

Sveučilište u Zagrebu

Hrvatski studiji

Studij psihologije

DIPLOMSKI RAD

**POVEZANOST OKOLIŠA S LOKOMOCIJOM,
EKSPLORATORNIM PONAŠANJEM,
SOCIJALNOŠĆU I KONGNITIVNOM RIGIDNOSTI
U ŠTAKORA**

Voditelj: doc. dr. sc. Zoran Tadić

Studentica: Ivana Adamić

Zagreb, 02. listopad 2009.

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti postoji li i u kojoj mjeri razlika, između štakora odraslih u standardnim laboratorijskim uvjetima i onih odraslih u obogaćenim uvjetima s obzirom na njihovu razinu lokomocije, eksploracije, socijalnosti i kognitivne rigidnosti. Subjekti istraživanja bili su bijeli norveški štakori (N=14) i pigmentirani norveški štakori (N=11). Bijeli norveški štakori su od rođenja odrastali u standardnom laboratorijskom okolišu, a pigmentirani su odmah nakon rođenja, s majkom, preseljeni u obogaćene uvijete u kojima su i odrastali. Primijenjena su četiri bihevioralna testa; lokomocija je provjerena testom otvorenog polja, eksploracija testom ploče s rupama, socijalnost testom socijalnog izbora i kognitivna rigidnost T-labirintom.

Dobiveni rezultati pokazali su kako postoji statistički značajna razlika u okomitoj lokomociji i anksioznosti u situaciji novog okoliša, no ne postoji značajna razlika u vodoravnoj lokomociji. Pronađena je statistički značajna razlika u eksploraciji gdje su štakori iz obogaćenih uvjeta značajnije više istraživali rupe u testu ploče s rupama. Pokazali su se i značajnije socijalnima na testu socijalnog izbora. Test kognitivne rigidnosti nisu uspjeli završiti štakori iz standardnih uvjeta pa su ti nalazi dobiveni samo za „obogaćenu“ skupinu.

Ključne riječi: obogaćeni okoliš, lokomocija, eksploratorno ponašanje, socijalnost, kognitivna rigidnost

Abstract:

The goal of this research was to check are there and in which extend, differences in locomotion, exploratory behavior, sociability and cognitive rigidity, between rats that grew up in standard laboratory conditions and those that grew up in enriched environment. Subjects were albino norway rats (N=14) and pigmented norway rats (N=11). Albino rats grew up in standard laboratory conditions, and pigmented rats were moved to enriched environment after birth, with their mother. Four behavioral tests were used; locomotion was tested in an open field test, exploration on the holeboard test, sociability with social approach test and cognitive rigidity with T-maze.

Results show the difference between two groups in vertical locomotion and anxiety in the new environment, but there is no difference in horizontal locomotion. The significant differences were found in exploratory behavior. “Enriched” group showed more head dipping behavior in holeboard test. They also showed more sociability on social approach test. The cognitive rigidity was measured only for “enriched” group because the “standard” group failed to finish the T-maze task.

Key words: enriched environment, locomotion, exploratory behavior, sociability, cognitive rigidity

SADRŽAJ

Uvod.....	4
1. Biologija i ponašanje laboratorijskih štakora.....	4
2. Obogaćeni i standardni laboratorijski okoliš.....	5
2.1. Standardni laboratorijski okoliš.....	5
2.2. Obogaćeni laboratorijski okoliš.....	6
2.3. Različiti okoliši i njihov utjecaj na rezultate u eksperimentu.....	8
3. Različiti aspekti okoliša i načini za njihovo obogaćivanje u laboratoriju.....	9
3.1. Socijalni aspekt i načini njegovog obogaćivanja.....	10
3.2. Nutricijski aspekt i načini njegovog obogaćivanja.....	10
3.3. Osjetilni aspekt i načini njegovog obogaćivanja.....	11
3.4. Psihološki aspekt i načini njegovog obogaćivanja.....	11
3.5. Fizički aspekt i načini njegovog obogaćivanja.....	12
4. Ciljevi istraživanja.....	13
Metoda i materijali.....	14
1. Eksperimentalna skupina.....	14
2. Kontrolna skupina.....	14
3. Testovi.....	15
3.1. Test otvorenog polja (open field test).....	15
3.2. Test ploče s rupama (Holeboard test).....	16
3.3. Test socijalnog izbora (social approach test).....	17
3.4. T-labirint.....	17
Rezultati i rasprava.....	19
1. Eksperiment 1: Test otvorenog polja.....	19
2. Eksperiment 2: Test ploče s rupama.....	22
3. Eksperiment 3: Test socijalnog izbora.....	25
4. Eksperiment 4: T-labirint.....	28
Zaključak.....	31
Literatura.....	32

UVOD

1. Biologija i ponašanje laboratorijskih štakora



Slika 1: Smeđi štakor (*Rattus Norvegicus*)

Štakor je sisavac koji pripada redu glodavaca. Danas, u laboratorijima, najčešće korištena vrsta štakora potekla je od običnog smeđeg štakora (*Rattus norvegicus*) koji je u europski uobičajen od 1700-tih, a danas nastanjuje gotovo cijeli svijet (Sharp i La Regina, 1998). Smatra se da je potekao iz sjeverne Kine, a jedini kontinent koji danas ne nastanjuje je Antartika. To je drugi najuspješniji sisavac nakon ljudi (Fragaszy i sur. 2003). Osim u rijetkim slučajevima, nastanjuje mjesta koja nastanjuju i ljudi, pogotovo urbana područja. U 19. stoljeću udomaćeni potomci smeđeg štakora koristili su se u neuroanatomskim istraživanjima u Sjedinjenim Američkim Državama i Europi (Sharp i La Regina, 1998). Laboratorijski štakor u prosjeku može živjeti od 2,5 – 3,5 godine. Mužjak u prosjeku teži od 450 – 520 grama dok ženke teže od 250 – 300 grama. Puls im je 300-400 udaraca u minuti, a disanje oko 100 udisaja po minuti (Sharp i La Regina, 1998). Štakori su sisavci s vrlo dobro razvijenim njuhom i sluhom dok im je vid nešto slabiji. Vide boje slično kao i ljudi, osim crvenih i zelenih nijansi, također mogu vidjeti i ultraljubičasto svjetlo (preuzeto sa <http://www.ratbehavior.org/RatVision.htm>).

Ženka štakora može okotiti od 3-18 mladunaca. Nakon oplodnje gestacija traje od 21-23 dana. Krzno mladunci u prosjeku dobivaju između 8. i 9. dana starosti. Oči otvaraju nakon 10-14 dana, a uši između 12. i 14. dana nakon koćenja. Mladi štakori se od majke mogu odvojiti nakon 21. dana starosti kada prestaju sisati, a spolnu zrelost dostižu između 40. i 60. dana. Štakor će najplodniji biti u dobi od 100-300 dana, a ženkin ciklus u prosjeku traje 4-5 dana (Sharp i La Regina, 1998).

Što se prehrane tiče smeđi štakor je svejedno glavna prehrana mu se sastoji od žitarica (Fragaszy i sur. 2003). Noćne su životinje i najaktivniji su tijekom noći i ranog jutra. Socijalni su, neagresivni i lako se adaptiraju na nove situacije. Kada se drže u skupinama, spavaju zajedno, čiste se međusobno i u međusobnoj komunikaciji koriste ultrazvučnu vokalizaciju. Kada im se omogući stvaraju socijalnu hijerarhiju u grupi.

Kod divljeg smeđeg štakora, u slučajevima nedostatka hrane, prvo umiru oni najniže u hijerarhiji. Hijerarhija im se sastoji od dominantnih i manje dominantnih štakora, a taj poredak utvrđuju „borbom kroz igru“. Kako bi utvrdili hijerarhiju, grupa će se međusobno loviti, skakat će jedan na drugoga, pokušavat će se međusobno srušiti na pod i izvoditi slične igre, dok će ozbiljne borbe uključivati i napade odostraga (preuzeto sa http://www.ratbehavior.org/norway_rat_ethogram.htm#PlayFighting).

Selektivnim parenjem smeđeg štakora dobivena laboratorijska verzija danas predstavlja važan model organizma u medicinskim, biološkim i psihološkim istraživanjima. Uzgajani su zbog toga što brzo dosežu spolnu zrelost, lagani su za održavanje i razmnožavanje u zatočeništvu.

2. Obogaćeni i standardni laboratorijski okoliš

2.1. Standardni laboratorijski okoliš



Slika 2: Primjer laboratorijskog kaveza

Okoliš laboratorijskih životinja često je dizajniran kako bi zadovoljio osnovne ekonomske i ergonomske uvjete.

Laboratorijski uvjeti najčešće onemogućavaju životinju u izvođenju svog normalnog ponašanja. Često kao odgovor na taj nedostatak stimulacije

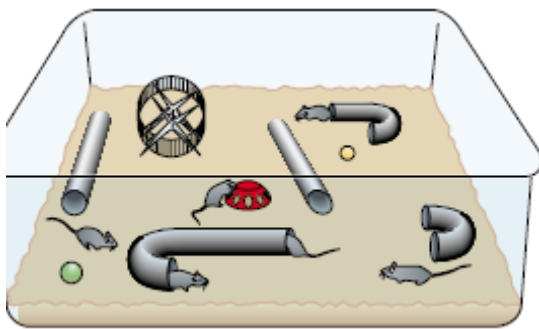
životinje pokazuju slabije fizičko stanje, abnormalna ponašanja ili pasivnost (Wenesfelder, 1990; prema Smith i Taylor, 1995).

Držanje životinja, koje je trenutno najzastupljenije u laboratorijima, najčešće se sastoji od plastičnih ili metalnih kaveza za glodavce s piljevinom kao podlogom, te standardiziranom laboratorijskom hranom i običnom vodom koji su uvijek dostupni i neograničeni. U standardiziranim laboratorijskim uvjetima, štakori su u često držani u istospolnim skupinama od oko četiri jedinke (Rauscher, 1998). Takvi uvjeti držanja životinji onemogućavaju čitav niz uobičajenih ponašanja specifičnih za vrstu. Odrasli štakor u takvom kavezu teško se može podići na zadnje noge, nemaju mjesto za skrivanje od stresnih podražaja iz okoline. Laboratorijski štakor najčešće je albino čije su crvene oči posebno osjetljive na svjetlo. Osvjetljenje u laboratorijima, od kojeg nema mogućnost bijega, je najčešće jako i nenosko

Također takvi uvjeti ne pružaju priliku za igru, vježbu, istraživanje, traženje hrane i druga slična ponašanja koja su normalna za štakora.

Pozitivno je to što ih se najčešće drži u skupinama, jer su socijalne životinje, no laboratorijski uvjeti im ne pružaju nova iskustva, perceptivno i lokomotorno su siromašni, te su životinje u njima svakodnevno izložene stresu. Takvi uvjeti, prema nalazima mnogih istraživanja (Van de Weerd i sur. 2002; Smith i Taylor, 1995; Callard i sur. 2000; Hadley i sur. 2006; DeLuca, 1997; Wiedenmayer, 1997; Powel i sur. 2000), često dovode do abnormalnih stereotipnih ponašanja. To su ponašanja koja se ponavljaju, a nemaju opažljivog cilja ili funkcije. Primjeri takvog ponašanja su buljenje u prazno, glodanje rešetki, samoozljeđivanje i slično, koji nisu zabilježeni kod divljih (ne zatočenih) životinja (Phillbin, 1998).

2.2. Obogaćeni laboratorijski okoliš



Primjer obogaćenog okoliša

Obogaćivanje okoliša je modifikacija životnog prostora životinje kako bi se poboljšalo njeno biološko funkcioniranje (Newberry, 1995; prema Van de Weerd i sur. 2002). Možemo ga definirati kao okoliš u kojem su kombinirane kompleksne socijalne i nesocijalne stimulacije (Van Praag i sur. 2000). Jedan od ciljeva obogaćivanja

okoliša je poboljšati opću dobrobit životinje i pružiti

joj mogućnost da izrazi više svog prirodnog, vrsti svojstvenog ponašanja. Okoliš životinje sastoji se od širokog spektra podražaja i stimulacija iz okoline, a obogaćivanje okoliša u zatočeništvu u obzir uzima ponašajne zahtjeve koji su specifični za vrstu (Van de Weerd i sur. 2002). Kada se životinji uskrate takva ponašanja koja su za nju prirodna, kao na primjer gradnja gnijezda, skloništa ili socijalne skupine, mogu se javiti vidljivi znakovi patnje, stresa, abnormalna ponašanja ili drugi znakovi patologije (Van de Weerd i sur. 2002). Poboljšavanje uvjeta držanja može imati više pozitivnih utjecaja na dobrobit životinje. Mnoga istraživanja pokazala su pozitivne učinke obogaćenog okoliša u laboratoriju. Ti učinci sežu od smanjivanja agresije, straha, anksioznosti i stresa do smanjivanja abnormalnih stereotipnih ponašanja ili poboljšavanja mozgovnih funkcija, učenja, pa tako i općeg fizičkog stanja (bolji imunološki odgovor, brže zarastanje rana, smanjenje pretilosti). Dodavanjem novih objekata u kavez, smanjuje se agresija kod laboratorijskih miševa. Već i jednostavan novi objekt poput

prazne staklene boce smanjuje agresiju (Ambrose i Morton, 2000). Povećavanje životnog prostora i mogućnost motoričke aktivnosti (kolut za trčanje) vodi do smanjenja u pokazivanju straha kod miševa (Engellenner i sur, 1982). Veći i kompleksniji okoliš smanjuje anksioznost i potiče više eksploratornog ponašanja u štakora (Levine, 1985; prema Reinhardt i Reinhardt, 2005). Modifikacija okoliša omogućavanjem životinji da se sakrije (plastične cijevi) smanjuje stres u štakora čak i ako im se ne poveća životni prostor (Foulkes, 2004; prema Reinhardt i Reinhardt, 2005). Istraživanje Callarda i suradnika (2000) o abnormalnom ponašanju životinja u zatočeništvu pokazalo je da ponašanje poput izvrtnje na leđa (engl. Backflipping), koje se ponekad javi u crnih štakora (*Rattus rattus*), značajno se smanjuje uvođenjem drvenih kućica za spavanje i skrivanje. To je u skladu sa hipotezom da razvoj abnormalnog ponašanja ima svoje korijene u odrastanju pod stresom koji donosi standardni laboratorijski okoliš i ograničene mogućnosti za perceptivnu i lokomotornu stimulaciju (Callard i sur. 2000). U miševa koji su odrastali u obogaćenom okolišu moguće je izmjeriti značajno višu razinu hipokampalnih neurona nego u onih odraslih u standardnim laboratorijskim uvjetima (Kempermann i sur. 1997). Štakori iz obogaćenih uvjeta držanja imaju veći i teži mozak (Diamond, 1966 i Atma i suradnici, 1968 ; prema Van Praag, 2000). To doprinosi poboljšanoj izvedbi na testovima učenja (Kempermann i sur. 1997). Obogaćivanje okoliša pokazalo se kao sredstvo poboljšavanja pamćenja na raznim zadacima koji zahtijevaju učenje. „Obogaćeni“ miševi bolje rezultate su postizali u vodenom labirintu (test prostornog pamćenja) od kontrolne skupine iz standardnih uvjeta. Prostorno učenje poboljšava se i u standardnim ili osiromašenim uvjetima, kada se životinjama omogući motorička aktivnost (Van Praag i sur. 2000).

Pozitivni učinci na fizičkom stanju životinje vide se u boljem imunološkom odgovoru organizma (Kingstone i Hofman-Goetz, 1996). Omogućavanjem izvođenja glodavcima prirodnog ponašanja „glodanja“ smanjuje se pretilost. Objekti koji im se omoguće za glodanje povećavaju eksploratorno ponašanje, te smanjuju unos viška hrane u organizam, kako bi se zadovoljila ta prirodna potreba.

Obogaćivanje okoliša ima efekte na patološka stanja, stres i starenje. D. Young (1999) je istraživanjem stanja poput moždanog udara, epilepsije ili starosti došao do rezultata kako trodnevno obogaćivanje okoliša smanjuje odumiranje stanica u hipokampusu za 45 % i sprečava motoričke grčeve i napadaje nakon ubrizgavanja kainičke kiseline (Van Praag i sur. 2000). Predoperativno, kao i postoperativno obogaćivanje okoliša ili omogućena motorička aktivnost ubrzavaju oporavak od moždanih lezija (Rozezweig i sur. 1977 i Darymple-Alford i Benton, 1984, prema Van Praag i sur. 2000).

U istraživanjima genetike i oporavka funkcija koje su narušene ozljedom mozga, ozljedom kralježnice ili zbog bolesti često se koriste transgene životinje. Neki afekti koji se vide kod tih životinja mogu biti rezultat stresa zbog osiromašenog okoliša u kojima ih se drži (Van Praag i suradnici, 2000). Takvi nalazi postoje u istraživanju C. Rampona (2000) gdje su mnogi bihevioralni i elektro-fizički deficiti opažani u transgenenog miša uklonjeni, umanjeni ili nisu nastali tokom razvoja u obogaćenom okolišu. To postavlja pitanje da li su ti deficiti kod mutiranih miševa bitni samo ako se radi o osiromašenim uvjetima.

Nedostaci obogaćivanja laboratorijskog okoliša su najčešće ekonomske prirode, iako to nije opravdano istraživanjima od kojih mnoga pokazuju da samo uvođenje novog objekta poput plastične cijevi u koju se životinja po želji može skloniti ima značajni i pozitivni utjecaj na njenu dobrobit, a ne zahtjeva velika financijska i prostorna izdavanja.

2.3. Različiti okoliši i njihov utjecaj na rezultate u eksperimentu

Postoji pitanje da li obogaćivanje standardnog laboratorijskog okoliša dovodi do smanjenja standardizacije u eksperimentu. Jedan od razloga postojanja standardiziranog laboratorijskog okoliša je povećavanje mogućnosti usporedbe i reprodukcije eksperimenata. Cilj je takvog okoliša smanjiti neželjene varijance koje uzrokuju nekontrolirani faktori iz okoliša. Neka istraživanja pokazuju da životinje iz obogaćenih uvjeta pokazuju više varijabilnosti u odgovorima na eksperimentalne procedure, zbog toga što pokazuju više različitih ponašanja. U obogaćenom okolišu životinje moraju odgovarati na mnogo podražajnih varijabli (Apleby, 1997; prema Van de Weerd i sur. 2002), što može uzrokovati povećanu varijaciju među jedinkama te time i veću standardnu devijaciju u eksperimentalnim rezultatima.

Životinje iz obogaćenog okoliša mogu biti manje pobudljive na podražaje od onih iz standardnog laboratorijskog okoliša. Restrikcija percepcije i osjetilnih iskustava čini živčani sustav osjetljivijim i jače pobudljivim na vanjske podražaje (Grandin, 1989; prema Van de Weerd i sur. 2002) te se time i smanjuje sposobnost habituacije. Takvi uvjeti uzrokuju i slabiju sposobnost učenja i tendenciju davanja prejakog odgovora na podražaj (Joseph i Gallagher, 1980; prema Van de Weerd i sur. 2002). Slijedeći tu logiku, životinje iz obogaćenih uvjeta trebale bi biti psihički i fizički stabilnije i time ih možemo smatrati boljim modelima organizma koji osiguravaju točnije rezultate u eksperimentima (Bayne i sur. 1996;

prema Van de Weerd i sur. 2002). „Obogaćene“ životinje vjerojatno bi predstavljale prikladnije modele za uopćavanje rezultata istraživanja na ljudsku populaciju.

Ako uvjeti držanja ne ostvaruju zahtjeve koje pojedina vrsta ima, ne mogu se očekivati pouzdani rezultati i točni zaključci (Fortmeyer, 1982; prema Van de Weerd i sur. 2002). Primjer toga bila bi istraživanja straha, stresa ili anksioznosti koja se najčešće iz etičkih razloga provode na životinjskim subjektima, kako bi se kasnije rezultati pokušali uopćiti na ljudsku vrstu. Teško će primjeren model biti nestabilna životinja, odrasla u osiromašenim uvjetima, slabo navikla na različite podražaje iz okoline, s pojačano pobudljivim živčanim sustavom te smanjenom sposobnošću učenja i habituacije. Kada bi se laboratorijskim životinjama osigurale najbolje moguće fizičke i socijalne osobine okoliša, primjerene za vrstu i za njihovu dobrobit, trebalo bi upotrijebiti manje jedinki u rutinskim testovima, a rezultati bi bili pouzdaniji (Chance i Russell, 1994; prema Van de Weerd i sur. 2002).

Takva opažanja javila su se već 50-ih godina dvadesetog stoljeća. Zabilježeno je da veličina varijance ovisi o prirodi okoliša (smještaj, opći tretman, socijalne situacije) u kojem se životinja nalazila (Chance, 1956; prema Van de Weerd i sur. 2002). Mnogi istraživači su pokazali (Van de Weerd i sur, 2002) kako obogaćivanje ne utječe samo na aritmetičku sredinu grupe u parametrima koje se mjeri već i na varijabilnost tih rezultata. Upotrebom „obogaćenih“ životinja mogao bi se smanjiti broj jedinki koji je potreban za dobivanje valjanih eksperimentalnih rezultata.

3. Različiti aspekti okoliša i načini za njihovo obogaćivanje u laboratoriju

Tijekom zadnja dva stoljeća postoje nekoliko nalaza i tvrdnji o pozitivnim utjecajima okolinske stimulacije i obogaćivanja okoliša životinje na njihov mozak i njegove funkcije kao i na opće funkcioniranje organizma. Kasnih 1940-ih O. D. Hebb je bio prvi koji je obogaćeni okoliš predložio kao eksperimentalni koncept. On je izvještavao o štakorima koje je kod kuće držao kao kućne ljubimce. Kod njih je primijetio bihevioralna poboljšanja u usporedbi sa štakorima koji su bili držani u laboratorijskim uvjetima. U svom istraživanju iz 1949. godine, došao je do nalaza o većoj plastičnosti mozga „obogaćenih“ životinja (Van Praag i sur. 2000). Uglavnom se „obogaćene“ životinje drže u većim kavezima, većim grupama, s mogućnošću za kompleksnijim socijalnim interakcijama. Okoliš je kompleksan i varira tokom vremena

(promjena igračka, rasporeda u kavezu ili promjena mjesta hranjenja). Životinjama je često omogućena i fizička aktivnost (Van Praag i sur. 2000). Istraživani su aspekti okoliša i neki istraživači su izdvojili fizičku aktivnost kao najvažniju.

Uspoređivanjem životinja koje su imale omogućeno kretanje na pokretnoj traci ili svojevremeno, na kolutu za trčanje, s onima kojima je to bilo uskraćeno, pokazalo se kako su aktivni štakori uspješniji na specijalnim zadacima od neaktivnih (Fordyce i Wehner, 1993 i Van Praag i sur. 1999; prema Van Praag i sur. 2000). No „obogaćeni“ štakori bili su uspješniji od aktivnih štakora na specijalnim testovima poput vodenog i T- labirinta (Van Praag i sur. 2000). To nam govori da stupanj poboljšanog učenja može biti veći kod potpunog obogaćivanja okoliša nego kod okoliša u kojem je samo pridodana motorička aktivnost.

3.1. Socijalni aspekt i načini njegovog obogaćivanja

Socijalni okoliš životinje može se, što se štakora tiče, poboljšati tako da se oni drže u skupinama jer su po prirodi socijalni. To je najčešće i slučaj u laboratorijima gdje se štakori drže u istospolnim skupinama po četiri jedinke. U laboratorijima se često drži više različitih vrsta zajedno, no nije poznato kako ti zvučni i mirisni podražaji djeluju na životinje (Smith i Taylor, 1995). Ljudi u laboratoriju također su dio socijalne okoline štakora i u cilju obogaćivanja okoliša bilo bi poželjno da nisu izvor stresa, već da su životinje navikle na držanje, rukovanje s njima, laboratorijske procedure, čišćenje i slično (Smith i Taylor, 1995). Rutinske procedure u laboratoriju (vađenje krvi, injekcije) dovode do povećanja pulsa, povišenog krvnog tlaka i povećane koncentracije glukokortikoida, 30–60 minuta ili više nakon završetka manipulacije sa životinjom. Te procedure su akutno stresne za životinju (Balcombe i sur. 2004).

3.2. Nutricijski aspekt i načini njegovog obogaćivanja

U prirodi štakori provode većinu svog vremena u traženju hrane, a u laboratoriju im je ona lako dostupna, uvijek ponuđena i jednaka (standardizirane laboratorijske granule za štakore i miševu). U svrhu obogaćivanja, hrana se životinjama nakon čišćenja može sakriti i rasipati po podlozi kaveza tako da one dio svog vremena provedu u traženju hrane (Smith i Taylor, 1995). Također, može se i unutar kaveza mijenjati mjesto hranjenja. Carder i Berkovitz (1970) došli su do zaključka kao štakori preferiraju zaraditi svoju hranu, ako zadatak nije

pretežak, čak i ako im je u isto vrijeme hrana lako dostupna i ponuđena u neograničenoj količini (Van de Werd i sur. 2002).

3.3. Osjetilni aspekt i načini njegovog obogaćivanja

Obogaćivanje okoliša osjetilnim podražajima može se provoditi na razne načine. Primjer bi bili glazba s radija, ne prejakog intenziteta, koji se ponekad uključi u pozadini, mijenjanje podloge u kavezu (krpeno, metalno, pijesak, piljevina), predmeti raznih struktura i materijala različitih na dodir (glatko, hrapavo, hladno, toplo) i slično. Često je svjetlo u laboratorijima jakog intenziteta, a većina glodavaca su noćne životinje. Zbog toga bi štakorima uz različitost podražaja trebalo i omogućiti da se sklone od podražaja koji su im neugodni. U standardnom laboratorijskom okolišu oni se preko dana nemaju kamo skloniti od svjetla, a to im se može osigurati drvenim kutijama ili običnim plastičnim vodovodnim cijevima. Svijetlost posebno smeta albino štakorima sa osjetljivijim očima na koje svjetlo može djelovati degenerativno i izazivati oštećenja (Smith i Taylor, 1995).

3.4. Psihološki aspekt i načini njegovog obogaćivanja

Psihološki okoliš može se obogatiti tako da se životinji omogući kontrola nad vlastitim okolišem. Nedostatak te kontrole može izazvati stres (Wiepkema i Koolhaas, 1993; prema Van de Weerd i sur. 2002). Omogućavanje zaklona je jedno od najjednostavnijih rješenja jer životinji daje mogućnost da se sakrije u situaciji koja ju plaši, da spava kada želi ili pobjegne iz borbe sa dominantnom životinjom. Rješenja mogu biti keramičke posude za cvijeće, drvene kutije, plastične cijevi, stare pojilice i slično (Peters i Festing, 1990; prema Smith i Taylor, 1995). Štakori odrasli u okolišu u kojemu su mogli kontrolirati osvjetljenje, izvor vode i hrane bili su manje anksiozni i manje emocionalno pobudljivi u usporedbi sa kontrolnom skupinom kojoj te mogućnosti nisu bile dostupne (Joffe, 1993; prema Smith i Taylor, 1995).

3.5. Fizički aspekt i načini njegovog obogaćivanja

Najčešći način obogaćivanja fizičke prirode okoliša je povećavanje životnog prostora životinje. Mali kavezi mogu povećati vjerojatnost pojavljivanja abnormalnih stereotipnih ponašanja (Ödberg, 1987; prema Smith i Taylor, 1995). Postojeći prostor može se povećati, učiniti kompleksnijim dodavanjem razina na koje se životinje mogu penjati, ako to postojeći prostor dopušta. Primijećeno je kako miševi kojima su organizirane razine u kavezima pokazuju tendenciju obavljanja nužde na jednom mjestu te tako svoja mjesta za spavanje održavaju čistima, dok životinje u standardnim uvjetima to ne čine (Van Praag i sur. 2000). Još neki od oblika obogaćenja je materijal za gradnju gnijezda (maramice, sijeno, papir i slično) te dodavanje objekata za glodanje. Takvi dodaci zaokupljaju životinju te ona provodeći vrijeme u aktivnostima gradnje, penjanja ili glodanja poboljšava svoje fizičko stanje, troši kalorije i razvija svoj organizam na normalan način izvodeći ponašanja specifična za vrstu.

4. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja bili su utvrditi razlike u ponašanju između dvije skupine štakora. Jedne koja je odrasla u standardnim laboratorijskim uvjetima i druge koja je odrasla u obogaćenim uvjetima. Cilj je bio provjeriti postoji li razlika između ove dvije skupine u lokomociji, u eksploratornom ponašanju, razini socijabilnosti i postoji li kognitivna fleksibilnost kod životinja iz obogaćenih uvjeta.

METODE I MATERIJALI

1. Eksperimentalna skupina

Leglo (n=11) norveških štakora (*Rattus norvegicus*) je tri dana nakon koćenja, zajedno s majkom, smješteno u obogaćeni okoliš u kojem su odrasli do dobi od devet mjeseci prije početka testiranja. Nastavili su živjeti u istim uvjetima i za vrijeme trajanja testiranja. Bili su podijeljeni u dvije istospolne skupine (četiri mužjaka i sedam ženki). Obogaćivanje okoliša bilo je provedeno na nekoliko načina. Zadovoljen je socijalni faktor držanjem u istospolnim skupinama i omogućen je mirisni, zvučni i dodirni kontakt sa drugim spolom (kavezi su bili smješteni jedan uz drugi). Čišćenje kaveza provodilo se svaki drugi dan i nakon čišćenja životinje su imale priliku svoj obrok tražiti u podlozi kaveza. Podloga kaveza mijenjala se tri puta u mjesecu tako da je standardna piljevina jednom zamijenjena papirom, pijeskom ili krpama. Štakorima su svakodnevno rukovali ljudi tako da im kontakt s ljudima ne bi predstavljao stres. Jednom tjedno izlazili su u prostoriju u kojoj su bili smješteni kavezi kako bi ju slobodno razgledali, a prije povratka u kaveze u njih su dodavani novi objekti različitih materijala i oblika. Kavez je bio dimenzija 88 X 50 X 78 cm (D X Š X V), te podijeljen na dvije razine. Omogućena su mjesta za skrivanje i spavanje (plastične neprozirne cijevi i drvene kutije) i objekti za glodanje (grane ili kartonske kutije) i gradnju gnijezda (maramice i sijeno). Hrana je bila u standardiziranim granulama i neograničena obična voda. Jednom tjedno hrana je bila zamijenjena sjemenkama suncokreta i raznim vrstama voća ili povrća, a umjesto vode jednom tjedno stavljeni su razni voćni sokovi.

2. Kontrolna skupina

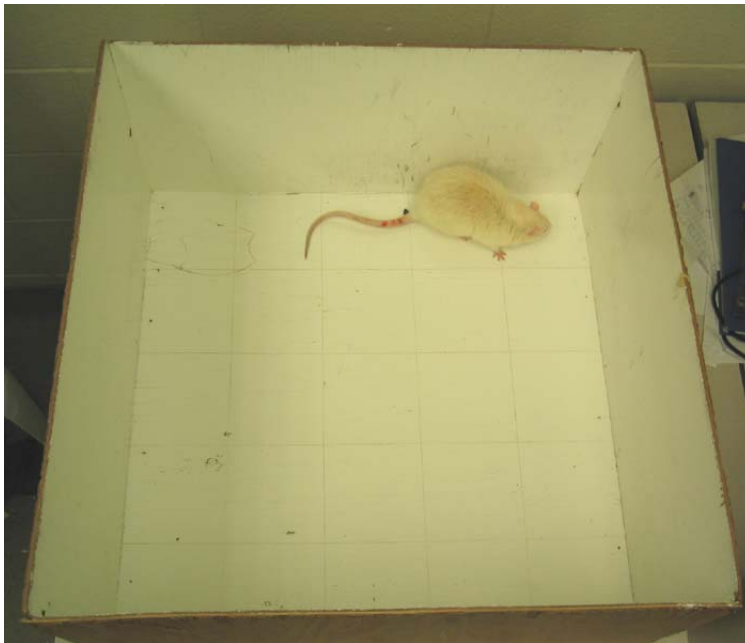
14 bijelih norveških štakora (*Rattus norvegicus*, soj Y59) okoćeno je i odraslo u standardnim laboratorijskim uvjetima. U istim uvjetima živjeli su do dobi od devet mjeseci kada je testiranje započelo, a nastavili su biti u njima i za vrijeme testiranja. Okoliš kontrolne skupine bio je standardizirani način držanja laboratorijskih štakora na biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta. Sastojao se od kaveza dimenzija 42 X 30 X 20 cm (D X Š X V), u kojima su štakori držani u istospolnim skupinama od četiri do pet jedinki.

Podloga za dno kaveza bila je piljevina, a hrana i voda bili su uvijek dostupni u neograničenim količinama. U podlozi kaveza, hrani i tekućini nije bilo nikakvih varijacija te su se uvijek hranili standardnim laboratorijskim granulama za miševе i štakore. Jedini kontakt s ljudima je bilo redovito čišćenje kaveza.

3. Testovi

Testiranje je provedeno na četiri bihevioralna testa. Test otvorenog polja, test ploče s rupama, test socijalnog izbora i T-labirint.

3.1. Test otvorenog polja (open field)



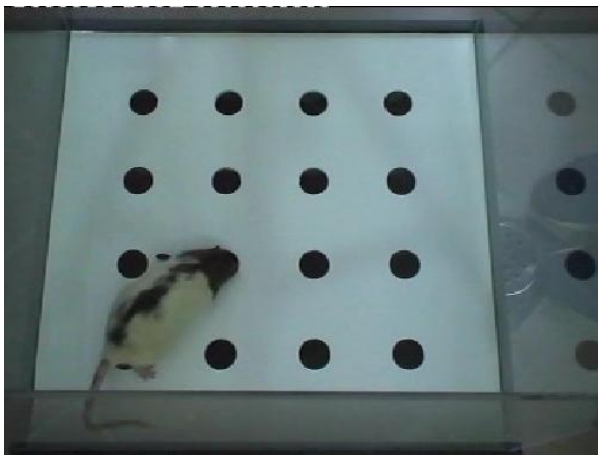
Slika 4: prikaz aparature za test otvorenog polja

Standardni test otvorenog polja uobičajeno se koristi za mjerenje motorike, eksploratornih i anksioznih ponašanja. Mjerenje testom otvorenog polja, prvi su opisali Hall i Ballachey kao vrijednu metodu za evaluaciju životinjinog spontanog ponašanja kao odgovor na novi okoliš (Barclay i Gibson, 1982). Može se koristiti za mjerenje učinaka droga ili, kao u slučaju ovog

istraživanja za mjerenje bihevioralnih odgovora na novu situaciju. Najčešće je sastavljen od svijetle kvadratne ploče okružene zidovima kako životinja ne bi pobjegla. Životinju se stavlja u aparaturu, u ovom slučaju smješšana je u kut kvadrata, a može se mjeriti ponašanje u vremenskom razdoblju od 3-15 minuta. Odabrano razdoblje opažanja bilo je pet minuta. Testom otvorenog polja promatra se konflikt koji životinja ima između urođenog straha od

svijetlih i otvorenih prostora nasuprot želji da istražuje novi prostor u kojem se nalazi. Kad su anksiozni, štakori imaju tendenciju držati se zidova i ne prilaziti sredini (tigmotaksa). U tom kontekstu, anksioznost se mjeri kao stupanj u kojem životinja izbjegava centar polja (preuzeto sa <http://www.panlab.com/panlabWeb/Software/>) Polje je često podijeljeno u više kvadrata pa se kao mjera lokomocije uzima broj prijeđenih kvadrata u polju, u razdoblju opažanja. U ovom slučaju označeno je samo središnje polje, a kao mjera lokomocije korišten je broj prelazaka preko crte tog središnjeg kvadrata. Kao mjera anksioznosti uzeto je čišćenje. To ponašanje je sastavni dio života glodavca i kao kompleksni i hijerarhijski proces osjetljivo je na utjecaje droga ili stresa. Gamma aminomaslačna kiselina (GABA) uključena je u proces čišćenja krzna u glodavaca, a isto tako i u anksiozna ponašanja (Kalueff i Tuohimaa, 2004). Pod utjecajem stresa, štakori imaju tendenciju povećati frekvenciju čišćenja svog krzna (Daniels, 2008), te je frekvencija čišćenja u testu otvorenog polja uzeta je kao mjera za anksioznost.

3.2. Test ploče s rupama (Holeboard test)



Slika 4: Aparatura za test ploče s rupama

Guranje glave u rupu na testu ploče s rupama uobičajeno se koristi kao indikator eksploratornog ponašanja. U standardnoj verziji koja je korištena u ovom istraživanju na ploči se nalazi 16 rupa, a ploča je kao i u testu otvorenog polja, ograđena da životinja ne bi mogla pobjeći. Bilježi se istraživanje rupe guranjem glave u nju toliko

da potpuno prekrije oči (preuzeto sa http://tse-systems.com/download/TSE_Hole-Board_20080724.pdf). Također, istražuje se i konflikt urođenog straha od centra polja nasuprot želje za istraživanjem. Zbog toga je za mjeru anksioznog ponašanja uzet broj guranja glave u rupe koje se nalaze na sredini polja. Veći broj posjeta središnjim rupama značio bi manje anksiozno ponašanje.

3.3. Test socijalnog izbora (social aproach test)



Slika 5: Test socijalnog izbora

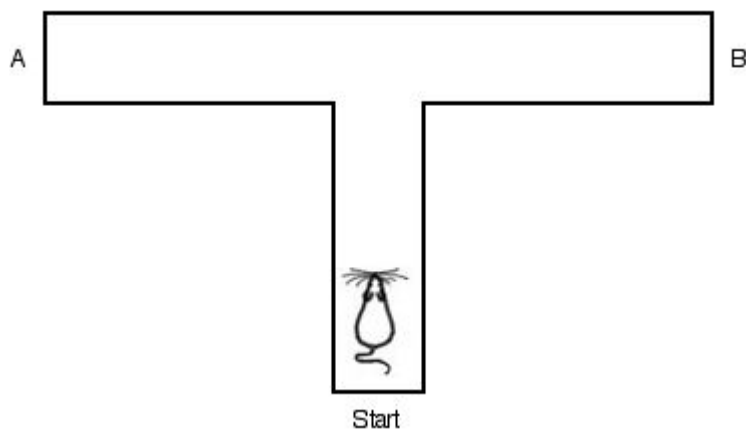
Test socijalnog izbora najčešće se koristi za mjerenje socijalnog aspekta anksioznosti. Test se sastoji od tri odjeljka. U srednjem odjeljku se nalazi testna životinja, s jedne strane je testnoj životinji nepoznati štakor istoga spola, a u odjeljku s druge strane nesocijalni objekt. U ovom testu mjeri se vrijeme koje štakor provede u pojedinom odjeljku. (Crawley i suradnici, 2007).

Kod štakora koji su prije testa doživjeli stres, primjećuje se tendencija izbjegavanja odjeljka u kojem je nepoznati štakor (Nicolas i Prinssen, 2006) i povećava se vrijeme provedeno u nesocijalnom odjeljku. Štakoru se prije testiranja omogućuje habituacija na srednji odjeljak od 5 – 10 minuta nakon čega ga se pušta da slobodno istražuje sva tri odjeljka, od kojih jedan sadržava nepoznatog štakora istog spola, a drugi nepoznati nesocijalni objekt. U slučaju ovog istraživanja svaki štakor imao je pet minuta habituacije na srednji odjeljak, nakon čega su maknute pregrade i on je slobodno mogao istraživati (10 minuta) sva tri odjeljka. U desnom odjeljku nalazio se mladi štakor istog spola, nepoznat testnoj životinji, a u lijevom odjeljku nalazila su se dva flomastera. Ti objekti, bez socijalne vrijednosti, također su bili nepoznati testnoj životinji. Aparatura je očišćena nakon svakog štakora kako mirisi prethodne životinje ne bi ometali novu životinju u istraživanju odjeljaka.

3.4. T- Labirint

T - Labirint je, kako mu i samo ime kaže, u obliku slova T. Najčešće se koristi u testovima pamćenja, jednostavnog učenja ili preferencija strana kod miševa i štakora. Testiranje započinje tako da testna životinja kreće od baze slova T i napreduje prema račvanju

labirinta. Na lijevom ili desnom kraju slova T obično se nalazi nagrada, u jednom ili u oba kraja. Test ima samo dvije opcije koje životinja može odabrati. Nekada se može raditi i bez nagrade da se utvrdi na primjer prirodna preferencija strane miša ili štakora. Odabire li štakor ili miš radije lijevi ili desni put? Često se koristi kao test za socijalnu preferenciju, preferenciju hrane ili mirisa ili u zadacima prostornog učenja (preuzeto sa <http://www.anymaze.com/tmaze.htm>). U slučaju ovog istraživanja, T-labirint je korišten kao test za kognitivnu rigidnost. Nakon što su štakori naučili na kojoj se strani nagrada uvijek nalazi, strana je zamijenjena i mjerio se broj pokušaja koji je štakorima trebao da odbace ponašanje koje više nije efikasno i zamjene ga novim. Aparatura je očišćena nakon svakog štakora kako mirisi prethodne životinje ne bi ometali novu životinju u izvršavanju zadatka.



REZULTATI I RASPRAVA

1. Eksperiment 1: Test otvorenog polja

Eksperiment je proveden bez prethodnog upoznavanja štakora sa testnom situacijom, tako da bi se moglo izmjeriti ponašanje u novoj situaciji. Testiranje je izvedeno tako da je svaki štakor proveo pet minuta u aparaturi, tj. na bijeloj plohi otvorenog polja po kojoj se mogao slobodno kretati. Svakog se štakora položilo u isti kut ploče i izvađen je van nakon pet minuta. Čišćenje aparature radilo se nakon svakog štakora tako da novog ne ometaju mirisi prethodnog. Mjerene varijable su okomita lokomocija, čija se frekvencija zabilježila svaki put kad bi se štakor uspravio na zadnje noge, pridržavajući se ili ne pridržavajući za stjenke aparature. Vodoravna lokomocija predstavlja kretanje štakora po ploči. Na sredini je bio izdvojen kvadrat te je mjera za lokomociju bilo svako prelaženje štakora preko crte s minimalno dvije noge. Kao mjera anksioznosti uzeta je frekvencija čišćenja, a ona se bilježila svaki puta kada bi se štakor zaustavio i započeo čišćenje svoga krzna, bilo samo glave ili cijelog tijela. Rezultati su dobiveni deskriptivnim mjerama, aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, te su dvije skupine (kontrolna i eksperimentalna) uspoređene analizom varijance (ANOVA).

Tablica 1: Aritmetičke sredine i standardne devijacije za ponašanja mjerena testom otvorenog polja (okomita lokomocija, vodoravna lokomocija i čišćenje)

	skupina	Aritmetička sredina (M)	Standardna devijacija (sd)	N
Okomita lokomocija (podizanje)	S1	3,86	2,93	14
	S2	15,91	4,65	11
Vodoravna lokomocija (prekid crte)	S1	2,23	1,36	14
	S2	3,09	1,64	11
Čišćenje (anksioznost)	S1	4,46	2,69	14
	S2	2,00	1,73	11

Legenda: S1=kontrolna skupina (standardni okoliš)
S2=eksperimentalna skupina (obogaćeni okoliš)
N=broj životinja u skupini

Tablica 2: Analiza varijance za test otvorenog polja

	F	Značajnost (p)
Okomita lokomocija	62,62*	0,00
Vodoravna lokomocija	1,97	0,17
Čišćenje	6,77*	0,01

Legenda: * - značajno uz nivo rizika od 5 %

Gledajući dobivene rezultate iz tablice 1, možemo vidjeti da su aritmetičke sredine (M) u lokomociji veće kod eksperimentalne skupine. Što se okomite lokomocije tiče, koja je mjerena kada se štakor podizao na zadnje noge, samostalno ili pridržavajući se za stjenke, za kontrolnu skupinu ona iznosi 3,86 dok je kod eksperimentalne skupine 15,96. Podizanje na zadnje noge je jedan od načina na koji štakor istražuje prostor u kojem se nalazi. Manja razlika u aritmetičkim sredinama vidljiva je u vodoravnoj lokomociji ($M_s1=2,23$, $M_s2=3,09$). Vodoravna lokomocija mjerena je kao frekvencija prekida crte. Na testu otvorenog polja, kako je prethodno navedeno, bio je označen središnji kvadrat. Bilježio se svaki prijelaz crte s barem dvije šape. Nešto veća aritmetička sredina vidljiva je kod kontrolne skupine u frekvenciji čišćenja krzna ($M=4,46$).

Među autorima koji su testirali štakore i miševe na testu otvorenog polja, neki su pronašli veću razinu aktivnosti kod „obogaćenih“ nego kod kontrolnih životinja (Ardila, 1977; Holson, 1986; Manosevitz, 1970; Manosevitz i Joel, 1973; Manosevitz i Montemayor, 1973; Prior i Sacheser, 1994; prema Van de Weerde, 1994). Neki istraživači došli su do suprotnih rezultata. Kod njih su štakori i miševi iz obogaćenih uvjeta pokazali manju aktivnost ili se po lokomociji nisu razlikovali od štakora i miševa držanih u standardnim uvjetima. (Denberg i Morton, 1962; Rose, 1985; prema Van de Weerd, 1994). Među tim autorima postoje varijacije u fizičkim karakteristikama aparature (veličina, oblik, boja polja), u proceduri istraživanja (jednokratna ili ponovljena mjerenja) i u okruženju gdje je testiranje provedeno (osvjetljenje, količina pozadinske buke i slično). Uz te faktore pojavljuje se i faktor trajanja testiranja koji u istraživanjima varira od kratkih (2–3 minute) do duljih (8–15 minuta) U prvih nekoliko minuta testiranja (2.5), štakori iz obogaćenih uvjeta pokazuju značajno veću motoričku aktivnost od štakora iz standardnih uvjeta (Van de Weerde, 1994). U istraživanjima testom otvorenog polja, koja traju 8 minuta i dulje (do 15 minuta), zabilježena je dulja ustrajnost u lokomociji životinja odraslih u standardnim laboratorijskim uvjetima.

Na početku testiranja, „obogaćene“ životinje pokazuju veću lokomociju, no nakon nekoliko minuta ona se smanjuje. Tako da rezultati ovise o duljini opažanja. Kod kraćih testiranja rezultati će pokazati veću lokomociju „obogaćenih“ životinja, dok će dulja opažanja pokazati veću lokomociju „standardnih“ životinja zbog slabije sposobnosti habituacije (Van de Weerd, 1994).

Iz rezultata prikazanih u tablici 2 možemo vidjeti kako postoji statistički značajna razlika između okomite lokomocije kontrolne i eksperimentalne skupine ($F=62,62$, $p<0,05$). Na temelju toga možemo zaključiti kako su štakori iz obogaćenih uvjeta frekventnije od onih iz standardiziranih uvjeta koristili uzdizanje na zadnje noge kako bi istražili prostor u kojem se nalaze. Ovo testiranje možemo svrstati u kraće istraživanje gdje se ponašanje opazalo unutar pet minuta tako da je veća lokomocija „obogaćenih“ štakora očekivana. Ta razlika nije statistički značajna u vodoravnoj lokomociji ($F= 1,97$, $p>0,05$). Što znači da su obje skupine u podjednakoj mjeri prilazile sredini polja koja štakorima prirodno predstavlja anksioznu situaciju. Veća motorička aktivnost primijećena kod eksperimentalne skupine što se tiče istraživanja okoline uzdizanjem na zadnje noge, no obje skupine su podjednako ulazile u sredinu.

Statističku značajnu razliku što se anksioznog ponašanja tiče možemo vidjeti kod varijable čišćenja. ($F=6,77$, $p<0,05$). Čišćenje je uzeto kao mjera za anksioznost zbog toga što pod utjecajem stresa štakori imaju tendenciju povećati frekvenciju čišćenja svog krzna (Daniels, 2008). Prema statistički značajno većoj aritmetičkoj sredini varijable čišćenja kod kontrolne skupine vidljivo je kako su oni češće svoju eksploraciju novog prostora zaustavljali zbog anksioznosti.

2. Eksperiment 2: Test ploče s rupama

Eksperiment je provoden bez prethodnog upoznavanja štakora sa testnom situacijom tako da bi se moglo izmjeriti ponašanje u novoj situaciji. Testiranje je izvođeno tako da je svaki štakor proveo 5 minuta u aparaturi, tj. na bijeloj plohi na kojoj se nalazilo 16 rupa. Štakor se po njoj mogao slobodno kretati. Cilj ovog testa je izmjeriti eksploratorno ponašanje koje se očituje kroz frekvenciju guranja glave u rupu. Veća frekvencija guranja glave u rupu smatra se izraženijim eksploratornim ponašanjem. U obzir su uzimana jedino ona kada je životinja gurnula glavu toliko da prekrije oči. Kao mjera anksioznosti uzete su četiri rupe u sredini jer sami boravak u sredini ploče predstavlja anksioznu situaciju životinji te je veća frekvencija guranja glave u središnje rupe uzeta kao pokazatelj manje anksioznosti. Svakog se štakora na početku položilo na sredinu ploče i vadilo ga se van nakon pet minuta. Čišćenje aparature radilo se nakon svakog štakora tako da sljedećeg ne ometaju mirisi prethodnog. Rezultati su dobiveni deskriptivnim mjerama, aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, te su dvije skupine (kontrolna i eksperimentalna) uspoređene analizom varijance (ANOVA).

Tablica 3: Aritmetičke sredine i standardne devijacije za ponašanja mjerena testom ploče s rupama (ukupno guranja glave u rupu i broj guranja glave u središnje rupe)

	Skupina	Aritmetička sredina(M)	Standardna devijacija(sd)	N
Broj ukupnih guranja glave	S1	11,92	6,40	13
	S2	29,45	7,55	11
Guranje glave u središnje rupe	S1	2,85	1,57	13
	S2	5,91	2,12	11
Okomita lokomocija (podizanje)	S1	1,38	1,45	13
	S2	9,18	2,78	11

Legenda: S1=kontrolna skupina (standardni okoliš)
S2=eksperimentalna skupina (obogaćeni okoliš)
N=broj životinja u skupini

Tablica 4: Analiza varijance za test ploče s rupama

	F	Značajnost (p)
Broj ukupnih guranja glave	37,94*	0,00
Guranje glave u središnje rupe	16,48*	0,00
Okomita lokomocija (podizanje)	77,58*	0,00

Legenda: * - značajno uz nivo rizika od 5 %

Iz tablice 3 možemo vidjeti kako je „obogaćena“ skupina više od kontrolne skupine istraživala prostor sa rupama gurajući glavu u rupe ($M_s1=11,92$, $M_s2=29,45$). Isto tako i više su prilazili i istraživali rupe koje su se nalazile na sredini ploče ($M_s1=2,85$, $M_s2=5,91$), što smo uzeli kao mjeru anksioznosti zbog urođenog straha glodavaca od sredine, tj. od otvorenih prostora. Iz tablice 4 vidimo da su te razlike statistički značajne. Štakori iz obogaćenih uvjeta značajno su više istraživali rupe gurajući glavu u njih ($F=37,949$, $p<0,05$). Isto tako značajno više su se upuštali u istraživanje središnje četiri rupe ($F=16,485$, $p<0,05$).

Kao i u prethodnom eksperimentu „obogaćeni“ štakori više su istraživali okomitom lokomocijom, odnosno uzdizanjem na zadnje noge, od kontrolnih ($M_s1=1,38$, $M_s2=9,18$). U slučaju ovog eksperimenta kada su im za eksploraciju ponuđene rupe, eksperimentalna skupina je smanjila okomitu lokomociju. Kako je vidljivo iz tablice 1 ($M=15,91$), kad su se nalazili na otvorenom polju bez rupa za istraživanje, više su istraživali prostor uzdizanjem na zadnje noge nego u testu ploče s rupama ($M=9,18$). Istraživanje uzdizanjem na zadnje noge u usporedbi sa rezultatima testa otvorenog polja smanjeno je kod obje skupine. U tablici 4 možemo vidjeti da je razlika u okomitoj lokomociji i ovdje statistički značajna, „obogaćene“ životinje više istražuju na taj način od „standardnih“.

Životinje iz obogaćenih uvjeta manje su plašljive i emocionalnije te pokazuju više eksploratornog ponašanja. Traže više varijabilnosti u novim i nepoznatim podražajima od životinja u standardnim uvjetima (Joseph i Gallagher, 1980; prema Van de Weerd, 2002). Istraživanje provedeno od strane Van de Weerd i suradnika (2002) pokazalo je kako okoliši koje su uspoređivali imaju utjecaj na eksploratorno ponašanje. Oni su držali miševe u standardnim, obogaćenim i super-obogaćenim uvjetima (kavezi veličine 840 cm² sa penjalicama, materijalom za glodanje, kutijama za gnijezdo i plastičnim tunelima) Miševi iz super-obogaćenih uvjeta su više vremena provodili u interakciji s novim objektima u

usporedbi sa životinjama iz ostalih uvjeta držanja. Pokazivali su veću razinu eksploracije što odgovara manjoj razini emocionalnosti i straha. Visoka emocionalnost inhibira eksploratorno ponašanje i obrnuto (Van de Weerd i sur. 2002). Još jednim prethodnim istraživanjem Van de Weerd i suradnici (1994) došli su do rezultata kako kod miševa dvomjesečno obogaćivanje okoliša povećava eksploratorno ponašanje. Iz rezultata ovog eksperimenta vidljiva je manja anksioznost i veća razina eksploracije kod „obogaćenih“ štakora nego kontrolne skupine što je u skladu s rezultatima prije opisanih istraživanja.

Teško je objasniti koja je motivacija u pozadini eksploracije kada životinja nije gladna niti žedna. Prema literaturi moguća objašnjenja su: (1) Istraživanje je motivirano strahom, (2) informacije koje životinja skupi istraživanjem smanjuju strah, (3) eksploratorno ponašanje je samo odgovor na novi podražaj i funkcija mu je skupiti informacije o tom podražaju, (4) eksploracija nije manifestacija jednog motiva već kombinacija utjecaja znatiželje i straha (Whishaw i sur. 2006).

Ekspiriment 3: Test socijalnog izbora (social approach test)

Ekspiriment je proveden tako da je svaki štakor u testnoj aparaturi proveo 15 minuta. Prvih 5 minuta odnosilo se na habituaciju u središnjem odjeljku, a idućih se 10 opazalo ponašanje štakora. Nakon što je završilo pet minuta habituacije, maknute su pregrade između odjeljaka i svaki štakor je imao 10 minuta za slobodno istraživanje svih odjeljaka. U desnom odjeljku bio je testnom štakoru nepoznat štakor koji je bio odvojen žičanim odjeljkom tako da nije mogao sam prići i započeti interakciju sa testnom životinjom. U lijevom odjeljku nalazio se nepoznati nesocijalni objekt (dva flomastera). Mjerilo se vrijeme provedeno u svakom od odjeljaka, te vrijeme provedeno u interakciji sa socijalnim kao i sa nesocijalnim objektom. Nije se mjerilo vrijeme provedeno u središnjem odjeljku. Nakon svakog štakora aparatura je očišćena kako mirisi ne bi ometali novu životinju koja ulazi u test. Rezultati su dobiveni deskriptivnim mjerama, aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, te su dvije skupine (kontrolna i eksperimentalna) uspoređene analizom varijance (ANOVA).

Tablica 5: Aritmetičke sredine i standardne devijacije za ponašanja mjerena testom socijalnog izbora.

	Skupina	Aritmetička sredina(M)	Standardna devijacija(sd)	N
Vrijeme kraj socijalnog objekta	S1	192,54	216,34	13
	S2	344,45	107,14	11
Vrijeme u interakciji sa soc. objektom	S1	17,31	15,50	13
	S2	102,55	88,34	11
Vrijeme kraj nesocijalnog objekta	S1	155,69	207,75	13
	S2	142,00	91,09	11
Vrijeme u interakciji sa nesoc.objektom	S1	8,62	9,54	13
	S2	7,45	6,06	11

Legenda: S1=kontrolna skupina (standardni okoliš)

S2=eksperimentalna skupina (obogaćeni okoliš)

N=broj životinja u skupini

Napomena: vrijednosti su izražene u sekundama

Tablica 6: Analiza varijance za rezultate testa socijalnog izbora

	F	Značajnost (p)
Vrijeme kraj socijalnog objekta	4,47*	0,04
Vrijeme u interakciji sa soc. objektom	11,76*	0,00
Vrijeme kraj nesocijalnog objekta	0,04	0,84
Vrijeme u interakciji sa nesoc.objektom	0,12	0,73

Legenda: * - značajno uz nivo rizika od 5 %

Tablica 7: Prikaz razlika između aritmetičkih sredina vremena provedenog u socijalnom i nesocijalnom odjeljku unutar skupina.

	Vrijeme kraj soc.objekta	Vrijeme kraj nesoc.objekta	t - test	
	M	M	t	p
S1 (N=13)	192,54	155,69	0,36	0,72
S2 (N=11)	344,45	142,00	3,55*	0,00

Legenda: S1=kontrolna skupina (standardni okoliš)

S2=eksperimentalna skupina (obogaćeni okoliš)

N=broj životinja u skupini

* - značajno uz nivo rizika od 5 %

Iz tablice 5 možemo vidjeti kako je skupina iz standardnih laboratorijskih uvjeta u prosjeku 3.21 minutu od 10 minuta u aparaturi provela uz nepoznatog štakora (M=192,54). „Obogaćene“ su životinje to u prosjeku činile 5.74 minute (M= 344,45). Iz tablice 6 možemo vidjeti kako je ta razlika statistički značajna (F=4,47; $p < 0,05$). „Obogaćene“ životinje pokazale su veću socijabilnost, provodeći više vremena u odjeljku u kojem se nalazio nepoznati štakor istog spola.

Skupina iz standardnih uvjeta je u ovom testu pokazala pasivnost pa su često odabrali jedan odjeljak i u njemu proveli većinu vremena u mirovanju. Kod te skupine možemo i vidjeti veću standardnu devijaciju kod vremena koje su provodili kraj socijalnog i vremena koje su

provodili kod nesocijalnog objekta. U vremenu provedenom kod socijalnog objekta za kontrolnu skupinu standardna devijacija iznosi 216,34, a za „obogaćene“ životinje ona je 107,14. U vremenu kraj nesocijalnog objekta „standardne“ životinje su pokazale više varijabilnosti u ponašanju i veću pasivnost odabirući jedan od tri odjeljka i mirujući u njemu do kraja testiranja.

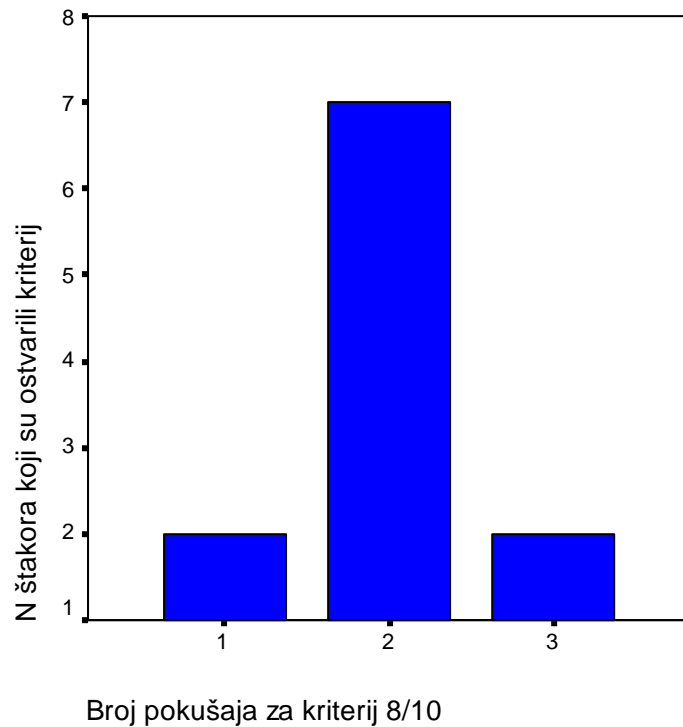
Aritmetička sredina (M) vremena provedenog u interakciji sa nepoznatim štakorom za „obogaćene“ životinje iznosi 102,55 sekundi, a za standardne životinje 17,31 sekundi. To bi značilo da su „obogaćene“ životinje od prosječnih 5.74 minute provedene u odjeljku sa nepoznatom životinjom u interakciji s njom u prosjeku proveli 1.78 minute. To je statistički značajna razlika ($F=11,769$; $p<0,05$), prema čemu možemo zaključiti da su „obogaćene“ životinje značajnije više vremena na testu socijalnog izbora provele u interakciji s nepoznatom životinjom od „standardnih“ životinja koje su od 10 minuta u prosjeku to činile samo 17,31 sekundi.

Utvrđeno je t-testom kako je skupina „obogaćenih“ životinja statistički značajno više vremena provela u odjeljku sa nepoznatom životinjom ($t=3,56$; $p<0,05$). Skupina životinja iz standardnih uvjeta je podjednako birala odjeljak s nepoznatom životinjom kao i odjeljak s nepoznatim socijalnim objektom te kod njih ne postoji statistički značajna razlika u preferenciji odjeljaka ($t=0,36$; $p<0,05$). Ta razlika u skupini „standardnih“ životinja ne postoji zbog pasivnosti koju smo prije naveli. Oni su nakon kratke lokomocije započeli mirovanje u jednom od tri odjeljka, bez obzira da li je u njemu bila nepoznata životinja, nepoznati objekt ili se radilo o praznom odjeljku. Vrijeme provedeno kraj nepoznate životinje reflektira anksiozno stanje u kojemu se životinja nalazi. Pokazalo se kako štakori koji dožive stresni događaj prije testiranja povećavaju izbjegavanje socijalnog odjeljka i raste vrijeme provedeno u nesocijalnom odjeljku (Nicolas i Prinssen, 2006). U ovom slučaju primijećena je veća socijalnost „obogaćenih“ životinje te su one statistički značajno više vremena provodile u socijalnom odjeljku nego u odjeljku s nepoznatim objektom. „Standardne“ životinje nisu pokazale tendenciju izbjegavanja odjeljka sa nepoznatom životinjom već su se bez diskriminacije odjeljaka umirile u jednom i tamo ostale do kraja testiranja. Statistički značajne razlike između grupa nisu nađene u vremenu provedenom kraj nepoznatog nesocijalnog objekta ($F=0,04$; $p>0,05$), kao ni u vremenu provedenom u interakciji s tim objektom ($F=0,12$; $p>0,05$),

Eksperiment 4: T – Labirint

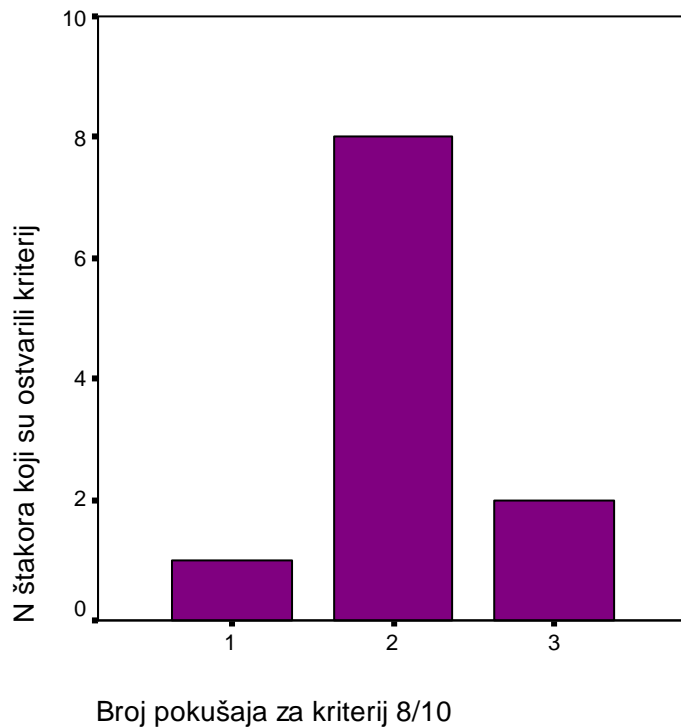
Testiranju na T-labirintu prethodilo je upoznavanja štakora sa situacijom. Prije samog testiranja štakori su stavljeni u labirint kako bi shvatili da se u njemu nalazi nagrada i što moraju učiniti da bi do nje došli. Nagrada je bila jedan mililitar majoneze na jednom od dva krajeva labirinta. U razdoblju uvježbavanja nije bilo pravila u tome gdje se hrana nalazila. Nekad je bila s lijeve strane T-labirinta, nekad s desne ili u oba kraja labirinta. U razdoblju uvježbavanja bilo je bitno da štakori shvate što trebaju napraviti za nagradu i da se habituiraju na T-labirint. Trebali su biti dovoljno opušteni da u njemu potraže i pojedu hranu. Uvježbavanje je trajalo dva dana. Nakon ta dva dana sve „obogaćene“ životinje u labirintu su tražile i uzimale nagradu. „Standardne“ životinje nisu uspjele izvršiti ovaj zadatak jer su sve odbijale kretanje unutar labirinta i ostajale su u mirovanju na početnoj točki aparature. Svi subjekti iz ove grupe morali su biti isključeni jer su odbijali kretanje, zbog toga u ovom eksperimentu nema kontrolne skupine pomoću koje bi utvrdili kakav je utjecaj okoliš imao na kognitivnu fleksibilnost/rigidnost. Nakon završetka predtreninga hrana je smještena s lijeve strane labirinta. Štakori su morali zadovoljiti kriterij 8/10. To je značilo da od 10 pokušaja u barem 8 slučajeva odaberu točnu stranu labirinta, odnosno onu stranu na kojoj se nalazi nagrada. Brojao se broj pokušaja koji je životinjama trebao da dođu do tog kriterija. Kada su kriterij zadovoljile životinjama je zamijenjeno mjesto nagrade na desnu stranu T-labirinta. Sada se mjerio broj pokušaja koji je potreban životinjama da ponašanje koje više nije efikasno jer ne donosi nagradu, treba da ga zamjene novim efikasnim za novu situaciju.

Grafički prikaz 1: Broj štakora i broj pokušaja koji je bio potreban za ostvarivanje kriterija 8/10 kada je hrana bila postavljena u lijevu stranu T-labirinta



Kognitivna rigidnost je ustrajanje u ponašanju koje više nije efikasno (Gray i sur. 1986). Iz grafičkog prikaza 1 možemo vidjeti kako su štakori iz obogaćenih uvjeta nakon trećeg pokušaja postizali kriterij 8/10. U prvom testiranju hrana je bila postavljena u lijevu stranu T-labirinta. Iz prvog pokušaja dvije su životinje ostvarile zadani kriterij u posjećivanju lijeve strane kako bi tamo pronašli nagradu. U drugom pokušaju kriterij je zadovoljilo još 7 životinja, a u trećem i preostale dvije od njih ukupno 11.

Grafički prikaz 2: Broj štakora i broj pokušaja koji je bio potreban za ostvarivanje kriterija 8/10 nakon što je mjesto hrane promijenjeno na desnu stranu



Nakon što je zadovoljen kriterij posjećivanja lijeve strane u 8 od 10 pokušaja kod svih 11 štakora, promijenjeno je mjesto nagrade. Ona je tada stavljena s desne strane. U prvom pokušaju kriterij desne strane zadovoljio je 1 štakor. U drugom pokušaju, prethodno efikasno ponašanje odlazanja na lijevu stranu, promijenilo je još 8 štakora, a u trećem pokušaju desnu stranu je u 8 od 10 slučajeva počelo odabirati i preostala 2 štakora. „Obogaćene“ su životinje pokazale sposobnost promjene svojeg ponašanja kada ono više nije efikasno i ne donosi nagradu. Ove rezultate nije bilo moguće usporediti sa životinjama iz standardnih laboratorijskih uvjeta jer one nisu uspješno završile zadatak. Kada su bile stavljene u T-labirint nisu odabirale niti jednu stranu već su mirovale na početku labirinta. Iako rezultati „obogaćenih“ životinja nisu mogli biti uspoređeni s rezultatima onih iz standardnih uvjeta, prema nalazu istraživanja Tanimure i suradnika (2007) kod miševa se primjećuje poboljšanje proceduralnog učenja, reverzibilnog učenja i konitivne fleksibilnosti ako su držani u većem i kompleksnijem okolišu.

ZAKLJUČAK

1. Na temelju rezultata možemo zaključiti kako postoje statistički značajne razlike u okomitoj lokomociji između „obogaćenih“ i „standardnih“ životinja. Životinje iz obogaćenih uvjeta češće koriste ovu vrstu motoričke aktivnosti za istraživanje novog okoliša. Analizom nije nađena statistički značajna razlika u vertikalnoj lokomociji, no pronađena je značajna razlika u frekvenciji čišćenja. „Standardne“ životinje su češće od „obogaćenih“ motoričku aktivnost iskazivali kroz čišćenje krzna što je uzeto kao pokazatelj veće anksioznosti.
2. Analiza eksploratornog ponašanja pokazala je kako životinje iz obogaćenih uvjeta statistički značajno više istražuju. Razlika je dobivena u ukupnom istraživanju rupa kao i u istraživanju rupa koje su se nalazile na sredini ploče što je pokazatelj manje anksioznosti. Također su i na ovom testu „obogaćene“ životinje više od standardnih koristile uzdizanje na zadnje noge za istraživanje novog prostora u kojem se nalaze.
3. Što se socijalnosti tiče, životinje iz obogaćenog okoliša provode više vremena kraj nepoznatog štakora nego životinje iz standardnih laboratorijskih uvjeta. Češće odabiru socijalni odjeljak od nesocijalnog i značajnije više vremena provode u interakciji sa nepoznatom životinjom. Životinje iz standardnih laboratorijskih uvjeta ne pokazuju preferenciju u odabiru odjeljka te nema statistički značajne razlike u vremenu provedenom u socijalnom ili nesocijalnom odjeljku. Statistički značajne razlike između grupa nisu nađene u vremenu provedenom kraj nepoznatog nesocijalnog objekta kao ni u vremenu provedenom u interakciji s tim objektom.
4. Što se kognitivne rigidnosti tiče, usporedba između grupa nije bila moguća zbog toga što niti jedna životinja iz kontrolne skupine nije uspješno završila test. Sve „obogaćene“ životinje su do 3. pokušaja ostvarile kriterij 8/10. Isto se ponovilo kada je nagrada premještena na desnu stranu labirinta. Do trećeg pokušaja sve životinje su ostvarile kriterij 8/10 ulaza u točnu ruku labirinta.

LITERATURA

- ✓ Ambrose, N., Morton, D. B. (2000). *The use of cage enrichment to reduce male mouse aggression*. Journal of Applied Animal Welfare Science, 3, 117-125.
- ✓ Balcombe, J. P., Barnard, N. D. i Sandusky, C. (2004). *Laboratory routines cause animal stress*. Contemporary Topics in Laboratory Animal Science, 43, 42-51.
- ✓ Barclay, L. L. i Gibson, E. G. (1982). *Spontaneous open-field behavior in thiamin-deficient rats*. Journa of. Nutrition, 112, 1899-1905.
- ✓ Callard, M. D., Bursten, S. N. i Price, E. O. (2000). *Repetitive backflipping behaviour in captive roof rats (Rattus rattus) and the effect of cage enrichment*. Animal Welfare, 9, 139-152
- ✓ Crawley, N. J., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, L. T., Hill, M. J., Young, B. N., Nadler, J. J., Moy, S. S., Young, J. L., Caldwell, K. H., Young, S. W. (2007). *Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments*. Neuropeptides, 41, 145–163.
- ✓ Daniels, U. M. W., de Klerk Uys, J., van Vuuren, P. i Stein, J. D. (2008). *The development of behavioral and endocrine abnormalities in rats after repeated exposure to direct and indirect stress*. Neuropsychiatry Diseas Treatmant, 4, 451–464.
- ✓ DeLuca, A. M. (1997). *Environmental enrichment: does it reduce barbering in mice?* AWIC Newsletter 8, pp. 7–8.
- ✓ Engellenner, W. J., Goodlett, C. R., Burrigh, R. G. i Donovick, P. J. (1982). *Environmental enrichment and restriction: Effects on reactivity, exploration and maze learning in mice with septal lesions*. Physiology and Behavior, 29, 885-893.
- ✓ Fragaszy, Munkenbeck, D. F. i Perry, S. (2003). *The Biology of Traditions: Models and Evidence*. Cambridge University Press. pp. 165.
- ✓ Gray, W. J., Dean, S. R. i Serenty, L. M. (1986). *Lateral preference as a predictor of cognitive rigidity*. Journal of Clinical Psychology, 42, 956-961
- ✓ Hadley, C., Hadley, B., Ephraima, S., Yang, M. i Lewis, M. H. (2006). *Spontaneous stereotypy and environmental enrichment in deer mice (Peromyscus maniculatus): Reversibility of experience*. Applied Animal Behaviour Science 97, 312-322.

- ✓ Kalueff, V. A. i Tuohimaa, P. (2004). *Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs*. *European Journal of Pharmacology*, 508, 147–153.
- ✓ Kempermann, G., Kuh, H. G. i Gage, F. H. (1997). *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. *Nature*, 386, 493-495.
- ✓ Kingston, S. G. i Hoffman-Goetz, L. (1996). *Effect of environmental enrichment and housing density on immune system reactivity to acute exercise stress*. *Physiology and Behavior*, 60, 145-150
- ✓ Nicolas B. L. i Prinssen, M. P. E. (2006). *Social approach-avoidance behavior of a high-anxiety strain of rats : effects of benzodiazepine receptor ligands*. *Psychopharmacologia*, 184, 65-74.
- ✓ Phillbin, A. B. N. (1998). *Towards an understanding of stereotypic behaviour in laboratory macaques*. *Animal Technology*, 49, 19-33..
- ✓ Powell, S. B., Newman, H. A., McDonald, T. A., Bugenhagen, P. i Lewis, M. H. (2000). *Development of spontaneous stereotyped behavior in deer mice: effects of early and late exposure to a more complex environment*. *Developmental Psychobiology*, 37, 100-108.
- ✓ Rampon, C. (2000). *Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice*. *Nature Neuroscience* 3, 205–206.
- ✓ Rauscher, F. H., Robinson, K. D. i Jens, J. J. (1998). *Improved maze learning through early music exposure in rats*. *Neurological Research*, 20, 427-432.
- ✓ Reinhardt, V. i Reinhardt, A. (2005). *Variables, refinement and environmental enrichment for Rodents and Rabbits kept in research institutions. Making life easier for animals in laboratories*. Animal Welfare Institute, Washington, D. C
- ✓ Sharp, E. P. i La Regina, C. M. (1998). *A volume in the laboratory animal pocket reference series*. CRC Press, London
- ✓ Smith, C.P. i Taylor, V. (1995). *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals: Birds, Cats, Dogs, Farm Animals, Ferrets, Rabbits, and Rodents*. AWIC Resource Series No. 2. U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD and Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Potters Bar, Herts, UK, pp. 145-212.
- ✓ Tanimura, Y., Yang, C. M. i Lewis, H. M. (2007). *Procedural learning and cognitive flexibility in a mouse model of restricted, repetitive behaviour*. *Behavioral Brain Research*, 189, 250-256.

- ✓ Van Praag, H., Kempermann, G. i Gage H. F. (2000). *Neural consequences of environmental enrichment*. Nature reviews, neuroscience, 1, 191-198.
- ✓ Van de Weerd, A. H., Aarsen L. E., Mulder, A., Kruitwagen, J. J. L. C., Hendriksen, M. F. C. i Baumans, V. (2002). *Effects of environmental enrichment for mice: Variation in experimental results*. Journal of applied animal welfare science, 5, 87–109.
- ✓ Van de Weerd, A. H., Van Elderen, D. A. I., Baumans, V., Zethof, T., Van Zutphen, M. F. L., Van der Heyden, J. (1994). *Effects of enrichment on open field test behaviour*. Journal of Experimental Animal Science 36, 98-105.
- ✓ Van de Weerd, A. H., Baumans, V., Koolhaas, M. J. i Van Zutphen, M. F. L. (1994). *Strain specific behavioral response to environmental enrichment in the mouse*. Journal of Experimental Animal Science 36, 117-127.
- ✓ Whishaw, Q. I., Gharbawie, A. O., Clark, J. B. i Lehmann, H. (2006). *The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security*. Behavioural Brain Research, 171, 230–239
- ✓ Wiedenmayer, C. (1997). *Stereotypies resulting from a deviation in the ontogenetic development of gerbils*. Behavioural Processes, 39, 215-221.
- ✓ Young, D. (1999). *Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective*. Nature Medicine 5, 448–453.
- ✓ Preuzeto sa <http://www.ratbehavior.org/RatVision.htm>. 13.09.2009.
- ✓ Preuzeto sa http://www.ratbehavior.org/norway_rat_ethogram.htm#PlayFighting. 13.09.2009.
- ✓ Preuzeto sa <http://www.panlab.com/panlabWeb/Software/> 12.09.2009.
- ✓ Preuzeto sa http://tse-systems.com/download/TSE_Hole-Board_20080724.pdf. 09.09.2009.
- ✓ Preuzeto sa <http://www.anymaze.com/tmaze.htm>. 09.09.2009.