

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra etologie a zájmových chovů



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Korelace tělesné hmotnosti a úzkostného chování u
laboratorních myší**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Pavlína Kučerová

Zájmové chovy zvířat

Vedoucí práce: Ing. Milena Santariová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Korelace tělesné hmotnosti a úzkostného chování u laboratorních myší" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Mileně Santariové, Ph.D., za trpělivost, spolupráci a celkovou pomoc při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Českému centru pro fenogenomiku, pod které spadá behaviorální oddělení, které mi umožnilo získat potřebná data k vyhodnocení hypotézy. V neposlední řadě děkuji mojí rodině, partnerovi a přátelům, kteří mi byli vždy oporou.

Korelace tělesné hmotnosti a úzkostného chování u laboratorních myší

Souhrn

Laboratorní myš je v současné době jedním z nejčastěji používaných laboratorních zvířat. Slouží jako modelový organizmus pro výzkum v oblasti genetiky, psychologie, medicíny a dalších vědních oborech. Rozsáhlé studie prokázaly, že sociální postavení ve skupinovém chovu myší způsobuje stres, který je hlavní příčinou vzniku úzkostných poruch. Toto úzkostné chování pak může zkreslovat výsledky pokusů, proto je vhodné úzkostnou myš z pokusu vyřadit. Jindy, například v pokusech týkajících se výzkumu anxiolytických léčiv naopak úzkostné chování experimentátor vyžaduje a úzkostné myši vyhledává.

Tato práce se zabývala korelací tělesné velikosti a úzkostného chování u laboratorní myši. Byla stanovena hypotéza práce neboli předpoklad, že myši s nižší hmotností budou v behaviorálních testech projevovat ve vyšší míře známky úzkostného chování než jedinci s vyšší hmotností. Tato hypotéza byla stanovena na základě studií, které popsaly velikost jedinců, jako určující vlastnost jejich sociálního postavení. U nejmenších jedinců pak byla očekávaná úzkost v důsledku chronického stresu, který byl způsobený agresivními útoky největších, dominantních jedinců při budování hierarchie.

Cílem práce bylo ověřit, zda může být menší velikost těla u laboratorní myši indikátorem úzkostných behaviorálních projevů.

Samotný výzkum probíhal od ledna do února roku 2022. Do pokusu bylo zařazeno 97 myší (46 samců, 51 samic) inbredního kmene C57Bl/6NCrl. U všech jedinců byla zjištěna hmotnost a délka chodidla pravé zadní končetiny. Z těchto nasbíraných hodnot byl vypočítán index, podle kterého byli vybráni největší a nejmenší jedinci z každé klece. Tito jedinci byli zařzeni do behaviorálních pokusů Open field a Light-dark box, které patří mezi nejčastěji používané testy emocionality.

Projevem úzkostného chování v testu Open field je tigmotaxe a omezený čas strávený v centru. V testu Light-dark box se úzkost projevuje sdržováním myši v tmavé zóně arény a snížený počet přechodů, mezi tmavou a osvětlenou zónou. Data z těchto testů byla statisticky zpracována v programu R verze 4.1.2.

Výsledky experimentu neprokázaly, že by úzkostné chování korelovalo s menší tělesnou velikostí, z čehož vyplývá, že tělesná velikost nemusí indikovat konkrétní behaviorální projev. V běžné praxi tedy nemusí dojít k obávanému zkreslení výsledků behaviorálních testů způsobené tělesnou velikostí laboratorních myší.

Klíčová slova: Myš, tělesná hmotnost, úzkostné chování, dominance

Correlation of body weight and anxiety behavior in laboratory mice

Summary

The laboratory mouse is currently one of the most frequently used laboratory animals. It serves as a model organism for research in genetics, psychology, medicine, and other scientific fields. Extensive studies have shown that social status in group breeding of mice causes stress, which is the primary cause of anxiety disorders. This anxiety behavior can then alter the results of experiments, so it is advisable to exclude the anxious mouse from the experiment. On the other hand, these anxious mice are sought out in anxiolytic drug research experiments, as the experimenter requires this kind of behavior.

This thesis looked at the correlation between body size and anxiety behavior in laboratory mice. The hypothesis of the thesis is (or the assumption) that mice with lower weight will show higher signs of anxiety behavior in behavioral tests than individuals with higher weight. This hypothesis was established based on studies describing the size of individuals as a determining feature of their social status. Anxiety was expected in the smallest individuals, due to chronic stress caused by aggressive attacks by the largest, dominant individuals in the process of hierarchy establishment.

The experiment aimed to verify whether a smaller body size in a laboratory mouse can be an indicator of anxiety behavioral manifestations.

The experiment itself took place from January to February 2022. The experiment included 97 mice (46 males, 51 females) of the inbred strain C57Bl / 6NCrl. The weight and length of the right hind limb were determined in all individuals. From these collected values, an index was calculated according to which the largest and smallest individuals from each cage were selected. These individuals were included in the Open field and Light-dark box behavioral experiments, which are among the most frequently used tests on emotionality.

Anxiety and limited time spent in the center are a manifestation of anxiety behavior in the Open field test. In the Light-dark box test, anxiety is manifested by the mouse staying in the dark zone of the arena and its reduced number of transitions between the dark and light zone. The data from these tests were statistically processed in the program R version 4.1.2.

The results of the experiment did not show that anxiety behavior correlated with smaller body size, suggesting that body size may not indicate a specific behavioral manifestation. Thus, in common practice, the feared bias in behavioral test results may not occur due to the body size of laboratory mice.

Keywords: Mouse, body weight, anxiety behavior, dominance

Obsah

1. Úvod	9
2. Vědecká hypotéza a cíle práce.....	10
2.1. Hypotéza	10
2.2. Cíl práce práce	10
3. Literární rešerše	11
3.1. Historie a význam chovu laboratorních zvířat.....	11
3.2. Laboratorní myš.....	12
3.2.1. Kmeny laboratorních myší a jejich použití	13
3.2.2. Etologie myši domácí	14
3.2.3. Sociální způsob života myší	17
3.2.4. Stres způsobený sociálním postavením ve skupině.....	21
3.3. Emoce, vznikající jako reakce na stres	24
3.3.1. Strach	24
3.3.2. Úzkost.....	25
3.4. Behaviorální testy k vyhodnocení úzkosti.....	27
3.4.1. Ovlivnění výsledků behaviorálního testování	29
4. Metodika	30
4.1. Charakteristika výzkumného pracoviště	30
4.2. Použitá zvířata	30
4.2.1. Identifikace myši	31
4.2.2. Chov myší	32
4.3. Hmotnost myší	34
4.4. Behaviorální testy	34
4.4.1. Open field test	35
4.4.2. Light-dark box	37
5. Výsledky.....	39
5.1. Určení největšího a nejmenšího jedince	39
5.2. Open field.....	41
5.3. Light-dark box.....	46
6. Diskuze.....	50
7. Závěr.....	53
8. Literatura	54

1. Úvod

Myši jsou nejdůležitější laboratorní zvířata používaná po celém světě v průmyslovém, akademickém a biomedicínském výzkumu. Výzkumy se provádí na speciálních myších vyšlechtěných pro použití v laboratořích (Wahlsten 2011). Pro správné použití zvířete v pokusu je třeba znát jeho fyziologii a etologii.

Myši jsou hlodavci se soumráchnou až noční aktivitou (Rixey et al. 2015). Publikovaný výzkum ukazuje, že myši jsou vnímavá, emocionální a značně inteligentní zvířata (Burn 2008). Myši patří mezi sociálně žijící hlodavce, kde je ve skupinách ustanovena hierarchie, a to jak mezi samci, tak i mezi samicemi (Suckow et al. 2005). Hierarchie je ustálená, jestliže je snížen počet konfliktů mezi jedinci způsobem, že jedni ustupují druhým a poskytují jim přístup ke zdroji bez boje. Toto se děje na základě zkušeností z předchozích agonistických interakcí (Veselovský 2005). Konečné postavení v hierarchii je ovlivněno vlastnostmi jedince. Mezi tyto rozhodující vlastnosti patří především velikost, síla a věk (Crowcroft 1955).

Protože stejné uspořádání rodin, jaké by se vyskytovalo přirozeně v přírodě není při chovu v laboratoři proveditelné, zavádí se skupinové ustájení myši stejného pohlaví, aby se splnila jejich potřeba sociální interakce. V mnoha případech však bude docházet k soubojům (Olsson et al. 2007). Agresivní projevy a budování hierarchie jsou úzce spjaty se stresem a stresovou reakcí (Loveland et al. 2014). Sociální postavení může dramaticky ovlivnit i zdraví jedince, zejména pokud jde o nemoci související se stresem (Sapolsky 2004).

Vědecké studie potvrzují, že podřízení jedinci, kteří prožívali déletrvajících, opakujících stres, způsobený útoky dominantního samce, mají v budoucnu zvýšené riziko vzniku úzkostných poruch (Heim 2003).

Úzkost je rys, který ovlivňuje výsledky behaviorálního testování. Někdy může úzkost výsledky ovlivnit negativně, jindy je naopak záměrně vyhledávána. Proto pokud by byla potvrzena stanovená hypotéza, dalo by se na základě velikosti jedince rozhodnout, zda má být do testu zařazen, či vyloučen.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1. Hypotéza

H1: „Myši s nižší hmotností budou v behaviorálních testech projevovat ve vyšší míře známky úzkostného chování než jedinci s vyšší hmotností.“

2.2. Cíl práce práce

Cílem práce bylo ověřit, zda může být menší velikost těla u laboratorní myši indikátorem úzkostných behaviorálních projevů.

3. Literární rešerše

3.1. Historie a význam chovu laboratorních zvířat

„Užití zvířat jako biologického modelu je jednou z významných složek biologického, lékařského, veterinárního a zemědělského výzkumu a vývoje. Umožňuje získávat poznatky pro hodnocení nejrůznějších biologických dějů, zákonitostí, vztahů a účinků látek vstupujících do biologických dějů“ (Bartoš et al. 2014).

Historie pokusů na zvířatech sahá až do starověkého Řecka, kde byla zvířata využívána pro studium lidské anatomie a fyziologie (Ericsson et al. 2013). Pro studie lidského těla řečtí lékaři prováděli pitvy na zvířatech, protože pitvy na lidech byly nepřípustné (Franco 2013). Středověk pak přinesl útlum nejen v pokroku medicíny ale i ve využití zvířat pro vědecké poznání. Teprve s renesancí přichází další nástup lékařů a badatelů, jež využívali ke svým experimentům zvířata. Využití zvířat v pokusech se nadále zvyšovalo s rozmachem vědy v 18. a 19. století (Franco 2013).

Ve 20. století byly zakládány chovy laboratorních zvířat a docházelo k celosvětovému využití zvířat v pokusech, což souviselo s rozvojem základního biomedicínského výzkumu a farmaceutického průmyslu (Bártová 2014). Vědci se z počátku zabývali především genetickou variabilitou u outbredních modelů. V roce 1909 byla provedena příbuzenská plemenitba u myší a až o dvacet let později se objevily první inbrední kmeny. Postupně bylo vyvíjeno stále více inbredních kmenů a brzy bylo zjištěno, že mezi kmeny existují inherentní rozdíly v základních biologických parametrech, jako je náchylnost k indukovaným a spontánně se vyskytujícím chorobám. Toto zjištění odstartovalo pokrok v oblasti genetiky a vědci se stále více zdokonalovali v manipulaci s dosud nezjištěným genomem myší. V roce 1976 pak byla vyšlechtěna první geneticky upravená myš a v roce 1987 vědci vyvinuli první knockoutovou myš (Ericsson et al. 2013). Od roku 2002 je známá celá sekvence myšího genomu (Keane et al. 2011).

V současné době se experimentální výzkum na zvířatech obvykle provádí na univerzitách, lékařských fakultách, farmaceutických společnostech, obranných zařízeních a komerčních zařízeních, která poskytují průmyslu služby testování zvířat (Grayson 2000).

Používání zvířat v pokusech musí být v souladu s vědeckými, etickými a právními zásadami (Mapara et al. 2012). S etickými zásadami souvisí i vývoj alternativních metod. Britští vědci William Russel a Rex Burch v roce 1959 v pokusech zavedli zásadu 3R (Hubrecht et al. 2019). Jedná se o zásady pro eliminaci a minimalizaci utrpení laboratorních zvířat. 3R znamená replacement, reduction a refinement.

- Replacement – nahrazení zvířat v pokusech, pokud dosažený výsledek je na stejné, nebo vyšší úrovni
- Reduction – snížení počtu zvířat výběrem vhodných metod či uspořádáním pokusu
- Refinement – zjemnění – optimální výživa, adekvátní zacházení školenými pracovníky, dostatečný prostor pro život, pokusy v anestézii (Davies et al. 2018)

3.2. Laboratorní myš

Laboratorní myš je v současné době jedním z nejčastěji používaných laboratorních zvířat nejen u nás, ale i ve světě. Slouží jako modelový organizmus pro výzkum v oblasti genetiky, psychologie, medicíny a dalších vědních oborech (Green 2007). Díky své krátké generační době, poměrně velkým vrhům, snadnému chovu a viditelným fenotypovým variantám představuje laboratorní myš vhodný animální model (Rixey et al. 2015).

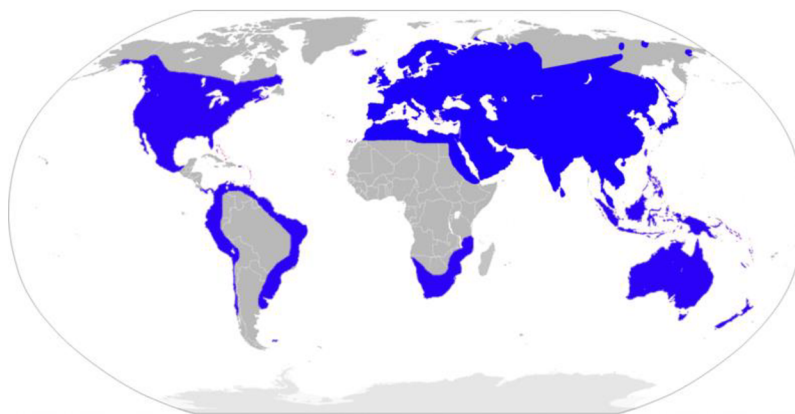
Výzkumy se provádí na speciálních myších vyšlechtěných pro použití v laboratořích. Jejich původ je poměrně dobře známý. Původ moderní laboratorní myši je odvozen od myši domácí, ze které vznikla křížením různých geografických populací. Systematické zařazení laboratorní myši znázorňuje tabulka 1. (Wahlsten 2011).

Tab. 1 Systematické zařazení laboratorní myši

Říše	Živočichové (Animalia)
Kmen	Strunatci (Chordata)
Třída	Savci (Mammalia) Linnaeus, 1758
Podtřída	Živorodí (Theria) Parker, Haswell, 1897
Nadřád	Placentálové (Eutheria) Gill, 1872
Řád	Hlodavci (Rodentia) Bowdich, 1821
Čeleď	Myšovití (Muridae) Illiger, 1811
Rod	Myš (<i>mus</i>) Linnaeus, 1758
Druh	Myš laboratorní (<i>Mus musculus</i>) Linnaeus, 1758

Původní areál rozšíření myši domácí (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) zahrnoval rozsáhlou oblast na jihu Evropy a Asie až po Japonsko. Synantropní způsob života umožnil rozšíření myši prakticky po celém světě (obr. 1). V tak obrovském areálu se vyvinulo mnoho poddruhů (Ballenger 1999).

K domestikaci myši došlo pravděpodobně nejprve v Japonsku a Číně, kde se myši chovaly pro zábavu. Vědecký chov pro laboratorní účely je doložen z let 1907 - 1909, kdy byl Clerencem C. Littlem vyšlechtěn první kmen inbredních myší (Festing et al. 2000).



Obr. 1 Areál rozšíření myši domácí (upraveno dle Musser et al. 2016)

3.2.1. Kmeny laboratorních myší a jejich použití

Praktické využití jednotlivých kmenů laboratorních myší ve výzkumu se primárně odvíjí od charakteristiky daného kmene. Kmeny jsou často vytvářeny za konkrétním účelem, a to až do takové hloubky, že mohou umožňovat studium konkrétních genů (Vychodilová et al. 2019). V současné době lze odhadnout, že se ve světě chová více než 1000 inbredních kmenů myší, od nichž se odvozuje řada kmenů outbredních (Jebavý et al. 2014).

Celosvětově se chovají a používají zejména tyto kmeny myší:

- Inbrední: C57BL, BALB/c, C3H, DBA
- Outbrední: ICR, NMRI, MF1, Swiss (Johanson 2012)

Inbrední kmeny laboratorních myší

Pro řadu vědeckých výzkumů je potřeba fenotypová stabilita. Tu získáme pomocí inbreedingu. Inbredního kmene se docílí příbuzeneckou plemenitbou. Výsledkem příbuzenecké plemenitby dochází ke snížení genetické variability, což vede k žádané fenotypové stabilitě (Suckow et al. 2000). Myši konkrétního inbredního kmene pocházejí z více než dvaceti sourozeneckých nebo filiálních spojení. Jedinci inbredního kmene jsou považováni za geneticky identické a fenotypové variace jsou způsobeny rozdíly v prostředí (Davisson 1998). Inbrední kmeny lze také vytvořit pomocí technologie „Knockout“. U těchto myší je gen znefunkčňen komplexním procesem zvaným homologní rekombinace (Suckow et al. 2000).

U inbredních kmenů hrozí vlivem časté příbuzenecké plemenitby inbrední deprese. Vlivem inbrední deprese nastávají komplikace s plodností, vrhy jsou menší a jedinci jsou drobnější (Tuttle et al. 2018).

Je také nutno respektovat odlišnost inbredních zvířat od myší divokých. Všechny inbrední kmeny jsou oproti divokým formám konstitučně oslabeny. Jsou chovány při stálé teplotě a optimálním mikroklimatu, dostávají krmné granulované směsi obsahující všechny potřebné živiny. Některé chovy jsou drženy ve sterilních podmínkách. Inbrední myš nemá šanci ve volné přírodě přežít (i bez predátorů) (Nádeníček et al. 2017).

Outbrední kmeny laboratorních myší

Outbrední kmeny jsou geneticky heterogenní populace, které vznikají nepříbuzeneckou plemenitbou. Jedinci jsou do chovných párů vybíráni náhodně. Aby koeficient inbreedingu zůstal co nejnižší, neměli by mít tito jedinci společné předky minimálně 8 generací. Nejlepší chovnou metodou je použití jedinců z různých populací (Yalcin et al. 2010).

Každý jedinec je geneticky jedinečný, tudíž odlišný od ostatních. Outbrední populace nejsou geneticky definované, ale mohou mít některé společné rysy. Výhodou outbredních kmenů je vysoká produktivita, vyšší fertilita a odolnost vůči nemocem. Proto se jedná o levnější a dostupnější kmeny (Churchill et al. 2012).

Outbrední laboratorní zvířata se využívají tehdy, když jejich genetická variabilita není omezujícím faktorem, nebo když je naopak žádoucí. Je třeba zdůraznit, že i když jsou tato zvířata geneticky variabilní, chovatelské postupy splňují určitou standardizaci jednotlivých kmenů (Vychodilová et al. 2019).

3.2.2. Etologie myši domácí

Myši jsou hlodavci se soumráchnou až noční aktivitou (Rixey et al. 2015). Publikovaný výzkum ukazuje, že myši jsou vnímavá, emocionální a značně inteligentní zvířata. Myši mají čichové, akustické, chuťové a somatosenzorické vnímání (Burn 2008). Hlavními smysly, které myš využívá pro kontakt s okolím jsou čich a hmat. Čich využívají při komunikaci mezi jedinci a hmat pro orientaci v prostoru. Jejich sluch se vyznačuje zejména tím, že je schopen zachytit i tzv. ultrazvuk až do výše kolem 100 kHz. Zrak u myší není dokonalý, a proto raději spoléhají na ostatní smysly (Ericsson et al. 2013).

U myší pozorujeme široký repertoár přirozeného chování. Chování je výrazem přizpůsobení se různým vnitřním a vnějším podmínkám a lze ho popsat jako reakci zvířete na různé podněty (Oktiansyah 2019).

Sexuální chování myši

Sexuální chování představuje řetězec fyziologických a behaviorálních reakcí začínající námluvami a vedoucí ke kopulaci. Tyto reakce, které se projevují sexuálně dimorfním způsobem, jsou regulovány pohlavními steroidními hormony (Mhaouty-Kodja et al. 2018).

Myši dosahují pohlavní dospělosti ve věku asi 6 až 8 týdnů. Samice mohou mít až 15 vrhů ročně a mohou znovu zabřeznout do 24 hodin po porodu. Průměrná doba březosti u myší je 19 až 21 dní (Quesenberry et al. 2020).

Samci hlodavců vyjadřují sexuální chování, kdykoli v přítomnosti vnímavé samice. Samec zjišťuje říji samice olizováním a očicháváním jejích genitálií, později ji následuje a snaží se o kopulaci. Samci v reakci na samice ultrazvukově vokalizují (Bean 1982). Samice myší jsou ochotné se pářit jen jeden den během svého 4–5 denního ovulačního cyklu. Estrální cyklus je

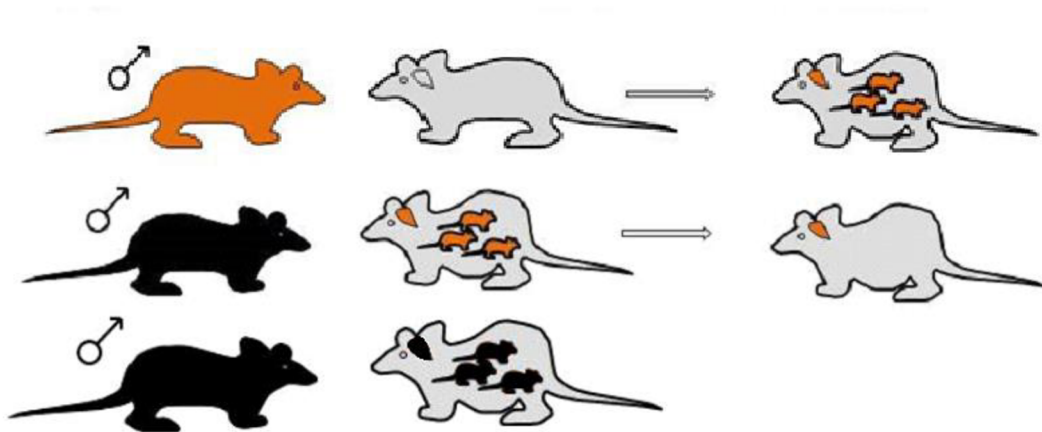
rozdělen do čtyř fází: proestrus, estrus, metestrus a diestrus. Samice mohou zabřeznout pouze tehdy, když dojde k ovulaci (Yeadon 2014).

U samice, které se spářily, je možné pozorovat viskózní vaginální zátka. Zátka je tvořena sekrety semenných váčků, které společně se sekrety prostaty a dalších přídatných žláz po ejakulaci v reakci s vaginálním sekretem koagulují. Zátka vyplňuje vaginu samice a slouží k zamezení odtoku spermatu z vaginy. Rozpouští se 8-24 hodin po páření (Yeadon 2014).

Rodičovské chování myši

Konečným cílem reprodukčního chování savců je přenos genetické informace z jedné generace na druhou. K dosažení tohoto cíle je nezbytná adekvátní rodičovská péče a úspěšný odchov potomků do reprodukčního věku. Rodičovské chování je soubor činností, které mohou být ovlivněny množstvím vnitřních a vnějších faktorů (Lonstein et al. 2002).

U myši lze pozorovat jev, kdy samice fyziologicky blokuje březost. K tomu dochází tehdy, když je ohroženo přežití potomků, zejména po vystavení přítomnosti, nebo pachu neznámého samce, u kterého je předpoklad, že by narozená mláďata po porodu zabil. Proto je pro samici výhodnější březost ukončit, navrátit se do říje a spářit se s tímto, nově přichozícím samcem (obr. 2). U myši lze březost ukončit pouze před implantací embrya, ale jiné druhy savců přerušují i pozdní fázi gestace. Tuto schopnost poprvé zaznamenala v roce 1959 Hilda M. Bruce a podle ní byla pojmenovaná jako Bruceův efekt (Avram et al. 2017).



Obr. 2 Blokace březosti za přítomnosti cizího samce a následná gravidita s nově přichozícím (převzato z Shaul 2019)

Rodičovské chování u myši zahrnuje dvě obecné kategorie reakcí: aktivní chování a klidové chování. Mezi aktivní rodičovské chování patří stavba hnízda, přenášení mláďat z jednoho místa na druhé a přímá péče o mláďata, jako je například olizování. Provádění aktivního rodičovského chování a jiných nerodičovských činností je proloženo relativním klidem, kdy se rodiče přestanou pohybovat a ulehnu do hnízda s mláďaty. Velká část tohoto klidového času je strávena kojením v různých kojících polohách (Lonstein et al. 2002).

Před samotným porodem samice neklidně pobíhá a přenáší materiál na stavbu hnízda. Materiál, který není dost jemný, upraví svými zuby. Hnízdo staví v nejtemnějším a nejteplejším

koutě. Často lze pozorovat stavbu společných hnízd pro více samic. Zde potom společně pečují o mláďata téměř výhradně samice shodného genotypu (obvykle ale nikoli výhradně jde o sestry) (Nádeníček et al. 2017).

Porody probíhají většinou od půlnoci do rozbřesku v závislosti na světelné periodě. Při porodu matka protrhne plodový vak a překousne pupeční šňůru. Novorozené mládě dočista olíže, pozře plodové obaly a placentu a obdobně se pak postará o každé následující mládě. V prvních 8 až 10 dnech po porodu odstraňuje matka olizováním mléčný trus a moč mláďat. Olizování svými masážními účinky povzbuzuje činnost střev. Krmení a odchov mláďat jsou výhradně starostí matky. Laktace trvá tři týdny (Nádeníček et al. 2017).

Potravní chování myši

Myši jsou všežraví hlodavci; konzumují širokou škálu semen, obilí, kořínků a jiné potraviny rostlinného původu. Konzumují také potravu živočišnou, nejčastěji hmyz a mršiny. Požadavky myši na živiny jsou definovány několika různými kritérii jako růst, reprodukce, věk (Hintz et al. 1995).

Toto chování kromě samotné konzumace zahrnuje explorační chování (Ellacott et al. 2010).

Pohybová aktivita

Největší denní aktivitou dospělých a juvenilních myši je lokomoce (Oktiansyah 2019). Pohybová aktivita je klíčovým ukazatelem pohody zvířat a je nezbytná k udržení zdraví orgánových systémů na buněčné, molekulární a tkáňové úrovni (Poffé et al. 2018). Mezi pohybovou aktivitu typickou pro myši patří explorační chování. Explorační chování je prozkoumávání neznámého prostředí (Bowler et al. 2005). Explorace okolí jedincem je z evolučního hlediska velmi důležitá. Umožňuje hledání potravy, úkrytů, partnerů atd. Znalost okolí současně snižuje rizika při aktivitě, např. nepřátelským střetům s jedinci vlastního druhu či s predátorem (Augustsson et al. 2005).

Spánek a odpočinek

Spánek a odpočinek u myši probíhá přes den, jelikož jsou to tvorové noční. K odpočinku uléhají po několika hodinách aktivity, aby se obnovila hladina energie (Fisher et al. 2012). Myši ve většině případech spí, nebo odpočívají společně. Dokonce i myši s přirozeně vysokou úrovní agresivity, uléhají ke skupinovému spánku (Fisher et al. 2012).

Komfortní chování

U myši často pozorujeme komfortní chování. Jedná se o péči o srst neboli grooming (Nádeníček et al. 2017). Vlastní péče o srst je běžné chování hlodavců a má uspořádaný cefalokaudální postup od olizování končetin k hlavě, tělu, genitáliím a ocasu (Denmark et al. 2010). Ve skupině myši se vyskytuje také allogrooming - vzájemná péče o srst mezi členy kolonie (Nádeníček et al. 2017).

3.2.3. Sociální způsob života myši

Myši patří mezi sociálně žijící hlodavce, kdy je ve skupinách ustanovena hierarchie, a to jak mezi samci, tak i mezi samicemi (Suckow et al. 2005). Myš domácí je obecně považována za teritoriální i koloniální druh (Ballenger 1999).

Myši jsou ve svém sociálním chování velmi přizpůsobivé. Nejvýraznějším příkladem této plasticity v přírodě je adaptace na hustotu populace. Při nízké populační hustotě žijí myši v rodinných skupinách. Tu tvoří dominantní samec se samicemi a jejich potomky. Myši na svém vybraném území projevují teritoriální chování vůči vetřelcům. Dospělí samci hlídkují na hranicích teritoria a močí označují vlastní území. V případě setkání s vetřelcem se samec chová agonisticky, nebo agresivně, což vede k boji, nebo útěku vetřelce. Takové teritoriální chování může přetrvávat v případě, že k invazím na území dochází jen zřídka (Wang et al. 2014).

Při vysokých populačních hustotách se myši stávají sociálně teritoriálními a přizpůsobují se despotickému sociálnímu systému, kde je jeden dominantní samec a ostatní samci podřízení. Agonistické chování dominantního samce slouží k upevnění sociální hierarchie a zamezení bojů. Pouze v případě, že podřízený nereaguje vhodným submisivním chováním, použije dominantní jedinec násilí (Wang et al. 2014).

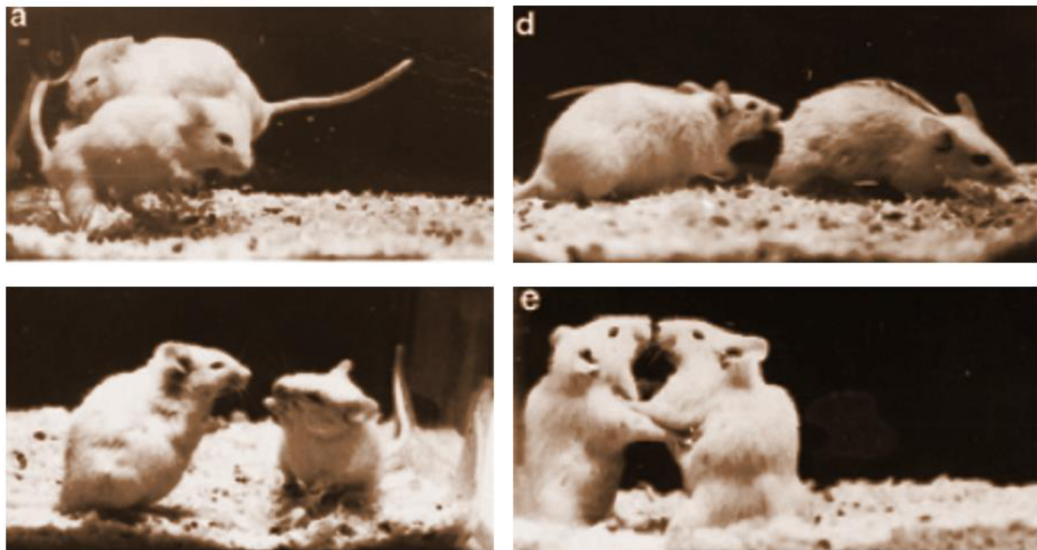
Možnosti a způsoby, jak se zvíře chová ve společnosti svého druhu, jsou přímo ovlivněny postavením jedince vůči ostatním členům skupiny. Toto postavení závisí na řadě vlastností jedince, zejména na velikosti, věku, zdravotním stavu, zkušenosti a síle a dynamicky se mění tak, jak se mění tyto faktory (Manning et al. 2009). Pozice v hierarchii může určovat přístup k důležitým zdrojům, jako je potrava, voda a potenciální sexuální partneři, přičemž dominantní zvířata získávají přednostní přístup (LeClair et al. 2021).

Hierarchie u myši

Způsob uspořádání society, nebo rodiny nazýváme hierarchie. Hierarchie je ustálená, jestliže je snížen počet konfliktů mezi jedinci způsobem, že jedni ustupují druhým a poskytují jim přístup ke zdroji bez boje. Toto se děje na základě zkušeností z předchozích agonistických interakcí (Veselovský 2005). Tyto interakce mohou být nekrvavé, doprovázené řadou prvků ritualizovaného chování, někdy však bývají velmi prudké a mohou vést až k usmrcení submisivního jedince (Nádeníček et al. 2017).

Samotný útok je pak velice rychlý. Útočník se přiblíží k boku druhého jedince a kousnutí je nejčastěji mířeno do kořene ocasu. Dalším agresivním krokem může být neustálé pronásledování vyúsťující v aktivní napadení, nejčastěji kousnutí. Dojde-li ke střetu, lze pozorovat jev zvaný „boxing“. Jedná se o druh souboje mezi dvěma jedinci spočívající v aktivním postoji na zadních končetinách a cílených úderech nadřazeného jedince do břišní krajiny submisivního jedince. Celý boj je doprovázen hlasitou vokalizací (obr. 3) (Van Loo et al. 2000).

K těmto agresivním bojům dochází především mezi samci. Cílem je nastavení hierarchie skupiny jako celku (Suckow et al. 2005). Samice vykazují výrazně menší agresivitu a k soubojům dochází velmi zřídka (Ballenger 1999).



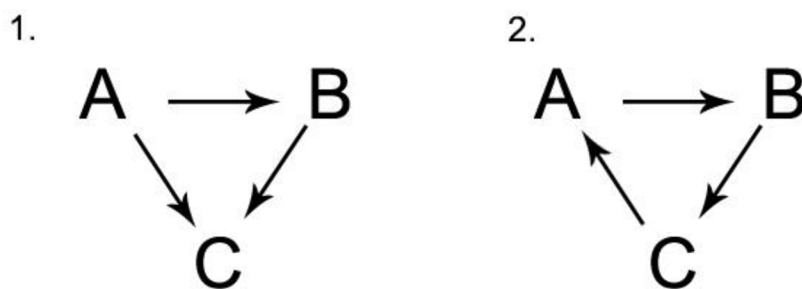
Obr. 3 Agonistické chování laboratorních myší (Miczek et al. 1978)

Skupinu vede nejsilnější jedinec, který se stává tzv. alfa samcem. Pro udržení hierarchie jsou nutná občasná varování či hrozby, které alfa samce udrží ve své pozici. Pokud protivník po hrozbě neustoupí, dochází opakovaně k agresivitě (Crowcroft 1955).

Dominanční hierarchii mezi sociálně žijícími druhy zvířat poprvé popisuje Schjelderup-Ebbe ve své práci o kuru domácím (*Gallus gallus domesticus*) z roku 1922. Ve své práci popisuje dominantní vztahy následovně: „jestliže jedinec A klove do jedince B, zatímco B mu oplácí jen zřídka či vůbec, pak je A dominantní nad B a B je podřízen A“.

Drews v roce 1993 na základě práce *Gallus gallus domesticus* (Schjelderup-Ebbe 1922) zavádí vlastní definici pojmu dominance, která byla pro svou jednoduchost a výstižnost široce přijata: „Dominance je atribut vzoru opakovaných agonistických interakcí mezi dvěma jedinci, charakterizovaný konzistentním výsledkem ve prospěch stejného člena dyády a standardní ústupkovou reakcí jeho protivníka. Postavení opakovaného vítěze je dominantní, u opakovaného poraženého podřízené“.

Je-li dominantní hierarchie ve skupině ustálená, může být charakterizována dvěma základními vlastnostmi - linearitou a strmostí (Vries et al. 2006). V dokonale lineární hierarchii pozorujeme všechny transitivní vztahy, což znamená, že pokud jedinec A dominuje jedinci B a B dominuje jedinci C, pak jedinec A musí dominovat jedinci C (příklad uvedený na skupině třech zvířat) (obr. 4.1). Některé hierarchie jsou pouze blízké linearitě, neboť obsahují zvraty, kdy podřízené zvíře zvítězí ve střetu s nadřazeným - netransitivní (cirkulární, kruhové) vztahy (obr. 4.2.) (Bernstein 1981).



Obr. 4 Znárodnění transitivity (1.) a netransitivity (2.) vztahů (Bernstein 1981)

Strmost hierarchie vypovídá o schopnosti jedince dominovat nad ostatními zvířaty ve skupině (vítězit v agonistických střetech). Jsou-li tyto rozdíly velké, označujeme hierarchii jako strmou, jsou-li malé, pak ji označujeme jako pozvolnou (Vries et al. 2006).

Hierarchie laboratorních myší držených v kleci

Protože stejné uspořádání rodin, jaké by se vyskytovalo přirozeně v přírodě není při chovu v laboratoři proveditelné, lze místo toho zavést skupinové ustájení myší stejného pohlaví, aby se splnila jejich potřeba sociální interakce. V mnoha případech však bude docházet k soubojům. Uzavřený chov a striktně vymezené prostorové podmínky vedou ke stresu submisivních jedinců a k následným zraněním způsobených absencí úkrytů či možností úniku (Olsson et al. 2007).

Ve skupinách složených pouze ze samců laboratorních myší byla pozorována lineární hierarchie s transitivity vztahy. Jedná se o nejjednodušší typ hierarchie, kdy vrchol představuje alfa samec, naopak nejnižší postavení zaujímá omega samec. Schématické znázornění vztahů mezi jedinci ukazuje obrázek 5 (Veselovský 2005).

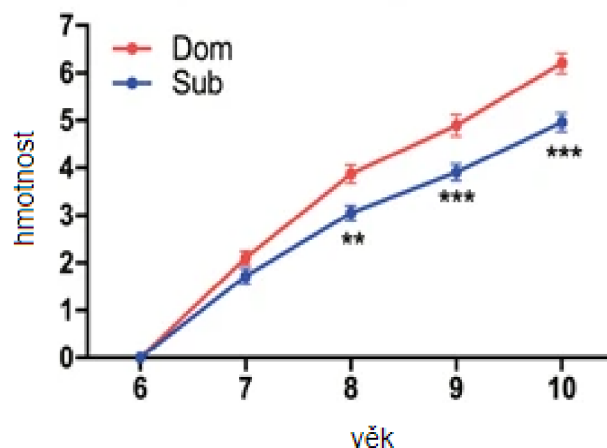


Obr. 5 Lineární hierarchie s transitivity vztahy ve skupině čtyř samců (převzato z Wang et al. 2011)

Postavení v hierarchii

Konečné postavení v hierarchii je ovlivněno vlastnostmi jedince. Mezi tyto rozhodující vlastnosti patří především velikost, síla a věk (Crowcroft 1955). Dominance u hlodavců jednoznačně souvisí s tělesnou hmotností. Bylo prokázáno, že podřízení samci myši mají mnohdy nižší tělesnou hmotnost než alfa samci (obr. 6) (Flannelly et al. 1977).

Hilakivi et al. (1990) uvádí hmotnost i jako faktor agresivity – čím byl jedinec těžší, tím déle trvaly jeho agresivní projevy. Williamson et al. ve své práci z roku 2017 uvádí, že samci kmene Crl:CD1 ve věku 7 týdnů stáří, chovaní ve skupině, vykazovali odlišnou hmotnost dle sociálního postavení. Podřízení samci měli tendenci k nižší tělesné hmotnosti. Tělesná hmotnost alfa samců byla $\pm 34,06\text{g}$, podřízení samci měli hmotnost $\pm 33,23\text{g}$. Výraznější rozdíl hmotnosti pozoroval Parmigiani a Pasquali (2009), kteří popsali agresivní reakce myši vůči jedincům s odlišným sociálním statutem. V pokusu použili myši kmene swbs oul. Při celkové analýze pokusu došli k jasnému výsledku. Dominantní, útoční samci byli výrazně těžší než podřízení samci. Průměrná hmotnost dominantních samců byla $\pm 32,35\text{g}$, zatímco u podřízených jedinců byla hmotnost $\pm 29,77\text{g}$. Je tedy zřejmé, že tělesná hmotnost a dominance jedince spolu úzce souvisejí.



Obr. 6 Vliv sociálního postavení na hmotnost jedince (Horii et al. 2017)

Vyšší tělesná hmotnost u dominantních jedinců má své opodstatnění, neboť těžší zvířata mají větší predispozice zvítězit nad ostatními v konfliktních situacích a stát se tak nejvýše postavenými členy sociální skupiny (Drickamer et al. 1973). Po opakovaně prohraném agresivním střetu s dominantním jedincem pak podřízené zvířate, často vlivem stresu či zranění dále ztratí ze své tělesné hmotnosti, naopak jedinci dominantní si svou hmotnost uchovají, neztratí na hmotnosti, čímž se rozdíl ještě více prohloubí (Blanchard et al. 1992).

Podřízenost sebou nese kromě fyzických stresorů také řadu stresorů psychických. Podřízená zvířata chovaná skupinově v laboratoři navíc mají relativně málo možností, jak se s tímto stresem vyrovnat. Jednou z možností je přenést agresivní frustraci na někoho s nižším postavením. V rámci klasického obrazu hierarchie dominance tedy podřízená zvířata trpí nadměrným fyzickým a psychickým stresem (Sapolsky 2004).

3.2.4. Stres způsobený sociálním postavením ve skupině

Dominanční hierarchie existuje u mnoha sociálních druhů a postavení v ní může ovlivnit kvalitu života jedince (Sapolsky 2004). Agresivní projevy a budování hierarchie jsou úzce spjaty se stresem a stresovou reakcí (Loveland et al. 2014). Stres je přirozeně se vyskytující nespecifická reakce organismu na mimořádně náročné situace (Quick et al. 2008). Sociální postavení může dramaticky ovlivnit i zdraví jedince, zejména pokud jde o nemoci související se stresem (Sapolsky 2004).

Základním kamenem fyziologie je homeostáza. Jedná se o stav, kdy jsou různé fyziologické ukazatele, jako je krevní tlak, srdeční frekvence, tělesná teplota na své optimální úrovni (Schulkin 2013). Pro zdraví je zásadní udržení této fyziologické rovnováhy. Tato rovnováha ovšem bývá narušována stresory, fyzickými, nebo psychickými faktory a nastává stres, neboli stav homeostatické nerovnováhy. Tělo obnovuje homeostázu tím, že mobilizuje nervové a endokrinní adaptace, které dohromady tvoří reakci na stres (Sapolsky 2004).

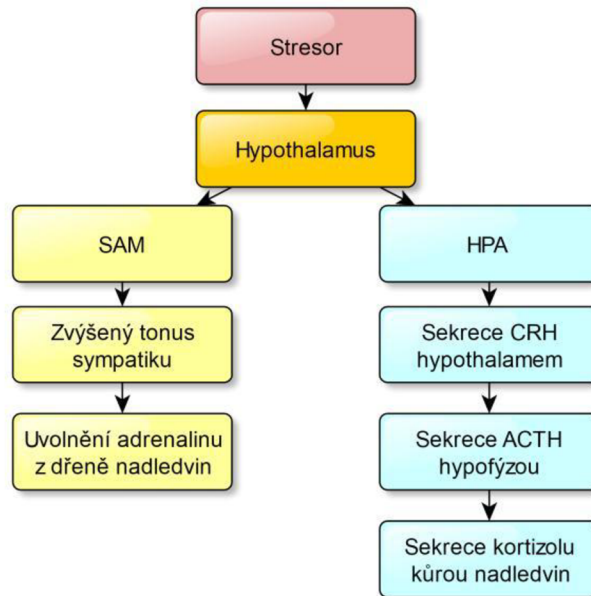
Prostředí vytváří velké množství prostředků, které narušují homeostázu myši. Útěk před predátorem, pronásledování kořisti, trvalé sucho nebo obtěžování sociální podřízeností – to vše narušuje homeostázu a mobilizuje stresovou reakci. Taková reakce může být život zachraňující, a to především při akutním fyzickém stresu. Nicméně nadměrná aktivace stresové reakce při chronickém stresu může být patogenní (Sapolsky 2004).

Patologie chronického stresu vznikají proto, že stresová reakce je neustále aktivována. Energie je neustále mobilizována, a proto se neukládá, což vede k atrofii svalů a únavě. Vyskytují se poruchy trávení, růstu, reprodukce a zhoršení obranyschopnosti. Ačkoli krátkodobý stres zlepšuje poznávání, chronický stres ho narušuje a zhoršuje synaptickou plasticitu i vznik nových neuronových spojů. Může docházet i k úmrtí neuronů (Sapolsky 2004).

Vlivem stresu mají jak podřízení, tak dominantní myši chování ve skupině tendenci vykazovat orgánové změny ve srovnání s jednotlivě chovanými jedinci. Dochází k zvětšování nadledvin a sleziny a zmenšení brzlíku. Zdá se však, že tyto změny jsou výraznější u podřízených a pouze podřízení vykazují sníženou váhu varlat. Lze také pozorovat změny hormonální (Blanchard et al. 1993).

Bylo zjištěno, že sociální prostředí je klíčovým modulátorem těchto změn. V sociálních hierarchiích s vysoce agresivními alfa samci, kteří sociálně potlačovali ostatní členy skupiny, byly pozorovány nižší hladiny cirkulujícího testosteronu u podřízených samců. Tito podřízení samci naopak vykazovali vyšší hladiny cirkulujícího kortikosteronu oproti alfa samcům (Williamson et al. 2017).

U savců aktivuje působení stresoru dvě osy: sympato-adreno-medulární osa (SAM) a hypothalamo-hypofyzární-adrenální osa (HPA) (obr. 7) (Breuner et al. 2002). Následné reakce slouží k posílení a pomoci tělu se s emocí vypořádat (Levine 2008).



Obr. 7 Nejdůležitější stresové osy: sympato-adreno-medulární osa a hypothalamo-hypofyzární-adrenální osa (Tomenendalová et al. 2018).

SAM osa stimuluje produkci katecholaminů (adrenalinu a noradrenalinu) z dřeně nadledvin a je řízena hlavně sympatickým nervovým systémem. Je tedy velmi rychlá, adrenalin (resp. noradrenalin) je vylučován během několika vteřin nebo minut. Adrenalin je syntetizován především v dřeni nadledvin, noradrenalin může být tvořen i v centrálním nervovém systému. Prekurzor noradrenalinu a adrenalinu, dopamin, je možné nalézt jak v dřeni nadledvin, tak v noradrenergických neuronech. Sám dopamin působí jako neurotransmitter v sympatických gangliích. Přeměnu noradrenalinu na adrenalin indukuje kortizol. Katecholaminy jsou ve vyšší míře syntetizovány a secernovány při stresových situacích (Breuner at al. 2002). Tyto hormony umožňují zvířeti fyziologicky reagovat na zátěžovou situaci, a překonat působení stresoru. Reakce na stresor je pak boj, útěk nebo znehybnění (Levine 2008).

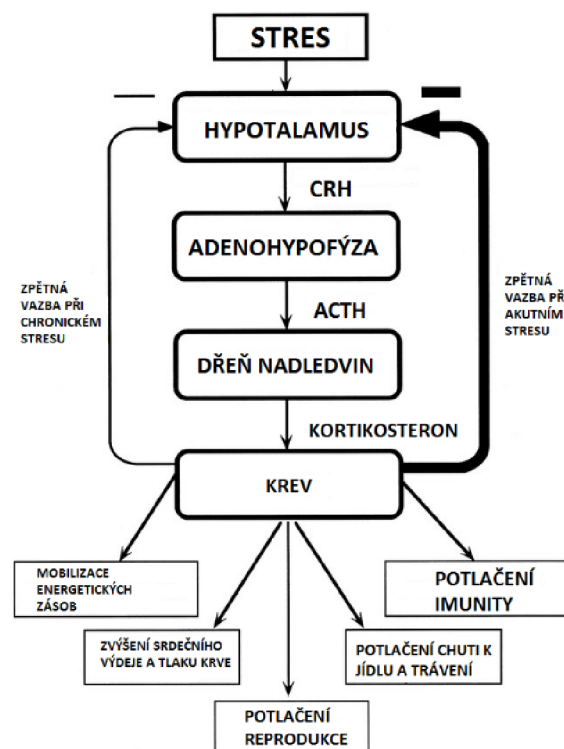
Příprava organismu na boj, nebo útěk se děje několika cestami. Noradrenalin a adrenalin se vážou na dvě skupiny adrenergických receptorů, α a β . Prostřednictvím β receptorů způsobují zvýšení srdeční frekvence i síly stahu srdce, noradrenalin navíc prostřednictvím α receptorů způsobuje vazokonstrikci v periferních tkáních, které nejsou bezprostředně nutné v ohrožující situaci (např. gastrointestinální systém), a tím zvyšuje krevní tlak (Breuner at al. 2002).

Epinefrin stimuluje glykolýzu, glukoneogenezi a lipolýzu, což pomáhá udržovat pohotový zdroj energie potřebný pro mozek, ostatní životně důležité orgány a pro kosterní svaly (Levine 2008). Zvýšený metabolismus také způsobí kalorigenní účinek katecholaminů. Katecholaminy zvyšují bdělost a zlepšují kognitivní funkce. Všechny tyto účinky připravují tělo na zátěžovou situaci a pomáhají tak překonat působení stresoru (Breuner at al. 2002).

Druhou stresovou osou je HPA osa, která je čistě hormonální. HPA osa je zodpovědná za neuroendokrinní adaptační složku stresové reakce (Levine 2008). Tato odpověď je charakterizována hypothalamickým uvolňováním faktoru uvolňujícího kortikotropin (CRF). CRF

je také známý jako CRH nebo hormon uvolňující kortikotropin. Když se CRF naváže na CRF receptory na přední hypofýze, uvolňuje se adrenokortikotropní hormon (ACTH). ACTH se váže na receptory v kůře nadledvin a stimuluje uvolňování kortizolu nadledvinami (obr. 8). V reakci na stresory se kortizol uvolňuje několik hodin po setkání se stresorem. Při určité koncentraci kortizolu v krvi je této ochrany zdánlivě dosaženo a kortizol vyvíjí negativní zpětnou vazbu na hypotalamické uvolňování CRF a hypofyzární uvolňování ACTH. V tomto okamžiku se vrací systémová homeostáza (Veldhuis et al. 2013).

Pokud je ovšem osa stimulovaná po delší dobu, nebo přerušovaně, ale pravidelně, má za následek potogenní změny v těle (Mcewen et al. 2011). Dlouhodobá stimulace má totiž antiproduktivní, protirůstové, katabolické a imunosupresivní účinky (Ladewig 2000).



Obr. 8 Znárodnění HPA osy a jejích hlavních účinků (Boonstra et al. 1998).

Vědecké studie potvrzují, že jedinci, kteří prožili déletrvající, nebo opakující stres, mají v budoucnu zvýšené riziko vzniku úzkostných poruch. Traumatický prožitek působením stresových hormonů změni neuronální spoje v některých částech mozku. HPA, která se aktivuje při stresu, stejně jako porucha ve funkci mozkových přenašečů (neurotransmitterů) hraje v etiologii úzkostných poruch zásadní roli. Obě poruchy jsou podkladem neurobiologických změn v centrálním nervovém systému. Zvýšená aktivita CRF zprostředkovává vztah mezi stresem a biologickým podkladem strachu a úzkosti (Heim 2003).

Tyto změny naznačují, že chronický stres způsobený sociálním postavením, může být zvláště relevantním modelem pro zkoumání behaviorálních, nervových a endokrinních korelátů chronického stresu a úzkosti (Blanchard et al. 1993).

3.3. Emoce, vznikající jako reakce na stres

Po dlouhou dobu byly emoce považovány za jedinečné pro lidské bytosti a byly studovány hlavně z filozofické perspektivy. Evoluční teorie a pokrok ve výzkumu mozku a chování postupně zavedly studium emocí do oblasti biologie a pochopení mechanismů, funkcí a evolučního významu emočních procesů se stálo hlavním cílem moderní neurovědy (Steimer 2002).

Moderní éra výzkumu emocí pravděpodobně začala, když se ukázalo, že emoce nejsou jen „pocity“ nebo duševní stavy, ale jsou doprovázeny fyziologickými a behaviorálními změnami, které jsou jejich nedílnou součástí. To postupně vedlo k dnešnímu pohledu na emoce, které jsou prožívány, nebo vyjadřovány na třech různých, ale úzce provázaných úrovních: na mentální nebo psychologické úrovni, na (neuro)fyziologické úrovni a na úrovni chování (Steimer 2002).

Psychologové James a Carla Langeovi (1885) předpokládají, že fyziologické stresové reakce (např. zvýšená srdeční a dechová frekvence) se objevují jako první a až tyto reakce vedou k pocitům, jako je strach a úzkost. Jiní tuto teorii kritizují a tvrdí, že jsou to emoce, které předchází stresu a způsobují fyziologickou reakci, která slouží jako sekundární pomocný mechanismus umožňující zvířeti na situaci reagovat (LeClair 2005).

3.3.1. Strach

Strach je jednou z vývojově nejstarších emocí (Nezbeda 2020). Strach je složitá fyziologická, behaviorální a emocionální reakce na hrozící nebezpečí (Kozłowska et al. 2015). Zvíře má nejčastěji strach z napadení predátorem, nebo dominantním jedincem vlastního druhu (Ballenger 1999).

Následná fyziologická reakce má za následek zvýšení srdeční frekvence, zvýšenou frekvenci dýchání, pocení, třes a časté je i močení a defekace. Behaviorálně bude zvíře při strachu vykazovat změny v držení těla a aktivitě. Zvíře se může zapojit do vyhýbavé reakce, jako je útěk nebo ukrytí se. Bojácné zvíře může zaujmout ochranné polohy těla, jako je snížení těla a hlavy, umístění uší blíže k hlavě a bude mít rozšířené zorničky (Horwitz 2013).

Hlavní funkcí strachu je působit jako signál nebezpečí, hrozby nebo motivačního konfliktu a tím započne spouštění vhodné adaptivní reakce. Etologové definují strach jako motivační stav vyvolaný specifickými podněty, které dávají podnět k obrannému chování nebo útěku. Zvířata se mohou naučit mít strach ze situací, ve kterých byla dříve vystavena bolesti nebo stresu, a následně projevit vyhýbavé chování, když se s touto situací znovu setkají (McFarland 1989). Této vlastnosti se říká paměť strachu a u myši byla vyvolána například stresem ze sociální porážky, kdy zažívaly fyzický a psychický stres způsobený útoky agresivního jedince (Sun et al. 2019). Tato paměť strachu pravděpodobně způsobuje úzkost (Sun et al. 2019).

3.3.2. Úzkost

Úzkost je určitá forma strachu. Zatímco strach je odpověď na známé vnější nebezpečí, úzkost je generalizovaná reakce na neznámou hrozbu nebo vnitřní konflikt (Nezbeda 2020). Beck a Emery (2005) napsali, že „Strach zahrnuje vědomé hodnocení ohrožujícího podnětu; úzkost zahrnuje emocionální reakci na toto hodnocení.

V diagnostické nosologii jsou úzkostné poruchy v zásadě chápány jako narušení emočního zpracování, konkrétněji přehnané sklony k obranné reakci na podněty, které jsou typicky vnímány jen jako mírně ohrožující nebo dokonce neškodné (McTeague et al. 2012).

Úzkost je z lékařského (psychiatrického) pohledu složitá kombinace emocí, zahrnující strach, zlé předtuchy a obavy. Úzkost je nejčastěji způsobena přemírou stresu, jehož spouštěčem může být jakákoliv událost. Problém nastává v momentě, kdy tento stav nemizí ani poté, co náročné životní okolnosti pominuly. Pokud jedinec pociťuje permanentní napětí a strach, doprovázený dalšími neurotickými projevy, mluvíme o úzkostné poruše (Knotková 2019).

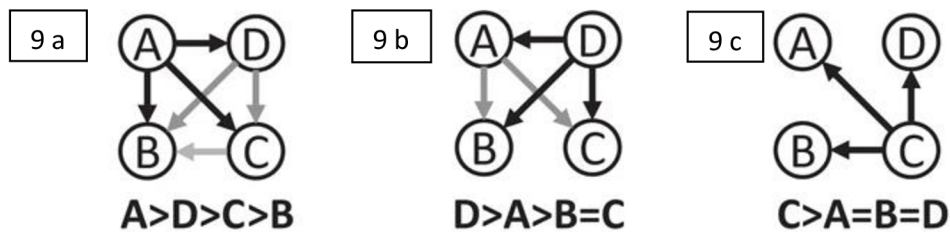
Postižený jedinec má většinou strach z neurčitého nebezpečí, na které jeho tělo reaguje stejně jako v případě reálné hrozby. Příznaky úzkosti jsou charakterizovány zvýšeným vzrušením, očekáváním, autonomní a neuroendokrinní aktivací a specifickými vzory chování, často s přechodem od běžného chování (např. průzkum, krmení) k útěku, nebo naopak k znehybnění či jinému obrannému chování. Funkcí těchto změn je usnadnit zvládnání nepříznivé nebo neočekávané situace. Pokud však adaptivní funkce úzkosti není úspěšná, úzkost se může stát patologickým stavem, který může později narušovat schopnost vyrovnat se s různými výzvami nebo stresujícími událostmi v každodenním životě (Steimer 2002).

Zvířecí modely poruch chování souvisejících s úzkostí poskytly silné důkazy o úloze stresu na epigenetickou kontrolu osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) a oblastí mozku reagujících na stres. Proto je řada podtypů úzkostných poruch považována za „související se stresem“ (Barlett et al. 2017).

Úzkost související se stresem ze sociálního postavení

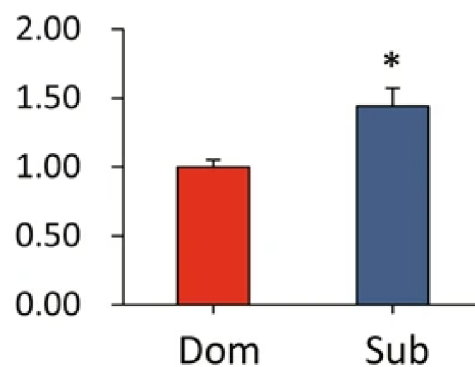
Nedávné studie zdůraznily, že hlavní příčinou chronického stresu, který způsobuje úzkost u myší je jejich sociální postavení ve skupině (Larrieu et al. 2018).

Horii a jeho tým v roce 2017 provedli studii, v které sledovali agonistické chování u myší ve 40 klecích. V každé kleci žili společně 4 samci kmene C57BL/6NCrSlc (B6) ve věku šest týdnů. Na základě pozorování agonistického chování zaznamenaného bezprostředně po výměně podestýlky nebo po vypnutí osvětlení bylo určeno sociální postavení každé myši (obr. 9). Myš, která vykazovala útočné chování a vyvolala submisivitu u všech ostatních myší, byla označena jako dominantní. V klecích, které analyzovali, byly pozorovány tři hierarchické struktury. Byly to: Typ 1 - jedna dominantní myš a jedna podřízená myš (obr. 9 a); Typ 2 - jedna dominantní myš a dvě podřízené myši (obr. 9 b); a Typ 3 - jedna dominantní myš a tři podřízené myši (obr. 9 c) (Horii et al. 2017).



Obr. 9 Stanovení sociální hierarchie v kleci skupinově ustájených samců (Horii et al. 2017)

Měření úrovně stresu u dominantních a podřízených samců přineslo očekávaný výsledek. Úrovně stresu u dominantních a podřízených samců myší byly hodnoceny srovnáním exprese genu pro hormon kortikotropin v hypotalamu. Koncentrace kortikotropinu mRNA byla významně vyšší u podřízených než dominantních samců (obr. 10). Tyto výsledky naznačují, že podřízení samci měli tendenci být v domácí kleci více stresováni (Horii et al. 2017).



Obr. 10 Porovnání úrovně stresu u dominantních a submisivních samců (porovnání koncentrace kortikotropinu v mRNA) (Horii et al. 2017)

Hlavním cílem celé studie bylo prokázat účinky sociální hierarchie na chování podobné úzkosti a deprese za pomoci série behaviorálních testů. V testu Open field byla lokomotorická aktivita podřízených nižší než u dominantních samců. V testu Elevated plus maze vykazovali podřízení samci významně nižší lokomotorickou aktivitu a procento času stráveného v otevřeném rameni než dominantní samci. Tyto údaje z behaviorálních testů naznačovaly, že podřízené myši vykazovaly více chování podobné úzkosti a depresi než dominantní myši (Horii et al. 2017).

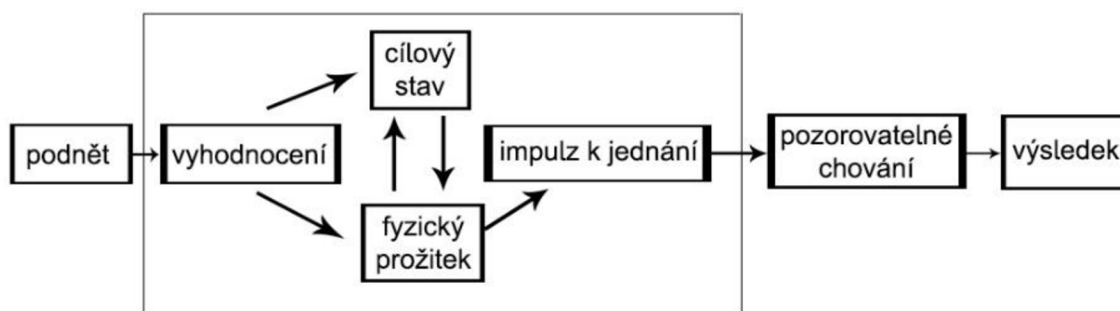
K podobným výsledkům došli v roce 2020 Karamihalev et al., kteří se také zaměřili na status sociální hierarchie, a na to, zda ovlivňuje úzkost u myší. V experimentech bylo sledováno chování myší žijících v samičích nebo samčích skupinách. Určili, do které sociální skupiny zvíře spadá. Poté vystavili některé skupiny myší mírnému chronickému stresu (např. mokrá podestýlka, nakloněná klec, přeplněnost) a jejich chování porovnali se skupinami myší chovaných v nestresových podmínkách. Zjistili, že jak pohlaví, tak sociální postavení každého hrálo roli v tom, jak reagovali na stres. Například podřízení samci projevovali úzkostnější

chování za stresujících okolností, zatímco dominantní samice se chovaly odvážněji a méně úzkostlivě.

3.4. Behaviorální testy k vyhodnocení úzkosti

Ve snaze modelovat patologickou úzkost byla vyvinuta řada testů. Tyto behaviorální testy slouží pro vyvolání a hodnocení úzkostného chování především u hlodavců (Clément et al. 2002).

Behaviorálním testováním se rozumí neinvazivní ovlivnění chování zvířete zvoleným podnětem za účelem pozorování jeho reakce (obr. 11). Testování chování myši se provádí jako součást vědeckého zkoumání některých větších otázek, jako jsou základy neuropsychiatrických poruch, nebo mechanismy formování paměti (Wahlsten 2011). Behaviorální testy u zvířat můžeme použít jako korelát pro určité typy změn chování u lidí, protože především biochemická stavba mozku a jeho biochemie je u všech savců do značné míry podobná. Tyto postupy tak přináší kromě důležitých teoretických poznatků i mnoho informací pro praktickou medicínu (Donát 1999).



Obr. 11 Pnáznornění procesu chování (Pektor 2007)

Behaviorální testy úzkosti lze seskupit do dvou hlavních podtříd: první zahrnuje podmíněné reakce myši na stresující a často bolestivé podněty, druhá zahrnuje etologicky založená paradigmat a zahrnuje spontánní nebo přirozené reakce zvířete na stresové podněty (Bourin et al. 2003). V tomto bodě je důležité poznamenat, že testy vyvolávající reakci prostřednictvím averzivní události vyvolávají u zvířete spíše strach. Naproti tomu úzkost vzniká v situacích, které nejsou jasně signalizovány a mají vysoký stupeň nepředvídatelnosti, pokud jde o čas a pravděpodobnost výskytu (Ohl 2005).

Mezi nejčastěji používané testy emocionality patří test Open field, Elevated plus maze a test Light-dark box. Jako důkaz platnosti těchto testů se považuje skutečnost, že podané sedativní látky usnadnily přístup otevřeným či osvětleným plochám, zatímco anxiogenní látky specificky inhibovaly zkoumání averzivních oblastí (Ramos et al. 2008).

Open field (OF)

Tento test poskytuje jedinečnou příležitost systematicky hodnotit explorační chování, obecnou pohybovou aktivitu a poskytuje počáteční screening chování souvisejícího s úzkostí u hlodavců (Prut et al. 2003). Používá se ve vědeckém výzkumu a využití nachází zejména při studiích neurobiologického základu úzkosti a při vývoji nových anxiolitických léčiv (Hall et al. 1932).

OF je běžným měřítkem exploračního chování a obecné aktivity u myši, kde lze měřit jak kvalitu, tak kvantitu aktivity (Gould et al. 2009).

Test využívá přirozené averze myši k jasně osvětleným prostorům, ale také potřebě prozkoumávat vnímaný ohrožující podnět (obr. 12). Výsledkem konfliktu těchto dvou protichůdných potřeb je měřitelná úzkost (Prut et al. 2003).



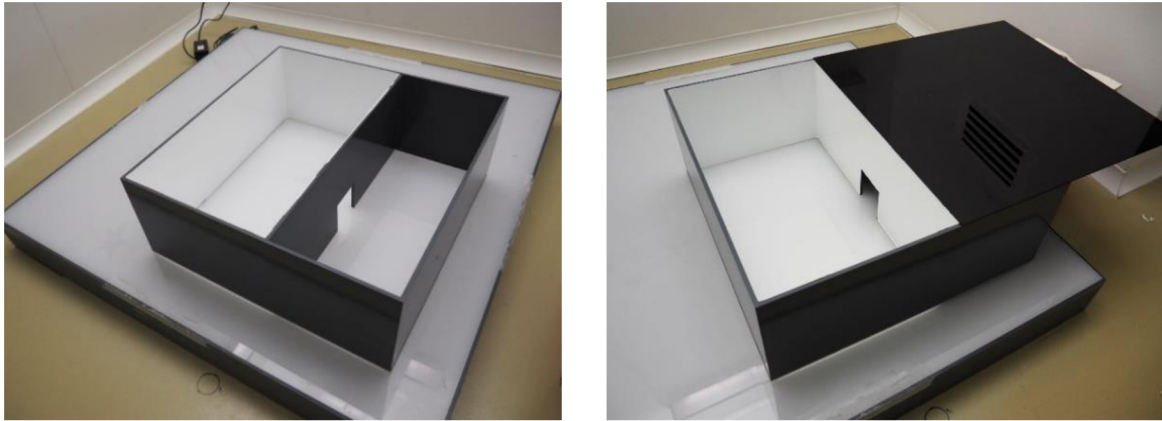
Obr. 12 Openfield test pro testování čtyř myši (čtyři komory) (vlastní foto)

Light-dark box (LDB)

Light-dark box je populární test používaný ve farmakologii k testování nepodmíněných úzkostných reakcí u hlodavců (Ennaceur 2013).

Test LDB je založen na vrozené averzi hlodavců k jasně osvětleným oblastem a na spontánním průzkumném chování. Příklad LDB má dvě komory, osvětlenou a tmavou. Tyto dvě komory spojuje otvor (obr. 13) (Bourin et al. 2003).

Je známo, že myši obecně preferují tmavší oblasti před světlými. Nicméně, když jsou myši umístěné v novém prostředí, mají tendenci ho zkoumat. Přirozená konfliktní situace nastává také mezi tendencí zkoumat a počáteční tendencí vyhýbat se neznámému (neofobie). Tyto protichůdné emoce zaznamenané v testu lze hodnotit k určení míry úzkosti (Ennaceur 2013).



Obr. 13 Light-dark box, při testu je tmavá část zakryta viz. obrázek vpravo (vlastní foto)

3.4.1. Ovlivnění výsledků behaviorálního testování

Chování celého organismu může ovlivnit i řada vnějších faktorů (Donát 1999). Snadno řešitelným problémem, který eliminuje výkyvy chování, které přímo nesouvisí s vlastnostmi myši v experimentech je definování a standardizace prostředí experimentu (Swanson 2000). Obecně se jedná o podmínky hlukové, světelné, teplotní a vlhkostní. Negativně ovlivnit výsledky můžou i pachové stopy po předchozím pokusu nebo po předchozím jedinci. Toho je možné zamezit tím, že budeme průběžně čistit plochy, s kterými přijde testovaná myš do kontaktu (Pometlová et al. 2012).

Při plánování behaviorálního pokusu musíme také počítat se stresovou reakcí experimentálních zvířat. Ta je způsobena i přemístěním klece se zvířaty z jedné místnosti do druhé. Do procesu behaviorálních pokusů tedy patří i doba přivykání (habituače) na prostředí experimentální místnosti. Je vhodné i přivyknutí zvířete na manipulaci experimentátorem – "handling". Sníží se tím stresová reaktivita zvířat, která ovlivňuje výsledky všech experimentů (Whishaw et al. 2005).

4. Metodika

Výzkum se zabýval korelací tělesné hmotnosti a úzkostného chování laboratorních myší, která byla zjišťována za pomoci behaviorálních testů Open field a Light-dark box. Myši dorazily do bariérového chovu v lednu 2022 a začátkem února byly testovány.

4.1. Charakteristika výzkumného pracoviště

Data potřebná k vyhodnocení hypotézy této diplomové práce byla získána ve vědeckém pracovišti BIOCEV (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci) (obr 14a). Jedná se o výzkumné pracoviště, jehož členy je šest ústavů Akademie věd ČR (Ústav experimentální medicíny, Ústav molekulární genetiky, Biotechnologický ústav, Mikrobiologický ústav, Fyziologický ústav a Ústav makromolekulární chemie) a dvě fakulty Univerzity Karlovy (Přírodovědecká fakulta a 1. lékařská fakulta).

V centru BIOCEV sídlí výzkumná centra, která jsou integrována do evropských výzkumných infrastruktur. Jedním z těchto center je České centrum pro fenogenomiku (CCP) (14b), pod které spadá i behaviorální oddělení. Právě toto pracoviště mi umožnilo získat potřebná data k vyhodnocení hypotézy.



Obr. 14a Logo Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci, 14b Logo Českého centra pro fenogenomiku

4.2. Použitá zvířata

Do pokusu bylo zařazeno 97 myší (46 samců, 51 samic) inbredního kmene C57Bl/6NCrl (obr. 15). Myši pocházely z chovu hlodavců ÚMG (Ústav molekulární genetiky). Chovy jsou umístěny ve dvou lokalitách, v rámci areálu Akademie věd České republiky v Praze Krči a ve Vestci a jsou součástí projektu BIOCEV. Tyto chovy patří díky svým technologiím k nejmodernějším pracovištím. Jedná se o chovy s celkovou kapacitou přesahující 70 000 zvířat (především různých kmenů myší a potkanů), kterým je zajišťováno standardizované prostředí, postupy a odborná péče. Z těchto chovů myši dorazily ve věku 6 týdnů, testovány byly ve věku 9 týdnů.



Obr. 15 Myš kmene C57BL (The Jackson Laboratories 2020)

4.2.1. Identifikace myši

Každé myši, byl při odstavu přidělen jedinečný identifikační kód a kód klece, kterou obývá. Tyto kódy automaticky vygeneroval software PyRAT (obr. 16). PyRAT je webový software pro správu laboratorních zvířat a pod přiděleným identifikačním kódem, nebo kódem klece bylo možné v PyRATU vyčíst všechny podstatné informace o myši.



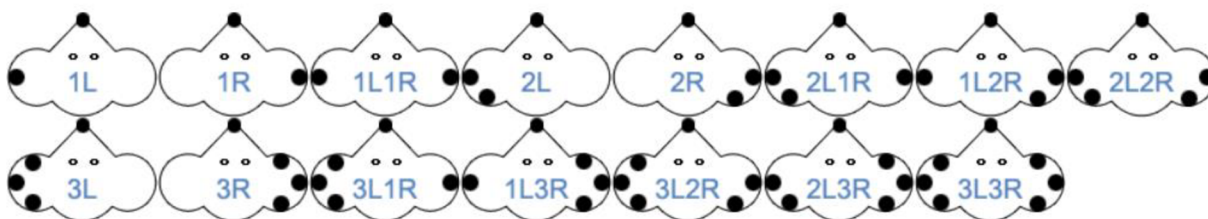
Obr. 16 Logo softwaru

V softwaru PYRAT lze dohledat údaje o rodičích, sourozencích, datum narození, zápisy o jednotlivých událostech, přesuny mezi chovnými místnostmi, jejich aktuální pozice, ale i zdravotní záznamy. Hlavní informace se nacházely i na kartě klece, kterou byla označená každá klec v chovné místnosti (obr. 17).

Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences			
Stock Card	Phenotyping Module		
kód klece	S83Z-03277	L_pheno@img.cas.cz	
Line/Strain			
C57Bl/6NCrl			
identifikační kód myši	♂	Tag	LabID
		82Z-CF749	1L
		82Z-CF750	1R
		82Z-CF751	1L1R
počet samic v kleci	♀	82Z-CF752	2L
rodiče	♂	82Z-07349	
	♀	82Z-08040	
			Barcode
			Date of birth
			21/12/21
			Project
			Phenotyping cohort
			Licence
Stock Card		Line/Strain	

Obr. 17 Detail karty klece

K vygenerovanému kódu byla myšim přidělena ušní značka. Ušní značení sloužilo k rozlišení jedinců v jedné kleci. V laboratořích se používá více typů značení myší, v tomto pokusu byla zvolena metoda děrování uší. Tato metoda je praktická díky své jednoduchosti proveditelnosti a rychlosti rozpoznání. Další podstatná výhoda tohoto způsobu značení je, že zvíře nijak neomezuje a samotné provedení nezpůsobuje výraznou bolest. Dírka se vystříhla speciálními kleštičkami v kraji ušního boltce. Systém značení byl velmi jednoduchý a umožnil poměrně velké množství kombinací dírek tak, aby nemohly být myši mezi sebou zaměněny. Dírky byly udělané v pravém či levém ušním boltci, případně na obou uších zároveň. Počet otvorů může být proměnlivý a díky tomu vzniká mnoho identifikačních kombinací (obr. 18) Identifikace jedinců byla důležitá, aby byla správně přiřazena data z měření k jedinci.



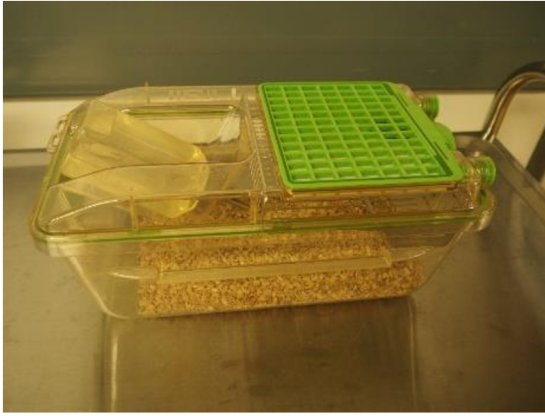
Obr. 18 Schéma ušního značení

4.2.2. Chov myší

Myši byly po celou dobu drženy v jednopohlavních skupinách po šesti, pěti, čtyřech a třech jedincích. Samci v jedné kleci byli vždy sourozenci ze stejného vrhu. Samice, které nejsou vůči sobě tolik agresivní, mohly být při odstavech spojené z více breedingových klecí a vznikla tak nepříbuzenská skupina.

Skupina myší byla držena v chovné místnosti o stálé teplotě 22 °C a vlhkosti vzduchu 60 % se světelným režimem 12/12 (od 6 h do 18 h světlo). Všechny myši měly stejnou péči, bylo s nimi stejně manipulováno a dostávaly stejné granulované krmivo a vodu dostupné ad libitum. Podestýlku tvořila dřevěná štěpka z topolu osika o velikosti 5 x 5 mm, buničina sloužila jako hnízdní materiál. V každé kleci byl papírový domeček. Všechny klece byly přestýlány jednou za dva týdny, naposledy 5 dní před testováním.

Jednotlivé klece (obr. 19) o celkové velikosti 391 × 199 × 160 mm, podlahové plochy 501 cm² byly umístěné ve stojanu, který má kapacitu až 70 klecí (obr. 20). Přívod vzduchu do patentované radiálně těsnící klece byl zabezpečen systémem IVC (individuálně větrané klece).



Obr. 19 Chovná klec (vlastní foto)



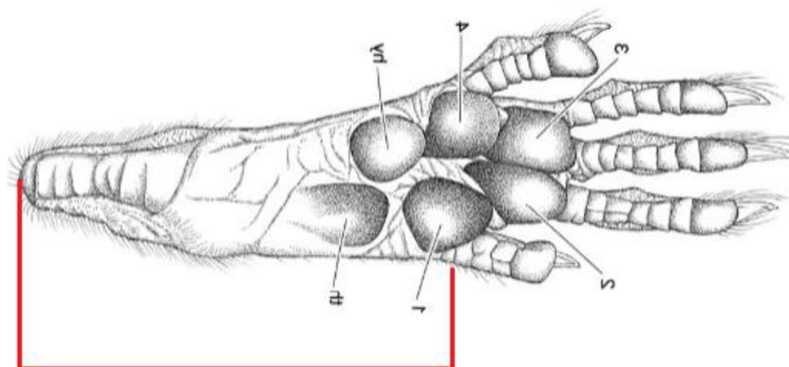
Obr. 20 Stojan na chovné klece napojený na IVC systém (vlastní foto)

4.3. Hmotnost myší

Předpokládalo se, že největší myši budou vykazovat nižší míru úzkostného chování než nejmenší myši ze skupiny. Pro určení největšího a nejmenšího jedince v kleci byli všichni jedinci zváženi na digitální váze Radwag PS 4500.X2.M. Aby hmotnost nebyla jediný ukazatel velikosti jedince, změřila se digitální šuplerou délka od kloubu malíčku po patní kost na pravé zadní končetině (obr. 21).

Užití délky chodidla zadní končetiny jako kvantitativního znaku nabízelo určité výhody. Délka chodidla, na rozdíl od nejčastěji používaného měřítka - hmotnosti, nebyla ovlivněna přechodnými podmínkami, jako by bylo množství přijaté potravy či vyprázdnění. Výhodou této metody je i to, že konečné velikosti chodidlo dosahuje ve věku přibližně jednoho měsíce věku, navíc měření nevyžaduje smrt zvířete.

Celková velikost jedince byla tedy určena indexem, kdy byla hmotnost vydělena délkou chodidla.



$$x = \frac{\text{hmotnost}}{\text{délka}}$$

Obr. 21 Červeně vyznačená měřená oblast pravé zadní končetiny (Musser et al. 2009)

Podle vypočítaného indexu byla vybrána vždy největší a nejmenší myš ze stejné klece. Jednalo se pak o 12 největších a 12 nejmenších samců. Samic bylo 14 největších a 14 nejmenších. Tito vybraní jedinci pak podstoupili behaviorální testy.

4.4. Behaviorální testy

Data potřebná k posouzení úzkostného chování byla získána behaviorálním testováním jednotlivých myší. Byly použity dva testy, Open field a Light-dark box, které patří mezi nejčastěji používané testy emocionality. Nejprve myši podstoupily test Open field, o dva dny později Light-dark box.

4.4.1. Open field test

Open field je test obecné úzkosti vyvolané v osvětleném, otevřeném, nechráněném prostoru. Test hodnotil celkovou lokomotorickou aktivitu zvířat vyvolanou průzkumným chováním v novém prostředí.

Obecný postup

Čtyři testovací boxy byly umístěny na základnu v testovací místnosti a osvětlení se nastavilo tak, aby ve středu každého testovacího boxu bylo 260 luxů (měřeno lux metrem). Spustila se videokamera instalovaná nad experimentální arénou. Videokamera byla propojena s počítačem, na kterém byl instalován software VIEWER (obr. 22) od společnosti BIOBSERVE (obr. 23). VIEWER dokázal identifikovat jednotlivé zvíře, určit jeho polohu (hlava, tělo a ocas), zakreslit jeho dráhu, analyzovat video a vydat komplexní soubor dat. VIEWER ukládal data jak z měření dráhy, tak samotné video z průběhu celého testu k pozdějším úpravám, či dalším analýzám.



Obr. 22 Logo programu



Obr. 23 Logo společnosti

Před samotným spuštěním testu bylo potřeba v programu VIEWER spustit konfiguraci pro Open field test a zadat parametry jednotlivých myší (pohlaví, identifikační kód, genotyp) a vytyčit hranice mezi periferií a středem testovacího boxu (obr. 24).

Celková plocha testovacího boxu byla 45 x 45 cm. Periferní zóna měřila 8 cm od okraje stěn arény a centrální plocha pak tvořila 67,6 % celkové plochy boxu. Testovací box byl vyroben z odolného druhu plastu, který nepohlcuje pachy a snadno se čistí. Box byl ohraničen černými, nereflexními stěnami, dno bylo vyrobeno ze stejného materiálu, bílé barvy.

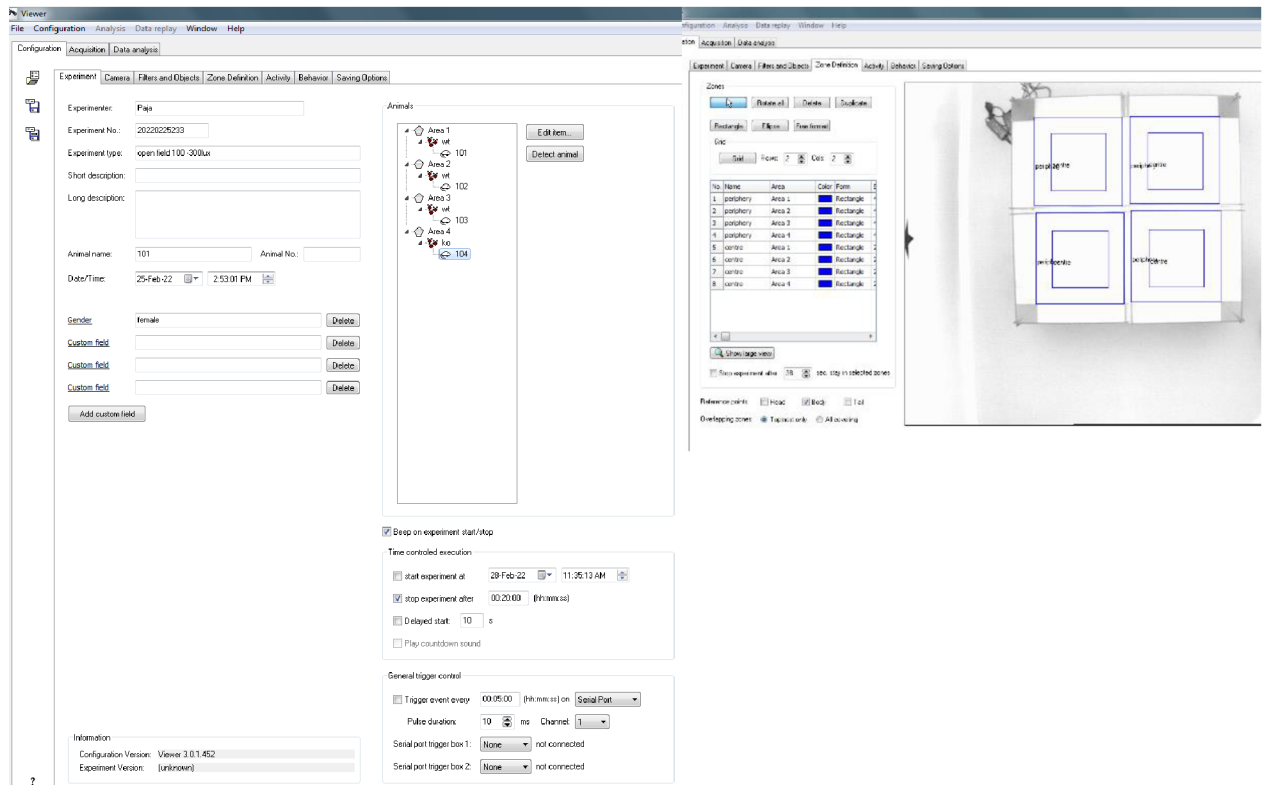
Před testem byla zvířata transportována z chovné místnosti a ponechána v klidu po dobu 60 minut. Tento čas bylo důležité dodržet z důvodu aklimatizace myší v novém prostředí a snížení stresu, který by mohl být vyvolán transportem. Kdyby byly myši rozrušené, mohlo by to negativně ovlivnit výsledky testování. Samotné testování začalo vždy v 11 h. První den byla otestována skupina samců. Druhý den byly otestovány samice. Samci a samice byli testováni v jiný den z důvodu možného ovlivnění chování samce samicí v jeho blízkosti.

Před umístěním myší do testovacího boxu se důkladně vyčistily jeho plochy 75% izopropylalkoholem. Plochy musely být před umístěním myší dokonale suché. Poté se každá myš umístila doprostřed okrajové zóny a nechala se po dobu 20 minut volně prozkoumat testovací plochu, přičemž byl experimentátor mimo dohled zvířete a v testovací místnosti bylo ticho. Test umožňoval snímat až čtyři myši současně ve vedle sebe postavených, samostatných boxech.

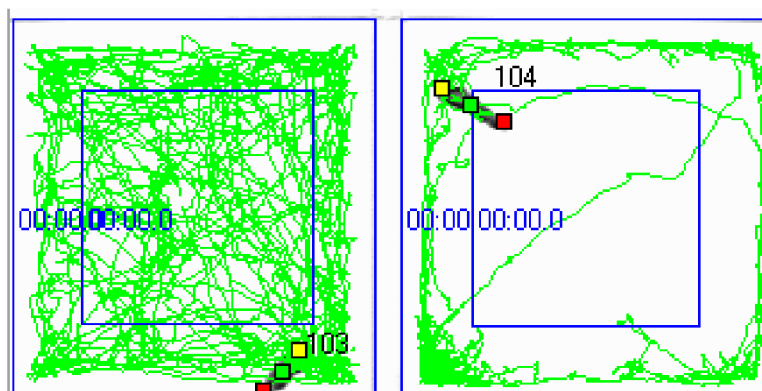
Na konci testu byla zvířata umístěna zpět do jejich domácí klece.

Po otestování všech zvířat se získala data, která nám poskytla informace o délce časového úseku, kdy se zvíře vyskytovalo v periférii a v centrálním prostoru (měřeno v sekundách) a délce nachozené vzdálenosti v periférii a v centrálním prostoru (měřeno v centimetrech), dále se mohly získat informace o průměrné rychlosti pohybu v periférii a v centrálním prostoru, počet přechodů mezi periférií a centrem, ale to nebylo k posouzení úzkostného chování podstatné.

Myši, které trávily více času v periférii a do centra vstupovaly minimálně, byly považované za úzkostnější než myši, které se pohybovaly po celém prostoru (obr 25).



Obr. 24 Screenshot z programu WIEVER – zadání parametrů jednotlivých myší (pohlaví, identifikační číslo, genotyp) a vytyčení hranice mezi periférií a středem testovacího boxu



Obr. 25 Porovnání chůze v aréně neúzkostné (vlevo) a úzkostné myši (vpravo)

4.4.2. Light-dark box

Light-dark box je test nepodmíněné úzkostné reakce. Vychází z vrozené averze ke světlu a spontánního průzkumného chování hlodavců. Test hodnotil počet přechodů myši z tmavé do osvětlené komory a čas strávený v jednotlivých komorách.

Obecný postup

Testovací box se umístil na základnu v testovací místnosti a osvětlení se nastavilo tak, aby ve středu osvětlené části testovacího boxu bylo 225 luxů (měřeno lux metrem). Spustila se videokamera instalovaná nad experimentální arénou. Videokamera byla propojena s počítačem, na kterém byl instalován software VIEWER od společnosti BIOBSERVE. VIEWER dokázal identifikovat jednotlivé zvíře, určit jeho polohu (hlava, tělo a ocas), zakreslit jeho dráhu, analyzovat video a vydat komplexní soubor dat. VIEWER ukládal data jak z měření dráhy, tak samotné video z průběhu celého testu k pozdějším úpravám, či dalším analýzám.

Před samotným spuštěním testu bylo potřeba v programu VIEWER spustit konfiguraci pro Light-dark box test a zadat parametry jednotlivé myši (pohlaví, identifikační kód, genotyp) a vytyčit hranice mezi osvětlenou a tmavou částí boxu (obr. 26).

Testovací box se skládal z menšího tmavého, uzavřeného prostoru (jedna třetina) a většího osvětleného, otevřeného averzního oddílu (dvě třetiny).

Celková plocha testovacího boxu byla 50 x 50 cm. Osvětlená zóna měřila 30 x 50 cm a tmavá zóna pak tvořila 40 % celkové plochy boxu. Mezi těmito dvěma zónami byla dělicí stěna, která měla uprostřed průchozí otvor o šířce 8 cm a výšce 6 cm. Testovací box byl vyroben z odolného druhu plastu, který nepohlcuje pachy a snadno se čistí. Světlá zóna byla vyrobena z bílého materiálu, tmavá zóna včetně poklopu byla vyrobena z černého, nereflexního materiálu.

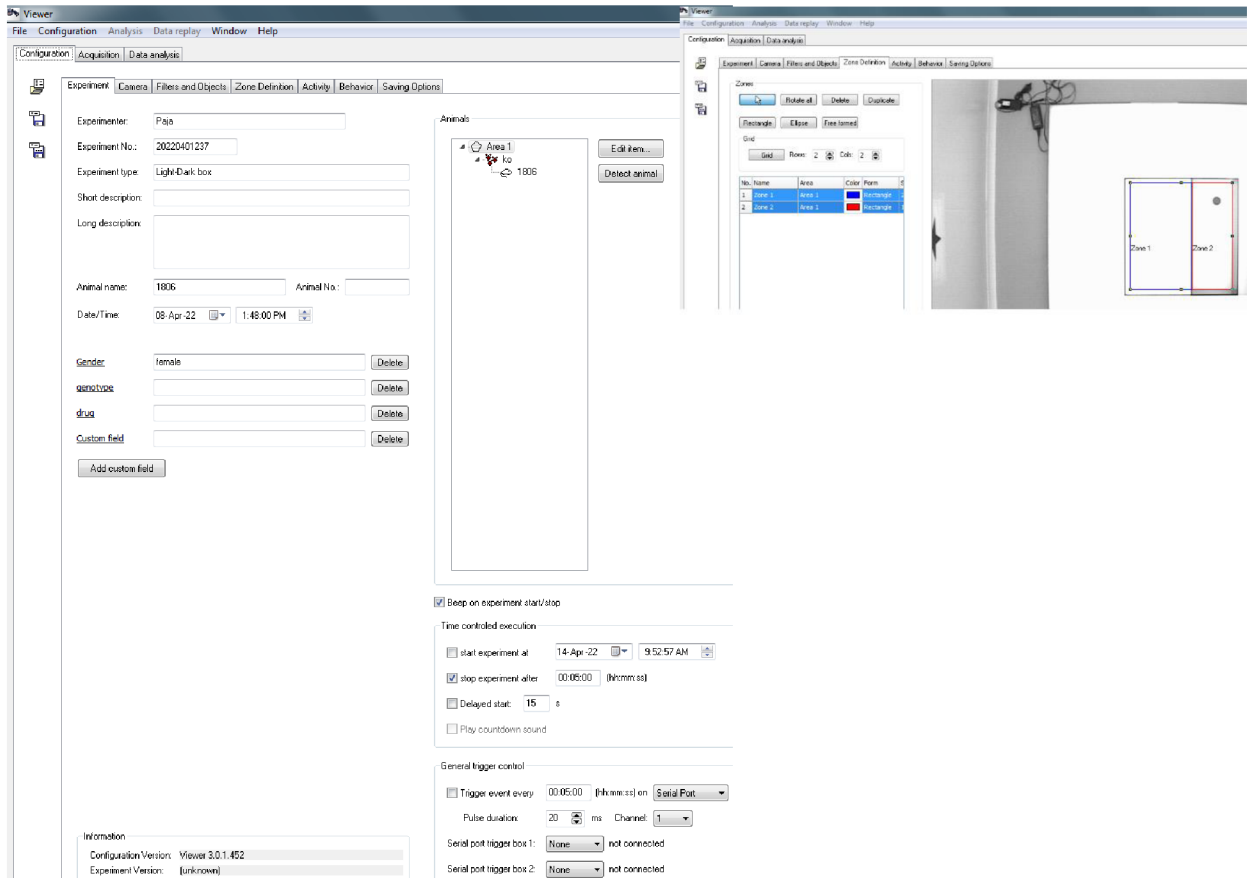
Před testem byla zvířata transportována z chovné místnosti a ponechána v klidu po dobu 60 minut. Tento čas byl důležitý dodržet z důvodu aklimatizace myši v novém prostředí a snížení stresu, který by mohl být vyvolán transportem. Kdyby byly myši rozrušené, mohlo by to negativně ovlivnit výsledky testování. Samotné testování začalo vždy v 11 h. První den byla otestována skupina samců. Druhý den byly otestovány samice. Samci a samice byly testovány v jiný den z důvodu možného ovlivnění chování samce samicí v jeho blízkosti.

Před umístěním myši do boxu, se důkladně vytřely plochy testovacího boxu 75% izopropylalkoholem. Plochy musely být před umístěním myši dokonale suché. Poté se každá myš umístila do tmavé zóny a co nejrychleji po vpuštění myši se zavřel nad tmavou zónou poklop. Myš se nechala po dobu 5 minut volně prozkoumat testovací plochu. Experimentátor byl během testu mimo dohled zvířete a v testovací místnosti bylo ticho.

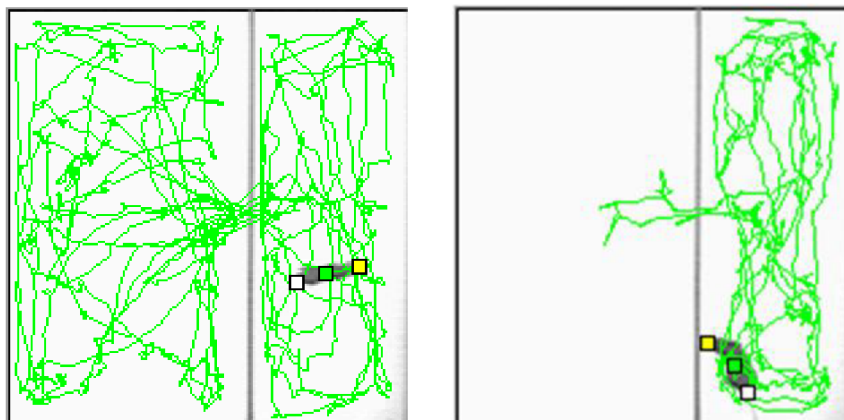
Na konci testu byla zvířata umístěna zpět do jejich domácí klece. Po otestování všech zvířat se získala data, která poskytla informace o délce časového úseku, kdy se zvíře vyskytovalo v tmavé zóně a v osvětlené zóně (měřeno v sekundách) a počet přechodů mezi zónami. Dále se mohly získat informace o délce nachozené vzdálenosti v tmavé

zóně a v osvětlené zóně (měřeno v centimetrech), průměrné rychlosti pohybu v tmavé zóně a v osvětlené zóně, ale to nebylo k posouzení úzkostného chování podstatné.

Myši, které trávily více času v tmavé zóně a do osvětlené zóny vstupovaly minimálně, byly považovány za úzkostnější než myši, které se pohybovaly po celém prostoru (obr. 27).



Obr. 26 Screenshot z programu WIEVER – zadání parametrů jednotlivé myši (pohlaví, identifikační číslo, genotyp) a vytyčení hranice mezi osvětlenou a tmavou zónou testovacího boxu



Obr. 27 Porovnání chůze v aréně neúzkostné (vlevo) a úzkostné myši (vpravo)

5. Výsledky

5.1. Určení největšího a nejmenšího jedince

V tabulce 2 jsou uvedena data z měření všech samců v pokusu. Tabulka obsahuje údaje o jednotlivých myších, jejich identifikační kódy, ušní značení a kód klece, kterou obývají. Data, s kterými se dále pracovalo, jsou délka chodidla a hmotnost. Tyto údaje byly mezi sebou poděleny a byl vypočítán index (hmotnost/délka chodidla). Podle indexu se vybral největší (oranžové značení) a nejmenší samec (modré značení) z každé klece, kteří byli následovně porovnání v behaviorálních testech měřících jejich úroveň úzkosti.

Tab. 2

kód myši	ušní značení	kód klece	délka chodidla	hmotnost	index g/mm
82Z-08797	4L3R	S83Z-03182	9,50	24,80	2,61
82Z-08798	4L2R	S83Z-03182	9,92	22,30	2,24
82Z-08799	4L1R	S83Z-03182	10,24	20,90	2,04
82Z-08800	4L4R	S83Z-03182	9,91	26,70	2,69
82Z-08801	3L4R	S83Z-03182	9,22	28,00	3,04
82Z-08807	2L4R	S83Z-03184	9,21	25,30	2,75
82Z-08808	1L4R	S83Z-03184	9,17	25,10	2,74
82Z-08855	3L	S83Z-03190	9,34	27,40	2,93
82Z-08856	3R	S83Z-03190	10,00	30,60	3,06
82Z-08857	3L2R	S83Z-03190	11,20	29,90	2,67
82Z-08858	3L1R	S83Z-03190	10,21	29,70	2,91
82Z-CF407	3L	S83Z-03198	10,39	25,20	2,43
82Z-CF408	3L1R	S83Z-03198	10,18	22,80	2,48
82Z-CF409	3L2R	S83Z-03198	9,16	22,40	2,45
82Z-CF410	2L3R	S83Z-03198	10,21	22,80	2,23
82Z-CF425	3L3R	S83Z-03200	9,88	25,30	2,56
82Z-CF431	4L	S83Z-03200	9,85	25,70	2,61
82Z-CF432	4R	S83Z-03200	9,84	25,30	2,57
82Z-09034	4L	S83Z-03216	9,16	24,00	2,62
82Z-09035	4R	S83Z-03216	9,01	24,10	2,67
82Z-09036	1L4R	S83Z-03216	9,00	24,20	2,69
82Z-09037	2L4R	S83Z-03216	8,85	24,20	2,73
82Z-09038	3L4R	S83Z-03216	9,66	23,30	2,41
82Z-09131	2L3R	S83Z-03235	9,01	25,40	2,82
82Z-09132	3L3R	S83Z-03235	8,58	22,20	2,59
82Z-09133	1L1R	S83Z-03235	10,10	22,70	2,25
82Z-09134	4L	S83Z-03235	9,30	25,40	2,73
82Z-09135	4R	S83Z-03235	8,76	20,90	2,38
82Z-09268	4L3R	S83Z-03240	8,93	27,00	3,02
82Z-09275	3L4R	S83Z-03240	8,91	27,10	3,04
82Z-09276	4L4R	S83Z-03240	10,18	29,20	2,87
82Z-09390	4R	S83Z-03251	9,07	27,90	3,08
82Z-09391	1L4R	S83Z-03251	8,72	25,80	2,96
82Z-09392	2L4R	S83Z-03251	8,30	22,80	2,75
82Z-09418	3L4R	S83Z-03253	9,10	24,50	2,69
82Z-09419	4L4R	S83Z-03253	8,80	24,70	2,8
82Z-09420	4L1R	S83Z-03253	8,87	26,60	2,99
82Z-09421	4L2R	S83Z-03253	8,54	25,80	3,02
82Z-09476	4L3R	S83Z-03255	9,16	27,10	2,96
82Z-09477	4L2R	S83Z-03255	9,28	23,90	2,57
82Z-09478	4L1R	S83Z-03255	8,86	27,40	3,09
82Z-09584	4L3R	S83Z-03280	9,63	26,50	2,75
82Z-09588	4L2R	S83Z-03280	9,99	27,70	2,77
82Z-09589	4L1R	S83Z-03280	9,29	26,00	2,8
82Z-09590	4L4R	S83Z-03280	8,90	25,60	2,88
82Z-09591	3L4R	S83Z-03280	8,86	26,60	3

V tabulce 3 jsou uvedena data z měření všech samic v pokusu. Tabulka obsahuje údaje o jednotlivých myších, jejich identifikační kódy, ušní značení a kód klece, kterou obývají. Data, s kterými se dále pracovalo, jsou délka chodidla a hmotnost. Tyto údaje byly mezi sebou poděleny a byl vypočítán index. Podle indexu se vybrala největší (oranžové značení) a nejmenší samice (modré značení) z každé klece, které byly následovně porovnány v behaviorálních testech měřících jejich úroveň úzkosti.

Tab. 3

kód myši	ušní značení	kód klece	délka chodidla	hmotnost	index g/mm
82Z-CF749	1L	S83Z-03277	9,15	21,30	2,33
82Z-CF750	1R	S83Z-03277	8,04	22,70	2,82
82Z-CF751	1L1R	S83Z-03277	9,05	21,70	2,4
82Z-CF752	1L1R	S83Z-03277	9,02	20,40	2,26
82Z-08802	4L3R	S83Z-03183	9,12	20,80	2,28
82Z-08803	4L2R	S83Z-03183	8,87	22,70	2,26
82Z-08804	4L1R	S83Z-03183	8,73	21,30	2,44
82Z-08805	4L4R	S83Z-03183	10,21	20,20	1,98
82Z-08806	3L4R	S83Z-03183	10,36	20,60	1,99
82Z-08853	4L	S83Z-03189	9,45	22,60	2,39
82Z-08854	4R	S83Z-03189	9,83	22,20	2,26
82Z-08859	2L4R	S83Z-03189	9,73	21,70	2,23
82Z-CF411	2L2R	S83Z-03199	8,90	19,50	2,19
82Z-CF412	3L	S83Z-03199	8,94	20,90	2,33
82Z-CF413	3R	S83Z-03199	9,09	20,50	2,26
82Z-CF414	3L1R	S83Z-03199	8,52	17,50	2,05
82Z-CF433	1L3R	S83Z-03201	9,06	20,80	2,3
82Z-CF434	3L2R	S83Z-03201	8,62	20,30	2,35
82Z-CF435	2L3R	S83Z-03201	9,67	20,40	2,11
82Z-09039	4L	S83Z-03217	8,81	20,60	2,34
82Z-09040	4R	S83Z-03217	8,95	22,80	2,55
82Z-09041	3L4R	S83Z-03217	9,25	20,50	2,22
82Z-09042	4L4R	S83Z-03217	9,76	21,80	2,23
82Z-09025	1L4R	S83Z-03219	9,11	23,60	2,6
82Z-CF528	4L1R	S83Z-03219	8,70	20,80	2,39
82Z-CF529	4L2R	S83Z-03219	9,02	21,30	2,36
82Z-09138	3L2R	S83Z-03236	8,77	20,00	2,28
82Z-09139	3L1R	S83Z-03236	9,30	25,90	2,78
82Z-09140	3L3R	S83Z-03236	9,30	21,60	2,32
82Z-09141	2L3R	S83Z-03236	9,11	20,90	2,29
82Z-09142	4L	S83Z-03236	9,11	19,50	2,14
82Z-09261	4L3R	S83Z-03239	8,94	19,20	2,15
82Z-09262	3L4R	S83Z-03239	9,12	21,70	2,38
82Z-09277	4L4R	S83Z-03239	8,47	22,50	2,66
82Z-09395	3L3R	S83Z-03252	8,46	22,30	2,64
82Z-09396	4L	S83Z-03252	9,21	21,80	2,37
82Z-09397	4R	S83Z-03252	8,86	21,90	2,47
82Z-09432	1L4R	S83Z-03254	9,07	20,90	2,3
82Z-09433	2L4R	S83Z-03254	8,51	20,10	2,36
82Z-09434	3L4R	S83Z-03254	8,28	21,60	2,6
82Z-09435	4L1R	S83Z-03254	8,90	19,20	2,16
82Z-09395	3L3R	S83Z-03252	8,46	22,30	2,64
82Z-09396	4L	S83Z-03252	9,21	21,80	2,37
82Z-09397	4R	S83Z-03252	8,86	21,90	2,47
82Z-09432	1L4R	S83Z-03254	9,07	20,90	2,3
82Z-09433	2L4R	S83Z-03254	8,51	20,10	2,36
82Z-09434	3L4R	S83Z-03254	8,28	21,60	2,61
82Z-09435	4L1R	S83Z-03254	8,90	19,20	2,16
82Z-09479	4L3R	S83Z-03256	8,86	20,70	2,34
82Z-09480	4L2R	S83Z-03256	9,06	23,00	2,54
82Z-09481	4L1R	S83Z-03256	9,04	21,90	2,42

5.2. Open field

Pro ověření hypotézy byl nejprve proveden test Open field. Za pomoci automatického pozorovacího programu byla získána data o tom, jak se největší samci po dobu 20 minut v testu chovali. Zjistilo se, kolik centimetrů nachodila myš v periférii a kolik centimetrů v centru testovacího boxu. Také se změřilo, kolik času v sekundách, strávila myš v centru a kolik v periférii testovacího boxu. Tento časový údaj je znázorněn i v procentech (tab. 4). Ty samé údaje, ale pro nejmenší samce jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 4							Tab. 5						
největší samci kód myši	nachozená vzdálenost v periférii (cm)	nachozená vzdálenost v centru (cm)	nachozená vzdálenost celkem (cm)	strávený v periférii (s)	čas strávený v centru (s)	strávený v periférii (%)	nejmenší samci kód myši	nachozená vzdálenost v periférii (cm)	nachozená vzdálenost v centru (cm)	nachozená vzdálenost celkem (cm)	strávený v periférii (s)	čas strávený v centru (s)	strávený v periférii (%)
82Z-08801	2239,6	1501,7	3741,3	936,5	263,5	78,0	82Z-08799	1339,8	182,8	1522,6	1154,7	45,3	96,2
82Z-08807	1754,6	660	2414,6	965,7	234,3	80,5	82Z-08808	1859,4	313,1	2172,5	1159,1	40,8	96,6
82Z-08856	1732,8	890,7	2623,5	1041,4	158,6	86,8	82Z-08857	2210,2	666,8	2877	1106,8	93,1	92,2
82Z-CF408	2518,1	906,5	3424,6	974	226	81,2	82Z-CF410	2623,7	1453,5	4077,2	850,6	349,4	70,9
82Z-CF431	3403,3	1421,1	4824,4	975	225	81,3	82Z-CF425	3019,9	2357,2	5377,1	854,4	345,5	71,2
82Z-09037	1803	503,4	2306,4	1108,5	91,5	92,4	82Z-09038	2273,1	2201,1	4474,2	680,2	519,8	56,7
82Z-09131	1713,9	775,9	2489,8	1081,9	118,1	90,2	82Z-09133	1670,1	528	2198,1	1088,5	111,4	90,7
82Z-09275	1988,4	1003,4	2991,8	984,9	215	82,1	82Z-09276	1272	1117,9	2389,9	792,6	407,4	66,1
82Z-09390	2193,9	1428,2	3622,1	769,1	430,8	64,1	82Z-09392	2032,1	1046,2	3078,3	1016,6	183,4	84,7
82Z-09421	2387,3	1536,4	3923,7	865,9	334,1	72,2	82Z-09418	2131,8	1243	3374,8	887,4	312,6	74,0
82Z-09478	1672,7	198,9	1871,6	1160,5	39,5	96,7	82Z-09477	3759,8	639,6	4399,4	1086,5	113,4	90,6
82Z-09591	2103,3	1511,8	3615,1	960,8	239,2	80,1	82Z-09584	3934,9	1895	5829,9	1001,5	198,5	83,5

Za pomocí automatického pozorovacího programu byla získána data o tom, jak se největší samice po dobu 20 minut v testu chovaly. Zjistilo se, kolik centimetrů nachodila myš v periférii a kolik centimetrů v centru testovacího boxu. Změřilo se i, kolik času v sekundách, strávila myš v centru a kolik v periférii testovacího boxu. Tento časový údaj je znázorněn i v procentech (tab. 6). Ty samé údaje, ale pro nejmenší samice jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 6							Tab. 7						
největší samice kód myši	nachozená vzdálenost v periférii (cm)	nachozená vzdálenost v centru (cm)	nachozená vzdálenost celkem (cm)	čas strávený v periférii (s)	čas strávený v centru (s)	čas strávený v periférii (%)	nejmenší samice kód myši	nachozená vzdálenost v periférii (cm)	nachozená vzdálenost v centru (cm)	nachozená vzdálenost celkem (cm)	čas strávený v periférii (s)	čas strávený v centru (s)	čas strávený v centru (%)
82Z-CF750	3379,6	1335,8	4715,4	983,8	216,2	82,0	82Z-CF752	3564,9	1782,9	5347,8	976,7	223,3	81,4
82Z-08804	3636,8	2400,3	6037,1	762,9	437,1	63,6	82Z-08805	3740,6	1803,7	5544,3	1020,4	179,6	85,0
82Z-08853	3441,6	1494,5	4936,1	1044,9	155,1	87,1	82Z-08859	2611,9	1132,4	3744,3	1056,7	143,2	88,1
82Z-CF412	3112,6	1336,4	4449	981,2	218,7	81,8	82Z-CF414	3581,4	1716,2	5297,6	979,1	220,9	81,6
82Z-CF434	2284,3	675,2	2959,5	1116,4	83,6	93,0	82Z-CF435	3130,2	810,7	3940,9	1077,9	122,1	89,8
82Z-09040	2953	1579,3	4532,3	887,2	312,8	73,9	82Z-09041	3694,7	1172,6	4867,3	1044	156	87,0
82Z-09025	1316,7	639,3	1956	1070,3	129,7	89,2	82Z-CF529	2997,9	1476,6	4474,5	970	230	80,8
82Z-09139	2477,9	821,7	3299,6	1084,7	115,3	90,4	82Z-09142	2141,1	584,7	2725,8	1101,5	98,5	91,8
82Z-09277	1952,9	1497,9	3450,8	961,8	238,2	80,2	82Z-09261	1836,9	1121,4	2958,3	924,9	275,1	77,1
82Z-09395	2933,2	1095,9	4029,1	1051,4	148,5	87,6	82Z-09396	2587,2	1491,8	4079	975,7	224,3	81,3
82Z-09433	2664	1043,8	3707,8	1022,5	177,5	85,2	82Z-09435	1617,1	1495,9	3113	684,9	515,1	57,1
82Z-09395	2933,2	1095,9	4029,1	1051,4	148,5	87,6	82Z-09396	2587,2	1491,8	4079	975,7	224,3	81,3
82Z-09434	1000,5	948,4	1948,9	773,4	426,6	64,5	82Z-09435	1617,1	1495,9	3113	684,9	515,1	57,1
82Z-09480	2469,3	1537,3	4006,6	846,2	353,8	70,5	82Z-09479	3350,1	2577,3	5927,4	785,9	414,1	65,5

Naměřená data byla statisticky zpracována:

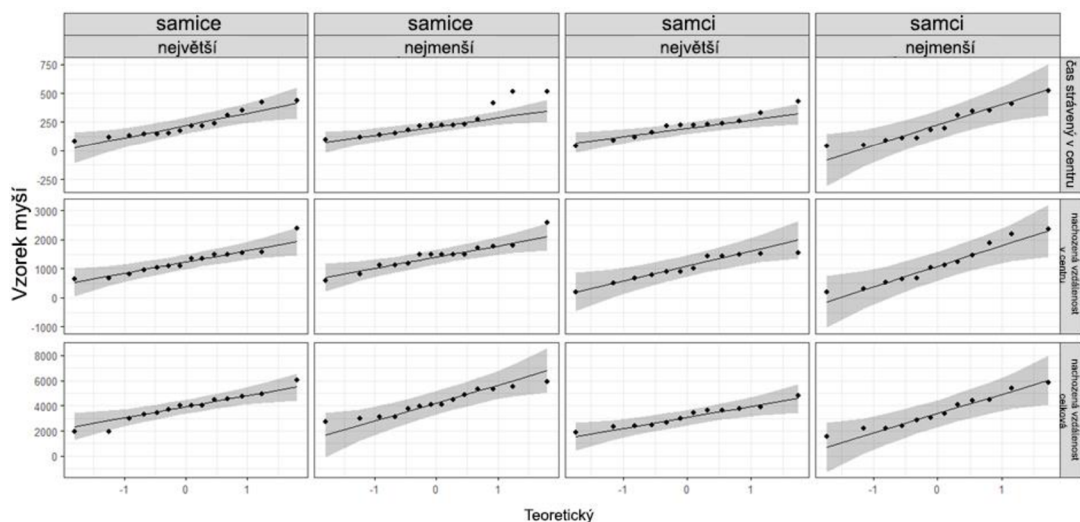
Pro ověření normality dat byl použit Shapirův-Wilkův test.

Tabulka 8: Výstup z programu R (version 4.1.2) - Shapirův-Wilkův test k ověření normality dat z testu Open field

	pohlaví	velikost jedince	statistika	p hodnota	poč. myší
nachozená vzdálenost v centru	samice	největší	0.9170723	0.19952819	14
nachozená vzdálenost v centru	samice	nejmenší	0.9378552	0.39153147	14
nachozená vzdálenost v centru	samec	největší	0.9059763	0.18940841	12
nachozená vzdálenost v centru	samec	nejmenší	0.9398714	0.49640718	12
nachozená vzdálenost celková	samice	největší	0.9628184	0.76910736	14
nachozená vzdálenost celková	samice	nejmenší	0.9433630	0.46310101	14
nachozená vzdálenost celková	samec	největší	0.9584662	0.76173011	12
nachozená vzdálenost celková	samec	nejmenší	0.9560438	0.72622205	12
čas strávený v centru	samice	největší	0.8952574	0.09627454	14
čas strávený v centru	samice	nejmenší	0.8350815	0.01401855	14
čas strávený v centru	samec	největší	0.9606507	0.79307905	12
čas strávený v centru	samec	nejmenší	0.9242085	0.32273269	12

p > 0,05

Graf 1. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z Shapirův-Wilkův test k ověření normality dat z testu Open field



Data nespĺnila předpoklad normality, proto byla pro statistické zpracování dat použita neparametrická dvoufaktorová ANOVA. Pro všechny hlavní efekty a interakce byla použita robustní ANOVA, analýza rozptylu hodnot transformovaných dat (Rfit) programu R (verze 2.1.2)

Tabulka 9: Výstup z programu R (version 4.1.2) - Dvoufaktorová ANOVA – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic z testu Open field.

Robustní ANOVA				
"čas strávený v centru"				
	st. volnosti	zbytkový st. volnosti	F hodnota	p hodnota
velikost jedince	1	2.189	0.038	0.846
pohlaví	1	17.893	0.310	0.579
velikost jedince: pohlaví	1	24.249	0.420	0.519
"nachozená vzdálenost v centru"				
	st. volnosti	zbytkový st. volnosti	F hodnota	p hodnota
velikost jedince	1	98.432	0.373	0.543
pohlaví	1	884.524	3.358	0.073
velikost jedince: pohlaví	1	151.775	0.576	0.451
"nachozená vzdálenost celková"				
	st. volnosti	zbytkový st. volnosti	F hodnota	p hodnota
velikost jedince	1	459.126	0.715	0.401
pohlaví	1	3207.579	5.001	0.030
velikost jedince: pohlaví	1	0.571	0.001	0.976

Čas strávený v centru: Hodnota p (0,85) pro čas strávený v centru*velikost jedince byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Open field test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v čase stráveném v centru mezi největšími a nejmenšími jedinci.

Hodnota p (0,58) pro čas strávený v centru*pohlaví byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Open field test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v čase stráveném v centru mezi samci a samicemi.

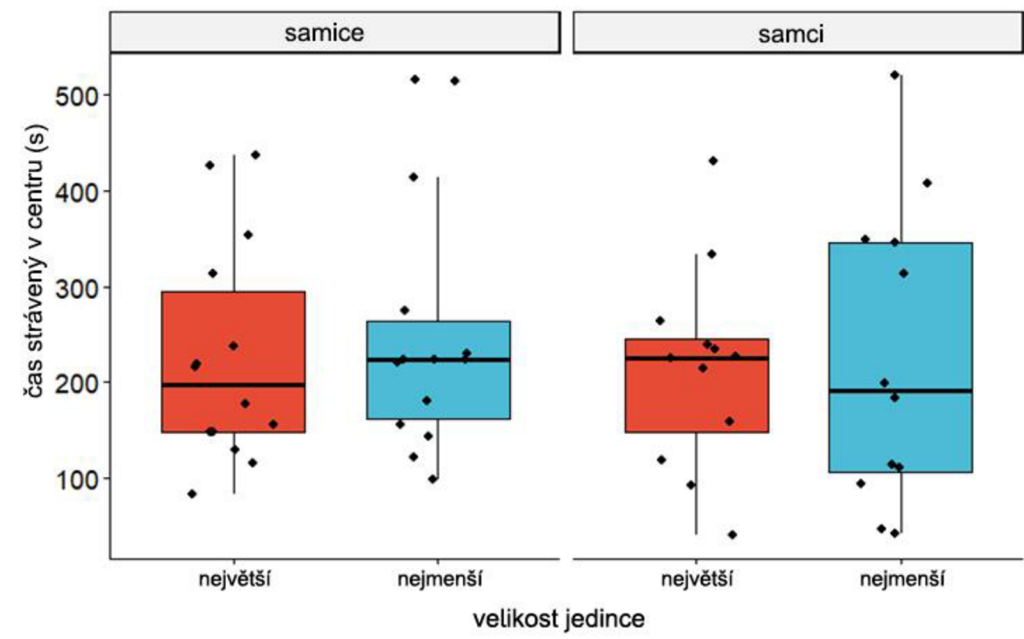
Nachozená vzdálenost v centru: Hodnota p (0,54) pro nachozenou vzdálenost v centru*velikost jedince byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Open field test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v nachozené vzdálenosti v centru mezi největšími a nejmenšími jedinci.

Hodnota p (0,07) pro nachozenou vzdálenost v centru*pohlaví byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Open field test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v nachozené vzdálenosti v centru mezi samci a samicemi.

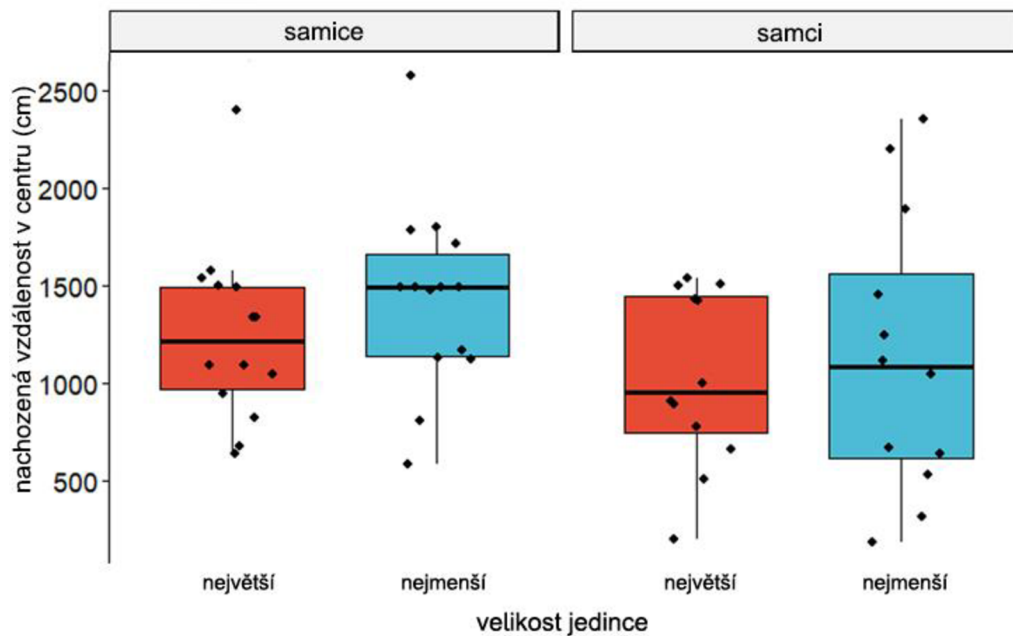
Nachozená vzdálenost celková: Hodnota p (0,40) pro nachozenou vzdálenost celkovou*velikost jedince byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Open field test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v nachozené vzdálenosti celkové mezi největšími a nejmenšími jedinci.

Hodnota p (0,03) pro nachozenou vzdálenost celkovou*pohlaví byla menší než hladina významnosti α (0,05), proto byla nulová hypotéza pro OF test zamítnuta. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v nachozené vzdálenosti celkové a pohlavím. Samice byly aktivnější než samci.

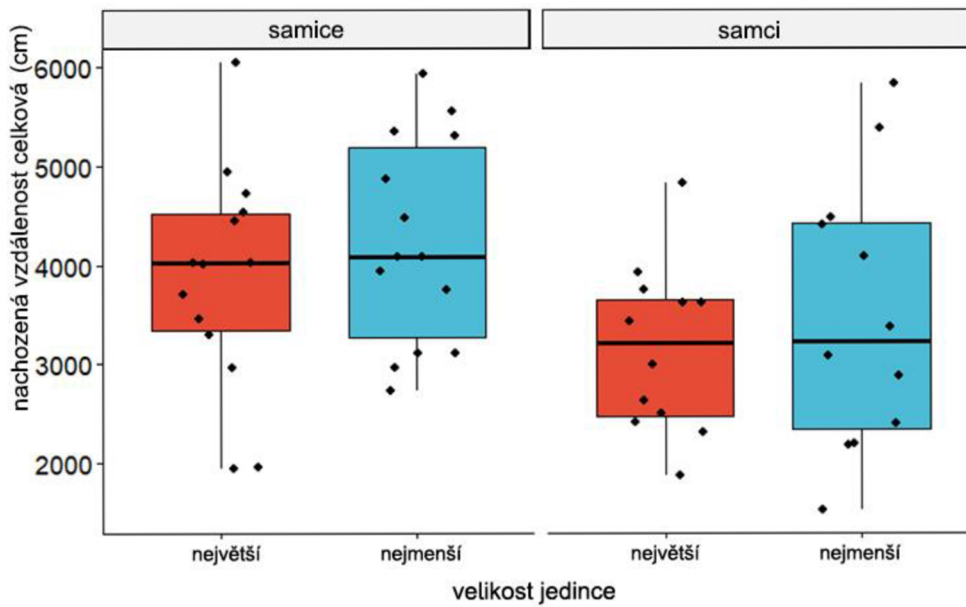
Graf 2. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z dvoufaktorové ANOVY – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic ve vztahu velikosti jedince a času stráveném v centru testu Open field



Graf 4. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z dvoufaktorové ANOVY – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic ve vztahu velikosti jedince a nachozené vzdálenosti v centru testu Open field



Graf 5. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z dvoufaktorové ANOVY – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic ve vztahu velikosti jedince a nachozené vzdálenosti celkové v testu Open field



5.3. Light-dark box

Po testu Open field následoval test Light-dark box. Za pomoci automatického pozorovacího programu byla získána data o tom, jak se samci po dobu 5 minut v testu chovali.

Výsledky z testu Light-dark box pro největší samce jsou uvedeny v tabulce 10. Z tabulky lze vyčíst údaje o čase v sekundách stráveném v osvětlené, či tmavé zóně. Čas strávený v tmavé zóně je udáván i v procentech. Tab 11. poskytuje stejné údaje, ovšem o nejmenších samcích.

Tab.10					Tab. 11				
největší samci kód myši	počet přechodů mezi zónami	čas strávený v osvětlené zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (%)	nejmenší samci kód myši	počet přechodů mezi zónami	čas strávený v osvětlené zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (%)
82Z-08801	14	83,7	216,3	72,1	82Z-08799	8	17,1	282,9	94,3
82Z-08807	3	21,2	278,8	92,9	82Z-08808	14	40,8	259,1	86,4
82Z-08856	8	19,1	280,8	93,6	82Z-08857	7	66,4	233,6	77,9
82Z-CF408	1	281,3	18,7	6,2	82Z-CF410	5	110,3	189,7	63,2
82Z-CF431	5	7,8	292,2	97,4	82Z-CF425	8	91,7	208,3	69,4
82Z-09037	13	79,7	220,3	73,4	82Z-09038	11	134,5	165,4	55,1
82Z-09131	6	44,3	255,7	85,2	82Z-09133	8	63,6	236,4	78,8
82Z-09275	14	94	206	68,7	82Z-09276	12	65,5	234,5	78,2
82Z-09390	18	68	232	77,3	82Z-09392	18	94,2	205,7	68,6
82Z-09421	2	50,9	249,1	83,0	82Z-09418	1	275,5	24,4	8,1
82Z-09478	38	113,1	186,9	62,3	82Z-09477	22	163,3	136,7	45,6
82Z-09591	6	45,4	254,6	84,9	82Z-09584	0	0	300	100,0

Výsledky z testu Light-dark box pro největší samice jsou uvedeny v tabulce 12. Z tabulky lze vyčíst údaje o čase v sekundách stráveném v osvětlené, či tmavé zóně. Čas strávený v tmavé zóně je udáván i v procentech. Tab 13 poskytuje stejné údaje, ovšem o nejmenších samicích.

Tab. 12					Tab. 13				
největší samice kód myši	počet přechodů mezi zónami	čas strávený v osvětlené zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (%)	nejmenší samice kód myši	počet přechodů mezi zónami	čas strávený v osvětlené zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (s)	čas strávený v tmavé zóně (%)
82Z-CF750	25	52,8	247,1	82,4	82Z-CF752	17	95,1	204,9	68,3
82Z-08804	10	44,3	255,7	85,2	82Z-08805	18	37,1	262,9	87,6
82Z-08853	21	48,5	251,5	83,8	82Z-08859	28	40,6	259,3	86,4
82Z-CF412	10	64,8	235,1	78,4	82Z-CF414	6	108,4	191,6	63,9
82Z-CF434	5	60	240	80,0	82Z-CF435	9	113,4	186,6	62,2
82Z-09040	10	78,4	221,5	73,8	82Z-09041	33	130,2	169,8	56,6
82Z-09025	3	44,9	255,1	85,0	82Z-CF529	20	132,5	167,4	55,8
82Z-09139	7	37,7	262,2	87,4	82Z-09142	10	19,1	280,9	93,6
82Z-09277	16	54,3	245,7	81,9	82Z-09261	4	30,1	269,9	90,0
82Z-09395	18	36	264	88,0	82Z-09396	78	60,6	239,3	79,8
82Z-09433	48	51,1	248,9	83,0	82Z-09435	48	99,8	200,1	66,7
82Z-09395	18	36	264	88,0	82Z-09396	78	60,6	239,3	79,8
82Z-09434	46	100,7	199,3	66,4	82Z-09435	48	99,8	200,1	66,7
82Z-09480	18	102,5	197,5	65,8	82Z-09479	14	73,8	226,2	75,4

Naměřená data byla statisticky zpracována:

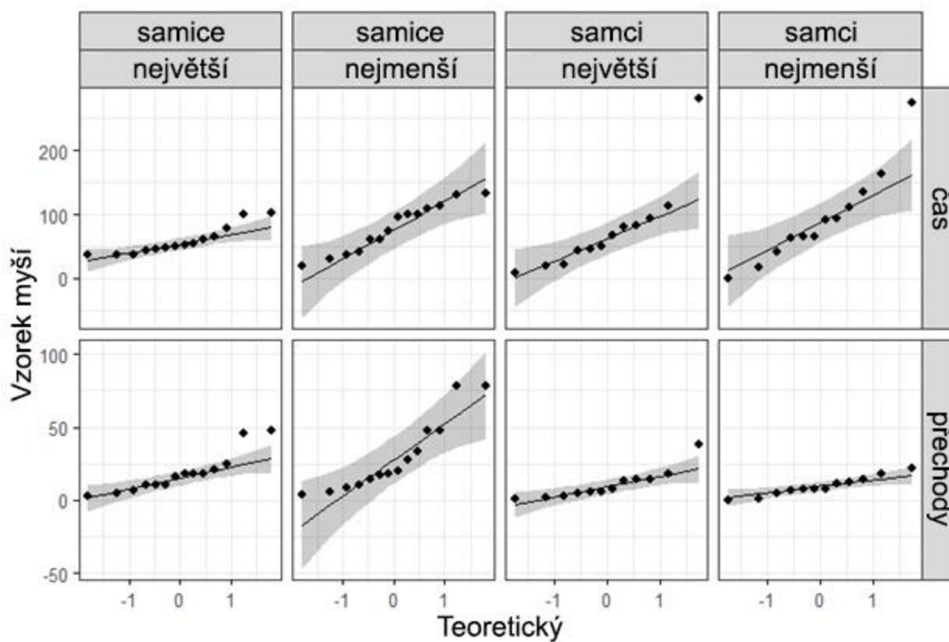
Pro ověření normality dat byl použit Shapirův-Wilkův test.

Tabulka 14: Výstup z programu R (version 4.1.2) - Shapirův-Wilkův test k ověření normality dat z testu Light-dark box

	pohlaví	velikost jedince	statistika	p value	poč. myší
poč. přechodů	samice	největší	0.8355553	0.014	14
poč. přechodů	samice	nejmenší	0.8459552	0.02	14
poč. přechodů	samec	největší	0.8059448	0.02	12
poč. přechodů	samec	nejmenší	0.9623955	0.817	12
čas ve světlé zóně	samice	největší	0.8476663	0.021	14
čas ve světlé zóně	samice	nejmenší	0.9379833	0.393	14
čas ve světlé zóně	samec	největší	0.7531628	0.003	12
čas ve světlé zóně	samec	nejmenší	0.9030887	0.174	12

$p > 0,05$

Graf 6. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z Shapirův-Wilkův test k ověření normality dat z testu Light-dark box



Data nenaplnují předpoklad normality, proto byla použita neparametrická dvoufaktorová ANOVA. Pro všechny hlavní efekty a interakce byla použita robustní ANOVA, analýza rozptylu hodnot transformovaných dat (Rfit) programu R (verze 2.1.2)

Tabulka 15: Výstup z programu R (version 4.1.2) - Dvoufaktorová ANOVA – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic z testu Light-dark box

čas ve světlé zóně				
	st. volnosti	zbytkový st. volnosti	F – hodnota	p hodnota
1 velikost jedince	1	48	2.266	0.138
2 pohlaví	1	48	0.103	0.749
3 velikost jedince: pohlaví	1	48	0.009	0.923
poč. přechodů				
	st. volnosti	zbytkový st. volnosti	F – hodnota	p hodnota
1 velikost jedince	1	48	2.234	0.141
2 pohlaví	1	48	10.795	0.002
3 velikost jedince: pohlaví	1	48	1.476	0.230

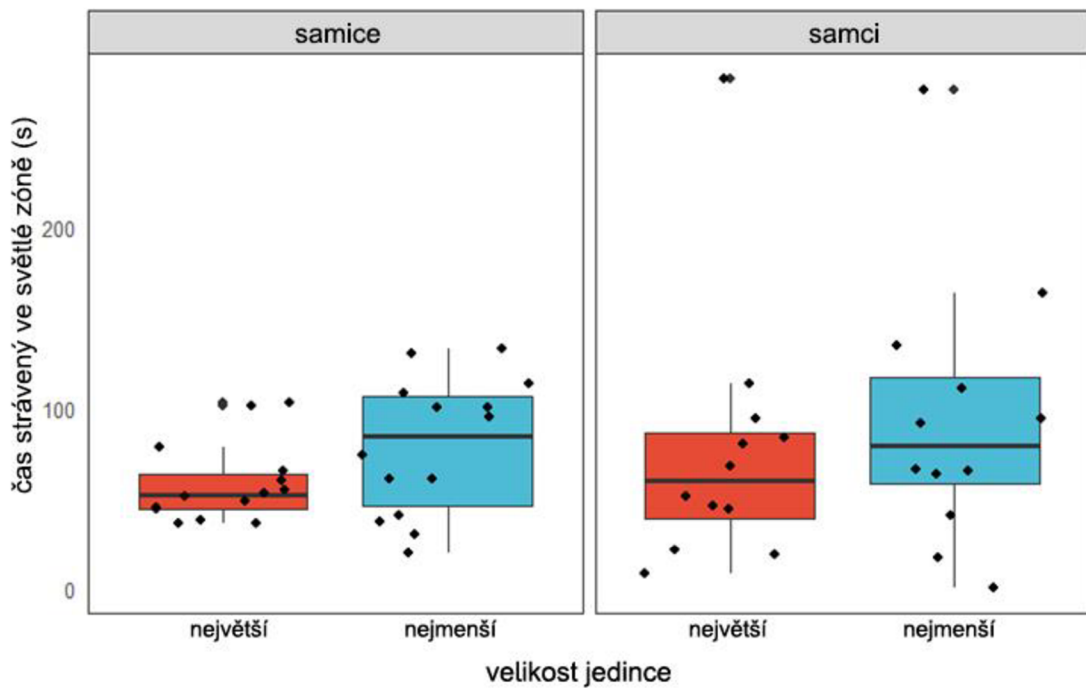
Čas ve světlé zóně: Hodnota p (0,14) pro čas strávený ve světlé zóně*velikost jedince byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Light-dark box test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v čase stráveném ve světlé zóně mezi největšími a nejmenšími jedinci.

Hodnota p (0,75) pro čas strávený ve světlé zóně*poohlaví byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Light-dark box test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v čase stráveném ve světlé zóně mezi samci a samicemi.

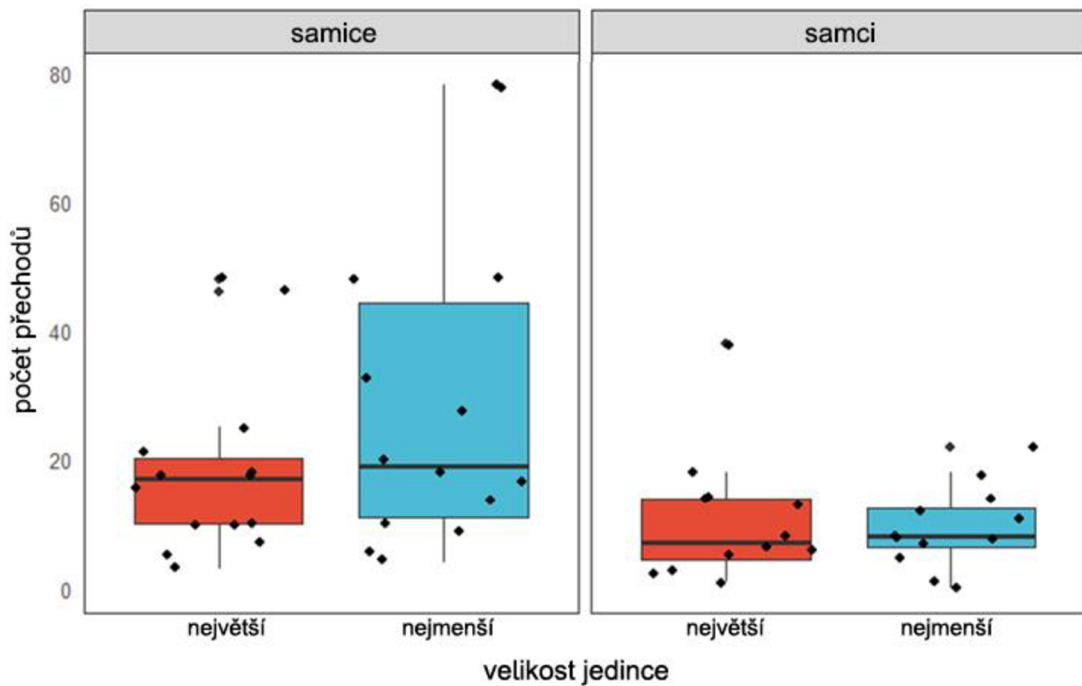
Počet přechodů mezi zónami: Hodnota p (0,14) pro počet přechodů mezi zónami*velikost jedince byla větší než hladina významnosti α (0,05). Hypotézu pro Light-dark box test nelze zamítnout, statisticky bylo prokázáno, že neexistoval významný rozdíl v počtu přechodů mezi zónami mezi největšími a nejmenšími jedinci.

Hodnota p (0,002) pro počet přechodů mezi zónami*poohlaví byla menší než hladina významnosti α (0,05), proto byla nulová hypotéza pro Light-dark box test zamítnuta. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu přechodů mezi zónami a pohlavím. Samice byly aktivnější než samci.

Graf 7. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z dvoufaktorové ANOVY – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic ve velikosti jedince a času stráveném ve světlé zóně testu Light-dark box



Graf 8. Výstup z programu R (version 4.1.2) - grafické znázornění dat z dvoufaktorové ANOVY – porovnání výsledků největších a nejmenších samců a samic ve velikosti jedince a počtu přechodů mezi zónami v testu Light-dark box



6. Diskuze

Mnoho autorů (Blanchard et al. 1993, Heim 2003, Knotová 2019, Barlett et al. 2019, Larrieu et al. 2018, Charney et al. 2004, Sayed et al. 2015) tvrdí, že patologické úzkosti vznikají v důsledku stresu. U laboratorních myší, chovaných ve skupinách, je hlavní příčinou vzniku chronického stresu, který způsobuje úzkost jejich postavení v hierarchii (Larrieu et al. 2018). Úroveň stresu lze určovat i na základě hladiny stresového hormonu kortikotropinu. Koncentrace kortikotropinu je významně vyšší u podřízených než dominantních samců. Toto zjištění naznačuje, že podřízení samci mají tendenci být v domácí kleci více stresováni (Blanchard et al. 1993, Horii et al. 2017).

Cílem práce bylo ověřit, zda může být menší velikost těla u laboratorní myši indikátorem úzkostných behaviorálních projevů. U těchto jedinců bylo úzkostné chování očekáváno na základě řady studií (Hilakivi et al. 1990, Horii et al. 2017, Blanchard et al. 1992), které popisují, že největší jedinci budou ve skupině dominantní a nejmenší jedinci naopak podřízení. V této studii se tak předpokládalo, že pokud bude ze skupiny společně chovaných myší vybrán největší a nejmenší jedinec, bude nejmenší jedinec vykazovat vyšší úzkost v novém neznámém prostředí, než jedinec největší. Největší a nejmenší jedinci byli vybráni na základě indexu, který byl vypočítán jako podíl hmotnosti myši a délky jejího chodidla pravé zadní končetiny.

U největších a nejmenších jedinců ze skupiny byly v testech Open field a Light-dark box sledovány projevy nesoucí známky úzkostného chování. Předpoklad, že nejmenší jedinci, budou během testování vykazovat známky úzkostného chování, se nenaplnil. Výsledky analýz neprokázaly statisticky významný rozdíl v míře úzkostného chování mezi největšími a nejmenšími jedinci. Byl prokázán pouze rozdíl v úrovni motorické aktivity, přičemž samice byly aktivnější než samci. Hypotéza, že myši s nižší hmotností mají sklony k úzkostnému chování, se nepotvrdila.

Stanovená hypotéza se shodovala se studií, kterou provedl Horii et al. z roku 2017. Ti se zabývali vlivem sociálního postavení jedince na chování podobné úzkosti a depresi. Potvrdilo se jim, že sociální postavení souvisí s fyzickým růstem. Výsledky ukázaly významný vliv dominantního postavení na nárůst tělesné hmotnosti. Při provedeném testu Open field byla nachozená vzdálenost a doba trávená v centru menší u podřízených než u dominantních myší. V testech Elevated puls maze vykazovaly podřízené myši významně menší nachozenou vzdálenost a procento času stráveného v otevřeném rameni než dominantní jedinci. Tyto výsledky behaviorálních testů naznačovaly, že podřízené myši vykazovaly více chování podobné úzkosti a depresi než dominantní myši a že dominantní jedinci byli skutečně větší než podřízení.

Někteří autoři (Avgustinovich et al. 1997, Clément et al. 1998, Ferrari et al. 1998, Guillot et al. 1966, Larrieu et al. 2017) naopak pozorovali úzkost u dominantních samců. Kudryavtseva et al. ve své práci z roku 2021 považují zvýšenou úzkost u dominantních samců jako důsledek opakované zkušenosti s agresí a agresivní motivací. Úroveň úzkosti pak závisí na míře a délce

trvání agresivního zážitku a na genetické zátěži (Avgustinovich et al. 2000). Kudryavtseva et al. (2021) uvádí, že samci více útočných kmenů, vykazují vyšší úroveň úzkosti ve srovnání s nízko agresivními kmeny.

Z těchto studií vyplývá, že lze pozorovat rozdíly v úzkostném chování vlivem sociálního postavení. Jako možný důvod, proč v této diplomové práci nebyl pozorován statisticky významný rozdíl se připouští fakt, že k určení sociálního postavení byl použit index velikosti jedince, který nemusel odpovídat reálnému sociálnímu postavení ve skupině. Někteří autoři se totiž neshodují na tom, jak a jestli vůbec sociální postavení souvisí s velikostí.

Flannelly et al. v roce 1977 prokázali, že podřízení samci myši mají mnohdy nižší tělesnou hmotnost než alfa samci. Hilakivi et al. (1990) uvádí hmotnost i jako faktor agresivity – čím byl jedinec těžší, tím déle trvaly jeho agresivní projevy. Williamson et al. ve své práci z roku 2017 také uvádí, že samci chovaní ve skupině, vykazovali odlišnou hmotnost dle sociálního postavení. Podřízení samci měli tendenci k nižší tělesné hmotnosti. Výraznější rozdíl hmotnosti pozoroval i Parmigiani a Pasquali (2009), kteří popsali agresivní reakce myši vůči jedincům s odlišným sociálním statutem. Při celkové analýze pokusu došli k jasnému výsledku. Dominantní, útoční samci byli výrazně těžší než podřízení samci.

Drickamer et al. (1973) uvádí, že vyšší tělesná hmotnost u dominantních jedinců má své opodstatnění, neboť těžší zvířata mají větší predispozice zvítězit v konfliktních situacích a stát se tak nejvýše postavenými členy sociální skupiny. Po opakovaném prohraném agresivním střetu s dominantním jedincem pak podřízená zvířata často vlivem stresu či zranění snižují svou tělesnou hmotnost, naopak dominantní si svou hmotnost uchovávají, čímž se rozdíl ještě více prohloubí (Blanchard et al. 1992).

Bartolomucci et al. (2009) studovali metabolické důsledky u myši způsobené chronickým sociálním stresem. Výsledky prokázaly, že dominantní myši krmené standardní stravou měly negativní energetickou bilanci, zatímco podřízené měly pozitivní energetickou bilanci. To mohlo mít souvislost i s tím, že lokomotorická aktivita byla snížena u podřízených a zvýšena u dominantních. Dominantní jedinci také vykazovali konzistentní pokles hmotnosti viscerálních tukových polštářů. Při dietě s vysokým obsahem tuku podřízení vykazovali vyšší, zatímco dominantní nižší náchylnost k obezitě spojené s hyperfagií. Závěrem prokázali, že sociální status v chronickém stresu hluboce ovlivňuje metabolické funkce myši.

Xu et al. (2020) nenanalezli žádný rozdíl v intenzitě tělesného růstu mezi dominantními a podřízenými jedinci, což naznačuje, že sociální hierarchie nemusí růst jedince ovlivnit. Ačkoli dominantní jedinci měli více výhod v kompetici o potravu, spotřebovaná energie mohla být vynaložena na aktivitu spojenou s agresivními útoky. Podřízení jedinci mohou přijímat méně potravy, ale nízká frekvence útočného chování může ušetřit energii pro růst (Gao et al. 2018). Xu et al. (2009) poukazují, že to, zda sociální hierarchie ovlivňuje růst jedince, může souviset s dostupností adekvátní potravy.

Z důvodu těchto nejednoznačných tvrzení o hmotnosti a sociálním postavení jedince je patrné, že tělesná velikost jedince nemůže být považována za jasný důkaz dominantního, nebo podřízeného postavení. K provedení dalších pokusů, zabývajících se úzkostí, která pramení z prožívání chronického stresu, který je způsobený agresivními útoky dominantních

jediců, doporučuji k určení sociální hodnosti použít jinou metodu. Taková metoda by měla vyhodnotit skutečné sociální postavení. Mezi takovéto metody patří například trubicový test, který přímo odráží vlastnosti pozorovaných myší.

7. Závěr

Úzkost způsobená stresem je ve výzkumu obecně nežádoucí, neboť negativně ovlivňuje výsledky testování a vede tak k falešným výsledkům. Stresory v laboratoři jsou dobře známým zdrojem nevysvětlitelných variací v pozadí, které ovlivňují výkonnost laboratorních zvířat v behaviorálních testech. Je to proto, že výkon zvířete během testování je určen jeho vnitřním stavem (Wahlsten 2011). To může způsobit značné problémy při replikaci výsledků napříč skupinami zvířat, experimentů a laboratoří a při přímém srovnání výsledků mezi studii (Bailey et al. 2006). Úzkost během testování pravděpodobně přesune pozornost zvířete od konkrétního testu nebo podnětu a zhorší jeho schopnost učit se, nebo řešit konkrétní úkoly. To může zhoršit spolehlivost testovaných subjektů a potenciálně poskytnout zavádějící údaje, které se mohou zdát konzistentní, ale odrážejí nevhodnou interakci s testem spíše než měřítko výkonu, k jehož posouzení byl test navržen (Gouveia et al. 2017).

Tato diplomová práce se zabývala korelací tělesné velikosti a úzkostného chování u laboratorní myši. Předpokládalo se, že myši s menší velikostí budou v behaviorálních testech projevovat ve vyšší míře známky úzkostného chování než jedinci s větší velikostí. K ověření tohoto předpokladu byli vybráni největší a nejmenší jedinci ze společných klecí. Tito jedinci pak byli testováni pomocí standardizovaných behaviorálních testů, v rámci kterých lze určit projevy úzkostného chování. Pro výzkum této diplomové práce byly zvoleny testy Open field a Light-dark box.

Na základě naměřených výsledků behaviorálních testů nebylo prokázáno, že by jedinci s menší velikostí vykazovali úzkostnější chování. Analýzy výsledků neprokázaly statisticky významné rozdíly mezi největšími a nejmenšími jedinci. Jediný prokázaný rozdíl byl mezi samci a samicemi v lokomotorické aktivitě. Jak v Open field testu tak v Light-dark boxu vykazovaly samice vyšší aktivitu. Toto ale nebylo předmětem plánovaného výzkumu. Stanovená hypotéza, že myši s menší tělesnou velikostí mají sklony k úzkostnému chování byla na základě zjištěných výsledků zamítnuta.

Z této diplomové práce vyplývá, že menší tělesná velikost laboratorních myší není indikátorem úzkostných behaviorálních projevů a proto nemusí mít experimentátor obavy do testu zařadit i menší jedince.

8. Literatura

Tištěné monografie

Bartoš L, Jebavý L, et al. 2014. Ochrana, chov a využití pokusných zvířat. Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech ve spolupráci s ČZU v Praze, Brno.

Beck AT, Emery G. 2005. Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective Basic Books. New York.

Davisson MT. 1999. National Research Council (US) International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research. National Academies Press (US). Washington DC.

Donát P. 1999. Úvod do etofarmakologie. TIGIS s.r.o. Praha.

Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. 2009 The Open Field Test. In: Gould T. (eds) Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Neuromethods, vol 42. Humana Press. Totowa.

Grayson L. 2000. Animals in Research: For and Against. British Library. London

Green EL. 2007. Biology of the Laboratory Mouse, by the staff of the Jackson laboratory. Dover publications, INC. New York.

Hintz HF, Cromwell GL, Fahey GC at al. 1995. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Fourth Revised Edition. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. National academy press. Washington, D.C.

Jebavý L. 2014. Chov laboratorních zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. 1. vydání. Praha

Ladewig J. 2000. Chronic intermittent stress: a model for the study of long-term stressors. The biology of animal stress. 1st edition. Cabi Publishing. New York.

Manning A, Dawkins MS. 2009. An Introduction to Animal Behaviour. Vyd. 6., Cambridge University Press. New York.

McFarland D. 1989. Oxford companion to animal behavior. Oxford University Press. Oxford.

Nádeníček J, Voslářová E. 2017. Etologie potkana a myši. VFU. Brno.

Suckow MA, Danneman P, Brayton C. 2005. The laboratory mouse. CRC Press. London.

Veselovský Z. 2005. Etologie - Biologie chování zvířat. Vyd. 1., Praha – Academia Praha.

Vychodilová L, Stejskalová K, Bubeníková J. 2019. Ing. Klinická genetika. Fakulta veterinárního lékařství. Ústav genetiky. Brno.

Wahlsten D. 2011. Mouse Behavioral Testing, how to use mice in behavioral neuroscience. University of Alberta. Canada.

Wasserbauer S, et al. 1999. Výchova ke zdraví pro vyšší zdravotnické školy a střední školy. 1. vyd. Státní zdravotní ústav. Praha.

Whishaw IQ, Kolb B. 2005. The behavior of the laboratory rat. Oxford University. New York.

Články v periodikách

Augustsson H, Dahlborn K, Meyerson BJ. 2005: Exploration and risk assessment in Avgustinovich DF, Gorbach OV, Kudryavtseva NN. 1997. Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiol Behav.* **61(1)**: 37–43s.

Avgustinovich DF, Lipina TV, Bondar NP, Alekseyenko OV, Kudryavtseva NN. 2000. Features of the genetically defined anxiety in mice. *Behav Genet.* **30(2)**: 101–109s.

Avram SKW, Cymerblit-Sabba A. 2017. Bruce effect. *Hormones, Brain and Behavior.* Elsevier. **3**: 279- 304s.

Bailey KR, Rustay NR, Crawley JN. 2006. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls. **47**: 124–131s.

Bean NJ. 1982. Olfactory and vomeronasal mediation of ultrasonic vocalizations in male mice. *Physiol Behav.* **28(1)**: 31–37s.

Bernstein IS. 1981. Dominance: The baby and the bathwater. *The Behavioral and Brain Sciences.* **4**: 419-457s.

Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero CH et al. 2009. Metabolic Consequences and Vulnerability to Diet-Induced Obesity in Male Mice under Chronic Social Stress. *PLoS One.* **4(1)**: 4331s.

Blanchard BC, Sakai RR, McEwen B, Weiss SM, Blanchard RJ. 1993. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav Brain Research.* **58(1-2)**: 113-21s.

- Blanchard RJ, Flores T, Magee L, Weiss S, Blanchard DC. 1992. Pregrouping aggression and defense scores influences alcohol consumption for dominant and subordinate rats in visible burrow systems. *Aggressive Behavior*. **18**: 459-467s.
- Boonstra R, Hik D, Singleton GR, Tinnikov A. 1998: The impact of predator- induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecological Monographs*. **68(3)**: 371–394s.
- Bourin M, Hascoet M. 2003. The mouse light-dark box. Elsevier. **463**: 55 – 65s.
- Bowler DE, Benton TG. 2005. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*. **80**: 205 - 225s.
- Breuner CW, Orchinik M. 2002. Beyond carrier proteins. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*. **175**: 99-112s.
- Burn CC. 2008. What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare. *Applied Animal Behaviour Science*. **112**: 1–32s.
- Clément Y, Calatayud F, Belzung C. 2002. Genetic basis of anxiety-like behaviour: critical review. *Brain Res Bull*. **57(1)**: 57-71s.
- Clément Y, Chapouthier G. 1998. Biological basis of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. **22(5)**: 623–633s.
- Crowcroft P. 1955. Territoriality in wild House mice, *Mus musculus* L. *Journal of Mammalogy*. **36(2)**: 299-301s.
- Davies G, Greenhough B et al. 2018. Science, culture, and care in laboratory animal research: Interdisciplinary perspectives on the history and future of the 3Rs. *Science, Technology & Human Values*. **20(10)**: 1-19s.
- Denmark A, Tien D, Wong K, et al. 2010. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural Brain Research*. **208(2)**: 553-559s.
- Drews C. 1993. The Concept and Definition of Dominance in Animal Behaviour. *Behaviour*. **125(3-4)**: 283-313s.
- Drickamer LC, Vandenberg JG, Colby DR. 1973. Predictors of dominance in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Animal Behaviour*. **21(3)**: 557-563s.

Ellacott KLJ et al. 2010. "Assessment of feeding behavior in laboratory mice." *Cell metabolism* **12(1)**: 10-17s.

Ennaceur A. 2013. "Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments". *Physiology & Behavior*. **135**: 55–71s.

Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. 2013. A Brief History of Animal Modeling. *Missouri medicine* **110(3)**: 201-205s.

Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, Rodgers RJ. 1998. Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors aggression and anxiety. *Physiol Behav*. **63(5)**: 821–827s.

Fisher SP. et al. 2012. "Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice." *Journal of biological rhythms* **27(1)**: 48-58s.

Flannelly KJ, Lore R. 1977. The influence of females upon aggression in domesticated male rats. *Animal Behaviour*. **25**: 654-659s.

Fonio E, Benjamini Y, Golani I. 2012. Short and long term measures of anxiety exhibit opposite results. *PLoS One*. **7(10)**.

Franco NH. 2013. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals* **3(1)**: 238–273s.

Gao T, Ding K, Song N, Zhang X, Han Z. 2018. Comparative analysis of multiple paternity in different populations of viviparous black rockfish, *Sebastes schlegelii*, a fish with long-term female sperm storage. *Mar. Biodivers*. **48**: 2017–2024s.

Guillot PV, Chapouthier G. 1996. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. *Behav Brain Sci*. **77**: 211–213s.

Gouveia K, Hurst JL. 2017. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Science reports*. **7**.

Hall CS et al. 1932. "A Study of the Rat's Behavior in a Field. A Contribution to Method in Comparative Psychology" University of California Publications in Psychology. **6**: 1-12s.

- Hilakivi C, Wozniak LA, Durcan KM, Linnoila MJ. 1990. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol behav.* **48(3)**: 429-433s.
- Horii Y, Nagasawa T, Sakakibara H, Takahashi A, et al. 2017. Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. *Scientific Reports.* **7(6991)**.
- Hubrecht R, Carter E. 2019. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals.* **9(10)**: 754s.
- Charney DS, Manji HK. 2014. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE.* **16(225)**.
- Churchill GA, Gatti DM, Munger SC, Svenson KL. 2012. The diversity outbred mouse population. *Mammalian Genome.* **23**: 713–718s.
- Karamihalev S, Brivio E, et al. 2020. Social dominance mediates behavioral adaptation to chronic stress in a sex-specific manner. *Elife.* **9**.
- Keane TM, Goodstadt L, et al. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature.* **477(7364)**: 289-294s.
- Kudryavtseva NN, Bondar NP, Avgustinovich DF. 2002. Association between experience of aggression and anxiety in male mice. *Behavioral Brain Research.* **133**: 83-93s.
- Kozłowska K, Walker P, McLean L, Carrive P. 2015. Fear and the defense cascade: Clinical implications and management. *Harv Rev Psychiatry.* **23(4)**: 263-287s.
- Lange C, Lang J. 1885. The mechanism of the emotions. *The Classical Psychologists,* 672-684s.
- Larrieu T, Cherix A, et al. 2017. Hierarchical Status Predicts Behavioral Vulnerability and Nucleus Accumbens Metabolic Profile Following Chronic Social Defeat Stress. *Current Biology* **24;27(14)**: 2202-2210s.
- LeClair KB, Chan K, Kaster MP, Parise LF et al. 2021. Individual history of winning and hierarchy landscape influence stress susceptibility in mice. *Elife.* **28(10)**.

- Levine ED. 2008. Feline Fear and Anxiety. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **38(5)**: 1065–1079s.
- Lonstein J, Fleming A. 2002. Parental Behaviors in Rats and Mice. *Curr Protoc Neurosci* **8(1)**: 8-15s.
- Loveland JL, Uy N, Maruska KP, Carpenter RE, Fernald RD. 2014. Social status differences regulate the serotonergic system of a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Experimental biology*. **217(15)**: 2680–2690s.
- Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. 2012: Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*. **9(1)**: 111-118s.
- Mcewen BS, Gianaros PJ. 2011. Stress and allostasis induced brain plasticity. *Annu Rev Med*. **62**: 431-445s.
- McTeague LM, Lang PJ. 2012. The anxiety spectrum and the reflex physiology of defense: from circumscribed fear to broad distress. *Depression and anxiety*. **29**: 264–281s.
- Mhaouty-Kodja S, Naulé L, Capela D. 2018. Sexual Behavior: From Hormonal Regulation to Endocrine Disruption. *Neuroendocrinology*. **107**: 400–416s.
- Musser GG, Lunde DP, Truong SN. 2009. Description of a New Genus and Species of Rodent (Murinae, Muridae, Rodentia) from the Tower Karst Region of Northeastern Vietnam. *American Museum Novitates*. **3517**: 1-41s.
- Ohl F. 2005. Animal Models of Anxiety. *Handbook of Experimental Pharmacology*. **169**: 35–69s.
- Oktiansyah R. 2019. Daily Activity of Male Mice (*Mus musculus*) in Laboratory. *Jurnal Biota* **5(2)**: 80-88s.
- Olsson IAS, Westlund K. 2007. More than numbers matter: The effect of social factors on behaviour and welfare of laboratory rodents and non-human primates. *Applied Animal Behaviour Science*. **103(3-7)**: 229-254s.
- Parmigiani S, Pasquali A. 2009. Aggressive responses of isolated mice towards opponents of differing social status. *Italian Journal of Zoology*. **46(1-2)**: 41-50s.

- Poffé CH, Dalle S, Kainz H, Berardi E, Hespel P. 2018. A noninterfering system to measure in-cage spontaneous physical activity in mice. *Journal of applied physiology*. **125(2)**: 263-270s.
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 3–33s.
- Quick DJ, Horn RS, Campbell J. 2008. Health Consequences of Stress. *Journal of Organizational Behavior Management*. **8(2)**: 19–36s.
- Ramos A, Pereira E, Martins GC et al. 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research*. **193(2)**: 277-288s.
- Rixey MP, Nachman MW. 2015. *The Natural History of Model Organisms: Insights into mammalian biology from the wild house mouse Mus musculus*. National Library of Medicine. **4**
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2004. How do glucocorticosteroids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr. Rev.* **21**: 55-89s.
- Sayed S, Lacoviello BM, Charney DS. 2015. Risk factors for the development of psychopathology following trauma. *Curr Psychiatry Rep.* **17(8)**: 612s.
- Schjelderup-Ebbe T. 1922. Beitrage zur Sozialpsychologie des Haushuhns. *Zeitschrift fuer Psychologie Leipzig*. **881**: 225-252s.
- Schulkin J. 2013. Allostatic: a neural behavioral perspective. *Horm. Behavior*. **43**: 21-27s.
- Steimer T. 2002. The biology of fear - and anxiety - related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* **4(3)**: 123-137s.
- Steimer T. 2002. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* **4(3)**: 231–249s.
- Sun Y, Lu W, Du K, Wang KH. 2019. microRNA and mRNA profiles in the amygdala are relevant to fear memory induced by physical or psychological stress. *J Neurophysiol.* **122(3)**: 1002-1022s.

- Swanson LW. 2000. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain research*. **886 (1-2)**: 113-164s.
- Toth I, Neumann ID. 2013. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res*. **354**: 107-118s.
- Tuttle AH, Philip VM, Chesler EJ, Mogil JS. 2018. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nature methods*. **15(12)**: 994-996s.
- Van Loo PLP, Kruitwagen CL, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. 2000. Modulation of aggression in male mice. Influence of age cleaning regime and scent marks. *Animal Welfare*. **9(3)**: 281-295s.
- Veldhuis JD, Sharma A, Roelfsema F. 2013. Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotrophic-adrenal axis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **42(2)**: 201-225s.
- Vries H, Stevens JMG, Vervaecke H. 2006. Measuring and testing the steepness of dominance hierarchies. *Animal Behaviour*. **71**: 585-592s.
- Wang F, Zhu J, Zhu H, Zhang Q, Lin Z, Hu H. 2011. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science*. **334(6056)**: 693-697s.
- Wang F, Kessels HW, Hu H. 2014. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. *Trends neuroscience*. **37(11)**: 674-82s.
- Williamson CM, Lee W, DR Russell, Curley JP. 2017. Social context-dependent relationships between mouse dominance rank and plasma hormone levels. *Physiology a behavior*. **171**: 110- 119s.
- Xu X, Zhang Z, Guo H, Qin J, Zhang X. 2020. Changes in Aggressive Behavior, Cortisol and Brain Monoamines during the Formation of Social Hierarchy in Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Animals (Basel)*. **10(12)**: 2357s.
- Yalcin B, Nicod J, Bhomra A, Davidson S, Cleak J, Farinelli L, Østerås M, Whitley A, et al. 2010. Commercially available outbred mice for genome-wide association studies. *PLoS Genet* **6(9)**: 1-15s.

Webové stránky

Ballenger L. 1999. "Mus musculus". Animal Diversity Web. Available from https://animaldiversity.org/accounts/Mus_musculus/ (accessed březem 2022).

Bártová E. 2014. Pokusy na zvířatech. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Available from https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-pokusy_na_zviratech&lang=cz (accessed březem 2021).

Cendelín J. Voller J. 2009. Laboratorní zvířata. Ústav patologické fyziologie Lékařská fakulta v Plzni Univerzita Karlova. Available from <http://patofyziologie.lfp.cuni.cz/wp-content/uploads/2018/09/zvirata.pdf> (accessed říjen 2021).

Heim Ch. 2003. Úzkost, stres a úzkostné poruchy na počátku 21.století. Available from <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2003/6-2003/Uzkost-stres-a-uzkostne-poruchy-na-pocatku-21-stoleti/e-9l-9C-e4.magarticle.aspx> (accessed březem 2022).

Horwitz D. 2013. Fears, Phobias and Anxiety. How do animals show fear? Aztec. Animal clinic. Available from <https://aztecanimalclinic.com/resources/pet-care-library/canine/fears-phobias-anxiety/> (accessed říjen 2021).

Knotková S. 2019. Úzkost mění také stavbu našich buněk. Available from <https://www.extrastory.cz/uzkost-meni-take-stavbu-nasich-bunek> (accessed prosinec 2021).

Nezbeda V. 2020. Jak se liší strach od úzkosti či paniky a kdy se stává úzkost nemocí? Adicare. Available from <https://adicare.cz/aktuality/jak-se-lisi-strach-od-uzkosti-ci-paniky-a-kdy-se-stava-uzkost-nemoci/> (accessed říjen 2021).

Pektor L. 2007. Emoce a výkonnost. QM Profi. Available from https://www.qmprofi.cz/33/emoce-a-vykonnost-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4Eou0c_K0wh9GGeN4JuU5hlo/ (accessed duben 2021).

Quesenberry KE, Donnelly TM. 2020. Breeding and Reproduction of Mice. Available from <https://www.msdsvetmanual.com/all-other-pets/mice/breeding-and-reproduction-of-mice> (accessed duben 2021).

Yeadon J. 2014. 6 STEPS FOR SETTING UP TIMED PREGNANT MICE. Available from <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/september/six-steps-for-setting-up-timed-pregnant-mice> (accessed duben 2021).

Musser G, Hutterer R, Kryštufek B, Yigit N, Mitsainas G. 2021. *Mus musculus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021. Available from <https://www.iucnredlist.org/species/13972/197519724> (accessed duben 2021).