burghardta (2006) existuje 5 základních kritérií k nadefinování hry. Hra je definována jako chování, které není plně funkční (zahrnuje prvky, které nepřispívají k přežití), má odlišnou strukturu a/nebo načasování od chování dospělých, opakuje se, ale není stereotypní, a vyskytuje se pouze v bezpečném prostředí. Nejdůležitějším kritériem je, že už jen samotný proces hry je odměňující. Hlavními typy hry jsou: sociální hra zaměřená na jedince stejného druhu, lokomočně-rotací hra (samostatně nebo s více jedinci) a hra s objekty (živými, neživými – rostliny, kameny, klacky) (Wilson & Kleiman 1974). Tato klasifikace her poskytuje vhled do základních mechanismů ontogenetických účinků hry zvířat. Například snížená lokomoční hra vedla u několika druhů ke snížení pohybových funkcí nebo tělesné zdatnosti (Cameron et al. 2008; Miguel-Pacheco et al. 2015; Berghänel et al. 2015). Kinematický aspekt hry zvířat, včetně pohybu, postoje a koordinace, je základem všech typů her. To je evidentní u lokomoční hry, ale také ve většině případů i u sociální hry, kdy mláďata předvádí pohyby, jako je pronásledování, chytání, přitisknutí a různé druhy rotací (Petrů et al. 2008). Kinematicky intenzivní a složité pohyby mohou mít zásadní vliv na vývoj zvířat. Bylo prokázáno, že fyzická cvičení, která se podobají kinematickým vlastnostem hry, stimulují nervový vývoj mozku a míchy u savců (Dishman et al. 2006). Tento druh cvičení může vést ke zlepšení kognitivních schopností a lepšímu zvládnutí stresu u dospívajících zvířat (Voss et al. 2013). Sociální aspekt hry, který se projevuje v herních událostech s jinými jedinci naopak vyžaduje, aby mláďata dokázala vnímat a zpracovávat sociální signály k tomu, aby mohla učinit sociální rozhodnutí (Bauer & Smuts 2007; Špinka et al. 2016; Pellis & Pellis 2017)

3.12 Sociální hra

Absence hry obecně je považována jako ukazatel nepříznivých psychologických a environmentálních podmínek (Held & Špinka 2011). Tato citlivost hry na prostředí naznačuje, že ke hře dochází pouze tehdy, když jsou uspokojeny primární potřeby přežití (Held & Špinka 2011; Hammond et al. 2019). Také přináší okamžité psychologické výhody, dlouhodobý přínos pro kondici a zdraví, čímž zlepšuje současné i budoucí welfare. Je sociálně nakažlivá, a proto způsobuje dobré welfare ve skupinách (Held & Špinka 2011).

U potkanů a některých dalších druhů savců je sociální chování během juvenilního období rozhodující pro rozvoj sociálních dovedností a zapojení do sociální hry je vysoce odměňující (Burke et al. 2022). Vzhledem k tomu, že sociální hra je nepředvídatelná a dynamická (Špinka et al. 2001), spoléhá se mnoho druhů zvířat na herní signály, aby se vyhnuly chybné interpretaci vzájemných akcí, což může vést k soubojům (Palagi et al. 2016).

Sociální hra se řídí různými pravidly (Burghardt 2006). Na rozdíl od volné hry jsou strukturované hry založeny na apriorních pravidlech a účastníci je musí dodržovat, aby nebyli "potrestáni". Ve volné hře jsou pravidla vytvářena zúčastněnými jedinci. V závislosti na typu hráčů (pohlaví, postavení ve skupině, věk) a typu hry (lechtání, lokomočně-rotací hra, hra na honěnou) vyžaduje každá nová hra „flexibilní pravidla“, která lze měnit (Palagi et al. 2016). V kontrastu se strukturovanými hrami, kde může pravidla vynucovat třetí osoba, ve volné hře si pravidla vynucují sami hráči. Tato pravidla mohou být založena na afektivních (např. emoční synchronizace) nebo kognitivních (např. na záměru) oblastech nebo kombinací obou (Demuru et al. 2015). Proto řízení nových hravých interakcí vyžaduje sofistikované komunikační dovednosti. Sociální hra tak může vyžadovat značné komunikační úsilí, improvizaci, strategické načasování a kreativitu (Graham & Burghardt 2010).

Vzhledem k tomu, že potkani si většinou hrají za špatných světelných podmínek z důvodu nočního způsobu života, jsou vizuální signály jen omezeně použitelné, stejně jako čichové signály, které rychle zahltí herní arénu. Díky bohatému repertoáru ultrazvukové vokalizace v pásmu 50 kHz (Brudzynski 2013), z nichž jsou vydávány jak v očekávání partnera na hru, tak během hry, jsou volání vydávána za účelem vzájemné komunikace (Burke et al. 2022).

Během hry má vokalizace ludickou funkci (z latinského ludere – hrát si), která je charakteristická pro mláďata. 50kHz vokalizace má i další funkci – konativní. Jedná se o záměrné chování zvířete, které má upoutat pozornost jednoho či více členů skupiny, případně ovlivnit jejich chování ke společné hře. Ultrazvuky, které tuto funkci u mladých jedinců plní, mohou zastávat jak aktivační roli, tak se dokážou změnit na výzvu ke hře (Brudzynski 2021).

3.13 „Rough-and-tumble“ hra u potkanů

Sociální hra zvaná „rough-and-tumble“ (RT) je u savců velmi rozšířeným jevem a úzce souvisí s komunikací. RT hra byla zaznamenána u mnoha druhů hlodavců. Průzkum hry v tomto řádu zdůrazňuje několik důležitých poznatků. Za prvé, cíle, o které „soupeří“, mohou být spojeny s tzv. agresí, predací, sexuálním chováním, anebo formami přátelských vztahů (např.

grooming). Za druhé, u druhů, kde dochází k boji, existují stupně složitosti hry. Může se jednat o hravé úder a doteky, na které příjemce nereaguje, až po razantní útoky zahrnující rozsáhlé zápasení. Za třetí, zvířata se zapojují do hry způsobem, který zvyšuje pravděpodobnost výměny rolí a určitého stupně reciprocity, čímž se zvyšuje pravděpodobnost, že nepřeroste v agresi. Hra je obvykle spojena přítomností lokomočně-rotáčnických pohybů, které stimulují hravou aktivitu pozorovatele. Hravost u jednoho potkana je skutečně nakažlivá, což způsobuje, že ostatní zvířata se zapojují do hry, i když si přestala hrát v důsledku únavy nebo přesycení (Palagi et al. 2016).

RT hra má dvě klíčová chování: kontakt se zátylkem (dorsal/nape contact) a přitisknutí („pin“) Potkan zahajuje hru kontaktem zátylku partnera. Další účastník hry reaguje přetočením na záda a útočník ho přitiskne k zemi (Cloutier et al. 2018; LaFollette et al. 2018). Rozdíl mezi hrou a soubojem je, že při hře potkani zejména atakují na šiji, zatímco při vážných soubojích jsou kousavé útoky zaměřeny spíše na obličej a dolní části těla (Palagi et al. 2016). Hra pokračuje tak, že se potkani střídají v jednotlivých polohách nahoře a dole. Vzájemná interakce vede k reciprocitě, a tak se střídají jedinci, kteří mají „výhodu“. To vyžaduje nejen spolupráci mezi hrajícími potkany, ale zdá se, že je to také jeden z faktorů, který dělá hru příjemnou (Burke et al. 2022).

3.14 Lechtání (heterospecifická hra)

Manipulace s potkany, kteří jsou chováni v laboratořích nebo jako domácí mazlíčci, může u potkanů vyvolávat stres. Manipulace může vyvolat reakce založené na strachu vůči člověku, což může ztížit další zacházení, zvýšit riziko zranění zvířete a ošetřovatele a omezit platnost experimentálních údajů. K předcházení negativních účinků manipulace je běžnou praxí poskytnout mladým zvířatům určitý čas na to, aby si zvykla na interakci s člověkem, a teprve poté je zařadit do pokusů. To zahrnuje třeba pasivní vystavení lidem, dotýkání, zvedání, hlazení, držení, mluvení a nabízení pamlsků (LaFollette et al. 2020).

Existuje však metoda, při které dochází k napodobování sociální RT hry mezi potkany (LaFollette et al. 2020), vycházející z jejich hravé společenské povahy, aby se manipulace s nimi stala pozitivním zážitkem. Lechtání samozřejmě není přesnou kopií RT hry, protože potkani nemohou při lechtání přitisknout lidskou ruku na zem (Cloutier et al. 2018; LaFollette et al. 2018). Panksepp & Burgdorf (2010) použili výrazy "hravé lechtání" a "heterospecifická hra" pro rychlou manuální stimulaci potkanů lidskou rukou. Obecně je označována jako lechtání (tickling) (Bombail et al. 2021), které slouží jako silně prospěšná forma sociálního

kontaktem, zejména pro mladé jedince, kteří se nachází v nejhravějším období života (Panksepp & Burgdorf 2010).

Cílem je napodobit hravé chování potkanů střídavým lechtáním na zátylku (dorsal/nape contact) a na břicho (belly contact) pomocí energicky rychlých pohybů prstů. Tato forma interakce vyvolává u mladých potkanů pozitivní afektivní stav, snižuje strach z člověka a zvířata ji aktivně vyžadují. Dalším důvodem, proč je lechtání pro mladé potkany odměňující, je důkaz, že tento druh manipulace motivuje k učení. Ošetřovatelé se tak mohou stát nedílnou součástí sociálního prostředí laboratorních potkanů, což dokazují podobnosti v reakcích potkanů na příležitosti k pozitivní interakci s lidmi a rozlišování potkanů mezi známými a neznámými lidmi. Pozitivní kontakt s lidmi by tedy mohl být užitečným prostředkem ke zmírnění nepříznivých účinků sociální izolace (Cloutier et al. 2013). Nedávno byla tato technika použita ke snížení strachu potkanů z lidí a zmírnění jejich averze vůči lékařským a výzkumným postupům (např. injekce) (Cloutier et al. 2018).

I když je lechtání poskytováno pouze 2 min denně na zvíře, je účinnou metodou pro snížení strachu z lidí. Vzhledem k tomu, že mladí potkani si spolu hrají přibližně 60 min denně, je lechtání po dobu 2 min denně praktické, ale pravděpodobně příliš krátké na to, aby se zopakovaly všechny účinky sociální hry mezi potkany. Majitelé potkanů v zájmovém chovu, kteří mají obvykle více času na manipulaci s potkany, mohou poskytovat delší lechtání, pokud potkani nadále reagují pozitivně. Na základně poznatků je prvních 15 min RT hry nejpozitivnějších (Cloutier et al. 2018). Bylo prokázáno, že produkce ultrazvukových vokalizací u potkanů, kteří čekali buď na partnera ke hře, nebo na odměnu, byla zesílena odměnou za hru, nikoli odměnou za potravu (Brudzynski & Burgdorf 2021). Ultrazvukové reakce při lechtání ukázaly, že se potkani, stejně jako lidé, liší v tom, jak jim lechtání přináší odměnu (Hinchcliffe et al. 2020). 50kHz vokalizace nemusí být podobná lidskému smíchu vyvolaného lechtáním, jak se dříve předpokládalo. Na rozdíl od lidského smíchu odráží vokalizace o 50 kHz přímo pozitivní afektivní prožitek zvířete při lechtání, zatímco u člověka lechtání provázené smíchem může být spojeno s negativním efektem (Hinchcliffe et al. 2020).

Pozitivní výsledky lechtání byly zjištěny na základě měření welfare potkanů, díky kterým je tato metoda hojně využívána k hodnocení a zlepšování welfare a ke studiu neurobiologie pozitivního účinku a komunikace (Cloutier et al. 2018; Burke et al. 2022). Mezi běžná zjištění patří již výše zmíněná zvýšená produkce 50kHz USV, změna chování při přiblížení a snadnost manipulace. Účinnost techniky lechtání lze posoudit pomocí pohybových vzorců a vokalizace potkanů. Potkani okusují a olizují prsty ošetřovatele během 15 s uvolnění

po lechtání. Když experimentátor pohybuje rukou po manipulačním boxu, potkan ji následuje. Mladí potkani mezi lechtáním běhají v manipulačním boxu a po lechtání vykazují zřetelné zvýšení aktivity. Při prvním lechtání je nejlepší provádět kontakt s břichem/přítisknutí kratší dobu. Jakmile si potkani na lechtání zvyknou, lze dobu trvání a počet přítisknutí prodloužit. Během prvních dvou týdnů každodenního lechtání lze pozorovat postupný nárůst počtu trylků vydávaných při 15 s uvolnění (Cloutier et al. 2018).

3.14.1 Srovnání produkce 50kHz USV při lechtání s člověkem a RT hry

Pokud jde o celkovou produkci volání při frekvenci 50 kHz za jednotku času, se uskuteční více volání během lechtání než při hře RT. Při obou typech hry je nejčastěji produkována 50kHz volání obsahující trylky (Cloutier et al. 2018) Přestože volání založená na trylcích tvoří 70-80 % všech volání vydávaných při obou typech hry, rozdíl spočívá v tom, že při lechtání dochází k nárůstu produkce trylků se skoky (step-trill). Ani u jednoho typu hry nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi počtem kontaktů při hře a počtem volání (Burke et al. 2022). Nejsilnější pozitivní asociace mezi voláním obsahující trylek v RT hře je při přibližování, pronásledování, uhýbáním a dotyku zátylku (Burke et al. 2018).

Vzor volání během lechtání se výrazně liší od vzoru volání při RT hře. Nejsilnější pozitivní asociace se projevují, když je potkan přítisknutý. Středně silné asociace jsou zaznamenány mezi plochým i trylkovým voláním, když experimentátor lechtá na zátylku, jako je tomu při dotyku od partnera v RT hře. Pokud je však jeden z partnerů devokalizován, je možné identifikovat vokalizujícího potkana. Volání obvykle vydává útočník (Burke et al. 2018; Burke et al. 2022). Vysoká produkce volání při přítisknutí není způsobena lechtáním břicha, protože v jiném kontextu tento efekt nevyvolává. Rozhodující je spíše buď přítisknutí, nebo kombinace lechtání při přítisknutí. To je rozdíl od RT hry, při níž potkan stojící nad přítisknutým partnerem vydává naprostou většinu volání (Kisko et al. 2017). Autoři Kisko et al. (2017); Bombail et al. (2021) uvádí, že lechtání není simulací RT hry, ale spíše odlišným druhem herního zážitku, jehož pozitivní aspekty nejsou pro různé potkany hodnoceny ve stejné míře (Melotti et al. 2014).

Ačkoli lechtání a RT hra nejsou potkany vnímány jako rovnocenné zážitky, některé rozdíly, které se objevily, vyžadují vysvětlení. Nejnápadnější bylo, že během lechtání bylo volání asi dvakrát častější. Zpětná vazba od partnera k vyměňování signálů tam a zpět, je důležitá pro zahájení a udržení herního boje. Zpětná signální vazba není potkanům umožněna, kteří interagují s rukou experimentátora, a to může být důvodem zvýšeného volání při lechtání

(Burke et al. 2022). Devokalizovaní potkani během RT hry méně často odpovídají na volání, což naznačuje, že některé 50kHz volání slouží k signalizaci partnera, aby si zajistili pokračování hry (Kisko et al. 2015). Dvojice devokalizovaných potkanů si hrají méně než normální dvojice. Při hře s devokalizovaným partnerem vokalizující partner zdvojnásobuje svoji produkci, takže ztrojnásobení produkce volání při lechtání může být způsob, jakým potkan kompenzuje němotu svého "partnera". To znamená, že hra s nekomunikujícím partnerem může stimulovat produkci neřízeného "smíchu" (Burke et al. 2022).

4 Metodika

4.1 Experimentální zvířata a jejich umístění

Experiment jsme prováděli v Demonstračním a experimentálním pracovišti ČZU. 3 pokusné skupiny (1., 2., 3. běh) samic potkanů Long-Evans (LE) ($n_1 = 17$, $n_2 = 18$, $n_3 = 18$, ve věku 21 ± 1 den) byly získány v červenci 2021, říjnu 2021 a březnu 2022 z akreditovaného chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Každá pokusná skupina potkanů pocházela ze 4 různých vrhů. Kromě toho bylo také v každém ze 3 běhů získáno 6 potkanů Fischer-344 (F-344) ve věku 3 až 4 týdnů. Potkani byli chováni po dvou jedincích v duna boxech o velikosti 70 x 46 x 31 cm (Obrázek 5, 6) s podestýlkou Pets Dream paper pure do věku 45-51 dní. Jednotliví potkani byli umístěni v polovině duna boxu, který byl oddělen uprostřed drátěným pletivem. Potkani ve stejném duna boxu měli navzájem jak hmatový, vizuální, sluchový a čichový kontakt, ale zároveň drátěné pletivo bránilo ve fyzické interakci (např. hře).



Obrázky 5 a 6 Duna boxů (domovských klecí) pro potkany.

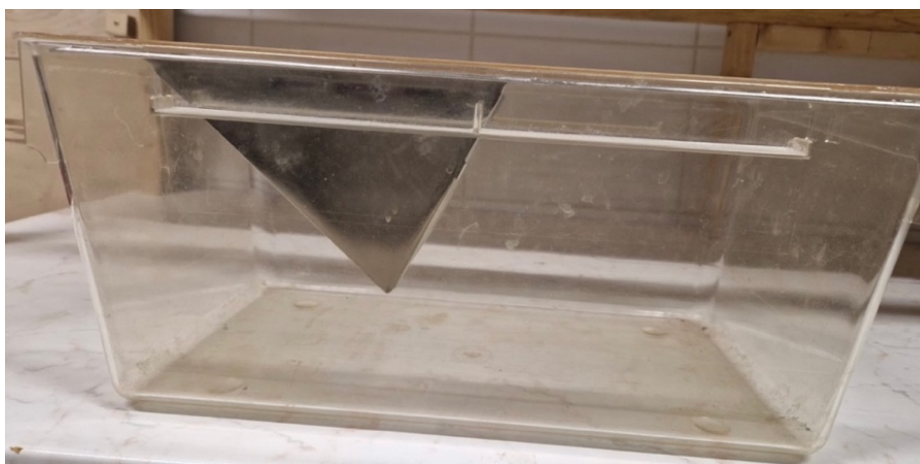
Potkani měli ad libitum přístup ke standardnímu krmení pro laboratorní potkany a vodě a byli umístěni v klimatizované místnosti (22 °C-24 °C) s umělým osvětlením v režimu 14 hod světla:10 hod tmy, kdy se světla rozsvěcela mezi 8.00 a 9.00 hod.

4.2 Manipulace s herními aspekty

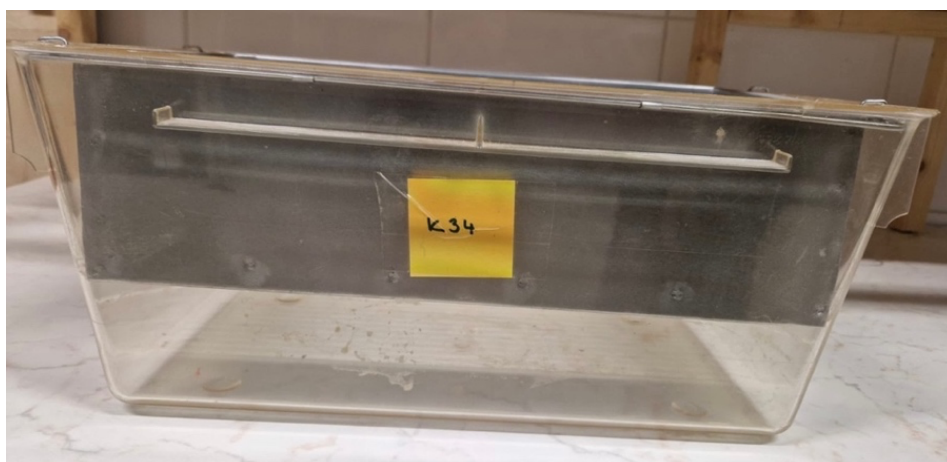
Všem experimentálním potkanům byla umožněna ve věku od 22 dnů (2. den po příchodu) do 70-76 dnů zkušenost s párovou hrou. Tato zkušenost byla poskytována tak, že byli každý všední den umístěni po párech do herní arény.

Pro zkoumání vlivu sociálních a kinetických aspektů hry bylo v každém ze 3 běhů 18 potkanů náhodně rozděleno do 3 skupin (kontrolní, sociálně redukované a kineticky redukované skupiny) po 6 jedincích. Ve všech skupinách bylo 6 zvířat, kromě kontrolní skupiny z 1.běhu, kde bylo 5 zvířat.

Potkani z kontrolní skupiny (P) si hráli ve dvojici s potkanem LE v nezměněné kleci (Obrázek 7). Potkani ze skupiny s kinematicky omezenou hrou (K) si také hráli ve dvojici s LE potkanem, jejich hrací plocha měla však výškově omezený strop z kovového pletiva (Obrázek 8). Výška hrací plochy se každý týden zmenšovala: 1. týden: 3 cm, druhý týden: 3,5 cm, třetí týden: 4,0 cm, čtvrtý týden: 4,5 cm. Toto výškové omezení znemožňovalo vertikální prvky hry, jako je skákání, přitahování (kontakt se zátylkem = nape contact), přitlačování (pin) a otáčení při herních soubojích. Zvířata se však stále mohla dotýkat a plazit se kolem sebe. Potkani ze skupiny se sociálně omezenou hrou (S) si hráli v nezměněné herní aréně (Obrázek 7), ale byli spárováni s potkany F-344, kteří vykazují vlastnosti pro sníženou sociální interakci (Siviy et al. 2003).



Obrázek 7 Herní box, ve kterém probíhala hra pro potkany ze skupin S a P.



Obrázek 8 Herní box s kinematickým omezením pro potkany ze skupiny K. Každý týden se plocha pro hru zmenšovala.

Všechna herní sezení začínala v 9.55 hod, kdy začala hrát hudba (úsek árie Leporella z Mozartovy opery Don Giovanni) k ohlášení začátku hry. Pouštění hudby trvalo 5 min. Poté byli potkani přesunuti do hracích boxů. Pár potkanů umístěných v jednom rozděleném domovském boxu byl vždy společně přemístěn spolu do herního boxu. Potkani si mohli hrát s partnerem hodinu denně každý všední den. Herní box byl vystlán podestýlkou z dřevěných hoblin a měl velikost 42 x 26 x 19,5 cm. Po uplynutí časového limitu byli potkani vráceni do domovských boxů.

4.3 Zkoumání vlivu lechtání na produkci 50kHz USV

Metodiku taktilní hry jsme čerpaly z protokolu od Cloutier et al. (2018), ve kterém je detailně vysvětlen a popsán postup metody. Lechtání probíhalo mezi 8.00 a 9.30 hod, tedy předtím, než byli poté v 10.00 hod umístěni do herního párového boxu. Pořadí, ve kterém byli jednotliví potkani bráni k lechtání, bylo vždy stejné a bylo vyváženě rozděleno mezi potkany skupin P, S, K.

Když potkani dosáhli stáří 35 dní, byli v následujících dvou týdnech lechtáni jednou denně (kromě soboty a neděle), celkem tedy 10 sezení na jednoho potkana. Všechna lechtání byla zaznamenána v laboratorní místnosti o rozměrech 2,9 x 5,9 x 2,8 m. Herní aréna byla umístěna na stole o výšce 93 cm a dno klece bylo pokryto vrstvou hoblinové podestýlky, která byla vyměněna s každým novým potkanem. Mikrofon (UltraSoundGate 116H, jednobanální snímání a kondenzátor CM16/CMPA) byl umístěn v blízkosti klece na hraní ve výšce 28 cm a připojený k notebooku. Veškeré zvuky při lechtání byly nahrávány pomocí softwaru Avisoft-

RECORDER (verze 4.2). Byly zde umístěny dvě kamery (Milesight). Jedna kamera byla před klecí, druhá byla umístěna na pravé straně klece, kdy zaznamenávaly postupy lechtání (Obrázek 9).

Dvě minuty před prvním lechtáním každého dne jsme nahrávali zvukové pozadí k detekci případného ultrazvukového hluku. Za tímto účelem jsme zapnuli obě kamery a před kameru umístili cedulku označující nahrávání zvukového pozadí, poté jsme spustili zvukový záznam a současně spustili časovač a pro označení začátku testování tlesknuli. Po dvou minutách jsme ukončili nahrávání šumu z pozadí a zahájili již samotné lechtání. Po zapnutí obou kamer byla před zapnutím mikrofonu před jednu kameru umístěna cedulka s identifikací potkana a identifikací nahrávky. Poté byl současně spuštěn časovač a provedeno tlesknutí, načež byl potkan přenesen z domovské klece do hracího boxu na lechtání.



Obrázek 9 Umístění herního boxu, kamer a mikrofonu, který je postaven na boxu po levé straně ruky experimentátora.

Lechtání bylo zahájeno tím, že experimentátor nechal volně jednu ruku uprostřed herního boxu po dobu 15 s (Obrázek 10). Přítomnost ruky umožňovala vybízet potkany k interakci tím, že ruku olizují a jemně okusují. Pokud zvíře během těchto 15 s začalo ruku očichávat, ruka se pomalu pohybovala po boxu, dokud zvíře nepřestalo ruku následovat a zkoumat. Po 15 s volného chování potkana následovalo 15 s lechtání. Interakce byla zahájena kontaktem se zátylkem (nape contact) trvajícím 2-4 s (Obrázek 11). Jednou rukou se experimentátor energicky dotýkal konečky prstů zátylku potkana. Ruka experimentátora se vyhýbala kontaktu se zadkem, protože tato oblast těla je při agresivních reakcích cílem. Kontakt se zátylkem pokračoval převrácením potkana na záda neboli přitisknutím (pin). Jakmile byl potkan na zádech, experimentátor pohyboval prsty po bříše (belly contact) (Obrázek 12), jako při lechtání lidí. Šimrání bylo rychlé, důrazné (2-4 s/pin) kvůli minimalizaci negativní reakce. Jakmile se potkan srovnal, bylo rychle na něj navazováno kontaktem zátylku. Následně se pokračovalo ve střídání kontaktů zátylku a přitisknutí. V průměru bylo provedeno 4 až 5 přitisknutí/15 s. Následovalo opakování volného chování a 15 s lechtání, celkem 4x po dobu 2 min. Poté jsme test ukončili a potkana vrátili do jeho domovské klece. Manipulační box jsme vyčistili, abychom odstranili výkaly a moč, které podestýlka neabsorbovala. Postup jsme opakovali s dalšími potkany.



Obrázek 10 Ruka experimentátora volně ponechána uprostřed herního boxu.



Obrázek 11 Kontakt rukou experimentátora se zátylkem (nape contact) potkana.

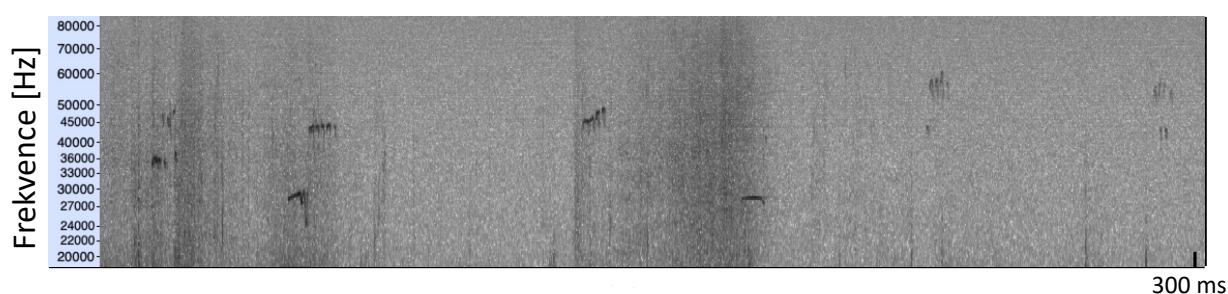


Obrázek 12 Kontakt rukou experimentátora s břichem (belly contact) potkana.

4.3.1 Vyhodnocení četností vokalizace

Statistickou analýzu dat jsme prováděli v softwaru R 4.1.2 (R Core Team, 2019). Použili jsme skript, který automaticky detekoval produkci pozitivních 50kHz USV během lechtání (Obrázek 13), v pásmovém filtru o rozmezí 35 až 68 kHz. Přesnost skriptu byla vyšší než 99 %. Stejný skript jsme použili na negativní vokalizace, jen byl upraven na detekci 22 kHz v rozmezí pásmového filtru 18 až 26 kHz (Liu et al. 2023, submitted).

Pomocí následné analýzy jsme porovnávali nejprve četnosti pozitivních 50kHz USV a pak negativních 22kHz USV mezi potkany, kteří zažili kineticky neomezenou hru nebo sociálně omezenou hru.



Obrázek 13 Spektrogram 50kHz a 22kHz USV vydávaných během lechtání v časovém rozmezí 300 ms.

4.4 Statistická analýza

Nejprve byl proveden korelační test mezi celkovou dobou trvání a celkovým počtem 50kHz USV z každého sezení ($n = 476$). Protože celková doba trvání vysoce korelovala s celkovým počtem 50kHz USV ($r_s = 0.96$, $n = 476$, $p < 0.001$). Poté jsme použili jsme pro další analýzy pouze celkový počet 50kHz USV.

Pro ověření hypotézy **H1** jsme vytvořili lineární smíšený model (funkce "lmer" v balíčku R jako "lme4"). Celkový počet 50kHz USV za sezení jako **závislá proměnná**. Treatment = manipulační aspekty hry (kontrolní, kinematické omezení, sociální omezení) a běh (1., 2., 3.) jako **fixní faktory**. Testovací dny (1-10) a pořadí testování (1-18) jako **kovariáty**. Identity potkanů a identity vrhů jako **náhodné faktory**.

Ověřili jsme rozdělení počtu vokalizací porovnáním modelů s použitím normálního (Gaussova) a Poissonova rozdělení. Model s normálním (Gaussovým) rozdělením odpovídal datům mnohem lépe, takže v následující analýze jsme data považovali za normálně rozdělená. Tento model jsme porovnávali pomocí Akaikeho informačního kritéria ($\Delta AICc$) se zjednodušenými modely, ze kterých byly postupně odstraňovány jednotlivé fixní faktory.

Nejlepší model (tedy ten s nejnižším Akaikeho kritériem) je podrobně prezentován v kapitole 5 Výsledky.

Použitím nejlepšího modelu (funkce "emmeans" v balíčku R jako "emmeans") jsme poté jsme pomocí post hoc testů ověřovali rozdíly mezi treatmenty. Abychom určili opakovatelnost produkce pozitivních 50kHz USV potkanů během testu, odhadli jsme opakovatelnost pro identitu potkanů a identitu vrhu (funkce "rpt" v balíčku R jako "rptR") pomocí stejného modelu. Tímto způsobem jsme prozkoumali hypotézu **H3** a **H6**.

Stejnou metodu jsme použili ke zjištění, zda naše experimentální testování ovlivnilo produkci negativní 22kHz vokalizace s celkovým počtem 22kHz USV za sezení jako proměnný faktor. Použili jsme však Poissonovo rozdělení pro 22kHz USV, protože vedlo k lepšímu přizpůsobení modelům. Poté jsme díky modelu ověřovali hypotézy **H2**, **H4** a **H6**.

Pro ověření hypotézy **H5** jsme pomocí korelačního koeficientu počítali míru korelace mezi 50kHz a 22kHz USV.

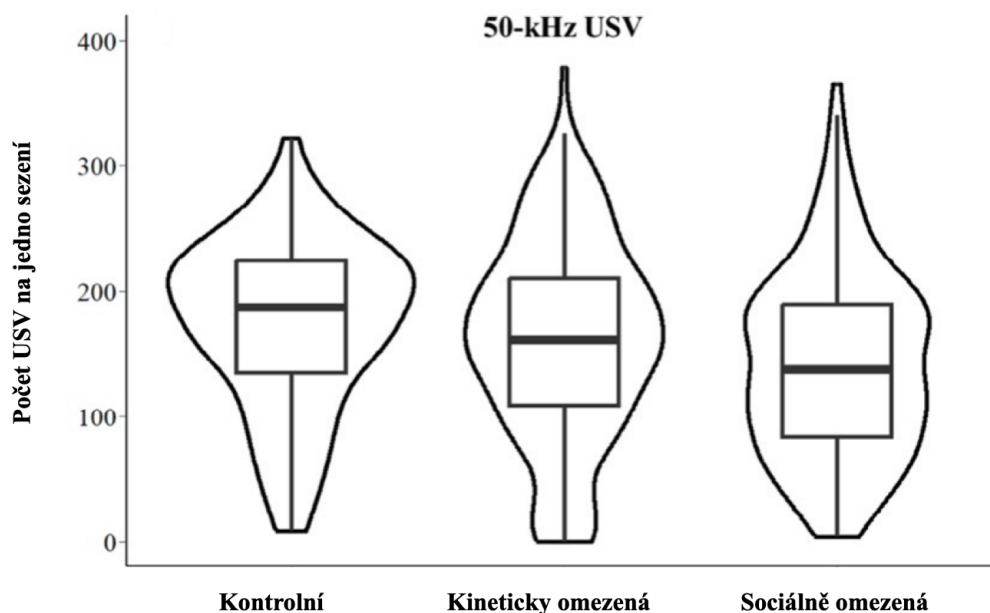
5 Výsledky

Potkani v průměru produkovali 159 ± 75.7 (průměr \pm směrodatná chyba průměru) 50kHz USV za jeden dvouminutový test. Nejlepším modelem pro 50kHz USV podle Akaikeho kritéria byl plný model se všemi fixními faktory (Tabulka 1).

Modely pro 50kHz USV	$\Delta AICc$
Treatment+běh+dny+pořadí	0
Treatment+běh+dny	5,89
Treatment+dny+pořadí	14,38
Běh+dny+pořadí	14,61
Treatment+běh+pořadí	16,18

Tabulka 1 5 nejlepších modelů na jedno sezení pro 50kHz USV. Nejlepší model je zvýrazněn tučně.

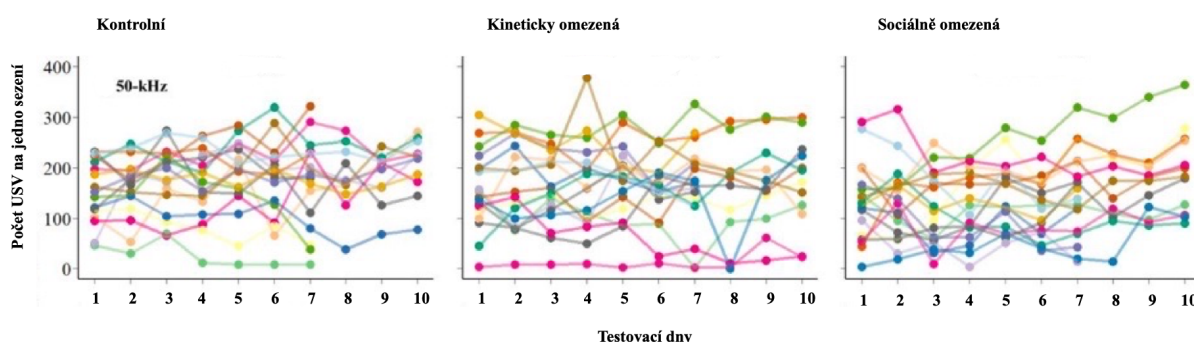
Tímto modelem jsme testovali hypotézu **H1**, která tvrdí, že kineticky nebo sociálně omezená hra sníží četnost pozitivních 50kHz USV produkovaných potkany během sezení. V tomto modelu neměla rozdělená zkušenost se hrou statisticky významný vliv na počet 50kHz USV. V naší post hoc analýze sice kontrolní potkani produkovali poněkud více 50kHz USV (průměr [95 % konfidenční interval] = $176 [144, 208]$) než potkani s kinematicky ($167, [137, 198]$) nebo sociálně ($143 [111, 174]$) omezenou hrou, avšak tyto rozdíly nebyly statisticky významné (Obrázek 14). Hypotézu **H1** jsme tedy nemohli potvrdit.



Obrázek 14 Vliv rozdílných zkušeností se hrou na četnost 50kHz USV během jednoho sezení. Houslový diagram znázorňuje rozložení počtu 50kHz USV. Sloupce ukazují medián skupiny a 1. a 3. kvartil. Horní a dolní konce sahají k minimální/maximální hodnotě, ale ne dále než k 1,5násobku vzdálenosti mezi 1. a 3. kvartilem. Na ose x jsou zobrazeny tři skupiny potkanů a na ose y je uveden celkový počet 50kHz USV za sezení.

Na základě výše uvedených výsledků s četností USV nepotvrzujeme hypotézu **H3** tvrdící, že potkani, kteří zažili kineticky omezenou hru, budou produkovat méně pozitivních 50kHz USV než potkani, kteří zažili sociálně omezenou hru.

Počet 50kHz USV za sezení byl vysoce opakovatelný u jednotlivých potkanů (opakovatelnost = 0,519 [0,306, 0,679]). Potkani pocházející ze stejných vrhů však neměli navzájem podobnou četnost 50kHz USV. Následně jsme statisticky zkoumali, zda četnost 50kHz USV se bude měnit s tím, jak budou testy opakovány v následujících dnech. Fixní efekt (dny) byl v modelu signifikantní (Tabulka 1), což prokazuje, že s opakováním testů četnost 50 kHz USV narůstala (Obrázek 15). Tím byla pro 50kHz USV potvrzena hypotéza **H6**. Dále jsme statisticky ověřovali, zda více vokalizovali potkani, kteří byli v rámci jednoho dne testováni později v pořadí. Tento efekt se také potvrdil (Tabulka 1).

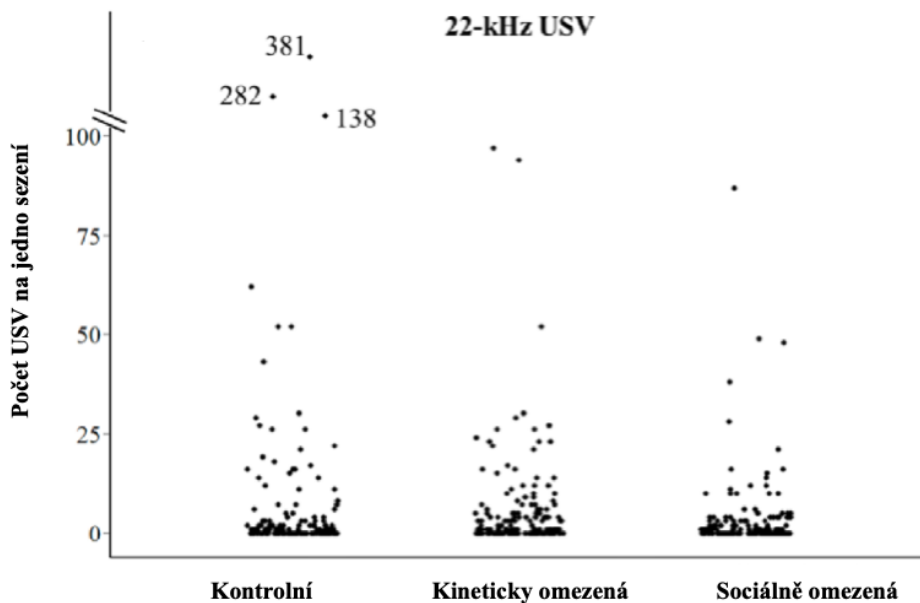


Obrázek 15 Individuální opakovatelnost počtu 50kHz USV na jedno sezení. Každá tečka představuje jedno lechtání a spojené tečky stejné barvy pocházejí od stejného jedince. Osa x znázorňuje po sobě jdoucí testovací dny a osa y počet 50kHz USV na jedno sezení.

Negativní 22kHz USV byly mnohem méně časté než 50kHz USV. Potkani produkovali průměrně $23 \pm 11,6$ 22kHz USV za sezení. Tento průměr byl zvýšen dvěma sezeními, ve kterém tři potkani neustále vydávali 22kHz USV a vyprodukovali celkem 381, 282 a 138 vokalizací. Bez těchto dvou sezení byla průměrná produkce 22kHz USV $12 \pm 3,2$ za sezení. Treatment neměl na produkci 22kHz USV vliv. Nejlepší model pro 22kHz USV vůbec nezahrnoval fixní efekt treatmentu (tj. způsobu odchovu) (Tabulka 2).

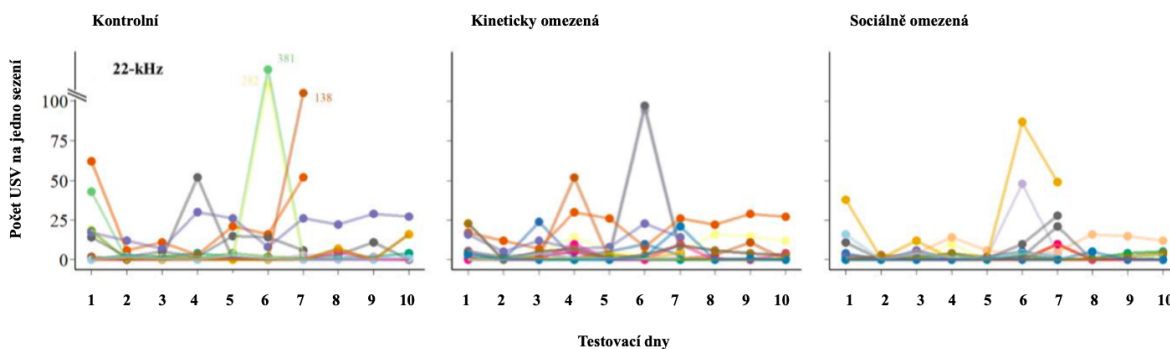
Modely pro 22kHz USV	$\Delta AICc$
Běh+dny	0
Běh+dny+pořadí	1,94
Treatment+běh+dny	2,25
Treatment+běh+dny+pořadí	4,22
Dny	15,89

Tabulka 2 5 nejlepších modelů na jedno sezení pro 22kHz USV. Nejlepší model je zvýrazněn tučně.



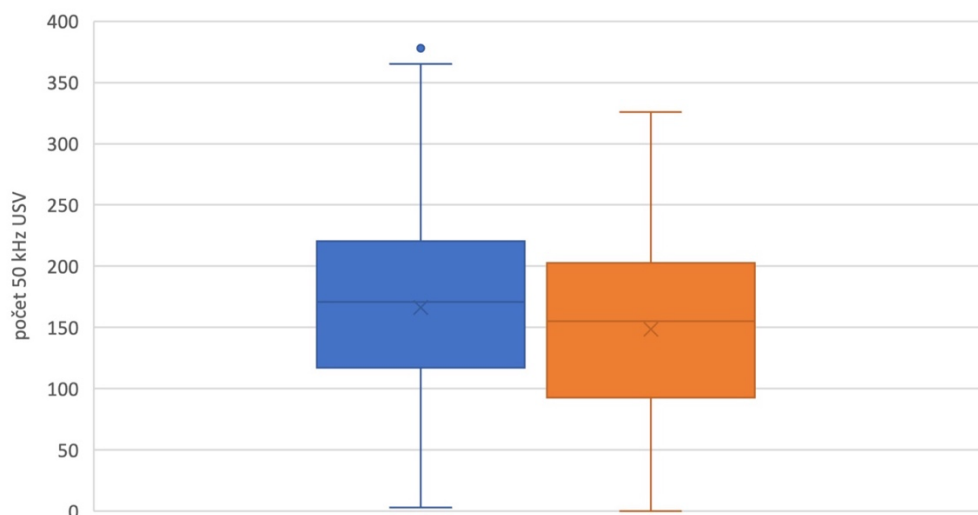
Obrázek 16 Vliv rozdílných zkušeností se hrou na četnost 22kHz USV během jednoho sezení. Každá tečka představuje jednoho potkana z jednoho sezení. Na ose x jsou znázorněny tři skupiny potkanů podle zkušenosti se hrou a na ose y je uveden celkový počet 22kHz USV na sezení. Tři extrémní hodnoty nad 100 na ose y jsou označeny a zobrazeny mimo stupnici.

Na základě výsledků (Obrázek 16) jsme nemohli potvrdit hypotézy **H2** a **H4**. Produkce 22kHz USV byla konzistentní v rámci jedinců (Obrázek 17) (opakovanost = 0,381 [0,193, 0,488], čímž byla potvrzena hypotéza **H6** i pro vokalizace v pásmu 22 kHz.

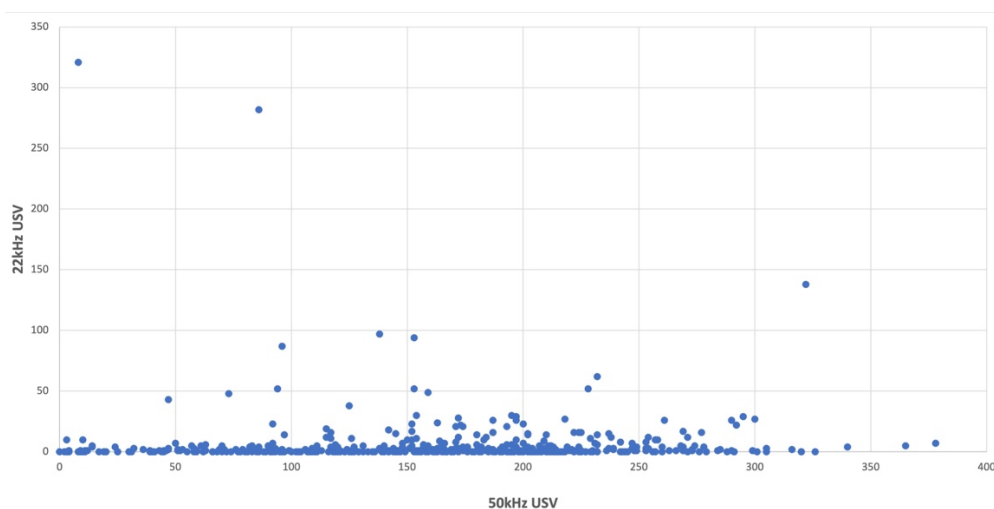


Obrázek 17 Individuální opakovatelnost počtu 22kHz USV na jedno sezení. Každá tečka představuje jedno lechtání a spojené tečky stejné barvy pocházejí od stejného jedince. Osa x znázorňuje po sobě jdoucí testovací dny a osa y počet 50kHz USV na jedno sezení. Každý sloupec zobrazuje jednu experimentální podmínku.

Poté jsme statisticky ověřovali, zda spolu počet pozitivních 50kHz USV a negativních 22kHz USV souvisí. Zajímalo nás, zda pokud známe četnost pozitivních 50kHz USV u jednoho zvířete, můžeme předpovědět četnost negativních 22kHz USV. Toto tvrzení nemůžeme potvrdit, což je očividné z Obrázku 18. Produkce 50kHz a 22kHz USV spolu nekorelovaly (Obrázek 19). Korelační koeficient ($r_s = -0.02$) je blízký nule, a tedy statisticky nevýznamný. Hypotézu **H5** jsme tedy mohli potvrdit.



Obrázek 18 Znárodnění sloupcového grafu četností 50kHz USV s 22kHz USV a bez 22kHz USV. Osa y zobrazuje četnost 50kHz USV. Modrý sloupec vyznačuje všechny hodnoty pozitivních 50kHz i negativních 22kHz vokalizací. V modrém sloupci je označen medián, 1. a 3. kvartil, maximum a minimum hodnot včetně negativních 22kHz vokalizací. Oranžový sloupec zobrazuje pouze hodnoty pozitivní 50kHz vokalizace. V oranžovém sloupci je označen medián, 1. a 3. kvartil, maximum a minimum hodnot bez negativních 22kHz USV.



Obrázek 19 Zobrazení grafu korelace 50kHz a 22kHz včetně 3 extrémně vysokých hodnot. Osa x znázorňuje hodnoty pozitivních 50kHz vokalizací. Osa y zobrazuje hodnoty negativních 22kHz vokalizací.

6 Diskuze

V naší studii produkce pozitivních 50kHz USV výrazně převažovala nad negativní produkcí 22kHz USV u laboratorních potkanů během hravé manipulace zvané lechtání (tickling) (kapitola 3.14). Průměrná produkce pozitivních 50kHz USV byla přibližně 159 na sezení. Oproti tomu průměrná produkce negativních 22kHz USV se pohybovala okolo 23 na sezení. To naznačuje, že lechtání je skutečně metoda, která u potkanů stimuluje pozitivní afektivní stavy a podporuje jejich hravou povahu (Cloutier et al. 2018).

Vzhledem k absenci signifikantně významných rozdílů v produkci 50kHz USV mezi skupinami potkanů nemůžeme potvrdit skutečnost založenou na hypotéze H1, a to že kineticky nebo sociálně omezená hra snižuje produkci 50kHz USV během lechtání. Stejně tak nemůžeme z výsledků potvrdit, že omezení ve hře zvyšuje produkci 22kHz USV během lechtání (hypotéza H2).

Testování vycházelo ze studií, které zjistily nižší úroveň hravého chování u potkanů z kmene Fischer-344 (Siviy et al. 2003). Metodu odchovu jsme čerpali ze studie Pellis et al. (2023), ve které použili párování potkanů Fischer-344 (F-344) a Long-Evans (LE). Hypotézy H1, H3 jsme vytvořili na základě předpokladů četností produkce pozitivních 50kHz USV (kapitola 2, Obrázek 1). Z předpokladů četností jsme následně odvodili tendence negativních vokalizací (hypotézy H2, H4). Z výsledků (kapitola 5) vyplývá, že naše předpoklady četností 50kHz USV nelze potvrdit za spolehlivé. Předpoklad, že kinetický aspekt bude pro produkci USV významnější než aspekt sociální, se zdá být mylné tvrzení.

Další hypotézy H3, H4 byly vytvořeny za účelem porovnání rozdílné produkce USV mezi jednotlivými skupinami potkanů, tedy zda různá kvalita hry ovlivní rozdílnou četnost produkce 50kHz a 22kHz USV. Ani jednu z hypotéz jsme nemohli potvrdit za věrohodnou. Potkani, kteří zažili kinematicky nebo sociálně omezenou hru, se nelišili v produkci 50kHz a 22kHz USV při lechtání ve srovnání s kontrolními potkany, kteří neměli žádné omezení. Manipulační aspekty hry neměly u skupin S a K potkanů velký vliv. Sociálně omezení potkani však hru hodnotili pozitivně. Kromě toho měli s největší pravděpodobností zájem se zapojit do RT hry. Domnívali jsme se, že potkani, kteří měli kineticky omezenou hru v důsledku postupného zmenšování klece, budou během hry vykazovat větší frustraci a s ní spojenou vyšší produkci negativních 22kHz USV oproti kontrolní skupině potkanů. Předpokládali jsme také, že potkani LE spárování s potkany F-344, jakožto omezený sociální aspekt hry, budou produkovat větší četnost 22kHz USV ve srovnání s kontrolní skupinou, ve které nebylo

zastoupeno žádné omezení v rámci hry. Vzhledem k důležitosti pohybového a postojového způsobu během RT hry (Palagi et al. 2016) jsme očekávali nejnižší četnost pozitivní produkce USV ve skupině s kinetickým omezením.

RT hra (kapitola 3.13) je forma hravého chování obvykle zahrnující spravedlivý počet výměny rolí. Zahrnuje také krátkodobou paměť pro vybavení poměru výher a proher. Nedostatek RT hry je pravděpodobně zodpovědný za vznik abnormálního sociálního chování (Pellis & Pellis 2017). Na základě předchozích studií jsme se domnívali, že abnormální chování, jako je agrese, se bude vyskytovat (Brown 1991; Stark & Pellis 2020). Během testování však nebyla pozorována žádná složka agresivního chování. Klíčová součást interakce při RT hře je reciprocita (Palagi et al. 2016; Burke et al. 2022), které se pravděpodobně potkanům LE párovaných s potkany F-344 nedostávalo. Nicméně je obecně známo, že v rámci skupiny společně žijících mláďat může herní zkušenost různě působit na jedince (Weller et al. 2020; Ham et al. 2022). Toto vysvětlení je v souladu se skutečností, že mezi jednotlivými potkany byla obrovská variabilita v tom, jak moc se ultrazvukově ozývali (Obrázky 15, 17).

Naše poznatky také narušují představu, že pozitivní a negativní vokalizace jsou protilehlé (Obrázek 19). Z Obrázku 18 je očividné, že oba druhy vokalizací se téměř překrývají, tudíž jsou prakticky stejné. Z toho vyplývá, že tvrzení, že jedinci, kteří vokalizují více 50kHz USV, budou naopak vokalizovat méně 22kHz USV, neplatí. Je možné, že při vnímání této emocionálně intenzivní situace potkany netvoří negativní a pozitivní valence dva protipóly, ale dvě nezávislé osy, takže někteří jedinci mohou současně vnímat samotné lechtání pozitivně i negativně (např. se strachem).

Z výsledků testování také vyplývá, že vysoká míra produkce o 50 kHz korelovala s počtem testovacích dnů. To by úzce souviselo s vydáváním pozitivně laděných 50kHz USV, které jsou produkovány hlavně při sociálním kontaktu, ale také při očekávání hravých interakcí (Burgdorf & Panksepp 2001; Hammond et al. 2019), zatímco negativní 22kHz USV jsou typicky vydávány v averzních situacích nebo při nebezpečí v přítomnosti predátora (Brudzynski 2013). Během testování byli potkani lechtáni každý den ve stejném pořadí (kapitola 4.3). Obrázky 15,17 mohou působit dojemem, že zvýšená produkce není příliš výrazná nebo zřejmá, avšak model ukázal, že vokalizace stoupají. Můžeme tedy s jistotou tvrdit, že potkani, kteří byli testováni během dne v pozdějším pořadí, byli povzbuzováni odposloucháváním ostatních jedinců a na základě toho vnímali lechtání více pozitivněji. Je třeba poznamenat, že potkani neměli před pokusem žádnou zkušenost s lechtáním, takže se nemohlo stát, že by hravá manipulace byla dříve naučenou zkušeností. Zvýšená produkce

pozitivních 50kHz USV byla s největší pravděpodobností způsobena technikou lechtání, která je pro potkany zřejmě odměňující forma interakce (LaFollette et al. 2018).

Výsledky mimo jiné také odhalily výraznou individuální konzistenci a interindividuální variabilitu v produkci 50kHz USV a 22kHz USV (hypotéza H6). Produkce pozitivních USV se pohybovala mezi 14 až 280 USV na jednoho potkana během testu. Z Obrázku 15, který znázorňuje individuální opakovatelnost, je patrné, že potkani produkující 50kHz USV udržují konzistentní úroveň vokalizace. U 22kHz vokalizací je také znázorněna individuální konzistence vokalizace, konkrétně na Obrázku 17.

Hojné používání lechtání jako metody ke zlepšování welfare u laboratorních potkanů (Cloutier et al. 2018; Burke et al. 2022) je dnes běžnou formou manipulace v laboratorním prostředí. O výsledcích interindividuální variability během lechtání se již zmínili autoři Bombail et al. (2021); Burke et al. (2022) v kapitole 3.14.1. Zjistili totiž, že potkani produkující častěji 50kHz USV mají pozitivnější prožitek z lechtání než ti méně hlasití jedinci produkující 50kHz USV. Ve vědecké literatuře se stále více prosazuje zohlednění individuálních rozdílů. Díky většímu zohlednění individuálních rozdílů může hravá forma interakce zlepšit životní podmínky všech potkanů v laboratorním prostředí tím, že aktivně podpoří pozitivní afektivní stavy. Stejně jako upravujeme dávkování léků v závislosti na tělesné hmotnosti nebo trénujeme zvířata po různě dlouhou dobu v závislosti na jejich schopnostech učení, bude pravděpodobně nutné přizpůsobit individuální potřeby potkanů lidské ruce, abychom maximalizovali prožitek z lechtání.

Lze tedy souhlasit s tvrzením, že vnímání lechtání se u jednotlivých potkanů liší. Používání určitých vzorců chování při lechtání nemusí vždy přispívat k pozitivnímu afektu (Bombail et al. 2021). Budoucí studie by měly prozkoumat, jak hluboko tyto individuální rozdíly sahají do genetické výbavy potkanů.

7 Závěr

Naše studie nepotvrzuje, že kinematicky nebo sociálně omezená hra snižuje frekvenci pozitivních 50kHz USV produkovaných potkany během lechtání (hypotéza **H1**). Rovněž jsme neprokázali, že by kineticky nebo sociálně omezená hra naopak zvyšovala frekvenci negativních 22kHz USV produkovaných během lechtání (hypotéza **H2**). Navzdory kinematicky nebo sociálně omezené hře reagovali potkani na lechtání stejně pozitivně jako potkani bez omezené hry. Navíc nemůžeme potvrdit, že potkani s kinematicky omezenou hrou budou produkovat méně pozitivní 50kHz/více negativní 22kHz USV než potkani se sociálně omezenou hrou (hypotézy **H3**, **H4**). Naše výsledky mimo jiné ukázaly, že produkce pozitivních 50kHz USV nekorelovala s produkcí negativních 22kHz USV (hypotéza **H5**), a zjistily shodnou individuální četnost pozitivních 50kHz a negativních 22kHz USV (hypotéza **H6**).

Na základě zjištění interindividuálních rozdílů v produkci pozitivních 50kHz USV při lechtání navrhuje, aby bylo do metody lechtání začleněno více prvků ze sociální „rough-and-tumble“ hry. Úprava lechtání by mohla poskytnout vhodnější způsob manipulace s laboratorními potkany. Současně doporučujeme, aby se během lechtání získalo více informací o signálních a nesignálních funkcích USV během hravé interakce, aby bylo možné plně pochopit rozdíly v produkci ultrazvuků při lechtání a „rough-and-tumble“ hry.

8 Literatura

- Ahloy-Dallaire J, Espinosa J, Mason G. 2018. Play and optimal welfare: Does play indicate the presence of positive affective states? *Behavioural Processes* **156**:3–15.
- Arakawa H. 2003. The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Developmental Psychobiology* **43**:11–19.
- Arakawa H. 2005. Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behavioural Processes* **70**:223–234.
- Arch VS, Narins PM. 2008. ‘Silent’ signals: selective forces acting on ultrasonic communication systems in terrestrial vertebrates. *Animal Behaviour* **76**:1423–1428.
- Baarendse PJJ, Counotte DS, O’Donnell P, Vanderschuren LJMJ. 2013. Early Social Experience Is Critical for the Development of Cognitive Control and Dopamine Modulation of Prefrontal Cortex Function. *Neuropsychopharmacology* **38**:1485–1494.
- Bauer EB, Smuts BB. 2007. Cooperation and competition during dyadic play in domestic dogs, *Canis familiaris*. *Animal Behaviour* **73**:489–499.
- Berghänel A, Schülke O, Ostner J. 2015. Locomotor play drives motor skill acquisition at the expense of growth: A life history trade-off. *Science Advances* **1**.
- Bombail V, Brown SM, Hammond TJ, Meddle SL, Nielsen BL, Tivey EKL, Lawrence AB. 2021. Crying With Laughter: Adapting the Tickling Protocol to Address Individual Differences Among Rats in Their Response to Playful Handling. *Frontiers in Veterinary Science* **8**.
- Briefer EF. 2020. Coding for ‘Dynamic’ Information: Vocal Expression of Emotional Arousal and Valence in Non-human Animals. Pages 137–162 *Coding Strategies in Vertebrate Acoustic Communication*.
- Brown RE. 1991. Effects of rearing condition, gender, and sexual experience on odor preferences and urine marking in Long-Evans rats. *Animal Learning & Behavior* **19**:18–28.
- Brudzynski SM. 2005. Principles of Rat Communication: Quantitative Parameters of Ultrasonic Calls in Rats. *Behavior Genetics* **35**:85–92.
- Brudzynski SM. 2009. Communication of Adult Rats by Ultrasonic Vocalization: Biological, Sociobiological, and Neuroscience Approaches. *ILAR Journal* **50**:43–50.
- Brudzynski SM. 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology* **23**:310–317.
- Brudzynski SM. 2017. Communication of Emotions in Animals. Page Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. Elsevier.
- Brudzynski SM. 2021. Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sciences* **11**:605.

- Brudzynski SM, Burgdorf JS. 2021. Recent Studies of Rat Ultrasonic Vocalizations—Editorial. *Brain Sciences* **11**:1390.
- Burgdorf J, Panksepp J. 2001. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiology & Behavior* **72**:167–173.
- Burghardt GM. 2006. *The Genesis of Animal Play*. The MIT Press.
- Burke CJ, Kisko TM, Euston DR, Pellis SM. 2018. Do juvenile rats use specific ultrasonic calls to coordinate their social play? *Animal Behaviour* **140**:81–92.
- Burke CJ, Kisko TM, Swiftwolfe H, Pellis SM, Euston DR. 2017. Specific 50-kHz vocalizations are tightly linked to particular types of behavior in juvenile rats anticipating play. *PLOS ONE* **12**:e0175841.
- Burke CJ, Pellis SM, Achterberg EJM. 2022. Who’s laughing? Play, tickling and ultrasonic vocalizations in rats. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **377**.
- Busnel RG. 1977. Acoustic communication. Pages 233–251 in SEBEOK TA, editor. *How Animals Communicate*. Indiana University Press, Bloomington.
- Cameron EZ, Linklater WL, Stafford KJ, Minot EO. 2008. Maternal investment results in better foal condition through increased play behaviour in horses. *Animal Behaviour* **76**:1511–1518.
- Cloutier S, Baker C, Wahl K, Panksepp J, Newberry RC. 2013. Playful handling as social enrichment for individually- and group-housed laboratory rats. *Applied Animal Behaviour Science* **143**:85–95.
- Cloutier S, LaFollette MR, Gaskill BN, Panksepp J, Newberry RC. 2018. Tickling, a Technique for Inducing Positive Affect When Handling Rats. *Journal of Visualized Experiments* DOI: 10.3791/57190.
- Cuesta S, Funes A, Pacchioni AM. 2020. Social Isolation in Male Rats During Adolescence Inhibits the Wnt/ β -Catenin Pathway in the Prefrontal Cortex and Enhances Anxiety and Cocaine-Induced Plasticity in Adulthood. *Neuroscience Bulletin* **36**:611–624.
- Danchin E, Giraldeau L-A, Valone TJ, Wagner RH. 2004. Public Information: From Nosy Neighbors to Cultural Evolution. *Science* **305**:487–491.
- Demuru E, Ferrari PF, Palagi E. 2015. Emotionality and intentionality in bonobo playful communication. *Animal Cognition* **18**:333–344.
- Dishman RK et al. 2006. Neurobiology of Exercise. *Obesity* **14**:345–356.
- Donaldson TM, Newberry RC, Špinka M, Cloutier S. 2002. Effects of early play experience on play behaviour of piglets after weaning. *Applied Animal Behaviour Science* **79**:221–231.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. 2004. Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: Impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Developmental Psychobiology* **45**:153–162.

- Ekman P. 2003. *Emotions Revealed, Recognizing Faces and Feelings to Improve Communication and Emotional Life* 1st edition. Times Books, New York.
- Friel M, Kunc HP, Griffin K, Asher L, Collins LM. 2019. Positive and negative contexts predict duration of pig vocalisations. *Scientific Reports* **9**:2062.
- Graham KL, Burghardt GM. 2010. Current Perspectives on the Biological Study of Play: Signs of Progress. *The Quarterly Review of Biology* **85**:393–418.
- Ham JR, Lilley MK, Lelekach J, Miller MR, Robeck TR, Pellis SM, Manitzas Hill HM. 2022. The emergence and early development of socio-sexual behavior in beluga calves (*Delphinapterus leucas*). *Behavioural Processes* **200**:104695.
- Hammond T, Bombail V, Nielsen BL, Meddle SL, Lawrence AB, Brown SM. 2019. Relationships between play and responses to tickling in male juvenile rats. *Applied Animal Behaviour Science* **221**:104879.
- Held SDE, Špinko M. 2011. Animal play and animal welfare. *Animal Behaviour* **81**:891–899.
- Himmler SM, Himmler BT, Pellis VC, Pellis SM. 2016. Play, variation in play and the development of socially competent rats. *Behaviour* **153**:1103–1137.
- Hinchcliffe JK, Mendl M, Robinson ESJ. 2020. Rat 50 kHz calls reflect graded tickling-induced positive emotion. *Current Biology* **30**:R1034–R1035.
- Hol T, Van den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM. 1999. Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behavioural Brain Research* **100**:91–97.
- Kaplan G. 2014. Animal communication. *WIREs Cognitive Science* **5**:661–677.
- Kisko TM, Himmler BT, Himmler SM, Euston DR, Pellis SM. 2015. Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behavioural Processes* **111**:25–33.
- Kisko TM, Wöhr M, Pellis VC, Pellis SM. 2017. From Play to Aggression: High-Frequency 50-kHz Ultrasonic Vocalizations as Play and Appeasement Signals in Rats. Pages 91–108 in Wöhr Marcus, Krach Sören, editors. *Social Behavior from Rodents to Humans*.
- Kremer L, Klein Holkenborg SEJ, Reimert I, Bolhuis JE, Webb LE. 2020. The nuts and bolts of animal emotion. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **113**:273–286.
- LaFollette MR, Cloutier S, Brady CM, O’Haire ME, Gaskill BN. 2020. Changing Human Behavior to Improve Animal Welfare: A Longitudinal Investigation of Training Laboratory Animal Personnel about Heterospecific Play or “Rat Tickling.” *Animals* **10**:1435.
- LaFollette MR, O’Haire ME, Cloutier S, Blankenberger WB, Gaskill BN. 2017. Rat tickling: A systematic review of applications, outcomes, and moderators. *PLOS ONE* **12**:e0175320.
- LaFollette MR, O’Haire ME, Cloutier S, Gaskill BN. 2018. Practical rat tickling: Determining an efficient and effective dosage of heterospecific play. *Applied Animal Behaviour Science* **208**:82–91.

- LaFollette MR, Swan MP, Smith RK, Hickman DL, Gaskill BN. 2019. The effects of cage color and light intensity on rat affect during heterospecific play. *Applied Animal Behaviour Science* 219:104834.
- Laplagne DA, Elías Costa M. 2016. Rats Synchronize Locomotion with Ultrasonic Vocalizations at the Subsecond Time Scale. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10.
- Laurijs KA, Briefer EF, Reimert I, Webb LE. 2021. Vocalisations in farm animals: A step towards positive welfare assessment. *Applied Animal Behaviour Science* 236:105264.
- Liu Q, Špinková M, Ilčíková T, Radchenko M. 2023. Effects of reduced kinematic and social play experience on affective appraisal of human-rat play in Norway rats. Submitted.
- Mason G, Mendi M. 1993. Why is There no Simple Way of Measuring Animal Welfare? *Animal Welfare* 2:301–319.
- Masterton B, Heffner H, Ravizza R. 1969. The Evolution of Human Hearing. *The Journal of the Acoustical Society of America* 45:966–985.
- Mazorra-Alonso M, Tomás G, Soler JJ. 2021. Microbially Mediated Chemical Ecology of Animals: A Review of Its Role in Conspecific Communication, Parasitism and Predation. *Biology* 10:274.
- Melotti L, Bailoo J, Murphy E, Burman O, Wurbel H. 2014. Play in Rats: Association across Contexts and Types, and Analysis of Structure. *Animal Behavior and Cognition* 1:489–501.
- Mendl M, Burman OHP, Paul ES. 2010. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277:2895–2904.
- Miguel-Pacheco GG, Vaughan A, de Passillé AM, Rushen J. 2015. Relationship between locomotor play of dairy calves and their weight gains and energy intakes around weaning. *Animal* 9:1038–1044.
- Morton ES. 1977. On the Occurrence and Significance of Motivation-Structural Rules in Some Bird and Mammal Sounds. *The American Naturalist* 111:855–869.
- Natusch C, Schwarting RKW. 2010. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96:251–259.
- Nunes S. 2014. Juvenile social play and yearling behavior and reproductive success in female Belding's ground squirrels. *Journal of Ethology* 32:145–153.
- Palagi E, Burghardt GM, Smuts B, Cordoni G, Dall'Olio S, Fouts HN, Řeháková-Petrů M, Siviy SM, Pellis SM. 2016. Rough-and-tumble play as a window on animal communication. *Biological Reviews* 91:311–327.
- Panksepp J. 2005. Affective consciousness: Core emotional feelings in animals and humans. *Consciousness and Cognition* 14:30–80.

- Panksepp J, Burgdorf J. 2010. Laughing Rats? Playful Tickling Arouses High-Frequency Ultrasonic Chirping in Young Rodents • Prologue: on the Discovery of “Laughter” in Rats.
- Paul ES, Mendl MT. 2018. Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective. *Applied Animal Behaviour Science* **205**:202–209.
- Pellis SM, Pellis VC. 2017. What is play fighting and what is it good for? *Learning & Behavior* **45**:355–366.
- Pellis SM, Pellis VC, Bell HC. 2010. The function of play in the development of the social brain. *American Journal of Play* **2**:278–296.
- Pellis SM, Pellis VC, Ham JR, Stark RA. 2023. Play fighting and the development of the social brain: The rat’s tale. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **145**:105037.
- Petrů M, Špinka M, Lhota S, Šípek P. 2008. Head rotations in the play of Hanuman langurs (*Semnopithecus entellus*): Description and analysis of function. *Journal of Comparative Psychology* **122**:9–18.
- Russell JA. 1980. A circumplex model of affect. *Journal of Personality and Social Psychology* **39**:1161–1178.
- Scherer KR. 2005. What are emotions? And how can they be measured? *Social Science Information* **44**:695–729.
- Schleich CE, Veitl S, Knotková E, Begall S. 2007. Acoustic Communication in Subterranean Rodents. Pages 113–127 in Begall S, Burda H, Burda H, editors. *Subterranean Rodents*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Schneider P, Bindila L, Schmahl C, 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**.
- Schweinfurth MK. 2020. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *eLife* **9**.
- Siviy SM, Love NJ, DeCicco BM, Giordano SB, Seifert TL. 2003. The relative playfulness of juvenile Lewis and Fischer-344 rats. *Physiology & Behavior* **80**:385–394.
- Snowdon CT, de la Torre S. 2002. Multiple environmental contexts and communication in pygmy marmosets (*Cebuella pygmaea*). *Journal of Comparative Psychology* **116**:182–188.
- Špinka M, Newberry RC, Bekoff M. 2001. Mammalian Play: Training for the Unexpected. *The Quarterly Review of Biology* **76**:141–168.
- Špinka M, Palečková M, Řeháková M. 2016. Metacommunication in social play: the meaning of aggression-like elements is modified by play face in Hanuman langurs (*Semnopithecus entellus*). *Behaviour* **153**:795–818.

- Stark R, Pellis SM. 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**:76–91.
- Taylor AM, Reby D. 2010. The contribution of source–filter theory to mammal vocal communication research. *Journal of Zoology* **280**:221–236.
- Thor DH, Holloway WR. 1984. Social play in juvenile rats: A decade of methodological and experimental research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **8**:455–464.
- Van Den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM. 1999. Sequential Analysis of Juvenile Isolation-Induced Decreased Social Behavior in the Adult Rat. *Physiology & Behavior* **67**:483–488.
- Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. 2013. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends in Cognitive Sciences* **17**:525–544.
- Weller JE, Turner SP, Farish M, Camerlink I, Arnott G. 2020. The Association Between Play Fighting and Information Gathering during Subsequent Contests. *Scientific Reports* **10**:1133.
- Wilson EO. 2000. *Sociobiology: The New Synthesis, Twenty-fifth Anniversary Edition*. Harvard University Press, Harvard.
- Wilson SC, Kleiman DG. 1974. Eliciting Play: A Comparative Study. *American Zoologist* **14**:341–370.
- Wöhr M, Engelhardt KA, Seffer D, Sungur AÖ, Schwarting RKW. 2015. Acoustic Communication in Rats: Effects of Social Experiences on Ultrasonic Vocalizations as Socio-affective Signals. Pages 67–89 in Markus Wöhr, Sören Krach, editors. *Social Behavior from Rodents to Humans*.
- Wyatt TD. 2010. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A* **196**:685–700.