

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra obecné zootechniky a etologie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv intenzity osvětlení na chování potkana ve
vyvýšeném křížovém bludišti**

Diplomová práce

Bc. Lada Čejková

Zájmové chovy zvířat

Vedoucí práce RNDr. PhDr. Tereza Nekovářová, Ph.D.
Konzultant Mgr. Markéta Chvojková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv intenzity osvětlení na chování potkana ve vyvýšeném křížovém bludišti" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí a konzultantky 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. PhDr. Tereze Nekovářové, Ph.D. a Mgr. Markétě Chvojkové, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Vliv intenzity osvětlení na chování potkana ve vyvýšeném křížovém bludišti

Souhrn

Na výsledky behaviorálních testů má vliv mnoho faktorů, kterým je nutné věnovat pozornost již při plánování experimentu. Jedním z nejběžnějších behaviorálních testů používaných u laboratorních hlodavců je vyvýšené křížové bludiště (EPM – Elevated Plus Maze), umožňující sledování anxiety a motorické aktivity. Poměrně diskutovaným faktorem je intenzita okolního osvětlení, která může mít na chování potkana v EPM poměrně velký vliv. Odborná literatura však v tomto ohledu nehovoří jednoznačně a není jasné, jak velký vliv osvětlení má. Tato práce se zabývá porovnáním chování potkana v EPM při různých intenzitách osvětlení. Pro rozšíření komplexity experimentu byly porovnány výsledky testu na zvířatech různých kmenů i věkových kategorií. Do experimentu jsou zahrnuty také samice, což umožní sledovat i pohlavní rozdíly, které jsou v experimentech v poslední době také zohledňovány. V neposlední řadě byl experiment zaměřen také na otestování vlivu handlingu.

Nejčastěji jsou v laboratořích pro behaviorální testy využíváni potkani kmene Wistar. Tito potkani jsou specifictí nízkou pigmentací, díky které mají bílou srst a červené oči, a právě nedostatek pigmentu je příčinou horšího zraku.^{9,10} V této práci je sledován tento kmen i kmen pigmentovaných potkanů Long Evans, kteří mají lepší zrak a lze u nich předpokládat i rozdílný efekt intenzity světla. Experiment potvrdil vliv intenzity osvětlení na celkovou uběhnutou dráhu v EPM, i dráhu a rychlost v otevřených ramenech u dospělých samců, ale u času v otevřených ramenech nebyla pozorována statisticky významná změna. Rozdílné chování měly samice, které oproti samcům vykazovaly vyšší míru explorativního chování. Výsledky experimentu jsou také ovlivněny “handlováním” zvířat před experimentem. Handlovaná zvířata trávila méně času a uběhla kratší dráhu v otevřených ramenech aparatury. Nejzajímavějším výsledkem je rozdíl mezi kmeny potkanů. Potkanům kmene Wistar ovlivnila intenzita světla dráhu, kterou ušli, zatímco potkanům kmene Long Evans intenzita osvětlení ovlivnila čas v otevřených ramenech. Výsledky tohoto experimentu jsou klíčové pro plánování dalších experimentů i pro interpretaci jejich výsledků.

Klíčová slova: potkan, Wistar, Long Evans, vyvýšené křížové bludiště, intenzita osvětlení

Effect of light intensity on rat behavior in an elevated plus maze

Summary

The results of behavioral tests are influenced by many factors that need to be addressed during the planning of the experiment. One of the most common behavioral tests used in laboratory rodents is the Elevated Plus Maze (EPM), enabling the monitoring of anxiety and motor activity. A relatively debated factor is the intensity of ambient lighting, which can have a significant impact on rat behavior in the EPM. However, the scientific literature does not provide a clear consensus on this matter, and it is unclear how much of an effect lighting has. This study focuses on comparing rat behavior in the EPM under different lighting intensities. To expand the complexity of the experiment, I have also decided to compare the test results across animals of different strains and age categories. Female subjects are also included in the experiment, allowing for the observation of gender differences, which have recently been increasingly considered in experiments. Lastly, I focused on testing the influence of handling.

Most commonly, Wistar rats are used in laboratories for behavioral tests. These rats are characterized by low pigmentation, resulting in white fur and red eyes, and the lack of pigment is precisely the cause of their poorer eyesight.^{9,10} In my study, I observed this strain as well as pigmented rats from the Long Evans strain, which have better vision, and we could anticipate a different effect of light intensity. The experiment confirmed the influence of lighting intensity on the total distance moved in the EPM, and on the distance and speed in the open arms in adult males, but no change was observed in the time spent in the open arms. Females exhibited different behavior, showing a higher level of exploratory behavior compared to males. The results of the experiment are also affected by pre-experiment handling of the animals. Handled animals spent less time and covered arms a shorter distance in the open arms of the apparatus. The most interesting result is the difference between the rat strains. Light intensity affected the distance moved by Wistar rats, whereas it influenced the time spent in the open arms in Long Evans rats. The outcomes of this experiment are crucial for planning further experiments and for interpreting their results.

Keywords: rat, Wistar, Long Evans, elevated plus maze, light intensity

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Behaviorální testy u laboratorních hlodavců	10
3.1.1	PPI – prepulzní inhibice úlekové reakce.....	10
3.1.2	Test otevřeného pole	11
3.1.3	Y bludiště	12
3.1.4	Morrisovo vodní bludiště.....	13
3.1.5	Bludiště Barnesové	14
3.1.6	Skinnerův box	15
3.2	Vyvýšené křížové bludiště – EPM	16
3.2.1	Anxieta.....	17
3.3	Faktory ovlivňující chování potkana v EPM.....	17
3.3.1	Vliv světelné intenzity	17
3.3.2	Vliv věku.....	18
3.3.3	Vliv pohlaví	18
3.3.4	Vliv handlingu	19
3.3.5	Rozdíl v pigmentaci oka	19
3.4	Charakteristika zkoumaného vzorku.....	20
3.4.1	Wistar.....	21
3.4.2	Long Evans	22
4	Metodika.....	23
4.1	Zvířata.....	23
4.2	Design experimentů.....	23
4.3	Experiment	24
4.3.1	Experiment 1 – vliv osvětlení	24
4.3.2	Experiment 2 - věk.....	24
4.3.3	Experiment 3 - pohlaví.....	25
4.3.4	Experiment 4 – handling	25
4.3.5	Experiment 5 – kmen	25
4.4	Statistika	26
5	Výsledky	27
5.1	Experiment 1 – vliv osvětlení	28
5.1.1	Celková dráha	28
5.1.2	Dráha v otevřených ramenech	29
5.1.3	Čas v otevřených ramenech	30
5.1.4	Rychlost v otevřených ramenech	31

5.2	Experiment 2 - věk	32
5.2.1	Celková dráha	32
5.2.2	Dráha v otevřených ramenech.....	33
5.2.3	Čas v otevřených ramenech	34
5.2.4	Rychlost v otevřených ramenech	35
5.3	Experiment 3 - pohlaví.....	36
5.3.1	Celková dráha	36
5.3.2	Dráha v otevřených ramenech.....	37
5.3.3	Čas v otevřených ramenech	38
5.3.4	Rychlost v otevřených ramenech	39
5.4	Experiment 4 - handling	40
5.4.1	Celková dráha	40
5.4.2	Dráha v otevřených ramenech.....	41
5.4.3	Čas v otevřených ramenech	42
5.4.4	Rychlost v otevřených ramenech	43
5.5	Experiment 5 - kmen.....	44
5.5.1	Celková dráha	44
5.5.2	Dráha v otevřených ramenech.....	45
5.5.3	Čas v otevřených ramenech	46
5.5.4	Rychlost v otevřených ramenech	47
6	Diskuze.....	48
6.1	Experiment 1 – vliv osvětlení	48
6.2	Experiment 2 - věk	49
6.3	Experiment 3 - pohlaví.....	49
6.4	Experiment 4 - handlování	50
6.5	Experiment 5 – kmen	50
6.6	Intenzita světla při ustájení	52
7	Závěr	53
8	Literatura	54
9	Přílohy	1

1 Úvod

Behaviorální testy jsou způsobem, jak sledovat chování zvířete co nejvíce uniformním způsobem. Na výsledek testů má však vliv mnoho proměnných, jako například předchozí manipulace se zvířaty (handling), teplota v místnosti, intenzita osvětlení, předchozí zkušenost s behaviorální úlohou, nebo zacházení se zvířetem, věk zvířat, pohlaví a mnoho dalších.¹⁻³ Je velice důležité celý experiment provádět za stejných podmínek, aby dosažené výsledky byly objektivní. V průběhu našich předchozích experimentů jsme se potýkali s obtížemi při vyhodnocování výsledků z vyvýšeného křížového bludiště (EPM) u laboratorních potkanů, což vyvolalo otázku, zda by výsledky nemohly být ovlivněny odlišnými podmínkami, například různou intenzitou osvětlení. Jelikož v odborné literatuře k problému existují rozporuplné informace, rozhodla jsem se toto téma zpracovat v mojí diplomové práci.

EPM je obecně považován za poměrně robustní test, tedy výsledky by neměly být snadno ovlivnitelné různými podmínkami, avšak v rámci jedné laboratoře jsou výsledky konzistentní a při pokusu o opakování stejného testu jinou laboratoří se výsledky často liší.^{4,5}

Při EPM testu jsou jako základní parametry zkoumány množství času a dráha, kterou potkan ujde v otevřených ramenech bludiště, sleduje se však i řada dalších parametrů jako panáčkování či nakukování do otevřených ramen, díky kterým lze chování zvířete popsat podrobněji. Čas a dráha v otevřených ramenech se interpretují jako míra anxiety/exploratorního chování zvířete. Přirozeně se zdraví potkani bez medikace spíše vyhýbají otevřeným ramenům a vyhledávají úkryt v uzavřených ramenech.⁵⁻⁸

Pilotní studie zkoumá vliv intenzity osvětlení na chování dospělých samců laboratorního potkana kmene Wistar v EPM. Pro zkoumání vlivů dalších faktorů byly zvoleny skupiny se samci mladými 1-1,5 měsíce, těsně po odstavu od matky, samci staršími než 5,5 měsíce a skupinu s dospělými samicemi starými 3-3,5 měsíce. Mnoha studií pojednává o vlivu nedostatečné pigmentace oka u potkanů kmene Wistar a následného ztrácení zraku^{9,10}, proto je do studie zařazena ještě skupina potkanů kmene Long Evans, kteří jsou pigmentovaní. Dále je do experimentu zařazena ještě skupina s dospělými samci kmene Wistar, kteří byli před pokusem handlování (přivykání na experimentátora) pro posouzení vlivu předchozího handlingu na výsledky experimentu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověřit, zda má intenzita osvětlení vliv na chování (míru anxiety a aktivity) laboratorního potkana v EPM (Experiment 1), a následně se pokusit zjistit vliv pohlaví, věku, kmene a použití handlingu na chování laboratorního potkana v této úloze za vybraných světelných intenzit (Experiment 2–5).

H1: Světlo ovlivní vybrané parametry chování potkanů v EPM. Vyšší osvětlení povede k menšímu času a nižší uražené dráze v otevřených ramenech.

H2: Na základě literární rešerše předpokládám, že bude mít vliv věk a pohlaví na chování potkanů v EPM.

H3: Domnívám se, že handlovaní potkani budou trávit více času v otevřených ramenech a urazí delší vzdálenost než potkani bez handlingu.

H4: Můžeme předpokládat, že se od sebe bude lišit chování potkanů kmene Wistar a Long Evans.

Výstupem této práce by mělo být objasnění aspektů, které by mohly mít vliv na výsledky vybraného behaviorálního testu a zjistit, jaké hodnoty osvětlení jsou vhodné pro hodnocení míry anxiety v EPM.

3 Literární rešerše

3.1 Behaviorální testy u laboratorních hlodavců

Behaviorální testy jsou důležitým prostředkem pro experimentální biologii, etologii a další vědecké disciplíny včetně vývoje farmak. Díky behaviorálním testům je možné zachytit změny, které nejdou zjistit pomocí biochemie a morfologie. Existuje řada testů, které mají širokou škálu využití. Používají se například pro vyhodnocení spontánní aktivity jako je lokomoce a exploração, emocionality, a to především anxiety, a také pro vyhodnocení učení a paměti. Při testech jsou sledovány projevy motorické, sociální a fyziologické a jejich sledování má vysvětlit určité chování a nalézt případnou patofyziologii daného projevu.^{1,11,12}

Velice důležitá je standardizace okolních podmínek jako je teplota, vlhkost, osvětlení, hluk, ale také vždy stejně připravená aparatura, včetně pozorovací místnosti. Dále má na výsledky pokusů vliv, zda bylo zvíře předem navykáno na osobu, která s ním bude pokus provádět, tedy zda byl proveden handling. A v neposlední řadě je důležité, jak bylo zvíře ustájeno.^{1,2,13,14}

Zde uvedu přehled několika vybraných behaviorálních testů, které se standardně používají v laboratorním výzkumu.

3.1.1 PPI – prepulzní inhibice úlekové reakce

Prepulzní inhibice úlekové reakce (*Obrázek 1*) je test, který je často využíván v animálních modelech schizofrenie. Úleková reakce je nepodmíněným reflexem, pomocí jejího testování tedy lze zjistit správné fungování centrální nervové soustavy. Při úleku zvíře většinou reaguje škubnutím celého těla, a právě tento záskub je měřen pomocí akcelerometru v podlážce. Úleku je dle použitého protokolu docíleno pomocí různých podnětů, a to hlasitým zvukovým podnětem, vizuálně pomocí záblesku světla, elektrickým podnětem, nebo pomocí silného proudu vzduchu. Při měření je zvíře vystaveno opakovaným podnětům různé intenzity a je měřena síla úleku, popřípadě habituace na podnět. V experimentu je porovnávána síla úleku při samotném intenzivním stimulu se silou úleku na stejný intenzivní stimul, před kterým předcházel obdobný, ale slabší stimul neboli prepulz. Prezentace prepulzu před pulzem vede u zdravých zvířat ke snížení následné úlekové reakce. Tento projev je u pacientů se schizofrenií i u jejich animálních modelů často narušen.^{13,15}

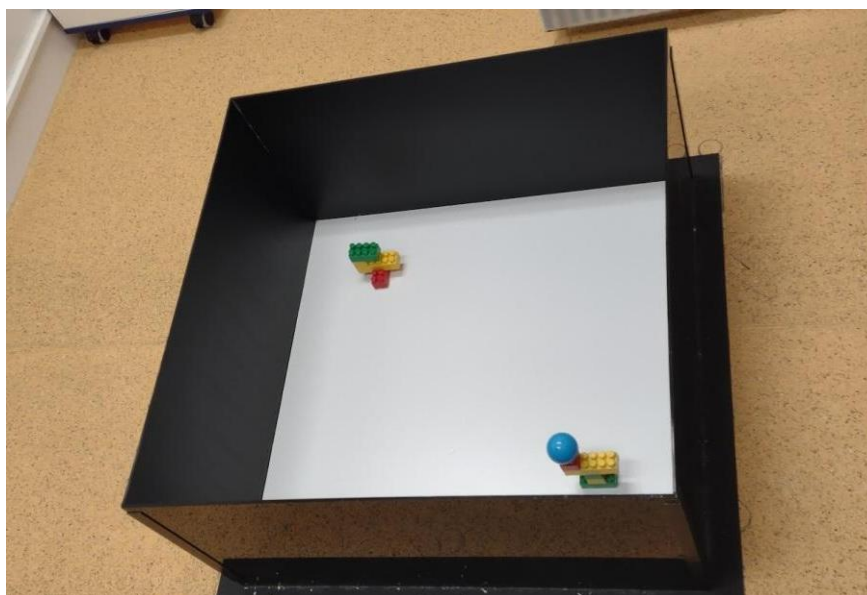


Obrázek 1: Prepulzní inhibice úlekové reakce

3.1.2 Test otevřeného pole

Open field (Obrázek 2), neboli test otevřeného pole, je využíván primárně k vyhodnocení spontánní lokomoční aktivity v novém prostředí. Při pokusu je sledována lokomoce, explorace, a vyhodnocována anxieta experimentálního zvířete. Aparatura je velká čtvercová aréna, do které je zvíře umístěno a následně začne nové prostředí prozkoumávat. Pokud je zvíře úzkostné, bude se v aréně delší čas držet u stěn (tzn. thigmotaxe), a uběhne kratší vzdálenost. Arénu na open field test lze také použít pro sledování sociálního chování. Tento pokus se jmenuje *social interaction test* a provádí se tak, že do bludiště jsou vypuštěni dva potkani, kteří se neznají a je měřen čas, který stráví očicháváním se a dalšími sociálními interakcemi navzájem.^{16,17}

Open field test se také lze přidáním předmětů do arény použít na úlohu nazývanou *novel object recognition* (rozpoznání nového objektu). Zvíře je umístěno do arény, ve které je umístěn jeden neznámý předmět, a dostane čas na to, aby arénu a předmět mohlo prozkoumat. Poté je zvíře vyndáno, do arény je přidán další předmět, a zvíře opět vypuštěno. Sleduje se čas, který stráví prozkoumáváním nového a starého předmětu, a také to, který předmět zkoumá jako první. Test vychází z předpokladu, že potkan bude přednostně zkoumat nový objekt. Tento test je využíván k hodnocení učení a paměti.¹⁶⁻¹⁸

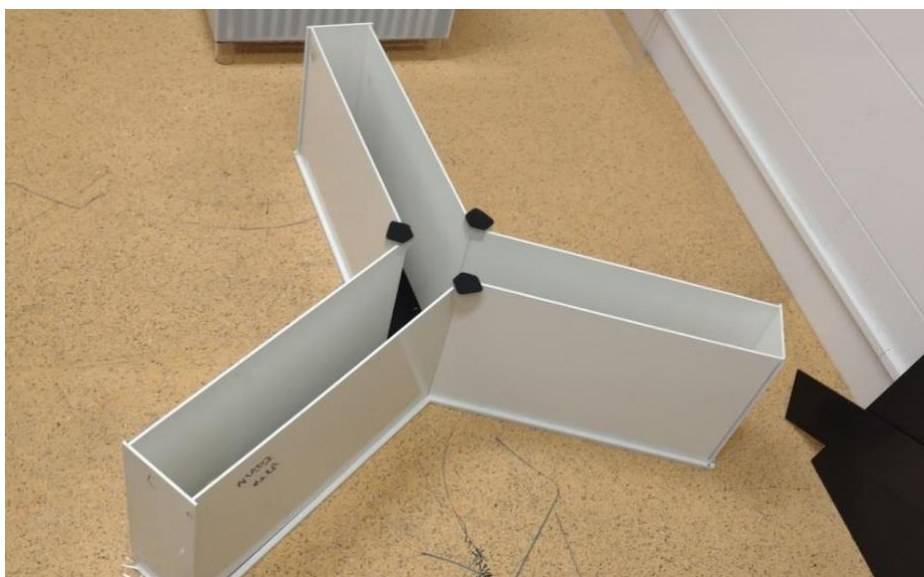


Obrázek 2: *Open field*, upravený pro test *novel object recognition*

3.1.3 Y bludiště

Y bludiště (*Obrázek 3*) je bludiště ve tvaru písmene Y (existuje i modifikace do tvaru T), které je používáno k testování prostorové orientace a paměti. Zvíře je vypuštěno do středu arény a je sledována uběhnutá dráha, čas strávený v jednotlivých ramenech, a počet vstupů do jednotlivých ramen. Nejdůležitějším sledovaným prvkem je alternace neboli střídání jednotlivých ramen. Test vychází z předpokladu, že zvíře bude preferovat raději novější rameno, tedy se nevrátí do ramene, ze kterého přišlo, ale raději navštíví to druhé. I toto bludiště má různé varianty, jako například všechna otevřená ramena, nebo s jedním ramenem uzavřeným.¹⁹

Bludiště lze také modifikovat na test sociálního chování. Do ramen jsou přidány mřížky, za jednu mřížku je umístěn jeden potkan a za druhou mřížku libovolný neznámý předmět, poté je testovaný potkan vypuštěn do třetího ramene bludiště a je zkoumáno, zda tráví více času u mřížky s druhým potkanem či u předmětu. Následně je možné provést další sledování s výměnou předmětu za dalšího potkana a u sledovaného potkana zkoumat, zda bude trávit více času u nového či již známého potkana. Tímto hodnotíme sociální chování.¹⁹



Obrázek 3: Y bludiště

3.1.4 Morrisovo vodní bludiště

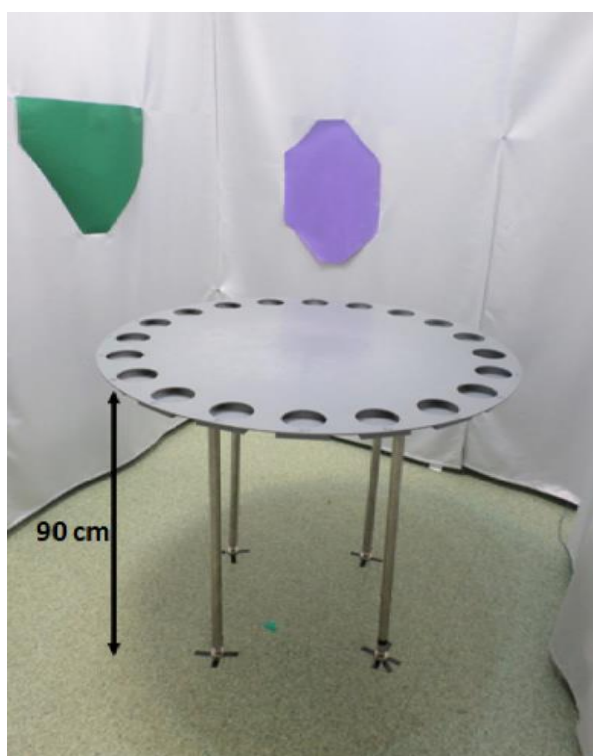
Morrisovo vodní bludiště (*Obrázek 4*) je kruhová nádrž naplněná vodou s malým ostrůvkem, který je umístěný pod hladinou vody. Zvíře je vypouštěno z různých míst po obvodu bazénu a má za úkol se co nejdříve dostat na skrytý ostrůvek. V případě, že ostrůvek nenajde do jedné minuty, je na něj navedeno. Další den jsou plavby opakovány a je sledována doba, za jakou je zvíře schopno ostrůvek najít a dráha, kterou uplave. Zvíře se může orientovat pouze pomocí vzdálených orientačních bodů v místnosti či po obvodu bazénku (alotetická orientace). Pomocí tohoto bludiště je tak zkoumána prostorová orientace a paměť i toto bludiště má mnoho modifikací.^{20,21}



Obrázek 4: Morrisovo vodní bludiště

3.1.5 Bludiště Barnesové

Toto bludiště je pojmenované po své tvůrkyni Carol Barnesové. Je to kruhové bludiště s otvory po obvodu, kde pouze jeden otvor vede do úkrytu. Učení se zakládá buď na pozitivní či negativní motivaci najít si úkryt. Pozitivní motivací může být odměna v úkrytu, negativní motivací je například hluk, nebo nasvícení bludiště ostrým světlem. Test je prováděn tak, že je zvíře umístěno uprostřed bludiště a je sledována dráha a čas, za který zvíře dokázalo najít úkryt. Úloha je opakována a při každém měření je sledován čas a počet chyb neboli nesprávně navštívené díry. Bludiště slouží k hodnocení poruch prostorové orientace, paměti a učení.^{20,22} Bludiště Barnesové (Obrázek 5) je principiálně stejné s Morrisovým vodním bludištěm, ale je považováno za méně stresující. Nevýhodou oproti Morrisovu vodnímu bludišti ale je, že v případě nedokonalého vyčištění mezi jednotlivými expozicemi může zvíře sledovat pachové stopy.

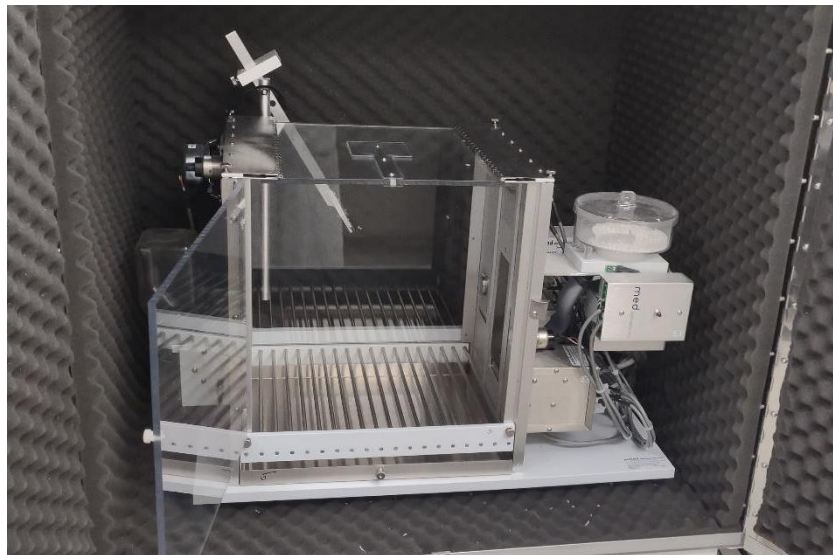


Obrázek 5: bludiště Barnesové – obrázek převzat z článku od autorů Gawel et.al 2019²²

3.1.6 Skinnerův box

Skinnerův box (*Obrázek 6*) představuje zařízení používané ke studiu operantního podmiňování a chování zvířat. Principem Skinnerova boxu je vytvoření prostředí, ve kterém je zvířeti prezentován specifický podnět (stimul), na který může reagovat prostřednictvím určitého operanda (např. páčky, klovacího disku apod.). Tato reakce může být následována poskytnutím pozitivní odměny (jako je krmivo nebo voda) nebo negativního podnětu (jako je elektrický stimul). Důležitým prvkem je však možnost sledovat behaviorální odpovědi zvířete na prezentované stimuly a následně provádět analýzy chování a učení.^{23,24}

V rámci Skinnerova boxu mohou být prezentovány různé typy stimulů, včetně vizuálních a auditivních, aby bylo možné zkoumat, jak zvíře vnímá a reaguje na tyto podněty. Kromě toho je možné manipulovat s odměnami a tresty, aby se studovaly různé aspekty učení a motivace. Při vyhodnocování není sledován pouze čas potřebný pro naučení se nového chování, ale také frekvence reakcí a změny v chování zvířete v reakci na různé stimuly. Tímto způsobem může být zkoumáno vnímání a zpracování informací zvířetem, jeho schopnost rozlišit mezi různými stimuly a adaptovat své chování.^{23,24}

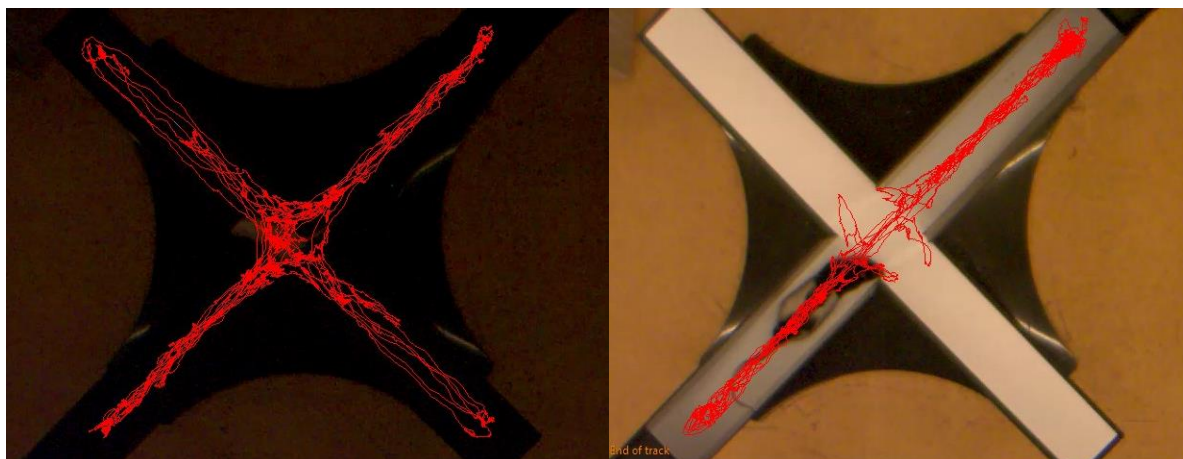


Obrázek 6: Skinnerův box

3.2 Vyvýšené křížové bludiště – EPM

Vyvýšené křížové bludiště je behaviorální test, který se používá pro zjištění míry anxiety (úzkosti). Úzkost je negativní emoční stav, který se vyznačuje obavami z potencionální hrozby. Pro testování jsou nejčastěji využívány myši či potkani, ale také jiné experimentální druhy (například prasata). EPM se využívá pro zkoumání úzkostného a posttraumatického chování, dále k testování nových látek s potenciálně anxiolytickým účinkem.²⁵

Bludiště sestává ze čtyř vyvýšených ramen ve tvaru kříže. Dvě protilehlá ramena mají vyvýšené obvodové stěny bez uzavřeného stropu, zatímco zbývající dvě ramena jsou zcela otevřená. Zvíře je vypuštěno do středu kříže. Nad aparaturou je snímací zařízení, které slouží k zaznamenávání pohybu zvířete. Je nezbytné, aby při nahrávání videa bylo zvíře v místnosti samo.^{5,6,26,27} Potkani přirozeně vyhledávají úkryty a neradi tráví čas na otevřeném prostranství, ale zároveň mají sklon ke zkoumání okolního prostředí. Zvíře, které bude úzkostné, bude trávit méně času v otevřených ramenech. Videá lze následně vyhodnocovat pomocí různých počítačových programů, které umožňují zaznamenat čas strávený v jednotlivých ramenech, nebo zobrazit dráhu, kterou potkan uběhl (na obrázcích zobrazena červenou čarou). V případě, že má potkan nízkou anxietu, bude ochotněji vycházet do otevřených ramen, jak lze vidět na obrázku č. 7 vlevo, vpravo je zobrazena dráha zvířete, které bylo více ve stresu a nebylo ochotno tolik vystupovat do otevřených ramen. Na obrázcích bylo rozdílných výsledků dosaženo změnou intenzity světla. Při testování látek s anxiolytickým účinkem je potřeba udržovat konstantní okolní podmínky. Potkani, kterým nejsou podávány žádné látky, tráví v EPM v otevřených ramenech méně času než ti, kteří dostali látky, které snižují úzkost.²⁸



Obrázek 7 červeně znázorněná dráha potkana v EPM s přirozeným(vlevo) chováním a anxiózním (vpravo)

3.2.1 Anxieta

Anxieta neboli úzkost je definována jako nepříjemný emoční stav spojený se strachem z nebezpečí, které by mohlo nastat, a provází ji pocity dysforie neboli pocity fyzického napětí. Úzkost i strach vyvolávají obdobné behaviorální odpovědi, a to nižší lokomoci, vyšší bdělost, odmítání potravy a zvýšený srdeční tep.²⁹

3.2.1.1 Hodnocení anxiety

EPM a open field jsou behaviorální aparatury, které jsou velice často používané k hodnocení míry anxiety. Pro studium behaviorálních změn jsou používány látky označované jako anxiolytika, mezi které patří například benzodiazepiny, barbituráty, nebo alkohol. Tyto látky snižují úzkost.³⁰ V aparaturách je sledována uběhnutá vzdálenost, která se s vyšší úzkostí snižuje. Dále je velmi důležitým ukazatelem přirozený strach z otevřených prostor. V open fieldu se projevuje tím, že se zvíře zdržuje v blízkosti stěn aparatury neboli thigmotaxí, v EPM nižším časem stráveným v otevřených ramenech aparatury. V EPM je u potkanů strach z otevřených prostor ještě umocněn strachem z výšek. Pokud je zvířeti aplikována anxiolytická látka, mělo by dojít ke zmírnění přirozeného strachu zvířete, které bude následně trávit oproti kontrolním zvířatům bez aplikace látky více času v otevřených ramenech EPM, u open fieldu testu bude trávit více času ve středové zóně bludiště.^{25,31,32} EPM má tak své nezastupitelné místo v preklinickém testování účinnosti nově vyvíjených anxiolytik. Některé výzkumy naznačují, že potkani v EPM na otevřená ramena nechtějí vycházet kvůli tomu, že se raději pohybují podél stěn aparatury a vliv strachu z výšky a intenzity osvětlení není tak prokazatelný.^{7,28} Jiný výzkum ale dokázal opak, tedy že pro vyvolání anxiety je důležitější intenzita osvětlení. V tomto pokusu byli potkani umístěni do vyvýšeného křížového bludiště se všemi rameny uzavřenými, dvě ramena byla z neprůhledného materiálu a dvě z průhledného plastu. Potkani trávili signifikantně více času v tmavých ramenech, je tedy možné, že intenzita světla ovlivňuje pohyb potkana v EPM více než přirozená preference pohybu podél stěn. Dalším vysvětlením tohoto výsledku, ale může být pocit bezpečí, který vyvolávají neprůhledná ramena. Skrze ty průhledná je stále vidět spoustu potenciálních nebezpečí.³³

3.3 Faktory ovlivňující chování potkana v EPM

3.3.1 Vliv světelné intenzity

Potkani mají soumráčnou až noční aktivitu, proto je pro ně přirozené pohybovat se v málo osvětleném prostředí. Například intenzita světla měsíčního svitu nepřesahuje hodnotu 1 lux, u pouličního osvětlení se intenzita světla pohybuje mezi 2-50 lux. Potkani se přirozeně vyhýbají vyšším intenzitám osvětlení.³⁴

Při plánování experimentu je tedy nutné věnovat pozornost zvolení vhodné intenzity světla, jak dokazuje experiment, jehož cílem bylo zjistit hodnotu osvětlení, která u zkoumaného jedince vyvolá averzi ke vstupům do otevřených ramen bludiště. Během pokusu byla

sledována dráha a čas v otevřených ramenech EPM při osvětlení 0, 1, 3, 10, 30, 100 a 300 lux. Experiment byl proveden na dospělých samcích potkanů kmene Wistar. Pokus prokázal, že signifikantní rozdíl v čase stráveném v otevřených ramenech je již při hodnotách v rozmezí 1-3 lux, mezi vyššími hodnotami již výsledky signifikantní nebyly.³⁴

Jiné experimenty ale vliv intenzity osvětlení u EPM na exploraci a čas strávený v otevřených ramenech neprokázaly. Tyto experimenty ale byly provedeny s výrazně vyššími hodnotami osvětlení, které byly vyšší než 30 lux.³⁵⁻³⁷

S intenzitou světla se pojí i cirkadiánní rytmus zvířete. To znamená, že je důležité, v jakou denní dobu je pokus prováděn. Potkani tráví signifikantně více času v otevřených ramenech EPM, pokud je pokus prováděn v časovém intervalu mezi 8-12 h ve srovnání s intervalem 14-17 h.³⁸

3.3.2 Vliv věku

Při volbě pokusného zvířete je důležité dbát i na stejné stáří zvířat ve zkoumané skupině. Adolescentní zvířata ve věku 30–45 dnů tráví signifikantně více času v otevřených ramenech než zvířata adultní ve věku 60–90 dnů.^{39,40} Jedním z cílů mé práce je i ověření, zda tento trend bude přetrvávat i za různých intenzit osvětlení.

Většina pokusů se provádí na dospělých zdravých zvířatech, což by mělo odpovídat dospělým mladým jedincům, ale pokud se jedná o farmakologický výzkum, majoritními uživateli tohoto odvětví tito jedinci nebudou. Bylo by proto mnohdy vhodné zahrnout do experimentu i další relevantní věkové skupiny včetně stárnoucích zvířat, která mají svá biologická specifika. Nejedná se jen o možné změny v behaviorální odpovědi, ale především o změny ve fyziologické odpovědi. Starší potkani mají například jinou odezvu v glukózo tolerančním testu či inzulin tolerančním testu.⁴¹ Další výzkum potvrdil rozdílnou reakci na toxicitu několika látek vázanou na věk. Fenobarbital byl toxičtější pro mladší a roztok bemegridu a sulfadimidinu zase pro starší.⁴² Z toho vyplývá, že fyziologická odpověď je v pokročilejším věku rozdílná nejen vyšším výskytem patologií, ale i odlišnou senzitivitou na farmaka.

3.3.3 Vliv pohlaví

V minulosti byli v experimentech záměrně používáni pouze samci kvůli obavám, že chování samic bude ovlivněno hladinami hormonů, které nastávají v průběhu estrálního cyklu.⁴³ Byly již publikovány studie, ve kterých výsledky ukazují, že nejsou signifikantně ovlivněné fází estrálního cyklu.⁴⁴⁻⁴⁶ Například ve výzkumu, který byl zaměřen na porovnání času stráveného v otevřených ramenech EPM mezi samci a samicemi v různých fázích estrálního cyklu, byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi časem, který stráví v otevřených ramenech samci a samice, ale rozdíl mezi samicemi v různých fázích estrálního cyklu prokázán nebyl.⁴³

3.3.4 Vliv handlingu

Handling je termín, který označuje procedury, jejichž snahou je přivyknout zvíře na experimentátora a na manipulace během experimentu. Probíhá před samotným experimentem pomocí doteku, hlazení a zvedání, tedy manipulací, kterým bude zvíře vystaveno při experimentu. Handling ovlivňuje explorativní chování a emocionalitu zvířat.⁴⁷ Návyk na manipulaci by měl u pokusných zvířat snížit úzkost a zlepšit schopnost učení a paměti. Pokud probíhá handling již od brzkého období před odstavem, mají v dospělosti zvířata vyšší aktivitu v open fieldu a tráví více času v otevřených ramenech ve vyvýšeném křížovém bludišti.⁴⁷⁻⁵⁰

3.3.5 Rozdíl v pigmentaci oka

Vzhledem k soumravné až noční aktivitě není zrak pro potkany nejdůležitějším smyslem. Oproti potkanům mají lidé zrak ostřejší, ale i přesto má na jejich chování množství okolního světla vliv. Divoký potkan má přirozeně pigmentované černé oči, zatímco v experimentech u laboratorních potkanů jsou oči červené. Pigment v očích zabraňuje nadměrnému průchodu světla a jeho rozptylu na sítnici, kde může poškozovat světločivé buňky. Je tedy možné, že při vystavování albinotických potkanů vyšším intenzitám osvětlení dochází k degeneraci sítnice.^{9,10}

V Kanadě provedl tým výzkumníků experiment, jehož cílem bylo objasnit rozdíly v ostrosti zrakového vnímání u různých kmenů potkanů. Pro tento výzkum byl využit test, který se nazývá *visual water task*. Jedná se o box lichoběžníkového tvaru naplněný vodou se širší stranou rozdělenou neprůhlednou stěnou na dvě části. Z užší strany boxu je vypouštěn potkan, který má za úkol najít únikovou plošinu, která je jen v jedné komoře. V tomto testu se sleduje, za jak dlouhou dobu zvířata naleznou plošinu a dostanou se z vody. Z výsledků experimentu nebyl zjištěn takřka žádný rozdíl mezi potkany divokými a laboratorními kmeny potkanů s pigmentovanými očima, jako jsou například Long Evans. Signifikantní rozdíl byl zjištěn při srovnání potkanů s pigmentovanými očima a potkanů albinotické formy, jako jsou kmeny Wistar či Sprague Dawley.⁵¹

Tendenci poškozování zraku způsobenou osvětlením potvrzuje výzkum, ve kterém byli albinotičtí potkani ustájeni za stálého osvětlení o intenzitě 2600 lux, kterým byly průběžně měřeny reakce oka pomocí elektroretinografu. Po šesti dnech pod stálým osvětlením neměli potkani na elektroretinografu takřka žádnou odezvu.¹⁰

Vliv zrakového vjemu také podporuje výzkum, provedený na univerzitě v Toyoake, který se zabývá porovnáním ušlé dráhy a času v otevřených ramenech v EPM, které mělo různé barvy stěn, a to průhledné, průhledné zbarvené modře, bílé a černé. Experimentem bylo zjištěno, že potkani trávili signifikantně více času v uzavřených ramenech bílé a černé barvy nežli průhledné. Na dráhu barva stěn vliv neměla.⁵²

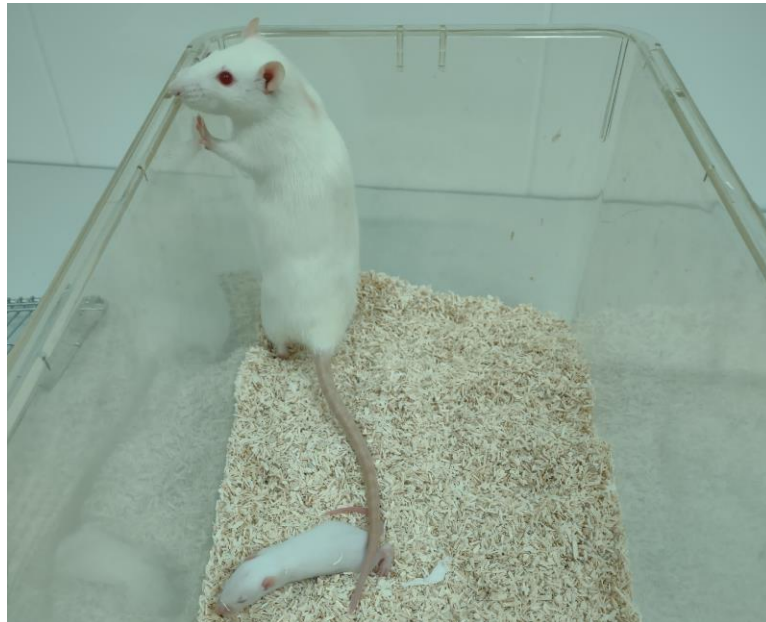
3.4 Charakteristika zkoumaného vzorku

Potkan (*Rattus norvegicus*) patří do rodu *Rattus*, je to poměrně velký myšovitý hlodavec. V dospělosti dosahují hmotnosti 150-500 g a samice jsou až o třetinu menší než samci. Pohlavní dospělost nastává v 2.–3. měsíci. Řadí se mezi kosmopolitně, synantropně rozšířené živočichy, preferují spíše vlhčí prostředí, proto se často zdržují podél vodních toků, kde si hloubí nory. Žijí ve velkých koloniích čítajících několik desítek jedinců. Samice rodí 3-7 krát za rok, březost trvá 21-24 dnů a ve vrhu se rodí 5-15 mláďat, která jsou slepá, neosrstěná, a kojena jsou přibližně 3 týdny. Odstav od matky nastává přibližně v měsíci věku. Potkani patří mezi všežravce, konzumují semena, traviny, obiloviny, zeleninu, ale i hmyz a maso. Jsou považováni za škůdce a vektor různých chorob a parazitů. V 50. letech 20. století začali být využíváni pro laboratorní výzkum, a to především kvůli snadnému chovu (malé rozměry, krátká doba březosti, vysoký počet mláďat ve vrhu) a vysoké inteligenci. Šlechtěním bylo dosaženo mnoha barevných variant, které se rychle staly chovatelsky velmi populární. Laboratorní potkan je považován za samostatný poddruh – potkan domácí (*Rattus norvegicus domestica*).⁵³⁻⁵⁵

Potkan je často používaným zvířetem v pokusech z několika důvodů. Z potkanů se stal modelový organismus, který je intenzivně využíván v mnoha výzkumech, a jeho využití tedy nabízí možnost širokého srovnání s výsledky jiných podobných pokusů a studií. Dalším důvodem je že myši, potkani a prasata jsou člověku fyziologicky a imunologicky podobní a proto jsou vhodné k translačním výzkumům. Bylo vyšlechtěno mnoho linií laboratorních potkanů sloužících ke specifickým výzkumům, každá linie ale nese predispozice k různým onemocněním. V laboratořích jsou nejčastěji využíváni bílí potkani kmene Wistar. Dalšími kmeny potkanů s bílým zbarvením jsou Sprague Dawley, Lewis a další. Využívány jsou také kmeny pigmentovaných potkanů, například Long Evans, Brown Norway a další.^{56,57}

3.4.1 Wistar

Potkani kmene Wistar (*Obrázek 8*) jsou albíni, mají tedy bílé zbarvení s pigmentovanými očima. Byli vyšlechtěni v roce 1906 v ústavu biologie a anatomie Wistar ve Philadelphii s cílem snížit náchylnost k přenášení chorob a pokusit se nalézt alternativu k bílým laboratorním myším, jejichž využití v některých výzkumech bylo složité. Například při zkoumání jednotlivých částí mozku je u myši kvůli malé velikosti mozku a nedostatku tkáně složité tyto struktury v mozku lokalizovat a následně analyzovat. Z toho pohledu bylo přínosné získat podobný unifikovaný organismus s většími rozměry. V současné době jsou potkani kmene Wistar jedním z nejpoužívanějších laboratorních kmenů potkana v experimentální vědě. Z tohoto kmene byly později vyšlechtěny další laboratorní kmeny potkanů, například Long Evans, Sprague Dawley, Lewis a další.^{57,58}



Obrázek 8: potkan kmene Wistar

3.4.2 Long Evans

Potkani kmene Long Evans (*Obrázek 9*) jsou černobíle zbarvení s pigmentovanými očima. Tento kmen byl vyšlechtěn doktorem Longem a Evansem v roce 1915. Vznik tohoto kmene je výsledkem několikerého křížení samic kmene Wistar se šedým samcem „divokého“ potkana. Jsou využíváni k behaviorálním pokusům.⁵⁹



Obrázek 9: potkani kmene Long Evans

4 Metodika

4.1 Zvířata

Experimenty byly provedeny na laboratorních potkanech. Jejich věk, hmotnost, pohlaví, kmen a počet je specifikován v tabulce 1. Celkový počet zvířat byl 204. Zvířata pochází z vlastního odchovu Národního ústavu duševního zdraví nebo z velkochovů VELAZ s.r.o. a Charles River.

Všechna zvířata byla ustájena v chovných místnostech v Národním ústavu duševního zdraví za stálých podmínek. V místnostech se udržuje teplota 21-22 °C a vlhkost 60 % se světelným režimem 12 hodin světlo/ 12 hodin tma. Zvířata měla neomezený přístup k vodě a krmení. Všechna zvířata byla ustájena ve skupinách alespoň po dvou v jedné ubikaci, toto uspořádání bylo stálé.

Tabulka 1 počet zvířat v jednotlivých skupinách

	10 lux	75 lux	150 lux	250 lux	500 lux
Adultní samci kmene Wistar staří 3-3,5 měsíce	15	13	14	14	14
Adolescentní samci kmene Wistar staří 1-1,5 měsíce	6	6	X	X	6
Seniorní samci kmene Wistar staří více než 5,5 měsíce	8	10	X	X	9
samice kmene Wistar staré 3-3,5 měsíce	7	7	X	X	7
1 den handlování potkani kmene Wistar staří 3-3,5 měsíce	7	7	X	X	7
1 týden handlování potkani kmene Wistar staří 3-3,5 měsíce	6	6	X	X	6
Adultní samci kmene Long Evans staří 3-3,5 měsíce	9	11	X	X	9

4.2 Design experimentů

Křížové bludiště bylo vyrobeno z černého plastu, samotné bludiště bylo na konstrukci umístěno ve výšce 1 metr od země. Sestávalo ze čtyř ramen spojených do tvaru kříže, dvě protilehlá ramena byla otevřená a zbylá dvě uzavřená (opatřená zástěnami ze stran). Každé rameno bylo 50 cm dlouhé a 12 cm široké, zástěny na uzavřených ramenech byly 40 cm vysoké. Pro sledování potkanů kmene Long Evans byla do bludiště vložena bílá plastová vložka pro dosažení vhodného kontrastu zvířete s podkladem (Obrázek 7).

Měření probíhalo ve stejnou denní dobu a to mezi 9:00-14:00 hod. Každé zvíře bylo v experimentu pouze jednou. Na začátku experimentu bylo zvíře vloženo do středu bludiště. Doba, po kterou bylo sledováno ve vyvýšeném křížovém bludišti, byla 5 minut. Před nahráváním dalšího zvířete byla aparatura vymyta a vytřena 30 % ethanolem. V každém

pokusném dni byli testováni potkani z různých skupin osvětlení, kvůli zamezení případnému ovlivnění experimentu vnějšími faktory.

Hladiny osvitu pro pilotní studii (Experiment 1) byly stanoveny na 10 lux, 75 lux, 150 lux, 250 lux, 500 lux. Tyto hladiny byly zvoleny na základě výsledků v ostatních publikovaných studiích a na základě zkušeností pracovníků z Národního ústavu duševního zdraví. Hodnota 75 lux je zde běžně používána v experimentech a vedlejším cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda se jedná o vhodně zvolenou hladinu osvětlení. Pro ostatní experimenty byly použity pouze hladiny 10 lux, 75 lux a 500 lux, které se mezi sebou nejvíce lišily. Všechna měření probíhala ve stejné pozorovací místnosti (*Obrázek 31*), ve které je nainstalováno rovnoměrné osvětlení s kamerou umístěnou uprostřed (*Obrázek 32*). Světlo bylo vždy nastaveno na přesnou hladinu pomocí luxmetru, který byl umístěn středu bludiště (*Obrázek 33*).

K nahrávání a vyhodnocování videí byl použit program Ethovision XT 16 (Noldus, Nizozemsko), ve kterém byly zaznamenávány tyto parametry: uběhnutá vzdálenost, čas strávený v otevřených ramenech bludiště. Na obrázku 34 je vidět, jakým způsobem program detekuje zvíře.

Sledovanými parametry byly čas strávený v otevřených ramenech EPM, který odráží míru anxiety, dráha, která odráží aktivitu a rychlost.

4.3 Experiment

4.3.1 Experiment 1 – vliv osvětlení

Pilotní experiment měl za úkol testovat chování dospělých samců kmene Wistar v EPM při různých intenzitách osvětlení. Pohlaví a věk byly zvoleny tak, aby odpovídaly podobným experimentům, které byly provedeny, a tedy bylo možné experimenty mezi sebou porovnávat. Bylo použito 70 samců z toho 15 ve skupině s osvitem 10 lux, 13 ve skupině s osvitem 75 lux, 14 ve skupině s osvitem 150 lux, 14 ve skupině s osvitem 250 lux a 14 ve skupině s osvitem 500 lux. Potkani byli staří 2,5-3 měsíce a vážili 290-390 g. Skupiny s osvitem 10 lux, 75 lux a 500 lux byly použity jako kontrolní skupina pro Experimenty 2-5.

4.3.2 Experiment 2 - věk

Další část experimentu je zaměřena na vliv stáří testovaných potkanů. V Experimentu 2 bylo porovnáváno chování adultních samců z Experimentu 1 s adolescentními (mladými) a seniorními (starými) samci kmene Wistar. Použita byla mláďata těsně po odstavu od matky, a to 1-2 týdny po odstavu, aby měla čas si navyknout na separaci od matky. Zároveň nebyla použita zvířata, která by byla ještě u matky, protože by přítomnost matky v ubikaci mladých jedinců mohla ovlivňovat experiment. Bylo použito 18 adolescentních samců, z toho 6 ve skupině s osvitem 10 lux, 6 ve skupině s osvitem 75 lux a 6 ve skupině s osvitem 500 lux, tito jedinci byli 1-1,5 měsíce staří o hmotnosti 90-170 g. Dále byli do experimentu 2 zařazeni ještě seniorní samci kmene Wistar ve věku více než 5,5 měsíce a hmotnosti 480-590 g, a to v počtu 27 zvířat, z toho 8 ve skupině s osvitem 10 lux, 9 ve skupině s osvitem 75 lux a 10 ve skupině s osvitem 500 lux.

4.3.3 Experiment 3 - pohlaví

V poslední době se laboratorní experimenty zaměřují vedle samců i na samice, a to z důvodu hormonálních změn v průběhu estrálního cyklu u samic. Bylo ale zjištěno, že i samci jsou ovlivněni změnami v rozdílném množství vylučování testosteronu v průběhu dne. Chování samců a samic může být odlišné a v poslední době se tedy klade mnohem větší důraz na zařazení samic do experimentů, abychom získali komplexní a nezkrácený pohled na danou problematiku. V Experimentu 3 proto jsou adultní samci z Experimentu 1 porovnáváni s adultními samicemi kmene Wistar o hmotnosti 190-260 g a stáří 2,5-3 měsíce. Použito bylo 21 samic, z toho 7 ve skupině s osvětlením 10 lux, 7 ve skupině s osvětlením 75 lux a 7 ve skupině s osvětlením 500 lux.

4.3.4 Experiment 4 – handling

Dalším faktorem, který by mohl mít vliv na chování zvířat je handling. Zvířata vystavená handlingu si navyknou na experimentátora a mohla by být v průběhu testování klidnější. Proto byli adultní samci z Experimentu 1, kteří před experimentem nebyli handlováni, porovnáváni s dospělými samci kmene Wistar starými 2,5-3 měsíce o hmotnosti 300-380 g, kteří před pokusem prošli handlingem. Byly vytvořeny dvě skupiny s odlišným designem handlingu. Jedinci z první skupiny byli handlováni pouze jediný den před pokusem a to tak, že každé zvíře bylo vzato na klín do ručníku, aby mělo možnost úkrytu a po dobu 5 minut bylo hlazeno a zvedáno. U druhé skupiny zvířat handling probíhal týden, a to od pondělí do čtvrtka a poté v pondělí následujícího týdne, v úterý pak proběhlo testování v EPM. Každé zvíře bylo denně po dobu 5 minut hlazeno a zvedáno, aby si zvyklo na manipulaci. Pro skupinu 1 bylo použito 21 zvířat z toho 7 pro skupinu s osvětlením 10 lux, 7 pro skupinu s osvětlením 75 lux a 7 pro skupinu s osvětlením 500 lux, pro skupinu 2 bylo použito 18 zvířat z toho 6 pro skupinu s osvětlením 10 lux, 6 pro skupinu s osvětlením 75 lux a 6 pro skupinu s osvětlením 500 lux.

4.3.5 Experiment 5 – kmen

Literatura uvádí, že zrakové vjemy mohou být zásadní pro chování testovaných zvířat v EPM. Vzhledem k tomu, že potkani kmene Wistar mají málo pigmentované oči a tím pádem častěji trpí na zrakové vady, tak se domnívám, že by mohl být rozdíl v chování oproti potkanům kmene Long Evans, kteří se také standardně používají v laboratorní praxi, ale mají oči pigmentované, je u nich tedy menší riziko vzniku poruch zraku způsobených nadměrným osvětlením. Proto je další experiment zaměřen na porovnání těchto dvou kmenů. Pro tento experiment bylo použito 29 dospělých samců kmene Long Evans o hmotnosti 300-400 g a stáří 2,5-3 měsíce, z toho 9 ve skupině s osvětlením 10 lux, 11 ve skupině s osvětlením 75 lux a 9 ve skupině s osvětlením 500 lux.

4.4 Statistika

Data byla analyzována v programu Prism v.8 (GraphPad, San Diego, USA). Hladina významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$. Data byla podrobena testu normality, a to pomocí Kolmogorovova-Smirnovova testu, a byly odstraněny odlehlé hodnoty pomocí *robust regression and outlier removal*, ROUT, Q = 1 %. V čase v otevřených ramenech byli odstraněni dva outlieři u adultních samců při 10 luxech, jeden u adultních samců při 150 luxech, jeden u kmene Long Evans při 75 lux, jeden u potkanů handlovaných 1 den při 75 lux a dva u potkanů handlovaných 1 den při 500 lux. V dráze nebyli žádní outlieři. V dráze v otevřených ramenech byl vyloučen jeden outlier u adultních samců při 150 luxech, dva u kmene Long Evans při 75 luxech, jeden u potkanů handlovaných den při 10 luxech a jeden u potkanů handlovaných 1 den u 500 lux. U rychlosti v otevřených ramenech byl vyloučen jeden outlier u adultních samců při 75 lux a jeden outlier u samců handlovaných 1 den při 500 lux.

K analýze vlivu intenzity osvětlení na behaviorální parametry dospělých potkanů kmene Wistar (Experiment 1) byla použita analýza rozptylu (ANOVA) a Tukeyho post hoc test.

Chování dospělých samců potkanů kmene Wistar z Experimentu 1 bylo navíc porovnáváno s chováním dalších skupin potkanů (dle věku, kmene, pohlaví, přivyknutí na experimentátora formou handlingu = Experiment 2-5) za vybraných intenzit osvětlení. K těmto analýzám byla použita dvoucestná ANOVA a Tukeyho post hoc test (faktory: intenzita osvětlení a druhá studovaná nezávislá proměnná, tedy věk, kmen, pohlaví nebo handling).

Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Body v grafech znázorňují jednotlivé naměřené hodnoty.

5 Výsledky

V tabulce 2 níže je shrnutí všech signifikantních výsledků z experimentů.

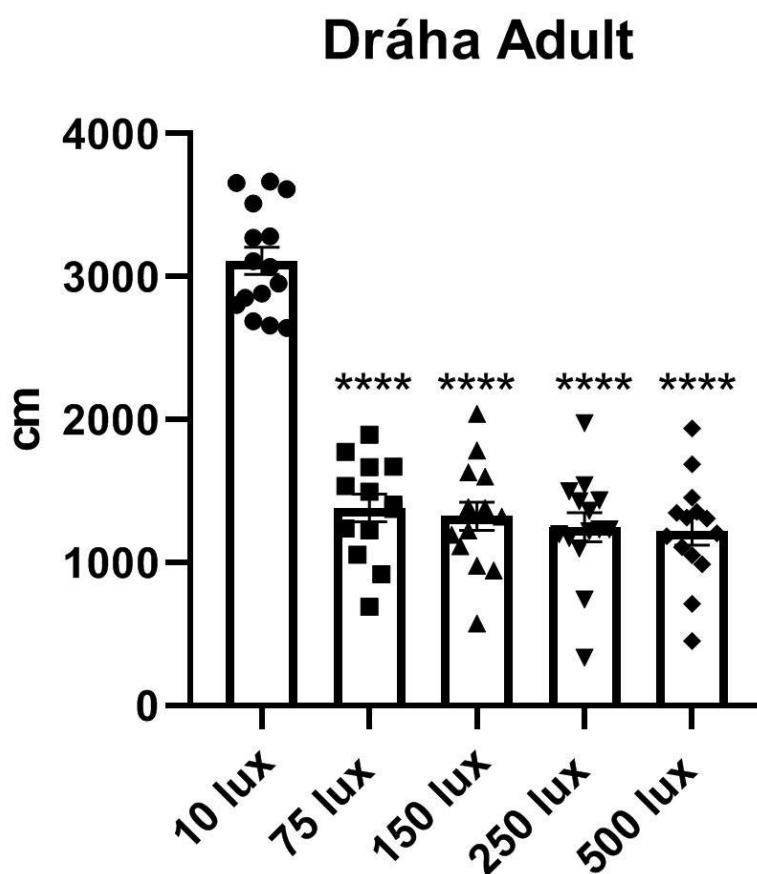
Tabulka 2: souhrn signifikantních výsledků z post-hoc testů

	Celková dráha	Dráha v otevřených ramenech	Čas v otevřených ramenech	Rychlost v otevřených ramenech
Samci Experiment 1	10 lux vs. ostatní hladiny	10 lux vs. ostatní hladiny	X	10 lux vs. ostatní hladiny
Věk Experiment 2	u všech skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux 10 lux adolescent vs. 10 lux adult	u skupin adolescent a adult 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux	adolescent 10x500 adolescent 10 x adult 10	u všech skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux
Pohlaví Experiment 3	u obou skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux	u obou skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux samci 10 lux vs. samice 10 lux	samci 10 lux vs. samice 10 lux samci 75 lux vs. samice 75 lux	u obou skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux
Handling Experiment 4	u všech skupin 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux	bez handlingu 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux bez handlingu 10 lux vs. handling 1 den 10 lux bez handlingu 10 lux vs. 1 týden handling 10 lux	X	bez handlingu 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux
Kmen Experiment 5	Wistar 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux Wistar 10 lux vs. Long Evans 10 lux Wistar 75 lux vs. Long Evans 75 lux Wistar 500 lux x Long Evans 500 lux	Wistar 10 x 75 a 10 x 500 Long Evans 10 x 75	Long Evans 10 lux vs. 75 lux	Wistar 10 lux vs. 75 lux a 10 lux vs. 500 lux

5.1 Experiment 1 – vliv osvětlení

5.1.1 Celková dráha

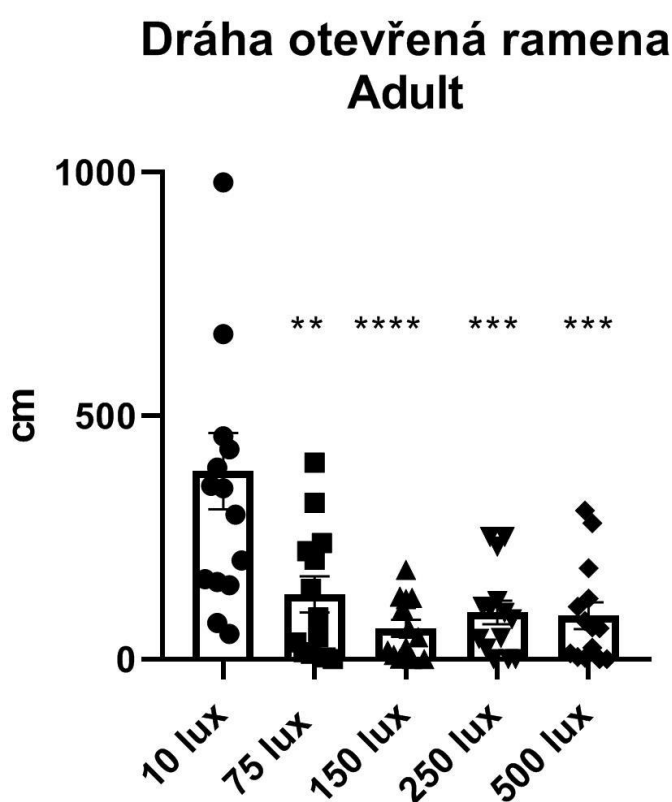
Analýza prokázala statisticky signifikantní vliv intenzity osvětlení na celkovou dráhu ušlou dospělými samci potkana Wistar v EPM ($F_{(4, 65)} = 71,90$, $p < 0,0001$). Statistická analýza prokázala signifikantní rozdíl mezi adultními samci, kteří úlohu prováděli za nejnižšího osvětlení, tedy 10 lux kteří průměrně ušli 3110,05 cm a všemi ostatními, tedy 75 lux, kteří průměrně ušli 1381,16 cm, 150 lux, kteří průměrně ušli 1323,6 cm, 250 lux, kteří průměrně ušli 1247,28 cm, 500 lux, kteří průměrně ušli 1221,9 cm ($p < 0,0001$ pro všechna párová porovnání). Potkani testovaní při osvětlení 10 lux měli vyšší aktivitu než ostatní skupiny (Obrázek 10).



Obrázek 10: Dráha ušlá adultními samci v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), **** $p < 0,0001$ vs. 10lux, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.1.2 Dráha v otevřených ramenech

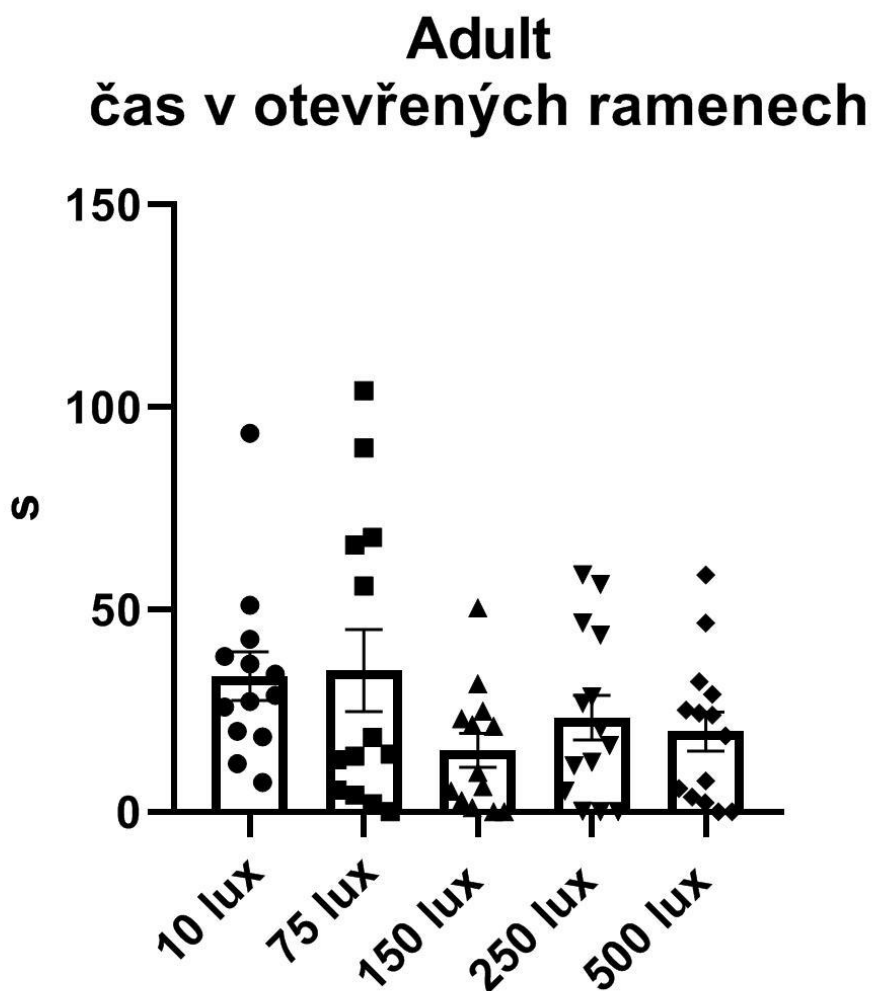
ANOVA prokázala signifikantní vliv intenzity osvětlení na dráhu ušlou zvířaty v otevřených ramenech bludiště ($F_{(4, 64)} = 9,109, p < 0,0001$). Vyšel signifikantní rozdíl mezi potkany při 10 lux, kteří průměrně ušli 386,157 cm a při všech ostatních intenzitách osvětlení, tedy při 75 luxech byla průměrná dráha 133,175 cm, při 150 luxech byla 63,6338 cm, při 250 luxech byla 96,5026 cm a při 500 luxech byla dráha 89,7024 cm. Přičemž při 10 lux potkani ušli větší dráhu v otevřených ramenech bludiště (75 lux vs. 10 lux $p = 0,0016$, 250 lux vs. 10 lux $p = 0,0002$, 150 lux i 500 lux vs. 10 lux $p = 0,0001$). Dráha v otevřených ramenech tedy vykazuje obdobný trend jako celková uběhnutá dráha (Obrázek 11).



Obrázek 11: Dráha ušlá adultními samci v otevřených ramenech EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. 10lux, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.1.3 Čas v otevřených ramenech

Analýza neprokázala ($F_{(4,62)} = 1,759$, $p=0,1485$) signifikantní vliv intenzity osvětlení na čas strávený dospělými potkany kmene Wistar v otevřených ramenech EPM (Obrázek 12).

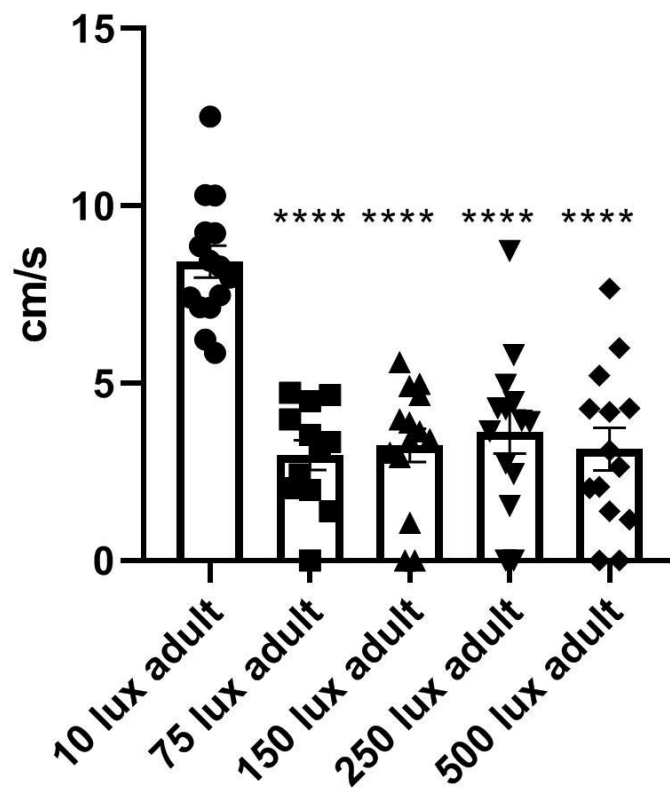


Obrázek 12: Čas, který strávili adultní samci v otevřených ramenech EPM za různých intenzit osvětlení. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM).

5.1.4 Rychlost v otevřených ramenech

ANOVA prokázala signifikantní vliv intenzity osvětlení na rychlost zvířat v otevřených ramenech EPM ($F_{(4, 64)} = 21,21, p < 0,0001$). Při 10 lux se zvířata pohybovala v otevřených ramenech rychleji (jejich průměrná rychlost byla 8,43053 cm/s), než při ostatních světelných intenzitách ($p < 0,0001$ pro vše), průměrná rychlost při 75 luxech byla 2,97864 cm/s, při 150 luxech byla 3,25137 cm/s, při 250 luxech byla 3,6248 cm/s a při 500 luxech byla 3,14743 cm/s. Rychlost v otevřených ramenech kopíruje trend celkové dráhy a dráhy v otevřených ramenech (Obrázek 13).

Rychlost v otevřených ramenech Adult



Obrázek 13: Rychlost adultních samců v otevřených ramenech v EPM. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), **** $p < 0,0001$ vs. 10 lux, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

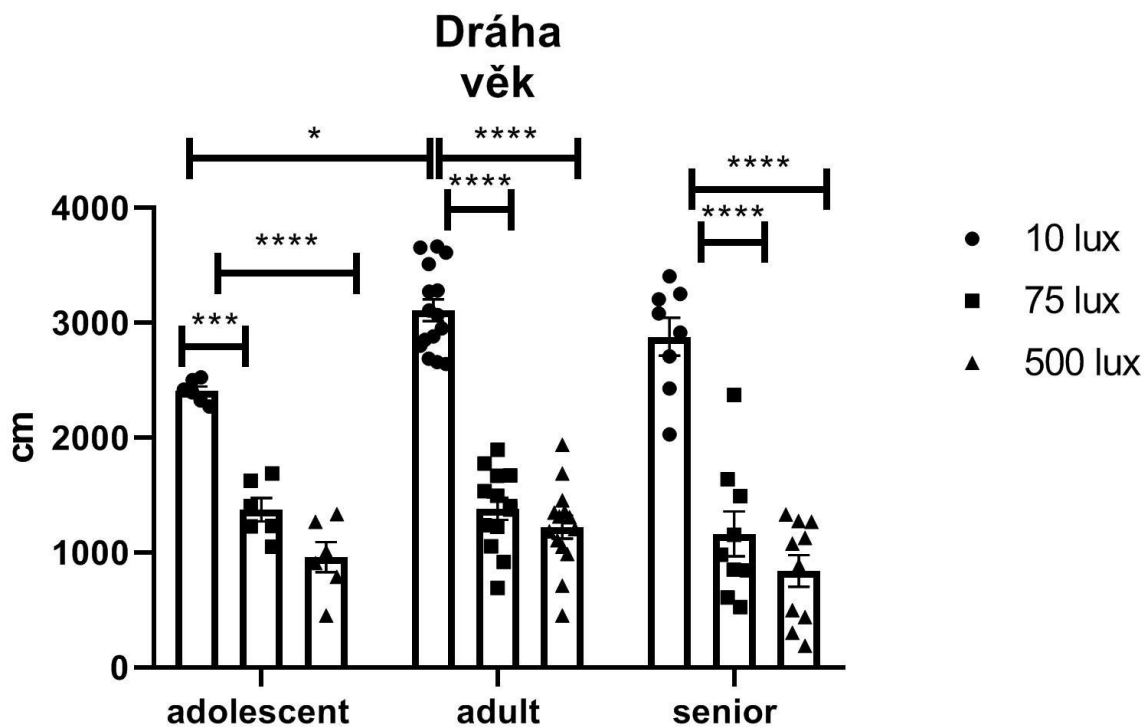
5.2 Experiment 2 - věk

5.2.1 Celková dráha

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv obou studovaných faktorů (věk zvířat: $F(2, 78) = 6,230$, $p = 0,0031$; osvětlení: $F(2, 78) = 152$, $p < 0,0001$).

Tukeyho post-hoc test vlivu osvětlení na dráhu adolescentních a seniorních zvířat ukázal obdobnou závislost jako u adultních jedinců. Při 75 luxech adultní ($p < 0,0001$) seniorní ($p < 0,0001$) i adolescentní ($p = 0,0006$) zvířata ušla menší dráhu, než při 10 luxech. Obdobně i při 500 luxech seniorní ($p < 0,0001$) i adolescentní ($p < 0,0001$) zvířata ušla menší dráhu než při 10 luxech (Obrázek 14).

Porovnáním dráhy ušlé jednotlivými věkovými skupinami za daného osvětlení navíc ukázal signifikantní rozdíl, mezi adolescenty a adulty, při osvětlení 10 lux ušla průměrně 2405,84 cm adolescentní zvířata, zatímco adultní ušla průměrnou dráhu 3110,05 cm ($p = 0,0111$).

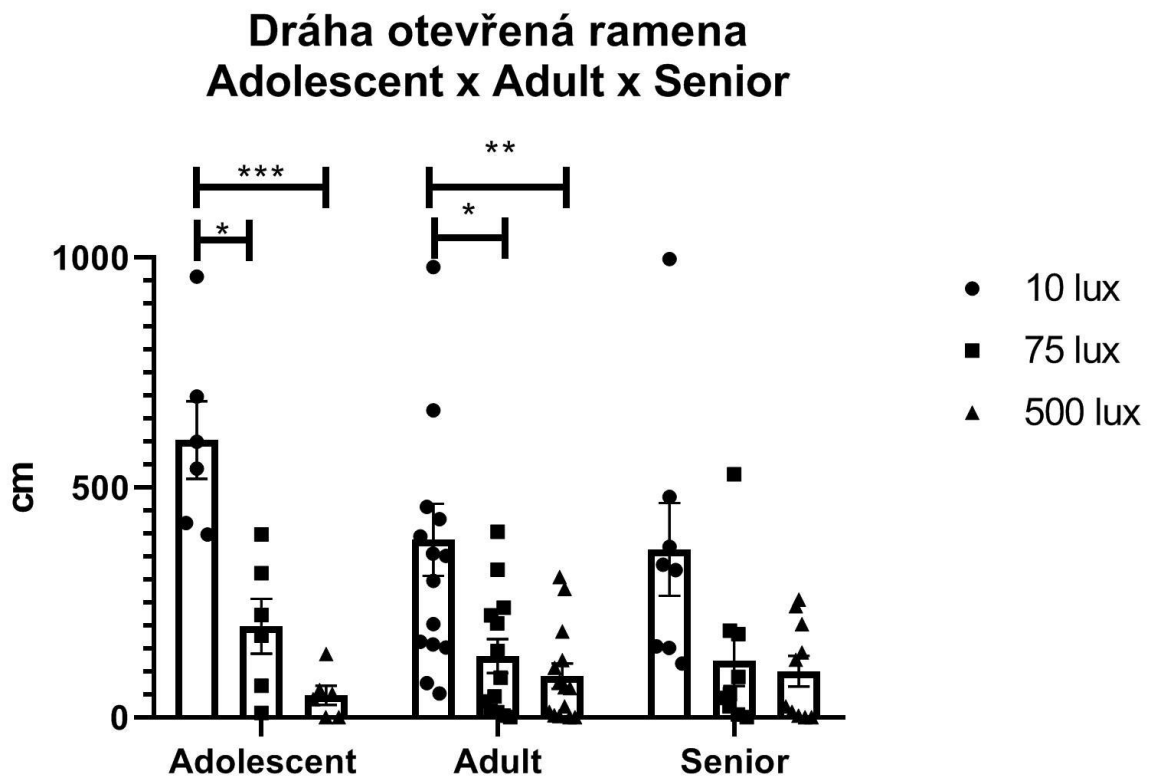


Obrázek 14: Dráha ušlá adolescentními, adultními a seniorními samci v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.2.2 Dráha v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv osvětlení na dráhu ušlou v otevřených ramenech EPM ($F_{(2, 78)} = 27,05$, $p < 0,0001$), zatímco efekt věku prokázán nebyl.

Analýza vlivu osvětlení na dráhu v otevřených ramenech ukázala signifikantní rozdíly u adolescentních a adultních zvířat. Při 75 luxech adultní ($p = 0,0221$) i adolescentní ($p=0,0131$) zvířata ušla menší dráhu, než při 10 luxech. Obdobně i při 500 luxech adultní ($p=0,0025$) i adolescentní ($p = 0,0001$) zvířata ušla menší dráhu než při 10 luxech. Oproti tomu u seniorních zvířat nebyl prokázán signifikantní rozdíl v ušlé dráze v otevřených ramenech EPM za různých světelných intenzit (Obrázek 15).



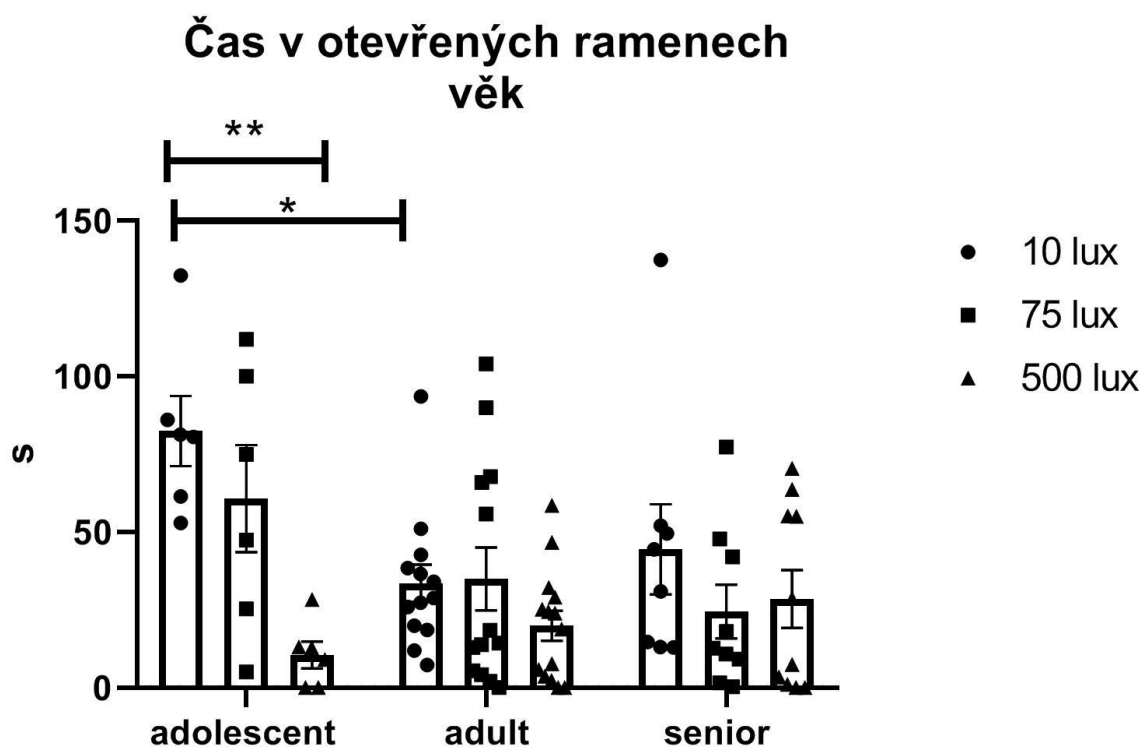
Obrázek 15: Dráha ušlá adolescentními, adultními a seniorními samci v otevřených ramenech EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.2.3 Čas v otevřených ramenech

Statistická analýza prokázala signifikantní efekt věku zvířat (ANOVA $F_{(2, 76)} = 3,637$; $p=0,0310$), intenzity osvětlení ($F_{(2, 76)} = 8,801$; $p=0,0004$) a jejich interakce ($F_{(4, 76)} = 2,953$; $p=0,0252$).

Analýza zaměřená na vliv intenzit osvětlení na chování jednotlivých věkových skupin prokázala, že mladá zvířata vykazují rozdílný čas v otevřených ramenech při jednotlivých světelných intenzitách. Konkrétně při 500 lux byl u mladých pozorován kratší čas v otevřených ramenech, než při 10 lux ($p = 0,0017$). Oproti tomu u starých zvířat, podobně jako u adultních, světelná intenzita sledovaný parametr neovlivnila.

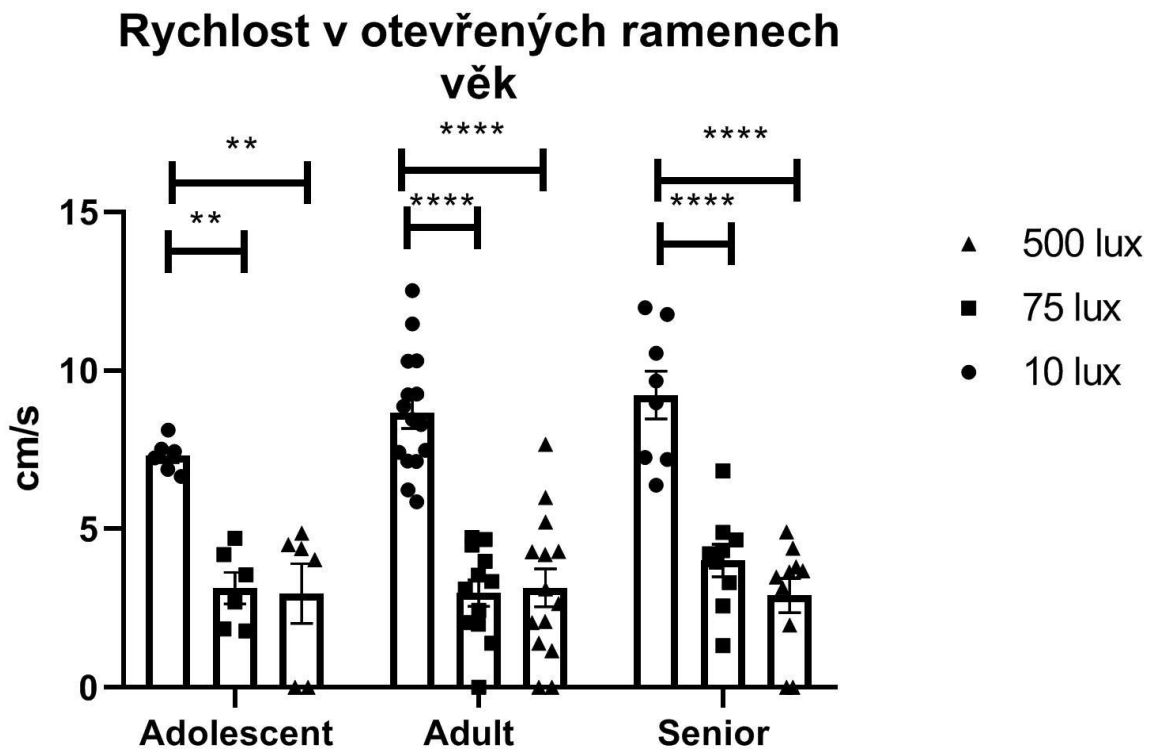
Porovnání věkových skupin za konstantního osvětlení ukázalo, že při 10 lux trávili mladí potkani více času v otevřených ramenech než dospělí ($p = 0,0276$). Při zbývajících světelných intenzitách se chování různých věkových skupin potkanů mezi sebou nelišilo (Obrázek 16).



Obrázek 16: Čas, který strávili adolescentní, adultní a seniorní samci v otevřených ramenech EPM za různých intenzit osvětlení. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.2.4 Rychlost v otevřených ramenech

Porovnáním výsledků rychlosti v otevřených ramenech byl u všech skupin zjištěn vliv intenzity osvětlení ($F_{(2, 77)} = 70,25$, $p < 0,0001$), ale neprokázalo se, že by měl vliv věk potkanů. Analýza prokázala rozdíl mezi rychlostí v otevřených ramenech potkanů při 10 luxech a 75 luxech u adolescentních ($p = 0,0044$), adultních ($p < 0,0001$) i seniorních ($p < 0,0001$) zvířat, obdobná závislost je i u rozdílu mezi rychlostí v otevřených ramenech při 10 luxech a 500 luxech u adolescentních ($p = 0,0026$), adultních ($p < 0,0001$) a seniorních ($p < 0,0001$) zvířat. Zvířata při 10 luxech běhala v otevřených ramenech signifikantně rychleji než při 75 a 500 luxech (Obrázek 17).



Obrázek 17: Rychlost adolescentních, adultních a seniorních samců v otevřených ramenech v EPM. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

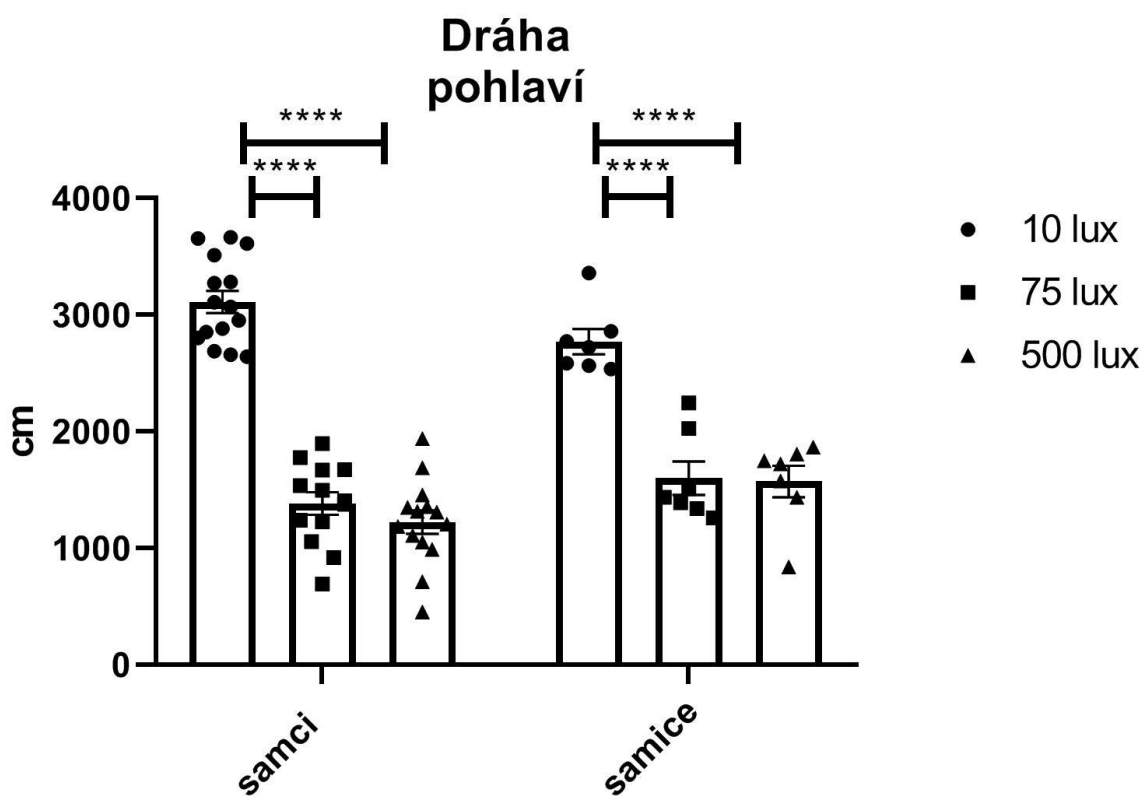
5.3 Experiment 3 - pohlaví

5.3.1 Celková dráha

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv osvětlení ($F_{(2, 57)} = 111, p < 0,0001$) a interakci ($F_{(2, 57)} = 4,946, p = 0,0105$).

Analýza vlivu osvětlení na dráhu samic ukázala obdobnou závislost dráhy na osvětlení jako u samců. Tedy při 75 luxech ($p < 0,0001$) i 500 luxech ($p < 0,0001$) samice uběhnou kratší vzdálenost, než při 10 luxech (Obrázek 18).

Analýza vlivu pohlaví na dráhu za daného osvětlení nezjistila signifikantní rozdíly mezi skupinami. Samci a samice se od sebe při daném osvětlení nelišili.



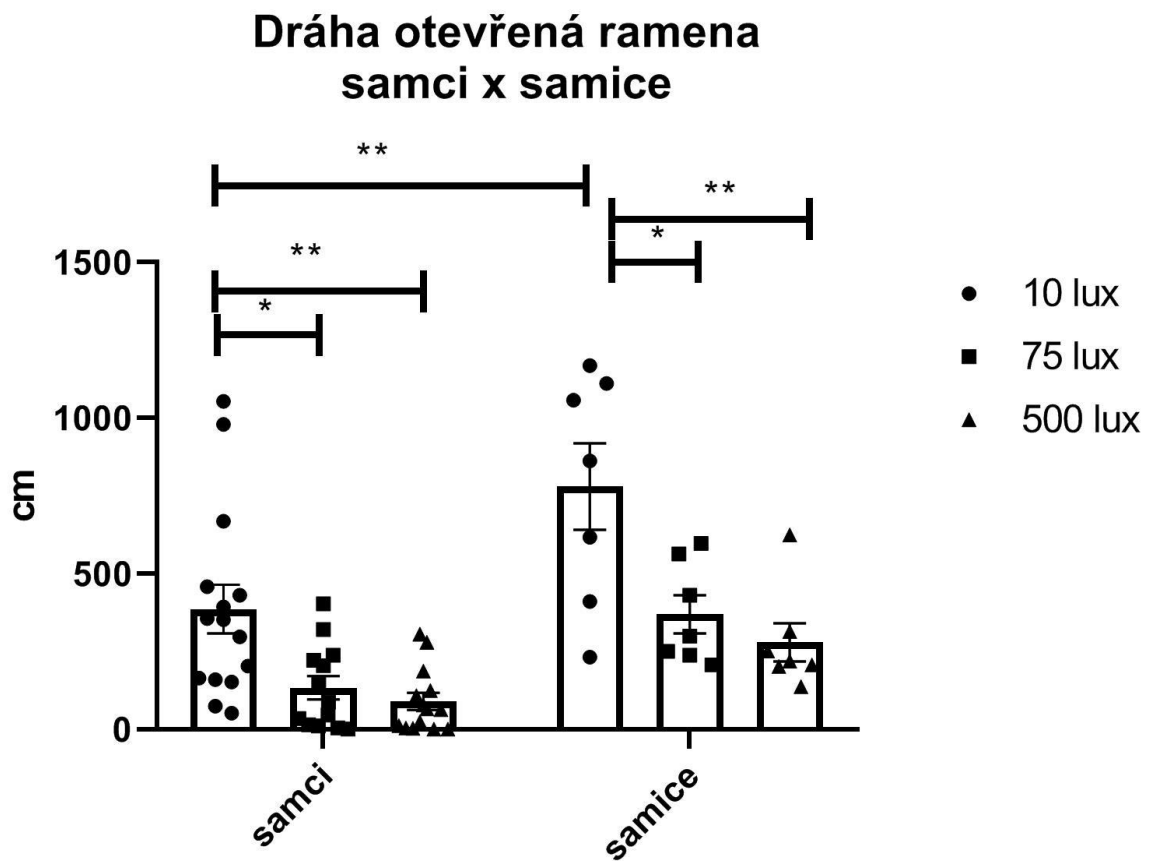
Obrázek 18: Dráha ušlá adultními samci a adultními samicemi v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), **** $p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.3.2 Dráha v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv obou studovaných faktorů (Pohlaví: $F_{(1, 57)} = 21,54$, $p < 0,0001$; Světlo: $F_{(2, 57)} = 17,74$, $p < 0,0001$).

Vliv osvětlení na dráhu v otevřených ramenech vyšel podobně jako u celkové dráhy. Vyšel signifikantní rozdíl mezi dráhou uběhnutou při 10 luxech a 75 luxech u samců ($p = 0,0404$) i samic ($p = 0,0117$), také mezi dráhou při 10 luxech a 500 luxech u samců ($p = 0,0078$) i samic ($p = 0,0011$). Samci i samice při 10 luxech ušli delší dráhu než při 75 a 500 luxech.

Oproti celkové dráze vyšel navíc rozdíl v dráze v otevřených ramenech mezi samci a samicemi při 10 luxech ($p = 0,0033$). Samice uběhly signifikantně delší dráhu (průměrně 779,6 cm) nežli samci (průměrně 386,157 cm). (Obrázek 19)



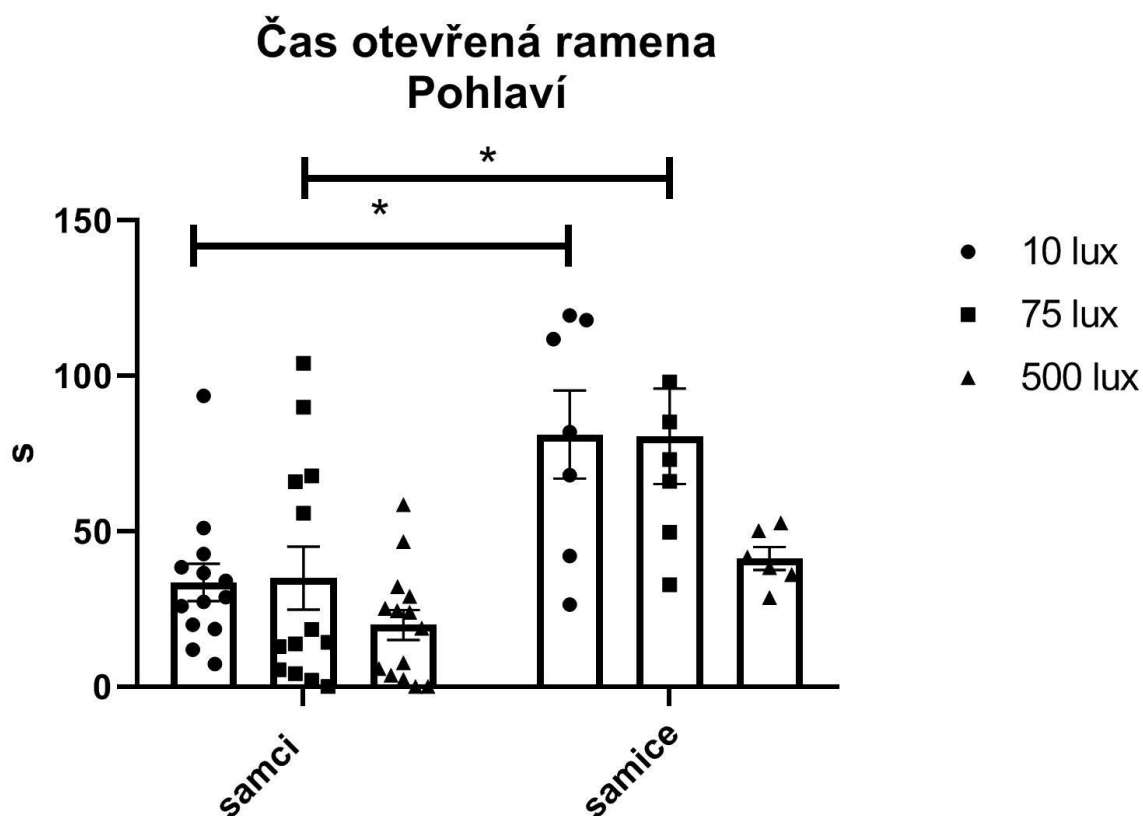
Obrázek 19: Dráha ušlá adultními samci a adultními samicemi v otevřených ramenech EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu .

5.3.3 Čas v otevřených ramenech

Statistická analýza prokázala signifikantní efekt pohlaví zvířat ($F_{(1, 54)} = 23,33$, $p < 0,0001$) a intenzity osvětlení ($F_{(2, 54)} = 5,045$, $p = 0,0098$).

Analýza vlivu osvětlení na chování samic vyšla stejně jako u samců. Ani u samic nebyl čas v otevřených ramenech EPM signifikantně ovlivněn osvětlením.

Při 10 luxech ($p = 0,0108$) i při 75 luxech ($p = 0,0164$) trávily samice více času v otevřených ramenech EPM než samci. Při 500 luxech byl také pozorován vyšší skupinový průměr času v otevřených ramenech u samic než u samců, rozdíl ale nedosáhl statistické signifikance (Obrázek 20).

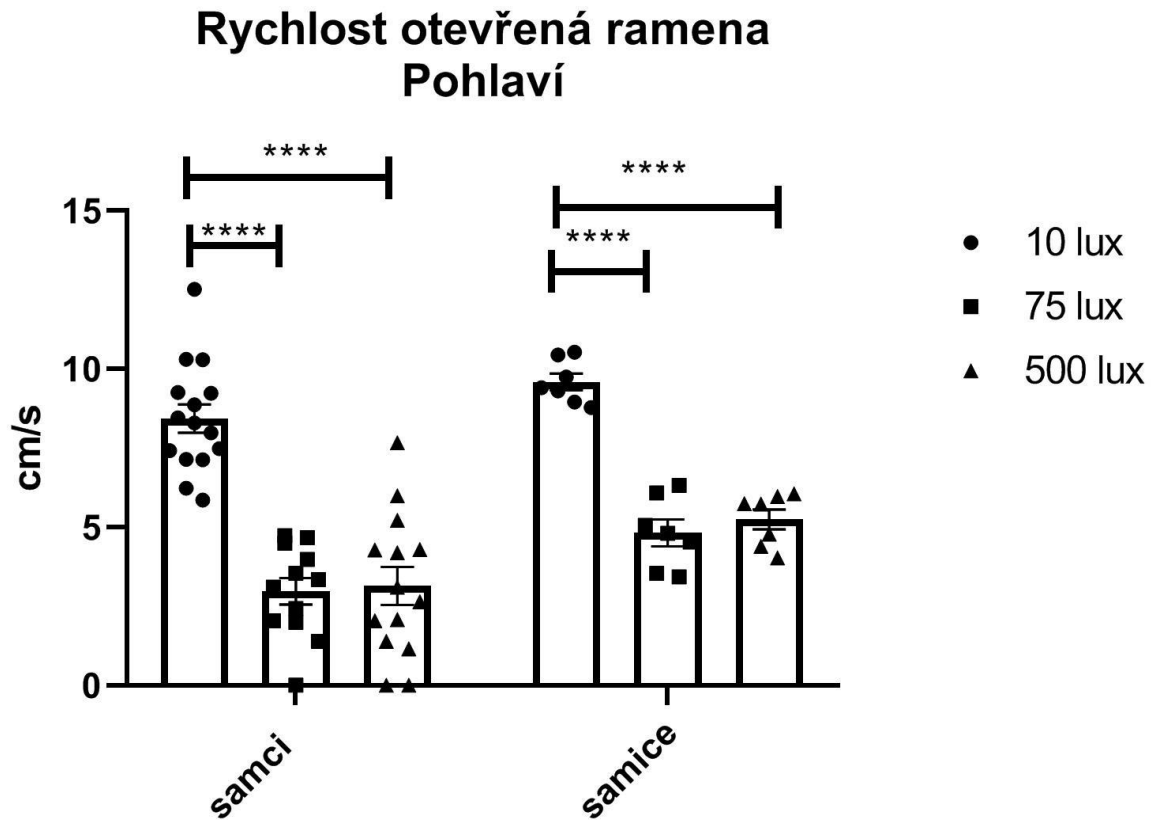


Obrázek 20: Čas, který strávili adultní samci a adultní samice v otevřených ramenech EPM za různých intenzit osvětlení. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.3.4 Rychlost v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv obou studovaných faktorů (Pohlaví $F_{(1, 56)} = 15,40$, $p = 0,0002$; Světlo $F_{(2, 56)} = 59,31$, $p < 0,0001$).

Rychlost v otevřených ramenech koreluje s celkovou dráhou potkanů, tedy vychází signifikantní rozdíl mezi rychlostí při 10 luxech a 75 luxech u samců ($p < 0,0001$) a samic ($p < 0,0001$) a při 10 luxech a 500 luxech a samců ($p < 0,0001$) i samic ($p < 0,0001$) (Obrázek 21).



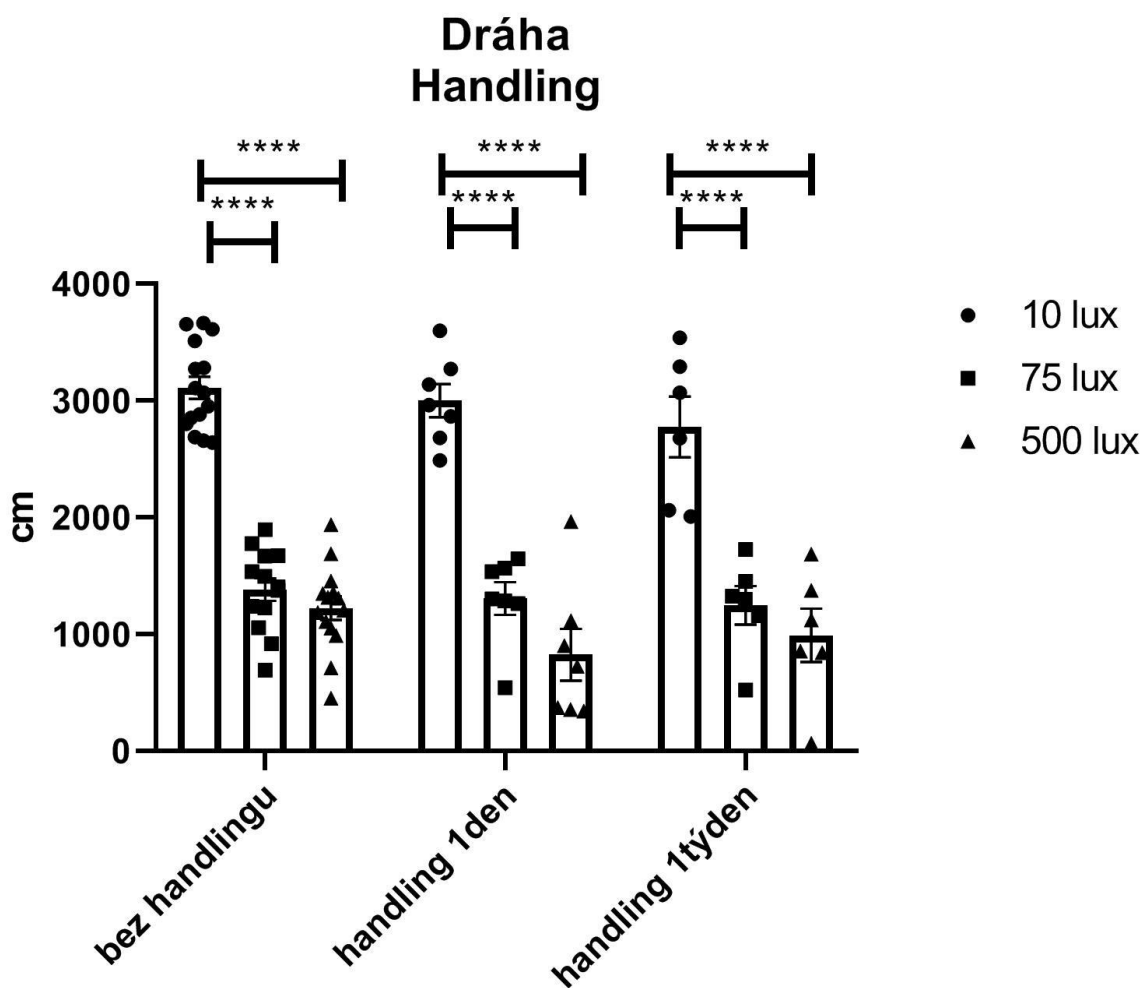
Obrázek 21: Rychlost adultních samců a adultních samic v otevřených ramenech v EPM. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), **** $p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.4 Experiment 4 - handling

5.4.1 Celková dráha

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv osvětlení ($F_{(2, 72)} = 142,1, p < 0,0001$).

Analýza vlivu osvětlení na dráhu u handlovaných zvířat den i týden prokázala podobnou závislost u všech skupin. Samci bez handlingu, handlovaní 1 den i 1 týden při 75 luxech ($p < 0,0001$) i 500 luxech ($p < 0,0001$) uběhli kratší dráhu, než při 10 luxech (Obrázek 22).



Obrázek 22: Dráha ušlá samci bez handlingu, handlovanými 1 den a handlovanými 1 týden v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), **** $p < 0,0001$,

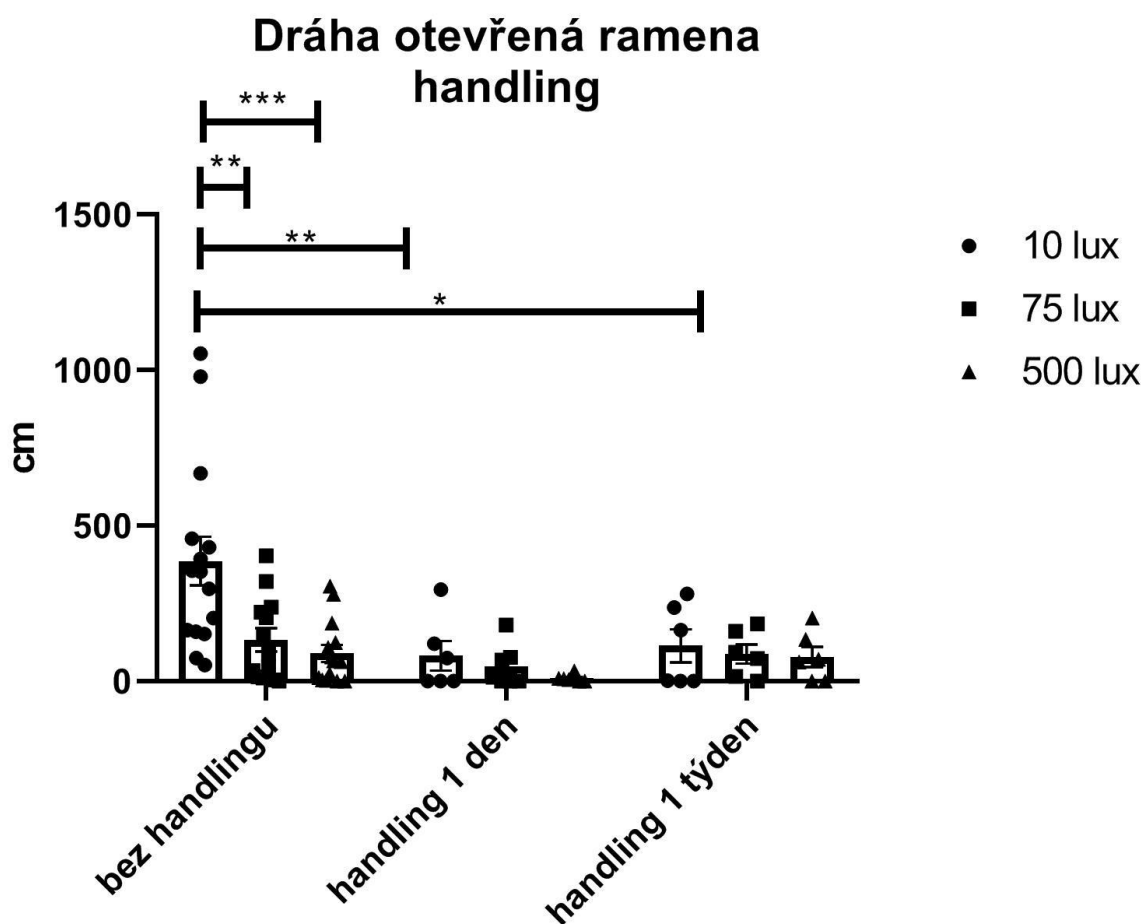
* = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.4.2 Dráha v otevřených ramenech

Statistická analýza prokázala signifikantní efekt handlingu u zvířat ($F_{(2, 70)} = 6,887$, $p=0,0019$) a intenzity osvětlení ($F_{(2, 70)} = 4,167$, $p=0,0195$).

Vliv intenzity osvětlení vyšel signifikantní pouze u zvířat, která neměla handling a to mezi 10 lux a 75 lux ($p=0,0037$) a mezi 10 lux a 500 lux ($p=0,0002$).

Signifikantně vyšel rozdíl mezi skupinami s handlingem a bez handlingu. A to mezi potkany při osvětlení 10 lux bez handlingu, ti ušli průměrně 386,157 cm a potkany 10 lux s handlingem 1 den, kteří ušli průměrně 81,7395 cm ($p=0,0077$) a mezi potkany při 10 lux bez handlingu a 10 lux s handlingem 1 týden ti ušli průměrně 113,85 cm ($p=0,0260$). Zvířata handlovaná ušla signifikantně nižší dráhu nežli bez handlingu (Obrázek 23).



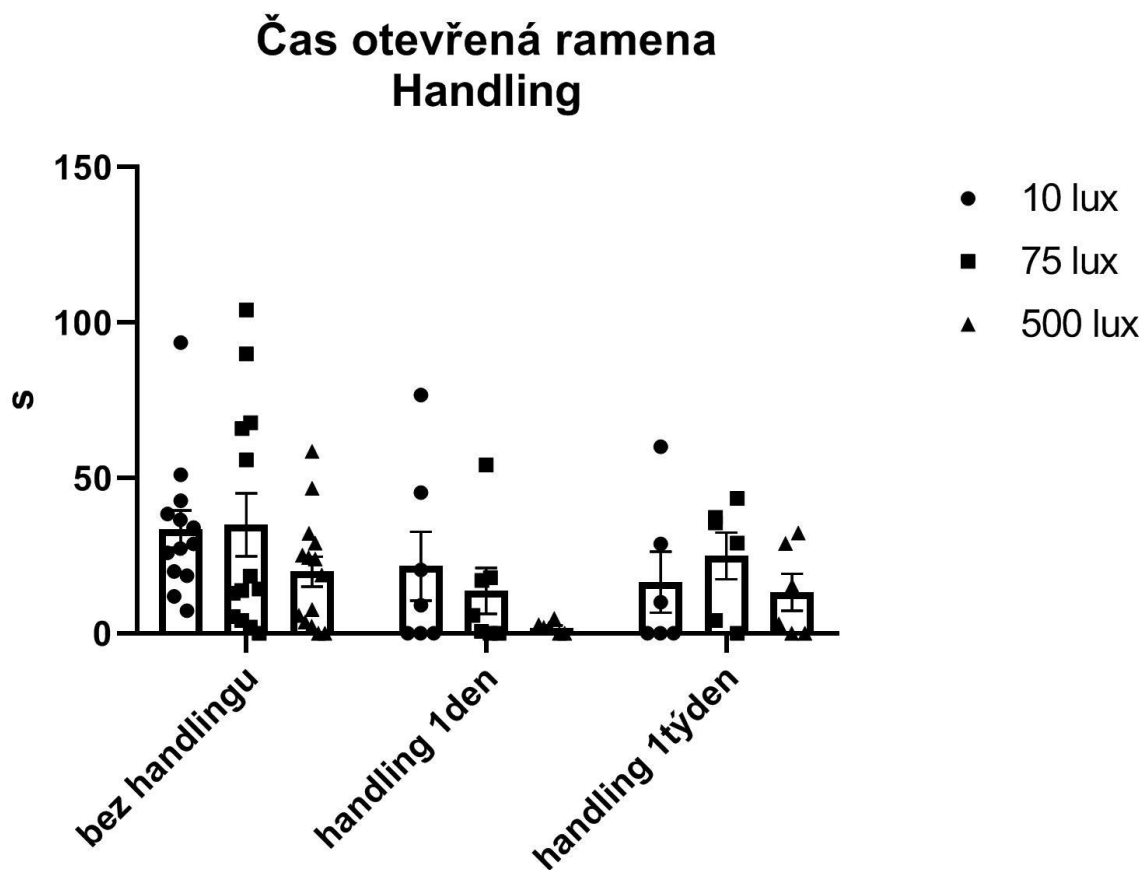
Obrázek 23: Dráha ušlá samci bez handlingu, handlovanými 1 den a handlovanými 1 týden v otevřených ramenech v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM),

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.4.3 Čas v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala efekt handlingu ($F_{(2, 69)} = 3,801, p=0,0272$).

Post hoc test neprokázal statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami, ale z grafů lze vidět, že se u obou pozorovaných skupin s handlingem snižuje čas strávený v otevřených ramenech EPM (Obrázek 24).

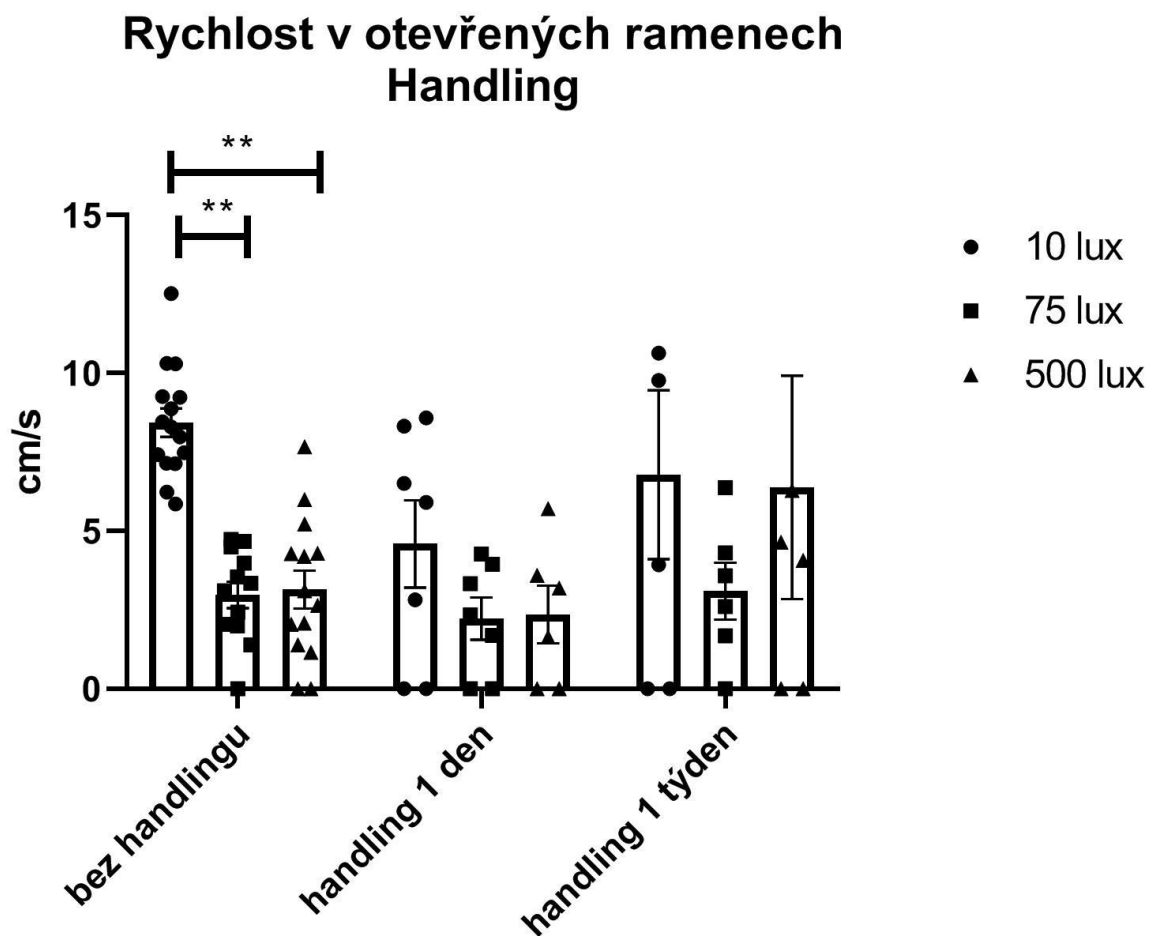


Obrázek 24: Čas, který strávili samci bez handlingu, handlování 1 den a handlování 1 týden v otevřených ramenech EPM za různých intenzit osvětlení. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM).

5.4.4 Rychlost v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv osvětlení ($F_{(2, 70)} = 7,268, p=0,0014$).

Signifikantní rozdíl vyšel pouze ve skupině zvířat, která neprošla handlingem, a to rozdíl v rychlosti v otevřených ramenech mezi zvířaty bez handlingu v 10 luxech a 75 luxech ($p=0,0048$) a 10 luxech a 500 luxech ($p=0,0042$). Zvířata v 10 luxech běžela rychleji než v 75 a 500 luxech (Obrázek 25).



Obrázek 25: Rychlost adultních samců bez handlingu, handlovaných 1 den a handlovaných 1 týden v otevřených ramenech v EPM. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), $**p < 0,01$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

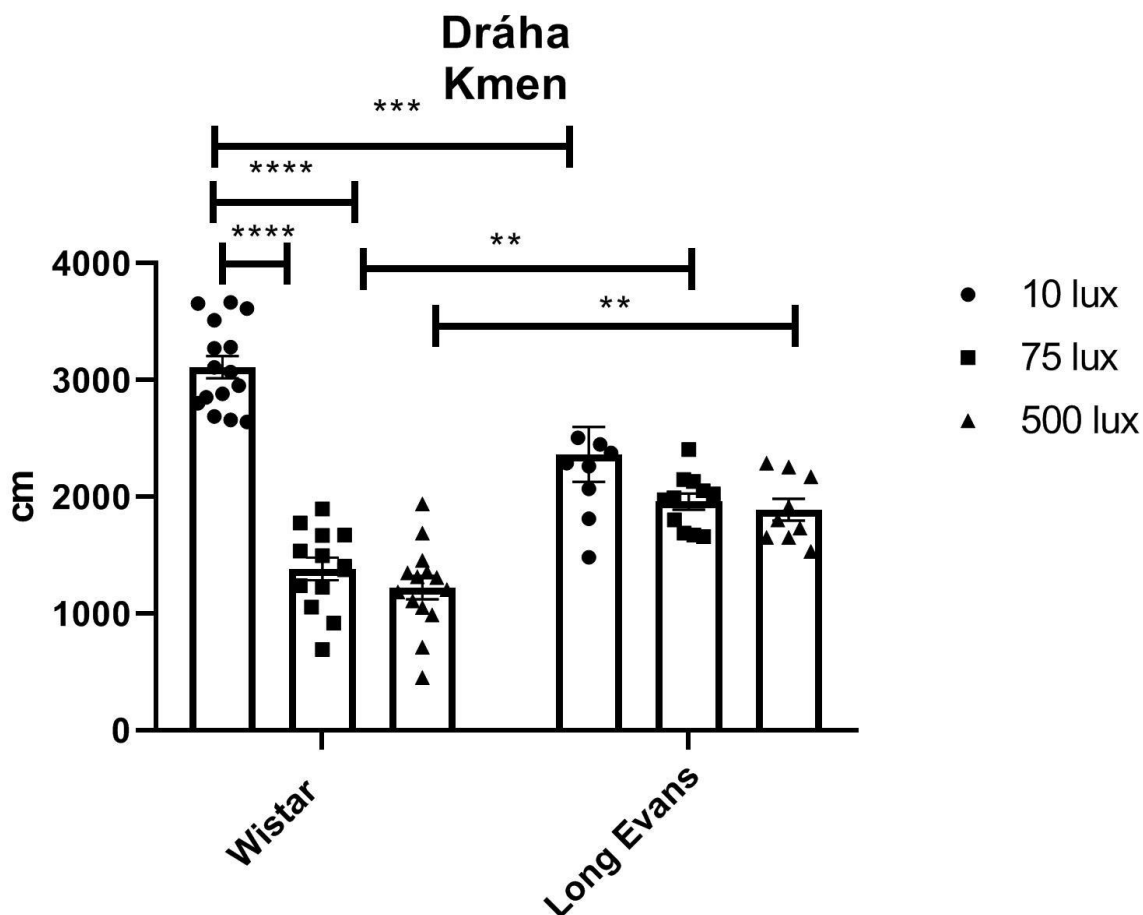
5.5 Experiment 5 - kmen

5.5.1 Celková dráha

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv osvětlení ($F_{(2, 65)} = 60,03$, $p < 0,0001$) a interakce mezi faktory ($F_{(2, 65)} = 22,19$, $p < 0,0001$).

Zatímco, jak bylo uvedeno výše, ušlá dráha u samců kmene Wistar byla ovlivněna intenzitou osvětlení, u potkanů kmene Long Evans tato závislost prokázána nebyla.

Při 10 luxech, 75 luxech i 500 luxech se navíc dráha potkanů Long Evans lišila od dráhy adultů Wistar. Při 10 luxech ušli potkani Long Evans (průměrně 2363,3 cm) menší dráhu než potkani Wistar (průměrně 3110,05 cm) ($p < 0,0005$), zatímco při 75 luxech ($p = 0,0095$) i 500 luxech ($p = 0,0029$) byla dráha Long Evansů větší. Při 75 luxech ušli potkani kmene Wistar průměrnou dráhu 1381,16 cm, zatímco Long Evans ušli průměrně 1958,95 cm. Při 500 luxech byla průměrná dráha potkanů kmene Wistar 1221,9 cm a Long Evans 1888,52 cm (Obrázek 26).

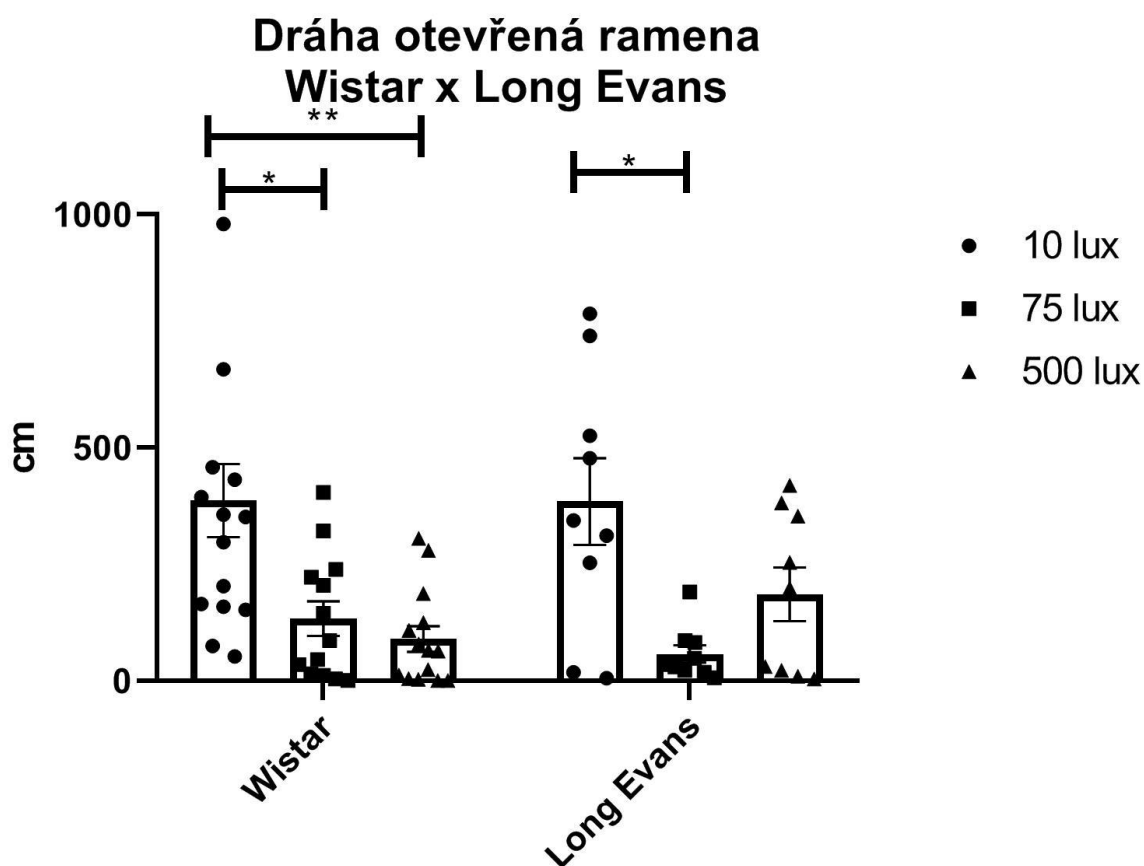


Obrázek 26: Dráha ušlá samci kmene Wistar a Long Evans v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.5.2 Dráha v otevřených ramenech

Statistická analýza prokázala signifikantní vliv osvětlení ($F_{(2, 63)} = 13,52, p < 0,0001$).

Signifikantně vyšel rozdíl v intenzitě osvětlení v jednotlivých skupinách, a to mezi Wistary při 10 luxech a 75 luxech ($p = 0,0173$) a 10 luxech a 500 luxech ($p = 0,0024$), u kmene Long Evans vyšel signifikantní rozdíl pouze mezi potkany mezi 10 lux a 75 lux ($p = 0,0119$). Zvířata uběhla delší dráhu v otevřených ramenech při 10 luxech než při 75 a 500 luxech (Obrázek 27).

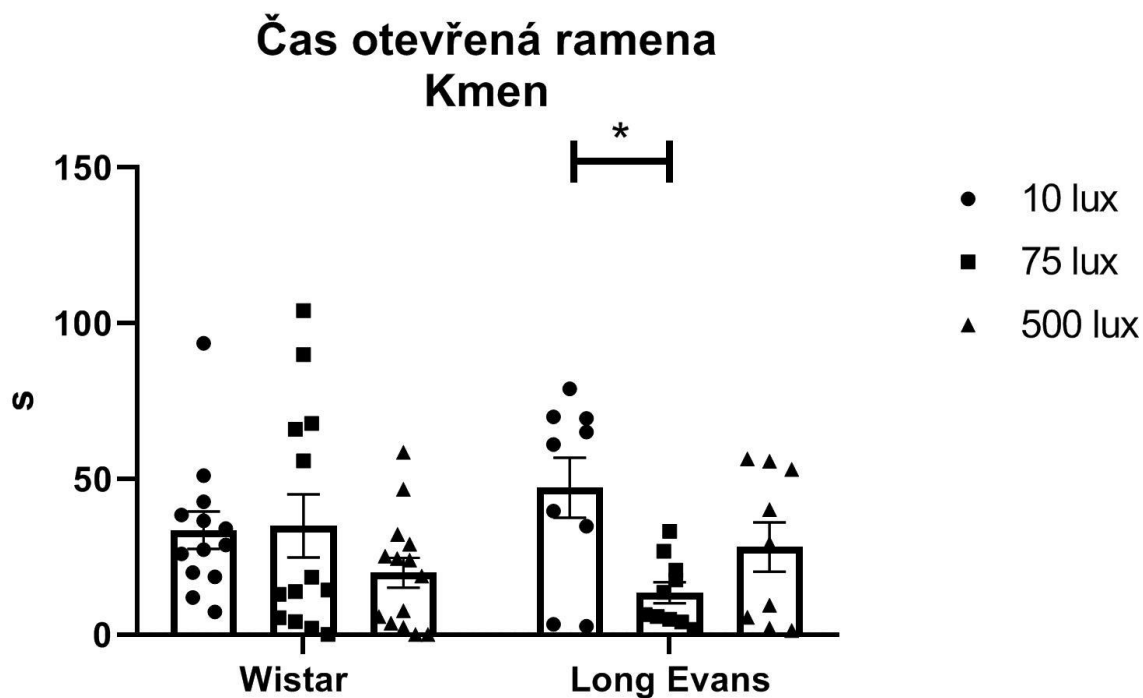


Obrázek 27: Dráha ušlá samci kmene Wistar a Long Evans v otevřených ramenech v EPM za různých světelných intenzit. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.5.3 Čas v otevřených ramenech

Analýza prokázala signifikantní interakci mezi faktory ($F_{(2, 62)} = 3,227, p=0,0464$).

Na rozdíl od potkanů kmene Wistar u potkanů kmene Long Evans byl čas strávený v otevřených ramenech EPM ovlivněn intenzitou osvětlení. Při 10 luxech (průměrně 47,1985 s) trávili Long Evansové delší čas v otevřených ramenech než při 75 luxech (průměrně 13,4619 s) ($p = 0,0480$) (Obrázek 28).



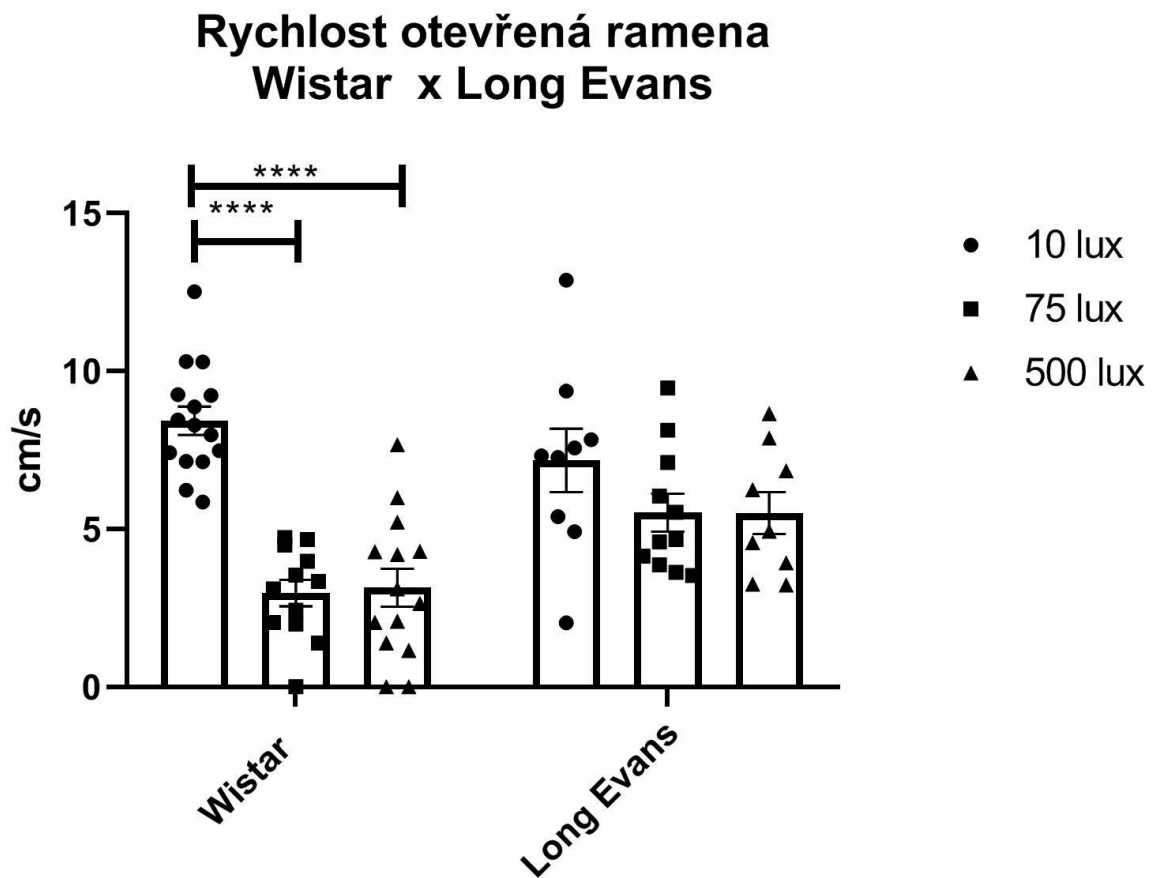
Obrázek 28: : Čas, který strávili samci bez handlingu, handlování 1 den a handlování 1 týden v otevřených ramenech EPM za různých intenzit osvětlení. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM),

* $p < 0,05$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

5.5.4 Rychlost v otevřených ramenech

Dvoucestná ANOVA prokázala vliv obou studovaných faktorů kmen: ($F_{(1, 64)} = 5,776$, $p = 0,0192$); osvětlení: ($F_{(2, 64)} = 21,57$, $p < 0,0001$) a jejich interakci: ($F_{(2, 64)} = 6,000$, $p = 0,0041$).

Signifikantní rozdíl vyšel pouze u potkanů kmene Wistar mezi osvětlením 10 lux a 75 lux ($p < 0,0001$) a 10 lux a 500 lux ($p < 0,0001$), při 10 luxech běhali rychleji než při 75 a 500 lux (Obrázek 29).



Obrázek 29: Rychlost samců kmene Wistar a Long Evans v EPM. Data jsou graficky zobrazena jako skupinové průměry \pm střední chyba průměru (SEM), $***p < 0,0001$, * = výsledek Tukeyho post-hoc testu.

6 Diskuze

Mezi jedinci potkanů kmene Wistar lze pozorovat konzistenci v délce uběhnuté dráhy. Při osvětlení o intenzitě 10 luxů vykázali významně delší trasu než při ostatních úrovních osvětlení, což platí jak pro celkovou dráhu, tak i pro dráhu v otevřených ramenech aparatury. Zvláštní pozornost si zaslouží rozdíly mezi samicemi a samci: samicím se v otevřených ramenech EPM podařilo uběhnout výrazně delší vzdálenost než samcům, a to navzdory tomu, že čas strávený v těchto ramenech se mezi pohlavími neliší. Tento fakt naznačuje, že samice projevují vyšší míru explorační.

Při srovnání chování různých kmenů byl zjištěn významný rozdíl. Zatímco trend v délce uběhnuté dráhy přetrvává téměř u všech jedinců kmene Wistar, u potkanů kmene Long Evans není tento trend statisticky významný. Potkani kmene Long Evans uběhli v EPM při všech testovaných hladinách osvětlení podobnou celkovou vzdálenost, významný rozdíl se však projevil v délce stráveného času a v délce uběhnuté dráhy v otevřených ramenech, při osvětlení 10 luxů potkani strávili delší dobu a uběhli větší vzdálenost v otevřených ramenech než při osvětlení 75 luxů.

První hypotéza nebyla zcela potvrzena. Dle předpokladů se potvrdila signifikantně kratší dráha při vyšších hladinách osvětlení, ale vliv na čas, který zkoumaní jedinci strávili v otevřených ramenech nebyl potvrzen. Hypotéza číslo dva byla potvrzena, na chování potkanů ve vyvýšeném křížovém bludišti měl vliv věk i pohlaví potkanů. Hypotéza číslo tři nebyla potvrzena, handlování potkani oproti předpokladu trávili v otevřených ramenech méně času. Hypotéza číslo čtyři byla potvrzena, mezi kmeny se prokázal signifikantní rozdíl v uběhnuté dráze i čase v EPM.

6.1 Experiment 1 – vliv osvětlení

Byla předpokládána existence rozdílu v čase, který zvířata stráví v EPM v otevřených ramenech aparatury při různých intenzitách osvětlení. Při nízkých intenzitách osvětlení by měla převážet tendence explorační a potkani by měli trávit více času v otevřených ramenech a překonat tak přirozený strach z výšek a otevřených prostranství, což se ale nepotvrdilo (podobné závěry byly již prezentovány v dřívějších publikacích^{34,35}). Předpokládaný rozdíl v dráze v otevřených ramenech se naopak potvrdil a tento trend vyšel signifikantní. Výsledky experimentu prokázaly, že potkani při intenzitě osvětlení 10 a 75 lux strávili v otevřených ramenech podobný čas, ale délka uběhnuté dráhy byla při 10 luxech signifikantně delší než při 75 luxech. Dráha tedy nekoreluje s časem stráveným v otevřených ramenech aparatury. Domnívám se, že je to způsobeno tím, že pro potkany je nízká intenzita osvětlení (10 lux) komfortnější než vyšší intenzita (75 lux), což vede k jejich větší ochotě ujít delší vzdálenost a překonat tak strach z otevřených prostor a možná se i více vzdálit od uzavřených ramen. Při 10 luxech došlo k významnému zvýšení nejen u uběhnuté dráhy v otevřených ramenech aparatury, ale i u celkové uběhnuté dráhy, což nasvědčuje, že hladina 75 luxů může působit anxiózněji a ochota prozkoumávat okolí je tedy při 10 luxech vyšší.

6.2 Experiment 2 - věk

V případě porovnání chování potkanů různého věku u kmene Wistar vykázaly všechny sledované parametry (celková dráha, dráha v otevřených ramenech a rychlost) signifikantní zvýšení při intenzitě osvětlení 10 luxů ve srovnání s úrovněmi 75 a 500 luxů u všech skupin. Výjimkou je dráha v otevřených ramenech u starších samců, kde výsledek nebyl signifikantní, avšak pozorovaný trend byl shodný. Zvířata všech věkových kategorií tedy byla za nejnižšího studovaného osvětlení nejaktivnější.

U starších (seniorních) zvířat byl výsledný čas strávený v otevřených ramenech, stejný jako u adultních potkanů, tedy neovlivněný světelnou intenzitou. Nicméně adolescentní zvířata trávila signifikantně delší čas v otevřených ramenech při 10 luxech než při 500 luxech, což naznačuje vliv světelné intenzity na míru anxiety u této věkové skupiny. Tato observace potvrzuje trend prezentovaný v předchozích studiích.³⁹⁻⁴⁰ Tento výsledek také podporuje teorii, že u albinotických potkanů, jako je kmen Wistar, postupem času (opakováním se světlu) dochází ke zhoršování zraku. To znamená, že mladší potkani, kteří mají zrak v pořádku, tráví při nižší intenzitě osvětlení v otevřených ramenech více času než při vyšší intenzitě, u které se předpokládá, že má anxiogenní efekt. Při 75 luxech v otevřených ramenech tráví méně času než při 10 lux, ale tento rozdíl není signifikantní, zatímco intenzita 500 luxů je pro ně již velice nepříjemná a v otevřených ramenech tráví signifikantně méně času. Absence vlivu světelné intenzity na čas strávený v otevřených ramenech EPM u adultních a starších zvířat mohla být potenciálně způsobena narušeným zrakovým vnímáním.

6.3 Experiment 3 - pohlaví

Donedávna se pro výzkumy používali pouze samci, pokud chceme znát komplexní situaci, neměli bychom opomíjet zařazení samic do experimentů.^{43,44}

Důvodem k nezařazování samic do pokusů v minulosti byla, kromě strachu z ovlivnění výsledků experimentu hormonálními změnami v průběhu estrálního cyklu, také snaha redukovat počty pokusných zvířat. Pokud bychom se rozhodli experimenty provádět na obou pohlavích, bylo by nutné vyřešit problém s ustájením samic a samců. Je možné, že pokud by byli ustájeni v jedné chovné místnosti, tak by pach říjících samic mohl ovlivnit chování samců.

Ve vyvýšeném křížovém bludišti se potvrdil rozdíl mezi pohlavími hned v několika aspektech, a to jak v dráze v otevřených ramenech, tak i v čase, který zvířata trávila v otevřených ramenech aparatury. I přesto, že se celková dráha naměřená u obou pohlaví příliš nelišila, uběhly samice v otevřených ramenech při intenzitě osvětlení 10 lux signifikantně delší dráhu (průměr 779,6 cm) než samci (průměr 386,157 cm). Samice jsou tedy nejspíše zvědavější a odvážnější, dalším možným vysvětlením by mohlo být, že tento jev nezpůsobuje zvědavost, ale stres a následná snaha utéct z bludiště.

Statisticky významný rozdíl byl také zaznamenán v čase stráveném v otevřených ramenech, samice trávily signifikantně více času v otevřených ramenech při 10 a 75 luxech než samci, což opět naznačuje, že při nižších intenzitách osvětlení vykazují samice vyšší tendenci explorovat než samci. Nicméně při intenzitě 500 luxů již tento rozdíl nebyl

statisticky významný. Tyto údaje ukazují, že osvětlení ovlivňuje chování v behaviorální aparatuře, přičmež 500 luxů se již jeví jako příliš intenzivní osvětlení i pro samice, které se zdají být zvidavější. Tyto výsledky korelují s výzkumem pana Scholla.⁴³ Výsledky experimentu 3 tedy ukazují, že intenzita osvětlení má vliv na chování v behaviorálních testech, ale tento vliv není stejný u obou pohlaví.

6.4 Experiment 4 - handlování

Handlování zvířat je metoda, která má za cíl navyknout laboratorní zvířata na manipulaci experimentátorem, což by mělo vést k menšímu stresu a klidnějšímu chování během experimentů. Výsledky tohoto experimentu jsou však v rozporu s předchozími studii.^{47,50} Celková uběhnutá dráha zůstává konzistentní s pozorovaným trendem u potkanů kmene Wistar, ale dráha v otevřených ramenech již s výsledky ostatních experimentů nekoreluje. Potkani, kteří před pokusem nebyli handlováni, uběhli v otevřených ramenech při 10 luxech signifikantně delší dráhu než potkani handlování po dobu jednoho dne i jednoho týdne. To může naznačovat, že handling je pro potkany stresující a nehandlování potkani pociťují menší anxieta a mají tak vyšší ochotu explarovat.

U potkanů, kteří prošli handlováním, nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi dráhou v otevřených ramenech za různých světelných intenzit, což naznačuje, že intenzita osvětlení nehraje významnou roli v jejich ochotě k průzkumu, která zůstává obecně nízká. To ukazuje, že handling byl silnějším faktorem ovlivňujícím chování potkanů než intenzita osvětlení. Z grafů je také patrné, že potkani po jednodenním handlování mají nižší aktivitu ve srovnání s týdním handlováním, což by mohlo znamenat, že kratší doba handlování působí na potkany stresověji než delší, během které si již zvířata mohla na manipulaci zvyknout. Tato zjištění vyvolávají otázku, zda by delší handlování nemohlo mít pozitivní účinky.

V literatuře existují studie, které se zabývají vlivem dlouhodobého handlování. V jednom experimentu byla zvířata handlována již od období před odstavem až do experimentu, což vedlo k signifikantně delšímu času strávenému v otevřených ramenech.⁴⁷ V případě vyvýšeného křížového bludiště se však nezdá, že by handlování snižovalo míru prožívaného stresu. Je proto důležité se zvířaty vždy zacházet stejně a brát v úvahu vliv předchozí manipulace na výsledky experimentu. Nesprávné zacházení například při přestýlání či přesunu zvířat mezi místnostmi by mohlo mít nechtěné dopady na výsledky behaviorálních studií.

6.5 Experiment 5 – kmen

Takřka u všech skupin potkanů kmene Wistar byla celková uběhnutá dráha signifikantně delší při intenzitě osvětlení 10 luxů než při 75 a 500 luxech, nicméně u potkanů kmene Long Evans se uběhnutá dráha v různých světelných intenzitách nemění.

Zatímco u potkanů kmene Wistar přetrvává korelace uběhnuté dráhy v otevřených ramenech s celkovou uběhnutou dráhou, u potkanů kmene Long Evans je uběhnutá dráha v otevřených ramenech signifikantně delší při 10 luxech než při 75 luxech, při 500 luxech již

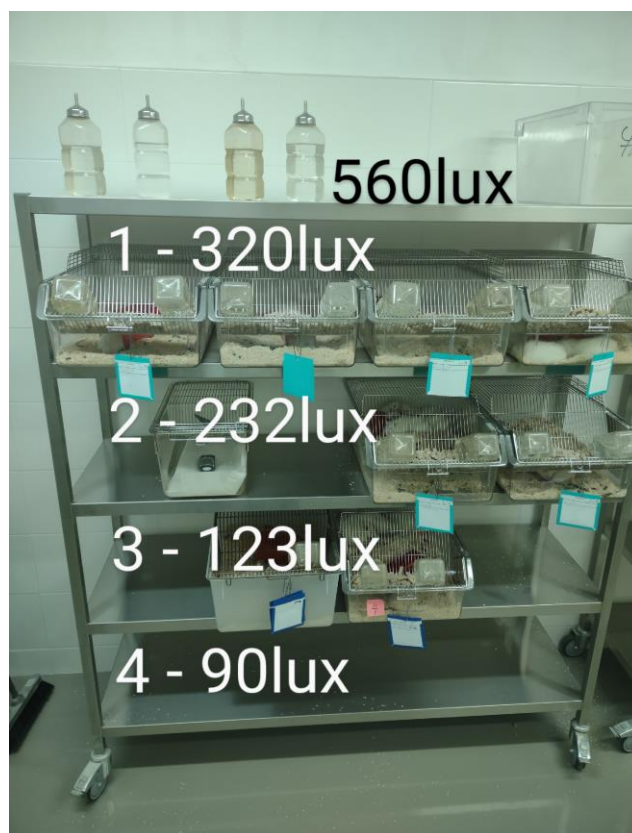
rozdíl není signifikantní. Kromě toho potkani kmene Long Evans strávili signifikantně více času v otevřených ramenech při 10 luxech než při 75 luxech. Možným vysvětlením tohoto jevu je rozdíl v kvalitě zraku mezi jednotlivými kmeny. Potkani kmene Long Evans mají oči více pigmentované a dle již provedených experimentů mají lepší zrak než potkani kmene Wistar.⁵¹ Za nízké intenzity osvětlení jsou potkani Long Evans ochotni vycházet na otevřená ramena, ale hladina 75 luxů se zdá být již příliš vysoká, jelikož způsobila signifikantní rozdíl v čase, který jsou ochotni potkani strávit na otevřených ramenech. Velmi vysoká hladina osvětlení, jako je použitých 500 luxů, nejspíše již osvětlí i uzavřená ramena aparatur natolik, že rozdíl v osvětlení uzavřených a otevřených ramen je nevýznamný, což by mohlo způsobit, že potkani Long Evans vychází do otevřených ramen častěji.

Podobný trend byl pozorován i u mladých potkanů kmene Wistar, což naznačuje, že mohou mít zrak méně poškozený než starší potkani. Otázkou zůstává, zda je tento rozdíl zapříčiněn pouze kvalitou zraku jednotlivých kmenů, nebo zda za hrají roli i další faktory. Rozdíl by mohl být i v přirozené tendenci explodovat, potkani kmene Wistar by mohli být přirozeně anxióznější a méně explorující než potkani Long Evans.

6.6 Intenzita světla při ustájení

Vedle intenzity světla při experimentu nelze vyloučit ani vliv intenzity osvětlení při ustájení potkanů. Potkani jsou v chovech nejčastěji ustájeni v plastových průhledných ubikacích s kovovým víkem. Tyto ubikace jsou umístěny v regálech. U potkanů kmene Wistar by při delším ustájení za vyšší světelné intenzity mohlo dojít k poškození zraku¹⁰, které by mohlo mít vliv na výsledky behaviorálních pokusů. Potkani, kteří byli použiti v této studii, byli všichni ustájeni v prvním, nebo druhém patře regálu (*Obrázek 30*). Pomocí luxmetru byla změřena hladina osvětlení v každé úrovni regálu. Výsledky ukazují, že intenzita osvětlení se mezi jednotlivými patry regálu liší přibližně o 100 luxů. Je možné, že tato nekonzistence v podmínkách ustájení by mohla mít dopad nejen na zrak, ale také na další fyziologické procesy a chování potkanů. Tato variabilita v osvětlení může představovat významný faktor, který může ovlivnit výsledky behaviorálních experimentů. Pokud je intenzita osvětlení dostatečně vysoká, mohla by poškodit zrak potkanů, což by se následně projevilo na jejich chování v průběhu pokusů.

Pokud není možné zajistit ustájení všech potkanů při stejné hladině osvětlení, bylo by vhodné měnit pozice boxů s potkany tak, aby byli všichni potkani během ustájení vystaveni stejným souhrnným podmínkám osvětlení a tím se předešlo tomu, že by výsledky pokusu mohly být ovlivněny tím, že by někteří potkani byli ustájeni ve spodních regálech s nízkou intenzitou osvětlení a někteří v horní části regálu s vyšší intenzitou osvětlení.



Obrázek 30: regál na kterém jsou umístěny chovné boxy

7 Závěr

Cílem této práce bylo zjištění vlivu intenzity světla na chování potkana ve vyvýšeném křížovém bludišti a porovnání dalších aspektů jako je věk, pohlaví či kmen, které by mohly mít vliv na výsledky. Vliv intenzity světla na dráhu (aktivitu) potkanů byl potvrzen pouze u kmene Wistar. U kmene Long Evans měla intenzita osvětlení vliv na čas v otevřených ramenech (anxieta), ale na dráhu nikoliv. Je tedy důležité při porovnávání výsledků behaviorálních studií zohlednit i behaviorální parametry, protože zjevně některé mohou být na určité manipulace senzitivnější.

Vliv intenzity osvětlení se potvrdil u všech experimentů. Intenzita osvětlení má vliv alespoň na některý z parametrů u samců, samic i různých věkových skupin. Překvapivé je, že u samic je výsledkem stejný trend v uběhnuté dráze, ale mezi samci a samicemi je rozdíl v aktivitě. Samice jsou aktivnější, což by mohlo znamenat, že jsou méně úzkostné a více explorují. Jediné, u čeho byl vliv intenzity světla malý, bylo u zvířat, která prošla handlováním. Je možné, že u těchto zvířat oproti očekávání převážila tendence k vyšší anxieta. Handlování může ovlivnit výsledky testů i opačným směrem, než bychom předpokládali, a je nutná pečlivá kontrola manipulací, kterou s experimentálními zvířaty provádíme. Neméně zajímavým výsledkem jsou rozdíly mezi věkovými kohortami. Jen u adolescentních zvířat je signifikantní rozdíl v čase stráveném v otevřených ramenech. Důvodem tohoto trendu by mohlo být postupné zhoršování zraku u dospělých a seniorních zvířat v důsledku ustájení zvířat za nevhodně vysoké hladiny osvětlení.

Hladina osvětlení vhodná pro EPM by měla být zvolena tak, aby zvířatům vyvolala stres ze vstupu do otevřených ramen, ale zároveň nezpůsobila úplnou averzi. Výsledkem z porovnání časů v otevřených ramenech EPM je, že zde adultní samci trávili více času při 10 a 75 luxech v otevřených ramenech, při 150 luxech se čas zkracoval. Potkani kmene Wistar trávili při 75 luxech v otevřených ramenech v porovnání s ostatními intenzitami spíše delší čas, zatímco potkani kmene Long Evans při 75 luxech trávili v otevřených ramenech signifikantně nejméně času. Neexistuje tedy plošně ideální hladina intenzity osvětlení při EPM, ale je závislá na mnoha proměnných.

Tento experiment přináší zajímavé nálezy týkající se faktorů, které mohou ovlivnit chování potkanů v jednom z často používaných behaviorálních testů. Potvrdilo se, že je velice důležité dodržovat stejné podmínky při každém pokusu, aby byly výsledky porovnatelné. Je i velice důležité dodržet podmínky, které mají zvířata při ustájení. Dalším aspektem, který vstupuje do pokusu je experimentátor samotný. Je tedy důležité, aby experiment byl prováděn ideálně jedním experimentátorem a dodržovat vždy stejné vnější podmínky jako je osvětlení nebo handling.

V budoucnu by bylo zajímavé prověřit i vliv dalších faktorů na studovanou behaviorální úlohu. Každé zvíře použité v pokusu do něj smí vstoupit jen jednou. Opakované použití by mohlo ovlivnit výsledky. Bylo by zajímavé zjistit, jaký vliv bude mít opakované použití zvířat.

8 Literatura

1. Wahlsten, D. *Mouse Behavioral Testing: How to Use Mice in Behavioral Neuroscience*. (Academic, London Burlington, VT, 2011).
2. Severino, G. *et al.* Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol. Behav.* **81**, 489–498 (2004).
3. Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 1193–1205 (2005).
4. Hogg, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**, 21–30 (1996).
5. Mechiel Korte, S. & De Boer, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 163–175 (2003).
6. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* **14**, 149–167 (1985).
7. Pellow, S. & File, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **24**, 525–529 (1986).
8. Itoh, J., Nabeshima, T. & Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl.)* **101**, 27–33 (1990).
9. Abadi, R. V., Dickinson, C. M., Pascal, E. & Papas, E. Retinal image quality in albinos. A review. *Ophthalmic Paediatr. Genet.* **11**, 171–176 (1990).
10. Birch, D. & Jacobs, G. H. Effects of Constant Illumination on Vision in the Albino Rat I.
11. Fishman, J. A. & Galguera, T. *Introduction to Test Construction in the Social and Behavioral Sciences: A Practical Guide*. (Rowman & Littlefield Publishers, Lanham, MD, 2003).
12. Whitley, B. E. & Kite, M. E. *Principles of Research in Behavioral Science*. (Routledge, New York, NY, 2013).
13. Geyer, M. A. & Swerdlow, N. R. Measurement of Startle Response, Prepulse Inhibition, and Habituation. *Curr. Protoc. Neurosci.* **3**, (1998).

14. Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Anim. Behav.* **21**, 205–235 (1973).
15. Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J. & Kuhn, J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders – Apart from schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 445–452 (2013).
16. Peral, D., Griffin, A. S., Bartomeus, I. & Sol, D. Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? *Anim. Behav.* **123**, 69–79 (2017).
17. Walsh, R. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin* (1976).
18. Lueptow, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J. Vis. Exp.* 55718 (2017) doi:10.3791/55718.
19. Kraeuter, A.-K., Guest, P. C. & Sarnyai, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. in *Pre-Clinical Models* (ed. Guest, P. C.) vol. 1916 105–111 (Springer New York, New York, NY, 2019).
20. Harrison, F. E., Hosseini, A. H. & McDonald, M. P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **198**, 247–251 (2009).
21. Vorhees, C. V. & Williams, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* **1**, 848–858 (2006).
22. Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J. & Kotlinska, J. H. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **392**, 1–18 (2019).
23. Skinner, B. F. *The Technology of Teaching*. (Meredith, New York, 1968).
24. Du Boulay, B. Escape from the Skinner Box: The case for contemporary intelligent learning environments. *Br. J. Educ. Technol.* **50**, 2902–2919 (2019).
25. Kraeuter, A.-K., Guest, P. C. & Sarnyai, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. in *Pre-Clinical Models* (ed. Guest, P. C.) vol. 1916 69–74 (Springer New York, New York, NY, 2019).
26. Walf, A. A. & Frye, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* **2**, 322–328 (2007).
27. Rodgers, R. J. & Cole, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol. Behav.* **53**, 383–388 (1993).
28. Treit, D., Menard, J. & Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**, 463–469 (1993).

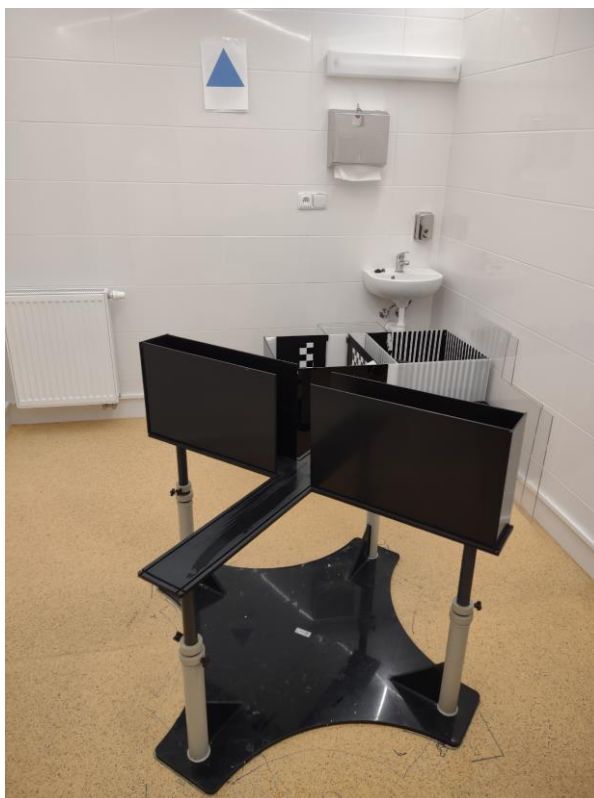
29. Craske, M. G. *et al.* What Is an Anxiety Disorder? *F O C U J. LIFELONG Learn. PSYCHIATRY*.
30. Gray, J. A. Drug Effects on Fear and Frustration: Possible Limbic Site of Action of Minor Tranquilizers. in *Drugs, Neurotransmitters, and Behavior* (eds. Iversen, L. L., Iversen, S. D. & Snyder, S. H.) 433–529 (Springer US, Boston, MA, 1977). doi:10.1007/978-1-4684-3180-3_10.
31. Lang, P. J. Fear reduction and fear behavior: Problems in treating a construct. in *Research in psychotherapy*. (ed. Shlien, J. M.) 90–102 (American Psychological Association, Washington, 1968). doi:10.1037/10546-004.
32. *Anxiety and the Anxiety Disorders*. (Erlbaum, Hillsdale, N.J., 1985).
33. Martínez, J. C., Cardenas, F., Lamprea, M. & Morato, S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behav. Processes* **60**, 15–26 (2002).
34. Garcia, A. M. B., Cardenas, F. P. & Morato, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* **85**, 265–270 (2005).
35. Becker, A. & Grecksch, G. Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* **59**, 1175–1177 (1996).
36. Jones, N. & King, S. M. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiol. Behav.* **72**, 99–106 (2001).
37. Morato, S. & Castrechini, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **22**, 707–710 (1989).
38. Griebel, G., Moreau, J.-L., Jenck, F., Martin, J. R. & Misslin, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav. Processes* **29**, 37–47 (1993).
39. Imhof, J. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav. Brain Res.* **56**, 177–180 (1993).
40. Doremus, T. L., Varlinskaya, E. I. & Spear, L. P. Age-Related Differences in Elevated Plus Maze Behavior between Adolescent and Adult Rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1021**, 427–430 (2004).
41. Ghezzi, A. C. *et al.* Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**, 16 (2012).

42. Šimůnek, J., Hegerová, E., Jaroš, J. & Tkadlec, E. Effects of Sulphadimidine on the Toxicity of Phenobarbital, Pentetrazole and Bemegride in Mice of Different Ages. *Acta Vet. Brno* **54**, 177–182 (1985).
43. Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J. & Forster, G. L. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiol. Behav.* **211**, 112670 (2019).
44. Becker, J. B., Prendergast, B. J. & Liang, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biol. Sex Differ.* **7**, 34 (2016).
45. Prendergast, B. J., Onishi, K. G. & Zucker, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **40**, 1–5 (2014).
46. Beery, A. K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **23**, 143–149 (2018).
47. Costa, R., Tamascia, M. L., Nogueira, M. D., Casarini, D. E. & Marcondes, F. K. Handling of Adolescent Rats Improves Learning and Memory and Decreases Anxiety. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **51**, (2012).
48. Cowley, J. J. & Widdowson, E. M. The effect of handling rats on their growth and behaviour. *Br. J. Nutr.* **19**, 397–406 (1965).
49. Weinberg, J., Krahn, E. A. & Levine, S. Differential effects of handling on exploration in male and female rats. *Dev. Psychobiol.* **11**, 251–259 (1978).
50. Andrews, N. & File, S. E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* **235**, 109–112 (1993).
51. Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M. & Wishaw, I. Q. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav. Brain Res.* **136**, 339–348 (2002).
52. Shoji, H. & Miyakawa, T. Effects of test experience, closed-arm wall color, and illumination level on behavior and plasma corticosterone response in an elevated plus maze in male C57BL/6J mice: a challenge against conventional interpretation of the test. *Mol. Brain* **14**, 34 (2021).
53. Schweinfurth, M. K. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *eLife* **9**, e54020 (2020).
54. Berdoy, M. The Behaviour and Ecology of *Rattus norvegicus*: from Opportunism to Kamikaze Tendencies. (1999).
55. Canzian, F. Phylogenetics of the Laboratory Rat *Rattus norvegicus*. (2015).
56. Müller, B. & Grossniklaus, U. Model organisms — A historical perspective. *J. Proteomics* **73**, 2054–2063 (2010).

57. Tucker, M. J. *Diseases of the Wistar Rat*. (Taylor & Francis, London, 1997).
58. Tocher Clause, B. *THE WISTAR INSTITUTE ARCHIVES: RATS (NOT MICE) AND HISTORY*.
59. Weisbroth, S. H. The origin of the Long-Evans rat and a review of the inheritance of coat colors in rats (*Rattus norvegicus*). *Lab. Anim. Care* **19**, 733–737 (1969).

Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Zotero - <https://www.zotero.org/download/>

9 Přílohy



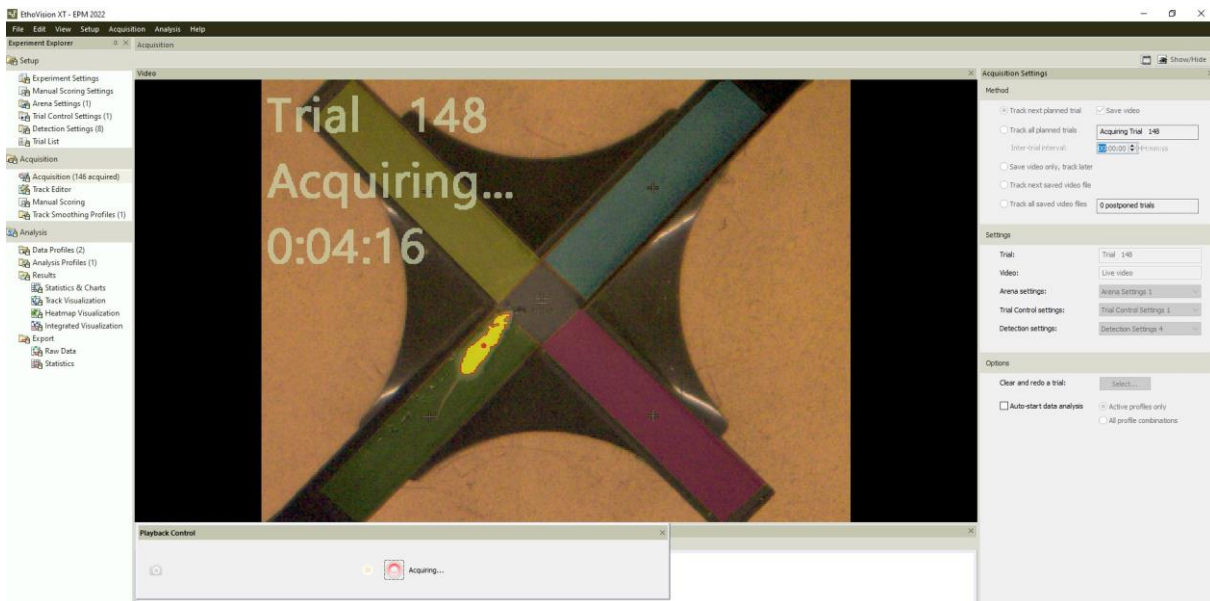
Obrázek 31: pozorovací místnost



Obrázek 32: osvětlení s kamerou umístěnou uprostřed



Obrázek 33: vyvýšené křížové bludiště s luxmetrem



Obrázek 34: potkan sledovaný v programu Ethovision XT16